جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

بررسی اثر مینوسیکلین بر میزان بیان ژن گیرنده $GABA_A$ در نواحی هیپوکمپ و پیریفورم مغزی، در طی روند کیندلینگ آمیگدال در موش صحرایی

حسن رامشینی[۱]، محمد محمدزاده[۲]، سید مهدی بهشتی نصر[۳]*

[۱] استادیار بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، گروه علمی زیست شناسی، تهران، ایران
[۲] استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار
[۳] مربی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

نشانی نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، سید مهدی بهشتی نصر
E-mail: beheshti.m1985@gmail.com

وصول:۹۲/۱۱/۱۲، اصلاح:۹۳/۱/۲۴، پذیرش:۹۳/۲/۱۷

چکیده

مقدمه: مینوسیکلین دارای اثرات ضد تشنجی است. از آن جایی که برخی داروهای ضد تشنجی باعث افزایش میانجی عصبی گابا در مغز می شوند، لذا هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن گیرنده $GABA_A$ در نواحی هیپوکمپ و پیریفورم مغزی، به دنبال تزریق مینوسیکلین در طی روند کیندلینگ آمیگدال در موش صحرایی می باشد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳ گروه موش صحرایی نژاد ویستار(۲٤ سر) پس از جراحی استرئوتاکسیک و یک هفته دوره بهبودی، تحریکات کیندلینگ (۲ بار در روز با فاصله زمانی شش ساعت) را دریافت می‌کردند. در گروه اول (n=۸) حیوانات هیچ گونه تحریکی را دریافت نمی کردند، به حیوانات گروه دوم (n=۸) روزانه سالین (1 ml/kg)، و گروه سوم (n=۸) مینوسیکلین با غلظت ۲۵ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم حیوان (mg/kg) به صورت داخل صفاقی (٦۰ دقیقه قبل از هر تحریک) تزریق شد. دو ساعت بعد از آخرین تحریک مغز حیوانات خارج شده و بیان ژن گیرنده های $GABA_A$ در نواحی هیپوکمپ و پیریفورم این سه گروه با یکدیگر مقایسه شدند. برای تحلیل داده ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه وتست تعقیبی Tukey در سطح معناداری $p<۰/۰۵$ استفاده گردید.

یافته‌ها: در گروه سوم، تزریق ۱۰ روزه مینوسیکلین (۲۵ mg/kg) توانست ADD تجمعی را نسبت به گروه کنترل (گروه دوم) به طور معنی‌داری کاهش($P<۰/۰۰۱$) و مدت زمان تاخیری تا مراحل ٤ ($P<۰/۰۱$) و ٥ ($P<۰/۰۰۱$) تشنج را به طور معنی‌داری افزایش داد. تزریق این دارو قبل از تحریکات کیندلینگ همچنین از تاثیر افزایشی ناشی از تحریک الکتریکی بر mRNA زیر واحد ٢γ گیرنده $GABA_A$ در هیپوکامپ و قشر پیریفورم نیز جلوگیری کرد .

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد تزریق مینوسیکلین قبل از تحریکات الکتریکی، اثر ضد تشنجی دارد و این اثر را از طریق کاهش بیان زیر واحد گیرنده های $GABA_A$ اعمال می کند.

کلمات کلیدی: *صرع، کیندلینگ، مینوسیکلین، گیرنده $GABA_A$.*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

صرع از جمله اختلالات رایج عصبی است که دانسته های فعلی در مورد مکانیسم های ایجاد و درمان قطعی آن ناکامل است. از این رو با استفاده از مدل های آزمایشگاهی ایجاد تشنج، مطالعات فراوانی در حال انجام است. یکی از مدل های رایج تشنج، کیندلینگ است. در این مدل با تحریک مکرر (الکتریکی یا شیمیایی) ناحیه خاصی از مغز در حیوانات آزمایشگاهی تشنج ایجاد می شود (۱). مطالعات الکتروفیزیولوژیک، فارماکولوژیک و مورفولوژیک (۱-۳) تشابه بین کیندلینگ و صرع لوب گیجگاهی را نشان داده‌اند. به کمک این مدل آزمایشگاهی می‌توان علاوه بر بررسی نحوه ارتباط بین نواحی مختلف مغزی و مطالعه نقش داروها و مواد شیمیایی، در مورد مکانیسم های درگیر در ایجاد و پیشرفت صرع نیز تحقیق شود (٤).

