

Original Article

Effects of gabapentin and lamotrigine on miR-9/miR-107 expression and neuronal differentiation in hippocampal cultures

Zeinab Amanzadeh¹, Leila Sadeghi^{1*}, Gholamreza Dehghan¹, Shahriar Alipour², Soomaayeh Heysieattalab³

¹Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Department of Clinical Biochemistry and Applied Cell Sciences, Faculty of Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

³Department of Cognitive Neuroscience, University of Tabriz, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 23 Sep 2025

Revised: 5 Feb 2026

Accepted: 8 Feb 2026

ePublished: 19 Apr 2026

Keywords:

- Gabapentin
- Lamotrigine
- Hippocampus
- Neurogenesis
- miR-9
- miR-107

Abstract

Background. Gabapentin and lamotrigine are widely used anticonvulsants prescribed to pregnant women with epilepsy. Gabapentin is a gamma-aminobutyric acid analog that reduces glutamate levels, and lamotrigine blocks sodium channels and reduces the release of glutamate and aspartate. These drugs are able to cross the placenta and potentially affect the development of the fetal brain, causing worrisome changes in fetal neurodevelopment. Undifferentiated neuronal cells were taken from the hippocampal tissue of 18-day-old rat embryos and cultured in Neurobasal medium for 20 days. Neuronal differentiation was performed in cells treated with gabapentin and lamotrigine (25 µg/mL). In order to examine gene expression, total RNA was extracted from neurons and the miRNA content of the genes was determined by real-time PCR. The t-test and ANOVA were used to compare the mean values between groups.

Methods. Undeveloped neural cells were taken from the hippocampus of 18-day-old rat embryos and cultured in Neurobasal medium for 20 days. Development of neural cells was followed in cells treated with gabapentin and lamotrigine (25µg/mL). Additionally, to analyze gene expression, total RNA was extracted and the contents of miRNA related to genes were evaluated by real-time PCR.

Results. After 20 days, neurons in control media showed normal growth, while drug-treated groups showed abnormal dendrite and axon formation and disrupted soma morphology. Gene expression analysis revealed upregulation of MicroRNA-9 gene in both of the treatment groups compared to the control group. However, the expression level of MicroRNA-107 reduced remarkably in treated neurons.

Conclusion. Considering the changes in the morphology and gene expression and given the ability of the drugs to cross the placenta, these drugs should be prescribed with caution during pregnancy, balancing maternal needs with potential risks to the fetus.

Practical Implications. The findings of this study show that the use of anticonvulsant drugs during pregnancy affects the morphology of fetal nerve cells and prevents their growth. These drugs can also change the expression level of miRNAs that are effective in the development of the nervous system.

How to cite this article: Amanzadeh Z, Sadeghi L, Dehghan Gh, Alipour Sh, Heysieattalab S. Effects of Gabapentin and Lamotrigine on miR-9/miR-107 expression and neuronal differentiation in hippocampal cultures. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(1):34-45. doi: 10.34172/mj.026.35153. Persian.

Extended Abstract

Background

Some medications that cross the placenta during pregnancy may have toxic effects. Gabapentin and lamotrigine cross the placenta and affect fetal

development. Gabapentin is a structural analogue of the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA). The safety of the use of gabapentin in pregnant women is a serious issue, as gabapentin can

*Corresponding author; Email: L.sadeghi@tabrizu.ac.ir

© 2026 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

cross the placental barrier. Lamotrigine is a triazine derivative that stabilizes presynaptic neuronal membranes and inhibits the release of presynaptic glutamate and aspartate.

The possible effects of drugs on the expression of miRNAs miR-9/miR-107, which are critical for neural development, were also studied.

The aim of this study was to investigate the effects of gabapentin and lamotrigine on the development of immature neuronal cells in primary hippocampal tissue cultures taken from 18-day-old rat embryos. Additionally, this study aimed to examine dendritic and axonal development during the culture period.

Methods

For RNA extraction, 1 μL of Trizol was added to the extracted cell pellet in two steps, and finally, after centrifuging the samples, 3 phases were formed: the upper phase containing RNA, the middle phase containing DNA, and the lower phase containing protein.

For cDNA synthesis from miRNA, an appropriate concentration of RNA was first added to the microtube. Then, 1 μL of adapter was added to each microtube, and the volume was brought to 12 μL with deionized water. After 5 minutes of incubation, 4 μL of RT buffer, 2 μL of dNTPs, and 1 μL of RT enzyme were added. Finally, 1 μL of RNase-free water was added to bring the final volume to 20 μL .

In the present study, RNA extracted from hippocampal tissue cells of 18-day-old rat embryos was examined in three control groups and treated with gabapentin and lamotrigine in triplicate. First, the master mix was prepared according to the number of samples. The master mix contained all the necessary ingredients for RT-PCR, including cDNA and Taq DNA polymerase.

The DNA polymerase enzyme in the master mix has a hot start feature that prevents the amplification of unwanted products and requires a temperature of 95°C for 15 minutes to activate. To analyze the gene expression data, the threshold cycle (CT) was calculated for each sample. The expression of our target genes was measured and normalized to the expression of U6. The CT difference between the two genes (ΔCT) was calculated in all samples and the

results were expressed as the difference in fold. The results of the present study were reported using descriptive statistics (mean \pm standard deviation). Independent *t*-test and one-way ANOVA were used to analyze the data. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In this study, we examined the effects of gabapentin and lamotrigine on the morphology, growth of immature neurons from primary cultures of rat fetal hippocampal tissue, and the expression level of genes involved in neuronal growth in three control and two treatment groups.

Figure 1 shows microscopic images of primary cultures of immature hippocampal neurons from rats treated with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gabapentin and lamotrigine on days 0, 10, and 20. On day 0, the cell body was clear and the cells had short neurites. A neural network was formed by day 10 in the control group. Neurite elongation in the cells continued after day 20, and an extensive and interconnected network was formed. Neurons treated with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gabapentin and lamotrigine did not grow normally, and short and thick dendrites were formed in the neurons after 10 days. In drug-treated neurons, there were fewer neurites; therefore, dense neurons were not observed (Figures 1B and 1C).

After performing real-time PCR analysis, changes in the expression level of microRNAs mir-9 and mir-107 were calculated relative to U6. Then, the independent *t*-test was used to statistically examine the normally distributed data. In the independent *t*-test, the *P*-value was 0.05 for all groups; in other words, there was no statistical difference between the compared groups. The expression level of these miRNAs was examined within a period of 20 days after the treatment of cells with drugs in triplicate. The results showed that the means and standard deviations of the miRNA gene expression relative to U6 as the reference gene in the lamotrigine treatment group, the gabapentin treatment group, and the control group were 0.41 ± 0.18 , 0.46 ± 0.67 , and 1, respectively (Figure 2. A). According to the results, Mir-9 expression was significantly increased by gabapentin exposure compared to the control group ($P < 0.05$).

Lamotrigine caused a statistically significant increase in the expression level of Mir-9 compared to both the control and gabapentin groups ($P<0.05$). Gabapentin and lamotrigine are significant in this group with $P<0.05$.

The means and standard deviations of the Mir-107 gene expression compared to the reference gene U6 in the gabapentin treatment group, the lamotrigine treatment group, and the control group were 0.163 ± 0.81 , 0.146 ± 0.64 , and 1, respectively (Figure 2. B). There was a statistically significant reduction in neurons receiving gabapentin ($P=0.001$). Comparison of the treated groups showed that lamotrigine caused a greater reduction in Mir-107 expression than gabapentin and control ($P=0.001$).

