جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ٢٤، شمارهٔ ٢ صفحهٔ ٢٣٦-٢٢٥ (١٣٨٧)

اثر سلولی عصاره برگ ترخون (*Artemisia dracunculus* L.) بر فعالیت صرعی القاء شده توسط پنتیلن تترازول در نورونهای حلزون

سحر فرج‌نیا[1]، مهیار جان احمدی*[1]، حبیب عباسی‌پور[2]، جعفر وطن‌پرست[3] و محمد کمالی‌نژاد[4]

١- استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
٢- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد
٣- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز
٤- مربی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mjanahmadi@yahoo.com و Janahmadi@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: اسفند ١٣٨٦ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ١٣٨٧ تاریخ پذیرش: تیر ١٣٨٧

چکیده

ترخون (*Artemisia dracunculus*)، گیاه چند ساله‌ای از خانواده Asteraceae است که به دلیل بوی خوش برگهایش به‌عنوان چاشنی غذا استفاده می‌شود. در طب ایران باستان، بخشهای هوایی خشک شده این گیاه به‌صورت خوراکی برای درمان صرع بکار می‌رفته است. صرع یکی از رایج‌ترین بیماریهای نورولوژیک است. در مطالعه حاضر، با استفاده از ثبت داخل سلولی اثر عصاره الکلی ترخون و مکانیسم سلولی احتمالی اثر آن بر ضد فعالیت صرع‌زایی پنتیلن تترازول (PTZ) ارزیابی شده است. در حضور عصاره گیاه ترخون (٠/١٪)، افزایش فعالیت الکتریکی انفجاری (burst) ناشی از پنتیلن تترازول از بین رفت. پتانسیل غشاء سلول به میزان ٨/ ٦٧ درصد نسبت به گروه کنترل دپلاریزه‌تر شد. همچنین، فرکانس شلیک پتانسیل عمل به‌ترتیب به میزان٦٢/٥ درصد و ٨٣/٨ درصد نسبت به گروه کنترل و در حضور PTZ کاهش یافت. دامنه پتانسیل هیپرپلاریزاسیون متعاقب نیز نسبت به شرایط کنترل ٣٦٪ کاهش یافت، ولیکن در مقایسه با PTZ تغییر چندانی نداشت. ازطرف دیگر، کاربرد عصاره به تنهایی، موجب بروز دپلاریزاسیون پتانسیل غشاء سلول به میزان ١٦/٦٩ درصد شد. درحالیکه فرکانس شلیک پتانسیل عمل کاهش یافت و به ٧٧/٣ درصد کنترل رسید و دامنه پتانسیل عمل و AHP تغییر معنی‌داری نداشت. الگوی فعالیت الکتریکی سلول از حالت تونیک منظم در حالت کنترل به فرم نامنظم تغییر یافت. همچنین، کاربرد عصاره قبل از PTZ نتوانست به‌طور کامل از بروز اثرهای صرع‌زایی ناشی از آن جلوگیری نماید. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که احتمالاً عصاره ترخون از طریق دپلاریزاسیون پتانسیل غشاء باعث کاهش تحریک‌پذیری سلولهای عصبی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره ترخون، صرع، پنتیلن تترازول، ثبت داخل سلولی، *Artemisia dracunculus* L.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

صرع از شایع‌ترین بیماریهای عصبی است که حدود ۱-۰/۵ درصد از جمعیت جهان به آن مبتلا هستند (Jozwiak, 2007). به‌رغم شیوع بالا و نیز سابقه دیرین این بیماری، هنوز درمانی اساسی برای آن کشف نشده و تنها راه درمانی که در حال حاضر وجود دارد، کنترل و مهار تشنجات صرعی است.

پزشکان ایرانی در قرون وسطی، اطلاعات بالینی کاملی در مورد صرع ارائه کرده‌اند و معمول‌ترین روش درمانی آنها، استفاده از گیاهان دارویی بود (Gorji & Khaleghi, 2001). با مطالعاتی که بر روی برخی از داروهای گیاهی مورد استفاده در طب سنتی ایران و دیگر کشورها صورت گرفته تا حدودی مکانیسم ضد صرعی آنها مشخص شده است. در طب سنتی ایران، ترخون برای درمان برخی بیماریها از جمله صرع مورد استفاده قرار می‌گرفته است (عقیلی علوی خراسانی، ۱۳۷۰). امروزه تحقیقاتی در مورد اثرهای ضد صرعی این گیاه صورت گرفته است، به عنوان مثال نشان داده شده است که بخشهای هوایی خشک شده گیاه ترخون، به صورت خوراکی به‌عنوان پاک کننده خون عمل می‌نماید و برای درمان سردرد، سرگیجه (Yazdanparast & Saee, 1999) و صرع (Sayyah *et al.*, 2004) نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

ترخون یک گیاه بوته‌ای از خانواده Asteraceae می‌باشد که به دلیل داشتن برگهای خوشبو به‌عنوان چاشنی در سالاد و نیز در تهیه سرکه ترخون بکار می‌رود (Sayyah *et al.*, 2004). در گذشته، این گیاه برای افزایش اشتها بکار می‌رفته است (Ribnicky *et al.*, 2004). ترخون دارای اثرهای حشره‌کشی (Turner, 1979؛ Saadali *et al.*, 2001) و پاکسازی رادیکالهای آزاد (Parejo *et al.*, 2002) می‌باشد. اسانس ترخون دارای اثرهای ضد قارچی و ضد توموری است (Meepagala *et al.*, 2002). عصاره ترخون به‌عنوان عاملی برای درمان هیپرگلایسمی ناشی از دیابت نیز استفاده می‌شود (Ribnicky *et al.*, 2006). به‌علاوه، دارای اثرهای ضد انعقادی و ضد هیپرلیپیدمی است (Yazdanparast & Saee, 1999).

