مقاله پژوهشی

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

سید مهدی بهشتی نصر[۱]، حسن رامشینی[۲*]، ابوالفضل راد[۳]

[۱] مربی گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، ایران

[۲] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور،۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

[۳] مربی گروه بیوشیمی و تغذیه، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، ایران

نشانی نویسنده مسئول: سبزوار، دانشگاه پیام نور مرکز سبزوار ، گروه زیست شناسی، دکتر حسن رامشینی

E-mail: hramshini@ibb.ut.ac.ir

وصول:۹۳/۲/۱۸، اصلاح:۹۳/۴/۹، پذیرش:۹۳/۵/۳

چکیده

زمینه و هدف: مینوسیکلین، دارای اثرات ضد التهابی و محافظت نورونی است. ازآنجایی که بین مرگ سلولی و تشنج، رابطه وجوددارد و ازطرفی بیان گیرنده‌ی NMDA به‌دنبال کیندلینگ افزایش‌می یابد، هدف ازاین مطالعه، بررسی اثر مینوسیکلین بر میزان بیان ژن گیرنده‌ی NMDA درنواحی هیپوکمپ و پیریفورم مغزی، درطی روند کیندلینگ آمیگدال در موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۳ گروه موش صحرایی نژاد ویستار (۲۴ سر) پس از جراحی استرئوتاکسیک و یک هفته دوره‌ی بهبودی، تحریکات کیندلینگ (۲ بار در روز با فاصله‌ی زمانی شش ساعت) را دریافت‌می‌کردند. در گروه اول (n=۸) حیوانات هیچ‌گونه تحریکی را دریافت‌نمی‌کردند. به حیوانات گروه دوم (n=۸) روزانه سالین (1 ml/kg)و گروه سوم (n=۸) مینوسیکلین با غلظت ۲۵ میلی‌گرم به‌ازای یک کیلوگرم حیوان (mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی (۶۰ دقیقه قبل از هر تحریک) تزریق‌شد. دو ساعت بعد ازآخرین تحریک، مغز حیوانات خارج‌شده و بیان ژن گیرنده NMDA در نواحی هیپوکمپ و پیریفورم این سه گروه با یکدیگر مقایسه‌شدند. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه وتست تعقیبی Tukey در سطح معناداری p<۰/۰۵ استفاده‌گردید.

یافته‌ها: تزریق داخل صفاقی مینوسیکلین قبل از تحریکات کیندلینگ از افزایشmRNA زیرواحد NR2A گیرنده‌ی NMDA در هیپوکمپ و قشر پیریفورم موش‌های کیندل شده جلوگیری‌کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده ازاین تحقیق نشان‌داد تزریق مینوسیکلین قبل از تحریکات الکتریکی، اثر ضد تشنجی دارد و این اثر را از طریق کاهش بیان زیر واحد گیرنده های NMDA اعمال‌می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *تشنج، کیندلینگ، مینوسیکلین، گیرنده‌ی* NMDA

مقدمه

صرع، یکی از رایج‌ترین اختلالات عصبی است که شیوع آن بیش از یک درصد است[۱]. به‌طورکلی، به فعالیت الکتریکی غیرطبیعی، همزمان و آشفته در مغز، «صرع(Epilepsy)» یا «تشنج(Seizure)» گفته می‌شود. اگر این اختلال، باعث تغییری ناگهانی و گذرا در رفتار شخص شود، به آن «تشنج» و اگر این حملات تشنجی بدون علت‌های زمینه‌ای و به‌طور تکراری رخ‌دهد به آن «صرع» گفته‌می‌شود. شایع‌ترین نوع صرع در انسان، صرع لوب گیجگاهی است (۲). در این نوع صرع، هیپوکمپ نقش مهمی در عمومی شدن تشنجات دارد(۳).

بهترین مدل آزمایشگاهی برای ایجاد صرع لوب گیجگاهی، کیندلینگ می‌باشد که در واقع یک پاسخ پیش‌رونده‌ی تشنجی به‌دنبال تحریک مکرر (الکتریکی یا شیمیایی) است. درحین فرایند، کیندلینگ تخلیه‌های الکتریکی ازموضع تحریک به نواحی دیگر در مغز منتشرشده و فعالیت آن نواحی را به‌گونه‌ای تغییرمی‌دهند که علائم حرکتی تشنج به‌وجودمی‌آید. این پاسخ‌های حرکتی به‌تدریج عمومی و فراگیرمی‌شوند (٤).

