

اثرات ترکیب جدید کوئینازولینونی بر جریانهای یونی القا شده در یک مدل صرعی: با

استفاده از تکنیک Voltage clamp

مهیار جان اممدی^۱، مهین گنج فانی^۲، هادی فتمی مقدم^۳

خلاصه

سابقه و هدف: صرع نوعی بیماری عصبی است که در آن تعدادی از سلولهای عصبی مغز ایمپالسهای الکتریکی غیرطبیعی صادر می کنند که موجب اختلال موقت سایر سلولهای عصبی مغز می گردد. به منظور تعیین اثرات ترکیب جدید کوئینازولینونی بر جریانهای یونی مرتبط با تشنج، این تحقیق روی یک مدل صرعی انجام گرفت.

مواد و روش ها: تحقیق به روش تجربی و با استفاده از تکنیکهای کلمپ جریان و کلمپ ولتاژ دو الکترودی، به منظور تعیین اثرات ترکیب جدید کوئینازولینونی نام (۲) - (سه فلونورومتیل)، ۳- (پاراتیل فسیل) (۳H) - ۴ کوئینازولینون) بر روی اثرات صرعی و کنداکتانس های یونی ناشی از PTZ در جسم سلولی D5 حلزون باغی، صورت گرفت.

یافته ها: داروی تشنج زای PTZ (۲۵ میلی مولار) موجب تغییر شکل پتانسیلهای عمل خودبخودی و افزایش فرکانس شلیک آن می گردد. در پتانسیلهای نگهدارنده ۴۰- میلی ولت، PTZ موجب کاهش دامنه جریانهای رو به داخل و رو به خارج گردید. کاربرد خارج سلولی ترکیب جدید کوئینازولینون (۰/۱ mM) در مدل صرعی سبب هیپرپلاریزاسیون پتانسیل استراحت غشا و کاهش فرکانس پتانسیل عمل گردید. تحت شرایط کلمپ ولتاژ، ترکیب جدید مورد آزمایش، موجب کاهش حداکثر دامنه جریان رو به داخل و تا حدودی افزایش جریانهای رو به خارج گردید. کاربرد ترکیب جدید در غیاب PTZ، موجب کاهش فرکانس، دامنه و طول مدت پتانسیل عمل گردید. پتانسیل استراحت غشا هم تحت تاثیر قرار گرفته و به سوی ولتاژهای هیپرپلاریزه تر شیفت نمود. کاربرد همزمان ترکیب کوئینازولینونی و PTZ موجب کاهش شدید فعالیت صرعی در جریانهای یونی غشا گردید.

نتیجه گیری و توصیه ها: ترکیب جدید کوئینازولینونی موجب کاهش تحریک پذیری سلولی و مهار فعالیت صرعی ناشی از PTZ از طریق تغییر کنداکتانس های یونی غشا می گردد. انجام تحقیقات بیشتر در این خصوص توصیه می گردد.

واژگان کلیدی: صرع، ترکیب کوئینازولینونی، حلزون باغی، کلمپ ولتاژ

مقدمه

می کنند و طیف فعالیت وسیعی هم دارند. اما اثرات سوء این داروها از جمله ایجاد تحمل سریع نسبت به عمل ضد صرعی شان و نیز شل کنندگی شدید عضلانی و اثرات آرامبخشی و فراموشی، استفاده از آنها را محدود کرده است (۳). بهمین دلیل تلاش برای یافتن راههای درمانی اساسی بر علیه صرع، بسیار ضروری است. در این راستا تحقیق در مورد وقایع داخل سلولی ناشی از این بیماری و روشن نمودن مکانیسم آن با استفاده از تکنیکهای پیشرفته ثبت داخل سلولی میتواند راه گشایان باشد.

صرع یکی از شایعترین بیماریهای دستگاه عصبی است که بدلیل تخلیه همزمان و غیر طبیعی دسته های بزرگی از نورونها که با هم ارتباط دارند، اتفاق می افتد. در طول چنین تخلیه های همزمان و شدید نورونها، حملات صرعی که همراه با تظاهرات رفتاری شدیدی است، اتفاق می افتد. درمان رایج صرع عموماً بصورت مهار تشنج می باشد که از علائم اصلی این بیماری است ولی متأسفانه اکثر داروهای ضد تشنج، عوارض جانبی سوئی دارند (۱، ۲). مثلاً بنزودیازپین ها داروهای ضد صرعی هستند که بسیار سریع عمل

۱-دانشیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲-گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۳-گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

خارج شدن از سر حیوان، در محلول رینگر مخصوص و در درجه حرارت اتاق در محفظه ثبت داخل سلولی که کف آن با Sylgard 184 (Dow coming, USA) پوشیده شده بود، بوسیله سوزنهای ظریف ثابت می‌گردید (۹). بافت‌های پیوندی اطراف سلولها، در زیر میکروسکوپ تشریح و بدون استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک، و با کمک پنسهای بسیار ظریف برداشته می‌شد. با آشکار شدن سلولها از چندین شاخص جهت شناسایی سلول D5، همچون محل قرار گرفتن سلول، اندازه، رنگ، موقعیت آن نسبت به اعصاب و فعالیت الکتریکی استفاده می‌گردید. ثبت داخل سلولی با استفاده از دو میکروالکتروود با مقاومت تقریبی ۵-۹ مگا اهم انجام می‌گرفت. میکروالکتروودها از لوله‌های موئینه بروسیلیکات دارای فیلامان داخلی (Clark electromedical instruments, UK) تهیه می‌شدند. یکی از میکروالکتروودها به منظور تزریق جریان و میکروالکتروود دیگر به منظور ثبت ولتاژ بکار می‌رفت که هر یک درون نگهدارنده‌های Perspex مجزایی قرار گرفته و مستقیماً به پری آمپلی فایر (Headstage) متصل می‌شدند. در داخل میکروالکتروود شیشه‌ای، سیم نقره‌ای به قطر ۰/۴ میلی‌متر قرار داده می‌شد که بخشی از آن پوشش Ag/AgCl داشت. میکروالکتروودهای شیشه‌ای با محلول کلرید پتاسیم ۳ مولار پر شده و به آمپلی فایر Axoclamp 2B (Axon Instruments Inc, CA) با قدرت تقویت $\times 10$ ، متصل می‌گردیدند. الکتروود دیگری بنام الکتروود مرجع (پل آگاری)، حاوی کلرید پتاسیم ۳ مولار و آگار حل شده در رینگر استاندارد در خارج سلول و نزدیک گانگلیون قرار می‌گرفت. به کمک آمپلی فایر مزبور و با بکارگیری برنامه Pulse، جریان ثابتی بداخل سلول تزریق می‌شد (Current Clamp) و یا ولتاژ غشاء در سطح معینی کلمپ می‌گردید (Voltage clamp). سپس پاسخ غشا سلول، بصورت تغییرات ولتاژ و یا تغییرات جریان، با استفاده از یک مبدل قیاسی به رقمی (D/A) و رقمی به قیاسی (A/D) به صورت داده‌های رقمی در می‌آمد و اطلاعات در کامپیوتر ذخیره می‌گردید.

روشهای الکتروفیزیولوژی:

روش Current Clamp:

ابتدا پتانسیل استراحت غشا و فعالیت خودبخودی سلول در رینگر استاندارد ثبت می‌شد و سپس ویژگیهای پتانسیل عمل از جمله فرکانس، دامنه، مدت، آستانه و دامنه پتانسیل هیپرپلاریزاسیون متعاقب مورد بررسی قرار می‌گرفت.