در مطالعات انجام شده روی عصاره ترخون، غیر سمّی بودن آن به اثبات رسیده (Ribnicky *et al.*, 2004) و مشخص شده که عصاره این گیاه محتوی استراگول، متیل اوژنول و بنزودیازپین‌ها (Ribnicky *et al.*, 2004) می‌باشد. در واقع، بنزودیازپین‌ها با اتصال به گیرنده‌های $GABA_A$ موجب ایجاد اثرهای ضد اضطراب، خواب‌آور، آرام‌بخش و ضد صرع می‌شوند (Kavvadias *et al.*, 2000). همچنین، امروزه مشخص شده که استراگول دارای فعالیت ضد تشنجی و خواب‌آوری است (Leal-cardoso *et al.*, 2004). متیل اوژنول نیز از دسته مونوترپنها می‌باشد که اثرهای ضد تشنجی آنها ثابت شده است (Sayyah *et al.*, 2004). در ضمن، در مطالعه‌ای بر روی موش، اسانس ترخون دارای اثرهای ضد تشنجی (Sayyah *et al.*, 2004) وابسته به زمان و میزان در مدلهای صرعی Maximal electroshock (MES) و Pentylenetetrazole (PTZ) گزارش شده است. اما مکانیسم سلولی اثر این گیاه هنوز مشخص نشده است. با توجه به این موارد، هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرهای احتمالی ضد صرعی و حفاظتی عصاره ترخون بر فعالیت الکتریکی صرعی القاء شده توسط PTZ در سلولهای عصبی حلزون باغی (*Helix aspersa*) بود. از آنجا که مطالعات پیشین نشان داده‌اند عصاره ترخون حاوی ترکیبهای بنزودیازپینی است و نقش بنزودیازپینها در مهار فعالیتهای صرعی نیز به‌خوبی روشن است، بنابراین در

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

این تحقیق به‌منظور بررسی اثرهای عصاره گیاه ترخون در سطح غشاء سلول از تکنیک ثبت داخل سلولی و کلمپ جریان استفاده شد. در این تکنیک با ثبت فعالیت الکتریکی سلول و نیز توانمندی عمل، مکانیسم اثر عصاره بر تحریک‌پذیری سلول مورد بررسی قرار گرفت. به‌طوری که تغییر شکل و ویژگیهای پتانسیل عمل و نیز الگوی شلیک سلول بیانگر اثر عصاره گیاه ترخون بر کانالهای یونی غشاء سلول عصبی است. مطالعه حاضر بر روی سلولهای عصبی حلزون انجام شد. زیرا مطالعه مکانیسمهای سلولی و ملکولی در نورونهای پستانداران اغلب مستلزم مراحلی از آماده‌سازی است که باعث تغییر در سازمان کلی نورونها شده و آسیبهای احتمالی را به‌دنبال دارد. به‌علاوه اندازه بسیار کوچک نورونها و نیاز به تقلید شرایط *in vivo*، انجام ثبت داخل سلولی در آزمایشگاه را مشکل می‌سازد. حلزون و سایر بی‌مهرگان اگر چه در سطح ارگانیسم و اندامها تفاوتهای فاحشی را با مهره‌داران و پستانداران نشان می‌دهند، ولی در سطح سازمان مولکولی تا حد زیادی با آنها مشابه هستند. به‌طوری که کانالهای یونی، مسیرهای انتقال سیگنال و بسیاری ساختارهای اساسی نورونهای مهره‌داران و بی‌مهره‌گان به‌طور شگفت‌آوری شبیه یکدیگرند. نرم‌تنان ضمن داشتن سیستم عصبی ساده، بزرگترین نورونها را در سلسله جانوران دارا بوده و از این جهت برای مطالعه فرایندهای سلولی و مولکولی به‌خصوص در ثبت داخل سلولی از مناسب‌ترین نمونه‌ها به‌شمار می‌آیند. اندازه بزرگ نورونها، شناسایی و ورود الکترود به سلول را تسهیل می‌کند و خونسرد بودن مشکلات نگهداری آنها را در شرایط *in vitro* کاهش می‌دهد. به‌طوری که می‌توان نورونها را برای ساعتها در یک رینگر ساده و در دمای اتاق نگهداری کرد. از طرف دیگر به‌دلیل تشابه ظاهری بین Paroxysmal depolarization shift (PDS) پستانداران که یک دپلاریزاسیون شدید در پتانسیل غشاء است و اثرهای ناشی از PTZ در نورونهای نرم‌تنان (Williamson & Crill, 1976) این ماده به‌عنوان داروی صرع‌زا مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روشها

در کلیه آزمایشها از حلزون باغی *Helix aspersa* به‌عنوان نمونه آزمایشگاهی استفاده شد. حلزونها به‌طور متناوب (حدوداً هر دو ماه) و به‌طور عمده از شهر لاهیجان در استان گیلان جمع‌آوری می‌شدند. نمونه‌ها در شرایط آزمایشگاه نگهداری شده و با هویج تغذیه می‌شدند. آزمایشها بر روی نورونهای حساس به PTZ مجموعه گانگلیونی تحت مری و عمدتاً روی نورونهای F1 و D5 انجام گرفت. بدین منظور صدف حلزون با انبر استخوان شکن قطعه قطعه شده و حلزون بدون صدف به کمک سر سوزن روی قطعه‌ای چوب پنبه ثابت می‌شد. با ایجاد شکافی طولی در ناحیه گردن جانور، حلقه گانگلیونی دور مری به همراه عروق و اعصاب محیطی از بدن خارج شده و با سوزن حشره در محفظه ثبت با بستر سیلگارد و حاوی رینگر نرمال حلزون تثبیت می‌گردید. محلول رینگر نرمال حلزون (برحسب میلی‌مولار) شامل: $MgSO_4$ (5)؛ KCl (4)؛ $CaCl_2$ (10)؛ NaCl (80)؛ Glucose (10) و HEPES (5) است و pH آن با افزودن TRISMA در حد ۷/٦-۷/٤ تنظیم می‌گردد (Taylor, 1987). نورونها در این مجموعه گانگلیونی به‌وسیله دو لایه بافت پیوندی احاطه شده‌اند. بخش پشتی گانگلیون دارای اعصاب کمتری بوده و با برداشتن لایه‌های پیوندی در این ناحیه (به‌وسیله انبرکهای بسیار ظریف و بدون استفاده از آنزیم پروتئولیتیک) نورونها

آشکار می‌شدند (Janahmadi *et al*., 1999؛ Vatanparast *et al*., 2007).

برای ایجاد مدل صرعی، محلول PTZ (Sigma; USA) با غلظت ۲۵ میلی‌مولار تهیه و در محفظه ثبت سلولی پرفیوز گردید (Sugaya *et al*., 1985 and 1987؛ Onozuka *et al*., 1986).