مطالعه‌ی بیان ژن‌های دخیل در تشنج، به شناخت هر چه بیشتر صرع و درنتیجه درمان آن کمک خواهدکرد. درحین تشنج‌های صرعی و روند صرع‌زایی، تولید شاخه-های دندریتی و شبکه‌های عصبی افزایش‌می‌یابد. در این فرایند، انواع انتقال‌دهنده‌های عصبی، میانجی‌های عصبی، انواع سایتوکاین‌ها و همچنین گیرنده‌های آنها دستخوش تغییر خواهند شد. گلوتامات و گاماآمینوبوتیریک اسید (گابا)، ازجمله انتقال‌دهنده‌های عصبی مهم مغز هستند. ازتعادل‌خارج شدن این دو سیستمِ انتقال‌دهنده‌ی عصبی، پایه و اساس رویداد صرع است (٥،٦). گلوتامات، انتقال-دهنده‌ی عصبی اصلی تحریکی مغز است که ازطریق گیرنده‌های مجزایی اثرات فیزیولوژیک آن بروزمی‌کند. این گیرنده‌ها عبارتنداز: گیرنده‌های Nمتیل دی‌آسپارتات (NMDA)، گیرنده‌های non-NMDA (مثل گیرنده‌های AMPA و حساس به کاینیک اسید) و گیرنده‌های متابوتروپیک. گیرنده‌های NMDA در فرایندهای حافظه، یادگیری و شناخت (cognition) نقش‌دارند(۷،۸). همچنین مشاهده‌شده که تعداد این گیرنده‌ها به‌دنبال کیندلینگ بیش از ۲ برابر افزایش می‌یابد (۹).

زیر واحد NR_2A در قشر مغز، تشکیلات هیپوکمپ و مخچه به مقدار زیادی وجوددارد. این زیرواحد، در شکل‌پذیری سیناپسی، تشکیل شبکه‌های عصبی و کیندلینگ نقش مهمی دارد. ممکن‌است افزایش بیان این زیرواحد گیرنده‌ی NMDA در روند صرع‌زایی نقش داشته‌باشد و داروهای ضد تشنجی ازطریق کاهش بیان این زیر واحد، موجب کاهش و یا مهار تشنجات صرعی شوند.

گابا، نوروترانسمیترِ مهاریِ اصلیِ مغز است. گابا، توسط آنزیم گلوتامات دِکربوکسیلاز از گلوتامات به وجودمی‌آید. بعضی از داروهای ضد تشنجی، باعث افزایش گابا در مغز می‌شوند (۱۰). همچنین مشاهده‌شده که به‌دنبال مدل‌های مختلف صرعی، بیان این گیرنده‌ها کاهش می‌یابد(۱۵-۱۱).

از آنجا که در تحقیقات قبلی ما نشان‌داده‌شد که مینوسیکلین اثرات ضد تشنجی دارد (۱۱،۱۲) ، باتوجه به اثرات تحریکی فعال‌شدن گیرنده‌های گلوتامات و اثرات مهاری فعال‌شدن گیرنده‌های گابا، احتمال‌می‌رود که مینوسیکلین ازطریق اثر، رویِ زیر واحد NR_2A گیرنده‌ی NMDA اثرات خود را اعمال‌کند. بنابراین، هدف ازاین تحقیق، بررسی میزان بیان ژن گیرنده‌های NMDA در نواحی مختلف مغزی، به‌دنبال تزریق مینوسیکلین درطی روند کیندلینگ آمیگدال در موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها

روش انجام آزمایش‌ها

پس از آماده‌کردن وسایل جراحی استریل‌شده، حیوان توسط کتامین و رامپون (۱۰۰ mg/kg، داخل