بدین منظور می‌توان با استفاده از داروی صرع‌زای پنتیلن تترازول (PTZ) بصورت خارج سلولی بر روی نورونهای ویژه‌ای در گانگلیون عصبی حلزون، نوعی مدل صرعی ایجاد نمود (۵، ۴) و سپس به بررسی مکانیسم اثر داروهای ضد صرع در سطح سلول پرداخت.

امروزه از داروهای زیادی برای کنترل صرع استفاده می‌شود از جمله دیازپام، دی فینیل هیدانتوئین (DPH)، آموباریتال، تری متادیون (۶) و متاکوالونها (۷). اساس ساختمانی دسته‌ای از این داروها، نوعی ترکیبات حلقوی می‌باشد که به نام عمومی کوئینازولینون شناخته می‌شوند و برخی از آنها قدرت زیادی در مهار صرع ایجاد شده توسط PTZ در مدل‌های حیوانی را دارند (۷).

خواص بیولوژیکی مشتقات مختلف کوئینازولینونها، تا حدود زیادی مطالعه شده است که از جمله اثرات آنها می‌توان به آرام‌بخشی، خواب‌آوری، ضد تشنج، شل‌کنندگی عضلانی، بی‌دردی و اثرات ضد باکتریایی آنها اشاره کرد (۷).

اخیراً مواد جدیدی از این دسته توسط Stasko و Nawarocka (۱۹۹۸) عرضه شده که دارای فعالیت ضد تشنجی و ضد التهابی می‌باشد (۸).

اما تحقیقات انجام شده در خصوص مکانیسم اثر ضد تشنجی این ترکیبات بر غشای سلول، بویژه در سطح کانالهای یونی بسیار اندک می‌باشد. لذا هدف این تحقیق، بررسی اثر نوعی ترکیب جدید کوئینازولینونی بنام ۲- (سه - فلونورومتیل)، ۳- (پارا اتیل فینیل) (۲H) - ۴- کوئینازولینون، بر خصوصیات الکتروفیزیولوژیک غشا و نیز خصوصیات بیوفیزیکی جریان‌ات یونی دخیل در حملات صرعی می‌باشد. لازم به ذکر است که این ماده توسط گروه شیمی دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی ساخته شده است و بدلیل داشتن فلونور در ساختار آن را به اختصار، ترکیب F می‌نامیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، آزمایشات بر روی جسم سلولی ۲۷ نورون D5 جدا شده از گانگلیون پارتال چپ حلزون باغی (Iranian Garden Snail) با وزن تقریبی ۶ گرم انجام گرفت. حلزونها از منطقه شمال ایران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. حیوانات در شرایط زیستی مناسبی از لحاظ نور، دسترسی به غذا، آب و درجه حرارت مناسب (۲۳-۲۰ درجه سانتیگراد) نگهداری می‌شدند. کلیه آزمایشات بر روی گانگلیون Subesophageal حیوان انجام می‌شد. گانگلیون بعد از

محاسبه میانگین و انحراف معیار داده‌ها و رسم منحنی‌ها استفاده گردید. داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف استاندارد ارائه شده‌اند.

یافته‌ها

نتایج ثبت فعالیت خودبخودی سلول *D5* (*Spontaneous activity*) از جسم سلولی ۲۷ نورون *D5* حلزون باغی در رینگر استاندارد ثبت داخل سلولی به عمل آمد. تمامی نورونهای مورد آزمایش بطور خودبخودی و بدون تحریک الکتریکی فعال بودند و پتانسیل‌های عمل خودبخودی با خصوصیات زیر از خود نشان میدادند:

پتانسیل استراحت 47.01 ± 2.75 میلی ولت، دامنه $72/43 \pm 2/14$ میلی ولت، مدت $2/82 \pm 0/12$ میلی ثانیه، آستانه پتانسیل عمل $35/07 \pm 1/82$ میلی ولت و دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب $17/06 \pm 1/29$ میلی ولت (شکل A-۱)

پس از ثبت فعالیت الکتریکی سلول در رینگر استاندارد، محلول رینگر حاوی PTZ با غلظت ۲۵ میلی مولار بصورت خارج سلولی پرفیوژن گردید. این عمل بلافاصله موجب افزایش شلیک پتانسیل‌های عمل شده (شکل B-۱) و ۴ تا ۶ دقیقه بعد تغییرات ساختاری در پتانسیل‌های عمل سلول *D5* پدید آورد (جدول ۱).

پس از بررسی اثرات PTZ بر فعالیت الکتریکی سلول، رینگر حاوی ترکیب F با غلظت ۰/۱ میلی مولار و PTZ بصورت خارج سلولی پرفیوژن گردید. پرفیوژن این ماده در حضور PTZ، موجب افت قله پتانسیل عمل خودبخودی سلول تا زیر صفر میلی ولت گردید (شکل C-۱) و فرکانس شلیک را کاهش داد. اما پس از گذشت زمان نسبتاً طولانی (۵۰-۴۰ دقیقه)، برخی از سلولها، قادر به ترمیم نسبی پتانسیل عمل خودبخودی بودند. (جدول ۱)

در گروه دیگر بعد از ثبت فعالیت خودبخودی سلول در رینگر استاندارد، محلول رینگر حاوی ترکیب F در عدم حضور PTZ پرفیوژن گردید. این ترکیب به تنهایی اثر شدیدی بر فرکانس پتانسیل عمل می‌گذارد بطوریکه پس از ۵ دقیقه، حدود ۶۸٪ از فعالیت خودبخودی سلول را کاهش می‌دهد. این ترکیب بر دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب اثری ندارد ولی دامنه پتانسیل عمل را ۸/۸٪ و از طرفی طول مدت پتانسیل را ۱۱/۶٪ کاهش می‌دهد. پتانسیل استراحت سلول را به میزان ۶۸٪ هیپرپلاریزه‌تر کرده ولی آستانه پتانسیل عمل را ۹/۳٪ دپلاریزه‌تر می‌کند (جدول ۱، شکل D-۱).

افزودن PTZ بعد از ترکیب F، موجب افزایش فعالیت خودبخودی سلول مورد نظر می‌شود اما زمان تاخیر آستانه در این شرایط طولانی‌تر می‌شود (شکل E-۱).

مدت پتانسیل عمل در نصف حداکثر دامنه پتانسیل عمل (*Half - maximal amplitude*) و دامنه پتانسیل عمل و پتانسیل متعاقب منفی از سطح پتانسیل استراحت محاسبه می‌گردیدند.

روش Voltage Clamp

با استفاده از این روش ویژگی‌های بیوفیزیکی و الکتروفیزیولوژیک جریانهای رو بداخل و رو بخارج غشای جسم سلولی نورون *D5* مطالعه گردید.

در این بررسی، از *Voltage clamp* دو الکترودی (*Two electrode voltage clamp*) استفاده شد بطوریکه پتانسیل غشاء به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه از پتانسیل نگهدارنده -40 میلی ولت تا پتانسیل $+50$ میلی ولت با فواصل و تنازی ۱۰ میلی ولت دپلاریزه می‌گردید.

محلول مورد استفاده در آزمایش:

ترکیب رینگر استاندارد خارج سلولی بر حسب میلی مولار به قرار زیر بود: (۹)

80 NaCl, 10 CaCl₂, 4 KCl, 5 MgCl₂, 10 Glucose, 5 HEPES
اسمولارته محلولها به کمک اسمومتر (Osmomat 030, Gonotec Co) اندازه‌گیری می‌گردید.

اسمولارته محلول‌های مورد آزمایش ۲۰۶-۲۰۲ میلی اسمول بر کیلوگرم آب بود. pH محلول‌های مورد استفاده نیز بکمک *Trizma base* و *Trizma hydrochloride* در حد ۷/۶-۷/۸ تنظیم می‌گردید.