Conclusion

These results confirmed that both gabapentin and lamotrigine can cross the umbilical cord and affect the growth of developing nerve cells. In addition, these drugs are not metabolized in the blood and are stable on their own. At high doses, they cause morphological abnormalities in hippocampal neurons and the formation of thick and short dendrites. Additionally, they can lead to disruption of the cell body and prevent the branching of dendrites and axon formation. Therefore, they are likely to cause mental retardation in the fetus at higher doses. Accordingly, their administration in pregnant women should be limited, and safe alternative drugs should be used in cases where necessary.

اثرات گابپنتین و لاموتریزین بر بیان miR-9 و miR-107 و کشت اولیه سلول‌های تمایز نیافته بافت هیپوکامپ

زینب امان زاده^۱ ID، لیلا صادقی^{۱*} ID، غلامرضا دهقان^۱، شهریار علیپور^۲، سمیه حیثیت طلب^۳

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
^۲ گروه بیوشیمی بالینی و علوم کاربردی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۳ گروه علوم اعصاب شناختی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه. گابپنتین و لاموتریزین از داروهای پرکاربرد ضد صرع هستند. گابپنتین آنالوگ گاما آمینوبوتیریک اسید است که سطح گلوتامات را کاهش می‌دهد و لاموتریزین کانال‌های سدیم را مسدود کرده و آزادسازی گلوتامات و آسپاراتات را کاهش می‌دهد. این داروها در زنان باردار قادر به عبور از جفت هستند، لذا به‌طور بالقوه می‌توانند بر رشد مغز جنین تأثیر بگذارند و باعث ایجاد تغییرات نگران‌کننده در رشد عصبی جنین می‌شوند.

روش کار. در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، سلول‌های عصبی تمایز نیافته از بافت هیپوکامپ جنین‌های ۱۸ روزه موش صحرایی استخراج و به مدت ۲۰ روز در محیط نوروبال‌کشت داده شدند. سلول‌ها در گروه‌های تیمار با داروهای گابپنتین و لاموتریزین (با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفتند. به‌منظور ارزیابی بیان ژن، RNA کل از نورون‌ها استخراج و سطح بیان miRNAهای هدف با استفاده از تکنیک Real-time PCR سنجیده شد. برای تحلیل آماری داده‌ها از آزمون t مستقل و ANOVA استفاده گردید.

یافته‌ها. پس از ۲۱ روز، نورون‌های گروه کنترل از رشد و تمایز طبیعی برخوردار بودند؛ در حالی که گروه‌های تحت تیمار دارویی، تشکیل دندریت و آکسون غیرطبیعی و مورفولوژی جسم سلولی مختل شده را نشان دادند. نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان‌دهنده افزایش معنادار بیان ژن mir-9 و کاهش بیان ژن mir-107 در نورون‌های تیمار شده در مقایسه با گره کنترل بود.

نتیجه‌گیری. یافته‌ها نشان می‌دهد گابپنتین و لاموتریزین با تغییر در بیان miRNAهای دخیل در تکوین سیستم عصبی، رشد نورون‌ها را مختل می‌کنند. با توجه به قابلیت عبور این داروها از سد جفتی، مصرف آن‌ها در دوران بارداری می‌تواند خطر آسیب‌های تکاملی و نقایص شناختی در جنین را افزایش دهد؛ لذا تجویز این داروها در دوران بارداری نیازمند ارزیابی دقیق‌تر و محدودیت‌های نظارتی است.

پیامدهای عملی. مطالعه حاضر نشان می‌دهد مصرف داروهای ضد تشنج در دوران بارداری با اثرگذاری بر مورفولوژی سلول‌های عصبی و تغییر الگوی بیان miRNAهای مؤثر در تکوین سیستم عصبی، مانع از رشد طبیعی نورون‌ها می‌شود.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۷/۱۴
اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۱۰/۳
پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۶
انتشار برخط: ۱۴۰۵/۱/۳۰

کلیدواژه‌ها:

- گابپنتین
- لاموتریزین
- هیپوکامپ
- miR-9
- miR-107
- بافت هیپوکامپ

مقدمه

در دوران بارداری، اغلب به علت نیاز به درمان اختلالات مختلف، مصرف دارو اجتناب‌ناپذیر است. اگرچه تمامی داروهای موجود در گردش خون مادر از جفت به جنین عبور نمی‌کنند، اما داروهای با وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون به راحتی از جفت عبور کرده و وارد سیستم گردش خون جنین می‌شوند که ممکن است اثرات تراتوژنیک یا سمی مستقیم داشته باشند.^۱ بنابراین، مسمومیت دارویی در این دوران اهمیت حیاتی دارد و می‌تواند خطرات جدی برای مادر و جنین ایجاد کند.^۲

در زنان باردار، ارزیابی اثرات دارویی به دلیل تأثیر آن بر سلامت مادر و جنین ضروری است، زیرا مصرف برخی داروها ممکن است منجر به مسمومیت جنین و اختلالات در فرآیند رشد آن شود.^۱ زمانی که غلظت دارو از محدوده درمانی فراتر رود، سمیت دارویی رخ می‌دهد. این سمیت می‌تواند دفاع سلولی را تضعیف کرده و به عملکرد اندام‌ها آسیب برساند.^۲ علاوه بر این، مسمومیت دارویی مادر نیز ممکن است منجر به آسیب‌های داخل رحمی و اثرات منفی بر مغز جنین شود.^۳

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: lsadeghi@tabrizu.ac.ir

عصبی، تکثیر و تمایز در مغز مهره‌داران نقش دارد و برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی ضروری است.^{۱۶-۱۷} miR-107 به‌طور اختصاصی در سلول‌های پیش‌ساز عصبی در مغز جنینی، به ویژه در نورون‌های تازه تمایز یافته، فراوان است. این microRNA با دخالت در تنظیم پس از رونویسی از طریق تعامل با آنزیم دایسر، سطح و عملکرد آن را در سلول‌های عصبی در حال تمایز به‌صورت منفی تنظیم می‌کند.^{۱۸-۱۹}

این مطالعه با هدف بررسی اثربخشی و ایمنی داروهای گاباپنتین و لاموتریزین بر رشد سلول‌های عصبی نابالغ در کشت اولیه نورون‌های هیپوکامپ گرفته شده از جنین ۱۸ روزه موش صحرایی انجام شد. برای این منظور، اثرات درمان گاباپنتین و لاموتریزین بر تشکیل دندریت و آکسون و همچنین مورفولوژی و رشد سوما با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. این‌گونه تحقیقات برای درک بهتر عوارض جانبی داروها، به ویژه در جمعیت‌های حساس مانند جنین و مادران باردار، اهمیت بسزایی دارند. همچنین، این مطالعات به روشن شدن مکانیسم‌های عملکرد داروهای نورواکتیو در سیستم‌های زنده و پیچیده کمک شایانی می‌کنند.

