



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของ piperine ที่มีต่อระดับของ
NMDA และ GABA_A receptors
ในสมองของหนูขาวเล็กที่กระตุ้นให้เกิด
การชักโดยใช้ pentylenetetrazole

โดย ดร.ธนศักดิ์ เทียกทอง

เมษายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของ piperine ที่มีต่อระดับของ
NMDA และ GABA_A receptors
ในสมองของหนูขาวเล็กที่กระตุ้นให้เกิด
การชักโดยใช้ pentylenetetrazole

ดร.ธนศักดิ์ เทียกทอง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และผู้ช่วยวิจัยทุกท่านที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้ ทั้งจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และจากสถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินไปอย่างราบรื่นและสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีพุทธศักราช 2549 จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4980021

ชื่อโครงการ : ผลของ piperine ที่มีต่อระดับของ NMDA และ GABA_A receptors ในสมองของหนูขาวเล็กที่กระตุ้นให้เกิดการชักโดยใช้ pentylenetetrazole

ชื่อนักวิจัย : ดร.ธนศักดิ์ เทียกทอง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

E-mail Address : thanasak37@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ :

Piperine เป็นสารจำพวก alkaloid ซึ่งพบในพริกไทยและมีการศึกษาพบว่า piperine มีผลลดอาการชักในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามกลไกในการลดอาการชักของ piperine ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โครงการวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของ piperine ที่มีต่อระดับของ NMDA และ GABA_A receptors ในสมองของหนูขาวเล็กที่กระตุ้นให้เกิดการชักโดยการฉีดสารแขวนลอย pentylenetetrazole (PTZ) ในน้ำเกลือ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเข้าช่องท้องหนูขาวเล็กวันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน และใช้ sodium valproate ซึ่งเป็นยารักษาโรคลมชักมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบผล การให้ PTZ ทำให้ระดับ NMDA receptor มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในสมองส่วน frontal cortex, hippocampus และ temporal cortex ของหนูขาวเล็ก ส่วนการให้ sodium valproate ร่วมกับ PTZ เพิ่มระดับ NMDA receptor ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ในขณะที่ทำให้ระดับ NMDA receptor ในสมองส่วน temporal cortex ของหนูขาวเล็กลดลง การให้ piperine 20 และ 40 mg/ml มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ NMDA receptor ในทิศทางเดียวกันกับการให้ sodium valproate ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า piperine อาจมีผลต่อระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กแตกต่างกันในแต่ละส่วนคล้ายกับ sodium valproate ส่วนการศึกษาผลของ piperine ที่มีต่อระดับของ GABA_A receptors ในสมองของหนูขาวเล็กไม่สามารถทำได้ เนื่องจากเกิดความผิดพลาดในขบวนการล้าง Hyperfilm อย่างไรก็ตามโครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่าง piperine ระดับของ NMDA receptor และการเกิดอาการชัก ซึ่งข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคตคือควรทำการศึกษาผลของ piperine ที่มีต่อการทำงานของ channel ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการชัก ได้แก่ sodium และ potassium channels

คำหลัก : piperine, NMDA receptor, GABA_A receptor, seizure, pentylenetetrazole

Abstract

Project Code : MRG4980021

Project Title : The effect of piperine on levels of NMDA and GABA_A receptors in brains of pentylenetetrazol-induced-seizure mice

Investigator : Dr.Thanasak Teaktong

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

E-mail Address : thanasak37@hotmail.com

Project Period :

Piperine is an alkaloid compound found in pepper and effects of piperine on convulsions induced in mice have been reported in several studies. However, mechanisms of piperine involved with anti-seizure effect have not been understood. The present study evaluated the effects of piperine on level of NMDA and GABA_A receptors in brains of PTZ-treated mice. Over a period of 30 days, i.p. injections of PTZ 25 mg/kg on alternate days resulted in the development of a well-known kindling model of epilepsy. Sodium valproate was used to be the standard antiepileptic drug in the study. PTZ produced a trend of increase in NMDA receptor without any significance in frontal cortex, hippocampus and temporal cortex of mouse brains. Administration of sodium valproate followed by PTZ increased NMDA receptor in frontal cortex and hippocampus whereas a decrease in NMDA receptor was found in temporal cortex. Piperine 20 and 40 mg/ml was shown to affect alterations of NMDA receptor in the same direction as sodium valproate did. The result suggests that piperine might have similar effect on NMDA receptor in different brain regions as sodium valproate. Unfortunately, analysis of effect of piperine on levels of GABA_A receptor in mouse brains was not achieved because of failure in the process Hyperfilm development. However, this is the first study that revealed relationship between piperine, level of NMDA receptor and seizure. Further studies need to be performed to evaluate effects of piperine on other targets involved with seizure such as sodium and potassium channels.

Keywords : piperine, NMDA receptor, GABA_A receptor, seizure, pentylenetetrazole

บทนำ

โรคลมชัก (epilepsy) เป็นความผิดปกติทางระบบประสาทที่สำคัญซึ่งพบมากเป็นอันดับสอง รองจาก stroke โดยเกิดขึ้นประมาณ 0.5-1% ในประชากรทั่วไป (McCorry et al., 2004) สาเหตุของการเกิดโรคลมชักเป็นผลจากปัจจัยต่างๆที่ทำให้เกิดการทำงานผิดปกติของสมอง เช่น การติดเชื้อโรคต่างๆ อุบัติเหตุที่กระทบกระเทือนสมอง ภาวะสมองขาดเลือด โรคของระบบประสาทส่วนกลาง และการได้รับยาหรือสารพิษบางชนิด เป็นต้น สาเหตุดังกล่าวมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของเซลล์ประสาทชนิดต่างๆในสมอง เกิดการส่งกระแสประสาทและคลื่นไฟฟ้าที่ผิดปกติในบริเวณต่างๆของสมอง และเมื่อคลื่นไฟฟ้าดังกล่าวมีปริมาณมากพอจะกระตุ้นให้เกิดการชักได้ในที่สุด (Benardo, 2003; Lee et al., 2003)

