Physiology and Pharmacology, 16 (3), 222-230
Autumn 2012 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of minocycline on amygdala kindling acquisition in rats

Seyed Mehdi Beheshti Nasr[1,2], Ali Moghimi[2], Mohammad Mohammad-Zadeh[1*]

1. Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
2. Dept. of Biology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 22 June 2012 **Accepted: 27 June 2012**

Abstract

Introduction: Minocycline is a derivative of tetracycline that has anti-inflammatory, antiappoptic, antioxidant and neuroprotective effects. Since there is a relationship between cell death and seizure, the aim of this study was to examine the role of minocycline in development of amygdala kindling in Wistar rats.

Methods: In this study, 21 rats were divided into three groups. After sterotaxic surgery and 1 week recovery period, rats received kindling stimulations (twice daily at 6 hour intervals). Group 1 (n=7) received daily kindling stimulations. Groups 2 (n=7) and 3(n=7) received saline (1 ml/kg) and minocycline (25 mg/kg), respectively, 60 min before kindling stimulation. Cumulative After discharge Duration (ADD), Cumulative Seizure duration (SD) and Seizure Stage (SS) were recorded and compared to the control group.

Results: In group 3, intraperitoneal administration of minocycline for 10 days significantly reduced cumulative ADD (control group: 907.2±64.5, minocycline group: 717.8±67.9) [$F_{(18, 216)}$=3.5, p<0.001] ،and cumulative SD (control group: 999.4±79.8, minocycline group: 776.1±77) [$F_{(19, 228)}$=3.8, p<0.001] compared to control group (group 2). It also significantly increased the mean number of stimulations to achieve the seizure stage 3 (control group: 7.2±0.6, minocycline group: 11±1) (P<0.05), and 5 (control group: 10.7±0.1, minocycline group: 18.7±0.3) (P<0.001).

Conclusion: According to the obtained results, application of minocycline increases the time required for amygdala kindling and may have anticonvulsant effects.

Key words: Seizure, Kindling, Minocycline, Rat

* Corresponding author e-mail: mohamad1353@gmail.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۶ (۳)، ۲۲۲ – ۲۳۰
پاییز ۱۳۹۱

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بررسی اثر مینو سایکلین بر روند کیندلینگ آمیگدال در موش های صحرایی

سید مهدی بهشتی نصر[۲،۱]، علی مقیمی[۲]، محمد محمدزاده[۱*]
۱. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار
۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

دریافت: ۲ تیر ۹۱ پذیرش: ۷ تیر ۹۱

چکیده

مقدمه: مینوسایکلین یک آنتی‌بیوتیک از خانواده تتراسایکلین است؛ که علاوه بر خاصیت ضدمیکروبی دارای ویژگی ضد التهابی، ضد آپوپتوز و آنتی اکسیدانی و دارای اثرات محافظتی روی سلولهای عصبی است. با توجه به ارتباط تشنج با مرگ و میر سلولی و التهاب، هدف از این تحقیق بررسی اثر مینوسایکلین بر روند کیندلینگ آمیگدال در موش های صحرایی است.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳ گروه موش صحرایی (۲۱ 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=۷) حیوانات تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند، به حیوانات گروه دوم (n=۷) روزانه سالین (1 ml/kg)، و گروه سوم (n=۷) مینوسیکلین با غلظت ۲۵ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم حیوان (mg/kg) به صورت داخل صفاقی (۶۰ دقیقه قبل از هر تحریک) تزریق شد. مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی (Cummulative Afterdischarge duration)، مدت زمان تشنج تجمعی (Cummulative Seizure duration) و مراحل رفتاری تشنج (Seizure Stage; SS) حیوانات این سه گروه پس از کیندلینگ با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها: در گروه سوم، تزریق ۱۰ روزه مینوسایکلین (۲۵ mg/kg) توانست ADD تجمعی (گروه کنترل: ۶۴/۵±۹۰۷/۲، گروه مینوسایکلین: ۶۷/۹±۷۱۷/۸) [$F_{(18, 216)}$=3.5, p<0.001]، و SD تجمعی (گروه کنترل: ۷۹/۸±۹۹۹/۴، گروه مینوسایکلین: ۷۷±۷۷۶/۳۱) [$F_{(19, 228)}$=3.8, p<0.001] را نسبت به گروه کنترل (گروه دوم) به طور معنی‌داری کاهش داد. همچنین تزریق مینوسایکلین تعداد تحریکات لازم برای بروز مراحل سوم (P<۰/۰۵) (گروه کنترل: ۰/۶±۷/۲، گروه مینوسایکلین: ۱±۱۱) و پنجم (گروه کنترل: ۰/۱±۱۰/۷، گروه مینوسایکلین: ۰/۳±۱۸/۷) (P<۰/۰۰۱) تشنج را به طور معنی‌داری افزایش دهد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد مینوسایکلین مدت زمان لازم برای کیندلینگ آمیگدال را افزایش داده و دارای اثرات ضد تشنجی است.