روش کار

در این مطالعه، از محیط کشت نوروزال و محلول پلی-دی-لیزین از شرکت Gibco آمریکا، تریپسین از شرکت ایران بایوتک، محلول هنکس از شرکت بهار افشان، الیگوپرایمرهای miRNA و کیت سنتز cDNA و مسترمیکس از شرکت بن یاخته استفاده شد. برای مدیریت منابع و حذف موارد تکراری از نرم‌افزار Endnote ورژن ۹ استفاده شد. طول نوریته‌ها و جسم سلولی تصاویر میکروسکوپ نوری با استفاده از نرم‌افزار image محاسبه و اندازه‌گیری شد. مطالعه حاضر در سه گروه سلولی و سه تکرار آزمایشی ارزیابی شد. نورون‌های اولیه از بافت هیپوکامپ جنین ۱۸ روزه موش صحرایی طبق پروتکل مایکل سبین هنر ۲۰۱۲ برای کشت جداسازی شدند. مطابق با این پروتکل، سلول‌ها در محیط کشت نوروزال حاوی B27 و FGF2 به مدت ۲۰ روز کشت داده شدند.^{۲۰} غلظت‌های درمانی گاباپنتین و لاموتریزین بر اساس مطالعات پیشین تعیین شد. در این راستا، غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان دوز موثر، که سطوح پلاسمایی دارو را در محدوده درمانی سرم خون حفظ می‌کند، انتخاب شد. پس از برداشت اولیه، تمامی مراحل بعدی کشت سلولی در شرایط کاملاً استریل و تحت هود کشت سلولی درجه‌بندی شده انجام پذیرفت. نورون‌ها به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ قرار داده شدند. سپس نیمی از حجم محیط کشت از سلول‌ها خارج شده و

برخی از داروها مانند گاباپنتین و لاموتریزین با عبور از جفت بر رشد جنین تأثیر می‌گذارند. گاباپنتین، که ساختاری شبیه به گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) دارد، به‌عنوان مسدودکننده کانال کلسیم عمل می‌کند و با کاهش پتانسیل عمل، حالت آرامش‌پذیری در نورون‌ها را حفظ می‌کند.^۶ ایمنی استفاده از گاباپنتین در زنان باردار مسئله جدی است، زیرا این داور می‌تواند از جفت عبور کند.^۷ گاباپنتین آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی تحریکی را مهار می‌کند. مکانیسم عملکرد آن مشخص نیست و به نظر می‌رسد که نحوه تأثیر اولیه در زیر واحد کمکی $\alpha 2\delta^1$ کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ باشد. عملکرد اصلی این زیر واحدها تسهیل حرکت زیر واحدهای $\alpha 1$ کانال‌های کلسیمی تشکیل‌دهنده منافذ از شبکه آندوپلاسمی به غشای سلولی نورون‌های پیش‌سیناپسی است.^۸ عوارض جانبی رایج این دارو شامل سرگیجه، خواب‌آلودگی، احتباس آب، اضطراب، افسردگی، مشکلات رفتاری، بیش‌فعالی و عدم تمرکز است.^۹ از آنجا که تأثیر بالقوه دوزهای درمانی گاباپنتین بر رشد مغز ناشناخته است، نگرانی فزاینده‌ای در مورد استفاده از گاباپنتین در دوران بارداری وجود دارد. با این حال، هیچ مدرک معتبری در مورد اثرات آن بر رشد مغز جنین در دوران بارداری وجود ندارد.^{۱۰}

لاموتریزین، داروی فنیل‌تریازین با خواص ضد درد و ضدصرع،^{۱۱} به‌طور انتخابی به کانال‌های سدیم وابسته به ولتاژ متصل می‌شود و فعالیت آنها را مهار می‌کند، در نتیجه، آزادسازی نوروترانسمیترهایی مانند گلوتامات و آسپاراتات پیش‌سیناپسی کاهش می‌یابد.^{۱۲} لاموتریزین ممکن است با کانال‌های کلسیمی فعال شده با ولتاژ تعامل داشته باشد و به طیف وسیع فعالیت آن کمک کند. مطالعات آزمایشگاهی (in vitro) نیز نشان داده‌اند که لاموتریزین دی‌هیدروفولات ردوکتاز را مهار می‌کند.^{۱۳} عوارض جانبی رایج این دارو شامل سردرد، سرگیجه، تاری دید، دوبینی، خشکی دهان، حالت تهوع، استفراغ، درد معده، خواب‌آلودگی، احساس خستگی، کمردرد یا مشکل خواب است.^{۱۴} در زنان باردار، لاموتریزین می‌تواند باعث سقط جنین شود و در هر بارداری به دلایل مختلف رخ دهد. مطالعات نشان داده‌اند که لاموتریزین در دوران بارداری باعث نقص مادرزادی نمی‌شود.^{۱۵}

تأثیرات احتمالی داروها بر بیان miRNAهای miR-9/miR-107 که برای رشد عصبی حیاتی هستند، نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. miRNAها نیز دسته‌ای از RNAهای کوچک غیرکدکننده هستند که از 22 نوکلئوتید تشکیل شده‌اند و بیان ژن را پس از رونویسی در سطح تنظیم می‌کنند. آنها نقش مهمی در تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی ایفا می‌کنند.^{۱۶} miR-9 در رشد سلول‌های

۳ فاز تشکیل شد: فاز بالایی حاوی RNA، فاز میانی حاوی DNA و فاز پایینی حاوی پروتئین. جهت سنتز cDNA از miRNA ابتدا غلظت مناسب RNA به داخل میکروتیوب افزوده شد و به هر میکروتیوب ۱ میکرولیتر آدپتور اضافه و با دپسواتر به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون، ۴ میکرولیتر RT بافر، ۲ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر RT آنزیم اضافه شد. در نهایت، آب یک میکرولیتر RNase free اضافه شد تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسانده شود. نمونه‌ها طبق برنامه، ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت، ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر قرار گرفت. در این تحقیق پرایمرهای مربوط به ژن‌های miRNAهای miR-9، miR-107 و U6 (به‌عنوان ژن مرجع) طراحی و ساخته شدند (جدول ۱). در مطالعه حاضر RNA استخراج شده از سلول‌های بافت هیپوکمپ جنین ۱۸ روزه موش صحرایی، در سه گروه کنترل و تیمار با گاباپنتین و لاموریزن در سه تکرار بررسی شد. تمام مواد مورد نیاز برای واکنش RT-PCR روی یخ نگهداری شدند. ابتدا مستر میکس با توجه به تعداد نمونه تهیه شد. Master Mix حاوی تمام مواد لازم برای RT-PCR از جمله cDNA و Taq DNA پلیمرز است. مقدار مواد برای Real-Time PCR شامل ترکیب اصلی ۰/۶ PCR میکرولیتر، آب بدون RNAase ۵/۴ میکرولیتر، پرایمرهای ۱ میکرولیتر و cDNA رقیق شده ۱ میکرولیتر است. پس از آماده‌سازی مخلوط، Hold، Denaturation cycle، Annealing cycle و Extension به دستگاه داده شد. آنزیم DNA پلیمرز موجود در Master Mix دارای ویژگی شروع داغ است که از تکثیر محصولات ناخواسته جلوگیری می‌کند و برای فعال شدن به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه نیاز دارد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن، چرخه آستانه (CT) برای هر نمونه محاسبه شد. بیان ژن‌های هدف اندازه‌گیری و نسبت به بیان U6 نرمال سازی شد.

به همان حجم از محیط کشت مغذی نوروبازال حاوی مکمل B27 (نسبت ۵/۱)، محلول گلوتامین (۰/۵ میلی‌مولار)، پنی‌سیلین (۱۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰۰۰ میکروگرم) اضافه شد. هر ۴ روز یکبار با حذف نیمی از محیط قدیمی و جایگزینی آن با همان حجم تغذیه محیط کشت Neurobasal تازه، نورون‌ها تغذیه شدند. فرایندهای عصبی باید در روز اول قابل مشاهده بود و تا روز دهم آکسون‌ها و دندریت‌های نورون‌ها گسترش می‌یافتند.^{۲۰} نورون‌ها پس از ۲۰ روز کشت با تربیسین از محیط کشت جدا شدند. تصاویر با استفاده از عدسی شیئی با استفاده روغن امولسیون با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر و میکروسکوپ نوری فاز کنتراست گرفته شدند.^{۲۱} برای شمارش سلولی از لام‌های نتوبار استفاده شد. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی، ۱۰ میکرولیتر از آن برداشته و به آرامی ۱۰ میکرولیتر رنگ تربیان بلو پیپت شد و با یک نمونه‌گیر زیر لام سنگی تزریق شد. تعداد سلول‌های زنده در چهار مربع شمارش و میانگین‌گیری شد. تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر با فرمول زیر به دست آمد.