การเกิดคลื่นไฟฟ้าที่ผิดปกติจากเซลล์ประสาทเป็นผลจากการเกิด postsynaptic potential เนื่องจากกระตุ้นการทำงานของ calcium channels ชนิดต่างๆ ที่มากผิดปกติ โดยเฉพาะ T-type calcium channels ทำให้มี calcium เข้าสู่เซลล์ประสาทมากขึ้น เกิดภาวะ depolarization ส่งผลกระตุ้นเซลล์ประสาทชนิดต่างๆให้ส่งคลื่นไฟฟ้าที่ผิดปกติออกมามากขึ้น จนเกิดอาการแสดงของการชัก (Delorenzo et al., 2005; Errington et al., 2005) นอกจากการชักจะเกิดจากการทำงานของ calcium channels ที่มากเกินไปแล้ว ยังเกิดจากการที่ chloride channels ไม่สามารถทำงานได้หรือทำงานน้อยกว่าปกติ ซึ่งปกติการเปิดของ chloride channels ทำให้เกิด inhibitory postsynaptic potential ที่ยับยั้งการเกิด depolarization และการส่งกระแสประสาทรวมถึงคลื่นไฟฟ้าของเซลล์ประสาทในสมอง หากมีความผิดปกติของ chloride channels จนทำให้ไม่สามารถทำงานหรือทำงานน้อยกว่าปกติ การยับยั้งดังกล่าวจะไม่สามารถเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้เกิดการส่งกระแสประสาทและคลื่นไฟฟ้าที่มากและผิดปกติออกมา (Jentsch et al., 2005; Lerche et al., 2005) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการชักเป็นความผิดปกติของเซลล์ประสาทในสมองที่เกิดขึ้นจากการทำงานที่เปลี่ยนแปลงไปของทั้ง T-type calcium และ chloride channels

Calcium channels สามารถพบได้ในบริเวณต่างๆของสมอง โดย calcium channels ที่พบได้มากชนิดหนึ่งในสมองคือ N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor ซึ่งมีบทบาทหน้าที่ต่างๆเกี่ยวกับการทำงานของสมอง เช่น การเจริญของเซลล์ประสาท การสร้าง synapse และการเกิด plasticity ของเซลล์ประสาท เป็นต้น การกระตุ้น NMDA receptor ด้วย glutamate ซึ่งเป็น excitatory neurotransmitter ที่สำคัญในสมอง จะส่งผลให้ calcium เข้าสู่เซลล์ประสาท กระตุ้นให้เกิด postsynaptic depolarization อย่างต่อเนื่อง และเกิดการส่งกระแสประสาทตามมา (Aarts and Tymianski, 2003) หาก NMDA receptor ถูกกระตุ้นมากเกินไป ทั้งจากการที่มีระดับของ NMDA receptor เพิ่มขึ้นหรือ NMDA receptor มีความไวต่อการกระตุ้นมากขึ้น จะส่งผลให้เซลล์ประสาทส่งกระแสประสาทมากผิดปกติ จากการที่มี calcium เข้าสู่เซลล์ประสาทมากเกินไป จนเกิด paroxysmal depolarizing shift (PDS) ซึ่งเป็น action potential ที่เกิดขึ้นนานกว่าปกติ และส่งเสริมให้เกิดเป็นคลื่นไฟฟ้าที่ผิดปกติ จนนำไปสู่การเกิดอาการชัก (Chang and Lowenstein, 2003; Kulak et al., 2004) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการกระตุ้น NMDA receptors สามารถกระตุ้นให้เกิดการชักขึ้นได้ (Makarska-Bialek et al., 2005; Slamberova and Rokyta, 2005) และการเกิดอาการชักสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับของ NMDA receptor ในสมองส่วนต่างๆ ซึ่งบางการศึกษาพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับของ NMDA receptor ในสมองส่วน

hippocampus และ cortex ของผู้ป่วยโรคลมชัก (Mathern et al., 1999; Najm et al., 2000; Neder et al., 2002) ในขณะที่บางการศึกษาพบว่าในสมองผู้ป่วยโรคลมชักมีระดับของ NMDA receptor ลดลง (Hosford et al., 1991; Andre et al., 2004) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าระดับของ NMDA receptor ในสมองที่มีพยาธิสภาพของโรคลมชักจะเป็นไปในทิศทางใด

Chloride channels ในสมองทำหน้าที่หลักในการยับยั้งการส่งกระแสประสาทโดยยับยั้งการเกิด depolarization จากการที่ chloride เข้าสู่เซลล์ประสาท จนเกิดภาวะ hyperpolarization และ inhibitory postsynaptic potentials การเปิดของ chloride channels นั้นส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการที่ gamma-aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็น inhibitory neurotransmitter ในสมอง ออกฤทธิ์กระตุ้น GABA_A receptor (Smith, 2001; Semyanov et al., 2004) จากการศึกษาในสมองของสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยที่มีอาการชักพบว่าการทำงานของ GABA_A receptor ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Calcagnotto et al., 2005; Palma et al., 2005) ส่วนระดับของ GABA_A receptors นั้น หลายการศึกษาพบว่ามีระดับลดลง (Kuwert et al., 1996; Koepp et al., 1997; Loup et al., 2000) ในขณะที่อีกบางการศึกษาพบว่าเพิ่มขึ้นหรือไม่เปลี่ยนแปลง (Kamphuis et al., 1995; Zilles et al., 1999) จึงทำให้ไม่สามารถบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนว่าสาเหตุของการเกิดโรคลมชักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ GABA_A receptor อย่างไร

ในปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาโรคลมชักมีจำนวนมากและแบ่งออกเป็นหลายประเภทตามกลไกการออกฤทธิ์ ได้แก่ ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ sodium channel เช่น phenytoin และ carbamazepine, ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NMDA receptor เช่น topiramate และยาที่ออกฤทธิ์เพิ่มการทำงานของ GABA เช่น benzodiazepines และ sodium valproate (Porter and Meldrum, 2002) แม้ว่ายาเหล่านี้จะให้ประสิทธิภาพในลดความถี่และความรุนแรงของโรคลมชัก อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยจำนวนไม่น้อยที่ไม่สามารถควบคุมอาการของโรคได้ด้วยการใช้ยาเพียงชนิดเดียว (French and Faught, 2009) และอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาดังกล่าวมักเกิดขึ้นได้บ่อย เช่น มึนงง เหนื่อย ความผิดปกติของเม็ดเลือด ความผิดปกติเกี่ยวกับตับ และผื่นแพ้ที่ผิวหนัง เป็นต้น (Walker et al., 2005) ทำให้ยังคงมีการพัฒนาและค้นคว้าศึกษาเกี่ยวกับยารักษาโรคลมชักที่มีประสิทธิภาพและทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์น้อยที่สุดต่อไป

สมุนไพรเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการนำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เนื่องจากสมุนไพรเป็นทรัพยากรที่มีอยู่มากมายในประเทศไทย และการนำสมุนไพรมาใช้ในการสนับสนุนภูมิปัญญาไทยที่มีอยู่แต่โบราณให้เกิดประโยชน์ที่คุ้มค่า พริกไทยเป็นสมุนไพรที่พบได้มากในประเทศไทยและนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อเป็นเครื่องเทศในการปรุงอาหาร จากการศึกษาที่ผ่านมา สารภายในพริกไทย ได้แก่ piperine ซึ่งเป็นสารจำพวก alkaloid มีฤทธิ์ลดอาการชักในสัตว์ทดลอง (D'Hooge et al., 1996; Mori et al., 1985) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของ piperine ในการลดอาการชักยังไม่ทราบแน่ชัด และเนื่องจากการเกิดอาการชักมีความสัมพันธ์กับการทำงานของตัวรับของสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการส่งสัญญาณประสาทและกระแสไฟฟ้า ซึ่งได้แก่ NMDA และ GABA_A receptors การวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาถึงการออกฤทธิ์ในการลดอาการชักของ piperine กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ NMDA และ GABA_A receptors ในสมองของสัตว์ทดลอง เพื่อพิสูจน์ว่าฤทธิ์ในการลดอาการชักของ piperine สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงระดับของตัวรับเหล่านั้นหรือไม่และอย่างไร โดยจะเน้นศึกษาที่สมองบริเวณ frontal cortex, temporal cortex และ

hippocampus เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเปลี่ยนแปลงของทั้ง NMDA และ GABA_A receptors (Isokawa, 1996; Mathern et al., 1998a; 1998b; Loup et al., 2000) รวมทั้งมีการสูญเสียของเซลล์ประสาทชนิดต่างๆ เกิดขึ้นในสมองส่วนเหล่านี้ในผู้ป่วยโรคลมชัก (de Lanerolle et al., 2003; Liu et al., 2007; Varho et al., 2005) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้รับสามารถใช้เป็นแนวทางในการอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ระงับอาการชักของ piperine ในระดับโมเลกุลที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของตัวรับชนิดต่างๆ โดยเฉพาะ NMDA และ GABA_A receptors อีกทั้งส่งผลให้เกิดการส่งเสริมและพัฒนาการรักษาโรคลมชักชนิดใหม่จากสมุนไพรที่มีผลปรับเปลี่ยนให้การเปลี่ยนแปลงของตัวรับแต่ละชนิดเป็นไปในแนวทางที่ดีขึ้น และทำให้เกิดผลในด้านการรักษาโรคลมชักที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นในอนาคต

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูขาวเล็ก (mice) น้ำหนัก 20-22 กรัม ถูกเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง 1 สัปดาห์ก่อนทำการทดลองเพื่อปรับสภาพ โดยให้สัมผัสกับแสงสว่างและความมืดสลับกัน ทุก 12 ชั่วโมง และได้รับอาหารและน้ำไม่จำกัด

ในการทดลองหนูขาวเล็กถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาวเล็กที่ได้รับน้ำเกลือ 0.9% โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ

กลุ่มที่ 2 หนูขาวเล็กที่ได้รับ pentylenetetrazole (PTZ) ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดอาการชัก ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการชัก

กลุ่มที่ 3 หนูขาวเล็กที่ได้รับ sodium valproate ขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม** โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน หลังจากนั้น 45 นาที จะได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการชักและได้รับยารักษาโรคลมชัก sodium valproate

กลุ่มที่ 4 หนูขาวที่ได้รับ piperine ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม*** โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน หลังจากนั้น 45 นาที จะได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 5 หนูขาวที่ได้รับ piperine ขนาด 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม*** โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน หลังจากนั้น 45 นาที จะได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 2

กลุ่มที่ 6 หนูขาวที่ได้รับ piperine ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม*** โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน หลังจากนั้น 45 นาที จะได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม* โดยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง วันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน จำนวน 6 ตัว เป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 3

หมายเหตุ

* ขนาดของ PTZ ที่ใช้ในการวิจัยนี้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ Agarwal et al. (2011)

** ขนาดของ sodium valproate ที่ใช้ในการวิจัยนี้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ Brahmane et al. (2010)

*** ขนาดของ piperine ที่ใช้ในการวิจัยนี้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ D'Hooge et al. (1996) และ Mori et al. (1985)