واژه‌های کلیدی: صرع، کیندلینگ، مینوسایکلین، موش صحرایی

مقدمه

صرع شایع‌ترین اختلال عصبی بعد از سکته مغزی و آلزایمر می‌باشد و از گذشته جزء بیماری‌های عصبی رایج در انسان بوده است [۳، ۷]، بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک بیش از یک درصد مردم دنیا از این بیماری رنج می‌برند [۲۲]. به دلیل غیر اخلاقی بودن آزمایش بر روی انسان، اغلب مطالعات در زمینهٔ صرع بر روی مدلهای آزمایشگاهی ایجاد صرع در حیوانات انجام می‌گیرد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به مدل کیندلینگ اشاره کرد [۲۴، ۲۷].

کیندلینگ یک مدل آزمایشگاهی برای مطالعه صرع زایی و صرع می‌باشد که در آن با تحریک مکرر ناحیه خاصی از مغز در حیوانات آزمایشگاهی تشنج ایجاد می‌شود [۲۹]. به کمک این مدل آزمایشگاهی می‌توان نحوه ارتباط بین نواحی مختلف مغزی را بررسی کرد، و نقش داروها و مواد شیمیایی مختلف را

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: mohamad1353@gmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

بر تشنج ایجاد شده در یک ناحیه مشخص بررسی کرد. کیندلینگ بهترین مدل برای ایجاد تشنجات موضعی پیچیده می‌باشد [۳۰]؛ که، شایع‌ترین نوع تشنجات در انسان است [۹، ۱۱].

با وجود تحقیقات گسترده در زمینه صرع و تشنج در حدود ۷۵ درصد موارد، دلایل ایجاد تشنج روشن نیست [۲۳]. اما مشخص شده است که سایتوکاین‌ها در حین تشنج از میکروگلیاها و آستروسیت‌ها آزاد می‌شوند [۳۴]. در همین رابطه مشاهده شده است که در طی حملات صرعی در مغز جوندگان سیگنالهای التهاب‌زا همچون سایتوکاین‌ها، کموکاین-ها و پروستاگلاندین‌ها افزایش می‌یابند. سایتوکاین‌ها رابط بین سیستم عصبی و سیستم ایمنی هستند [۱، ۶]. نورون‌ها، گلیاها و لنفوسیت‌ها گیرنده‌های بسیار زیادی برای انواع سایتوکاین‌ها دارند [۶، ۱۶].

تولید بیش از حد سایتوکاین‌ها منجر به اثرات نوروتوکسیک بر سلول‌های عصبی شده و باعث القاء تشنج می‌شود [۱۲، ۲۰، ۲۱]. با توجه به اثرات تشنج‌زایی سایتوکاین‌ها، عواملی که تولید سایتوکین‌ها را کاهش دهند، و یا اثر آنها را در سطح سلول بلوک کنند؛ می‌تواند برای کاهش تشنجهای صرعی مفید باشند. عوامل ضد التهابی همانند مینوسایکلین شاید گزینه مناسبی برای کاهش حملات صرعی باشد.

مینوسایکلین یک آنتی‌بیوتیک از خانواده تتراسایکلین است؛ که علاوه بر خاصیت ضدمیکروبی دارای ویژگی ضد التهابی است [۲]. تزریق سیستمیک مینوسایکلین موجب کاهش فعالیت میکروگلیا، و کاهش تولید سایتوکاین التهابی در سیستم عصبی مرکزی شده [۱۳، ۱۴، ۱۷]، و از نورون‌ها در برابر آسیب‌های مغزی ناشی از ضربه و آسیب تروماتیکی محافظت می‌کند [۱۸، ۳۱]. از طرفی با توجه به اثرات ضد التهابی و محافظتی مینوسایکلین، ممکن است این ترکیب، بر تشنج‌های صرعی تأثیرگذار باشد؛ که مورد بررسی قرار نگرفته است. از این‌رو، هدف از این تحقیق بررسی تأثیر مینوسایکلین بر تشنجات ناشی از روند کیندلینگ آمیگدال است.

