

جلوگیری از اثر SRF بر نوروتهای کشت داده شده هر می هیپوکامپ به وسیله عصاره آبی جدا شده از گیاه جدوار *Delphinium denudatum* WALL.ex Hook.F.&Thoms

رضا حیدری^۱، فرزانه شاهین^۲، سامپونگ سومباتی^۳، رج دی لورنزو^۴

۱- دانشیار نیورولوژی، کالج پزشکی ویرجینیا، دانشگاه Commonwealth ویرجینیا، آمریکا

۲- دانشیار شیمی، انستیتو تحقیقات شیمی، دانشگاه کراچی پاکستان، کراچی، پاکستان

۳- دانشیار فیزیولوژی، کالج پزشکی ویرجینیا، دانشگاه Commonwealth ویرجینیا، آمریکا

۴- استاد نورولوژی، کالج پزشکی ویرجینیا، دانشگاه Commonwealth ویرجینیا، آمریکا

۵- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه تهران، بیمارستان شریعتی

* آدرس مکاتبه: خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم مرکز تحقیقات غدد درونریز و متابولیسم

تلفن: ۳-۸۰۲۶۹۰۲ (۰۲۱)، فاکس: ۸۰۲۹۳۹۹ (۰۲۱)

پست الکترونیک: mrheydari@sina.tums.ac.ir

چکیده

در این گزارش ما اثر عصاره آبی (Aqueous fraction (AF)) جدا شده از جدوار با نام علمی *Delphinium denudatum* WALL.ex Hook.F.&Thoms بر SRF (sustained repetitive firing) نرونهای پیرامیدال هیپوکامپ موش صحرایی را بررسی کردیم. بلوک SRF یکی از مکانیسمهای پایه داروهای آنتی اپی‌لپتیک (AED) در سطح سلولی می‌باشد. اثر AF (۰/۶ - ۰/۲ mg/ml) با یک داروی اولیه آزمایشی، فنی‌توین (PHT) مقایسه شد. با استفاده از تکنیک Whole cell current-clamp و به وسیله یک پالس دپلاریزان به مدت ۵۰۰ ms و قدرت ۰/۱ - ۰/۶ A و ۰/۳ Hz SRF بررسی گردید. درست شبیه فنی‌توین، AFA، پتانسیل‌های عمل AP را در هر پالس تا موقعی که هیچ AP برای باقیمانده پالس باقی نماند، در مسیر وابسته به غلظت کاهش می‌دهد. رابطه‌ای بین کاهش وابسته به مصرف در شدت و V_{max} (velocity of up stroke) پتانسیل عمل وجود دارد. نتایج مشخص می‌کند که AF، SRF را در نوروتهای هیپوکامپ در مسیر وابسته به مصرف و وابسته به ولتاژ شبیه فنی‌توین کاهش می‌دهد. اما برخلاف فنی‌توین که ترجیحاً در زمان غیرفعال بودن کانال پتاسیم اثر می‌کند، این اثرات AF آشکارا در زمانی که کانال در حالت معمولی است ایجاد می‌شود و نشان می‌دهد که اثرات کاهش V_{max} و شدت اولین پتانسیل عمل وابسته به دوز می‌باشد. ما نتیجه گرفتیم که AF دارای اثر ضدصرع می‌باشد.

گل‌واژگان: *Delphinium denudatum*، اثر ضدصرع، هیپوکامپ، SRF (sustained repetitive firing)، پتانسیل فعال AP، AF (Aqueous fraction)

مقدمه

اثر درمانی و اطمینان بخش داروهای در دسترس ضدصرع کامل نیست و ۴۰-۲۵ درصد از بیماران در ضمن استفاده از داروهای ضدصرع رایج دچار تشنج می‌شوند [۱،۲،۳]. داروهای ضدصرع معمولی مثل فنی‌توین (PHT)، کاربامازپین (CBZ)، اسیدوالپروئیک (VPA)، فنوباریتال، بنزودیازپین‌ها و داروهای جدیدتر ضدصرع مثل گاباپنتین، لاموتریجین، اوکاربازپین، رماسماید، تیاگابین، توپیرامیت و ویگابترین همه جزء ترکیبات و همچنین اثرات تراژونیک همراه هستند [۴،۵،۶،۷،۸]. محصولات طبیعی در راه کشف داروهای جدید کمک مهمی کرده‌اند و همچنین شامل مواد جدیدی هستند که برای به‌دست آوردن داروهای جدید با اثر بهتر و عوارض کمتر کمک می‌کنند [۹،۱۰،۱۱].

SRF مربوط به پتانسیل عمل در پاسخ به تحریک دپلاریزه‌کننده یک پاسخ غیرحساس به ولتاژ سیناپس دارد که خاصیت تمامی نرون‌های سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد [۱۲]. جلوگیری از SRF نرون‌ها در یکی از مکانیسم‌های پایه فعالیت داروهای ضدصرع رایج در سطح سلولی است [۱۳،۱۴]. داروهای ضدصرع در درمان صرع ژنرالیزه تونیک کلونیک و تشنج پارسیشیل موثر می‌باشند مثل فنی‌توین، کاربامازپین، اسیدوالپروئیک و همچنین در مواقع تشنج مداوم دیازپام که مسیر وابسته به مصرف و وابسته به ولتاژ را مسدود می‌کنند [۱۵،۱۶،۱۷].

همچنین داروهای جدید ضدصرع فلپامایت، گاباپنتین، لاموتریجین، اگزاکاربازپین، رماسماید و توپیرامیت نیز SRF را در مسیر وابسته به مصرف محدود می‌کنند [۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۲۲،۲۳].

فنی‌توین، کاربامازپین و اسیدوالپروئیک SRF پتانسیل‌های عمل را آشکارا در نتایج درمانی خود کاهش می‌دهند [۱۶]. DZP و بقیه بنزودیازپین‌ها و باربیتورات‌ها SRF را در جنبه‌های درمانی صرع

پایدار کاهش می‌دهد. بلوک SRF در مسیر وابسته به مصرف نشان‌دهنده پایه الکتروفیزیولوژیکال برای جلوگیری از ایجاد صرع در اثر کانون‌های صرع می‌باشد که به‌وسیله اختلال در ارتباط بین نرون‌ها به‌وسیله داروهای ضدصرع درمان می‌شود [۲۴،۲۵،۲۶،۲۷].