2. การเตรียมสมองของสัตว์ทดลอง

หลังจากเสร็จสิ้นการเตรียมสัตว์ทดลองในข้อ 1 สมองของหนูขาวเล็กในแต่ละกลุ่มถูกนำมาตัดเป็นแผ่นบาง (sectioned) ให้มีความหนา 10 μm โดยใช้ cryostat microtome ที่อุณหภูมิประมาณ -20°C และแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ซึ่งประกอบด้วยสมองส่วน frontal cortex, temporal cortex และ hippocampus ถูกทำให้แห้งบนแผ่น slide แก้ว และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อใช้ในการศึกษาระดับของ NMDA และ GABA_A receptors โดยวิธี autoradiography ต่อไป

3. การศึกษาระดับของ NMDA receptors โดยใช้วิธี autoradiography

Slide แผ่นเนื้อเยื่อในข้อ 2 ถูกนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป incubate ด้วย 5 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นถูก incubate ด้วย 5 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 ที่มี 100 μ M glutamate, 30 μ M glycine, 50 μ M spermidine และ 5 nM [3 H]dizocilpine maleate ([3 H]MK-801) เป็นเวลา 60 นาที สำหรับระดับของ non-specific NMDA receptor binding slide แผ่นเนื้อเยื่อถูก incubate ด้วย Tris-HCl buffer ที่มี glutamate, glycine, spermidine, [3 H]MK-801 และ 0.1 mM (+)MK-801 เมื่อครบเวลา incubate แล้ว slide แผ่นเนื้อเยื่อ ถูกล้างใน 5 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 ที่เย็น เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปจุ่มใน reverse osmosis water ที่เย็น และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปวางประกบเทียบกับแถบ tritium มาตรฐานบน Hyperfilm เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4. การศึกษาระดับของ GABA_A receptors โดยใช้วิธี autoradiography

Slide แผ่นเนื้อเยื่อในข้อ 2 ถูกนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป incubate ด้วย 50 mM Tris-citrate buffer pH 7.0 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นถูก incubate ด้วย 50 mM Tris-citrate buffer pH 7.0 ที่มี 3 nM [3 H]muscimol เป็นเวลา 45 นาที สำหรับระดับของ non-specific NMDA receptor binding slide แผ่นเนื้อเยื่อถูก incubate ด้วย Tris-HCl buffer ที่มี glutamate, glycine, spermidine, [3 H]muscimol และ 0.01 mM GABA เมื่อครบเวลา incubate แล้ว slide แผ่นเนื้อเยื่อ ถูกล้างใน 50 mM Tris-citrate buffer pH 7.0 ที่เย็น เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปจุ่มใน reverse osmosis water ที่เย็น และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปวางประกบเทียบกับแถบ tritium มาตรฐานบน Hyperfilm เป็นเวลา 4 สัปดาห์

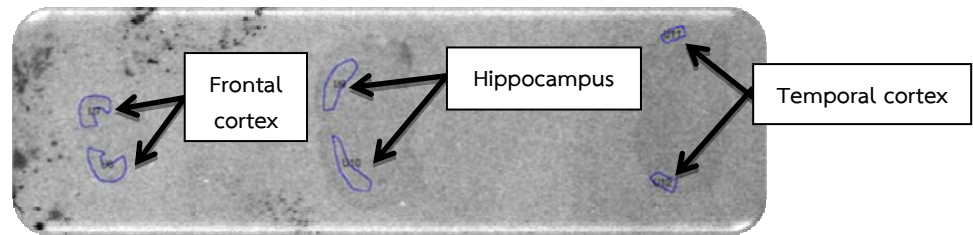
5. การวิเคราะห์ระดับของ NMDA และ GABA_A receptors

Hyperfilm ถูกล้างหลังจากวางประกบกับ slide แผ่นเนื้อเยื่อเมื่อครบตามกำหนดเวลา จากนั้น autoradiographs ที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์หาระดับของ NMDA และ GABA_A receptors โดยใช้ Quantity One[®] 1-D analysis software (Bio-Rad Laboratories, USA) และผลที่ได้ถูกนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้การคำนวณทางสถิติแบบ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

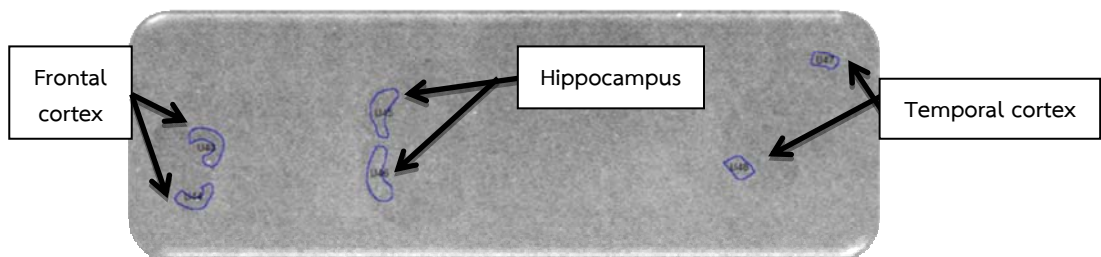
ผลการทดลอง

ผลการศึกษาระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็ก

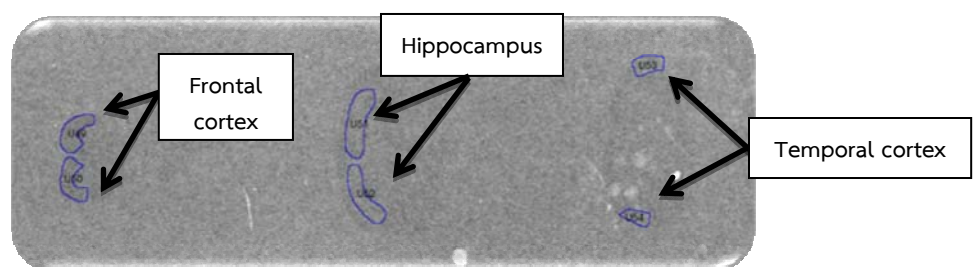
หลังจากนำ slide ที่การศึกษาระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็กไปวางประกบบน Hyperfilm เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลของระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็กส่วน frontal cortex, hippocampus และ temporal cortex แสดงเป็น autoradiograph ดังรูปที่ 1