گیاه ترخون از مزرعه‌ای در شهر ری که مکان کشت سبزیجات است خریداری شد و با نمونه گیاهی واقع در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره (voucher specimen) ۸٦۱ مطابقت داده شد. برای تهیه عصاره الکلی برگ گیاه ترخون، به ۱۰۰ گرم سرشاخه هوایی خشک ترخون ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹٦٪ اضافه و به مدت ٤۸ ساعت در محیط آزمایشگاه نگهداری شد. آنگاه، پس از صاف کردن محتوای بشر، با استفاده از دستگاه Rotary evaporator، الکل تبخیر و عصاره خشک حاصل شد. از هر ۱۰۰ گرم ترخون، ۱۵گرم عصاره خشک و به‌صورت پودر بدست آمد.

در آزمایشگاه ثبت داخل سلولی، عصاره ترخون به‌طور روزانه و با غلظت نهایی ۰/۱٪ در محلول رینگر نرمال تهیه و در محفظه ثبت سلول پرفیوز شد. یرای تهیه این غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره خشک در ۱۰۰ میلی‌لیتر رینگر حل شد. غلظتهای بالاتر از ۰/۱٪ موجب بروز فعالیتهای صرعی در سلولهای عصبی مورد آزمایش شد.

با استفاده از یک آمپلی فایر Axoclamp 2B (آمریکا، Axon Instruments) پتانسیل عملهای خودبخودی در شرایط کنترل و متعاقب تیمارهای مختلف با روش کلامپ جریان ثبت گردید. میکروالکترودهای مورد استفاده از میکروپیپت‌های دیواره نازک از جنس بروسیلیکات (Clark, UK) و با کمک یک میکروالکترود پولر افقی (آمریکا، Stoleting) تهیه شد. الکترودها با محلول KCl سه مولار پر شده و نمونه‌های بدون نشت که مقاومت ۵-۲ MΩ داشتند جهت ثبت مورد استفاده قرار گرفتند. یک سیم نقره که با الکترولیز در محلول سه مولار KCl دارای روکشی از کلرید نقره شده بود داخل میکروالکترود شیشه‌ای قرار گرفت و سپس به پره آمپلی‌فایر وصل شد. در تمام آزمایشات از یک پل آگاری به‌عنوان الکترود مرجع استفاده می‌شد که محلول محفظه ثبت را به پتانسیل صفر (زمین) وصل می‌کرد. داده‌های ثبت شده، توسط یک مبدل آنالوگ-دیجیتال ۱٦ بیتی (استرالیا، AD Instrument) رقمی شده و جهت آنالیز ذخیره می‌گردید. در برخی آزمایشات برای حذف تأثیر احتمالی تغییر پتانسیل استراحت غشاء (Resting membrane potential=RMP) بر فرکانس و ویژگیهای کمّی پتانسیلهای عمل ثبت شده، پتانسیل غشاء با تزریق جریان منفی در حد پتانسیل استراحت ثابت نگهداشته می‌شد.

آزمایشها در دو گروه آزمایشی مجزا انجام گرفت. در گروه اول، پس از ثبت پایه و ثبت در شرایط کنترل، به‌منظور ایجاد مدل صرعی، PTZ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار پرفیوز گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه فعالیت خودبخودی سلول مطالعه شد. سپس، به‌منظور بررسی اثر داروی گیاهی بر صرع القاء شده توسط PTZ، عصاره ترخون به همراه PTZ به محیط خارج سلولی پرفیوز گردید و مجدداً ثبت از فعالیت خودبخودی انجام گرفت. در مرحله شستشو ابتدا داروی گیاهی و سپس PTZ از محیط خارج سلولی حذف شد و سلولها تنها در معرض رینگر نرمال قرار گرفتند. در گروه دوم، پس از ثبت فعالیت سلول در رینگر نرمال، به‌منظور بررسی اثر مستقیم عصاره ترخون بر فعالیتهای الکتریکی سلول و نقش احتمالی آن در پیشگیری از وقوع

فعالیت صرعی، عصاره با غلظت ۰/۱٪، در محفظه ثبت داخل سلولی پرفیوز شد و همانند شرایط کنترل، فعالیت خودبخودی مورد مطالعه قرار گرفت. آنگاه، پس از ۱۵ تا ۲۰ دقیقه PTZ به همراه عصاره، جانشین رینگر محلول قبلی گردید و مجدداً پتانسیل عمل خودبخودی ثبت شد. سپس، در مرحله شستشو ابتدا PTZ و نهایتاً داروی گیاهی از محفظه ثبت داخل سلولی شسته شد.

عوامل کمّی پتانسیل عملهای ثبت شده با کمک نرم‌افزار chart اندازه‌گیری شد. دامنه پتانسیل عمل از پتانسیل استراحت تا قله اسپایک و مدت آن در میانه دامنه، بین بخشهای بالارو و پایین‌روی اسپایک محاسبه گردید. دامنه پتانسیل عمل از سطح پتانسیل استراحت تا قله و مدت آن در میانه دامنه، بین بخشهای بالارو و پایین‌رو اسپایک محاسبه گردید. دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون (After hyperpolarization potential=AHP) نیز از پتانسیل استراحت تا قله AHP تعیین شد (شکل ۱). مقادیر کمّی به‌صورت میانگین± انحراف معیار بیان شده و آزمون مقایسه میانگینها با روش *t*-test و ANOVA یک‌طرفه انجام گردید. اختلافهای با P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

از جسم سلولی ۵۲ نورون حساس به PTZ واقع در گانگلیون پاریتال چپ حلزون در رینگر نرمال، ثبت داخل سلولی به عمل آمد. نورونهای مورد آزمایش دارای میانگین پتانسیل استراحت ۲/۱±٤۷- میلی‌ولت بودند (شکل ۲A) و فعالیت خودبخودی منظم با میانگین فرکانس ۰/۳±۱/۳٦ هرتز بودند (شکل ۲B). میانگین دامنه و مدت پتانسیل عمل در رینگر نرمال به‌ترتیب: ۲/٤۵±٦۹/٦۹ میلی‌ولت و ۰/۳±٦ میلی ثانیه بود. به‌دنبال هر پتانسیل عمل خودبخودی، یک پتانسیل متعاقب هیپرپولاریزاسیون (AHP) دیده می‌شد که دامنه‌ای در حدود ۱/۲±۱۰/٤- میلی‌ولت داشت (شکل ۲C) و الگوی فعالیت سلول به‌صورت تونیک منظم بود (شکل ۳A).