D. denudatum گیاهی است که برای درمان صرع در شبه قاره به‌خصوص پاکستان استفاده شده است [۲۸]. در طب سنتی ایران نیز برای بیماری صرع استفاده می‌شود که در ایران به نام جدوار شناخته می‌شود. ما اثرات ضدصرع در محیط *in vivo* به‌وسیله AF جدا شده از گیاهان دارویی را در تست‌های maximal electroshock (MEST) subcutaneous pentylenetetrazole test و subcutaneous bicuculline test و همین‌طور اثر مهارتی آن‌را در SRF نسبت به قبل نشان دادیم [۲۹،۳۰].

در این مقاله ما اثر AF بر SRF نرون‌های هری هیپوکامپ و همین‌طور اثر آن‌را با یک داروی ضدتشنج فنی‌توین بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

۱-۲- تهیه کشت سلول‌های هیپوکامپ

کشت سلول‌های هیپوکامپ از موش Sprague Dawley ۲ روزه به‌وسیله اصلاح روش بانکر (Banker)، به‌طور خلاصه سلول‌های هیپوکامپ از موش‌های ۲ روزه تهیه و به‌وسیله لایه تغذیه‌کننده آستروگلیال رشد داده شدند [۳۱،۳۲]. آستروسیت‌ها از موش‌های ۲ روزه به‌وسیله متد آبنی (Abney's) تهیه شدند [۳۳]. رشد سلول‌های گلیال در محیط کشت در ظرف‌های ۳۵ mM (Costar) به‌وسیله ۱۰ mg/ml پولی ال لیزین (M.W.30-70,000) و هفته‌ای ۲ بار با MEM (Minimal Essential Fetal Medium) و ۱۰ درصد فتال بوین سرم (Fetal

به وسیله اوسیلوسکپ ۷-۱۳۴ (Hitachi) و VCR (at 44 KHz) و دستگاه ضبط کننده دیجیتالی اطلاعات VR-10 ذخیره می‌گردید. اطلاعات بعداً با نرم‌افزار WCP version 1.2 Strathelyde (Dagan Corporation Minneapolis MN) آنالیز و با chart (Astro-med Dash IV, Warwick, RI) recorder بازبینی می‌شد.

تغییرات در کنترل و آزمایش‌ها با تکنیک اصلاح شده 6 or 8 barrel sewer pipe perfusion انجام می‌شد [۳۵]. AF یا فنی‌توین در غلظت پایانی در DMSO در solution recording ۰/۰۵ درصد حل می‌گردید. recording solution در تیوب‌های مخروطی که با تفلون درست قبل از آزمایش پوشیده شده بودند قرار داشت. غلظت بالاتر در اول و در حین به دست آمدن فعالیت استفاده می‌شد. غلظت کم‌کم در حین مطالعه رابطه نسبت اثر به غلظت کاهش پیدا می‌کرد. تغییرات سریع (≈۵۰۰) و کامل solution به وسیله حرکت جانبی تیوب در ارتباط با نوروئهایی که در فاصله در حدود ۷-۵ میکرون تحت مطالعه هستند انجام گرفت. این تکنیک بدون هیچ‌گونه آلودگی یا آرتفکت اجازه پرفوزیون را داد. recording solution به‌طور مداوم از محل با سرعت (۰/۵ ml/min) کشیده شد. سلول‌های هیپوکامپ هرمی با پتانسیل استراحت سلولی بیشتر از ۵۰- میلی‌ولت برای مطالعه انتخاب شدند. ظرفیت pipette و مقاومت دستیابی در حدود ۶۰ درصد جبران شده بود.

۲-۳- محلول‌های آزمایشی

محلول‌های خارج سلولی (recording) عبارت بودند از: ۱۴۵ NaCl، ۲۰۵ KCl، ۱۰ HEPES، ۱۰، ۸ MgCl₂، ۲ CaCl₂ و ۱۰ D-glucose. برای بلوک کردن انتقال سیناپس تحریک کننده و بازدارنده، ۰/۵-۱ کینورنیک اسید و ۵۰ μM بیسوکولین اضافه شد. pH در حد ۷/۲۵ با اضافه کردن ۱M NaOH و

۱۰ mM و ۲ mM ال-گوتامین و Bovin Serum گلوکز به مدت ۲ هفته تغذیه می‌گشتند. بعد از ۴ روز کشت سلول‌های گلیال در معرفی ۵ μM سیستئین آرابینوزید قرار می‌گرفتند تا از پرولیفراسیون بیشتر جلوگیری شود. یک روز قبل از تکمیل نهایی کشت، تغذیه نوروئها با مکمل N3 که شامل ۲۵ mM HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine- N-2-)، ۲mM ethansulfonic acid بافر (pH ۷/۴) و ۵ μM گوتامین، ۱۰۰ μg/ml ترانسفرین، ۱۰۰ μM پوترسکین، ۳۰ μM سدیم سلنیت، ۲۰ μM پروژسترون، ۱ mM سدیم پیرووات و ۰/۱ درصد اوآل بومین، ۲۰ μg/ml T3 و ۴۰ μg/ml کورتیکواسترون صورت می‌گرفت. سلول‌های هیپوکامپ با دانسیته ۱۰^۵ × ۷/۵ در ظرف قرار داده شدند. کشت در محیط ۳۷ درصد زیر CO₂ ۵ درصد و هوا ۹۵ درصد و تغذیه هفته‌ای ۲ بار نگه داشته شدند. گوتامین، MEN و HEPES بافر از Gaithersburg, MD) تهیه شدند.