หนูขนาดเล็กที่ได้น้ำเกลือเพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม)

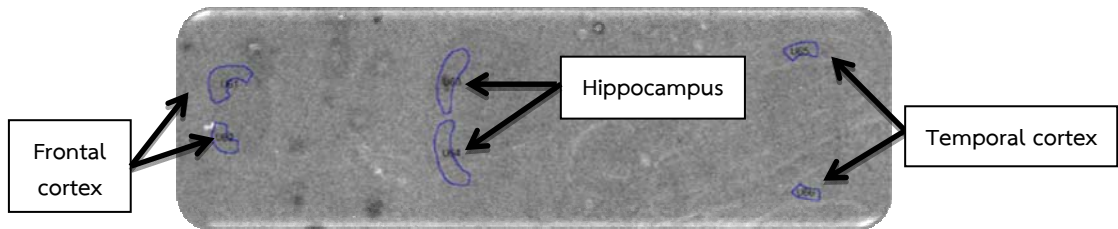


หนูขนาดเล็กที่ได้รับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

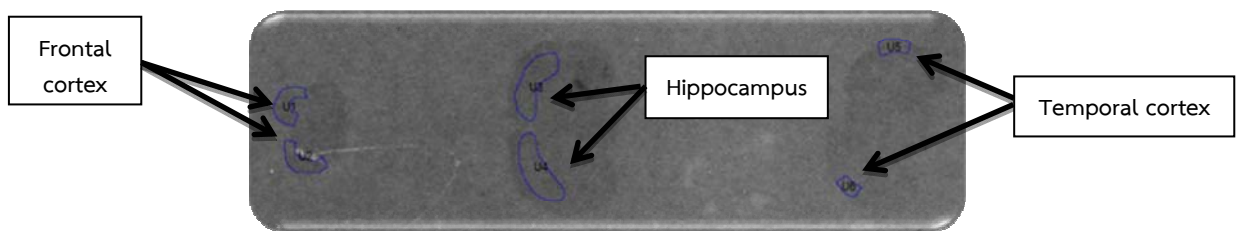


หนูขนาดเล็กที่ได้รับ sodium valproate ขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
ร่วมกับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

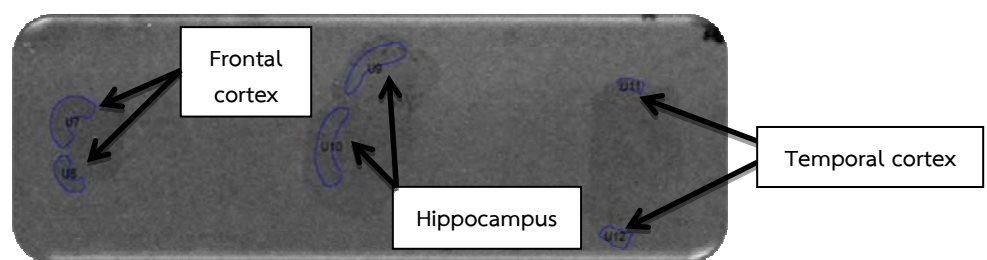
รูปที่ 1 Autoradiograph ของสมองหนูขนาดเล็กกลุ่มต่างๆ



หนูขาวเล็กที่ได้รับ piperine ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
ร่วมกับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม



หนูขาวเล็กที่ได้รับ piperine ขนาด 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
ร่วมกับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม



หนูขาวเล็กที่ได้รับ piperine ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
ร่วมกับ PTZ ขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

รูปที่ 1 Autoradiograph ของสมองหนูขาวเล็กกลุ่มต่างๆ (ต่อ)

เมื่อนำ autoradiograph ดังกล่าวไปวัดระดับ NMDA receptor โดยใช้ Quantity One[®] 1-D analysis software (Bio-Rad Laboratories, USA) พบว่าการได้รับ PTZ ทำให้เกิดแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นของระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กทั้งในส่วน frontal cortex, hippocampus และ temporal cortex แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หนูขาวเล็กที่ได้รับ sodium valproate ร่วมกับ PTZ มีระดับ NMDA receptor เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของระดับ NMDA receptor เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวเล็กที่ได้รับเพียง PTZ ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus อย่างไรก็ตามการได้รับ sodium valproate ร่วมกับ PTZ ทำให้ระดับ NMDA receptor มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus แต่มีแนวโน้มลดลงโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในสมองส่วน temporal cortex เมื่อเปรียบเทียบกับที่ได้รับ PTZ เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 1)

การได้รับ piperine ทั้ง 3 ขนาด ร่วมกับ PTZ ทำให้ระดับ NMDA receptor เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวเล็กกลุ่มควบคุม ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ส่วนในสมองส่วน temporal cortex จะพบผลดังกล่าวเมื่อหนูขาวเล็กได้รับ piperine ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม การเพิ่มขึ้นของระดับ NMDA receptor ไม่ขึ้นกับขนาดของ piperine และ piperine ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้ระดับ NMDA receptor เพิ่มขึ้นมากที่สุด ในสมองหนูขาวเล็กทั้ง 3 ส่วน เป็นที่น่าสังเกตว่ามีเพียงหนูขาวเล็กที่ได้รับ piperine ขนาด 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ PTZ เท่านั้นที่ทำให้ระดับ NMDA receptor มีแนวโน้มลดลงในสมองส่วน temporal cortex เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวเล็กที่ได้รับ PTZ เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้พบว่าการได้รับ piperine ขนาด 20 และ 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้ระดับ NMDA receptor ในสมองทั้ง 3 ส่วนเพิ่มขึ้นมากกว่าการได้รับ sodium valproate แต่การได้รับ piperine ขนาด 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้ระดับ NMDA receptor ในสมองส่วน hippocampus และ temporal cortex ลดลงมากกว่าการได้รับ sodium valproate (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กกลุ่มต่างๆ ศึกษาโดยวิธี autoradiography

