



Electrophysiological investigation of the cellular effect of anethole, the chief constitute of anise, on F1 neuronal excitability in garden snail

Zahra Ghasemi^{1,2}, Hassanpour-Ezatti M², Mohammad Kamalinejad³, Mahyar Janahmadi^{1*}

1. Neuroscience Research Centre and Dept. of Physiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. Biology, Faculty of Basic Science, Shahed University, Tehran, Iran

3. Dept. Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 21 Nov 2010

Accepted: 19 Jan 2011

Abstract

Introduction: Anethole is the main constituent of *Pimpinella anisum L.* (anise), a herbaceous annual plant which has several therapeutic effects. In the folk medicine, anise is employed as an antiepileptic drug. Specifically, this study was focused on the cellular effect of anethole, an aromatic compound in essential oils from anise and camphor. Anethole has various physiological effects on the cardiovascular system and smooth and skeletal muscles. However, despite these persistent effects, there is little information available about the actions of anethole on nerve cells. Therefore, a major goal of the present research was to investigate the possible cellular mechanisms underlying the effect of anethole on the neural excitability and action potential characteristics in snail neurons.

Methods: Intracellular recordings were made under the current clamp condition on F1 cells of *Helix aspersa*. Following extracellular application of anethole (0.5% or 2%), changes in the firing pattern and action potential parameters were assessed and compared to control condition.

Results: Application of anethole (0.5% and 2%) led to a significant increase in the action potential amplitude and a reduction in the peak area and time to peak. In the presence of 0.5% anethole, the after hyperpolarization (AHP) amplitude was significantly decreased, while the firing frequency of neurons was increased. However, 2% anethole did not affect the AHP amplitude, but significantly reduced the firing frequency of action potentials.

Conclusion: Based on the effect of anethole on the action potential parameters, it can be concluded that it probably affects the voltage gated ion channels function, including Ca²⁺ channels and/or Ca²⁺ dependent K⁺ channels activity.

Key words: Anethole, Intracellular recording, neuronal excitability, ion channels

* Corresponding author e-mail: mjanahmadi@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی الکتروفیزیولوژیک اثر سلولی آنتول، ماده موثر آنیسون، بر تحریک پذیرى نورون F1 حلزون باغی

زهرا قاسمی^{۱*}، مجید حسن پور عزتی^۲، محمد کمالی نژاد^۳، مهیار جان احمدی^{۴*}

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

۳. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۲۹ دی ۱۳۸۹

دریافت: ۳۰ آذر ۱۳۸۹

چکیده

مقدمه: گیاه آنیسون دارای کاربردهای پزشکی و بیولوژیکی فراوانی است از جمله اینکه، از دیرباز بعنوان دارویی ضد صرع مصرف می شد. بسیاری از اثرات آن به ترکیب اصلی تشکیل دهنده آن یعنی آنتول نسبت داده می شود. مطالعات متعددی تاثیر آنتول را بر روی عملکرد سیستم قلبی-عروقی، عضلات صاف و اسکلتی نشان داده اند اما تاکنون اثر آن بر روی سلول های عصبی بررسی نشده است. بنابراین، هدف ما در این تحقیق بررسی تاثیر مقادیر مختلف آنتول بر فعالیت الکتریکی نورون F1 حلزون می باشد.

روش ها: تمامی ثبت های داخل سلولی تحت شرایط کلمپ جریان روی سلول F1 حلزون باغی (*Helix aspersa*) انجام گرفت. تاثیر مقادیر ۰/۵ و ۲ درصد آنتول بر الگوی شلیک و ویژگی های پتانسیل عمل بررسی و با شرایط کنترل مقایسه شد.

یافته ها: هر دو غلظت آنتول در مقایسه با شرایط کنترل موجب افزایش دامنه پتانسیل عمل و کاهش مدت حداکثر دامنه ولتاژی و سطح زیر منحنی در ناحیه ی قله شدند. هر چند آنتول ۰/۵٪ منجر به کاهش معنی دار ($p < 0.001$) دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون (AHP) و افزایش کاهش معنی دار ($p < 0.001$) فرکانس شلیک پتانسیل عمل شد اما مقادیر بالای آن (۲٪) تاثیر معنی داری روی دامنه AHP نداشته ولی با کاهش شدید ($p < 0.001$) در فرکانس شلیک همراه بود.

نتیجه گیری: اثر سلولی محتمل آنتول (۰/۵٪ و ۲٪) بر روی دامنه پتانسیل عمل و اثر تحریکی این ماده بر روی فعالیت کانال های سدیمی و احتمالاً کلسیمی وابسته به ولتاژ درگیر در فاز بالا روی پتانسیل عمل است. همچنین تغییرات ایجاد شده توسط آنتول ۰/۵٪ در دامنه AHP بواسطه تاثیر آن بر کانال های پتاسیمی، وابسته به ولتاژ و وابسته به غلظت یون کلسیم داخل سلولی، درگیر در این فاز وساطت می شود.