محیط کشت ۱۷ - ۱۲ روزه برای مطالعات الکتروفیزیولوژیکال آماده می‌باشد. Whole cell current-clamp recording با الکترو pipette از جنس شیشه نازک بروسیلیکات (WPI, Sarasota, FL) انجام شد [۳۴]. قبل از recording محیط کشت با recording solution عوض شد. الکترودهای شیشه‌ای (مقاومت ۸-۴ MΩ) در دو مرحله با Flaming-Brown P 80 کشنده الکترو متوقف و با pipette solution پوشانده می‌شدند. محیط کشت‌ها به میکروسکپ‌های معکوس (Swift Instruments USA) که با کنترل مکانیکی کنتراست بینایی (Narishige Japan) تجهیز شده بودند، در زیر کنترل مستقیم بینایی کلامپ به سلول‌ها زده شد.

recording با استفاده از تقویت‌کننده Axopatch (Axon Instruments Burligane, CA) 200 تقویت می‌گردید و با فیلتر 4 pole Bessel قبل از دیجیتاله کردن فیلتره می‌شد. تمام اطلاعات با هم

۲-۶- گردآوری گیاهان و آمادگی AF

D. denudatum پس از تهیه در هوا خشکانده شدند و با اتانل ۹۵ درصد به مدت ۶ روز عصاره‌گیری گردید. حلال تحت خلا تبخیر شد و نتیجه بخشی ماده اتانل در آب مقطر با هگزان حل شد. لایه آبی (Aqueous layer) با استفاده از کلروفرم در pH ۷٫۱ و ۱۲ استخراج گردید. باقیمانده AF قابل حل در آب (۴۵۰ g) برای آزمایش‌ها استفاده شد [۲۹].

۲-۷- آمار

نتایج آماری مهم به وسیله t-test دانشجویان با Sigma Plot version 5 ارزیابی شد. P value کمتر از ۰/۰۲ به عنوان مهم تلقی گردید.

نتایج

فنی‌توییین SRF را در مسیر وابسته به مصرف و وابسته به ولتاژ بلوک می‌کند. بررسی current clamp recording از نرون‌های هیپوکامپ نشان‌دهنده اثر وابسته به غلظت فنی‌توییین ($20-40 \mu\text{M}$) می‌باشد که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

اثر فنی‌توییین ($20-40 \mu\text{M}$) بر شدت و پتانسیل‌های عمل بر نرون‌های مشابه در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.

در تمامی سلول‌ها ($n=11$) فنی‌توییین اثر قابل توجهی بر شدت پتانسیل عمل اول نداشته است. فنی‌توییین کاهش وابسته به مصرف در شدت پتانسیل‌های عمل بعدی نشان داده شده است که همچنین همراه با کاهش V_{max} بوده است. شکل شماره ۳ نشان‌دهنده اثر فنی‌توییین ($20-40 \mu\text{M}$) بر V_{max} پتانسیل‌های عمل از همان نرون که در شکل شماره ۲ نشان داده است. فنی‌توییین نمی‌تواند اثر قابل توجهی را در کاهش V_{max} وابسته به غلظت و شدت پتانسیل‌های عمل اول نشان دهد (Ap#1).

بلوک وابسته به ولتاژ SRF به وسیله فنی‌توییین در ۱۰ تا ۱۱ سلول دیده شد. وقتی که سلول‌ها از

اسمولالیتیه در عدد ۳۲۵ mOsm تنظیم شد. محلول داخل سلول (پیتیت) به mM : ۱۴۰ : گلوکونات پتاسیم، 10 mgCl_2 و 10 CaCl_2 HEPES بود. همچنین برای ATP سلولی که شامل ۲ mM Mg-ATP و ۲۰ mM فسفوکراتینین و ۵۰ v/ml کراتی‌نین فسفوکیناز اضافه شد. محلول پیپیت با $0.2 \mu\text{M}$ فیلترهای بسیار ریز (Nalgene) صاف گردید. pH این محلول روی عدد ۷/۲ با KOH و اسمولالیتیه روی عدد ۳۲۵ mOsm تنظیم شد.

۲-۴- مطالعات روی SRF

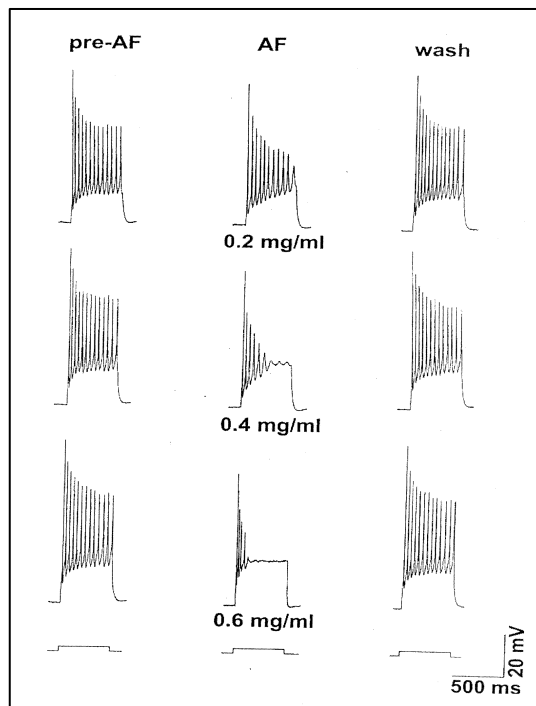
SRF تحت تحریک ۹۵-۵۰ محرک سه مرحله‌ای (MSC, Greenral, NY) و پالس دپلاریزان به مدت ۵۰۰ ms، ۰/۳ HZ و نیروی افزایش یابنده از ۰/۱-۰/۶ nA از طریق میکرو پیپیت می‌باشد. مدت و فرکانس پالس دپلاریزان برای همه آزمایش‌ها ثابت می‌ماند. نیروی در جریان به تدریج تا موقعی که سلول تحت مطالعه توسط پالس دپلاریزان پتانسیل‌های فعال مناسبی را نشان دهد، افزایش می‌یابد.

همه اطلاعات آنالیز می‌شود. نتایج در مورد تغییرات در V_{max} (velocity of Upstroke of the AP) و شدت هر پتانسیل فعال توضیح داده شده، ارزش V_{max} به سدیم درونی در جریان تولید پتانسیل عمل بستگی دارد. نرون‌های هر می‌هیپوکامپ واکنش‌های متفاوتی را در رابطه با SRF نسبت به پالس‌های ms ۵۰۰ پتانسیل‌های عمل گوناگون می‌دهند. نرون‌هایی که از نواحی مختلف هیپوکامپ می‌باشند واکنش‌های گوناگونی را نسبت به پالس‌های دپلاریزان می‌دهند. سلول‌های همگی توسط پتانسیل عمل با پالس ms ۵۰۰ که برای این مطالعه انتخاب شده است تحریک می‌شوند. در تمام آزمایش‌ها SRF ارزش V_{max} کنترل کمتر از ۱۶۰ V/S بود.

