

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. از آنجایی که بین مرگ سلولی و تشنج، رابطه وجود دارد و از طرفی بیان گیرنده NMDA به دنبال کیندلینگ افزایش می یابد، هدف از این مطالعه، بررسی اثر مینوسیکلین بر میزان بیان ژن گیرنده NMDA در نواحی هیپوکمپ و پیریفورم مغزی، در طی روند کیندلینگ آمیگدال در موش صحرایی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۳ گروه موش صحرایی نژاد ویستار (۲۴ سر) پس از جراحی استرئوتاکسیک و یک هفته دوره بهبودی، تحریکات کیندلینگ (۲ بار در روز با فاصله زمانی شش ساعت) را دریافت می کردند. در گروه اول (n=۸) حیوانات هیچ گونه تحریکی را دریافت نمی کردند. به حیوانات گروه دوم (n=۸) روزانه سالی (1 ml/kg) و گروه سوم (n=۸) مینوسیکلین با غلظت ۲۵ میلی گرم به ازای یک کیلوگرم حیوان (mg/kg) به صورت داخل صفاقی (۶۰ دقیقه قبل از هر تحریک) تزریق شد. دو ساعت بعد از آخرین تحریک، مغز حیوانات خارج شده و بیان ژن گیرنده NMDA در نواحی هیپوکمپ و پیریفورم این سه گروه با یکدیگر مقایسه شدند. برای تحلیل داده ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Tukey در سطح معناداری $p < 0.05$ استفاده گردید.

یافته ها: تزریق داخل صفاقی مینوسیکلین قبل از تحریکات کیندلینگ از افزایش mRNA زیر واحد NR2A گیرنده NMDA در هیپوکمپ و قشر پیریفورم موش های کیندل شده 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 NMDA اعمال می کند.

واژه های کلیدی: تشنج، کیندلینگ، مینوسیکلین، گیرنده NMDA

مقدمه

صرع، یکی از رایج‌ترین اختلالات عصبی است که شیوع آن بیش از یک درصد است [۱]. به‌طور کلی، 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 رخ دهد به آن «صرع» گفته می‌شود. 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 از موضع تحریک به نواحی دیگر در مغز منتشر شده و فعالیت آن نواحی را به‌گونه‌ای تغییر می‌دهند که علائم حرکتی تشنج به‌وجود می‌آید. این پاسخ‌های حرکتی به تدریج عمومی و فراگیر می‌شوند (۴).

مطالعه‌ی بیان ژن‌های دخیل در تشنج، به شناخت هر چه بیشتر صرع و در نتیجه درمان آن کمک خواهد کرد. درحین تشنج‌های صرعی و روند صرع‌زایی، تولید شاخه‌های دندریتی و شبکه‌های عصبی افزایش می‌یابد. در این فرایند، انواع انتقال‌دهنده‌های عصبی، میانجی‌های عصبی، انواع سائتوکاین‌ها و همچنین گیرنده‌های آنها دستخوش تغییر خواهند شد. گلوتامات و گاما‌آمینوبوتیریک اسید (گابا)، از جمله انتقال‌دهنده‌های عصبی مهم مغز هستند. از تعادل خارج شدن این دو سیستم انتقال‌دهنده‌ی عصبی، پایه و اساس رویداد صرع است (۵، ۶). گلوتامات، انتقال‌دهنده‌ی عصبی اصلی تحریکی مغز است که از طریق گیرنده‌های مجزایی اثرات فیزیولوژیک آن بروزمی‌کند. این گیرنده‌ها عبارتند از: گیرنده‌های N-متیل دی‌آسپاراتات (NMDA)، گیرنده‌های non-NMDA (مثل گیرنده‌های

AMPA و حساس به کاینیک اسید) و گیرنده‌های متابوتروپیک. گیرنده‌های NMDA در فرایندهای حافظه، یادگیری و شناخت (cognition) نقش دارند (۷، ۸). همچنین مشاهده‌شده که تعداد این گیرنده‌ها به‌دنبال کیندلینگ بیش از ۲ برابر افزایش می‌یابد (۹).