واژه های کلیدی: آنتول، ثبت داخل سلولی، تحریک پذیری نورونی، کانالهای یونی

مقدمه

طولانی در علوم اعصاب باستانی ملل مختلف از جمله ایران می باشد [۱۳]. علیرغم شیوع بالا و تاریخچه طولانی، هنوز درمان اساسی برای آن کشف نشده است و در حال حاضر تنها روش درمانی، کنترل و مهار تشنجات صرعی است. در طب قرون وسطایی ایران، درمان صرع شامل پرهیز از عوامل صرع زا و تجویز داروهای گیاهی ضدصرع، از جمله؛ اسطوخودوس، سنبل الطیب، ترخون، بادیان رومی و غیره بود

صرع یکی از شایع ترین بیماری های عصبی با شیوعی حدود ۱-۰/۵ درصد در جهان است و دارای تاریخچه ای

mjanahmadi@yahoo.com

* نویسنده مسئول مکاتبات:

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

پمپ را موجب می شود [۱۷]. همچنین در زمینه اثر بر انقباض عضلات صاف دیواره عروق، آنتول در غلظت های پایین تر از طریق تحریک باز شدن کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ انقباض و در غلظت های بالاتر شل شدن عضلانی را موجب می شود [۳].

علیرغم بررسی های صورت گرفته نقش و تأثیر این ماده بر روی ویژگی های الکتروفیزیولوژیک و تحریک پذیری سلول های عصبی مشخص نیست. لذا هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر سلولی آنتول بعنوان ماده موثره برخی از داروهای گیاهی با اثرات ضد صرعی بر روی تحریک پذیری نورونی و ویژگی-های پتانسیل عمل (با تکیه بر عملکرد کانال های یونی) در سلول های عصبی حلزون باغی با استفاده از ثبت داخل سلولی و کلمپ جریان است.

مواد و روش ها

تمامی آزمایش ها بر روی سلول F1 در گانگلیون تحت مری حلزون باغی *Helix aspersa* انجام گرفت. حلزون ها از مناطق شمالی کشور، عمدتاً استان گیلان، جمع آوری شده و پس از انتقال به آزمایشگاه در شرایط مناسب از لحاظ نور، درجه حرارت مناسب (۲۳-۲۰ درجه سانتی گراد) و دسترسی به آب و غذا نگهداری می شدند. به منظور تغذیه آنها از برگ کاهو، کلم و خیار استفاده می شد. قبل از انجام آزمایش، به منظور ایجاد شرایط فیزیولوژیک یکسان برای نمونه های مورد استفاده و حصول اطمینان از فعال بودن حیوان، آنها را درون ظرف آب قرار داده و پس از بیرون آمدن از صدف و حرکت کردن، آزمایش بر روی آنها انجام می گرفت. در این حال ابتدا صدف حیوان به کمک انبر استخوان شکن برداشته شده و سپس به وسیله سوزن سر و دم حلزون بدون صدف روی تخته تشریح ثابت می گردید. آنگاه با ایجاد شکافی طولی در ناحیه سر حیوان، گانگلیون تحت مری شناسایی و به همراه عروق و اعصاب محیطی برداشته شده و به داخل محفظه ثبت منتقل و به کمک سوزن های حشره در این محفظه ی حاوی بستر سیلگارد (Dow corning, USA) و رینگر نرمال حلزون تثبیت می شد. رینگر نرمال حلزون محلولی نمکی (بر حسب میلی مولار): $\text{NaCl}(80)$, $\text{CaCl}_2(10)$, $\text{MgCl}_2(5)$, $\text{KCl}(4)$.

[۸]. یکی از این داروهای گیاهی آنیسون یا بادیان رومی (*Pimpinella anisum L.*) است. گیاهی علفی، یکساله، بومی مناطق غربی ایران، آسیای صغیر و مصر و جزایر یونان است و در بسیاری از کشورهای مناطق معتدل دنیا می روید [۱۴، ۱۵]. عصاره روغنی این گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و انگلی است [۱۹، ۲۱]. اخیراً مشخص شده است که عصاره های آبی و الکلی دانه های این گیاه دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی هستند [۹]. علاوه بر این، اثرات ضد تشنجی میوه های آنیسون نیز در موش مشاهده شده است [۱۵]. علیرغم تاریخچه ای که در مورد کاربرد این گیاه در درمان صرع وجود دارد و کارهای تحقیقاتی زیادی بر روی آن در این زمینه صورت گرفته است، نتایج آزمایشی که اخیراً توسط دکتر جان احمدی و همکاران بر روی نورون های حلزون توسط تکنیک ثبت داخل سلولی انجام گرفت، نشان داد که عصاره روغنی این گیاه موجب افزایش تحریک پذیری این سلول ها در شرایط کنترل یا بعد از فعالیت صرعی القا شده توسط پنتیلن تترازول می شود [۱۱].

از آنجاییکه مطالعات شیمیایی و فیتوشیمیایی بیانگر این موضوع هستند که اساسی ترین ترکیب موجود در عصاره روغنی حاصل از میوه های این گیاه، ترانس آنتول است (حدوداً ۹۳٪ ترکیب اصلی عصاره را تشکیل می دهد) [۱۰، ۱۸]، در این تحقیق به بررسی نقش آنتول، بعنوان عمده ترکیب سازنده عصاره آنیسون، بر روی فعالیت الکتریکی سلول عصبی F1 حلزون باغی پرداخته شده است و هدف اصلی یافتن مکانیسم احتمالی سلولی اثرات آن بر سلول های عصبی است.