به‌دنبال کاربرد PTZ (۲۵mM) به صورت خارج سلولی، الگوی شلیک پتانسیل عمل پس از ۵ تا ۷ دقیقه به فعالیت انفجاری تغییر یافت و PDS قابل مشاهده بود (شکل ٤B). پس از گذشت ۱۰ دقیقه از کاربرد PTZ، فرکانس شلیک پتانسیل عمل در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌داری حدود ۸۳/۸ درصد افزایش یافت (n=۱۰، نسبت به کنترل P<۰/۰۵؛ ۰/۳±۲/۵ هرتز) و پتانسیل غشاء سلول کمی دپولاریزه شد و از ۲/۱±٤۷- در شرایط کنترل به ٤±٤۳- میلی‌ولت در حضور PTZ رسید (شکل ۲A). میانگین دامنه پتانسیل عمل کاهش (n=۱۰، ٦٤±۳/٦٦/۵۸ میلی‌ولت) و مدت آن درمقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت (n=۱۰، P<۰/۰۵؛ ۳±۱۱ میلی ثانیه). همچنین، دامنه AHP پتانسیل عمل نیز به‌طور معنی‌داری به میزان ٦۰ درصد کاهش یافت (n=۱۰، P<۰/۰۰۱؛ ۰/۵±٤/۱٦- میلی‌ولت) (شکل ۲C).

به‌منظور بررسی اثر عصاره برگ گیاه ترخون بر فعالیت الکتریکی خودبخودی سلول، پس از ایجاد مدل صرعی، محلول رینگر نرمال محتوی PTZ و عصاره ترخون به محیط خارج سلولی پرفیوز شد، که منجر به کاهش فرکانس شلیک پتانسیل عمل به‌ترتیب به میزان ٦۲/۵ درصد و ۸۳/۸ درصد نسبت به گروه کنترل و در حضور PTZ کاهش یافت (n=۱۰، P<۰/۰۵ و P<۰/۰۰۱؛ ۰/۱±۰/۸۵ هرتز) و دپولاریزه‌تر شدن پتانسیل غشاء سلول به میزان ٦۷/۸ درصد نسبت به گروه کنترل شد (n=۱۰، P<۰/۰۰۱؛ ۳/۵۷±۳۱/۸۸- میلی‌ولت) (شکل ۲A و ۲C) و به‌تدریج

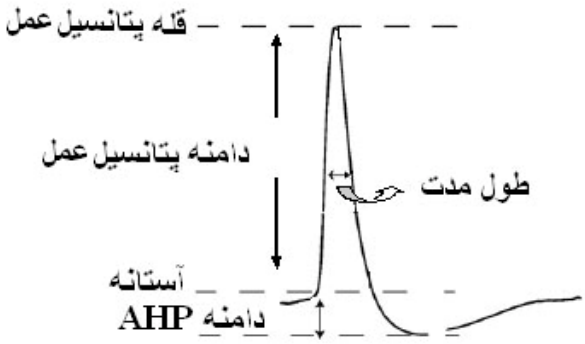
فعالیت انفجاری از بین رفت و سلول خاموش شد (شکل ۳C). حتی با تزریق مداوم جریان منفی به سلول و رساندن پتانسیل غشاء به حد پتانسیل استراحت ثبت شده در شرایط کنترل، سلول همچنان خاموش ماند. به عبارت دیگر، توقف فعالیت الکتریکی سلول ناشی از تغییر پتانسیل غشاء نبوده است. دامنه AHP نیز نسبت به شرایط کنترل ۳۶٪ کاهش یافت، لاکن نسبت به پس از افزودن PTZ تغییر چندانی نداشت (شکل ۲C).

به‌منظور بررسی برگشت‌پذیری اثر عصاره ترخون، رینگر نرمال فاقد عصاره ترخون و PTZ به محیط خارج سلولی پرفیوز گردید و پس از گذشت ۳۰ دقیقه از آن پتانسیل استراحت غشاء هیپرپولاریزه‌تر شد و فعالیت الکتریکی سلولها به‌تدریج و به‌طور نسبی به شرایط کنترل برگشتند (شکل ۳D) لاکن خصوصیات پتانسیل عمل کاملاً به شرایط کنترل باز نگشت (شکل ۲A-C).