زیر واحد NR₂A در قشر مغز، تشکیلات هیپوکمپ و مخچه به مقدار زیادی وجود دارد. این زیر واحد، در شکل‌پذیری سیناپسی، تشکیل شبکه‌های عصبی و کیندلینگ نقش مهمی دارد. ممکن است افزایش بیان این زیر واحد گیرنده‌ی NMDA در روند صرع‌زایی نقش داشته‌باشد و داروهای ضد تشنجی از طریق کاهش بیان این زیر واحد، موجب کاهش و یا مهار تشنجات صرعی شوند.

گابا، نوروترانسمیتر مهاری اصلی مغز است. گابا، توسط آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز از گلوتامات به وجود می‌آید. بعضی از داروهای ضد تشنجی، باعث افزایش گابا در مغز می‌شوند (۱۰). همچنین مشاهده‌شده که به‌دنبال مدل‌های مختلف صرعی، بیان این گیرنده‌ها کاهش می‌یابد (۱۱-۱۵).

از آنجا که در تحقیقات قبلی ما نشان داده شد که مینوسیکلین اثرات ضد تشنجی دارد (۱۱، ۱۲)، با توجه به اثرات تحریکی فعال‌شدن گیرنده‌های گلوتامات و اثرات مهاری فعال‌شدن گیرنده‌های گابا، احتمال می‌رود که مینوسیکلین از طریق اثر، روی زیر واحد NR₂A گیرنده‌ی NMDA اثرات خود را اعمال کند. بنابراین، هدف از این تحقیق، بررسی میزان بیان ژن گیرنده‌های NMDA در نواحی مختلف مغزی، به‌دنبال تزریق مینوسیکلین در طی روند کیندلینگ آمیگدال در موش صحرائی است.

مواد و روش‌ها

روش انجام آزمایش‌ها

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

مراحل انجام کار در گروه‌های مورد استفاده در این آزمایش، به این ترتیب بود که درگروه اول، حیوانات پس از جراحی، تحریکات کیندلینگ را دریافت نمی‌کردند. درگروه دوم، ۶۰ دقیقه قبل از تحریکات روزانه‌ی 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 دست‌آمده از تحقیقات پیشین (۱۶) تزریق داخل صفاقی شد. پس از کیندل شدن، تا ۲ ساعت بعد از آخرین تحریک مغز حیوانات خارج‌شده و نواحی هیپوکمپ و پیریفورم استخراج‌گردید و بلافاصله به یخچال ۸- منتقل شده و تا زمان استخراج RNA در آن نگهداری شد. در ادامه، نمونه‌های استخراجی RNA برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آماده شدند.

روش اندازه‌گیری بیان ژن

به منظور تعیین بیان ژن زیر واحد NR2A گیرنده‌ی NMDA و GAPDH در هیپوکمپ و قشر پیریفورم، ابتدا بافت مورد نظر، هم‌وزن‌نیزه شده و سپس کل RNA موجود در بافت‌ها با کمک محلول استخراج RNX⁺ (سیناژن، ایران) و براساس پروتوکول کلروفورم-الکل استخراج-گردید [۱۷]. برای بررسی کیفیت، RNA روی ژل آگارز ۱٪ ران گردید. به علاوه، آزمایش غلظت سنجی RNA، نشان‌دهنده‌ی درجه‌ی خلوص قابل قبولی از RNA بود. سنجش غلظت به کمک اسپکتروفتومتری بررسی شد. به صورتی که نسبت به دست‌آمده برای طول موج‌های ۲۸۰-۲۶۰ در محدوده‌ی ۲-۱/۸ بود که نشان‌دهنده‌ی درجه‌ی خلوص قابل قبول RNA است

با استفاده از ۵ میکرولیتر از مجموع RNA استخراج‌شده، پرایمر Oligo-dt (فرمتاز، آلمان)، آنزیم نسخه‌بردار معکوس (فرمتاز، آلمان) و پرایمر PCR master (سیناژن، ایران)؛ cDNA ساخته شد. به منظور تکثیر قطعه از cDNA مربوط به ژن‌های فوق، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. فرآیند PCR با