مطالعه بیان ژن های دخیل در تشنج به شناخت هر چه بیش تر صرع و در نتیجه درمان آن کمک خواهد کرد. در حین تشنج های صرعی و روند صرع زایی تولید شاخه‌های دندریتی و شبکه‌های عصبی افزایش می‌یابد. در این فرایند انواع انتقال دهنده های عصبی انتقال دهنده عصبی ، میانجی های عصبی ، انواع سایتوکاینها و هم چنین گیرنده‌های آنها دستخوش تغییر خواهند شد. گلوتامات و گاماآمینوبوتیریک اسید (گابا) از جمله انتقال دهنده های عصبی مهم مغز هستند. از تعادل خارج شدن این دو سیستم انتقال دهنده عصبی پایه و اساس رویداد صرع است (٥, ٦).

گابا انتقال دهنده عصبی مهاری اصلی مغز است. گابا توسط آنزیم گلوتامات دِکربوکسیلاز از گلوتامات به وجود می‌آید. بعضی از داروهای ضد تشنجی باعث افزایش گابا در مغز می شوند (۷) ، هم چنین مشاهده شده است که به دنبال مدل های مختلف صرعی بیان این گیرنده ها کاهش می یابد (۸, ۹). اگرچه گزارش هایی مبنی بر افزایش طولانی مدت گیرنده های $GABA_A$ به دنبال صرع پایدار (توسط پیلوکارپین) (۱۰) و هم چنین افزایش رهایش گابا در هیپوکمپ و کاهش حساسیت گیرنده های گابا در این ناحیه به دنبال صرع توسط پنتیلن تترازول (۱۱)، نیز وجود دارد. بنابر این با توجه به این که در تحقیقات پیشین مشخص شد مهار گیرنده گابای نوع A (۱۱)، سیستم مهاری مغز را کاهش و موجب بروز تشنج می شود و با توجه به تغییرات زیر واحد $\gamma 2$ در هیپوکامپ (۱۲)، در این تحقیق زیر واحد γ_2 گیرنده $GABA_A$ انتخاب گردید.

از آن جا که در تحقیقات قبلی ما نشان داده شد که مینوسیکلین اثرات ضد تشنجی دارد (۱۳, ١٤) ، با توجه به اثرات مهاری فعال شدن گیرنده های گابا، احتمال می رود که مینوسیکلین از طریق اثر روی زیر واحدهای $\gamma 2$ گیرنده $GABA_A$ اثرات خود را اعمال کند بنابراین هدف از این تحقیق بررسی میزان بیان ژن گیرنده های $GABA_A$ در نواحی مختلف مغزی، به دنبال تزریق مینوسیکلین در طی روند کیندلینگ آمیگدال در موش صحرایی است.

روش انجام آزمایش ها

پس از آماده کردن وسایل جراحی استریل شده، حیوان توسط کتامین و رامپون (۱۰۰ mg/kg، داخل صفاقی) بی هوش می شود (۱۵). سپس موهای سر حیوان را تراشیده، حیوان را در دستگاه استریوتاکس قرار داده و پس از ثابت کردن سر حیوان و بتادینه کردن پوست سر، برشی در خط وسط با تیغ جراحی داده می شود. پس از آشکار شدن کامل سطح استخوان جمجمه، و تمیز کردن آن با الکل، نقطه برگما مشخص می شود. موقعیت مسیر آمیگدال در سطح جمجه نسبت برگما (بر حسب میلیمتر: ۲/۵ – L +8/4 =AP= و ۷/۵ V= نسبت به سخت شامه) می باشد (١٦). پس از بستن پیچ های لنگرگاه، الکترود تک قطبی و الکترودهای تحریک و ثبات در محل های تعیین شده برای تحریک و ثبت از آمیگدال قرار داده می شوند.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

یک هفته پس از جراحی، از شدت آستانه به منظور تحریک دادن استفاده می شد. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان مورد نظر توسط جریانی به شدت ۱۰ میکروآمپر تحریک می گردید. اگر امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۵ ثانیه) ثبت می شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می شد. در غیر این صورت، هر بار شدت جریان ۱۰ میکروآمپر به فواصل ۵ دقیقه افزایش داده می شد تا وقتی که امواج تخلیه متعاقب ثبت گردد ، سپس حیوانات با این شدت جریان آستانه روزانه دو بار (با فاصله زمانی حداقل ٦ ساعت) تحریک می‌شدند، تا مراحل مختلف تشنج را نشان داده و کیندل شوند (۱۷).

روش ایجاد کیندلینگ:

برای تحریک حیوان از روش کیندلینگ استفاده شد. در این روش حیوانات با موج مربعی تک فازی با مشخصات فرکانس ٦۰ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۲ ثانیه تحریک شدند. این تحریکات هر روز ۲ بار تا زمان نشان دادن مرحله ۵ تشنج اعمال شد (۱۷) با ادامه تحریکات به تدریج هم‌زمان با ثبت امواج تخلیه متعاقب، مراحل تشنج نیز قابل مشاهده می‌باشند. با توجه به این که مقایسه ی میانگین داده های گروه ها در کمیت ADD به صورت تجمعی بهتر صورت می گیرد و نمایش نتایج نیز روشن تر خواهد بود؛ کمیت مذکور به شکل تجمعی (حاصل جمع عدد هر کمیت در هر بار تحریک با داده های تحریک های قبلی) تجزیه تحلیل و نمایش داده شده است.