تعداد کل سلول‌ها = $\frac{\text{تعداد سلول‌های شمارش شده} \times 4}{\text{مربع}} \times \text{عکس رقت} \times 10000$
 برای استخراج RNA، ۱ میکرولیتر تریزول در دو مرحله به رسوب سلول‌های استخراج شده اضافه شد. سپس، بافت با میکرو هموزنایزر روی یخ همگن شد و ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه شد و ورتکس شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه، در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی دور ریخته شد و ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به مخلوط اضافه شد. دوباره در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میکروتیوب تخلیه شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد با رسوب مخلوط شد. مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی تخلیه و ۱۵۰-۳۵۰ میکرولیتر آب DEPS به رسوب اضافه گردید و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا رسوب به آرامی حل شود. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها،

جدول ۱. پرایمر ژن‌های miRNA

الیگومرها	توالی نوکلئوتیدی پرایمر 5'→3'	Tm°
miR-9	F- AGGCATCTTTGGTTATCT R- universal توالی به صورت	60°C
miR-107	F- ACCAGAGCAGCATTCTA R- universal توالی به صورت	60°C
U6	F- CTCGCTTCGGCAGCACATATACTA R- universal توالی به صورت	60°C
Universal reverse (for microRNAs)	GTGCAGGGTCCGAGGT	60°C

پیوسته ایجاد شد و میانگین و انحراف معیار طول دندریتها به $58/812 \pm 32/829$ و جسم سلولی به $293/277 \pm 58/106$ افزایش یافت. بنابراین، ما رشد بیشتر جسم سلولی و افزایش انشعاب دندریتیک را در طول فرآیند توسعه در نورون‌هایی که با گاباپنتین و لاموتریزین درمان نشده بودند، مشاهده کردیم (شکل 1A). با این حال، نورون‌های درمان شده با ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گاباپنتین و لاموتریزین نتوانستند به‌طور طبیعی رشد کنند و رشد نوریت‌ها به‌طور قابل توجهی مختل شد. هر دو دارو به‌طور قابل-توجهی دندریت‌زایی را در نورون‌های هیپوکامپ مهار کردند و پس از ۱۰ روز مورفولوژی غیرمعمولی را القا کردند. این امر منجر به دندریت‌های کوتاه و ضخیم در نورون‌ها شد. به‌طور خاص، در گاباپنتین، تغییر در دندریت‌زایی بسیار زیاد است و در درمان لاموتریزین، نورون‌ها تیز شدند که احتمالاً نشان‌دهنده تغییرات در جسم سلولی است. با این حال، انشعاب نورون‌ها نسبتاً زیاد بود. به‌ترتیب میانگین انحراف معیار تغییر در طول گاباپنتین و لاموتریزین $55/961 \pm 19/420$ و $55/560 \pm 16/263$ کنترل به‌طور قابل توجهی کاهش یافته بود (شکل 1B). همچنین، میانگین اندازه جسم سلولی برای گاباپنتین و لاموتریزین به‌ترتیب $17/937 \pm 7/164$ و $22/262 \pm 2/746$ بود که نسبت به گروه کنترل به شدت کاهش یافته بود. پس از ۲۰ روز درمان با ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گاباپنتین و لاموتریزین (شکل 1C)، نوریت‌ها در هر دو گروه درمانی در مقایسه با مدت زمان مشابه گروه کنترل کوتاه‌تر و ضخیم‌تر با شاخص انشعاب پایین‌تر بودند و سلول‌ها برای مدت کوتاه‌تری تحت درمان قرار گرفتند؛ به‌طوری‌که میانگین و انحراف معیار طول نوریت‌ها در گروه‌های تیمار با گاباپنتین و لاموتریزین به-ترتیب $70/843 \pm 34/507$ و $112/549 \pm 34/947$ نانومتر بود. در درمان با لاموتریزین، جسم سلولی تا حد زیادی تخریب شد و تا گروه گاباپنتین $16/888 \pm 2/530$ نانومتر کاهش یافت ولی اندازه جسم سلولی در گروه گاباپنتین $17/937 \pm 7/164$ بود. همچنین، در طول مدت ۲۰ روز کشت نورون‌ها در هر سه گروه تعداد شاخه‌های دندریت‌ها زیاد شدند. بیان هر یک از MiRNAها به‌وسیله تکنیک Real-time PCR در دماهای مختلف بررسی شد و در صورت داشتن هرگونه ایراد آنها دوباره تکرار شدند. به منظور آنالیز دقیق از ΔCT ، $\Delta \Delta CT$ و $Fold\ chang$ استفاده شد. (CT (Cycle of Threshold) به‌عنوان تعداد چرخه‌های مورد نیاز برای عبور سیگنال فلورسنت از آستانه تعریف می‌شود. هر چقدر مقادیر CT بیشتر باشد، میزان بیان ژن کمتر است. پس از انجام Real time PCR آنالیز نتایج میزان تغییرات بیان میکرو RNA های Mir-9 و Mir-107 نسبت به U6 محاسبه شد. برای آنالیز آماری داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk برای تطابق توزیع نمونه‌ها و بررسی نرمالیتی

تفاوت CT دو ژن (ΔCT) در تمام نمونه‌ها محاسبه و نتایج به-صورت تفاوت در Fold بیان شدند. Fold نشان‌دهنده میزان تغییر در بیان ژن در نمونه‌های آزمایش نسبت به کنترل است و برابر با $Fold = 2^{-\Delta \Delta CT}$ است.

در حالی که:

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT_{Test} - \Delta CT_{Control} = (CT_{Target} - CT_{U6})_{Test} - (CT_{Target} - CT_{U6})_{Control}$$

نتایج مطالعه با استفاده از روش‌های آمار توصیفی (میانگین \pm انحراف معیار) گزارش شد. با توجه به اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال بودند، در مرحله بعد برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه‌های کنترل و تیمار (دو گروه) از آزمون t مستقل و برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه‌های مختلف تیمار شده و کنترل از آزمون ANOVA یک‌طرفه استفاده شد. سطح معنی‌داری ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری GraphPad Prism نسخه ۹ انجام گرفت.