آزمایشات در سه بخش طراحی گردید و در هر بخش ثبت فعالیت الکتریکی خودبخودی و جریانهای یونی غشا جسم سلولی نورون *D5* در شرایط زیر انجام می‌شد:

بخش اول:

- ۱- در محیط رینگر استاندارد
- ۲- در حضور PTZ با غلظت ۲۵ میلی مولار
- ۳- در حضور ترکیب F با غلظت ۰/۱ میلی مولار و PTZ

بخش دوم:

- ۱- در محیط رینگر استاندارد
- ۲- در حضور ترکیب F با غلظت ۰/۱ میلی مولار
- ۳- بعد از اضافه کردن PTZ و ترکیب F

بخش سوم:

- ۱- در محیط رینگر استاندارد
 - ۲- بعد از اضافه کردن همزمان ترکیب F و PTZ
- نتایج حاصل از آزمایشات، بکمک نرم افزارهای *Analyse* و *Trial* در محیط *Matlab* مورد بررسی قرار گرفت و از برنامه *Excel* برای

(command potentials)، از پتانسیل نگهدارنده -40 میلی‌ولت و در محدوده ولتاژهای -40 تا $+50$ میلی‌ولت در مراحل 500 میلی ثانیه، در رینگر استاندارد و در حضور PTZ را نشان می‌دهد. شکل B-3 نشان دهنده ارتباط ولتاژ-جریان (I-V relationship) ثبت شده از پتانسیل نگهدارنده -40 میلی‌ولت است.

نتایج این مطالعه نشان داد که پس از گذشت 10 دقیقه از پرفیوژن ترکیب F همراه با PTZ به محیط خارج سلولی، آستانه جریان رو بداخل $1/38$ ٪ به سمت پتانسیل‌های مثبت‌تر جابجا شد و حداکثر جریان رو بداخل $10/89$ ٪ (نسبت به قبل از افزودن ترکیب F) کاهش داشت و ولتاژ آن به مقدار 6 میلی‌ولت به سمت پتانسیل‌های منفی شیف‌ت نمود. در این شرایط، حداکثر جریان رو بخارج نیز $7/5$ ٪ افزایش داشته و پتانسیل آن 2 میلی‌ولت به سمت پتانسیل‌های منفی‌تر متمایل شده است.

شکل A-4 نشان دهنده جریانهای رو بداخل و رو بخارج حاصل از دیپلریزاسیون غشا در رینگر محتوی ترکیب F با غلظت $0/1$ میلی‌مولار بهمراه PTZ می‌باشد. شکل B-4 رابطه جریان - ولتاژ در پتانسیل نگهدارنده -40 میلی‌ولت و شکل 5، مقایسه منحنی‌های جریان - ولتاژ را در دو وضعیت فوق‌الذکر نشان می‌دهد.

برای پاسخ به این سوال که آیا ترکیب F به تنهایی روی جریانهای یونی اثر می‌گذارد، ابتدا محلول رینگر حاوی ترکیب مورد نظر با غلظت $0/1$ میلی‌مولار به محیط خارج سلولی پرفیوژن گردید. بعد از انجام ثبت در دقیقه دهم، پرفیوژن محلول حاوی PTZ و ترکیب F انجام شد. همانطور که در جدول 2 ملاحظه می‌شود، 10 دقیقه بعد از افزودن ترکیب F، آستانه جریان رو بداخل تغییر چندانی نکرده است اما متوسط حداکثر جریان رو بداخل نسبت به حالت کنترل $38/5$ ٪ کاهش داشته که بعد از افزودن محلول حاوی PTZ و ترکیب جدید، این مقدار نسبت به قبل از PTZ، $28/3$ ٪ کاهش نشان می‌دهد. ولتاژ حداکثر جریان رو بداخل نیز در این شرایط به سمت مقادیر منفی‌تر شیف‌ت نموده است که پس از افزودن PTZ، شیف‌ت ولتاژی بیشتر شده است. متوسط حداکثر جریان رو بخارج با $5/09$ ٪ کاهش همراه بود که پس از افزودن PTZ، $36/3$ ٪ کاهش یافته است. ولتاژ جریان فوق هم به مقدار 5 میلی‌ولت، به سمت ولتاژهای مثبت شیف‌ت نموده است. شکل 6 مقایسه جریانهای یونی غشا را تحت این شرایط نشان می‌دهد.

همانطور که در جدول 2 ملاحظه می‌شود، 5 دقیقه بعد از افزودن محلول حاوی ترکیب F و PTZ بطور همزمان، متوسط حداکثر

شکل B-C-2 تاثیر ترکیب F بر فعالیت خودبخودی سلول D5 و نیز اثر PTZ بعد از ترکیب F را در طی مجموعه ثبت 16 ثانیه‌ای را نشان می‌دهد.

در گروه آزمایشی بعدی، پرفیوژن همزمان ترکیب F و PTZ پس از 5 دقیقه موجب افزایش فرکانس پتانسیل عمل خودبخودی به میزان $8/3$ ٪، کاهش دامنه پتانسیل عمل و هیپرپلاریزاسیون متعاقب به ترتیب $8/6$ ٪ و $28/5$ ٪، افزایش طول مدت پتانسیل عمل به میزان $19/9$ ٪، دیپلریزه‌تر شدن آستانه پتانسیل عمل به میزان $1/5$ میلی‌ولت و هیپرپلاریزه شدن پتانسیل استراحت سلول به میزان $11/2$ ٪ گردید (شکل F-1).

نتایج کلمپ ولتاژ:

پس از بررسی اثر ترکیب F بر فعالیت صرعی ناشی از PTZ، به منظور مطالعه ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک جریانهای کل یونی که در یک مدل صرعی از عرض غشا عبور می‌کنند و در حضور ترکیب جدید F، تکنیک ولتاژکلمپ دو الکترودی مورد استفاده قرار گرفت. در این بخش از آزمایشات ابتدا جریانهای یونی غشا جسم سلولی نورو D5 در رینگر استاندارد ثبت شد. در مرحله بعدی، 7 دقیقه پس از پرفیوژن رینگر حاوی PTZ با غلظت 25 میلی‌مولار ثبت انجام گرفت و نتایج حاصله با جریانهای یونی غشا در رینگر استاندارد مقایسه گردید. سپس این گروه، بعنوان کنترل برای مقایسه جریانهای یونی غشا در حضور ترکیب کوئینازولینونی F با غلظت $0/1$ میلی‌مولار، در نظر گرفته شد.

نتایج نشان می‌دهد که آستانه جریان رو بداخل در این گروه از سلولهای D5، در رینگر استاندارد $0/47 \pm 1/29$ میلی‌ولت، متوسط حداکثر جریان رو بداخل $0/66 \pm 3/84$ - نانوآمپر و ولتاژ جریان حداکثر $4/17 \pm 5/77$ میلی‌ولت می‌باشد. همچنین متوسط حداکثر جریان رو بخارج $0/93 \pm 6/23$ - نانوآمپر و ولتاژ آن $0/86 \pm 4/08$ میلی‌ولت می‌باشد (جدول 2).

بر طبق نتایج موجود، 7 دقیقه بعد از پرفیوژن PTZ، آستانه جریان رو بداخل تغییر چندانی نکرده است اما حداکثر جریان رو بداخل $18/75$ ٪ کاهش یافته و ولتاژ آن به اندازه $2/73$ میلی‌ولت به سمت منفی شیف‌ت نموده است. حداکثر جریان رو بخارج نیز 8 ٪ کاهش داشته و پتانسیل آن به مقدار جزئی ($0/66$ میلی‌ولت) به سمت پتانسیل‌های مثبت‌تر شیف‌ت نموده است.