صفاقی) بیهوش می‌شود (۱۳). سپس موهای سر حیوان تراشیده و حیوان در دستگاه استریوتاکس قرارداده‌می‌شود و پس از ثابت‌کردن سر حیوان و بتادینه‌کردن پوست سر، برشی در خط وسط با تیغ جراحی ایجاد می‌گردد. پس از آشکارشدن کامل سطح استخوان جمجمه و تمیزکردن آن با الکل، نقطه‌ی برگما مشخص‌می‌شود. موقعیّت مسیر آمیگدال در سطح جمجه نسبت برگما (برحسب میلیمتر: ۲/۵ – L +8/4 =AP= و ۷/۵ V= نسبت به سخت شامه) می‌باشد [۱٤]. پس از بستن پیچ‌های لنگرگاه، الکترود تک قطبی و الکترودهای تحریک و ثبات در محل‌های تعیین‌شده برای تحریک و ثبت از آمیگدال قرارداده‌می‌شوند.

یک هفته پس از جراحی، از شدت آستانه به‌منظور تحریک‌دادن استفاده‌می‌شد. برای به‌دست‌آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان موردنظر توسط جریانی به‌شدت ۱۰ میکروآمپر تحریک‌می‌گردید. اگر امواج تخلیه‌ی متعاقب (حداقل به‌مدت ۵ ثانیه) ثبت‌می‌شدند، این شدت جریان به‌عنوان شدت جریان آستانه شناخته‌می‌شد، درغیراین صورت، تاوقتی‌که امواج تخلیه‌ی متعاقب ثبت‌گردد، هربار، شدت جریان ۱۰ میکروآمپر به‌فواصل ۵ دقیقه افزایش‌داده‌می‌شد. سپس حیوانات با این شدت جریان آستانه روزانه دو بار (با فاصله‌ی زمانی حداقل ٦ ساعت) تحریک‌می‌شدند تا مراحل مختلف تشنج را نشان‌داده و کیندل شوند (۱۵).

روش ایجاد کیندلینگ

برای تحریک حیوان، از روش کیندلینگ استفاده‌شد. دراین روش، حیوانات با موج مربعی تک‌فازی با مشخصات فرکانس ٦۰ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به‌مدت ۲ ثانیه تحریک‌شدند. این تحریکات، هر روز ۲ بار تا زمان نشان‌دادن مرحله‌ی ۵ تشنج اعمال‌شد (۱۵). با ادامه‌ی تحریکات به‌تدریج هم‌زمان با ثبت امواج تخلیه‌ی متعاقب، مراحل تشنج نیز قابل مشاهده‌می‌باشند.

گروه‌بندی

مراحل انجام کار در گروه‌های مورد استفاده دراین آزمایش، به‌این ترتیب بود که درگروه اول، حیوانات پس ازجراحی، تحریکات کیندلینگ را دریافت‌نمی‌کردند. درگروه دوم، ٦۰ دقیقه قبل از تحریکات روزانه‌ی کیندلینگ، سالین (1 ml/kg) تزریق داخل صفاقی شد. مراحل کاری گروه سوم، مشابه گروه دوم است، اما به‌جای سالین، مینوسیکلین (25 mg/kg) دوز مناسب به‌دست‌آمده از تحقیقات پیشین (۱٦) تزریق داخل صفاقی شد. پس از کیندل‌شدن، تا ۲ ساعت بعد از آخرین تحریک مغز حیوانات خارج‌شده و نواحی هیپوکمپ و پیریفورم استخراج‌گردید و بلافاصله به یخچال ۸٤- منتقل‌شده و تا زمان استخراج RNA در آن نگهداری‌شد. در ادامه، نمونه‌های استخراجی RNA برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آماده‌شدند.

روش اندازه گیری بیان ژن

به‌منظور تعیین بیان ژن زیرواحد NR_2A گیرنده‌ی NMDA و GAPDH در هیپوکمپ و قشر پیریفورم، ابتدا بافت موردنظر، هموژنیزه‌شده و سپس کل RNA موجود در بافت‌ها با کمک محلول استخراج RNX^+ (سیناژن، ایران) و براساس پروتوکل کلروفرم- الکل استخراج‌گردید[۱۷]. برای بررسی کیفیت، RNA روی ژل آگارز ۱٪ ران گردید. به‌علاوه، آزمایش غلظت‌سنجی RNA، نشان‌دهنده‌ی درجه‌ی خلوص قابل قبولی ازRNA بود. سنجش غلظت به‌کمک اسپکتروفتومتری بررسی‌شد. به‌صورتی‌که نسبت به‌دست‌آمده برای طول موج‌های A ۲۸۰°-۲٦۰ در محدوده‌ی۲- ۱/۸ بود که نشان‌دهنده‌ی درجه‌ی خلوص قابل قبول RNA است