آنتول (1-متوکسی-4-ایزوپروپینیل-بنزن) ترکیبی معطر با کاربردهای تجاری فراوان در صنایع غذایی و عطرسازی است [۴]. علاوه بر مصارف تجاری، این ماده بعنوان یکی از اجزای اصلی سازنده ی عصاره روغنی بسیاری از گیاهان از جمله، آنیسون (۹۳٪) [۱۰، ۱۸]، کرچک هندی (۲۷٪) [۴]، ترخون (۲۱/۲٪) [۱۶] و غیره می باشد. آنتول دارای اثرات متعدد فیزیولوژیک بر روی سیستم قلبی-عروق [۲۰]، عضلات صاف [۳] و اسکلتی است [۱]. بعنوان مثال، نشان داده شده است که دارای اثری دو فازی بر روی فعالیت پمپ Ca^{2+} -ATPase غشا شبکه سارکوپلاسمی عضلات صاف در کوچکچه هندی است. بطوریکه در غلظت های بالا ابتدا فعال شدن و سپس مهار

۰/۵٪ و در گروه دوم محلول با غلظت بالاتر (۲٪) به محیط خارج سلولی پرفیوژن شد و آنگاه از فعالیت الکتریکی سلول ها در این شرایط ثبت بعمل آمد و سپس در پایان به منظور بررسی برگشت پذیری اثرات آنتول بر روی فعالیت سلولی شستشو انجام گرفت، بدین صورت که رینگر نرمال حاوی آنتول از محیط خارج شد و سلول ها در معرض رینگر نرمال فاقد آنتول قرار گرفتند.

ویژگی های کمی پتانسیل عمل های ثبت شده توسط نرم افزار Chart اندازه گیری و ذخیره شد. آنگاه این مقادیر کمی بصورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده و مقایسه ی گروهها با روش آزمون ANOVA یکطرفه و پس آزمون Tukey HSD انجام گرفت و اختلاف های با $P \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

به منظور اندازه گیری پارامترهای الکتروفیزیولوژیکی که در شرایط مختلف کنترل و پس از کاربرد آنتول اندازه گیری شدند عبارتند از: پتانسیل استراحت غشا، دامنه پتانسیل عمل که از پتانسیل استراحت تا قله اسپایک را در بر می گیرد. مدت زمان حداکثر دامنه، ولتاژی که بیان کننده فاصله زمانی از شروع اسپایک تا جایی که حداکثر شیب وجود دارد. سطح زیر منحنی در ناحیه قله پتانسیل عمل، فرکانس یا تعداد پتانسیل های عمل در واحد زمان و دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون و نظم در شلیک. میزان نظم در شلیک توسط ضریب تغییرات (Coefficient of variation) که از تقسیم میانگین فواصل بین اسپایکها بر انحراف معیار (Standard deviation) محاسبه میگردد؛ بیان می شود. هرچه ضریب تغییرات فواصل اسپایکی بزرگتر بی نظمی بیشتر و بالعکس هرچه ضریب تغییرات فواصل اسپایکی کمتر نظم در شلیک پتانسیل عمل بیشتر می شود. بمنظور اندازه گیری پارامترهای الکتروفیزیولوژیکی، در هر سلول میانگین بیش از ۲۰ پتانسیل عمل محاسبه گردید.

یافته ها

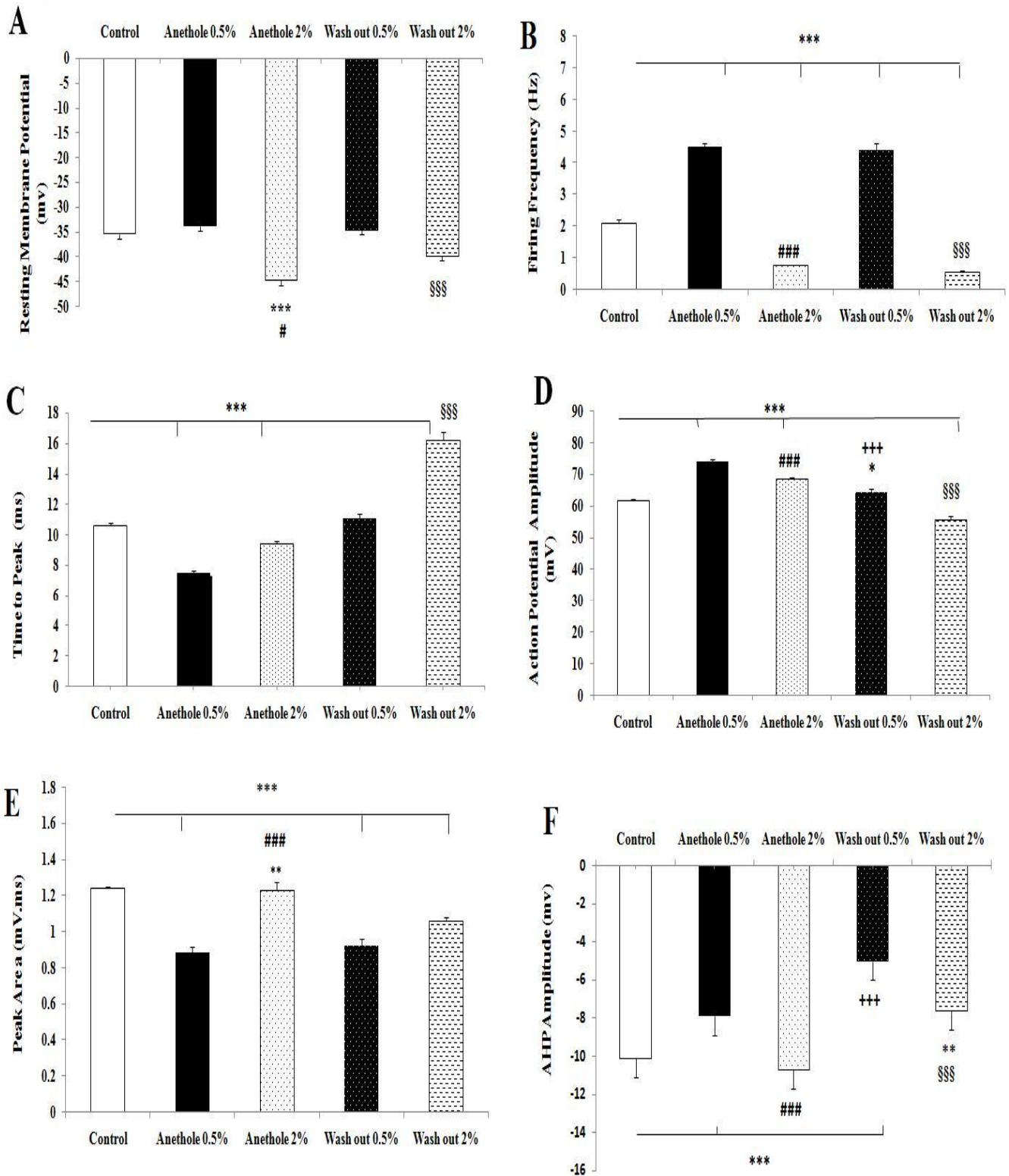
اثر غلظت پایین (۰/۵٪) آنتول بر ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک سلول F1: سلول F1 دارای میانگین پتانسیل استراحت $35/5 \pm 0/9$ میلی ولت (شکل A-۱) و میانگین