شکل A-3 کل جریانهای رو بداخل و رو بخارج حاصل از پلاریزاسیون غشا توسط پتانسیل‌های فرمانی

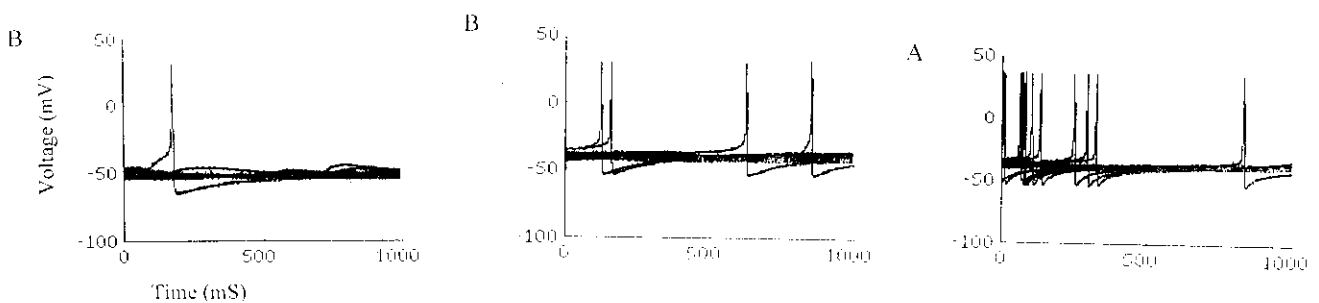
جریان رو بداخل ۷/۴۲/۲ نسبت به کنترل کاهش نشان می دهد و ولتاژ این جریان اندکی به سمت مقادیر منفی شیفیت نموده است. و همچنین متوسط حداکثر جریان رو بخارج ۱/۱۶/۰۹ کاهش یافته ولی ولتاژ آن تغییر چندانی نکرده است (شکل ۷).

جدول ۱: میزان فعالیت خودی سلول D5 بر حسب خصوصیات و به تفکیک گروههای مورد مطالعه (n=۵)

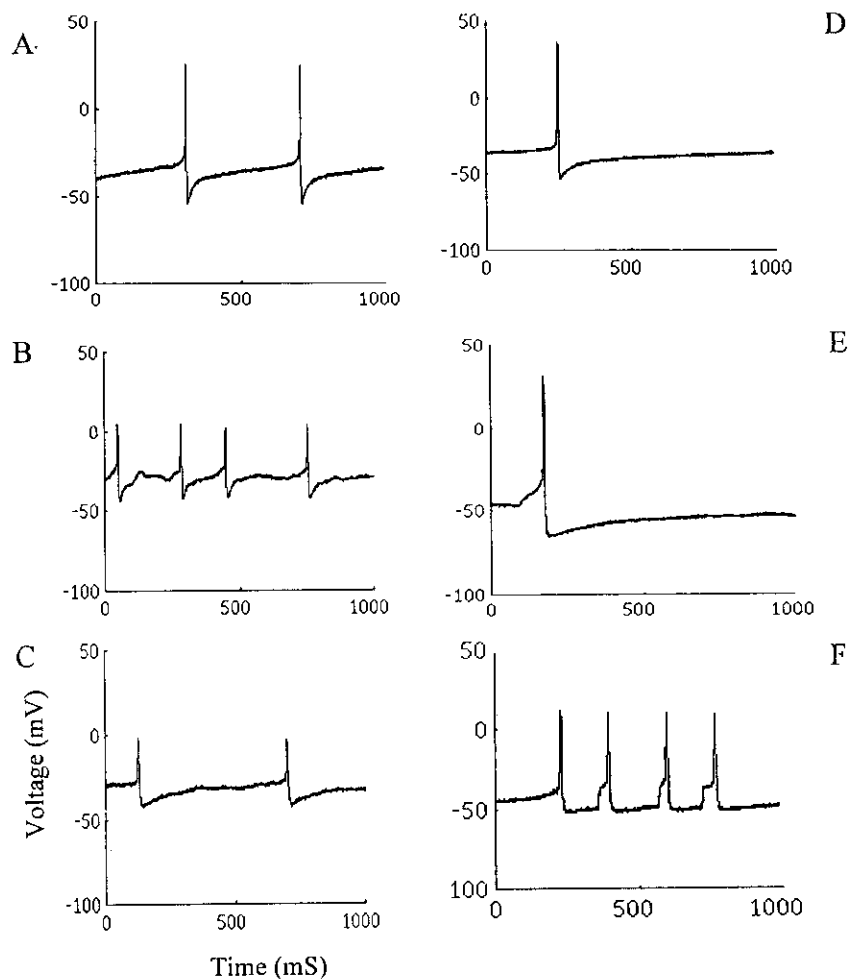
خصوصیات گروهها	فرکانس پتانسیل عمل (هرتز)	پتانسیل استراحت عمل (میلی ولت)	دامنه پتانسیل عمل (میلی ولت)	مدت پتانسیل عمل (میلی ثانیه)	دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب (میلی ولت)	آستانه پتانسیل عمل (میلی ولت)
رینگر استاندارد	۰/۹۸±۰/۱۰	-۴۸/۵۰±۱/۸۹	۷۱/۰۵±۲/۲۸	۳/۴۷±۰/۵۶	-۱۴/۳±۱/۱۳	-۳۶±۲/۱۲
PTZ	۴/۳۹±۰/۶۱	-۴۷±۱/۷۳	۶۲/۲۵±۳/۲۷	۵/۱۸±۰/۳۵	-۷±۱/۰۶	-۲۹/۸۷±۰/۷
رینگر استاندارد	۰/۷۱±۰/۱۷	-۳۷/۶۷±۲/۱۰	۶۹/۳±۲/۶۱	۲/۸۴±۰/۱۷	-۲۰/۱۲±۰/۵۸	-۳۰/۶۲±۱/۰۲
ترکیب F	۰/۲۳±۰/۰۷	-۴۰/۲۵±۲/۹۲	۶۳/۳۲±۳/۹۴	۲/۵۱±۰/۱۹	-۲۰/۱۲±۲/۳	-۲۷/۷۵±۴/۲
رینگر استاندارد	۰/۹۶±۰/۲۵	-۵۱/۷۵±۵/۴۳	۷۳/۸۲±۲/۴۹	۲/۷۷±۰/۱۹	-۱۳/۷±۱/۱۱	-۴۰/۵±۴/۰۶
MIX	۱/۰۴±۰/۵۱	-۵۷/۵۵±۶/۲۷	۶۷/۴۷±۵/۶۵	۳/۴۶±۰/۶۰	-۹/۸±۱/۹۰	-۳۹±۶/۳۱

جدول ۲: میزان جریان های درونی رو به داخل و خارج غشاء سلول D5 به تفکیک گروههای مورد مطالعه (n=۴)