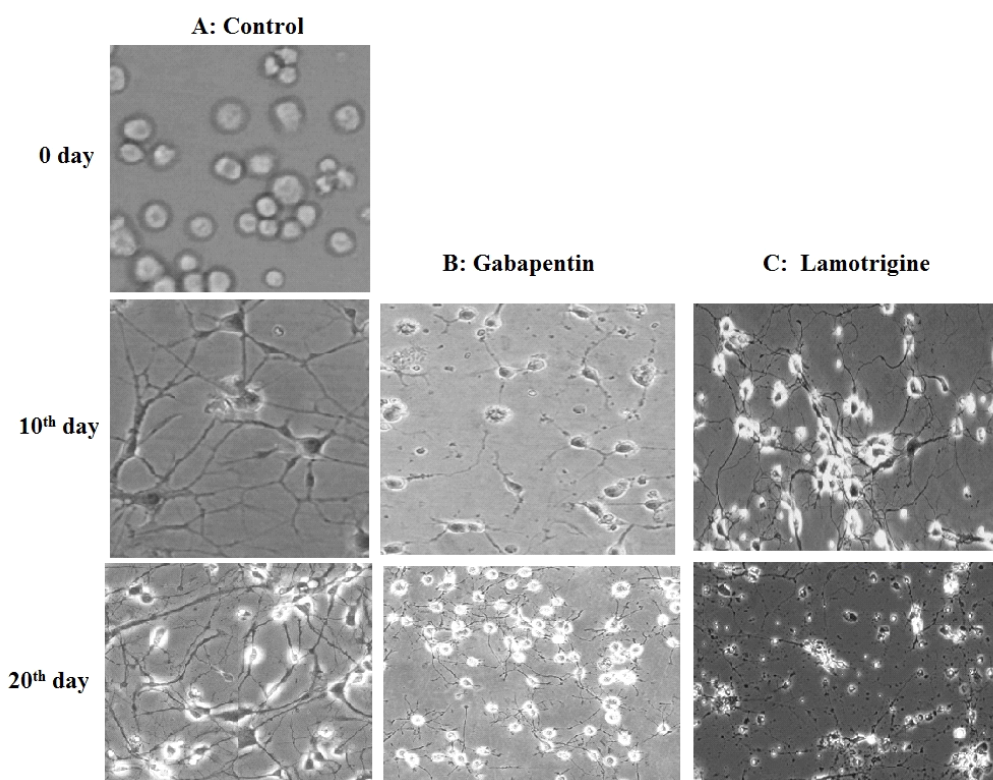
یافته‌ها

در این مطالعه، اثرات داروهای گاباپنتین و لاموتریزین بر مورفولوژی، رشد نورون‌های نابالغ حاصل از کشت اولیه بافت هیپوکامپ جنین موش صحرایی و بیان ژن‌های دخیل در رشد نورون‌ها در سه گروه کنترل و دو گروه تیمار را بررسی شد. کشت اولیه سلول‌های هیپوکامپ با موفقیت تهیه شد و تقریباً 2×10^6 سلول زنده پس از شمارش سلول‌ها با لام به هر فلاسک سلولی T25 اضافه شد و در طول کشت سلولی در محیط کشت نوروزال مرگ سلولی اتفاق نیافتاد و بر تعداد سلول‌ها نیز اضافه نشد. بنکر و کوان پیش از این مراحل مختلف رشد مورفولوژیکی در کشت‌های اولیه نورون‌های هیپوکامپ را توضیح داده بودند^{۳۳} و ما تغییرات مورفولوژیکی عصبی را در به مدت ۲۰ روز دنبال کردیم. هیچ افزایشی در تعداد نورون‌ها در فلاسک کنترل و فلاسک تیمار شده وجود نداشت. همچنین، سلول‌های عصبی نمی‌توانند در محیط کشت نوروزال تکثیر شوند. مطابق با شکل ۱، در روز اول، همه فلاسک‌ها حاوی سلول‌های تمایز نیافته بودند، جسم سلولی برجسته بود و سلول‌ها طول نوریت کمی داشتند. رشد دندریت‌ها و آکسون‌های نورون‌ها در ۱۰ روز تحت شرایط رشد بهینه (گروه کنترل) مشهود بود و یک شبکه عصبی تشکیل می‌داد. میانگین و انحراف معیار طول دندریت‌ها $84/005 \pm 24/413$ نانومتر و جسم سلولی $25/201 \pm 1/760$ نانومتر بود. طویل شدن نوریت‌ها در سلول‌ها پس از ۲۰ روز ادامه یافت و سلول‌ها با نورون‌های مجاور تماس پیدا کردند؛ در نتیجه، یک شبکه گسترده و به‌هم

بررسی بیان این MiRNAها در بازه زمانی ۲۰ روز پس از تیمار سلولها با داروها و در سه تکرار انجام گرفت. در آزمون ANOVA یکطرفه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد. سپس از آزمون تعقیبی Tukey با مقدار معناداری $\alpha=0/05$ برای بررسی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد. همه گروه‌های آزمایش با دقت ۰/۹۵ محاسبه شده و با هم متفاوت هستند.

بیان ژن‌ها استفاده شد. آزمون نرمالیته Shapiro-Wilk با مقدار معناداری $\alpha=0/05$ انجام گرفت و تمامی نمونه‌ها نرمال بودند. در ادامه از آزمون t مستقل برای بررسی آماری متغیر دارای توزیع نرمال استفاده شد.

در آزمون t مستقل برای همه گروه‌ها ($P>0/05$) بود و هیچ تفاوتی بین گروه‌های مقایسه شده از نظر آماری وجود نداشت.



شکل ۱. مورفولوژی نورون‌های هیپوکامپ در محیط کشت (بزرگنمایی ۱۰۰): سه گروه کنترل و تیمار شده با داروهای گاباپنتین و لاموتریژین در روزهای صفر، ۱۰ و ۲۰ با دوز ثابت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داده شده است. سلول‌های کنترل در شرایط ایده‌آل با اندازه و شکل طبیعی کشت داده شدند و پس از ۲۰ روز شبکه کاملی از دندریت‌ها، آکسون‌ها و جسم سلولی طبیعی ایجاد شد. با این حال، تیمار با گاباپنتین و لاموتریژین رشد سلول‌های عصبی و شاخه‌های دندریت و آکسون را کاهش داد. پس از ۲۰ روز تیمار، جسم سلولی درهم‌تنیده می‌شود و دندریت‌ها ضخیم‌تر و کوتاه‌تر می‌شوند که نشان‌دهنده عقب‌ماندگی رشد است.

جدول ۲: بهینه‌سازی دما و غلظت پرایمرها برای واکنش‌های Real-time PCR و میانگین CT

MiRNA	میانگین CT	ΔCT	ΔΔCT	Foldchang	
Mir-9	Control	۲۸/۳۷	۶	۰	۱
	Gabapentin	۲۵/۲۴	۲/۸۷	-۳/۱۳	۸/۷۵
	Lamotrigine	۲۴/۹۲	۲/۵۵	-۳/۴۵	۱۰/۹۳
Mir-107	Control	۲۳/۹۳	۱/۵۶	۰	۱
	Gabapentin	۲۴/۳۳	۱/۹۶	۰/۴	۰/۷۶
	Lamotrigine	۲۶/۷۱	۴/۳۴	۲/۷۸	۰/۱۵
U6	۲۲/۳۷				

کنترل داخلی جهت نرمالیزه کردن نتایج استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش جداگانه است. نمادهای ستاره تغییرات معنی‌دار با گروه کنترل را در هر مقایسه نشان می‌دهند.