مواد و روش ها

در این تحقیق تجربی از موش‌های صحرایی نر در محدوده وزنی ۲۸۰ تا ۳۲۰ گرم استفاده شد. برای بیهوش کردن حیوان از کتامین (۱۰۰ mg/kg) و رامپون (۲۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی استفاده شد [۱۵]. پس از بیهوشی، حیوان در دستگاه استریوتاکسی [۲۵]، قرار می‌گرفت. مختصات محل کارگذاری الکترود در هسته‌های قاعده‌ای جانبی آمیگدال (بر حسب میلیمتر: AP= – ۲/۵، L= +۴/۸ و V= ۷/۵ نسبت به سخت شامه) مشخص می‌گردید. دو الکترود تک قطبی نیز توسط پیچ‌های متصل به آنها به سطح جمجمه محکم می‌شدند. پس از قرار دادن الکترودها، پین‌های متصل به آنها در داخل مادگی سوکت مخابراتی قرار داده می‌شد و سوکت توسط سیمان دندانپزشکی بر روی سر حیوان متصل می‌گردید.

یک هفته پس از جراحی، از شدت آستانه به منظور تحریک دادن استفاده می‌شد. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان مورد نظر توسط جریانی به شدت ۱۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. اگر امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۵ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد. در غیر این صورت، هر بار شدت جریان ۱۰ میکروآمپر به فواصل ۵ دقیقه افزایش داده می‌شد تا وقتی که امواج تخلیه متعاقب ثبت گردد. سپس حیوانات با این شدت جریان آستانه روزانه دو بار (با فاصله زمانی حداقل ۶ ساعت) تحریک می‌شدند، تا مراحل مختلف تشنج را نشان داده و کیندل شوند [۳۰].

با ادامه تحریکات به تدریج هم زمان با ثبت امواج تخلیه متعاقب، مراحل تشنج نیز قابل مشاهده می‌باشند. از مراحل پنج‌گانه تشنج بر اساس تقسیم بندی Racine [۲۷] این کمیت‌ها ثبت می‌شدند:

مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج (Stage 4 Latency; S_4L) ؛ ۳- مدت زمان مرحله ۵ تشنج (Stage 5 Duration; S_5D)؛ ۴- مدت زمان حمله تشنج (SD). مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (Afterdischarge duration; ADD)؛ یکی دیگر از کمیت-های تشنجی قابل ثبت بود. با توجه به اینکه مقایسه‌ی میانگین داده های گروه‌ها در کمیت های S_5D، SD و ADD به صورت تجمعی بهتر صورت می‌گیرد و نمایش نتایج نیز روشن-تر خواهد بود؛ سه کمیت مذکور به شکل تجمعی (حاصل جمع عدد هر کمیت در هر بار تحریک با داده های تحریک های

Table 1. Effect of minocycline injection (i.p.) on Duration of equilibrium preservation

	Minocycline (50 mg/kg)	Minocycline (25 mg/kg)
Duration of equilibrium preservation (% of saline injection)	42.3±8**	92.6±2.9
** P<0.01 when compared to saline injection (n=5)		

قبلی) تجزیه تحلیل و نمایش داده شده است.

مراحل انجام کار در گروه‌های مورد استفاده در این آزمایش به این ترتیب بود که گروه اول فقط تحریکات کیندلینگ را (۲ بار در روز با فاصله ۶ ساعت تا کیندل شدن) دریافت می‌کردند. گروه دوم تمامی مراحل کار مشابه گروه اول بود؛ به استثنای اینکه سالین (۱ ml/kg) به صورت داخل صفاقی روزانه تزریق می‌شد. گروه سوم تمامی مراحل کار مشابه گروه دوم بود به استثنای اینکه مینوسایکلین با غلظت ۲۵ mg/kg (تهیه شده از Sigma) جایگزین سالین می‌شد. یک ساعت پس از هر بار تزریق حیوانات تحریک می‌شدند و کمیت های تشنجی ثبت می‌شد. با توجه به این که پروتکل تحریکی برای کیندل کردن حیوانات ۲ بار در روز بود؛ تحریک دوم در هر روز بدون تزریق بود.

در تحقیق پیشین [۵] اثر مینوسایکلین با دوزهای ۱۲/۵ mg/kg، ۲۵ و ۵۰ را در حیوانات کیندل شده بررسی شد؛ و نشان داده شد که بیشترین تأثیر آن بر کمیت های تشنجی دوز ۵۰ mg/kg بود. از آنجایی که در تحقیق مذکور تنها یک مرتبه مینوسایکلین به موش‌های کیندل شده تزریق می‌شد؛ می‌بایست دوز انتخابی برای مطالعه روند کیندلینگ علاوه بر اینکه اثر ضد تشنجی داشته باشد رفتار حیوان (رفتارهای غیر تشنجی) را تحت تأثیر قرار ندهد. بدین منظور برای تعیین دوز مناسب (از بین دوزهای ۱۲/۵ mg/kg، ۲۵ و ۵۰) از تست رفتاری میله گردان (Rotarod) استفاده شد.