صفاقی) بیهوش می‌شود (۱۳). سپس موهای سر حیوان تراشیده و حیوان در دستگاه استریوتاکس قرار داده می‌شود و پس از ثابت کردن سر حیوان و بتادینه کردن پوست سر، برشی در خط وسط با تیغ جراحی ایجاد می‌گردد. پس از آشکار شدن کامل سطح استخوان جمجمه و تمیز کردن آن با الکل، نقطه‌ی برگما مشخص می‌شود. موقعیت مسیر آمیگدال در سطح جمجمه نسبت برگما (برحسب میلی‌متر: $AP = 8/4 + L - 2/5$ و $V = 7/5$ = نسبت به سخت شامه) می‌باشد [۱۴]. پس از بستن پیچ‌های لنگرگاه، الکتروود تک قطبی و الکترودهای تحریک و ثابت در محل‌های تعیین شده برای تحریک و ثبت از آمیگدال قرار داده می‌شوند.

یک هفته پس از جراحی، از شدت آستانه به منظور تحریک دادن استفاده می‌شود. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان مورد نظر توسط جریانی به شدت ۱۰ میکروآمپر تحریک می‌گردد. اگر امواج تخلیه‌ی متعاقب (حداقل به مدت ۵ ثانیه) ثبت می‌شوند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شود، در غیر این صورت، تا وقتی که امواج تخلیه‌ی متعاقب ثبت گردد، هر بار، شدت جریان ۱۰ میکروآمپر به فواصل ۵ دقیقه افزایش داده می‌شود. سپس حیوانات با این شدت جریان آستانه روزانه دو بار (با فاصله‌ی زمانی حداقل ۶ ساعت) تحریک می‌شوند تا مراحل مختلف تشنج را نشان داده و کیندل شوند (۱۵).

روش ایجاد کیندلینگ

برای تحریک حیوان، از روش کیندلینگ استفاده شد. در این روش، حیوانات با موج مربعی تک‌فازی با مشخصات فرکانس ۶۰ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۲ ثانیه تحریک شدند. این تحریکات، هر روز ۲ بار تا زمان نشان دادن مرحله‌ی ۵ تشنج اعمال شد (۱۵). با ادامه‌ی تحریکات به تدریج هم‌زمان با ثبت امواج تخلیه‌ی متعاقب، مراحل تشنج نیز قابل مشاهده می‌باشند.

گروه بندی

نرم افزار Statistica و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Tukey برای مقایسه‌ی تغییرات مولکولی و رفتاری استفاده گردید. سطح معناداری نیز $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بیان ژن NR_{2A} گیرنده‌ی NMDA در هیپوکمپ دو ساعت بعد از آخرین تحریک الکتریکی در هر دو گروه سالین و مینوسیکلین نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافت ($P < 0.001$). به طوری که بیان ژن NR_{2A} گیرنده‌ی NMDA از 0.412 ± 0.008 در گروه کنترل، به 0.985 ± 0.002 در گروه سالین و 0.810 ± 0.007 در گروه مینوسیکلین رسید (شکل ۱ A).

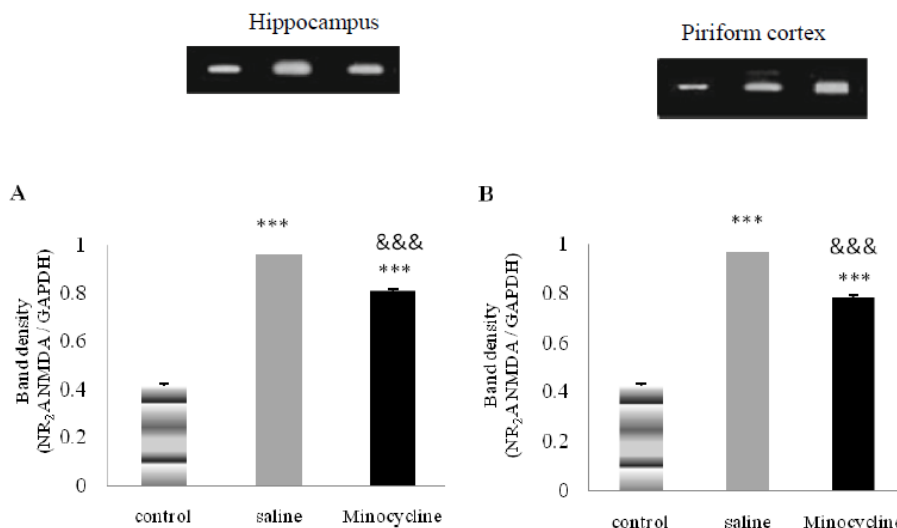
کمک آنزیم پلیمرز Taq (پارستوس، ایران) و پرایمرهای اختصاصی پیشرو و معکوس برای هر ژن انجام شد (جدول ۱). شرایط PCR از نظر دمای اتصال پرایمرها، تعداد سیکل و میزان PCR در آزمایش‌های جداگانه بهینه سازی شد. ۵ میکرولیتر از محصول هر واکنش، پس از مخلوط شدن با ۱ میکرولیتر Loading Day در ژل ۲٪ آگارز آغشته به اتیدیوم بروماید به همراه DNA ladder، ۱۰۰bp ران شد. پس از پایان الکتروفورز از ژل تحت نور UV تصویربرداری و تراکم باندهای مورد نظر توسط نرم افزار Image J نسخه‌ی ۱.۴۳ اندازه گیری شد و برای هر نمونه تراکم باند مربوط به ژن نسبت به GAPDH محاسبه گردید.