Glucose(10), HEPES(5) بود [۲۲]، pH محلول با افزودن Trizma Base در حد ۷/۶ تنظیم می شد. بافت پیوندی احاطه کننده نورون های این مجموعه گانگلیونی پس از ثابت نمودن گانگلیون در محفظه مخصوص توسط پنس های بسیار ظریف و بدون استفاده از آنزیمهای هضم کننده در زیراستریومیکروسکوپ انجام می شد [۲۴، ۱۲]. پس از آشکار شدن سلول F1، از شاخص هایی نظیر محل قرار گرفتن سلول، اندازه، رنگ و موقعیت آن نسبت به رشته های عصبی، جهت شناسایی سلول مورد نظر استفاده می گردد. آنگاه بافت مذکور در همین وضعیت درون محلول رینگر نرمال باقی می ماند، تا با شرایط جدید تطابق حاصل کند و سپس ثبت داخل سلولی انجام می شد.

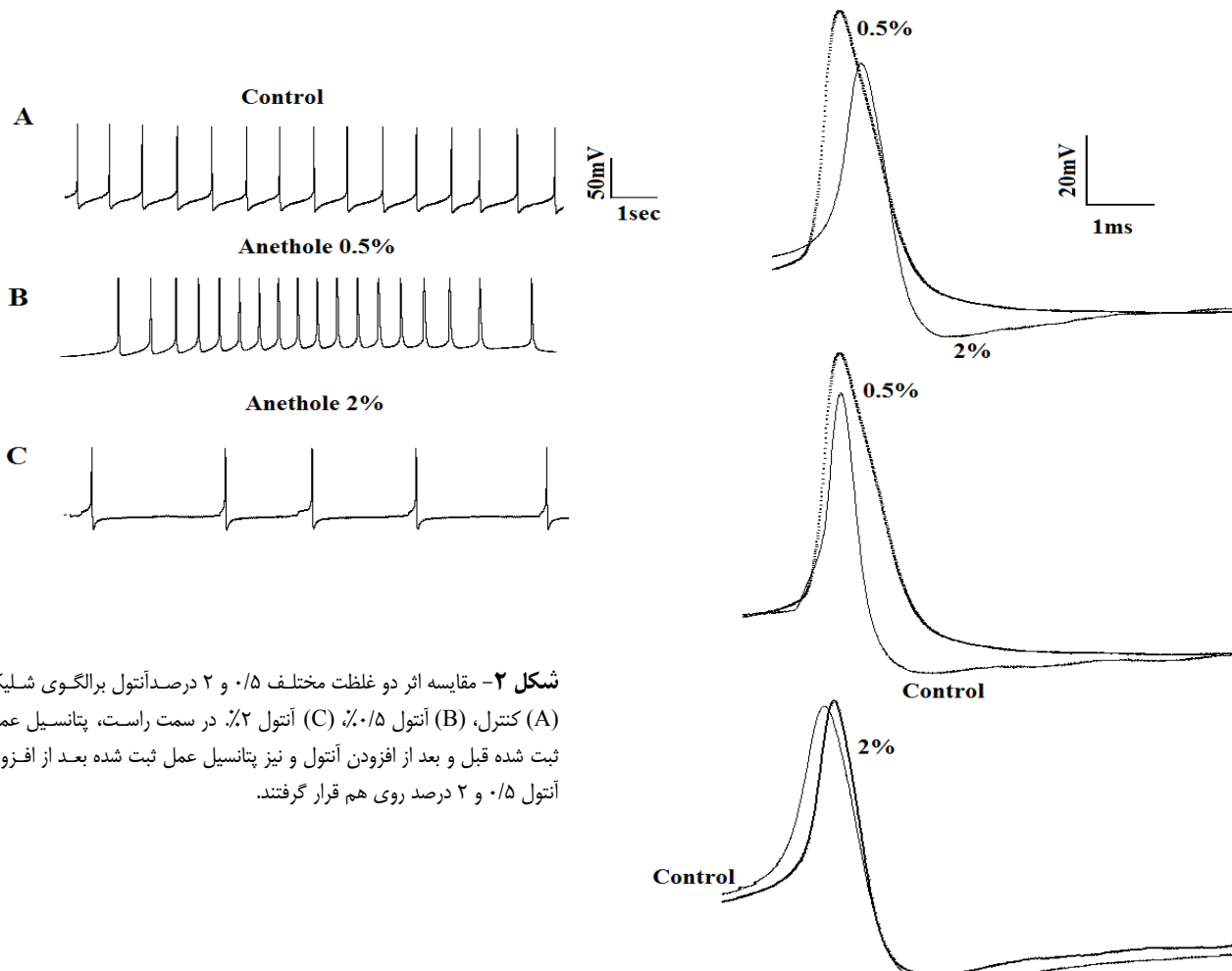
آنتول ۹۹٪ (Sigma, USA) خریداری شده و قبل از انجام آزمایشات مقادیر ۰/۵ و ۲ درصد از آن در محلول رینگر نرمال حلزون تهیه می شد.