بحث

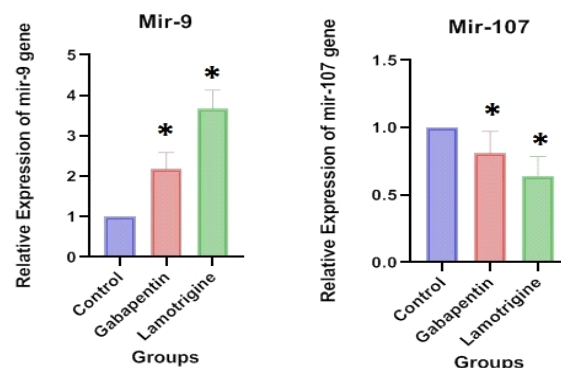
برخی از مواد شیمیایی نورواکتیو، داروها یا متابولیت‌های آنها همانند گاباپنتین و لاموتریژین، می‌توانند از جفت و سد خونی- مغزی عبور کرده و بر سلول‌های عصبی در حال رشد تأثیر بگذارند. این داروها در خون پایدار هستند و می‌توانند تشنج را تسکین دهند. بنابراین، آنها معمولاً برای کنترل اختلالات عصبی در زنان باردار مبتلا به صرع تجویز می‌شوند. غلظت مؤثر داروها در سرم خون ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. این مطالعه اثرات گاباپنتین و لاموتریژین را بر مورفولوژی و رشد نورون‌های هیپوکامپ جنین موش صحرایی در غلظت فیزیولوژیکی بررسی کرد تا دوره نوزادی رشد سیستم عصبی مرکزی را تقلید کند. این یافته‌ها برای هدایت طراحی مطالعات پیش‌بالینی با هدف ارزیابی ایمنی گاباپنتین و لاموتریژین در دوران بارداری مهم هستند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد زمانی که نورون‌های در حال رشد و تکوین در معرض داروها قرار می‌گیرند بیان این miRNAها تغییر می‌یابد. سلول‌های عصبی نابالغ برای رشد و تمایز مناسب سلول به غلظت پایدار Ca^{2+} ، که به عنوان هموستاز کلسیم شناخته می‌شود، نیاز دارند. کنترل دقیق سطح Ca^{2+} برای عملکرد عصبی، از جمله انعطاف‌پذیری سیناپسی، بقای نورونی، رشد نوریت‌ها و تنظیم بیان ژن که توسط این داروها تنظیم نشده و منجر به دندریت‌های کوتاه و ضخیم و همچنین شکل و اندازه غیرطبیعی سوما شده است، بسیار مهم است. نتایج ما نشان داد که هر دو دارو در مقایسه با گروه کنترل، رشد غیرطبیعی با نوریت‌های کوتاه‌تر و ضخیم‌تر و شاخص شاخه‌بندی پایین‌تر در نورون‌های هیپوکامپ ایجاد می‌کنند. سلول‌های عصبی کشت‌شده در محیط کنترل بدون هیچ درمانی توانستند یک شبکه عصبی کامل با شاخص شاخه‌بندی بالای نوریت‌ها و یک جسم سلولی سالم تولید کنند، اما در نورون‌های تیمار شده با دارو، هیچ شبکه کاملی یافت نشد، در حالی که اندازه و شکل جسم سلولی غیرطبیعی بود. پیش از این، اثرات گاباپنتین بر نورون‌ها در موش‌های بالغ مبتلا به درد مزمن بررسی شده بود و نتایج نشان داد که گیرنده گاما آمینوبوتیریک اسید افزایش می‌یابد که می‌تواند تمایز و مهاجرت عصبی را القا کند، اما دوز بالای دارو شاخص‌بندی دندریتیک را کاهش داد، که یافته‌های ما را نیز تأیید می‌کند.^{۲۴}

گاباپنتین مانع از تشکیل و تمایز نورون‌های دوپامینرژیک در جنین‌های موش می‌شود.^{۲۵} $16 \mu\text{g/mL}$ گاباپنتین تعداد سلول‌های

نتایج نشان داد میانگین و انحراف معیار بیان ژن Mir-9 (شکل 2. A) نسبت به ژن مرجع U6 در گروه درمان با لاموتریژین و گروه درمان با گاباپنتین، گروه کنترل به $2/18 \pm 0/41$ ، $3/77 \pm 0/46$ و 1 بود. مطابق با نتایج، بیان Mir-9 در نتیجه قرار گرفتن در معرض گاباپنتین به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0/05$). مقدار بیان (Foldchange) آن برابر با $8/75$ بود. مقایسه بیان Mir-9 بین سلول‌های دریافت‌کننده لاموتریژین تأیید کرد که لاموتریژین باعث افزایش معناداری از لحاظ آماری در سطح بیان Mir-9 نسبت به هر دو گروه کنترل و دریافت‌کننده گاباپنتین می‌شود ($P < 0/05$). میزان بیان (Foldchange) برای آن $10/93$ به دست آمد (جدول ۲). در آزمون تعقیبی توکی مشخص شد به ترتیب گاباپنتین و لاموتریژین با $P < 0/05$ در این گروه معنی دار هستند.

میانگین و انحراف معیار بیان ژن Mir-107 (شکل 2. B) در مقایسه با ژن مرجع U6 در گروه درمان با گاباپنتین، گروه درمان با لاموتریژین و گروه کنترل به ترتیب $0/81 \pm 0/163$ ، $0/76 \pm 0/146$ و 1 بود. از نظر آماری، کاهش قابل توجهی بین نورون‌های دریافت‌کننده گاباپنتین وجود دارد ($P = 0/001$). مقدار بیان (Foldchange) آن برابر با $0/76$ می‌باشد (جدول ۲). مقایسه گروه‌های تحت درمان نشان داد که لاموتریژین باعث کاهش بیشتری در بیان Mir-107 نسبت به گاباپنتین و کنترل می‌شود ($P = 0/001$). میزان بیان آن (Foldchange) $0/15$ به دست آمد (جدول ۲). در آزمون تعقیبی توکی مشخص شد به ترتیب نمونه کنترل و گاباپنتین با $P < 0/05$ در این گروه معنی‌دار هستند.



A: بیان ژن Mir-9

B: بیان ژن Mir-107

شکل ۲. بیان نسبی ژن‌های دخیل در رشد عصبی و نمو عصبی. نتایج نشان داد که بیان نسبی ژن Mir-9 در نورون‌هایی که هر دو دارو را دریافت کردند، افزایش یافت. افزایش بیان در سلول‌های تیمار شده با لاموتریژین قابل توجه‌تر بود ($P < 0/05$). ژن Mir-107 در هر دو گروه تیمار شده کاهش بیان داشت و سلول‌های دریافت‌کننده لاموتریژین کاهش بیشتری در سطح mRNA مربوط به ژن Mir-107 نشان دادند. تیمار با لاموتریژین باعث کاهش قابل توجه‌تری در بیان ژن‌ها می‌شود ($P = 0/001$). از ژن U6 به عنوان

بنیادی قشر مغز MAP^{2+} را افزایش داده و گاباپنتین تمایز عصبی را تا حدودی القا می‌کند. همچنین، 1 nMol گاباپنتین با افزایش بیان MAP^{2+} ، تمایز عصبی NSC‌های هیپوکامپ موش بالغ را به‌طور قابل‌توجهی بهبود بخشید. در مطالعه ما گاباپنتین با دوز دارویی 25 میکروگرم بر لیتر استفاده شده بود که در طول تیمار میزان تمایز کاهش یافته بود مثلاً روز 20 نسبت به روز 10 تمایز نوریت‌ها کمتر بود ولی توی اون مطالعه 16 میکروگرم بر میلی لیتر داروی گاباپنتین استفاده شده بود و افزایش تمایز در نوریت‌ها مشاهده شده بود که عکس نتایج ما هست و ما احتمال دادیم علت این امر بخاطر مصرف دوز پایین تر دارو هست زیرا تأثیر سمی ناشی از افزایش دوز دارویی نداشت.^{۲۱} آنها همچنین دریافتند که لاموتریزین در دوز (20 mg/Kg) بر نورون‌های سالم تأثیر نداشت، اما نورون‌های نابجا را در DG موش‌های مبتلا به صرع لوب تمپورال ناشی از لیتیوم پیلوکارپین کاهش داد.^{۲۲-۲۶} طبق گزارش قبلی ما، داروی ضد تشنج دیگر، فنی‌توئین، نیز باعث عقب‌ماندگی رشد و اختلال در شبکه شاخه‌بندی در کشت اولیه نورون‌های هیپوکامپ می‌شود.^{۲۱} بررسی‌ها و همکاری‌ها نشان دادند لاموتریزین با دوز 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم و توپیرامات با دوز 80 میلی‌گرم بر کیلوگرم تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی ناشی از تشنج را در هیپوکامپ مهار کرده، اما بر تمایز سلول‌های جنینی تأثیر نداشتند. هر دو دارو در تیمار طولانی مدت تعداد تشنج مکرر و آسیب ناشی از آن را کاهش دادند. توپیرامات تعداد نورون‌های نوزادی را در لایه سلولی گرانولوزای دندان‌های پس از تشنج را با بقای نورون‌های تازه متولد شده افزایش و لاموتریزین تعداد نورون‌های شکنج دندان‌های را پس از تشنج کاهش داد.^{۲۸} نتایج سوبسال و همکاری‌ها نشان داد تشنج در دوران بارداری بر رشد مغز جنین تأثیر منفی می‌گذارد، اما درمان جنین 21 روز پس از تولد با فنی‌توئین و اسید فولیک و لاموتریزین باعث بهبود در تغییر بیان ژن‌های موثر در تکوین نورن‌ها شدند.^{۲۹}