برای این منظور در دو گروه از حیوانات، تزریق داخل صفاقی مینوسایکلین با دوزهای ۲۵ mg/kg و ۵۰ صورت گرفت. یک ساعت پس از تزریق، موش ها در دستگاه Rotarod قرار گرفتند و مدت زمان حفظ تعادل آنها ثبت می‌شد. نتایج نشان داد تزریق مینوسایکلین با دوز ۵۰ mg/kg به طور معنی‌داری مدت زمان حفظ تعادل را نسبت به گروه سالین کاهش داد (P<۰/۰۱). اما دوز ۲۵ mg/kg تأثیر معنی-داری بر رفتار حیوان نداشت (جدول ۱). بنابراین دوز ۲۵ mg/kg برای بررسی اثر مینوسایکلین بر روند کیندلینگ انتخاب شد.

پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکترود در محل مورد نظر، مغز حیوان خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. بعد از یک هفته از محل الکترود برش‌گیری به عمل آمده تا محل الکترود مشخص گردد.

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار Statistica استفاده شد. در آزمایش اول برای مقایسه دوزهای مختلف مینوسایکلین بر کمیت‌های تشنج از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated measure و پس آزمون Tukey استفاده شد. جهت نمایش اختلاف بین داده‌ها، با استفاده از آزمون t– زوج‌ها هر یک از کمیت‌های با کنترل مربوطه، استفاده گردید.

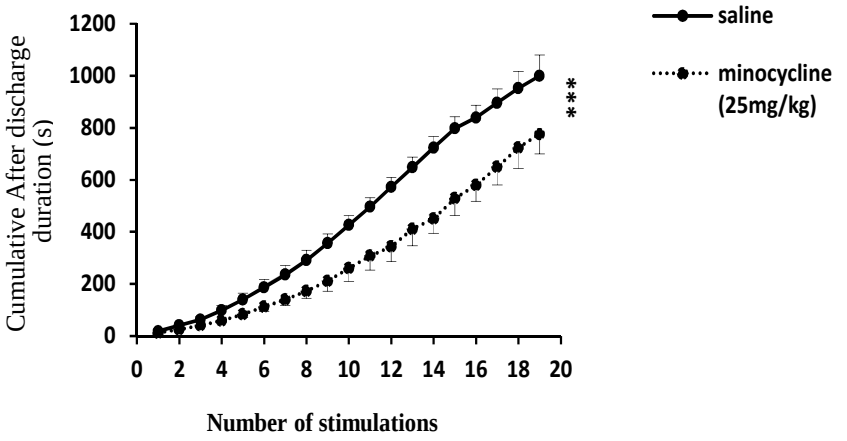
یافته ها

میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع امواج تخلیه‌های متعاقب در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با هم نداشت و این بدان معناست که استعداد ابتلا به حملات تشنجی در تمامی گروه ها یکسان بود. همچنین تعداد تحریکات لازم برای کیندل شدن و کمیت های تشنجی اندازه‌گیری شده در این تحقیق در گروه اول (تحریکات کیندلینگ) و گروه دوم (تحریکات کیندلینگ + تزریق سالین) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

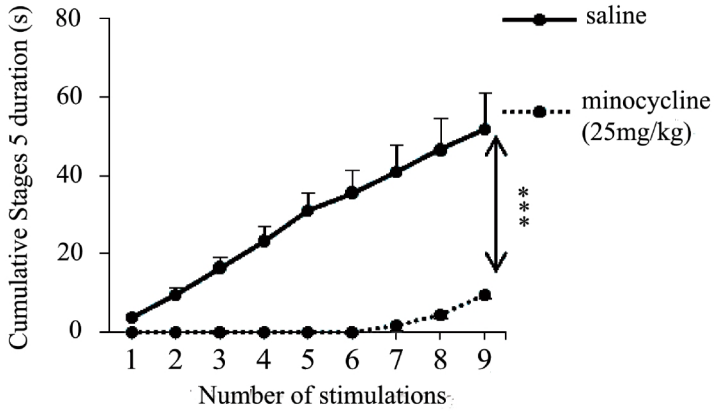
کمیت ADD در حیواناتی که روزانه (۱۰ روز) مینوسایکلین (۲۵ mg/kg) دریافت می‌کردند نسبت به گروه دریافت کننده سالین به طور معنی داری کاهش یافت [$F_{(18, 216)}=3.5$; $P<0.001$] (شکل ۱).