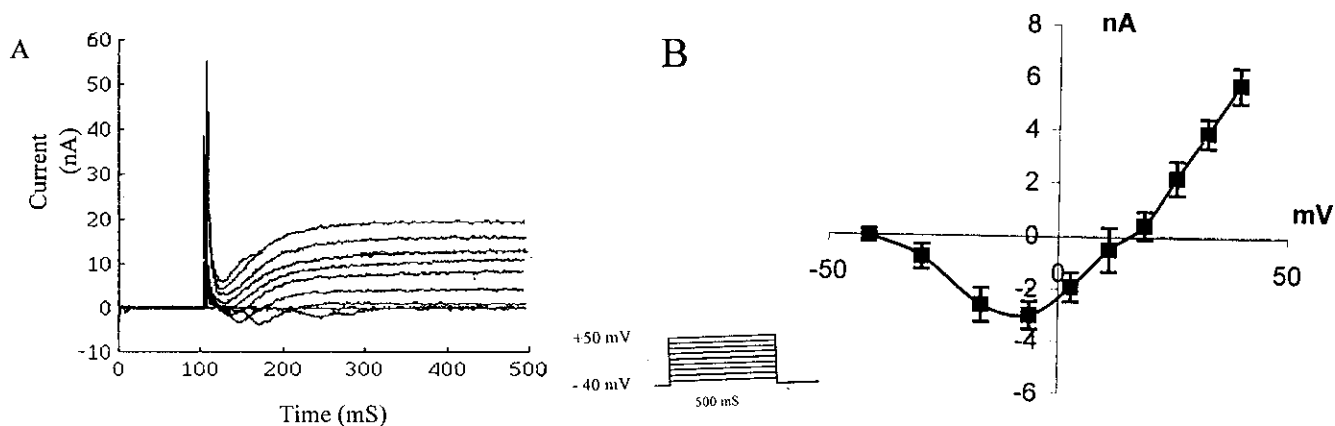
گروهها	ویژگی	آستانه جریان mv رو بداخل	حداکثر جریان رو بداخل (nA)	ولتاژ حداکثر جریان رو بداخل (mv)	حداکثر جریان رو بخارج (nA)	ولتاژ حداکثر جریان رو بخارج (mv)
رینگر استاندارد		-۴۱/۲۹±۰/۴۷	-۳/۸۴±۰/۶۶	-۵/۷۷±۴/۱۷	۶/۲۳±۰/۹۳	۴۰/۰۸±۰/۸۶
PTZ		-۴۱/۲۲±۰/۲۷	-۳/۱۲±۰/۴۹	-۸/۵۶±۳/۰۶	۵/۷۳±۰/۶۸	۳۹/۴۲±۲/۱۴
ترکیب F در حضور PTZ		-۴۰/۶۵±۰/۱۲	-۲/۷۸±۱/۰۳	-۱۴/۵۴±۲/۹۷	۶/۱۶±۰/۷۶	۳۷/۶۵±۲/۹
رینگر استاندارد		-۴۱/۶۱±۰/۳	-۷/۰۱±۲/۰۵	-۴/۴۶±۶/۲۱	۵/۳۷±۰/۹۲	۳۶/۴۳±۴/۷۵
ترکیب F		-۴۱/۴۲±۰/۱۲	-۴/۳۱±۱/۵۶	-۹/۳۴±۴/۸۷	۵/۰۵±۰/۳۹	۴۱/۶±۱/۵۷
PTZ در حضور ترکیب F		-۴۱/۰۳±۰/۴۱	-۳/۰۹±۱/۵۷	-۱۰/۹۵±۴/۸۷	۴/۸۸±۰/۶۳	۴۱/۵۹±۱/۹۹
رینگر استاندارد		-۴۱/۳۸±۰/۱۲	-۵/۴±۱/۰۱	-۷/۸۲±۴/۳۸	۴/۶۶±۰/۲۷	۴۰/۱۶±۳/۹
کاربرد همزمان PTZ و F		-۴۱/۲۵±۰/۰۲	-۳/۱۲±۰/۱۷	-۸/۴۱±۶/۸۵	۳/۹۱±۰/۵۳	۴۰/۳۶±۳/۶۶



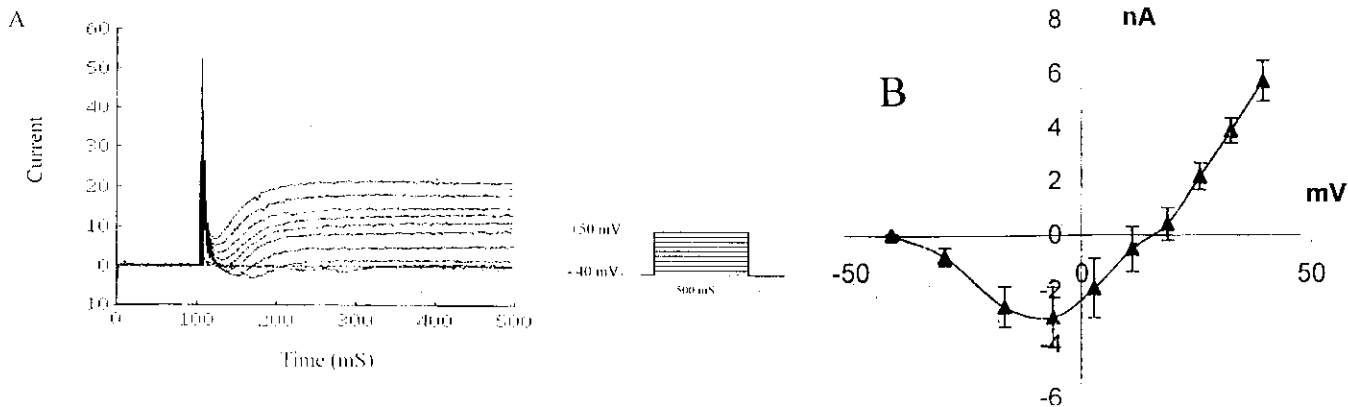
شکل ۲: فعالیت خودی سلول D5 حلزون باغی در رینگر استاندارد (A)، ۱۰ دقیقه پس از کاربرد ترکیب F در محیط سلول (B)، کاربرد PTZ پس از ترکیب کوئینازولینونی (C)



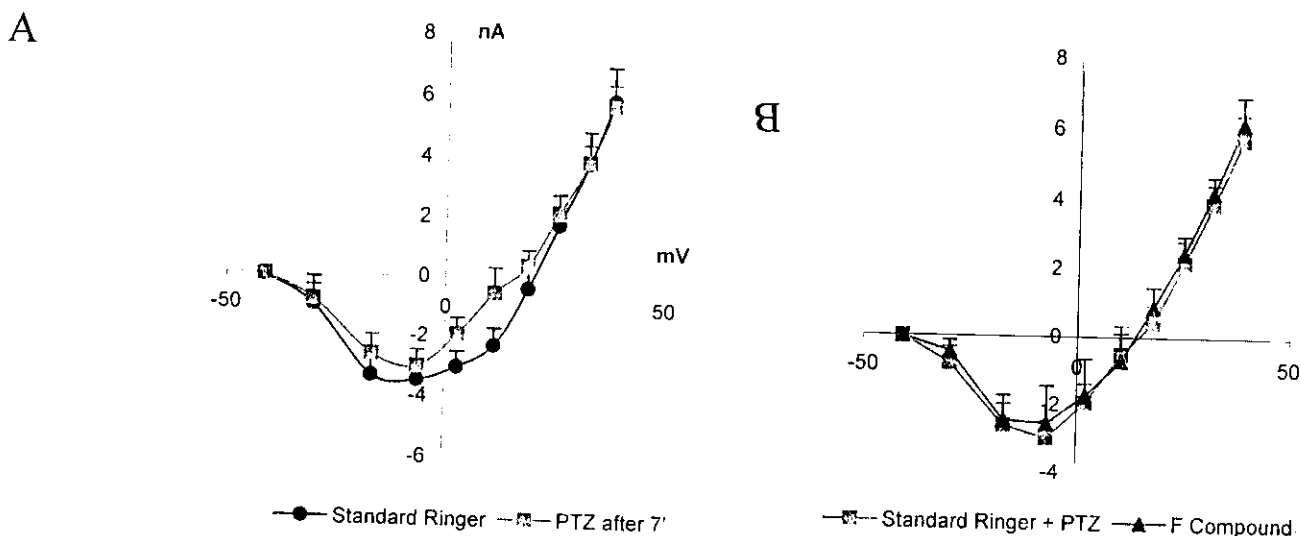
شکل ۱: فعالیت خودبخودی سلول D5 حلزون باغی، (A) در رینگر استاندارد، (B) رینگر حاوی ترکیب PTZ بعد از گذشت ۵ دقیقه، (C) پس از اضافه شدن ترکیب F به رینگر حاوی پنتیلین تترازول، (D) پس از کاربرد مستقیم ترکیب در محیط سلول، (E) بکار بردن PTZ پس از ترکیب کوئینازولینونی، (F) کاربرد همزمان ترکیب F و پنتیلین تترازول