با استفاده از ۵ میکرولیتر ازمجموع RNA استخراج‌شده، پرایمر Oligo-dt (فرمنتاز، آلمان)، آنزیم نسخه‌بردار معکوس (فرمنتاز، آلمان) و پرایمر PCR master (سیناژن، ایران)؛ cDNA ساخته‌شد. به‌منظور تکثیر قطعه از cDNA مربوط به ژن‌های فوق، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. فرآیند PCR با

کمک آنزیم پلیمراز Taq (پارستوس، ایران) و پرایمرهای اختصاصی پیشرو و معکوس برای هر ژن انجام‌شد (جدول ۱). شرایط PCR ازنظر دمای اتصال پرایمرها، تعداد سیکل و میزان PCR در آزمایش‌های جداگانه بهینه-سازی شد. ۵ میکرولیتر از محصول هر واکنش، پس از مخلوط‌شدن با ۱ میکرولیتر Loading Day در ژل ۲٪ آگارز آغشته به اتیدیوم بروماید به‌همراه DNA ladder، ۱۰۰bp ران شد. پس از پایان الکتروفورز از ژل تحت نور UV تصویربرداری و تراکم باندهای موردنظر توسط نرم-افزار Image J نسخه‌ی ۱.۴۳ اندازه‌گیری‌شد و برای هر نمونه تراکم باند مربوط به ژن نسبت به GAPDH محاسبه‌گردید.

روش آماری

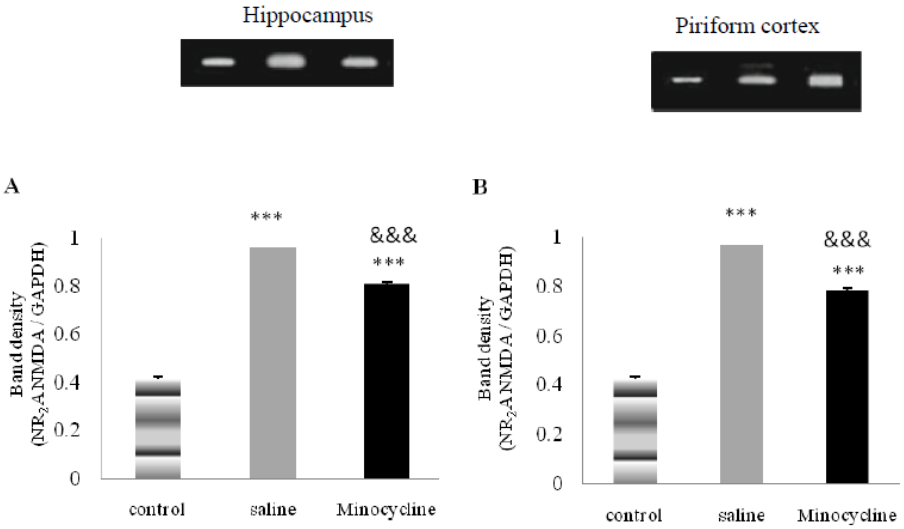
برای تجزیه و تحلیل آماری از آخرین نسخه‌ی نرم‌افزار Statistica و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey برای مقایسه‌ی تغییرات مولکولی و رفتاری استفاده‌گردید. سطح معناداری نیز p<۰/۰۵ در نظرگرفته‌شد.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل آماری نشان‌دادکه بیان ژن NR_2A گیرنده‌ی NMDA در هیپوکمپ دو ساعت بعد ازآخرین تحریک الکتریکی در هر دو گروه سالین و مینوسیکلین نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش‌یافت (P<۰/۰۰۱). به‌طوری‌که بیان ژن NR_2A گیرنده‌ی NMDA از ۰/۴۱۲±۰/۰۰۸ در گروه کنترل، به ۰/۹۸۵±۰/۰۰۲ در گروه سالین و ۰/۸۱۰±۰/۰۰۷ در گروه مینوسیکلین رسید (شکل ۱ A).