گروه بندی:

مراحل انجام کار در گروه‌های مورد استفاده در این آزمایش به این ترتیب بود که در گروه اول حیوانات پس از جراحی تحریکات کیندلینگ را دریافت نمی کردند. در گروه دوم ٦۰ دقیقه قبل از تحریکات روزانه کیندلینگ، سالین (1 ml/kg) تزریق داخل صفاقی شد. مراحل کاری گروه سوم مشابه گروه دوم است اما به جای سالین، مینوسیکلین (25 mg/kg) دوز مناسب به دست آمده از تحقیقات پیشین (۱۸) تزریق داخل صفاقی شد. پس از کیندل شدن تا ۲ ساعت بعد از آخرین تحریک، مغز حیوانات خارج شده و نواحی هیپوکمپ و پیریفورم استخراج گردید و بلافاصله به یخچال ۸٤- منتقل شده و تا زمان استخراج RNA در آن نگهداری شد. در ادامه، نمونه های استخراجی RNA برای واکنش زنجیره ای پلیمراز آماده شدند.

روش اندازه گیری بیان ژن:

به منظور تعیین بیان ژن زیر واحد γ_2 گیرنده $GABA_A$ و GAPDH در هیپوکامپ و قشر پیریفورم، ابتدا بافت مورد نظر هموژنیزه شده و سپس کل RNA موجود در بافت ها با کمک محلول استخراج RNX^+ (سیناژن، ایران) و بر اساس پروتوکل کلروفرم- الکل استخراج گردید (۱۹). برای بررسی کیفیت، RNA روی ژل آگارز ۱٪ ران گردید. به علاوه آزمایش غلظت سنجی RNA؛ نشان دهنده درجه ی خلوص قابل قبولی از RNA بود. سنجش غلظت به کمک اسپکتروفتومتر ی مورد بررسی قرار گرفت به صورتی که نسبت به دست آمده برای طول موج های A ۲٦۰-۲۸۰° در محدوده ی۲- ۱/۸ بود که نشان دهنده درجه ی خلوص قابل قبول RNA است .

با استفاده از ۵ میکرولیتر از مجموع RNA استخراج شده، پرایمر Oligo-dt (فرمنتاز، آلمان)، آنزیم نسخه بردار معکوس (فرمنتاز، آلمان) و پرایمر PCR master (سیناژن، ایران)؛ cDNA ساخته شد. به منظور تکثیر قطعه از cDNA مربوط به ژن های فوق از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. فرآیند PCR با کمک آنزیم پلیمراز Taq (پارستوس، ایران) و پرایمر های اختصاصی پیشرو و معکوس برای هر ژن انجام شد (جدول ۱). شرایط PCR از نظر دمای اتصال پرایمر ها، تعداد سیکل و میزان PCR در آزمایش های جداگانه بهینه سازی شد. ۵ میکرولیتر از محصول هر واکنش پس از

مخلوط شدن با ۱ میکرولیتر Loading Day در ژل ۲٪ آگارز آغشته به اتیدیوم بروماید به همراه DNA ladder، ۱۰۰bp ران شد. پس از پایان الکتروفورز از ژل تحت نور UV تصویر برداری شده و تراکم باندهای مورد نظر توسط نرم افزار Image J نسخه ۱.۴۳ اندازه گیری شده و برای هر نمونه تراکم باند مربوط به ژن نسبت به GAPDH محاسبه شد.

روش آماری:

برای تجزیه و تحلیل آماری از آخرین نسخه نرم افزار Statistica و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه وتست تعقیبی Tukey برای مقایسه تغییرات مولکولی و رفتاری استفاده گردید. سطح معناداری نیز $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

با استفاده از آزمون تی مستقل میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع امواج تخلیه‌های متعاقب بین دو گروه سالین و مینوسایکلین تفاوت معنی‌داری با هم نداشت($P= ۰/۸۲$) و این بدان معناست که استعداد ابتلا به حملات تشنجی در تمامی گروه‌ها یکسان بود.

کمیت ADD در حیواناتی که روزانه (۱۰ روز) مینوسیکلین (۲۵ mg/kg) دریافت می‌کردند نسبت به گروه دریافت کننده سالین به طور معنی داری کاهش یافت ($P< ۰/۰۰۱$) (شکل ۱).

تعداد تحریکات لازم برای رسیدن حیوانات به مراحل چهارم($P< ۰/۰۱$) و پنجم ($P< ۰/۰۰۱$) تشنج در گروه تزریق مینوسیکلین نسبت به گروه سالین افزایش معنی داری داشت (شکل ۲).