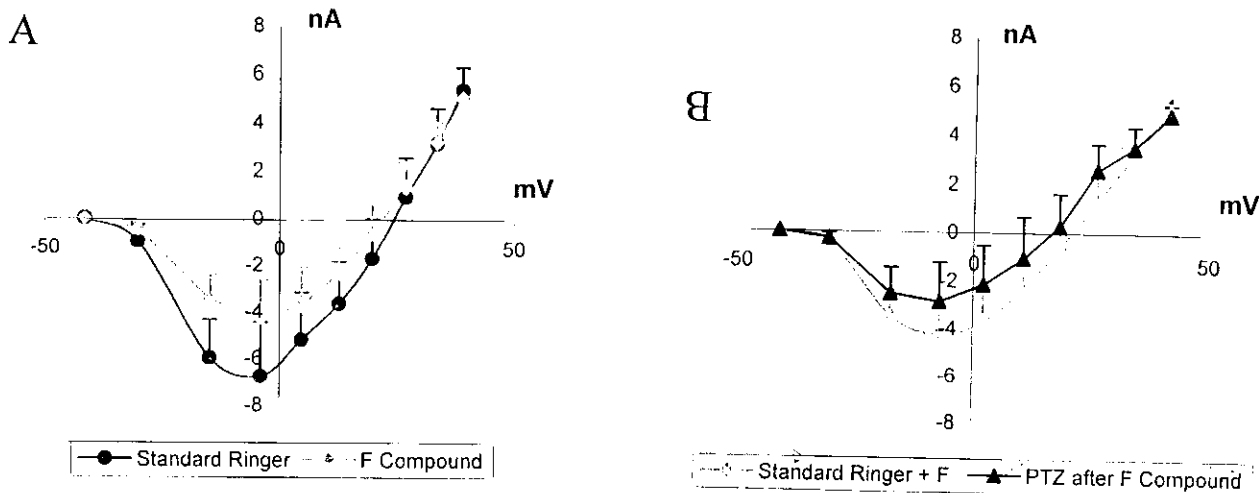
شکل ۳: (A) جریانهای رویداخل و روبخارج حاصل از دپلاریزاسیون غشا جسم سلولی نورون D5 حلزون باغی، از پتانسیل -۴۰ تا +۵۰ میلی ولت در مراحل ۱۰ میلی ولتی به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه در رینگر استاندارد و در حضور پنتیلین تترازول (۲۵ میلی مولار)، (B) ارتباط جریان-ولتاژ جریان-ولتاژ جریانهای رویداخل و روبخارج در پتانسیلهای فرمانی مختلف از پتانسیل نگهدارنده -۴۰ تا -۵۰ میلی ولت



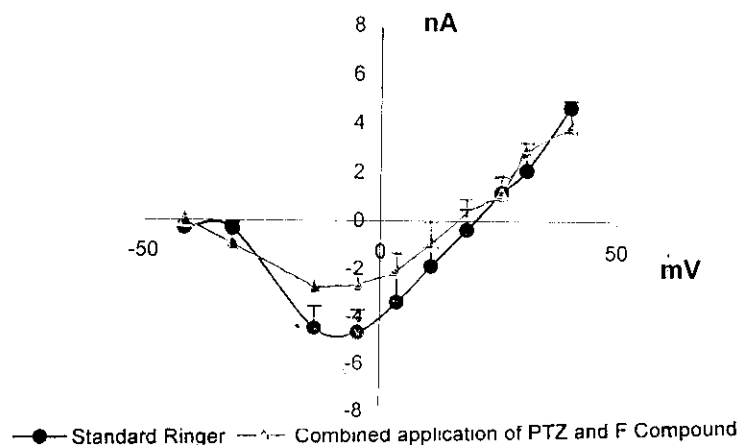
شکل ۴: (A) جریانهای رویداخل و رویداخل حاصل از دیلاریاسیون غشا جسم سلولی نورون DS حلزون باغی، از پتانسیل -۴۰ تا +۵۰ میلی‌ولت در مراحل ۱۰ میلی‌ولتی به مدت ۵۰۰ میلی‌ثانیه، ۱۰ دقیقه پس از اضافه شدن ترکیب F با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و در حضور پنتین تترازول (۲۵ میلی‌مولار)، (B) ارتباط جریان-ولتاژ جریانهای رویداخل و رویداخل در پتانسیلهای فرمانی مختلف از پتانسیل نگهدارنده -۴۰ تا +۵۰ میلی‌ولت



شکل ۵: مقایسه ارتباط جریان-ولتاژ جریانهای رویداخل و رویداخل در پتانسیلهای فرمانی مختلف از پتانسیل نگهدارنده -۴۰ تا +۵۰ میلی‌ولت، در حضور پنتین تترازول (۲۵ میلی‌مولار)، (B) پس از اضافه شدن ترکیب F با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در حضور پنتین تترازول (۴-۵)



شکل ۶: مقایسه ارتباط جریان-ولتاژ جریانهای رویداخل و رویداخل در پتانسیلهای فرمانی مختلف از پتانسیل نگهدارنده -۴۰ تا +۵۰ میلی‌ولت، در حضور ترکیب F با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار، (B) در حضور PTZ و ترکیب F



شکل ۷: مقایسه ارتباط جریان-ولتاژ جریانهای رویداخل و روبخارج در پتانسیل‌های فرمانی مختلف از پتانسیل نگهدارنده -40 تا $+50$ میلی‌ولت، با کاربرد همزمان PTZ و ترکیب کوئینازولینونی F

بحث

در رابطه با نقش ترکیبات کوئینازولینونی در درمان تشنج، تحقیقات مختلفی انجام شده است. Jackson و همکاران (۱۹۹۶)، اثرات ضد تشنجی دو دارو تحت عنوان NNC 14-0184 و NNC 14-0189 را که از مشتقات کوئینازولینون‌ها هستند، در موش سوری و موش صحرایی (Rat) بررسی کرده و با اثرات ضد تشنجی دو داروی رایج بنام دیازپام و کلونازپام مقایسه کردند (۳). آنها نشان دادند که این دو دارو قادر به حفاظت از تشنج ناشی از PTZ بوده و نیز در موشهایی که کیندلینگ آمیگدال در آنها صورت گرفته بود، اثر ضد تشنجی مؤثری داشتند (۳). همچنین Wolfe و همکارانش (۱۹۹۰) ترکیبات جدیدی از ۴-کوئینازولینون‌ها معرفی کردند که در درمان تشنج ناشی از تزریق زیر جلدی مترازول (ScMET) ^۱ و تشنج ناشی از الکتروشوک (MES) ^۲ در موشهایی که این داروها را به صورت داخل صفاقی دریافت کرده بودند، اثر درمانی خوبی داشتند و عوارض جانبی آنها نیز کمتر بود (۱۰).