جدول ۱: توالی پرایمر های زیر واحد NR_2A گیرنده NMDA و GAPDH مورد استفاده برای تکثیر به روش RT-PCR

نام ژن	نوع پرایمر	توالی
GAPDH	پیشرو	5'GGGTGTGAACCACGAGAAAT 3'
	پسرو	5' ACTGTGGTCATGAGCCCTTC 3'
NR_2A/ NMDA	پیشرو	5'TGTGAAGAAATGCTGCAAGG 3'
	پسرو	5' GAACGCTCCTCATTGATGGT 3'



شکل۱: تغییرات بیان ژن NR_2A گیرنده‌ی NMDA پس از کیندلینگ دربافت هیپوکمپ (A) و پیریفورم (B)در گروه کنترل، سالین و مینوسیکلین. شکل نشان‌می‌دهد تحریکات الکتریکی، موجب افزایش بیان این ژن‌ها در هیپوکمپ و پیریفورم در هر دو گروه سالین و مینوسیکلین نسبت به گروه کنترل می‌شود. همچنین تزریق مینوسیکلین از تغییرات بیان ژن‌های ایجادشده توسط کیندلینگ الکتریکی جلوگیری می‌کند. داده‌ها، به‌صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان‌داده‌شده‌اند. *** نشان دهنده‌ی P< ۰/۰۰۱ در مقایسه‌ی کنترل و &&& نشان‌دهنده‌ی P< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه تزریق سالین می‌باشد. (n=٦).

بیان ژن NR_2A گیرنده‌ی NMDA در قشر پیریفورم نیز دو ساعت بعد از آخرین تحریک الکتریکی در هردو گروه سالین و مینوسیکلین نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش‌یافت (P<۰/۰۰۱). به‌طوری‌که بیان ژن NR_2A گیرنده‌ی NMDA از ۰/۰۰۸±۰/۴۲۵ در گروه کنترل، به ۰/۰۰۲ ± ۰/۹۶۷ در گروه سالین و ۰/۰۰۸ ± ۰/۷۸۰ در گروه مینوسیکلین رسید (شکل۱ B).

همچنین مشاهده‌شد بیان این ژن در گروه مینوسیکلین نسبت به گروه سالین به‌طور معناداری در هیپوکمپ کاهش‌یافت (P< ۰/۰۰۱) و از ۰/۰۰۲ ± ۰/۹۸۵ در گروه سالین، به ۰/۰۰۷ ± ۰/۸۱۰ در گروه مینوسیکلین رسید (شکل۱ A). به‌علاوه، بیان این ژن در قشر پیریفورم در گروه مینوسیکلین نسبت به سالین نیز کاهش معناداری یافت (P< ۰/۰۰۱) و از ۰/۰۰۲±۰/۹۶۷ در گروه سالین، به ۰/۰۰۸±۰/۷۸۰ در گروه مینوسیکلین رسید (شکل۱ B).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق، نشان‌داد که مینوسیکلین مدت زمان لازم برای کیندلینگ آمیگدال را افزایش می‌دهد. این دارو، همچنین بیان ژن NR_2A گیرنده‌ی NMDA دخیل در ایجاد تشنج را نیز تحت تاثیرقرارداده، از تغییر آن‌ها درحین تشنج جلوگیری‌می‌کند. به‌طوری‌که موجب کاهش معنادار (P< ۰/۰۰۱) این ژن در هیپوکامپ و قشر پیریفورم نسبت به گروه سالین می‌شود.