کمیت S_5D نیز در حیوانات گروه سوم (دریافت کننده مینوسایکلین) نسبت به گروه سالین به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲).

یکی دیگر از کمیت‌هایی که در طی روند کیندلینگ تا زمان



شکل ۱- اثر تزریق روزانه مینوسایکلین بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی (Cumulative After discharge duration) طی روند کیندلینگ آمیگدال. تزریق مینوسایکلین باعث کاهش مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی نسبت به گروه کنترل (تزریق سالین) می‌شود. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین و به شکل تجمعی نشان داده شده‌اند. *** نشان دهنده P<۰/۰۰۱ (n=۷)



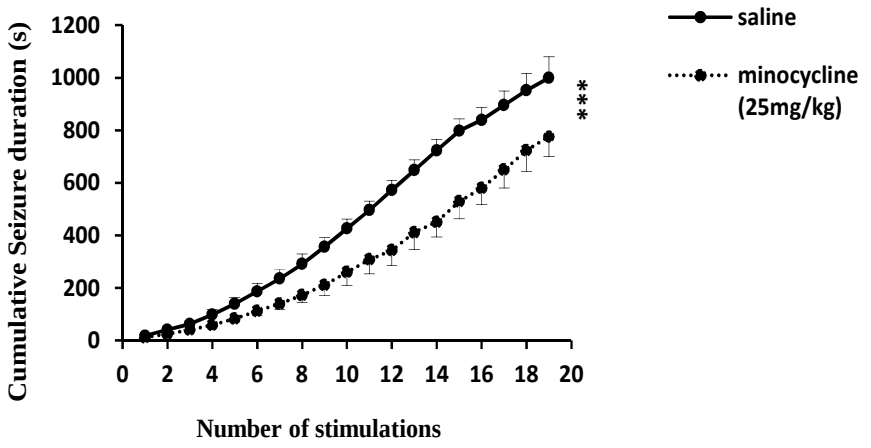
شکل ۲- اثر تزریق روزانه مینوسایکلین بر مدت زمان مرحله ۵ تشنج تجمعی (Cummulative Stage 5 Duration; S5D)؛ طی روند کیندلینگ آمیگدال. تزریق مینوسایکلین باعث کاهش مدت زمان مرحله ۵ تشنج تجمعی نسبت به گروه کنترل (تزریق سالین) می‌شود. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین و به شکل تجمعی نشان داده شده‌اند. *** نشان دهنده P< ۰/۰۰۱ (n=۷).

کیندل شدن حیوانات قابل اندازه‌گیری است، کمیت SD می‌باشد. آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated measure نشان داد کمیت SD در حیواناتی که دوز ۲۵ mg/kg مینوسایکلین را دریافت کرده بودند نسبت به گروه سالین به طور معنی‌داری کاهش یافته است [$F_{(19, 228)}$=3.8; P<0.001] (شکل ۳).

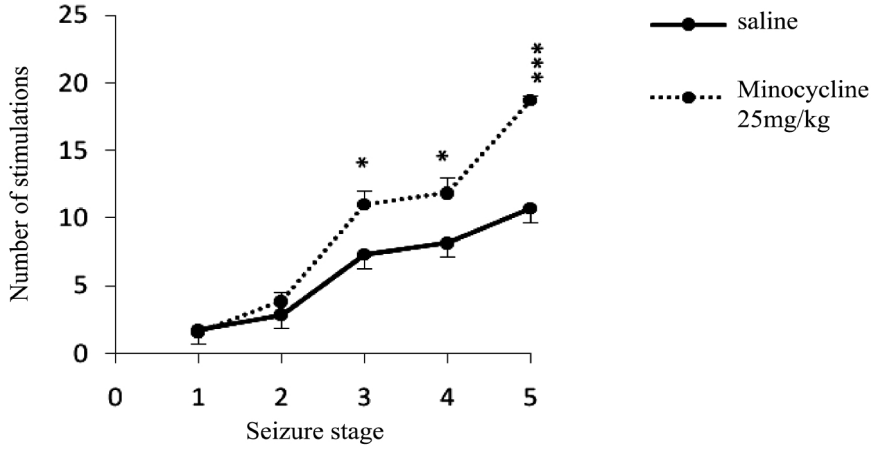
با توجه به اینکه در طی روند کیندلینگ مراحل پنج‌گانه تشنجی قابل مشاهده و ثبت است، کمیت رفتاری مرحله حمله (Seizure stage) هر روز به دنبال تحریکات ثبت می‌شد. میانگین تعداد تحریکات در گروه سوم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه تزریق سالین داشت (۰/۳ ± ۱۸/۷ در مقایسه با ۰/۱ ± ۱۰/۷) (P<۰/۰۰۱). همچنین تعداد تحریکات لازم برای رسیدن حیوانات به مراحل سوم و چهارم تشنج در گروه تزریق مینوسایکلین نسبت به گروه سالین افزایش معنی داری داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۴).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مینوسایکلین مدت زمان لازم برای کیندلینگ آمیگدال را افزایش می‌دهد به