نتایج تحقیق حاضر که در آن اثرات ترکیب جدید کوئینازولینونی بر فعالیت الکتریکی سلول و جریانهای یونی در مدل صرعی و نیز در شرایط نرمال بررسی شده است، نشان می‌دهد که کاربرد ترکیب کوئینازولینونی مورد آزمایش موجب کاهش فرکانس شلیک پتانسیل‌های عمل خودبخودی سلول و هیپرپلاریزه شدن غشا می‌گردد. این مسئله نشان دهنده کاهش تحریک پذیری سلول است و می‌تواند بیسانگر تغییر کند اکتانسه‌های یونی غشا باشد. کاهش تحریک‌پذیری بصورت کاهش میزان (Rate) شلیک اسپایکها می‌باشد که بدلیل افزایش فاصله بین آنها رخ می‌دهد. افزایش فاصله بین اسپایکها نیز می‌تواند ناشی از افزایش کنداکتانس K^+ باشد که در جهت خروج یون پتاسیم از سلول عمل کرده و ضمناً موجب هیپرپلاریزه شدن غشا هم می‌شود. جریانهای روبخارج پتاسیمی

متعددی در تنظیم فرکانس سلول نقش دارند. از جمله می‌توان به جریانهای پتاسیمی وابسته به کلسیم، جریان پتاسیمی سریع (I_A) و جریان پتاسیمی حساس به موسکارین (I_M) اشاره کرد (۱۱). شاید ترکیب F با فعال کردن این جریانها، موجب کاهش فرکانس پتانسیل عمل گردد. البته با توجه به اینکه ورود جریانهای سدیم و کلسیم بداخل سلول موجب افزایش فرکانس می‌گردد، بالطبع کاهش ورود این جریانها، می‌تواند موجب کاهش فرکانس شلیک پتانسیل‌های عمل گردد.

از اثرات دیگر کاربرد ترکیب F، افزایش دامنه AHP می‌باشد. تحقیقات نشان می‌دهد که در بروز AHP، کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم دخالت دارند. مهار این کانالها باعث کاهش AHP شده و بدنبال آن نورونها مکرراً فعالیت می‌نمایند (۱۲). بنظر می‌رسد که ترکیب F توانسته فعالیت کانالهای پتاسیمی رو بخارج وابسته به کلسیم را افزایش دهد و در نتیجه علاوه بر کاهش فرکانس شلیک پتانسیل‌های عمل، سبب افزایش دامنه AHP گردد.

همچنین نتایج این تحقیق حاکی از آن است که ترکیب کوئینازولینونی مورد آزمایش، موجب کاهش مدت و دامنه پتانسیل عمل می‌شود. مدت پتانسیل عمل بستگی به سرعت دپلاریزاسیون و ریلاریزاسیون دارد و دامنه پتانسیل عمل نیز تابع پتانسیل استراحت سلول و مقدار دپلاریزاسیون است. از آنجا که ترکیب F پتانسیل غشا را هیپرپلاریزه کرده است، پس کاهش دامنه بخاطر کاهش اورشوت پتانسیل عمل می‌باشد. از سوی دیگر با توجه به اینکه میزان سرعت دپلاریزاسیون و ریلاریزاسیون، علاوه بر جریانهای رو خارج، به جریانهای رویداخل هم بستگی دارد، بنابراین کاهش دامنه و مدت پتانسیل عمل ممکن است ناشی از کاهش جریانات فوق باشد.

افزایش این جریانها می‌گردد. بدین ترتیب بنظر می‌رسد که کاربرد ترکیب F بعد از PTZ توانسته جریانهای رو بخارج پتاسیمی را که توسط PTZ مهار شده بود، تا حدودی فعال کند.

یکی از اثرات احتمالی این ترکیب کوئینازولینونی، اثر بر کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم است. این کانالها علاوه بر ولتاژ، به کلسیم درون سلولی هم حساسند. همچنین بنظر می‌رسد که این ترکیب توانسته فعالیت کانالهای M پتاسیمی را نیز افزایش دهد. از آنجا که مهار کانالهای M اثر ضد تطابقی داشته و منجر به شلیک‌های مکرر نورونی می‌شود (۱۸) لذا فعال‌تر کردن این جریان می‌تواند منجر به کاهش شلیک‌های نورونی شود که در بخش کلمپ جریان هم مشاهده شد.

اثر بکاربردن PTZ متعاقب استفاده قبلی از ترکیب کوئینازولینونی F
به منظور بررسی اثر ترکیب کوئینازولینونی F بر فعالیت الکتریکی سلول و نیز به منظور آزمودن این فرضیه که آیا این ترکیب جدید می‌تواند سبب کاهش احتمال بروز تشنج گردد، در بخش دیگری از آزمایشات، سلولها ابتدا در معرض این ترکیب قرار گرفتند و بعد از ثبت فعالیت الکتریکی سلول و جریانات یونی غشا، PTZ به محیط خارج سلولی پرفیوز گردید. مطابق نتایج این بخش از آزمایشات، علیرغم آنکه بکار بردن ترکیب F به تنهایی بر روی سلول، سبب کاهش تحریک پذیری سلول می‌گردد ولی اضافه کردن PTZ به محیط خارج سلولی نورونهایی که قبلا در معرض ترکیب F قرار گرفته بودند اثراتی مشابه با اثر افزودن مستقیم PTZ به محیط خارج سلولی نورونها دارد و درمان قبلی با ترکیب F نتوانسته از اثرات PTZ بر نورونها ممانعت کند و با این غلظت اثرات درمانی آن بیشتر از اثرات پیشگیری کننده آن است.

نتایج آزمایشات کلمپ ولتاژ هم موید این مطلب است و بکار بردن PTZ پس از ترکیب F، کاهش جریانهای رو بداخل و رو بخارج، بدون تغییر کینتیک آنها را در پی داشت.

اثرات کاربرد همزمان ترکیب F و PTZ:

با مقایسه در صد تغییرات ناشی از PTZ بر روی ویژگیهای پتانسیل عمل خودبخودی سلول D5 مشخص می‌شود که در شرایط کاربرد همزمان این دو ماده، اثرات افزایش تحریک پذیری PTZ بر فعالیت الکتریکی سلول تا حدود زیادی خنثی می‌شود. نتایج کلمپ ولتاژ هم نشان می‌دهد که تحت شرایط فوق، جریانهای رو بداخل کاهش چشمگیری یافته است و انتظار می‌رود که فعالیت سلول تحت این شرایط بسیار کاهش یابد. اما از سوی دیگر می‌بینیم که جریانهای رو

در رابطه با اثر ترکیب F بر جریانهای رو بداخل، بنظر می‌رسد که این ماده بر روی جریانهای کلسیمی اثر داشته باشد زیرا هم چنانکه افزایش ورود کلسیم به سلول باعث کاهش سرعت دپلاریزاسیون و طولانی شدن مدت پتانسیل عمل می‌شود، عکس این موضوع نیز صادق است. یعنی جلوگیری از ورود کلسیم به سلول، می‌تواند منجر به کوتاه شدن پتانسیل عمل گردد. چنانکه Iijima و همکارانش (۱۹۸۸) همین اثر را در مورد MCI-176 (یکی از مشتقات ۳H-4- کوئینازولینون) مشاهده کردند. این ماده به عنوان یکی از آنتاگونیست‌های آلی کلسیم، موجب مهار جریان کلسیمی در سلولهای بطن کوچک هندی شده و طول مدت پتانسیل عمل را در سلولها کاهش داده است (۱۳).