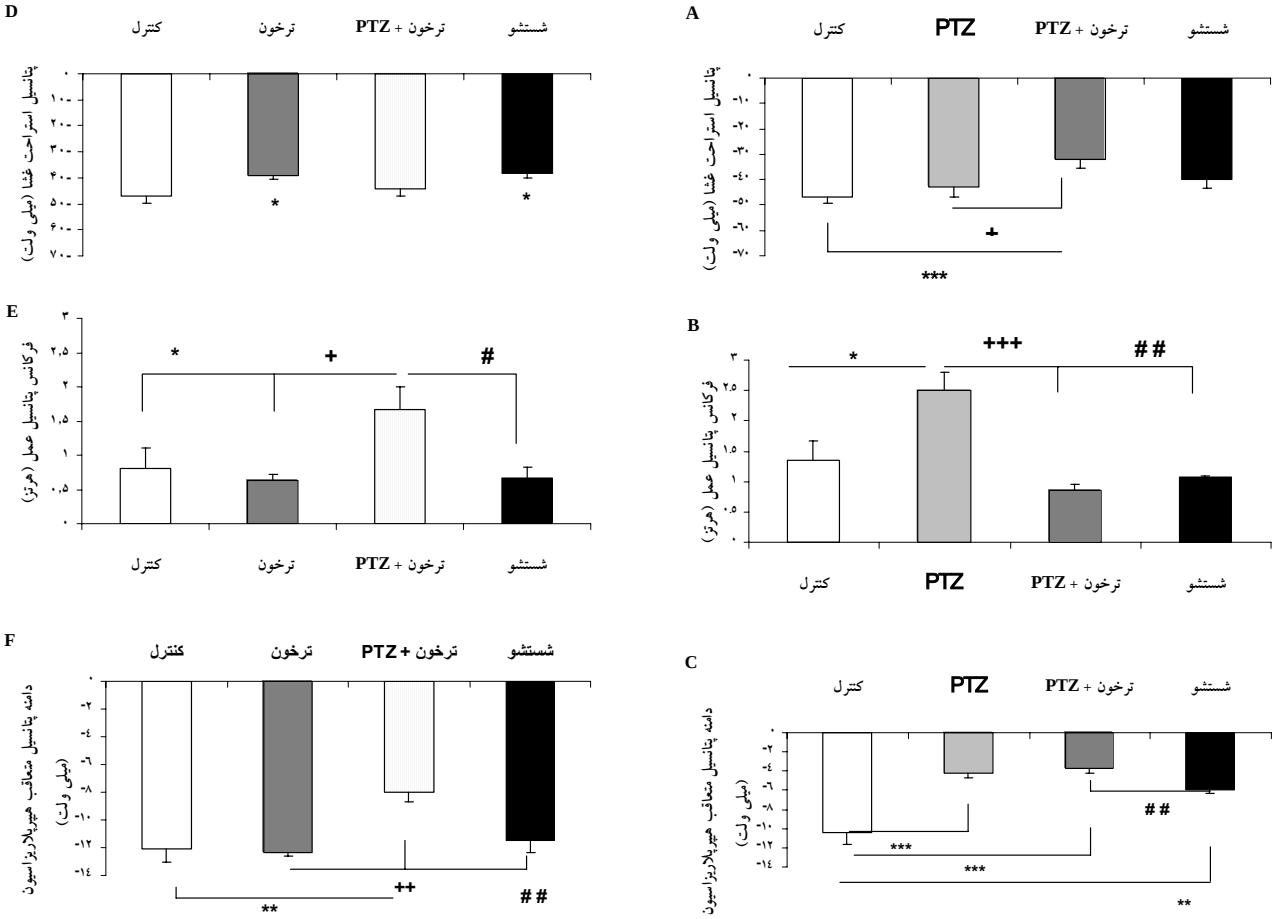
برای بررسی اثر پیشگیرنده و حفاظتی عصاره ترخون بر افزایش فعالیتهای الکتریکی ناشی از کاربرد PTZ و نقش احتمالی آن در جلوگیری از وقوع فعالیت صرعی، رینگر نرمال محتوی عصاره ترخون به‌تنهایی، در محفظه ثبت داخل سلولی پرفیوز شد. ۱۵ دقیقه پس از کاربرد عصاره ترخون، پتانسیل استراحت سلول به ۱/۱۹±۳۹/۱۶- میلی‌ولت رسید و ۱۶/۶۹ درصد دپلاریزه‌تر شد (P<۰/۰۵، شکل ۳D). فرکانس شلیک پتانسیل عمل کاهش یافت و به ۷۷/۳ درصد کنترل رسید (شکل ۳E). دامنه پتانسیل عمل و AHP تغییر معنی‌داری نداشت (شکل ۳F)؛ ولی مدت پتانسیل عمل آن طولانی‌تر (n=۸، P<۰/۰۰۱؛ ۷±۱۷ میلی ثانیه) شد. الگوی فعالیت الکتریکی سلول از حالت تونیک منظم در حالت کنترل (شکل ٤A) به فرم نامنظم تغییر یافت (شکل ٤B).

افزودن PTZ بعد از عصاره ترخون موجب افزایش فرکانس شلیک پتانسیل عمل سلول شد (n=۸، P<۰/۰۵؛ ۰/۰۳±۲/٤۲ هرتز) و پتانسیل استراحت غشاء سلول هیپرپلاریزه شد و به ۲/٤±٤٤/۳۷- میلی‌ولت رسید (n=۸، P<۰/۰۵) در مقایسه با کاربرد عصاره ترخون به‌تنهایی). دامنه پتانسیل عمل کاهش (n=۸، P<۰/۰۵؛ ۸±۳۸ میلی‌ولت) و مدت آن افزایش یافت (n=۸، P<۰/۰۱؛ ۸±۳۷ میلی ثانیه). دامنه AHP نسبت به قبل از کاربرد PTZ به میزان ۳٤/۱۹ درصد کاهش یافت (P<۰/۰۱؛ شکل ۲E)، به‌طوری که قابل تشخیص نبود (n=۸، P<۰/۰۱) (شکل ٤). الگوی فعالیت الکتریکی سلول از حالت نامنظم که در حضور عصاره ترخون به‌تنهایی ثبت شده بود، به فرم انفجاری تبدیل شد (شکل ٤C).

برای نشان دادن برگشت‌پذیری اثر حفاظتی عصاره ترخون، در مرحله اول رینگر نرمال محتوی عصاره ترخون، جایگزین محلول خارج سلولی محتوی عصاره ترخون و PTZ گردید. سپس محلول رینگر نرمال فاقد عصاره ترخون و PTZ در محیط خارج سلولی پرفیوز شد. پس از شستشوی PTZ و باقی ماندن عصاره ترخون در مایع خارج سلولی، فرکانس شلیک پتانسیل عمل دوباره کاهش یافت و دیگر خصوصیات پتانسیل عمل نیز مشابه قبل از کاربرد PTZ، یعنی تنها در حضور عصاره ترخون شد. فعالیت الکتریکی سلول همراه فعالیت سیناپسی مهاری (IPSP) با دامنه بالا بود (شکل ٤Da). پس از شستشوی محیط خارج سلولی توسط رینگر نرمال فاقد عصاره ترخون و PTZ، به‌تدریج خصوصیات پتانسیل عمل سلول مشابه شرایط کنترل شد؛ به‌طوری که پس از ۳۰ دقیقه تقریباً تفاوتی با کنترل نداشت. الگوی فعالیت سلول نیز به حالت تونیک منظم نزدیک شد (شکل ٤Db).