بررسی های آماری نشان داد بیان ژن γ_2 گیرنده $GABA_A$ در هیپوکامپ و قشر پیریفورم دو ساعت بعد از آخرین تحریک الکتریکی در هر دو گروه سالین و مینوسیکلین نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت ($P< ۰/۰۰۱$) (شکل۳ A و B). هم چنین مشاهده شد بیان این ژن در گروه مینوسیکلین نسبت به گروه سالین به طور معنی داری در هیپوکامپ کاهش یافت ($P< ۰/۰۰۱$) (شکل۳ A). به علاوه بیان این ژن در قشر پیریفورم گروه مینوسیکلین نیز نسبت به سالین کاهش معنی داری یافت ($P< ۰/۰۰۱$) (شکل۳ B).

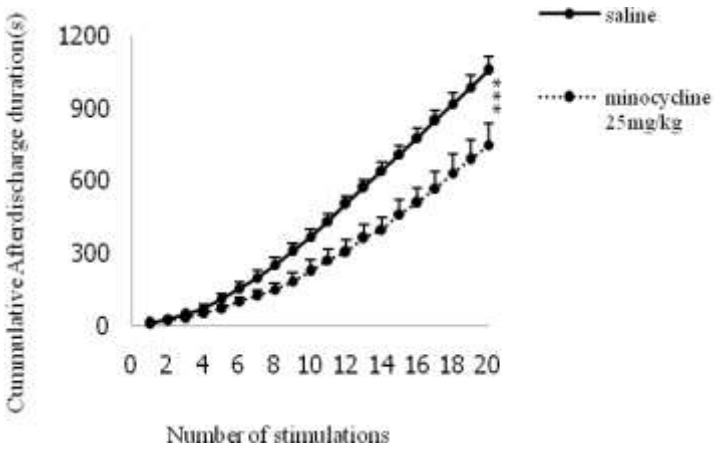
بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مینوسیکلین مدت زمان لازم برای کیندلینگ آمیگدال را افزایش می‌دهد به طوری که تزریق ۱۰ روزه مینوسیکلین (۲۵ mg/kg) توانست ADD تجمعی را نسبت به گروه کنترل (گروه سالین) به طور معنی داری کاهش دهد، هم چنین تعداد تحریکات لازم برای بروز مراحل سوم تا پنجم تشنج به طور معنی-داری با تزریق روزانه مینوسیکلین افزایش یافت. مینوسیکلین بیان ژن های γ_2 گیرنده $GABA_A$ دخیل در ایجاد تشنج را نیز تحت تاثیر قرار داده و از تغییر آن ها در حین تشنج جلوگیری می کند.

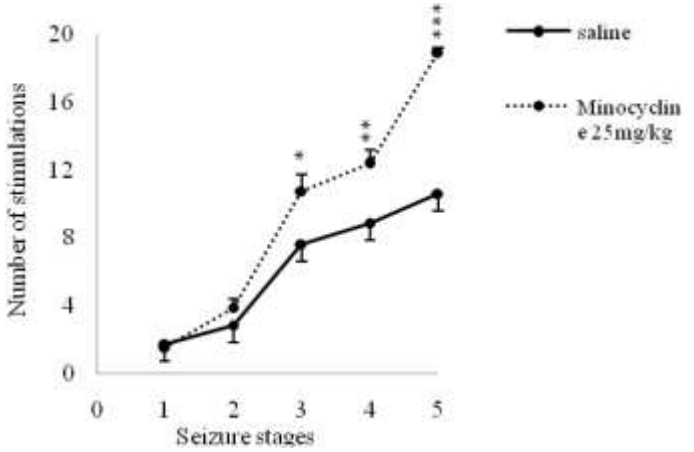
مینوسیکلین از مشتقات نسل دوم خانواده تتراسایکلین است (۲۰)، اگر چه در ابتدا به عنوان آنتی بیوتیک شناخته شده بود، اما به دنبال آن شواهدی مبنی بر خاصیت ضد التهابی این دارو به دست آمد. از جمله عملکردهای شناخته شده مینوسیکلین، مهار فعالیت میکروگلیاها و آستروسیت‌هاست (۲۱). یکی دیگر از خواص مینوسیکلین ویژگی آنتی اکسیدانی آن است. بر اساس مطالعات و مشاهدات آزمایشگاهی، این دارو

جدول ۱: توالی پرایمر های γ_2 گیرنده $GABA_A$ و GAPDH مورد استفاده برای تکثیر به روش RT-PCR

نام ژن	نوع پرایمر	توالی
GAPDH	پیشرو	5'GGGTGTGAACCACGAGAAAT 3'
	پسرو	5' ACTGTGGTCATGAGCCCTTC 3'
γ_2GABA_A	پیشرو	**5'** CGGAAACCAAGCAAGGATAA 3'
	پسرو	5' AGTCCTTGCCATCCAAACAC 3'