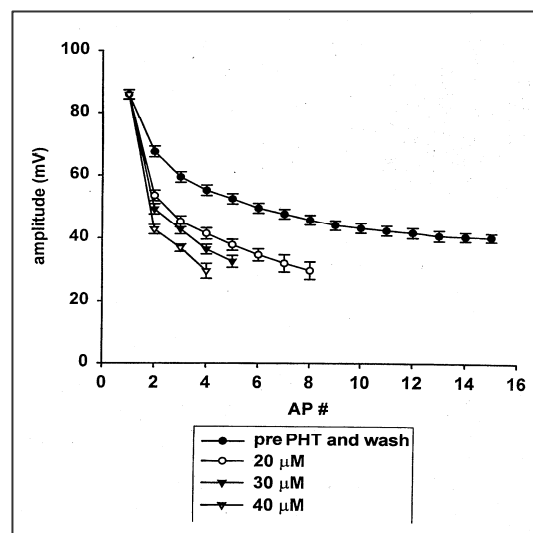
۲-۵- شیمیایی

تمام مواد شیمیایی از شرکت Sigma (St. Louis MI) Chemical Co، مگر موارد مشخص شده تهیه شد.

۶۵- mv به ۷۵- mv هیپرپولاریزه می شدند محدودیت SRF به خاطر افزایش پتانسیل های عمل در هر پالس



شکل شماره ۱- ممدودیت SRF concentration - dependent به وسیله فنی توپین. Current clamp recording از غلظت متفاوت فنی توپین. پتانسیل های فعال به وسیله پالس دپلاریزان 0.4nA تمریک شدند. پتانسیل غشای نرونی (Em) ۵۷- mv بود. کاهش در پتانسیل های عمل مثل آمپلیتود به غلظت فنی توپین و کاهش V_{max} ارتباط داشت. IS=Washout Period.



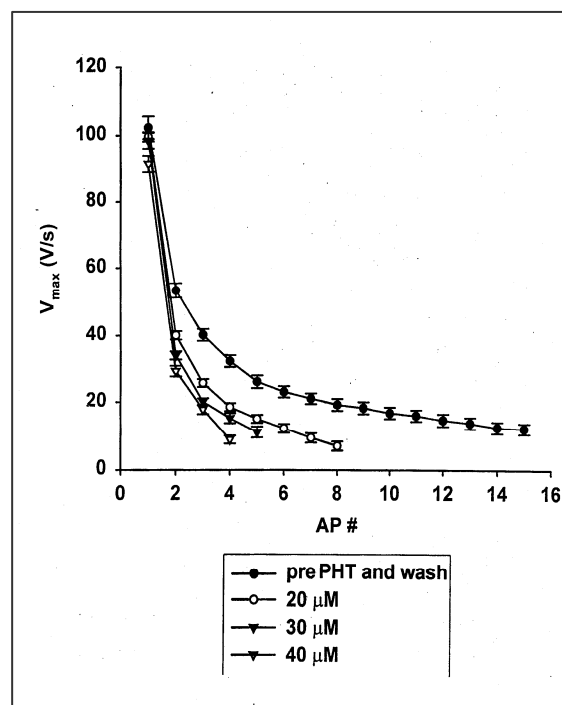
شکل شماره ۲- اثر فنی توپین به آمپلیتود پتانسیل های عمل در مین SRF. نتایج نشان دهنده این مطلب می باشد که S.E.A ± ۵۰. Identical records در هر غلظت فنی توپین (۲۰، ۳۰، ۴۰ μM) به دست آمد و کنترل همین نروون در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. فنی توپین هیچ اثری بر آمپلیتود AP#1 ندارد.

AF در غلظت 0.6 mg/ml هیچ اثر قابل ملاحظه‌ای بر پتانسیل استراحت غشا ($3.9 \pm 6.8 \text{ mv}$) کنترل (n=11) است. Current clamp recording اثر وابسته به غلظت AF را ($0.2-0.6 \text{ mg/ml}$) بر تعداد و شدت پتانسیل‌های عمل به وجود آمده در حین پالس را نشان می‌دهد (شکل شماره ۵). در غلظت 0.2 mg/ml شدت پتانسیل عمل به طور پیشرفت‌کننده‌ای شروع به کاهش می‌کند. این اثر همچنین در اثر افزایش قدرت دپلاریزان پالس از $0.4-0.2 \text{ nA}$ که با current clamp recording سلول‌های دیگر هیپوکامپ نشان داده شده است وجود دارد (شکل شماره ۷).

کاهش پیدا می‌کرد و معکوس می‌شد. دپلاریزه شدن پتانسیل غشا از 53 mv به -48 mv تعداد پتانسیل‌های عمل در هر پالس کاهش می‌دهد و بازتوانی اثر SRF را بر مقدار پتانسیل‌های غشا آهسته می‌کند. فنی‌تویین ($5 \mu\text{M}$) هیچ اثری بر پتانسیل استراحت غشا ندارد ($0.2 \pm 0.6 \text{ mV}$) در مقابل ارزش کنترل ($0.6 \pm 0.4 \text{ mV}$ (N=8)).

۳-۲ اثر AF (Aqueous fraction) بر SRF

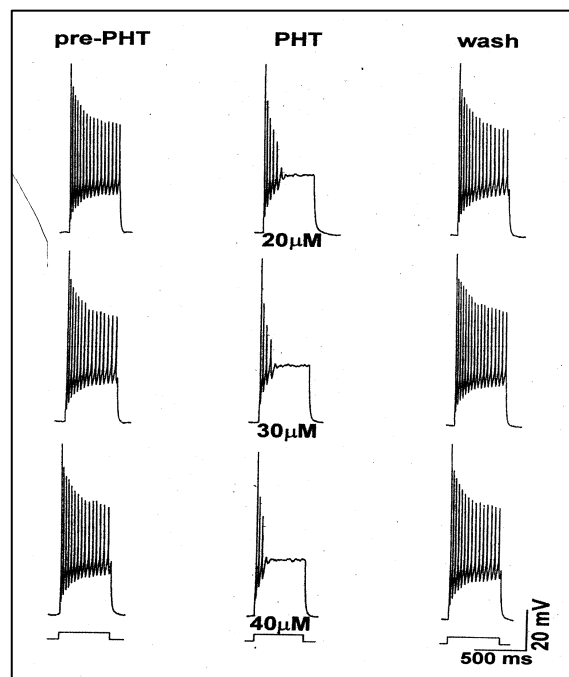
نتایج مطالعات بر اثر AF ($0.2-0.6 \text{ mg/ml}$) بر SRF در نرون‌های هرمی هیپوکامپ در شکل شماره ۴ و ۵ و ۶ و ۷ نشان داده شده است.