شکل ۱- ویژگیهای پتانسیل عمل و نحوه اندازه‌گیری آنها

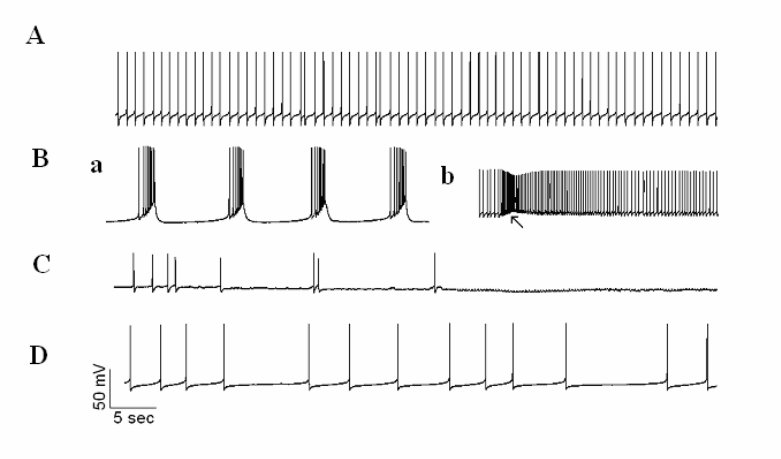


شکل ۲- مقایسه کمّی تأثیر تیمارهای مختلف بر ویژگیهای الکتریکی سلول عصبی

تأثیر کاربرد عصاره ترخون پس از PTZ و شستشو توسط محلول رینگر نرمال فاقد عصاره ترخون و PTZ بر (A) پتانسیل استراحت غشاء، (B) فرکانس شلیک پتانسیل عمل و (C) دامنه AHP.

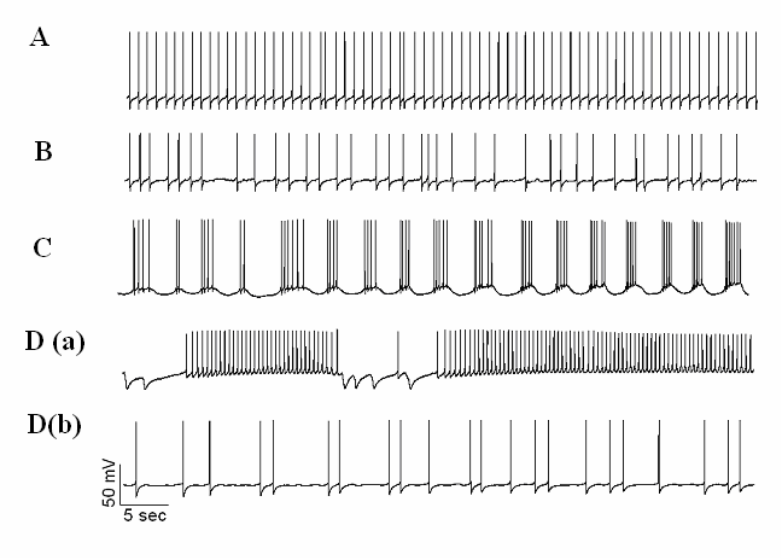
اثر حفاظتی کاربرد عصاره ترخون قبل از PTZ و شستشو توسط محلول رینگر نرمال فاقد عصاره ترخون و PTZ بر (D) پتانسیل استراحت غشاء، (E) فرکانس شلیک پتانسیل عمل و (F) دامنه AHP. *، + #، به‌ترتیب در مقایسه با گروه کنترل، PTZ و شستشو.

(n=۱۰). P<۰/۰۵ # ’+ ’* ، P<۰/۰۰۱ +++ ’***در مقایسه با گروه کنترل و P<۰/۰۱ # # ’++ ’**



شکل ۳- القاء فعالیت الکتریکی صرعی توسط PTZ در نورونهای حلزون و تأثیر عصاره ترخون در مهار آن.

فعالیت خودبخودی یک نورون در شرایط کنترل (A)، و در رینگر حاوی PTZ (B)، ۵ تا ۷ دقیقه پس از کاربرد PTZ فعالیت انفجاری آغاز می‌شود (a). علامت فلش PDS ناشی از PTZ رانشان می‌دهد (b). پتانسیلهای غشایی ثبت شده از نورون، ۱۵ دقیقه پس از کاربرد عصاره ترخون (۰/۱٪) در حضور PTZ (C). پتانسیلهای غشایی ثبت شده ۳۰ دقیقه پس از پرفیوژن محلول رینگر نرمال فاقد PTZ و عصاره ترخون، که بیانگر برگشت‌پذیری نسبی اثر عصاره ترخون می‌باشد (D).



شکل ٤- چگونگی اثر حفاظتی عصاره ترخون بر فعالیت الکتریکی صرعی سلول

(A) فعالیت خودبخودی نورون در شرایط کنترل. (B) اثر عصاره ترخون بر فعالیت الکتریکی سلول. (C) اثر کاربرد توأم PTZ و عصاره ترخون پس از عصاره ترخون به‌تنهایی که در برخی موارد منجر به آغاز فعالیت انفجاری شد. (Da) پس از حذف PTZ و باقی ماندن عصاره ترخون در محیط خارج سلولی فعالیت انفجاری متوقف شد. فلشها نشانگر IPSP هستند. (Db) با جایگزین کردن رینگر نرمال فاقد PTZ و عصاره ترخون، الگوی فعالیت الکتریکی سلول به‌تدریج به شرایط کنترل نزدیک شد.

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پرفیوژن عصاره ترخون در نمونه صرعی، یعنی در سلولی که قبلاً در معرض PTZ قرارگرفته و فعالیت الکتریکی صرعی در آن ایجاد شده است، موجب بروز فعالیت سیناپسی مهاری، کاهش فرکانس شلیک پتانسیل عمل و متوقف شدن فعالیت انفجاری و در برخی موارد دپولاریزه شدن غشاء و خاموش شدن سلول می‌شود. در این شرایط حتی با تزریق مداوم جریان منفی و رساندن پتانسیل استراحت به شرایط کنترل، سلول همچنان خاموش باقی ماند. این پدیده نشان‌دهنده آن است که خاموشی سلول به‌دلیل دپولاریزه شدن غشاء نبوده، بلکه به‌دلیل کاهش تحریک‌پذیری سلول است و می‌تواند بیانگر تغییر در هدایت یونها باشد.