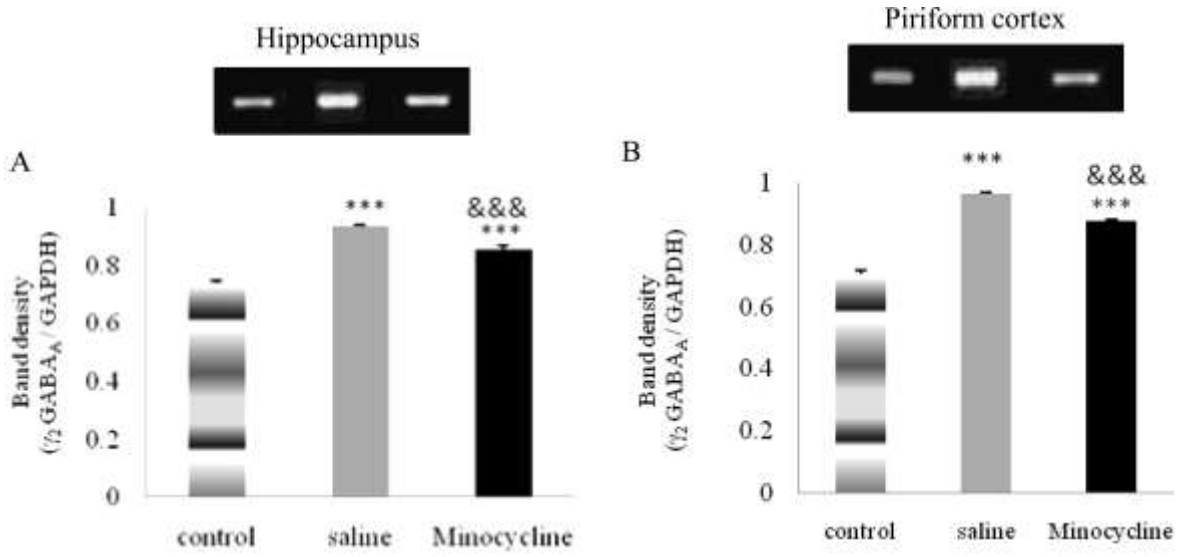


شکل ۱: اثر تزریق روزانه مینوسیکلین بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی (Cummulative Afterdischarge duration) طی روند کیندلینگ آمیگدال. تزریق مینوسیکلین باعث کاهش مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی نسبت به گروه کنترل (تزریق سالین) می شود. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین و به شکل تجمعی نشان داده شده‌اند. *** نشان دهنده P< ۰/۰۰۱ (n=۸).



شکل ۲: تأثیر مینوسیکلین بر بروز مراحل رفتاری تشنج طی روند کیندلینگ آمیگدال. در گروه تزریقی مینوسیکلین تعداد تحریکات برای رسیدن حیوانات به مراحل ۳ تا ۵ نسبت به گروه تزریقی سالین افزایش معنی‌داری نشان داد. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین و به شکل تجمعی نشان داده شده‌اند. * نشان دهنده P< ۰/۰۵، ** نشان دهنده P< ۰/۰۱ *** نشان دهنده P< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه تزریق سالین می باشد (n=۸).

به طور مستقیم پاک کننده رادیکال‌های آزاد و مهار کننده آنزیم‌هایی مثل نیتریک اکساید سنتاز می‌باشد (۲۲, ۲۳). از آن‌جایی‌که در هنگام تشنج به محض رهایش گلوتامات، غلظت کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد و نیتریک اکساید سنتاز فعال می‌شود؛ بنابراین مینوسیکلین شاید با مهار نیتریک اکساید سنتاز از پیشرفت تشنج و مرگ سلولی جلوگیری کند (۲٤).



شکل۳: تغییرات بیان ژن گیرنده $GABA_A$ پس از کیندلینگ در بافت هیپوکمپ (A) و پیریفورم (B) در گروه کنترل، سالین و مینوسیکلین. شکل نشان می دهد تحریکات الکتریکی موجب افزایش بیان این ژن ها در هیپوکامپ و پیریفورم در هر دو گروه سالین و مینوسیکلین نسبت به گروه کنترل می شود. همچنین تزریق مینوسیکلین از تغییرات بیان ژن ها ایجاد شده توسط کیندلینگ الکتریکی جلوگیری می کند. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. *** نشان دهنده P< ۰/۰۰۱ در مقایسه کنترل و &&& نشان دهنده P< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه تزریق سالین می باشد. (n=٦).