ثبت از پتانسیل های عمل خودبخودی سلول ها در شرایط کنترل و متعاقب پرفیوژن رینگر حاوی آنتول، توسط آمپلی فایر Axoclamp 2B (Axon Instrument, USA) و با روش کلمپ جریان انجام می گرفت. میکروالکترودهای مورد استفاده از میکروپیت هایی با دیواره نازک از جنس بروسیلیکات (Clark Instrument, UK) بوده که به کمک میکروالکتروپولر عمودی (Narishige, Japan) تهیه می شدند. الکترودها با محلول KCl سه مولار پر شده و در صورت نشی نبودن اگر مقاومتی حدود ۵-۲ مگا اهم داشتند جهت ثبت مورد استفاده قرار می گرفتند. الکترودها مرجع در تمامی آزمایشات پل آگاری، متشکل از سیم نقره با پوشش کلرید نقره (Ag/AgCl) در سرنگی حاوی رینگر نرمال و آگار ۴٪، بوده که محفظه ی ثبت را به پتانسیل صفر (زمین) وصل می کرد. داده های ثبت شده از فعالیت سلول ها، توسط یک مبدل آنالوگ-دیجیتال ۱۶ بیتی (AD Instrument, Australia)، رقمی شده و جهت آنالیز ذخیره می گردید.

آزمایش ها در دو گروه آزمایشی مجزا انجام گرفت. در هر گروه حداقل از ۶ سلول ثبت داخل سلولی صورت گرفت و پس از آنکه به مدت ۵ دقیقه ثبت پایه از فعالیت خودبخودی سلولهای F1 در شرایط کنترل ($n > 6$) به عمل می آمد به منظور بررسی اثر آنتول، در گروه اول محلول آنتول با غلظت



شکل ۱- مقایسه اثرات آنتول در دو غلظت ۰/۵ و ۲ درصد (در هر گروه $n > 6$) بر ویژگی های الکتریکی سلول های عصبی F1. تاثیر آنتول بر پتانسیل استراحت (A)، فرکانس پتانسیل عمل (B)، مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی (C)، دامنه پتانسیل عمل (D)، سطح زیر منحنی در ناحیه قله (E)، دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل (F). * بیانگر تفاوت معنی دار میانگین گروهها با کنترل ($p < 0.05$), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), # نشان دهنده تفاوت معنی دار بین میانگین دو گروه آنتول ۰/۵ و ۲٪ و § نشان دهنده تفاوت معنی دار بین آنتول ۰/۵ و شستشو ($p < 0.05$), +++ $p < 0.001$), \$\$\$ $p < 0.001$).



شکل ۲- مقایسه اثر دو غلظت مختلف ۰/۵ و ۲ درصد آنتول بر الگوی شلیک. (A) کنترل، (B) آنتول ۰/۵٪، (C) آنتول ۲٪ در سمت راست، پتانسیل عمل ثبت شده قبل و بعد از افزودن آنتول و نیز پتانسیل عمل ثبت شده بعد از افزودن آنتول ۰/۵ و ۲ درصد روی هم قرار گرفتند.