روش آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از آخرین نسخه‌ی

جدول ۱: توالی پرایمرهای 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'



شکل ۱: تغییرات بیان ژن NR_{2A} گیرنده‌ی NMDA پس از کیندلینگ دریافت هیپوکمپ (A) و پیریفورم (B) در گروه کنترل، سالین و مینوسیکلین. شکل نشان می‌دهد 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 ایجاد شده توسط کیندلینگ الکتریکی جلوگیری می‌کند. داده‌ها، به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. *** نشان دهنده‌ی $P < 0.001$ در مقایسه‌ی کنترل و &&& نشان دهنده‌ی $P < 0.001$ در مقایسه با گروه تزریق سالین می‌باشد. (n=۶).

از حد بیان ژن مذکور، سبب افزایش تحریک‌پذیری سیستم عصبی می‌گردد. به‌علاوه، فعالیت گیرنده‌های NMDA آبخارهای داخل سلولی را شروع می‌کند که به تغییرات عملکردی و سازمان‌دهی سیناپسی در هر دو سیستم‌های گابا و گلوتامات منجر می‌شود (۱۹). بنابراین، ممکن است که این گیرنده، مسئول صرع‌زایی و گسترش تحریک-پذیری نورونی ایجاد شده در کیندلینگ باشد (۲۰). در یک بررسی، مشاهده شد در کیندلینگ PTZ، ۹ روز بعد از آخرین تزریق، NR₂ در قشر و هیپوکمپ به‌طور قابل ملاحظه کاهش یافت (۲۱). در این مطالعه، مشاهده کردیم ۲ ساعت بعد از آخرین تحریک، برخلاف برخی از مطالعات قبلی، بیان ژن NR_{2A} گیرنده‌ی NMDA در گروه سالیین افزایش یافت که شاید به دلیل تفاوت در زمان اندازه‌گیری ژن و نوع کیندلینگ باشد. همچنین میزان بیان این ژن مذکور در بافت هیپوکمپ و قشر پیرفورم در گروه مینوسیکلین نسبت به گروه سالیین به‌طور معناداری کاهش یافت. در همین راستا، در مطالعه‌ای نشان داده شده که مینوسیکلین، رهائش گلوتامات را از پایانه‌های پیش-سیناپسی و همچنین، تحریک‌پذیری نورون‌های بافت هیپوکمپ را از طریق کاهش جریان‌های روبه داخل سدیمی و کلسیمی، کاهش می‌دهد (۲۲). پس احتمالاً یکی از مکانیسم‌هایی که می‌تواند در اثرات ضد تشنجی مینوسیکلین دخیل باشد، کاهش بیان ژن زیر واحد NR_{2A} گیرنده‌ی NMDA و متعاقب آن کاهش احتمالی فعالیت این گیرنده است.