خاصیت دیگر مینوسیکلین ضد آپوپتوزی بودن آن است (۲۵)، از جمله مهم ترین عواملی که در مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول فعال می‌شوند، کاسپاز ۱و ۳ هستند (۲٦)، مینوسیکلین می‌تواند به طور مستقیم با کاهش تجمع کلسیم سبب پایداری غشای میتوکندری شده و از رهایش سیتوکروم C و دیگر فاکتورهای آپوپتوتیک به داخل سیتوپلاسم، جلوگیری کند و موجب محافظت نورونی می‌شود (۲۷). شاید به واسطه‌ی این مکانیسم پیشرفت تشنج به واسطه مینوسیکلین کُند شود.

تزریق داخل صفاقی مینوسیکلین پارامتر الکتروفیزیولوژیک ADD تجمعی را نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش داد. ADD نشانگر فعالیت مدارهای موضعی در ناحیه ثبت است که به خاصیت ذاتی نورون‌ها و مدارهای آن ناحیه بستگی دارد، و به نظر می‌رسد مینوسیکلین با مهار مدارهای نورونی ناحیه آمیگدال اثر کاهشی بر روی این پارامتر در روند کیندلینگ دارد . این پژوهش مینوسیکلین تعداد تحریکات لازم برای شروع مراحل ۱ تا ۳ تشنج (تشنجات موضعی) ناشی از کیندلینگ الکتریکی آمیگدال را نسبت به گروه کنترل افزایش داد اگر چه از نظر آماری معنی دار نبود. هم چنین نشان داده شد که تزریق داخل صفاقی مینوسیکلین تعداد تحریکات لازم برای شروع مرحله ٤ تشنج را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد مینوسیکلین مرحله عمومی شدن تشنج را در کیندلینگ آمیگدال طولانی کرده است زیرا که S_4L شاخص سرعت عمومی شدن حملات تشنجی است و مربوط به درگیر شدن مدارهای ساقه مغز است که منجر به عمومی شدن تشنج می‌شود. از طرفی تزریق داخل صفاقی مینوسیکلین تعداد تحریکات لازم برای شروع مرحله ۵ تشنج را به طور معنی داری افزایش داد. نتایج تحقیق حاضر در مورد مدت زمان تأخیری تا شروع مراحل تشنجی مشابه پژوهش احمدی راد و

همکاران بود(۲۸). اگرچه در تحقیق حاضر اثرات ضد تشنجی بیش تری از مینوسیکلین مشاهده شد. برای مثال کاهش ADD که یکی از دلایل تفاوت در نتایج می باشد به علت تفاوت در مدل های تشنجی است.

تغییرات بیان ژن دیگری که در این تحقیق مورد بررسی قرار دادیم، زیر واحد γ_2 گیرنده $GABA_A$ است که یک جزء مهم مولکولی پیچیده سیناپسی می باشد که به تشکیل کمپلکس گیرنده و جا به جایی گیرنده در سطح سلول کمک می کند و در تنظیم حساسیت گیرنده $GABA_A$ به بنزودیازپین نقش به سزایی دارد (۲۹, ۳۰). ارزیابی بیان ژن زیر واحد γ_2 گیرنده $GABA_A$ در این تحقیق نشان داد که به دنبال تحریکات الکتریکی بیان این ژن به طور معنی داری در هیپوکمپ و قشر پیریفورم افزایش می یابد. این افزایش ممکن است یک مکانیسم سازشی در مقابل تشنج باشد که در مدل های دیگر تشنجی نیز دیده شده است.

مینوسیکلین از افزایش بیان ژن مذکور در هیپوکامپ و قشر پیریفورم جلوگیری کرد. با توجه به این که افزایش گیرنده گابایکی از مکانیسم های مهاری تشنج است، افزایش فعالیت گاباارژیک به دنبال تشنج به عنوان یک مکانیسم حفاظتی است که از اثرات آسیب رسان صرع به نورون ها جلوگیری می کند. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد در کشت سلول های گرانولی مخچه، تنظیم بیان mRNA زیر واحد $GABA_A$ توسط فعالیت گیرنده N متیل دی آسپارتات (NMDA) کنترل می شود. بنابراین فعالیت این گیرنده گلوتاماتی ممکن است تنظیم کننده اصلی فعالیت گاباارژیک باشد (۳۱).