شکل ۳- اثر تزریق روزانه مینوسایکلین بر مدت زمان تشنج تجمعی (Cummulative Seizure duration) طی روند کیندلینگ آمیگدال. تزریق مینوسایکلین باعث کاهش مدت زمان تشنج تجمعی نسبت به گروه کنترل (تزریق سالین) می‌شود. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین و به شکل تجمعی نشان داده شده‌اند. *** نشان دهنده P< ۰/۰۰۱ (n=۷).



شکل ٤- تأثیر مینوسایکلین بر بروز مراحل رفتاری تشنج طی روند کیندلینگ آمیگدال. در گروه تزریقی مینوسایکلین 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 و *** نشان دهنده P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه تزریق سالین می باشد (n=۷).

طوری که تزریق ۱۰ روزه مینوسایکلین (۲۵ mg/kg) توانست ADD و SD تجمعی را نسبت به گروه کنترل (گروه سالین) به طور معنی داری کاهش دهد. همچنین تعداد تحریکات لازم برای بروز مراحل سوم تا پنجم تشنج به طور معنی‌داری با تزریق روزانه مینوسایکلین افزایش یافت. مینوسایکلین از مشتقات نسل دوم خانواده تتراسایکلین است [۸]، اگر چه در ابتدا به عنوان آنتی بیوتیک شناخته شده بود، اما به دنبال آن شواهدی مبنی بر خاصیت ضد التهابی و آنتی آپوپتتیک این دارو به دست آمد. از جمله عملکردهای شناخته شده مینوسایکلین، مهار فعالیت میکروگلیاها و آستروسیت‌هاست [۳۱]. التهاب، و به دنبال آن مرگ سلولی آپوپتتیک در ایجاد تشنج دخیل است [۳۱، ۳۲]. در هنگام التهاب در مغز میکروگلیاها و آستروسیت‌ها، اولین سلول‌هایی هستند که فعال می‌شوند. به دنبال این فعالیت، سایتوکاین های پیش التهابی (مانند: IL-6, TNF-α, IL-1β) ترشح می‌شوند [۱۰، ۲۸، ۳۱]. بنابراین انتظار می‌رود عوامل ضدالتهابی مانند مینوسایکلین بتوانند از پیشرفت تشنج بکاهند و یا درصد وقوع تشنج را کاهش دهند. اثرات ضدتشنجی مشاهده شده در این تحقیق نیز تأیید کننده این موضوع می‌باشد. در راستای این موضوع گزارش های متعددی نشان داده است که مینوسایکلین با مهار IL-1β (که باعث تحریک آزادسازی گلوتامات از پایانه های عصبی) در کاهش شدت تشنجات صرعی نقش دارد [۱۳، ۱۴، ۱۷].

یکی دیگر از خواص مینوسایکلین ویژگی آنتی اکسیدانی آن است. بر اساس مطالعات و مشاهدات آزمایشگاهی، این دارو به طور مستقیم پاک کننده رادیکال‌های آزاد و مهار کننده آنزیم‌هایی مثل نیتریک اکساید سنتاز می‌باشد [۴، ۱۹]. از آن‌جایی که در هنگام تشنج به محض رهایش گلوتامات، غلظت کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد و نیتریک اکساید سنتاز فعال می‌شود؛ بنابراین مینوسایکلین شاید با مهار نیتریک اکساید سنتاز از پیشرفت تشنج ومرگ سلولی جلوگیری کند [۲۶]. همانطور که گفته شد مینوسایکلین یک ترکیب ضد آپوپتوزی است [۳۵]، از جمله مهمترین عواملی که در مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول فعال می‌شوند، کاسپاز ۱ و ۳ هستند [۱۸]، مینوسایکلین می‌تواند به طور مستقیم با کاهش تجمع کلسیم سبب پایداری غشای میتوکندری شده و از رهایش سیتوکروم C و دیگر فاکتورهای آپوپتتیک به داخل سیتوپلاسم، جلوگیری می‌کند و موجب محافظت نورونی می‌شود [۳۳]. شاید به واسطه‌ی این مکانیسم پیشرفت تشنج به واسطه مینوسایکلین کُند شود.