$miR-9$ یکی از فراوان‌ترین $miRNA$ ها در مغز در حال رشد و بالغ است. اگرچه عملکرد $miR-9$ در پیش‌سازهای عصبی به خوبی مشخص شده است، اما نقش آن در نورون‌های تمایز یافته تا حد زیادی ناشناخته است. این موضوع تعجب‌آور است زیرا سطح $miR-9$ در نورون‌های بالغ بالاتر از پیش‌سازهای عصبی است، که نشان دهنده اهمیت بالای فرآیندهای بیولوژیکی آن است. اخیراً، نقشی برای $miR-9$ در گسترش و شاخه‌بندی نوریت‌ها ذکر شده که نشان‌دهنده اهمیت $miR-9$ در ایجاد شبکه‌های عصبی است. جیستی و همکاری‌ها با هدف مشخص کردن نقش بالقوه $miR-9$ در رشد دندریتیک از نورون‌های هیپوکامپ موش صحرایی استفاده کردند و نشان دادند که نورون‌های ترانسفکت شده با اسفنج GFP

$FC-miR-9$ پس از 10 روز در شرایط کاهش قابل‌توجهی در طول و شاخه‌دار شدن دندریتی قرار می‌گیرند. این امر احتمالاً به دلیل از دست دادن عملکرد $miR-9$ است. همچنین، کاهش پیچیدگی دندریتی مشاهده شده ممکن است تحت تأثیر تغییرات در عوامل بیرونی سلولی محیط خارج سلولی، سلول‌های گلیال یا کاهش فعالیت ورودی‌های عصبی مؤثر بر تمایز دندریتی باشد. کوتاه شدن دندریت‌ها منجر به اختلال در انتقال سیناپسی ناشی از کاهش تعداد مطلق سیناپس‌ها در هر نورون (با حفظ تراکم سیناپس) می‌شود.^{۳۰} در راستای تأیید نتایج مطالعه حاضر، مید و همکاری‌ها نشان دادند که تأثیر غلظت 20 میلی‌مولار الکل در کوتاه مدت می‌تواند بیان $miR-9$ بالغ را افزایش دهد. تنظیم بیوزن $miR-9$ در اثر مصرف الکل با گذشت زمان در رشد و عملکرد مغز تأثیر می‌گذارد. $miR-9$ از طریق تنظیم هم‌زمان یک فاکتور رونویسی، REST بر تمایز سلول‌های بنیادی عصبی تأثیر می‌گذارند (RE1: فاکتور رونویسی خاموش‌کننده/فاکتور خاموش‌کننده محدودکننده نورون). $miR-9$ مستقیماً REST را هدف قرار می‌دهد، همچنین یک کوفاکتور REST را تنظیم می‌کند. بنابراین، $miR-9$ می‌تواند ترکیب‌های مختلفی از REST:coREST ایجاد کند و در نتیجه بر تمایز عصبی تأثیر بگذارد.^{۳۱} از آنجایی که REST در طول رشد عصبی به شدت کاهش می‌یابد، یکی از عملکردهای کلیدی $miR-9$ پایین نگه داشتن سطح REST در طول تمایز نورون‌ها است. بیان بیش از حد REST در نورون‌های اولیه هیپوکامپ به‌طور قابل‌توجهی طول دندریتیک و شاخه‌دار شدن را کاهش می‌دهد. افزایش سطح REST در واقع واسطه اصلی اثرات $miR-9$ بر رشد دندریتی است.^{۳۰}

$miR-107$ متعلق به خانواده بسیار حفاظت‌شده $miR-103/107$ است. پروفایل‌های بیان اعضای خانواده $miR-103/107$ نشان می‌دهد که $miR-103$ در بافت‌های قشر مغز و پیشانی، قلب، ریه و کبد بیان می‌شود، در حالی که $miR-107$ به‌طور خاص در نمونه‌های مغز غنی شده است و در تمایز و تکوین نورون‌ها نقش دارد؛ چراکه $miR-107$ در مسیرهای سیگنالینگ توقف چرخه سلولی، رگ‌زایی و هیپوکسی یافت می‌شود.^{۳۲} نتایج وانگ و همکاری‌ها نشان داد بیان $miR-107$ در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر حتی در مراحل تولید به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت، زیرا ناحیه $3'$ - ترجمه نشده mRNA (UTR) مربوط به آنزیم برش‌دهنده پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید β -site (BACE1) توسط $miR-107$ تکثیر می‌شود. با کاهش سطح $miR-107$ در پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو، سطح mRNA مربوط به BACE1 تمایل به افزایش داشت. نتایج نشان می‌دهد $miR-107$ در تنظیم پس از رونویسی BACE1 نقش دارد.^{۳۳} ریستوری بیان کرد $miR-107$ در سطح پس از رونویسی با Dicer

دانشکده پزشکی ارومیه پشتیبانی شده است. از همکاری این دانشکده‌ها در این مطالعه تشکر و قدردانی می‌شود.

مشارکت پدیدآوران

طرح موضوع و نظارت بر نگارش توسط لیلا صادقی انجام شده است. تهیه پیش‌نویس، انجام آزمایشات سلولی و مولکولی، جمع‌آوری، تحلیل و بررسی داده‌ها توسط زینب امانزاده، شهریار علیپور و سمیه حثیت طلب انجام گرفته است. همچنین، تمامی نویسندگان در پژوهش و نگارش اولیه مقاله با بازنگری آن سهمی بوده‌اند و صحت مقاله حاضر را تایید کردند.

منابع مالی

این تحقیق هیچ گونه حامی مالی نداشته است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

تمامی داده‌های مورد استفاده در مقاله و در بخش نتایج گنجانده شده است.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه تبریز با کد اخلاق IR.TABRIZU.REC.1404.029 به تصویب رسیده است.

تعارض منافع

این اثر مستقل بوده و هیچ‌گونه تضاد منافع با اشخاص و سازمان‌های دیگر ندارد.