با توجه به این که علاوه بر گیرنده NMDA سایر گیرنده های یونوتروپیک گلوتاماتی نیز درتغییرات مورفولوژیکی پایانه های آکسون های گاباارژیک نقش دارند و باعث افزایش رهایش خودبه خودی گابا می شوند، به نظر می رسد که تنظیم سیستم گاباارژیک می تواند تحت تاثیر فعالیت این گیرنده ها قرار گیرد (۱۲). در یک بررسی دیگر، سطح بیان ۱۳ نوع زیرواحد گیرنده $GABA_A$ با استفاده از RT-PCR بعد از آخرین تشنج در همه نواحی هیپوکمپ حیوان کیندل شده مورد مطالعه قرار گرفت. نشان داده شد که زیر واحد $\gamma2$ به طور معنی داری افزایش یافته بود. تغییر در بیان این گیرنده یک پاسخ کلی نورون ها به کیندلینگ در این ناحیه مغزی می باشد (۱۲). در همین راستا یک سری از مطالعات الکتروفیزیولوژیک نشان دادند به دنبال تحریک الکتریکی، بیان زیرواحد $\gamma2$ افزایش می یابد. این بررسی ها نشان دادند که افزایش میزان بیان mRNA $GABA_A$ بیان گر مقابله سلول ها با افزایش تحریک پذیری می باشد (۳۲). از طرف دیگر این احتمال وجود دارد که مینوسیکلین با کاهش شدت تحریک پذیری بر التهاب ناشی از صرع تاثیر بگذارد.

نتیجه گیری

به نظر می رسد در حین روند کیندلینگ به عنوان یک مدل صرعی افزایش بیان گیرنده های گابابه عنوان یک مکانیسم محافظتی در سیستم عصبی مرکزی عمل می کنند. از آنجایی که مینوسیکلین از طریق مسیرهای ضدالتهابی از پیشرفت روند کیندلینگ ممانعت می کند ، افزایش بیان گیرنده های گابا به عنوان مکانیسم جبرانی در سیستم عصبی

مرکزی ضروری به نظر نمی رسد و در نتیجه این مکانیسم وارد عمل نمی گردد.

سپاسگزاری

از دانشگاه پیام نور واحد سبزوار به خاطر حمایت مالی این پروژه تحقیقاتی تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Traynelis SF, Dingledine R, McNamara JO, Butler L, Rigsbee L. Effect of kindling on potassium-induced electrographic seizures in vitro. Neurosci Lett. 1989;105(3):326-32.
2. McNamara JO. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. Curr Opin Neurol Neurosurq. 1993;6(4):583-7.
3. Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. Brain Res. 1990;535(2):195-204.
4. Sato M, Racine RJ, McIntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1990;76(5):459-72.
5. Coulter DA. Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. Int Rev Neurobiol. 2001;45:237-52.
6. Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. Epilepsy Res. 1999;36(2-3):189-204.
7. Loscher W. Valproate enhances GABA turnover in the substantia nigra. Brain Res. 1989;501(1):198-203.
8. Nishimura T, Schwarzer C, Gasser E, Kato N, Vezzani A, Sperk G. Altered expression of GABA(A) and GABA(B) receptor subunit mRNAs in the hippocampus after kindling and electrically induced status epilepticus. Neuroscience. 2005;134(2):691-704.
9. Tsunashima K, Schwarzer C, Kirchmair E, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus III: altered messenger RNA expression in kainic acid-induced epilepsy. Neuroscience. 1997;80(4):1019-32.
10. Fritschy JM, Kiener T, Bouilleret V, Loup F. GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. Neurochem Int. 1999;34(5):435-45.
11. Ramanjaneyulu R, Ticku MK. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. Eur J Pharmacol. 1984;98(3-4):337-45.
12. Walsh LA, Li M, Zhao TJ, Chiu TH, Rosenberg HC. Acute pentylenetetrazol injection reduces rat GABAA receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with No effect on benzodiazepine binding site density. J Pharmacol Exp Ther. 1999;289(3):1626-33.
13. Beheshti Nasr S, Moghimi A, Mohammad-Zadeh M. Effect of minocycline on amygdala kindling acquisition in rats. Physiol Pharmacol. 2012;16(3):222-30.
14. Beheshti Nasr S, Mohammad-Zadeh M, Moghimi A. The Role of Minocycline on Amygdala-Kindled Seizures in Rat. J Sabzevar Univ of Med Sci. 2012;19(1):14-25.
15. Gurbanova AA, Aker RG, Sirvanci S, Demiralp T, Onat FY. Intra-amygdaloid injection of kainic acid in rats with genetic absence epilepsy: the relationship of typical absence epilepsy and temporal lobe epilepsy. J Neurosci. 2008;28(31):7828-36.
16. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: Academic press. 2007.
17. Shindo A, Nakamura T, Matsumoto Y, Kawai N, Okano H, Nagao S, Itano T, Tamiya T. Seizure suppression in amygdala-kindled mice by transplantation of neural stem/progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. Neurol Med Chir. 2010;50(2):98-106.
18. Beheshti Nasr SM, Moghimi A, Mohammad-Zadeh M, Shamsizadeh A, Noorbakhsh SM. The effect of minocycline on seizures induced by amygdala kindling in rats. Seizure. 2013;22(8):670-4.
19. Rodrigo MC, Martin DS, Redetzke RA, Eyster KM. A method for the extraction of high-quality RNA and protein from single small samples of arteries and veins preserved in RNAlater. J Pharmacol Toxicol methods. 2002;47(2):87-92.
20. Buller KM, Carty ML, Reinebrant HE, Wixey JA. Minocycline: a neuroprotective agent for hypoxic-ischemic brain injury in the neonate? J Neurosci Res. 2009;87(3):599-608.
21. Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W. Minocycline as a neuroprotective agent. Neuroscientist. 2005;11(4):308-22.