فرکانس شلیک پتانسیل های عمل $2/1 \pm 0/12$ هرتز در شرایط کنترل بود (شکل ۱-B). میانگین مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی در این شرایط $10/6 \pm 0/18$ میلی ثانیه بود (شکل ۱-C) و میانگین دامنه و سطح زیر منحنی در ناحیه قله پتانسیل عمل به ترتیب، $61/6 \pm 0/62$ میلی ولت و $1/24 \pm 0/008$ میلی ولت در ثانیه بود (شکل ۱-D و ۱-E). دامنه پتانسیل های متعاقب هیپرپلاریزاسیون دارای میانگینی حدود $10/11 \pm 0/4$ میلی ولت بود (شکل ۱-F). در این گروه پس از کاربرد خارج سلولی آنتول ۰/۵ درصد، تغییراتی در الگوی فعالیت الکتریکی و خصوصیات پتانسیل های عمل بوجود آمد (شکل ۲). بطوریکه که فرکانس شلیک پتانسیل عمل به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۱-B) و به $5/4 \pm 0/12$ هرتز رسید ($P \leq 0/001$). میانگین سطح زیر منحنی و مدت زمان رسیدن به قله هر دو کاهش یافتند (شکل ۱-E و ۱-C) و به ترتیب به $0/88 \pm 0/035$ میلی ولت در ثانیه و $7/5 \pm 0/12$ میلی ثانیه ($P \leq 0/001$) رسیدند. میانگین دامنه پتانسیل عمل بطور معنی

داری ($p < 0.001$) افزایش یافت (شکل ۱-D) و به $73/95 \pm 0/75$ میلی ولت رسید. میانگین پتانسیل استراحت غشای سلول ها پس از افزودن آنتول ۰/۵٪ به محیط تنها اندکی دپلاریزه شد (شکل ۱-A) و به $-33/87 \pm 1/6$ میلی ولت رسید که این مقدار با شرایط کنترل اختلاف معنی داری از نظر آماری نداشت. همچنین دامنه پتانسیل های متعاقب هیپرپلاریزاسیون (شکل ۱-F) به $-7/9 \pm 0/17$ میلی ولت رسید ($P \leq 0/001$).

اثر غلظت بالای (۲٪) آنتول بر ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک سلول F1: سلول F1 در حضور غلظت بالاتر (۲٪) آنتول دارای فعالیت الکتریکی پایین تری نسبت به گروه کنترل بود، بطوریکه فرکانس شلیک پتانسیل عمل سلول کاهش معنی داری یافت (شکل ۱-B) و به $0/77 \pm 0/02$ هرتز رسید ($P \leq 0/001$). میانگین دامنه پتانسیل عمل افزایش یافت (شکل ۱-D) و به $68/7 \pm 0/16$ میلی ولت رسید ($P \leq 0/001$). میانگین سطح زیر منحنی و مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی

داده شده است [۱۸, ۱۰]. تأثیر مستقیم آنتول بر سیستم قلبی-عروقی، عضلات صاف و اسکلتی نشان داده است [۲۰, ۳, ۱]. بعنوان مثال گزارش شده است که آنتول بر روی فعالیت پمپ Ca^{2+} -ATPase شبکه سارکوپلاسمی عضلات صاف در خوگچه دارای اثری دو فازی است بطوریکه در غلظتهای بالا موجب ابتدا تشدید فعالیت پمپ و سپس مهار آن می شود [۱۷]. با اینحال اثر آن بر سلولهای عصبی تاکنون بررسی نشده است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که آنتول بر روی فعالیت الکتریکی سلول عصبی FI حلزون اثر می گذارد بگونه ای که در اکثر موارد این اثرات غیرقابل بازگشت می باشد. آنتول در غلظت های مختلف موجب تغییر الگوی شلیک پتانسیل عمل و منظم تر شدن آن شد، بعبارتی دیگر سلول ها در حضور آنتول به صورت منظم تری به فعالیت خودبخودی خود ادامه می دهند. ولی اثر غلظت های پایین و بالای آنتول تا حدودی با هم متفاوت بود.

از آنجاییکه غلظت های مختلف آنتول موجب افزایش دامنه پتانسیل عمل و کاهش مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی و سطح زیر منحنی در ناحیه قله شده اند می توان پیشنهاد کرد که آنتول باتاثر بر کانال های یونی درگیر در فاز بالاروی پتانسیل عمل، که کانال های سدیمی و احتمالاً کلسیمی وابسته به ولتاژ می باشند، دارای اثر تحریکی است و با افزایش فعالیت آنها موجب بروز تغییراتی در سرعت فاز بالاروی پتانسیل عمل شده است، هرچند تأثیر آنتول ۰/۵٪ بر روی پارامترهای فوق به مراتب بیشتر از آنتول ۲٪ بود.

همچنین در حضور آنتول ۰/۵٪ دامنه پتانسیل هیپرپلاریزاسون متعاقب کاهش و فرکانس شلیک پتانسیل عمل افزایش یافت. از آنجاییکه در بسیاری از نورون های مهره داران و بی مهرگان از جمله حلزون فاز رپولاریزاسیون پتانسیل عمل و پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسون توسط فعالیت دو دسته از کانال های پتاسیمی، یعنی کانالهای وابسته به ولتاژ و وابسته به غلظت یون آزاد کلسیم داخل سلولی (K_{Ca})، تعیین می شوند. کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم اساساً در شکل و فرکانس و نیز الگوی شلیک پتانسیل عمل نقش دارد [۷, ۶, ۵, ۲]. بررسیهای قبلی نشان داده است که این دسته از کانالهای یونی توسط سم زنبور عسل (Apamin)، مهارکننده

کاهش پیدا یافت (شکل ۱-E و ۱-C) و به ترتیب به، $۱/۲۳ \pm ۰/۰۴$ میلی ولت در ثانیه و $۹/۴۵ \pm ۰/۱۵$ میلی ثانیه رسید ($P \leq ۰/۰۱$ و $P \leq ۰/۰۰۱$). پتانسیل استراحت غشا نیز در این شرایط هیپرپلاریزه تر شد (شکل ۱-A) و به $۴۴/۷۵ \pm ۰/۳۲$ میلی ولت رسید ($P \leq ۰/۰۰۱$). میانگین دامنه پتانسیل های متعاقب هیپرپلاریزاسیون نسبت به شرایط کنترل تغییر چندانی پیدا نکرد و به $۱۰/۷ \pm ۰/۳۵$ میلی ولت رسید که از نظر آماری با شرایط کنترل تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۱-F).