شکل شماره ۳- اثر concentration-dependent فنی‌تویین بر V_{max} در مین SRF

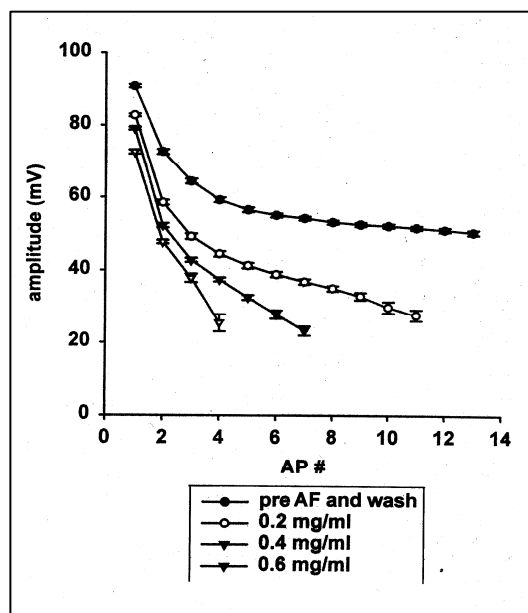
نتایج نشان‌دهنده این مطلب است که $50 \pm \text{SEM}$ از گزارش یکسان پتانسیل‌های عمل در همان نرون به دست می‌آید. ۱ و ۲. محدودیت V_{max} use dependent به وسیله فنی‌تویین در موازات کاهش شدید V_{max} تا موقعی تولید پتانسیل عمل کاهش یابد، می‌باشد. کاهش در شدت جریان و پتانسیل‌های فعال (شکل شماره ۲) به نسبت کاهش V_{max} فنی‌تویین اثر مختصری بر V_{max} پتانسیل عمل #۱ می‌گذارد. در مملول‌های کنترل (pre-PHT, wash) کاهش سریع V_{max} بعد از پتانسیل فعال به علت دپلاریزاسیون می‌باشد.





شکل شماره ۴- محدودیت SRF concentration - dependent به وسیله AF

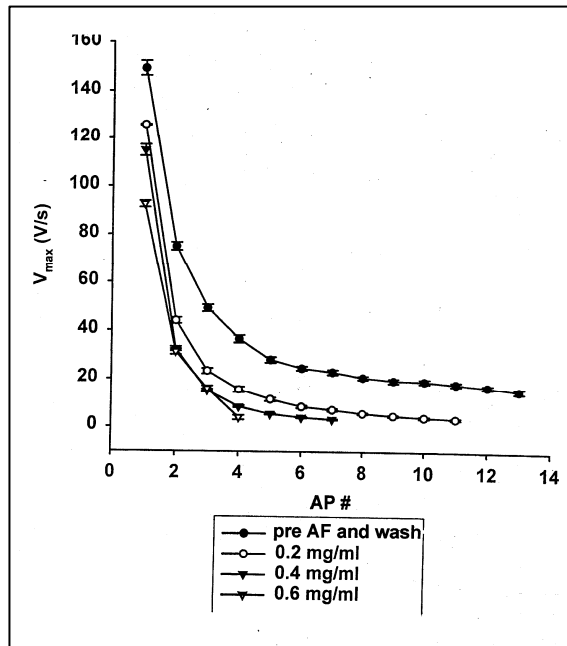
Current clamp recording از یک سلول هیپوکامپ محدودیت SRF در غلظت‌های متفاوت AF را نشان داد. SRF به وسیله یک پالس دپلاریزان ۰/۵ nA یک سلول نرونی ایجاد شد. پتانسیل‌های نرون ذکر شده را در -61 mV در مین recording نگاه داشته شده بود.



شکل شماره ۵- اثر AF بر آمپلیتود پتانسیل‌های عمل در مین SRF.

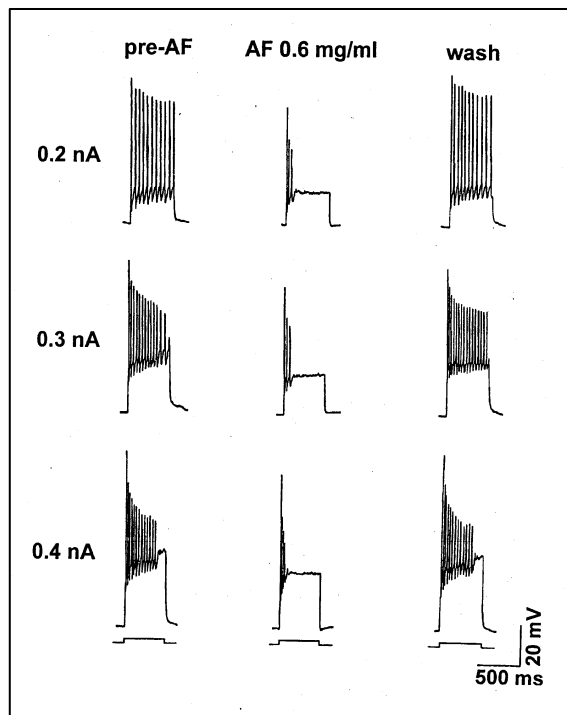
نتایج نشان دهنده این مطلب می‌باشد که $70 \pm$ S.E.M. از ۷۰ گزارش یکسان در هر غلظتی از AF به دست آمده و کنترل (pre AF and wash) از همان نرون در شکل شماره 1B نشان داده شده است. کاهش قابل ملاحظه‌ای در آمپلیتود پتانسیل‌های فعال تا موقعی که هیچ پتانسیل عملی تا باقیمانده پالس باقی نماند به وجود آمد. AF همچنین آمپلیتود AP#1 در مسیر وابسته به غلظت کاهش می‌دهد.





شکل شماره ۶- اثر AF وابسته به غلظت بر V_{max} در مین SRF.

نتایج نشان دهنده \pm ISEM از ۵۳ گزارش پتانسیل‌های عمل از همان سلول نورو هیپوکامپ نشان داده شده است. در مملول کنترل پالتی دپلاریزان ۵۰۰ ms و ۰/۵ nA، ۱۳ پتانسیل عمل با کاهش V_{max} به علت کاهش دپلاریزاسیون ایجاد شده‌اند. AF (۰/۶-۰/۴ mg/ml) شدیداً V_{max} را تا موقعی که پتانسیل عمل ایجاد نشد کاهش پیدا کرد.