تزریق داخل صفاقی مینوسایکلین پارامتر الکتروفیزیولوژیک ADD تجمعی را نسبت به گروه کنترل بطور 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 مینوسایکلین با مهار مدارهای نورونی ناحیه آمیگدال اثر کاهشی بر روی این پارامتر در روند کیندلینگ دارد. همچنین مشاهده شد مینوسایکلین مدت زمان تشنج (SD) را نیز به طور معنی داری کاهش داد.

در این پژوهش مینوسایکلین 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. همچنین نشان داده شد که تزریق داخل صفاقی مینوسایکلین تعداد تحریکات لازم برای شروع مرحله ۴ تشنج را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد مینوسایکلین 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 مینوسایکلین تعداد تحریکات لازم برای شروع مرحله ۵ تشنج را به طور معنی داری افزایش داد. همچنین مشاهده شد مینوسایکلین S_5D را نیز نسبت به گروه کنترل به صورت معنی داری کوتاه کرده است و این نشان می‌دهد که طول مدت حملات تونیک- کلونیک احتمالاً پس از سرکوب تولید و یا آنتاگونیزه کردن سایتوکاین‌های التهاب‌زا توسط مینوسایکلین کاهش می‌یابد.

تاکنون در رابطه با اثر مینوسایکلین بر تشنجات ناشی از مدل‌های آزمایشگاهی صرع گزارش های زیادی وجود ندارد. در تحقیقی که همزمان با مطالعه حاضر انجام می‌شد، مشاهده شد که مینوسایکلین تنها مرحله تأخیر در فاز ۴ را برخی روزها طولانی می‌کند (در کیندلینگ PTZ) و بر سایر کمیتهای تشنجی تأثیر معنی‌داری ندارد. در پژوهش قبلی ما نیز اثرات ضد تشنجی در موشهای کیندل شده مشاهده شد [۵]. نتایج تحقیق حاضر در مورد مدت زمان تأخیری تا شروع مراحل تشنجی مشابه پژوهشی بوده که نتایج آن هنوز منتشر نشده است. اگرچه در تحقیق حاضر اثرات ضد تشنجی بیشتری از مینوسایکلین مشاهده شد. برای مثال کاهش ADD و S_5D که یکی از دلایل تفاوت در نتایج به یقین تفاوت در مدلهای تشنجی است. البته هنوز در مورد اینکه صرع و تشنجات ناشی از آن باعث ایجاد عوامل التهاب‌زا می‌شود و یا اینکه عوامل التهاب‌زا ایجاد کننده صرع هستند و یا اینکه هر دو اتفاق می‌تواند رخ دهد کاملاً مشخص نیست [۳۵]. اما آنچه که در این تحقیق مشخص شد این بود که مینوسایکلین احتمالاً با کاهش غلظت عوامل التهاب‌زا در مغز و کانون تشنج از شدت تشنجات ناشی از کیندلینگ آمیگدال می‌کاهد و ممکن است این اثر ضد تشنجی مینوسایکلین به خواص ضدآپوپتوز و آنتی اکسیدانی آن مربوط باشد. از این‌رو برای روشن شدن هر چه بیشتر این مسأله نیاز به تحقیقات زیادتر است.

سپاسگزاری

در پایان از معاونت محترم آموزشی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار که بخشی از حمایت مالی این پژوهش را بر عهده داشتند و نیز از معاونت محترم پژوهشی دانشکده‌ی علوم دانشگاه فردوسی مشهد برای تهیه داروی مینوسایکلین تشکر می‌گردد.

References

[1] Aarli JA, Epilepsy and the immune system. ***Arch Neurol*** 57 (2000) 1689-92.

[2] Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 93 (1996) 14014-19.

[3] Anschel DJ, Pascual-Leone A, Holmes GL, Anti-kindling effect of slow repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. ***Neurosci Lett*** 351 (2003) 9-12.

[4] Arzimanoglou A, Hirsch E, Nehlig A, Castelnau P, Gressens P, Pereira de Vasconcelos A, Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review. ***Epileptic Disord*** 4 (2002) 173-182.

[5] Beheshti Nasr SM, Mohammad-Zadeh M, Moghimi A, The Role of Minocycline on Amygdala-Kindled Seizures in Rat. ***J Sabzevar Univ of Med Sci*** 19 (2012) 14-25.

[6] Benveniste EN, Cytokine actions in the central nervous system. ***Cytokine Growth Factor Rev***. 9 (1998) 259-275.