مقادیر مربوط به ضرایب تغییرات، که شاخص میزان نظم در شلیک پتانسیل عمل است، در شرایط کنترل ۰/۲۹، در حضور آنتول ۰/۵ درصد $۰/۰۳$ و در حضور آنتول ۲٪ به ۰/۱۶ رسید. بنابراین در حضور آنتول الگوی شلیک پتانسیل عمل نسبت به شرایط کنترل منظم تر شده و این نظم در غلظت-های پایین تر مشهودتر می باشد. در هر دو گروه آزمایشی به منظور بررسی برگشت پذیری اثر غلظت های مختلف آنتول، پس از افزودن آنتول به محیط و ثبت فعالیت های پایه و تحریکی سلول ها بعد از گذشت زمانی حدود ۲۰-۱۵ دقیقه، این محلول ها از محیط حذف و رینگر نرمال جایگزین آنها شد. در این شرایط نیز از فعالیت سلول ها ثبت به عمل آمد. اثر آنتول بر ویژگیهای پتانسیل عمل در مواردی برگشت پذیر و در مواردی غیر قابل برگشت بود (شکل ۱).

در برخی مراحل آزمایش به منظور حذف تأثیر احتمالی تغییر پتانسیل استراحت غشا بر فرکانس و ویژگی های کمی پتانسیل های عمل ثبت شده، پتانسیل غشا با تزریق جریان منفی در حد پتانسیل استراحت ثابت نگه داشته می شد.

بحث

معمول ترین روش پزشکان ایران باستان برای درمان صرع، که از شایع ترین بیماریهای عصبی می باشد، شامل پرهیز از عوامل صرع زا و تجویز داروهای گیاهی ضدصرع، از جمله؛ اسطوخودوس، سنبل الطیب، ترخون، بادیان رومی و غیره بود [۸].

اثر ضد صرعی بادیان رومی یا آنیسون (Pimpinella anisum L.) به آنتول بعنوان مهمترین ماده موثره آن نسبت

دیگری که وجود دارد این است که این ماده از طریق مهار کانال های پتاسیمی غشا موجب بروز چنین اثراتی می شود [۲۰].

همین طور در زمینه تاثیر عصاره روغنی آنیسون بر فعالیت سلول های حلزون، دکتر جان احمدی و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که این ترکیب موجب تحریک پذیری بیش از حد این سلول ها می شود. مکانیسم سلولی محتمل برای بروز چنین اثراتی، افزایش فعالیت کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ یا مهار فعالیت کانال های پتاسیمی حساس به ولتاژ یا حساس به غلظت کلسیم داخل سلولی، و بدنبال آن کاهش دامنه AHP بیان شد. از آنجایی که حدوداً ۹۳٪ از ترکیب اصلی این عصاره را آنتول تشکیل می دهد و با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر می توان اثرات تحریک پذیری عصاره آنیسون بر روی فعالیت سلول های حلزون را ناشی از آنتول دانست و مکانیسم سلولی محتمل برای آنرا اثر بر روی عملکرد کانال های یونی بیان کرد [۱۱].

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۷۶۰ مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است و طرح مصوب شبکه علوم اعصاب ایران می باشد. بدین وسیله نویسندگان از زحمات سرکار خانم دکتر فرشته معتمدی ریاست محترم مرکز و شبکه در تامین اعتبار طرحهای مذکور کمال تشکر را دارند.

اختصاصی K_{Ca} ، مهار و موجب کاهش دامنه و طول مدت AHP پتانسل عمل می شود [۲۳]. در بررسی حاضر نیز دامنه AHP تحت تاثیر آنتول کاهش معنی داری یافت که احتمالاً بیانگر اثر مهاری مستقیم آن بر کانالهای مذکور و یا بطور غیر مستقیم بامهار ورود کلسیم موجب مهار کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم گردیده است و از این طریق موجب افزایش معنی دار میزان تحریک پذیری سلول گردید. با این حال، هرچند مقادیر بالای آنتول تاثیر قابل توجهی بر روی دامنه پتانسیل متعاقب هایپرپلاریزاسون نداشت لیکن باعث بروز کاهش شدید در فرکانس شلیک پتانسیل عمل شد که احتمالاً بیانگر اثرات غیراختصاصی آن بر کانالهای یونی دخیل در غلظتهای بالاتر است.