شکل شماره ۷- اثر غیرفعال‌کنندگی AF (۰/۴ mg/ml) بر SRF در سلول‌های هرمی هیپوکامپ تعداد پتانسیل‌های عمل با

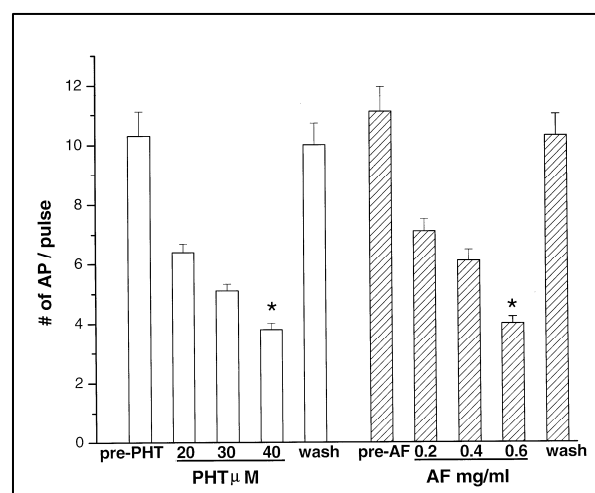
پالس‌های مداوم دپلاریزان (۰/۳ و ۰/۲ nA) و در نهایت در ۵۰۰ ms در ۰/۴ nA متوقف می‌شود. AF (۰/۴ mg/ml) بلوک بسیار قوی بر SRF در تمامی قدرت‌های بالا ایجاد می‌کند ($E_m = -57$ mV).

کمتر از مقدار کنترل می‌باشد. به علت سقوط تیز V_{max} تنها ۴-۲ اسپایک به دست می‌آید و تولید پتانسیل‌های عمل برای بقیه پالس انجام نمی‌شود (در مثال عکس ۶). در تمام مطالعات سلولی V_{max} پتانسیل $\neq 1$ در حدود ۷۸-۸۵ درصد از مقدار کنترل مشاهده می‌شوند. در غلظت 0.2 mg/ml که کاهش وابسته به دوز را نشان داد V_{max} پتانسیل عمل $\neq 1$ در غلظت 0.4 mg/ml ، ۷۴-۶۷ درصد و در غلظت 0.6 mg/ml AF ۶۳-۵۸ درصد کاهش پیدا می‌کند. مشاهده شد که در هر غلظت از AF سلول‌ها تقریباً پتانسیل‌های فعال صادر می‌کنند. در مطالعات سلولی برای SRF، کاهش تعداد پتانسیل‌های فعال در هر پالس به وسیله AF وابسته به دوز شناخته شد و به طور مهم در غلظت 0.6 mg/ml بسیار کاهش پیدا می‌کند. این با عمل $40 \mu\text{M}$ فنی‌توبین قابل قیاس است (شکل شماره ۸).

محدودیت وابسته به ولتاژ SRF به وسیله AF در غلظت 0.6 mg/ml در ۱۱ تا ۱۳ سلول مشاهده شد. هیپوپلاریزه شدن سلول در پتانسیل غشایی 75 mV تا 85 mV در نتیجه ایجاد مجدد SRF و افزایش تعداد پتانسیل‌های فعال در هر پالس می‌باشد. دپلاریزه شدن تا 48 mV SRF را به وسیله AF

شدت پتانسیل عمل $\neq 1$ به طور اندکی کمتر از مقدار کنترل در غلظت 0.2 mg/ml است و کاهش وابسته به غلظت را نشان می‌دهد (شکل شماره ۵). در تمام مطالعات سلول‌ها، AF در غلظت 0.6 mg/ml شدت پتانسیل عمل $\neq 1$ را به ۲۰-۱۶ درصد از مقدار کنترل کاهش می‌دهد. به علاوه در اثر کاهش شدت جریان در غلظت 0.6 - 0.4 mg/ml تعداد پتانسیل‌های عمل به آرامی تا نزدیک به ۶۰ درصد کاهش پیدا می‌کند. در غلظت 0.6 mg/ml کاهش بسیار سریع در تعداد و شدت پتانسیل‌های عمل متوالی تا موقعی که تحریک برای بقیه پالس توقف کند. در تمام سلول‌های مورد مطالعه به محض این‌که سلول‌ها با محلول recording آغشته (superfuse) می‌شدند، آمپلیتود به سطح مقادیر پیش از AF (preaqueous fraction) می‌رسید.

ارزش V_{max} در پتانسیل عمل $\neq 1$ اثر کاهش وابسته به دوز شدت پتانسیل‌های فعال را به دنبال دارد (شکل شماره ۳). V_{max} پتانسیل عمل $\neq 2$ به علت دپلاریزه شدن و اسپایک‌هایی که در نواحی بی‌حرکت پایین V_{max} که از غلظت 0.2 - 0.4 mg/dl شروع می‌شود، ناگهان کاهش پیدا می‌کند. در غلظت 0.6 mg/ml اولین اسپایک به طور قابل توجهی



شکل شماره ۸- اثر فنی‌توبین (40 mm) و AF (0.6 mg/ml) بر تعداد پتانسیل‌های فعال در 500 ms از پالسی پلاریزان در مین SRF نتایج نشان‌دهنده $\pm \text{SEM}$ و ارزش‌های به دست آمده از همه نرون‌های ضبط شده برای فنی‌توبین ($N=11$) و AF ($N=19$). اثر قابل ملاحظه ($p < 0.001$) در تعداد پتانسیل‌های فعال به وسیله AF و فنی‌توبین وجود دارد.



در بلوک وابسته پتانسیل عمل اولیه (AP#1) تحت تاثیر داروهای ضدصرع مانند فنی توئین، کاربامازپین، اسیدوالپروئیک چون کانال سدیم در مرحله استراحت از پتانسیل منفی غشا هستند [۴۴، ۴۳، ۴۲، ۱۶]. نتایج ما نشان داد که ارزش V_{max} اولین پتانسیل عمل $63 - 58$ درصد از مقدار کنترل کاهش در غلظت 0.1 mg/ml از AF کاهش پیدا می‌کند و این را مطرح می‌نماید که وجود AF با مرحله غیرفعال کانال سرم و با مرحله استراحت سدیم همکاری می‌کند. بنابراین اثرات AF بر شدت پتانسیل فعال اولیه با اثرات فنی توئین فرق می‌نماید و اثرات بسیار مهمی بر V_{max} و شدت پتانسیل عمل دارند.