กลุ่มหนูขาวเล็ก	ระดับ NMDA receptor (fmol/mg)		
	Frontal cortex	Hippocampus	Temporal cortex
กลุ่มควบคุม	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.27 ± 0.18
กลุ่มที่ได้รับ PTZ	0.08 ± 0.09	0.12 ± 0.15	0.46 ± 0.27
กลุ่มที่ได้รับ sodium valproate + PTZ	0.41 ± 0.09 ^a	0.36 ± 0.09 ^a	0.31 ± 0.10

ตารางที่ 1 ผลของระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กกลุ่มต่างๆ ศึกษาโดยวิธี autoradiography (ต่อ)

กลุ่มหนูขาวเล็ก	ระดับ NMDA receptor (fmol/mg)		
	Frontal cortex	Hippocampus	Temporal cortex
กลุ่มที่ได้รับ piperine ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม + PTZ	0.53 ± 0.28 ^{a,b}	0.55 ± 0.27 ^{a,b}	0.50 ± 0.17
กลุ่มที่ได้รับ piperine ขนาด 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม + PTZ	0.53 ± 0.27 ^{a,b}	0.13 ± 0.08 ^d	0.16 ± 0.15
กลุ่มที่ได้รับ piperine ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม + PTZ	2.46 ± 0.14 ^{a,b,c,d,e}	2.47 ± 0.07 ^{a,b,c,d,e}	2.32 ± 0.18 ^{a,b,c,d,e}

หมายเหตุ ระดับ NMDA receptor แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^a p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

^b p < 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PTZ

^c p < 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ sodium valproate

^d p < 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ piperine ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

^e p < 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ piperine ขนาด 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ผลการศึกษาระดับของ GABA_A receptor ในสมองหนูขาวเล็ก

เนื่องจากเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนของการนำ Hyperfilm ที่ทำการประกบกับ slide ที่ทำการศึกษาระดับของ GABA_A receptor ในสมองหนูขาวเล็กไปทำการล้าง จากการที่ Hyperfilm สัมผัสกับแสงสีขาวโดยความไม่ตั้งใจ เป็นเหตุให้ไม่มี autoradiograph ที่จะสามารถวิเคราะห์หาระดับของ GABA_A receptor ในสมองหนูขาวเล็ก

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของ piperine ที่มีต่อระดับของ NMDA และ GABA_A receptors ในสมองของหนูขาวเล็กที่กระตุ้นให้เกิดการชักโดยใช้ pentylenetetrazole และวิธีการศึกษาระดับ receptor ดังกล่าวทำโดยอาศัยเทคนิค autoradiography ซึ่งการกระตุ้นให้เกิดการชักโดยใช้ pentylenetetrazole (PTZ) นั้นเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาพยาธิสภาพของการเกิดโรคลมชักและการค้นหาหาหรือสารที่มีฤทธิ์ลดการเกิดโรคลมชักในสัตว์ทดลอง (Demeter et al., 2012; Júnior et al., 2011; Pavlova et al., 2010) จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า PTZ ทำให้เกิดการชักในสัตว์ทดลองและทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptor ในสมองของสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะสมองส่วน frontal cortex, hippocampus และ temporal cortex (Cremer et al., 2009; Ekonomou and Angelatou, 1999; Zhu et al., 2004) และสมองส่วนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคลมชักในมนุษย์ (Liu et al., 2007; Sherwin, 1999) จากการศึกษาพบว่าเมื่อหนูขาวเล็กได้รับ PTZ ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน ระดับ NMDA receptor มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยไม่มีความสำคัญในสมองส่วน frontal cortex, hippocampus และ temporal cortex ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่รายงานถึงผลของ PTZ ที่มีต่อระดับ NMDA receptor ในสัตว์ทดลอง

Sodium valproate เป็นยารักษาโรคลมชักที่มีประสิทธิภาพและออกฤทธิ์รักษาโรคลมชักได้หลายชนิด กลไกในการออกฤทธิ์รักษาโรคลมชักของ sodium valproate มีหลายแบบ ได้แก่ ยับยั้งการทำงานของ sodium channels, เพิ่มการทำงานของ GABA และยับยั้งการทำงานของ NMDA receptor (Porter and Meldrum, 2002) แต่จากผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการให้ sodium valproate ร่วมกับ PTZ มีผลเพิ่มระดับ NMDA receptor ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า sodium valproate มีผลไปลดฤทธิ์ของการทำลายสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ของ PTZ เนื่องจากสมองทั้งสองส่วนนี้สัมพันธ์กับการเรียนรู้และความจำ (Lee et al., 2011; Tronel and Sara, 2003) ซึ่งในสัตว์ทดลองที่ได้รับ PTZ จะเกิดบกพร่องขบวนการต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ และการบกพร่องดังกล่าวสัมพันธ์กับการลดลงของการทำงานของ NMDA receptor (Palizvan et al., 2006; Szyndler et al., 2006) จึงเป็นไปได้ว่าในการศึกษานี้ระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กส่วน frontal cortex และ hippocampus ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลส่วนหนึ่งจากการได้รับ sodium valproate สำหรับการลดลงของระดับ NMDA receptor ในสมองส่วน temporal cortex จากการได้รับ sodium valproate ร่วมกับ PTZ นั้น อาจอธิบายได้จากการที่โรคลมชักที่เกิดจากความผิดปกติที่ temporal cortex (temporal lobe epilepsy) เป็นโรคลมชักที่เกิดขึ้นมากที่สุดคือประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วยโรคลมชักทั้งหมด (Semah et al., 1998) และพบการเพิ่มขึ้นของระดับ NMDA receptor ในสมองส่วน temporal cortex ของผู้ป่วยโรคดังกล่าว (Liu et al., 2007) และสัตว์ทดลองที่ได้รับ PTZ (Zhu et al., 2004) การลดลงของระดับ NMDA receptor ในสมองส่วน temporal cortex จากการศึกษา อาจเป็นผลจากการที่ sodium valproate ไปต้านฤทธิ์ของ PTZ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการชักในหนูขาวเล็กที่สมองส่วน temporal cortex และการที่ sodium valproate ให้ผลที่แตกต่างกันในสมองแต่ละส่วน อาจเกิดจากกลไกในการออกฤทธิ์ที่ต่างกันของ sodium valproate ในสมองแต่ละส่วน ซึ่งจะมีผลต่อการรักษาอาการที่หลากหลายซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่เกิดโรคลมชักหรืออาการชัก