ژنی که در این مطالعه، بیان آن مورد بررسی‌قرارگرفت، زیرواحد NR_2A گیرنده‌ی NMDA می‌باشد که در شکل‌پذیری سیناپسی، تشکیل شبکه‌های عصبی و توسعه و ایجاد کیندلینگ نقش مهمی ایفامی‌کند (۱۸). زیرواحد NR_2A به‌طورگسترده‌ای در قشر مغز، تشکیلات هیپوکمپ و سلول‌های گرانولی مخچه وجوددارد و نسبت به زیرواحد NR_2B درطی روند کیندلینگ، تغییر بیان بیشتری را متحمل می‌گردد (۱۸). احتمالاً افزایش بیش ازحد بیان ژن مذکور، سبب افزایش تحریک‌پذیری سیستم عصبی می‌گردد. به‌علاوه، فعالیت گیرنده‌های NMDA آبشارهای داخل سلولی را شروع می‌کند که به تغییرات عملکردی و سازمان‌دهی سیناپسی درهر دو سیستم‌های گابا و گلوتامات منجرمی‌شود (۱۹). بنابراین، ممکن‌است که این گیرنده، مسؤول صرع‌زایی و گسترش تحریک‌پذیری نورونی ایجادشده در کیندلینگ باشد (۲۰). دریک بررسی، مشاهده‌شد در کیندلینگ PTZ، ۹ روز بعد از آخرین تزریق، NR_2 در قشر و هیپوکمپ به‌طور قابل ملاحظه کاهش‌یافت (۲۱). دراین مطالعه، مشاهده‌کردیم ۲ ساعت بعد از آخرین تحریک، برخلاف برخی از مطالعات قبلی، بیان ژن NR_2A گیرنده‌ی NMDA درگروه سالین افزایش‌یافت که شاید به‌دلیل تفاوت در زمان اندازه‌گیری ژن و نوع کیندلینک باشد. همچنین میزان بیان این ژن مذکور در بافت هیپوکمپ و قشر پیریفورم در گروه مینوسیکلین نسبت به گروه سالین به‌طور معناداری کاهش‌یافت. درهمین راستا، در مطالعه‌ای نشان‌داده‌شده که مینوسیکلین، رهایش گلوتامات را از پایانه‌های پیش‌سیناپسی و همچنین، تحریک‌پذیری نورون‌های بافت هیپوکمپ را ازطریق کاهش جریان‌های روبه داخل سدیمی و کلسیمی، کاهش‌می‌دهد (۲۲). پس احتمالاً یکی از مکانیسم‌هایی که می‌تواند در اثرات ضد تشنجی مینوسیکلین دخیل باشد، کاهش بیان ژن زیرواحد NR_2A گیرنده‌ی NMDA و متعاقب آن کاهش احتمالی فعالیت این گیرنده است.

باتوجه به‌این‌که، علاوه بر گیرنده‌ی NMDA، سایر گیرنده‌های یونوتروپیک گلوتاماتی نیز درتغییرات مورفولوژیکی پایانه‌های آکسون های گاباارژیک نقش‌دارند و باعث افزایش رهایش خودبه‌خودی گابا می‌شوند، به‌نظرمی‌رسد که تنظیم سیستم گابا ارژیک، می‌تواند تحت تأثیر فعالیت این گیرنده‌ها قرارگیرد (۲۱). البته هنوز مشخص‌نشده که التهاب باعث صرع می‌شود یا صرع، ایجاد التهاب می‌کند (۲۳). ازطرف دیگر، این احتمال

وجوددارد که مینوسیکلین با کاهش شدت تحریک پذیری، بر التهاب ناشی از صرع تاثیر بگذارد. براین اساس، به‌نظرمی‌رسد مینوسیکلین ازطریق کاهش میزان بیان ژن زیرواحد NR_2A گیرنده‌ی NMDA و به‌دنبال آن کاهش تحریک پذیری و صرع، توانسته جلوی التهاب ناشی از صرع را بگیرد.