اثرات ترکیب کوئینازولینونی F بر جریانات یونی غشا در مدل صرعی:
نتایج آزمایشات انجام شده با تکنیک کلمپ ولتاژ، نشان می‌دهد که با بکار بردن ترکیب F در حضور PTZ، میزان حداکثر جریان رو بداخل نسبت به حالت کنترل کاهش یافته و پتانسیل آن نیز تا حدودی به سمت ولتاژهای منفی شیفت نموده است ضمناً آستانه جریان فوق هم، قدری به سمت ولتاژهای دپلاریزه تر جابجا شده است. به این ترتیب بنظر می‌رسد که این ترکیب از ورود یونهای مثبت به داخل سلول کاسته است و ضمناً ورود این یونها قدری با تاخیر شروع شده و سریعتر هم به مقدار حداکثر رسیده است. تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که ورود یونهای مثبت (به خصوص یون کلسیم) بدرون سلول و یا افزایش فعالیت کلسیم درون سلولی (از طریق آزاد شدن از ذخایر داخل سلولی) در بروز آثار و علائم صرع نقش دارد (۱۶-۱۴). کاهش ورود یونهای مثبت بدرون سلول موجب کاهش علائم مربوطه خواهد شد. Schumacher و همکارانش با انجام آزمایشات Patch Clamp بر روی سلولهای گرانولی هیپوکامپ افراد مبتلا به صرع گیجگاهی و مقاوم به دارو متوجه شدند که داروهایی نظیر فنی تونین و کاربامازپین (داروهای ضد صرع رایج) از طریق مهار برگشت‌پذیر و وابسته به غلظت کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ با آستانه بالا (HVA) اثرات ضد صرعی خود را اعمال می‌نمایند (۱۷).

در اینجا هم با توجه به نتایج ناشی از کلمپ جریان از یکسو و نتایج حاصل از کلمپ ولتاژ از سوی دیگر بنظر می‌رسد که ترکیب F موجب کاهش جریانهای رو بداخل می‌گردد.

بررسی نتایج حاصل از تکنیک کلمپ ولتاژ نشان می‌دهد که ترکیب F بر جریانهای رو بخارج هم اثر کرده و در حضور PTZ سبب

می رود که با تحقیقات بیشتر در زمینه بررسی اثرات جانبی این ماده بتوان در آینده به عنوان یکی از داروهای ضد صرع موثر از آن استفاده نمود.

بخارج هم تا حدود زیادی در مقایسه با وضعیت های قبلی کاهش یافته است و در مجموع سلول وضعیت بهتری در مقایسه با کاربرد PTZ به تنهایی دارد.

نتیجه گیری

با توجه به شیوع گسترده بیماری صرع در جوامع انسانی از یکسو و محدود بودن داروهای ضد صرع و نیز عوارض جانبی سوء بسیاری از آنها و به خصوص ایجاد تحمل در بیماران از سوی دیگر، لزوم دستیابی به داروهای ضد صرع جدید ضروری می باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ترکیب کوئینازولینونی جدید با ایجاد هیپرپلاریزاسیون و کاهش فرکانس شلیک پتانسیل های عمل موجب کاهش تحریک پذیری در مدل صرع ناشی از PTZ شده است. امید آن

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مراتب تقدیر خود را از آقای دکتر سید محمد فیروزآبادی به جهت طراحی نرم افزار Pulse و Analyse برای ثبت و آنالیز داده ها و نیز از سرکار خانم دکتر مینو دبیری و آقای دکتر کوروش رادمقدم برای سنتز ترکیب کوئینازولینونی، ابراز می دارند. هزینه انجام این پروژه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به منظور انجام طرح پژوهشی شماره ۳/۳۰۷ تامین گردیده که بدینوسیله تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

- 1- Sugaya E, Sugaya A, Kajiwara K, et al. Cellular physiology of epileptogenic phenomena. In: Lily Tong, Stekentang (eds.). *Neurochemistry in Clinical Application*, Plenum press, New York, 1994.
- 2- Sugaya E, Sugaya A. Cellular physiology of epileptogenic phenomena and its application of therapy intractable epilepsy. *Comp Biochem Physiol* 1991; 98(1):249-70.
- 3- Jackson HC, Hansen HC, Kristiansen M, et al. Anticonvulsant profile of the imidazoquinazolines NNC 14-0185 and NNC 14-0189 in rats and mice. *Pharmacol* 1996; 308:21-30.
- 4- عمرانی س، جان احمدی م، گنج خانی م. فردوسی ر. اثر داروی صرع زای پنتیلن تترازول بر ویژگیهای پتانسیل عمل سلول D5 حلزون باغی با استفاده از روش ثبت داخل سلولی. *یاخته* ۱۳۷۹؛ شماره ۸ صفحات: ۱۷-۲۲۲.
- 5- گنج خانی م، جان احمدی م، فتحی مقدم ه، و همکاران. اثر داروی صرع زای پنتیلن تترازول بر جریانهای یونی نورو D5 حلزون باغی با استفاده از ثبت داخل سلولی. *یاخته* ۱۳۷۹ شماره ۸ صفحات: ۲۹-۲۲۳.
- 6- Faugier S, Willows AOD. Behavior and nerve cell membrane effects of an epileptic agent (Metrazol) in a mollusk. *Brain Res* 1973;52:243-60.
- 7- Buyuktimkin S, Ekinci AC, Otuk G. Pharmacological studies quaternized 4(3H)-quinazolinones. *J Pharmac Sci* 1992; 81(11): 1092-94.
- 8- Nawrocka W, Stasko JJ. New quinazolinones - 4. Anti inflammatory and anticonvulsant agents, new classes of pharmacologically active compounds. *Bull Chim Farm* 1998;137(2):35-9.
- 9- Taylor PS. Selectivity and patch measurement of A-Current in Helix aspersa neurones. *J Physiol* 1987;388: 437-47.
- 10- Wolfe JF, Rathman TL, Sleevi MC, et al. Synthesis and anticonvulsant activity of some new 2-substituted 3-aryl-4(3H)-quinazolinones. *J Med Chem* 1990; 33:161-6.
- 11- Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, et al. *Fundamental Neuroscience*. Academic press ; 1999:129-154.
- 12- Szente MB, Baranyi A, Woody CD. Intracellular injection of apamin reduces slow potassium current mediating after hyperpolarizations and IPSPs in neocortical neurones of cats. *Brain Res* 1988; 461: 64-74.
- 13- Iijima T, Takahashi K, Taria N. Voltage- and use- dependent block of the inward calcium current by MCI-176, a new non- Dihydropyridine calcium antagonist, in canine ventricular muscles and single ventricular cells of the Guinea-pig. *Japan J Pharmacol* 1988; 46: 155-64.
- 14- Papp A, Feher O. Analysis of the slow inward current induced by pentylentetrazol. *Exp Brain Res* 1991; 20: 31-34.

- 15- Papp A, Feher O, Erdelyi L. Properties of the slow inward current induced by pentylentetrazol in Helix neurons. *Epilepsy Res* 1990; 6:119-25.
- 16- Wiemann M, Jones D, Straub H, et al. Simultaneous blockade of intracellular calcium increases and of neuronal epileptiform depolarizations by verapamil. *Brain Res* 1996;734(1-2):49-54.
- 17- Schumacher TB, Beck H, Steinhauser C, et al. Effects of phenytoin, carbamazepine and gabapentine on calcium channels in hippocampal granule cells from patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1998;39(4):355-63.
- 18- Siegelbaum SA, Schwartz JH, Kandel ER. Modulation of synaptic transmission, Second messengers, In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (eds.) *Principles of Neural Science*. McGraw Hill 2000; 241-3.