Piperine เป็นสารจำพวก alkaloid ที่พบในพริกไทย จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานฤทธิ์ลดอาการชักของ piperine ในสัตว์ทดลอง (D'Hooge et al., 1996; Mori et al., 1985) ในโครงการวิจัยนี้มีการให้ piperine ในขนาดต่างๆ แก่หนูขาวเล็กพร้อมกับ PTZ ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า piperine ในขนาด 20 และ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลต่อระดับ NMDA receptor ในสมองส่วน frontal cortex, hippocampus และ temporal cortex ของหนูขาวเล็กในทิศทางเดียวกับ sodium valproate ซึ่งแม้ว่ายังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดของ piperine ในการลดอาการชัก แต่ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ในการลดอาการชักของ piperine อาจเกี่ยวข้องกับการทำให้ระดับ NMDA receptor เกิดการเปลี่ยนแปลงในสมองของหนูขาวเล็กแต่ละส่วนที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับ sodium valproate โดยที่ piperine จะเกิดผลดังกล่าวเมื่อให้ในขนาด 20 และ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วน piperine ในขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลเพิ่มระดับ NMDA receptor ในสมองของหนูขาวเล็กทั้ง 3 ส่วน ซึ่งเป็นไปได้ว่าการให้ในขนาดสูงขึ้นไปอาจทำให้ความแตกต่างในการออกฤทธิ์ของ piperine แต่ละส่วนของสมองลดลง และจากการที่ระดับของ NMDA receptor ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคลมชัก (Cremer et al., 2009; Ekonomou and Angelatou, 1999; Zhu et al., 2004) ดังนั้นการให้ piperine ในขนาดสูงจึงอาจนำไปสู่ประสิทธิภาพที่ลดลงในการลดการเกิดโรคลมชักของ piperine และ piperine ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาจเป็นขนาดที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคลมชักในสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดย pentylenetetrazole

เอกสารอ้างอิง

- Aarts MM, Tymianski M (2003) Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors. *Biochem Pharmacol* 66:877-86.
- Agarwal NB, Agarwal NK, Mediratta PK, Sharma KK (2011) Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. *Seizure* 20:257-62.
- Andre VM, Flores-Hernandez J, Cepeda C, Starling AJ, Nguyen S, Lobo MK, et al. (2004) NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. *Cereb Cortex* 14:634-46.
- Benardo LS (2003) Prevention of epilepsy after head trauma: do we need new drugs or a new approach? *Epilepsia* 44:27-33.
- Brahmane RI, Wanmali VV, Pathak SS, Salwe KJ (2010) Role of cinnarizine and nifedipine on anticonvulsant effect of sodium valproate and carbamazepine in maximal electroshock and pentylenetetrazole model of seizures in mice. *J Pharmacol Pharmacother* 1:78-81.
- Calcagnotto ME, Paredes MF, Tihan T, Barbaro NM, Baraban SC (2005) Dysfunction of synaptic inhibition in epilepsy associated with focal cortical dysplasia. *J Neurosci* 25:9649-57.
- Chang BS, Lowenstein DH (2003) Epilepsy. *N Engl J Med* 349:1257-66.
- Cremer CM, Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Schleicher A, Speckmann EJ, Zilles K (2009) Pentylenetetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 163:490-9.
- de Lanerolle NC, Kim JH, Williamson A, Spencer SS, Zaveri HP, Eid T, et al. (2003) A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia* 44:677-87.
- Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS (2005) Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 105:229-66.
- Demeter I, Nagy K, Gellért L, Vécsei L, Fülöp F, Toldi J (2012) A novel kynurenic acid analog (SZR104) inhibits pentylenetetrazole-induced epileptiform seizures. An electrophysiological study : special issue related to Kynurenine. *J Neural Transm* 119:151-4.

- D'Hooge R, Pei YQ, Raes A, Lebrun P, van Bogaert PP, de Deyn PP (1996) Anticonvulsant activity of piperine on seizures induced by excitatory amino acid receptor agonists. *Arzneimittelforschung* 46:557-60.
- Ekonomou A, Angelatou F (1999) Upregulation of NMDA receptors in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazol-induced "kindling" model of epilepsy. *Neurochem Res* 24:1515-22.
- Errington AC, Stohr T, Lees G (2005) Voltage gated ion channels: targets for anticonvulsant drugs. *Curr Top Med Chem* 5:15-30.
- French JA, Faught E (2009) Rational polytherapy. *Epilepsia* 50 Suppl 8:63-8.
- Hosford DA, Crain BJ, Cao Z, Bonhaus DW, Friedman AH, Okazaki MM, et al. (1991) Increased AMPA-sensitive quisqualate receptor binding and reduced NMDA receptor binding in epileptic human hippocampus. *J Neurosci* 11:428-34.
- Isokawa M (1996) Decrement of GABA_A receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in dentate granule cells in epileptic hippocampus. *J Neurophysiol* 75:1901-8.
- Jentsch TJ, Poet M, Fuhrmann JC, Zdebik AA (2005) Physiological functions of CLC Cl⁻ channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu Rev Physiol* 67:779-807.
- Júnior JS, de Almeida AA, Tomé Ada R, Citó AM, Saffi J, de Freitas RM (2011) Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. *Epilepsy Behav* 22:678-84.
- Kamphuis W, De Rijk TC, Lopes da Silva FH (1995) Expression of GABA_A receptor subunit mRNAs in hippocampal pyramidal and granular neurons in the kindling model of epileptogenesis: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 31:33-47.
- Koepp MJ, Labbe C, Richardson MP, Brooks DJ, Van Paesschen W, Cunningham VJ, et al. (1997) Regional hippocampal [¹¹C]flumazenil PET in temporal lobe epilepsy with unilateral and bilateral hippocampal sclerosis. *Brain* 120:1865-76.
- Kulak W, Sobaniec W, Wojtal K, Czuczwar SJ (2004) Calcium modulation in epilepsy. *Pol J Pharmacol* 56:29-41.
- Kuwert T, Stodieck SR, Puskas C, Diehl B, Puskas Z, Schuierer G, et al. (1996) Reduced GABA_A receptor density contralateral to a potentially epileptogenic MRI abnormality in a patient with complex partial seizures. *Eur J Nucl Med* 23:95-8.