تعامل دارد و سطح و عملکرد آن را در سلول‌های تمایز عصبی به‌طور منفی تنظیم می‌کند. افزایش عملکرد miR-107 باعث از دست رفتن شدید مورفولوژی نورون‌ها می‌شود که در نتیجه از دست رفتن بیوژنز Dicer است. در مقابل، کاهش miR-107، پایداری Dicer mRNA و تعداد پیش‌سازهای چرخه‌ای تولیدکننده نورون‌ها را افزایش می‌دهد. تنظیم سطح دایسر توسط miR-107 در سلول‌های عصبی در حال تمایز، برای حفظ سطح هموستاتیک miRNAهای خاص که تجمع دقیق آنها برای نوروزن ضروری است، مورد نیاز است.^{۱۹}

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر تأکید کرد که گاباپنتین و لاموتریزین، می‌توانند از بند ناف عبور کرده و بر رشد سلول‌های عصبی در حال رشد تأثیر بگذارند. این داروها در خون متابولیزه نمی‌شوند و خود پایدار هستند و در دوزهای بالا باعث ایجاد ناهنجاری‌های مورفولوژیک در نورون‌های هیپوکامپ و ایجاد دندریت‌های ضخیم و کوتاه و اختلال در جسم سلولی شده و از انشعاب دندریت‌ها و تشکیل آکسون جلوگیری می‌کند. بنابراین، این احتمال وجود دارد در دوزهای بالاتر باعث عقب‌ماندگی ذهنی در جنین شوند و تجویز آنها در زنان باردار باید محدود شده و در موارد مورد نیاز از داروهای ایمن جایگزین استفاده شود.

قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه دانشجوی دکترای بیوشیمی دانشگاه تبریز می‌باشد و توسط دانشکده علوم طبیعی تبریز و

References

- Chen Q, Gan Y, Wang K, Li Q. PregTox: A Resource of Knowledge about Drug Fetal Toxicity. *Biomed Res Int.* 2022;2022:4284146. doi: 10.1155/2022/4284146.
- Moini J, Logalbo A, Schnellmann J. Pharmacogenomics, drug toxicity, and environmental toxins. *Neuropsychopharmacology.* England: Academic Press. 2023;1:75-96.
- Thompson BL, Levitt P, Stanwood GD. Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(4):303-12. doi: 10.1038/nrn2598
- Karra Geetha, Shaik Razia Begum, Anil Kumar, Nur Hussain, T. Rama Rao and Divya Amaravadi. Drug use in pregnancy: A review. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences.* 2024;18(03):59-66. doi: 10.30574/wjbphs.2024.18.3.0330
- Sert ZS, Menekse TS. Drug-induced poisoning during pregnancy: Four-year experience. *Am J Emerg Med.* 2022;54:22-5. doi: 10.1016/j.ajem.2022.01.047.
- Rattner A, Hsieh JC, Smallwood PM, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, et al. A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):2859-63. doi: 10.1073/pnas.94.7.2859.
- Yu H, Xiong M, Zhang Z. The role of glycogen synthase kinase 3 beta in neurodegenerative diseases. *Front Mol Neurosci.* 2023;16:1209703. doi: 10.3389/fnmol.2023.1209703.
- Crawford P, Brown S, Kerr M; Parke Davis Clinical Trials Group. A randomized open-label study of gabapentin and lamotrigine in adults with learning

- disability and resistant epilepsy. *Seizure*. 2001;10(2):107-15. doi: 10.1053/seiz.2000.0474.
9. Sakai A, Matsuda T, Doi H, Nagaishi Y, Kato K, Nakashima K. Ectopic neurogenesis induced by prenatal antiepileptic drug exposure augments seizure susceptibility in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(16):4270-5. doi: 10.1073/pnas.1716479115.
 10. Suman-Chauhan N, Webdale L, Hill DR, Woodruff GN. Characterisation of [3H]gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies. *Eur J Pharmacol*. 1993;244(3):293-301. doi: 10.1016/0922-4106(93)90155-3.
 11. Tomé D, Dias MS, Correia J, Almeida RD. Fibroblast growth factor signaling in axons: from development to disease. *Cell Commun Signal*. 2023;21(1):290. doi: 10.1186/s12964-023-01284-0.
 12. Toledano R, Gil-Nagel A. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Semin Neurol*. 2008;28(3):317-27. doi: 10.1055/s-2008-1079336.
 13. Betchel NT, Fariba KA, Saadabadi A. Lamotrigine. 2023 Feb 13. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. PMID: 29262021.
 14. Ebrahimi HA, Ebrahimi F. The effect of lamotrigine on epilepsy. *Iran J Neurol*. 2012;11(4):162-3.
 15. Zhao J, Zhou Y, Guo M, Yue D, Chen C, Liang G, et al. MicroRNA-7: expression and function in brain physiological and pathological processes. *Cell Biosci*. 2020;10:77. doi: 10.1186/s13578-020-00436-w.
 16. Zhao C, Sun G, Li S, Shi Y. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(4):365-71. doi: 10.1038/nsmb.1576.
 17. Radhakrishnan B, Alwin Prem Anand A. Role of miRNA-9 in Brain Development. *J Exp Neurosci*. 2016;10:101-20. doi: 10.4137/JEN.S32843.
 18. Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, et al. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci*. 2008;28(5):1213-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5065-07.2008.
 19. Ristori E, Lopez-Ramirez MA, Narayanan A, Hill-Teran G, Moro A, Calvo CF, et al. A Dicer-miR-107 Interaction Regulates Biogenesis of Specific miRNAs Crucial for Neurogenesis. *Dev Cell*. 2015;32(5):546-60. doi: 10.1016/j.devcel.2014.12.013.
 20. Seibenhener ML, Wooten MW. Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice. *J Vis Exp*. 2012;(65):3634. doi: 10.3791/3634
 21. Marefat A, Sadeghi L. Neurotoxic effects of phenytoin on primary culture of hippocampal neurons: Neural development retardation. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*. 2020;36:52-6. doi: 10.1016/j.npbr.2020.03.001
 22. Kim J, Heindl JE, Fuqua C. Coordination of division and development influences complex multicellular behavior in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS One*. 2013;8(2):e56682. doi: 10.1371/journal.pone.0056682.
 23. Banker GA, Cowan WM. Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J Comp Neurol*. 1979;187(3):469-93. doi: 10.1002/cne.901870302.
 24. Zeng W, Tan Y, Yang L, Jiang X. Effect of gabapentin on neurogenesis in hippocampal dentate gyrus of adult rats with co-disease of chronic pain and depression. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2022;47(7):839-46. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210657.
 25. Alsanie WF, Abdelrahman S, Alhomrani M, Gaber A, Habeeballah H, Alkhatabi HA, et al. Prenatal Exposure to Gabapentin Alters the Development of Ventral Midbrain Dopaminergic Neurons. *Front Pharmacol*. 2022;13:923113. doi: 10.3389/fphar.2022.923113.
 26. Alavi MS, Al-Asady AM, Fanoudi S, Sadeghnia HR. Differential effects of antiseizure medications on neurogenesis: Evidence from cells to animals. *Heliyon*. 2024;10(4):e26650. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e26650.
 27. Shi XY, Wang JW, Cui H, Li BM, Lei GF, Sun RP. Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain. *Brain Dev*. 2010;32(3):229-35. doi: 10.1016/j.braindev.2009.03.012.
 28. Chen J, Quan QY, Yang F, Wang Y, Wang JC, Zhao G, et al. Effects of lamotrigine and topiramate on hippocampal neurogenesis in experimental temporal-lobe epilepsy. *Brain Res*. 2010;1313:270-82. doi: 10.1016/j.brainres.2009.12.024
 29. Soysal H, Doğan Z, Kamışlı Ö. Effects of phenytoin and lamotrigine treatment on serum BDNF levels in offsprings of epileptic rats. *Neuropeptides*. 2016;56:1-8. doi: 10.1016/j.npep.2015.12.001
 30. Giusti SA, Vogl AM, Brockmann MM, Vercelli CA, Rein ML, Trümbach D, et al. MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. *Elife*. 2014;3:e02755. doi: 10.7554/eLife.02755.