[7] Blumcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD, Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. ***Epilepsy Res*** 36 (1999) 205-223.

[8] Buller KM, Carty ML, Reinebrant HE, Wixey JA, Minocycline: a neuroprotective agent for hypoxic-ischemic brain injury in the neonate? ***J Neurosci Res*** 87 (2009) 599-608.

[9] Chen SJ, Desai MA, Klann E, Winder DG, Sweatt JD, Conn PJ, Amygdala kindling alters protein kinase C activity in dentate gyrus. ***J Neurochem*** 59 (1992) 1761-1769.

[10] Choi J, Koh S, Role of brain inflammation in epileptogenesis. ***Yonsei Med J*** 49 (2008) 1-18.

[11] Edwards HE, Burnham WM, Ng MM, Asa S, MacLusky NJ, Epilepsy Limbic seizures alter reproductive function in the female rat. ***Epilepsia*** 40 (1999) 1370-1377.

[12] Espinosa E, Bermudez-Rattoni F, Behavior-immunity relationship: the role of cytokines. ***Rev Invest Clin*** 53 (2001) 240-253.

[13] Fan LW, Pang Y, Lin S, Tien LT, Ma T, Rhodes PG, Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. ***J Neurosci Res*** 82 (2005) 71-82.

[14] Giuliani F, Hader W, Yong VW, Minocycline attenuates T cell and microglia activity to impair cytokine production in T cell-microglia interaction. ***J Leukoc Biol*** 78 (2005) 135-143.

[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*** 28 (2008) 7828-36.

[16] Hanisch UK, Quirion R, Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. ***Brain Res Brain Res Rev*** 21 (1995) 246-84.

[17] Henry CJ, Huang Y, Wynne A, Hanke M, Himler J, Bailey MT, et al, Minocycline attenuates lipopolysaccharide(LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. ***J Neuroinflammation*** 5 (2008) 1-14.

[18] Heo K, Cho YJ, Cho KJ, Kim HW, Kim HJ, Shin HY, et al, Minocycline inhibits caspase-dependent and-independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. ***Neurosci Lett*** 398 (2006) 195-200.

[19] 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*** 94 (2005) 819-27.

[20] Kubera M, Budziszewska B, Basta-Kaiml A, Zajicova A, Holan V, Lason W, Immunoreactivity in kainate model of epilepsy. ***Pol J Pharmacol*** 53 (2001) 541-5.

[21] Lehtimaki KA, Keranen T, Huhtala H, Hurme M, Ollikainen J, Honkaniemi J, et al, Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration. ***J Neuroimmunol*** 152 (2004) 121-5.

[22] McNamara JO, Emerging insights into the genesis of epilepsy. ***Nature*** 399 (1999) A15-22.

[23] Mlodzikowska-Albrecht J, Steinborn B, Zarowski M, Cytokines, epilepsy and antiepileptic drugs--is there a mutual influence? ***Pharmacol Rep*** 59 (2007) 129-38.

[24] Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Javan M, Ghorbani P, Effect of low frequency stimulation of perforant path on kindling acquisition and synaptic transmission in the dentate gyrus in rats. ***Physiol Pharmacol*** 11 (2007) 137-145.

[25] Paxinos G, Watson C, ***The rat brain in stereotaxic coordinates***: Academic press 2007.

[26] Plane JM, Shen Y, Pleasure DE, Deng W, Prospects for minocycline neuroprotection. ***Arch Neurol*** 67 (2010) 1442-1448.

[27] Racine RJ, Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. ***Electroencephalogr Clin Neurophysiol*** 32 (1972) 281-294.

[28] Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ, Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 105 (2008) 17151-6.

[29] Sato M, Racine RJ, McIntyre DC, Kindling: basic mechanisms and clinical validity. ***Electroencephalogr Clin Neurophysiol***. 76 (1990) 459-72.

[30] Shindo A, Nakamura T, Matsumoto Y, Kawai N, Okano H, Nagao S, Seizure suppression in amygdala-kindled mice by transplantation of neural stem/progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. ***Neurol Med Chir (Tokyo)*** 50 (2010) 98-105.

[31] Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W, Minocycline as a neuroprotective agent. ***Neuroscientist*** 11 (2005) 308-322.

[32] Vezzani A, Inflammation and epilepsy. ***Epilepsy Curr*** 5 (2005) 1-6.

[33] 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*** 279 (2004) 19948-54.

[34] Woodroofe MN, Cytokine production in the central nervous system. ***Neurology*** 45 (1995) S6-10.

[35] Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BYS, Ona V, Li M, Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. ***Nature*** 417 (2002) 74-8.