تاکنون، پژوهشهای محدودی بر روی اثر ضد صرعی گیاه ترخون صورت گرفته است؛ لکن مشخص شده که عصاره ترخون محتوی بنزودیازپین‌هایی به نام دلورازپام و تمازپام است (Kavvadias *et al.*, 2000) و در واقع، بنزودیازپین‌ها با اتصال به گیرنده‌های $GABA_A$ موجب ایجاد اثرهای ضد صرعی می‌شوند. این ترکیبها به‌عنوان آگونیست گیرنده $GABA_A$، باعث افزایش فرکانس باز شدن کانال کلری مرتبط با این گیرنده می‌شوند (Cavazos & Lum, 2005). به‌علاوه، استراگول و متیل اوژنول که اثرهای ضد تشنجی آنها ثابت شده است نیز در عصاره الکلی ترخون یافت می‌شود (Ribnicky *et al.*, 2004).

Sayyah و همکاران (۲۰۰٤) نشان دادند که اسانس ترخون تشنجات کلونیک القاء شده توسط PTZ و نیز تشنجات تونیک القاء شده توسط MES در موش را مهار می‌کند. در این تحقیقات مشخص شد که اسانس ترخون بر روی تشنجات القاء شده توسط PTZ مؤثرتر از تشنجات ناشی از MES می‌باشد، لاکن مکانیسم اثر آن روشن نشد. با توجه به اینکه عصاره گیاه ترخون محتوی بنزودیازپین‌هاست، به نظر می‌رسد که بخشی از اثرهای ضد صرعی خود را از طریق اثرگذاری بر گیرنده‌های $GABA_A$ اعمال می‌کند. شاید دلیل مشاهده IPSP در ثبتهای سلولی نیز بی ارتباط با این گیرنده‌ها نباشد. به‌علاوه این گیاه محتوی متیل اوژنول است که از دسته مونوترپنها می‌باشد. مونوترپنها نیز با تعدیل سیستم گاباارژیک و گلوتاماترژیک اثرهای ضد صرعی خود را اعمال می‌کنند (Sayyah *et al.*, 2004). امروزه مشخص شده که نوروترنسمیتر گابا سه پاسخ مختلف را در نورونهای حساس به گابا در نرم‌تنان از جمله حلزون برمی‌انگیزد: هیپرپولاریزاسیون همراه با مهار شدید فعالیت اسپایک، دپولاریزاسیون غشاء و پاسخ دو فازی متشکل از دوره کوتاه تحریک‌پذیری و متعاقب آن مهار طولانی (Molnár *et al.*, 2002). در ضمن، بروز پاسخ دپولاریزاسیون به‌واسطه گیرنده‌های گابا به‌ویژه نوع A در بسیاری از سلولهای عصبی نیز نشان داده شده است (Perkins & Wong, 1996). به هر حال، وجود فعالیت سیناپسی مهاری می‌تواند دلیلی بر فعال شدن سیستم گاباارژیک باشد. با توجه به اینکه عصاره ترخون محتوی بنزودیازپین‌هاست و این ترکیبها آگونیست‌های گیرنده $GABA_A$ هستند، احتمالاً اثر مستقیم یک یا چند ترکیب موجود در عصاره ترخون بر گیرنده‌های $GABA_A$ و افزایش جریان ورودی کلر به داخل سلول موجب پیدایش پتانسیل پس-سیناپسی مهاری شده است. با این وجود، برای روشن شدن

توضیحاتی که آورده شد، نیاز به آزمایشهای بیشتری با استفاده از روش ولتاژ کلمپ می‌باشد.

برای تعیین اثر مستقیم عصاره ترخون بر فعالیت الکتریکی سلول، ابتدا عصاره ترخون به‌تنهایی و سپس به همراه PTZ به محیط خارج سلولی پرفیوز شد. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که با پرفیوژن عصاره ترخون به محیط خارج سلولی، الگوی شلیک فعالیت الکتریکی سلول از حالت تونیک منظم به فرم نامنظم تغییرمی‌دهد. با کاربرد هم‌زمان عصاره ترخون و PTZ ابتدا فرکانس شلیک افزایش یافت و سپس الگوی فعالیت الکتریکی سلول از حالت نامنظم در حضور عصاره ترخون به‌تنهایی، به فرم انفجاری تبدیل شد. پتانسیل استراحت غشاء سلول دپولاریزه شد و دامنه پتانسیل عمل کاهش و مدت آن افزایش یافت.

با توجه به نتایج ذکر شده، به نظر می‌آید که عصاره ترخون دارای یک اثر حفاظتی نسبی بر فعالیت الکتریکی صرعی القاء شده توسط PTZ می‌باشد و به‌طور کامل نمی تواند از بروز اثرهای ضرع‌زایی PTZ جلوگیری نماید. چرا که کاربرد عصاره ترخون قبل از ایجاد مدل صرعی، نتوانست مانع بروز امواج انفجاری و دیگر تأثیرات PTZ در سلول شود. با توجه به آنچه گفته شد، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره ترخون دارای اثر ضد صرعی نسبی بر مدل صرعی القاء شده توسط PTZ در نورونهای حلزون است. این آثار احتمالاً به‌واسطه اثر یک یا چند ترکیب موجود در عصاره ترخون بر گیرنده‌های $GABA_A$ ایجاد می‌شود.

با توجه به اینکه ترکیبهای موجود در عصاره ترخون قادر به تغییر در الگوی فعالیت نورونی و مهار نسبی الگوی صرعی القاء شده توسط PTZ هستند، استفاده از پتانسیل بالقوه این ترکیبها به‌عنوان عوامل ضد صرع مستلزم تحقیقات بیشتری در جهت شناسایی ترکیبهای مؤثر و بررسی مکانیسم تأثیر آنهاست.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۳۰۲ مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. بدین وسیله نویسندگان مقاله از کمکهای شایان رئیس محترم مرکز در تأمین امکانات لازم برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