مینوسیکلین، اثرات ضد تشنجی خود را با جلوگیری از افزایش زیرواحد NR_2A گیرنده‌ی NMDA اعمال‌می‌کند. بدین‌ترتیب، جدای از اثرات ضدالتهابی مینوسیکلین که موجب نقش ضدتشنجی برای آن می‌شود، این ترکیب دارویی از طریق مهار افزایش زیر واحد گیرنده‌های تحریکی در مغز، باعث مهار تشنج می‌گردد. در پایان می‌توان بیان‌کرد که مینوسیکلین به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای درمان افراد صرعی بیشتر موردمطالعه‌قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه پیام نور واحد سبزوار به‌خاطر حمایت مالی این پروژه تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. Nature. 1999;399(6738 Suppl):A15-22.
2. Engel J Jr. Classifications of the International League Against Epilepsy: time for reappraisal. Epilepsia. 1998;39(9):1014-7.
3. Cohen AS, Lin DD ,Quirk GL, Coulter DA. Dentate granule cell GABA(A) receptors in epileptic hippocampus: enhanced synaptic efficacy and altered pharmacology. Eur J Neurosci. 2003;17(8):1607-16.
4. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Exp Neurol. 1969;25(3):295-330.
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 research. 1999;36(2-3):189-204.
7. Libikova H, Pogady J, Wiedermann V, Breier S. Search for herpetic antibodies in the cerebrospinal fluid in senile dementia and mental retardation. Acta virol. 1975;19(6):493-5.
8. White HS, Harmsworth WL, Sofia RD, Wolf HH. Felbamate modulates the strychnine-insensitive glycine receptor. Epilepsy research. 1995;20(1):41-8.
9. Kraus JE, Yeh GC, Bonhaus DW, Nadler JV, McNamara JO. Kindling induces the long-lasting expression of a novel population of NMDA receptors in hippocampal region CA3. J Neurosci. 1994;14(7):4196-205.
10. Loscher W. Valproate enhances GABA turnover in the substantia nigra. Brain Res. 1989;501(1):198-203.
11. Beheshti Nasr SM, Moghimi ALI, Mohammad Zadeh M. Effect of minocycline on amygdala kindling acquisition in rats. Physiology and Pharmacology. 2012;16(3):222-30. [Persian]
12. Beheshti Nasr SM, Mohammad-Zadeh M, Moghimi A. The Role of Minocycline on Amygdala-Kindled Seizures in Rat. J Sabzevar Univ of Med Sci. 2012;19:14-25. [Persian]
13. 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.
14. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: Academic press 2007.
15. 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(Tokyo). 2010;50(2):98-106.
16. 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.
17. 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.
18. Lason W, Turchan J, Przewlocka B, Labuz D, Machelska H, Przewlocki R. Effects of pentylenetetrazol kindling on glutamate receptor genes expression in the rat hippocampus. Brain Res. 1998;785(2):355-8.

19. von Lubitz DK. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? Eur J Pharmacol. 1999;371(1):85-102.
20. Atack JR, Cook SM, Hutson PH, File SE. Kindling induced by pentylenetetrazole in rats is not directly associated with changes in the expression of NMDA or benzodiazepine receptors. Pharmacol Biochem Behav. 2000;65(4):743-50.
21. 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.
22. 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.
23. 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.

An investigation into the effect of minocycline on gene expression of NMDA receptor in hippocampus and piriform brain areas on amygdala kindling acquisition in rats

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

Hasan Ramshini.,
Department of biology, Payam Noor University, 19395-4697, Tehran, I.R.Iran

Abolfazl Rad
Instructor of biochemistry and nutrition department , Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Received:08/05/2014**, Revised:**30/06/2014**, Accepted:**25/07/2014

Corresponding Author:
Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
hramshini@ibb.ut.ac.ir

Abstract

Background and purpose: Minocycline has got the anti-inflammatory and neuroprotective effects. Considering the interaction between cell death and seizure, and on the other hand, Kindling which increases expression NMDA receptors in brain, the aim of this study is to investigate the effect of minocycline on gene expression of NMDA receptor in hippocampus and piriform brain areas on amygdale kindling acquisition in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, three animal groups of 24 Wistar rats received kindling stimulations (twice daily within 6 hours intervals) after being stereotaxic operated and taking one week recovery period. In first Group (n=8) animals did not received daily kindling stimulations. Animals of the second and the third Groups (n=8) respectively had been injected by saline (1ml/kg) and minocycline (25 mg/kg), 60 minutes before receiving kindling stimulations. Two hours after last stimulation animal's brains were removed and the changes of NR2A gene subunit of NMDA receptor in the hippocampus and piriform cortex were measured and compared relative to the control group. Datawere analyzed using ANOVA and Tukey post hoc tests at significant level of P<0/05.

Results: Intraperitoneal administration of minocycline before kindling stimulations prevented an increase in the mRNA of NR2A subunit of NMDA receptor in hippocampus and piriform cortex of amygdala kindling.

Conclusion: The results of this study have shown that minocycline administration before electrical stimulation has anticonvulsant effects which are applied through a decrease in expression of NMDA receptors.

keywords: *Seizure, Kindling, Minocycline, NMDA Receptor.*