اثرات AF بر بلوک وابسته به ولتاژ SRF شامل اثرات داروهای در دسترس مثل فنی توئین، کاربامازپین، اسیدوالپروئیک می‌باشد و نشان‌دهنده این است که AF ترجیحاً با کانال ولتاژی سدیم عمل می‌کند که در خلال دپلاریزه کردن آن‌را به حالت غیرفعال می‌برد [۴۵، ۴۴، ۴۳]. ترکیباتی که در AF وجود دارند به نظر می‌رسد که SRF را از نظر پتانسیل غشایی نرونی بلوک می‌کنند. بنابراین شبیه فنی توئین AF می‌تواند تحریک نرونی را به وسیله افزایش غیرفعال کانال سدیم در محیط دپلاریزه کانون صرع‌زا کاهش دهد.

داروهای ضدصرع که SRF را محدود می‌کنند اثر جلوگیری‌کننده قوی در ارتباط با پخش شدن تونیک در MEST نیز دارند [۴۶]. این امر به توانایی داروهای ضدصرع برای جلوگیری از پخش شدن تخلیه صرع در حین حمله صرع ارتباط دارد. AF نشان داده شده است که یک اثر ضدصرعی بسیار قوی در SRF دارد و ما اخیراً فهمیده‌ایم که اثر جلوگیری‌کننده قوی در ارتباط با پخش شدن تونیک در MEST ناشی از AF نشان‌دهنده این است که مواد موجود در AF اثر ضدصرعی قوی دارند که منجر به کشف داروهای جدید در این دسته خواهد شد [۴۷].

کاهش تعداد پتانسیل‌های فعال در هر پالس بلوک می‌کند و همچنین به خاطر کاهش سرعت بازیافتن SRF به وسیله AF بلوک می‌شود.

بحث

نتیجه مطالعات اخیر اثبات نمود که AF در بلوک وابسته به ولتاژ SRF در سلول‌های عصبی هیپوکامپ در محیط کشت روش موثرتری می‌باشد. این فعالیت در SRF شبیه اثر مشخص شده فنی توئین در اثر بلوک SRF است. بنابراین فعالیت ضدصرعی فنی توئین نشان داده شده که در سطح سلولی درست‌مشابه آن عمل می‌کند. از آنجایی که بلوک وابسته به مصرف و وابسته به ولتاژ SRF از مکانیسم‌های شناخته شده داروهای ضدصرعی می‌باشد، این نتایج نشان داد که AF هم درست مثل آنها همان مکانیسم را دارد.

بلوک وابسته به مصرف SRF نشان می‌دهد که ترکیبات نظیر بی‌حس‌کننده‌های موضعی، فنی توئین و کاربامازپین ترجیحاً به مرحله غیرفعال کانال سرم باند می‌شوند [۳۷]. به علاوه مطالعات گیرنده‌های سلولی نشان داد که اثرات فنی توئین با جلوگیری از تراوش سدیم و کاهش وابستگی ولتاژ ظاهر می‌شود [۳۸]. فرضیه گیرنده تعدیل‌کننده (modulator receptor) پیشنهاد می‌دهد که ترکیبات در مراحل متفاوت گیرنده (استراحت، فعالیت یا غیرفعالیت) کانال سدیم با تمایل متفاوت باند می‌شوند [۳۹]. داروهای ضدصرع ترجیحاً در مرحله غیرفعال بودن کانال سدیم تاثیر می‌گذارند و بعد به تدریج V_{max} و شدت پتانسیل‌های عمل را به وسیله کم کردن بازیابی از غیرفعال بود تا موقعی که هیچ پتانسیل فعالی از مدت باقیمانده پالس دپولاریزان باقی نمانده باشد، کاهش می‌دهند [۴۰، ۴۱]. ما چند نمونه از بلوک V_{max} و شدت را توسط AF مشاهده کردیم.

تشکر و قدردانی

۱. Friends Education and Medical Trust به خاطر کمک مالی به رضا حیدری
۲. انستیتو ملی بیماری‌های نورولوژی و سکتی به

خاطر کمک مالی

۳. دکتر عطاالرحمان و اقبال چوهدری برای کمک به تهیه AF
۴. دکتر علیرضا مجتهدی به خاطر ترجمه فارسی مقاله

منابع

1. Elger CE. Pharmacoresistance: modern concept and basic data derived from human brain tissue. *Epilepsia* 2003; 44: 9-15.
2. Heinemann U, Draguhn A, Ficker E, Stabel J, Zhang CL. Strategies for the development of drugs for pharmacoresistant epilepsies. *Epilepsia* 1994; 35: S10-21.
3. White HS. Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions. *Epilepsia* 2003; 44: 2-8.
4. Devinsky O. Cognitive and behavioural effects of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 1995; 36: S46-S65.
5. Holmes GL. Critical issues in the treatment of epilepsy. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1993; 50: 85-116.
6. Mattson RH. Efficacy and adverse effects of established and new antiepileptic drugs. *Epilepsia* 1995; 36: S13-S26.
7. Samren EB, van Duijn CM, Christiaens GC, Hofman A, Lindhout D. Antiepileptic drug regimens and major congenital abnormalities in the offspring. *Ann. Neurol.* 1997; 46: 739-746.
8. Smith MC, Bleck TP. Convulsive disorders: toxicity of anticonvulsants. *Clin. Neuropharmacol.* 1991; 14: 97-115.
9. Farnsworth NR. Ethnopharmacology and drug development. In: *Ethnobotany and the search for new drugs*. Ciba Foundation Symposium 185, John Wiley & Sons, Chichester. 1994, pp: 42-59.
10. Newman DJ, Cragg GM, KM Snader. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 2000; 17: 215-34.
11. Tulip M, Bohlin L. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery ? *Trends. Pharmacol. Sci.* 2002; 23: 225-31.
12. Macdonald RL, McLean MJ, Skerritt JH. Anticonvulsant drug mechanisms of action. *Fed. Proc.* 1985; 10: 2634-9.
13. Macdonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drugs mechanisms of action. *Epilepsia* 1995; 36: S2-S12.
14. Rho J, Sanker R. The pharmacologic basis of antiepileptic drug action. *Epilepsia* 1999; 40: 1471-83.
15. DeLorenzo RJ. Mechanisms of actions of anticonvulsant drugs. *Epilepsia* 1988; 29: S35-S47.
16. Macdonald RL. Antiepileptic drug actions. *Epilepsia* 1989; 30: S19-S28.
17. White HS. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. *Epilepsia* 1999; 40: S2-S10.
18. White HS, Wolf HH, Swinyard EA, Skeen GA, Sofia RD. A neuropharmacological evaluation of felbamate as a novel anticonvulsant. *Epilepsia* 1992; 33: 564-72.
19. Wamil AW, McLean MJ. Limitation by gabapentin of high frequency action potential firing by mouse central neurons in culture. *Epilepsy Res.* 1994; 17: 1-11.
20. Cheung H, Kamp D, Harris E. An in vitro investigation of the action of lamotrigine on neuronal voltage-activated sodium channels. *Epilepsy Res.* 1992; 13: 107-12.