- عقیلی علوی خراسانی، م.ح، ۱۳۷۰. مخزن الادویه. انتشارات صفا، تهران، ٦٦٨ صفحه.
- Cavazos, J.E. and Lum, F., 2005. Seizures and epilepsy: overview and classification. Medicine, 1-30.
- Gorji, A. and Khaleghi, M., 2001. History of epilepsy in medieval Iranian medicine. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 25: 455-461.
- Janahmadi, M., Malmierca, M.S., Hearne, P.G., Green, G.G. and Sanders, D.J., 1999. Morphological and electrophysiological features of F76 and D1 neurones of the sub-oesophageal ganglia of Helix aspersa in vitro and in culture. Anatomy and Embryological Journal, 199(6): 563-572.
- Józwiak, S., 2007. Contemporary opinions on classification, pathogenesis and treatment of drug-resistant epilepsy Wiad Lek. Wiadomości lekarskie, 60(5-6): 258-264.
- Kavvadias, D., Abou-Mandour, A.A., Czygan, F.C., Beckmann, H., Sand, P., Riederer, P. and Schreier, P., 2000. Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracunculus* and *Solanum tuberosum* rationalizing their endogenous formation in plant tissue. Biochemical and Biophysical Research Communication, 296: 290-295.
- Leal-Cardoso, J.H., Matos-Birto, B.G., Lopes-Junior, J.E.G., Viana-Cardoso, K.V., Sampaio-Freitas, A.B., Brasil, R.O., Coelho-de-Souza, A.N. and

- Albuquerque, A.A.C., 2004. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 37: 1193-1198.
- Meepagala, K.M., Sturtz, G. and Wedge, D.A., 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. *Var. dracunculus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 6989-6992.
- Molnár, G., Gyori, J., Salánki, J. and Rózsa, K.S., 2002. Cadmium ions modulate GABA induced currents in molluscan neurons. Acta Biologica Hungarica, 53(1-2): 105-123.
- Onozuka, M., Imai, S. and Sugaya, E., 1986. Pentylenetetrazole-induced bursting activity and cellular protein phosphorylation in snail neurons. Brain Research, 362(1): 33-39.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J. and Codina, C., 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled. Mediterranean herbs and aromatic plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 6882-6890.
- Perkins, K.L. and Wong, R.K., 1996. Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells. Journal of Neurophysiology, 76: 3886-3894.
- Ribnichy, D.M., Poulev, A., O'Neal, Y., Wnorowski, G., Malek, D.E., Jäger, R. and Raskin, I., 2004. Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *Artemisia dracunculus* L. for use as a dietary supplement and in functional foods. Food and Chemical Toxicology, 42: 585-598.
- Ribnicky, D.M., Poulev, A., Watford, M., Cefalu, W.T. and Raskin, I., 2006. Antihyperglycemic activity of Tarralin, an ethanolic extract of Artemisia dracunculus L. Phytomedicine, 13(8): 550-557.
- Sayyah, M., Nadjafnia, L. and Kamalinejad, M., 2004. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil, Journal of Ethnopharmacology, 94: 283-287.
- Saadali, B., Boriky, D., Blaghen, M., Vanhaelen, M. and Talbi, M., 2001. Alkamides from *Artemisia dracunculus*. Phytochemistry, 58: 1083-1086.
- Sugaya, E., Kishii, K. and Onozuka, M., 1985. Inhibitory effect of phenytoin on intracellular cyclic nucleotide and calcium changes during pentylenetetrazole-induced bursting activity in snail neurons. Brain Resesrch, 341(2): 313-319.
- Sugaya, E., Furuichi, H., Takagi, T., Kajiwara, K. and Komatsubara, J., 1987. Intracellular calcium concentration during pentylenetetrazol-induced bursting activity in snail neurons. Brain Resesrch, 1416(1): 183-186.
- Taylor, P.S., 1987. Selectivity and patch measurment of A-current channels in *Helix aspersa* neurons. Journal of Physiology, 388: 437-447.
- Turner, N.J., 1979. Plants in British Columbian Indian Technology. British Columbia Provincial Museum, 304p.
- Vatanparast, J., Janahmadi, M. and Asgari, A.R., 2007. Forskolin potentiates the paraoxon-induced hyperexcitability in snail neurons by blocking afterhyperpolarization. Neurotoxicology, 28(6): 1178-1183.
- Williamson, T.L. and Crill, W.E., 1976. The effects of pentylenetetrazol on molluscan neurons. I. Intracellular recording and stimulation. Brain Research, 116(2): 217-229.
- Yazdanparast, R. and Saee, A., 1999. Effects of aqueous tarragon, *Artemisia dracunculus*, extract on lipid and coagulatory parameters in rats. Biomedical Letters, 59: 137-141.

Cellular effect of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) leaves extract on pentylenetetrazole-induced epileptic activity in snail neuron

S. Farjnia*[1], M. Janahmadi[1], H. Abbasipour[2], J. Vatanparast[3] and M. Kamalinejad[4]

1- Neuroscience Research Center and Department of Physiology, Shahid Beheshti Medical Sciences University Iran.
2- Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahed University
3- Department of Biology, College of Sciences, Shiraz University
4- Department of Pharmacognosy, Shahid Beheshti Medical Sciences University

*Corresponding Author, E-mail: mjanahmadi@yahoo.com

Recieved: March 2008 Revised: May 2008 Accepted: June 2008

Abstract

Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) is a perennial herb in the Asteraceae family used for its aromatic leaves in seasoning. In Iranian ancient medicine, the dried aerial parts of this plant were orally used to treat epilepsy. Epilepsy is one of the most common neurological disorders. In the present study, using intracellular recording the anti-epileptiform potential of the ethanolic extract of tarragon and its possible cellular mechanism was assessed against pentylenetetrazole (PTZ) epileptogenesis. In the presence of tarragon extract (0.1%), the PTZ-induced burst activity disappeared. The cell membrane potential became 67.8% more depolarized than the control value. The firing frequency also decreased 62.5% and 83.8% compared to control and in the presence of PTZ, respectively. Exposure to extract, furthermore, caused 36% reduction in the amplitude of after hyper polarization (AHP) compared to control, but not to PTZ, condition. On the other hand, extra cellular application of extract alone led to a membrane depolarization by about 16.69%. While, the firing frequency reduced to 77.3% of control and the amplitude of both action potential and AHP remained almost unchanged. These changes were associated with a shift in the neuronal firing pattern from regular tonic to an irregular mode. Pretreatment with tarragon extract did not completely prevent the epileptogenesis induced by PTZ. Consequently, these results suggest that tarragon extract reduces the neuronal excitability possibly through the membrane depolarization.

Key words: Tarragon extract, epilepsy, pentylenetetrazole, intracellular recording, *Artemisia dracunculus* L.