- Lee KC, Finley PR, Alldredge BK (2003) Risk of seizures associated with psychotropic medications: emphasis on new drugs and new findings. *Expert Opin Drug Saf* 2:233-47.
- Lee KW, Kim HC, Lee SY, Jang CG (2011) Methamphetamine-sensitized mice are accompanied by memory impairment and reduction of N-methyl-D-aspartate receptor ligand binding in the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 178, 101-7.
- Lerche H, Weber YG, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2005) Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Curr Pharm Des* 11:2737-52.
- Liu FY, Wang XF, Li MW, Li JM, Xi ZQ, Luan GM, et al. (2007) Upregulated expression of postsynaptic density-93 and N-methyl-D-aspartate receptors subunits 2B mRNA in temporal lobe tissue of epilepsy. *Biochem Biophys Res Commun* 358:825-30.
- Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A, Fritschy JM (2000) Selective alterations in GABA_A receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 20:5401-19.
- Makarska-Bialek K, Kaminski RM, Czuczwar SJ (2005) Influence of the antagonist of the glycine site of NMDA receptors, MRZ 2/576, on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in mice. *Pharmacol Rep* 57:458-66.
- Mathern GW, Pretorius JK, Leite JP, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, et al. (1998a). Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res* 32:154-71.
- Mathern GW, Pretorius JK, Mendoza D, Lozada A, Leite JP, Chimelli L, et al. (1998b). Increased hippocampal AMPA and NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:615-34.
- Mathern GW, Pretorius JK, Mendoza D, Leite JP, Chimelli L, Born DE, et al. (1999) Hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Ann Neurol* 46:343-58.
- McCorry D, Chadwick D, Marson A (2004) Current drug treatment of epilepsy in adults. *Lancet Neurol* 3:729-35.
- Mori A, Kabuto H, Pei YQ (1985) Effects of piperine on convulsions and on brain serotonin and catecholamine levels in E1 mice. *Neurochem Res* 10:1269-75.
- Najm IM, Ying Z, Babb T, Mohamed A, Hadam J, LaPresto E, et al. (2000) Epileptogenicity correlated with increased N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A/B in human focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 41:971-6.

- Neder L, Valente V, Carlotti CG Jr, Leite JP, Assirati JA, Paco-Larson ML, et al. (2002) Glutamate NMDA receptor subunit R1 and GAD mRNA expression in human temporal lobe epilepsy. *Cell Mol Neurobiol* 22:689-98.
- Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnani S (2005) Epileptogenic insult causes a shift in the form of long-term potentiation expression. *Neuroscience* 134, 415-23.
- Palma E, Spinelli G, Torchia G, Martinez-Torres A, Ragazzino D, Miledi R, et al. (2005) Abnormal GABA_A receptors from the human epileptic hippocampal subiculum microtransplanted to *Xenopus oocytes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2514-8.
- Pavlova TV, Stepanichev MY, Gekht AB, Gulyaeva NV (2010) Acquisition of an active avoidance reaction in rats and morphological changes in the hippocampus in pentylenetetrazol kindling. *Neurosci Behav Physiol* 40:501-6.
- Porter RJ, Meldrum BS. Antiseizure drugs. In: Katzung BG, editor. *Basic & clinical pharmacology*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 395-418.
- Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 51, 1256-62.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27:262-9.
- Sherwin AL (1999). Neuroactive amino acids in focally epileptic human brain: a review. *Neurochem Res* 24:1387-95.
- Slamberova R, Rokyta R (2005) Occurrence of bicuculline-, NMDA- and kainic acid-induced seizures in prenatally methamphetamine-exposed adult male rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 25:1-6.
- Smith TA (2001) Type A gamma-aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *Br J Biomed Sci* 58:111-21.
- Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skórzewska A, Maciejak P, Walkowiak J, et al. (2006) Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test and amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacol Rep* 58, 75-82.
- Tronel S, Sara SJ (2003) Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *J Neurosci* 23, 5472-6.
- Varho T, Komu M, Sonninen P, Lahdetie J, Holopainen IE (2005) Quantitative HMRS and MRI volumetry indicate neuronal damage in the hippocampus of children with focal epilepsy and infrequent seizures. *Epilepsia* 46:696-703.
- Walker DG, Renwick AG, Hillier K, editors. *Medical pharmacology and therapeutics*. 2nd ed. Edinburgh (UK): McGraw-Hill; 2005.

- Zilles K, Qu MS, Kohling R, Speckmann EJ (1999) Ionotropic glutamate and GABA receptors in human epileptic neocortical tissue: quantitative *in vitro* receptor autoradiography. *Neuroscience* 94:1051-61.
- Zhu LJ, Chen Z, Zhang LS, Xu SJ, Xu AJ, Luo JH (2004) Spatiotemporal changes of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit levels in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. *Neurosci Lett* 356:53-6.