21. Wamil AW, Schmutz M, Portet C, Feldmann KF, McLean MJ. Effects of oxcarbazepine and 10-hydroxycarbazepine on action potential firing and generalized seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 271: 301-8.
22. Wamil AW, Cheung H, Harris EW, McLean MJ. Remacemide HCl and its metabolite FPL 12495AA limit action potential firing frequency and block NMDA responses of mouse spinal cord neurons in cell cultures. *Epilepsy Res.* 1996; 23: 1-14.
23. DeLorenzo RJ, Sombati S, Coulter DA. Effects of topiramate on sustained repetitive firing and spontaneous recurrent seizure discharges in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 2000; 41: S40-4.
24. McLean MJ, Macdonald RL. Benzodiazepines but not beta carbolines limit high frequency repetitive firing of action potentials of spinal cord neurons in cell culture. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1988; 244: 789-95.
25. Skerit JH, Rock DM, McLean MJ, Macdonald RL. Concentration-dependent effects of benzodiazepines on GABA responses and sustained high frequency repetitive firing in mouse cultured neurons. *Soc. Neurosci. Abs.* 1984; 10: 643.
26. Skerit JH, Werz MA, McLean MJ, Macdonald RL. Diazepam and its anomalous p-chloro-derivative Ro 5-4864: comparative effects on mouse neurons in cell culture. *Brain. Res.* 1984; 310: 99-105.
27. McLean MJ, Macdonald RL. Limitation of high frequency repetitive firing of cultured mouse neurons by anticonvulsant drugs. *Neurology* 1984; 34: 288.
28. Said HM. *Hamdard pharmacopoeia of eastern medicine*. Hamdard National Foundation. Times Press Karachi. Pakistan. 1970, pp: 560.
29. Raza M, Shaheen F, Choudhary MI, Sombati S, Rafiq A, Suria A, Atta-ur-Rahman, DeLorenzo RJ. Anticonvulsant activities of ethanolic extract and aqueous fraction isolated from *Delphinium denudatum*. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 78: 73-8.
30. Raza M, Sombati S, Shaheen F, Choudhary MI, DeLorenzo RJ. Anticonvulsant effects in vivo and inhibition of sustained repetitive firing in vitro by an aqueous fraction isolated from *Delphinium denudatum*. *Soc. Neurosci. Abs.* 1997; 23: 840.
31. Banker GA, Cowan WM. Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell cultures. *J. Comp. Neurol.* 1977; 187: 469-94.
32. Sombati S, DeLorenzo RJ. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture. *J. Neurophysiol.* 1995; 73: 1706-11.
33. Abney ER, Bartlett PB, Raff MC. Astrocytes, ependymal cells and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cultures of embryonic rat brain. *Dev. Biol.* 1981; 83: 301-10.
34. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers. Arch.* 1981; 391: 85-100.
35. Gibbs III JW, Berkow G, Coulter DA. GABA_A receptor function in developing rat thalamic neurons: Whole cell recordings of GABA-mediated currents and modulation by benzodiazepines. *J. Neurophysiol.* 1996; 76: 2568-79.
36. Johnston D, Amaral DG. Hippocampus. In: Shepherd GM (Ed.). *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press. New York. 1998, pp: 417-58.
37. Courtney KR. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1975; 195: 225-36.



38. Francis J, Burnham M. [³H] Phenytoin identifies a novel anticonvulsant-binding domain on voltage-dependent sodium channels. *Mol. Pharmacol.* 1992; 42: 1097-103.
39. Hille B. Mechanisms of block. In: *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. 1992, pp: 390-442.
40. Catterall WA. Molecular properties of brain sodium channels: An important target for anticonvulsant drugs. In: Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ (Eds). *Jasper's Basic mechanisms of epilepsy, Advances in Neurology*. Vol, 79. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. 1999, pp: 441-56.
41. Courtney KR, Etter EF. Modulated anticonvulsant block of sodium channels in nerve and muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1983; 88: 1-9.
42. McLean MJ, Macdonald RL. Multiple actions of phenytoin on mouse spinal cord neurons in cell culture. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1983; 227:779-89.
43. McLean MJ, Macdonald RL. Sodium valproate but not ethosuximide produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1986; 237: 1001-11.
44. McLean MJ, Macdonald RL. Carbamazepine and 10 11-epoxycarbamazepine produce use- and voltage dependent limitation of rapidly firing action potentials of mouse central neurons in culture. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1986; 238: 727-32.
45. Macdonald RL, McLean MJ. Anticonvulsant drugs: mechanisms of action. In: Delgado-Escueta AV, Ward Jr AA, Woodbury DM, Porter RJ(Eds.). *Basic Mechanisms of the Epilepsies: Molecular and Cellular Approaches, Advances in Neurology*. Vol 44. Raven Press. New York. 1986, pp: 713-36.
46. Meldrum BS. Update on the mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 1996; 37: S4-S11.
47. Raza M, Sombati S, Shaheen F, Choudhary MI, Suria A, Atta-ur-Rahman, DeLorenzo RJ. Anticonvulsant action of FS-1 sub-fraction isolated from Delphinium denudatum. *Phytother. Res.* 2001; 15: 426-30.