باتوجه به این‌که، علاوه بر گیرنده‌ی NMDA، سایر گیرنده‌های یونوتروپیک گلوتاماتی نیز در تغییرات مورفولوژیکی پایانه‌های آکسون‌های گاباارژیک نقش دارند و باعث افزایش رهائش خودبه‌خودی گابا می‌شوند، به-نظرمی‌رسد که تنظیم سیستم گابا ارژیک، می‌تواند تحت تأثیر فعالیت این گیرنده‌ها قرار گیرد (۲۱). البته هنوز مشخص نشده که التهاب باعث صرع می‌شود یا صرع، ایجاد التهاب می‌کند (۲۳). از طرف دیگر، این احتمال

بیان ژن NR_{2A} گیرنده‌ی NMDA در قشر پیرفورم نیز دو ساعت بعد از آخرین تحریک الکتریکی در هر دو گروه سالیین و مینوسیکلین نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). به‌طوری‌که بیان ژن NR_{2A} گیرنده‌ی NMDA از $0/425 \pm 0/008$ در گروه کنترل، به $0/967 \pm 0/002$ در گروه سالیین و $0/780 \pm 0/008$ در گروه مینوسیکلین رسید (شکل ۱ B).

همچنین مشاهده شد بیان این ژن در گروه مینوسیکلین نسبت به گروه سالیین به‌طور معناداری در هیپوکمپ کاهش یافت ($P < 0/001$) و از $0/985 \pm 0/002$ در گروه سالیین، به $0/810 \pm 0/007$ در گروه مینوسیکلین رسید (شکل ۱ A). به‌علاوه، بیان این ژن در قشر پیرفورم در گروه مینوسیکلین نسبت به سالیین نیز کاهش معناداری یافت ($P < 0/001$) و از $0/967 \pm 0/002$ در گروه سالیین، به $0/780 \pm 0/008$ در گروه مینوسیکلین رسید (شکل ۱ B).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد 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 تأثیر قرار داده، از تغییر آن‌ها در حین تشنج جلوگیری می‌کند. به‌طوری‌که موجب کاهش معنادار ($P < 0/001$) این ژن در هیپوکامپ و قشر پیرفورم نسبت به گروه سالیین می‌شود.

ژنی که در این مطالعه، بیان آن مورد بررسی-قرار گرفت، زیر واحد NR_{2A} گیرنده‌ی NMDA می‌باشد که در شکل‌پذیری سیناپسی، تشکیل شبکه‌های عصبی و توسعه و ایجاد کیندلینگ نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۸). زیر واحد NR_{2A} به‌طور گسترده‌ای در قشر مغز، تشکیلات هیپوکمپ و سلول‌های گرانولی منخچه وجود دارد و نسبت به زیر واحد NR_{2B} در طی روند کیندلینگ، تغییر بیان بیشتری را متحمل می‌گردد (۱۸). احتمالاً افزایش بیش

این ترکیب دارویی از طریق مهار افزایش زیر واحد گیرنده‌های تحریکی در مغز، باعث مهار تشنج می‌گردد. در پایان می‌توان بیان کرد که مینوسیکلین به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای درمان افراد صرعی بیشتر مورد مطالعه قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

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

وجود دارد که مینوسیکلین با کاهش شدت تحریک پذیری، بر التهاب ناشی از صرع تاثیر بگذارد. بر این اساس، به‌نظر می‌رسد مینوسیکلین از طریق کاهش میزان بیان ژن زیر واحد NR₂A 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 زیر واحد NR₂A گیرنده‌ی NMDA اعمال می‌کند. بدین ترتیب، جدای از اثرات ضدالتهابی مینوسیکلین که موجب نقش ضد تشنجی برای آن می‌شود،

References

- McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature*. 1999;399(6738 Suppl):A15-22.
- Engel J Jr. Classifications of the International League Against Epilepsy: time for reappraisal. *Epilepsia*. 1998;39(9):1014-7.
- 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.
- Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*. 1969;25(3):295-330.
- Coulter DA. Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol*. 2001;45:237-52.
- 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.
- 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.
- White HS, Harmsworth WL, Sofia RD, Wolf HH. Felbamate modulates the strychnine-insensitive glycine receptor. *Epilepsy research*. 1995;20(1):41-8.
- 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.
- Loscher W. Valproate enhances GABA turnover in the substantia nigra. *Brain Res*. 1989;501(1):198-203.
- 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]
- 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]
- 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.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*: Academic press 2007.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 pentylentetrazole 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 pentylentetrazol 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 amygdala 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. Data were 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.