اثر دوگانه آنتول در مطالعه انجام شده توسط Soares و همکارانش (۲۰۰۷) که به بررسی اثر آنتول بر روی انقباض پذیری عضلات صاف دیواره عروق پرداخته اند نیز نشان داده شد. آنها گزارش کردند که آنتول در غلظت های پایین (10^{-4} - 10^{-6} مولار) موجب افزایش انقباض پذیری و در غلظت های بالا (10^{-2} - 10^{-3} مولار) باعث کاهش انقباض پذیری این عروق شده است، بگونه ای که در بالاترین مقدار آن عروق به وضعیت استراحت کامل خود برگشتند. بررسی های انجام شده در زمینه ی مکانیسم سلولی درگیر در چنین اثر آنتول نشان داد که این ماده اثرات خود را به واسطه تاثیر بر روی عملکرد کانال های حساس به ولتاژ کلسیمی اعمال می کند. به گونه ای که در حضور مهارکننده های این نوع کانال ها، از جمله نیفیدپین و دیلتیازم، این اثرات تحریکی آنتول ممانعت شدند. احتمال

References

- [1] Albuquerque AAC, Sorenson AL, Leal-Cardoso JH, Effects of essential oil of Croton Zehntneri, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *J Ethnopharmacol* 49 (1995) 4941-4949.
- [2] Bennett BD, Callaway JC, Wilson CJ, Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20 (2000) 8493-8503.
- [3] Coelho-de-Souza AN, Barata EL, Magalhaes PJC, Lima CC, Leal-Cardoso JH, Effects of the Essential Oil of Croton zehntneri, and its Constituent Estragole on Intestinal Smooth Muscle. *Phytother Res* 11 (1997) 299-304.
- [4] Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW, Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Ciência e Cultura* 29 (1977) 445.
- [5] Crest M, Gola M, Large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels are involved in both spike shaping and firing regulation in Helix neurones. *J Physiol* 465 (1993) 265-287.
- [6] Faber ES, Sah P, Physiological role of calcium-activated

- potassium currents in the rat lateral amygdale. *J Neurosci* 22 (2002) 1618-1628.
- [7] Goldberg JA, Wilson CJ, Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 25 (2005) 10230-10238.
- [8] Gorji A, Khaleghi M, History of epilepsy in medieval Iranian medicine. *Neurosci Biobehav Rev* 25 (2001) 455-461.
- [9] Gülcin I, Oktay M, Kirecci E, Küfrevioğlu OI, Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem* 83 (2003) 371-382.
- [10] Hansel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, editors. *Pimpinella*. In: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. 5th ed. Drogen P-Z. **Berlin-Heidelberg-New York-London**, 1994, p. 135-156.
- [11] Janahmadi M, Farajnia S, Vatanparast J, Abbasipour H, Kamalinejad M, The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* L. (Umbelliferae) induces neuronal hyperexcitability in snail partly through attenuation of after-hyperpolarization. *J Ethnopharmacol* 120 (2008) 360-365.
- [12] Janahmadi M, Malmierca MS, Hearne PG, Green GG, Sanders DJ, Morphological and electrophysiological features of F76 and D1 neurones of the sub-oesophageal ganglia of *Helix aspersa* in vitro and in culture. *Anat Embryol (Berl)* 6 (1999) 563-572.
- [13] Józwiak S, Contemporary opinions on classification, pathogenesis and treatment of drug-resistant epilepsy. *Wiad Lek* 60 (2007) 258-264.
- [14] Kosalec I, Pepljnjak S, Kustrak D, Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharm* 55 (2005) 377-385.
- [15] Pourgholami MH, Majzoob S, Javadi M, Kamalinejad M, Fanaee GHR, The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. *J Ethnopharmacol* 66 (1999) 211-215.
- [16] Ribnichy DM, Poulev A, O'Neal Y, Wnorowski G, Malek DE, Jager R, Raskin I, Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *Artemisia dracunculoides* L. for use as a dietary supplement and in functional foods. *Food Chem Toxicol* 42 (2004) 585-598.
- [17] Sarkozi S, Almasy J, Lukasc B, Dobrosi N, Nagy G, Jona I, Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. *J Muscle Res Cell Motil* 28 (2007) 167-174.
- [18] Schultze W, Lange G, Kubeczka KH, Direkte massenspektrometrische Analyse von *Pimpinella anisum* L. Anispulver and Anisi 1. *Dtsch Apoth Ztg* 127 (1987) 372-378.
- [19] Singh G, Kapoor IPS, Pandey SK, Singh UK, Singh RK, Studies of essential oils. Part 10. Antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytother Res* 16 (2002) 680-682.
- [20] Soares PMG, Lima RF, Pires AdF, Souza EP, Assreyu AMS, Criddle DN, Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. *Life Sci* 81 (2007) 1085-1093.
- [21] Soliman KM, Badeaa RI, Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol* 40 (2002) 1669-1675.
- [22] Taylor PS, Selectivity and patch measurement of A-current channels in *Helix aspersa* neurons. *J Physiol* 388 (1987) 437-447.
- [23] Vatanparast J, Janahmadi M, Contribution of apamin-sensitive SK channels to the firing precision but not to the slow afterhyperpolarization and spike frequency adaptation in snail neurons. *Brain Res* 19 (2009) 57-66.
- [24] Vatanparast J, Janahmadi M, Asgari AR, Forskolin potentiates the paraoxon-induced hyperexcitability in snail neurons by blocking afterhyperpolarization. *Neurotoxicology* 28 (2007) 1178-1183.