22. Arzimanoglou A, Hirsch E, Nehlig A, Castelnau P, Gressens P, Pereira de Vasconcelos A. Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review. Epileptic Disord. 2002;4(3):173-82.
23. Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. J Neurochem. 2005;94(3):819-27.
24. Plane JM, Shen Y, Pleasure DE, Deng W. Prospects for minocycline neuroprotection. Arch Neurol. 2010;67(12):1442-8.
25. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC,et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. Nature. 2002;417(6884):74-8.
26. Shin HY, Cho YJ, Cho KJ, Kim HW, Kim HJ, Kim GW, Lee BI, Heo K. Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. J Korean Epilepsy Soc. 2006; 10(1): 3-10.
27. Wang J, Wei Q, Wang CY, Hill WD, Hess DC, Dong Z. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. J Biol Chem. 2004;279(19):19948-54.
28. Ahmadirad N, Shojaei A, Javan M, Pourgholami MH, Mirnajafi-Zadeh J. Effect of minocycline on pentylenetetrazol-induced chemical kindled seizures in mice. Neurol Sci. 2013:[Epub ahead of print]
29. Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Giorgi O. Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. J Pharmacol Exp Ther. 1992;262(2):792-800.
30. Nagai T, Suzuki Y ,Arai H, Imai K, Kodaka R, Itagaki Y, Tanaka J, Okada S. Effect of Pentylentetrazol (PTZ) Kindling on GABAergic System: A Histochemical Study by Staining for GABA-Transaminase (GABA-T). Jpn J Psychiatry Neurol. 1993;47(2):392-3.
31. Hirao T, Morimoto K ,Yamamoto Y, Watanabe T, Sato H, Sato K, Sato S, Yamada N, Tanaka K, Suwaki H. Time-dependent and regional expression of GABA transporter mRNAs following amygdala-kindled seizures in rats. Brain Res Mol Brain Res. 1998;54(1):49-55.
32. Henshall DC, Murphy BM. Modulators of neuronal cell death in epilepsy. Curr Opin Pharmacol. 2008;8(1):75–81.

The effect of minocycline on gene expression of $GABA_A$ receptor in hippocampus and piriform brain areas on amygdale kindling acquisition in rat

Hasan Ramshini,
1Assistant Professor in Biochemistry, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran,

Mohammad Mohammad-Zadeh,
Assistant Professor in Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Seyed Mehdi Beheshti Nasr
Instructor of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

Received:22/01/2014**, Revised:**13/04/2014**, Accepted:**07/06/2014

Corresponding Author:
Seyed Mehdi Beheshti Nasr
Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
E-mail:
beheshti.m1985@gmail.com

Abstract

Introduction: Minocycline has anticonvulsant effects. Since some antiepileptic drugs increase the neurotransmitter GABA in the brain, the aim of this study is the effect of minocycline on gene expression of $GABA_A$ receptor in hippocampus and piriform brain areas on amygdale kindling acquisition in rat.

Methods: In this experimental study, three group (24 Wistar rats), after stereotaxic surgery and 1 week recovery period, received kindling stimulations(twice daily at 6 hours interval). Group 1(n=8) did not receive daily kindling stimulations. Group 2 (n=8) received intraperitoneal saline (1ml/kg) and Group 3 (n=8) received intraperitoeneal minocycline (25 mg/kg) 60 min before kindling stimulation and respectively. Two hours after the last stimulation, animals' brains were removed and the changes of gene expression by γ_2 subunit of $GABA_A$receptor in the hippocampus and piriform cortex were measured and compared with the control group. Data was analyzed using one-way ANOVA and Tukey post hoc tests (P<0/05).

Results: In Group 3 intraperitoneal administration of minocycline for 10 days reduced cumulative ADD significantly reduced in comparison with the control group (Group 2) (P<0.001); also, it increased significantly the delay time of stage 4 (p<0.01) and stage 5 (p<0.001) of the seizures. In addition, the injection of minocycline before kindling stimulations removed the electrical stimulation induced an increase in mRNA of γ2 subunit of $GABA_A$ receptor in hippocampus and piriform cortex of amygdale kindling.

Conclusion: The results of this study showed that minocycline administration before electrical stimulation acts as an anticonvulsant, and this effect occurs via reducing $GABA_A$ receptors.

keywords: *Epilepsy, Kindling, Minocycline, $GABA_A$ receptor.*