



Investigation of the effects of a new synthetic iron nanochelator on neuronal excitability in the presence and absence of oxidative stress

Zahra Ghasemi¹, Saeedeh Fakharzadeh¹, Mohammad Hassan Nazaran², Mahyar Janahmadi^{1*}

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

2. Sodoor Ahrar Shargh Company, Tehran, Iran

Received: 3 Apr 2012

Accepted: 12 June 2012

Abstract

Introduction: Oxidative stress is one of the important pathologic factors involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Antioxidants as neutralizing agents of free radicals are one of the treatment options for these diseases and antioxidant agents that can pass through blood brain barrier have beneficial effects. In the present research, the antioxidant effect of a new iron nanochelator on the electrophysiological characteristics of neural cells following H₂O₂ – induced oxidative stress was investigated.

Methods: Intracellular recordings were made under the current clamp condition on F1 cells of *Helix aspersa*. Effects of oxidant agent, H₂O₂ (1 mM), in the presence of the new iron nanochelator at high (2.63 mM) and low (263 μM) concentrations were assessed on the firing pattern and action potential parameters and were compared to the control condition.

Results: Application of H₂O₂ led to a significant decrease in the firing pattern and AP amplitude and an increase in the time to peak compared with control condition. Addition of the antioxidant following H₂O₂ treatment increased these parameters and restored them to the control condition. On the other hand, effects of H₂O₂ on the electrical activity of cell were modulated when the antioxidant was used earlier.

Conclusion: Based on the modulating effects of the new synthesized iron nanochelator on verified action potential parameters in the presence of H₂O₂, it can be concluded that nanochelator probably exerts its antioxidant effects through the alterations of the function of ion channels.

Key words: Iron nanochelator, H₂O₂, Intracellular recording, Neuronal excitability, Ion channels

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

بررسی اثرات یک نانو شلاتور آهن سنتتیک جدید بر تحریک پذیری نورونی در حضور و عدم حضور استرس اکسیداتیو

زهرا قاسمی^۱، سعیده فخارزاده^۱، محمد حسن نظران^۲، مهیار جان احمدی^{۳*}

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

۲. شرکت صدور احراز شرق، تهران

پذیرش: ۲۳ خرداد ۹۱

دریافت: ۱۵ فروردین ۹۱

چکیده

مقدمه: استرس اکسیداتیو از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراتیو است. یک انتخاب درمانی برای این اختلالات، استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها به عنوان عوامل خنثی کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشد. از این رو ترکیبات آنتی اکسیدانتی که قادر به عبور از سد خونی مغزی هستند دارای اثرات مفیدی می‌باشند. در این بررسی برای اولین بار اثرات الکتروفیزیولوژیک تنها نانو آنتی اکسیدانت سنتتیک (با پایه‌ی شلاتوری آهن) را بر ویژگی‌های تحریک پذیری نورون‌های عصبی حلزون در حضور و عدم حضور استرس اکسیداتیو با استفاده از ثبت داخل سلولی مورد بررسی قرار دادیم.

روش‌ها: تمامی ثبت‌های داخل سلولی تحت شرایط کلمپ جریان روی سلول F1 حلزون باغی (*Helix aspersa*) انجام گرفت. تأثیر عامل اکسیدانت پراکسید هیدروژن (۱ میلی مولار) در حضور غلظت‌های بالا (۲ میلی مولار) و پایین (۲۶۳ میکرومولار) نانوشلاتور آهن بر الگوی شلیک و ویژگی‌های پتانسیل عمل بررسی و با شرایط کنترل مقایسه شد.

یافته‌ها: پراکسید هیدروژن در مقایسه با شرایط کنترل موجب کاهش فرکانس شلیک پتانسیل عمل و دامنه پتانسیل عمل و افزایش مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی گردید. افزودن آنتی اکسیدانت بعد از آب اکسیژنه موجب افزایش این پارامترها و نزدیک شدن آنها به شرایط کنترل گردید. همچنین، کاربرد آنتی اکسیدانت قبل از آب اکسیژنه موجب تعدیل اثرات آب اکسیژنه بر روی فعالیت الکتریکی سلول گردید.

نتیجه گیری: بر اساس اثرات تعدیل کننده‌ی نانو شلاتور جدید آهن بر ویژگی‌های تغییر یافته پتانسیل عمل در حضور آب اکسیژنه می‌توان چنین نتیجه گرفت که احتمالاً این ترکیب با اثر بر عملکرد کانال‌های یونی تأثیر آنتی اکسیدانتی خود را اعمال می‌کند.

واژه‌های کلیدی: نانوشلاتور آهن، آب اکسیژنه، ثبت داخل سلولی، تحریک پذیری نورونی، کانالهای یونی

مقدمه

پاتوفیزیولوژی سیستم عصبی دارد. با گذشت زمان محیط ردوکس ایجاد شده در نورون‌ها به دلیل افزایش تولید ROS (گونه‌های واکنشگر اکسیژن، Reactive Oxygen Species) و نیز ضعف دفاع آنتی اکسیدانتی (آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک) به سمت شرایط اکسیداتیو می‌رود. این شرایط که استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود به نظر می‌رسد که یک فاکتور عمومی در فرآیند پیری سیستم‌های بیولوژیک است [۱۶].

تولید بیش از حد ROS از طریق واکنش با پروتئین‌ها،

متابولیسم اکسیژن منجر به تولید مولکول‌های فعالی با نام رادیکال‌های آزاد می‌گردد که نقش بسیار مهمی در فیزیولوژی و

mjanahmadi@yahoo.com

Janahmadi@sbmu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

دارند از سوبستراهای مهم ROS در روند پیری پستانداران به شمار می‌روند [۲۶].

بافت‌های مختلف پستانداران و از جمله مغز دارای دفاع آنتی اکسیدانی از نوع آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک است [۱۳]. سوپراکسید دسموتاز میتوکندریایی و گلووتاتیون از مهمترین آنتی اکسیدانت‌های بافتی هستند. در حال حاضر تلاش‌های فراوانی برای طراحی و ساخت آنتی اکسیدانت‌هایی که قادر به عبور از سد خونی مغزی باشند در حال انجام است. آنتی اکسیدانت‌های قوی و طبیعی مانند ویتامین E، فلاونوئیدها و کاروتنوئیدها قادر به عبور از این سد نیستند [۱۳]. طیف وسیعی از آنتی اکسیدانت‌ها در بررسی‌های *in vitro* و *in vivo* در مدل‌های مرگ نورونی و نورودژنراسیون مورد پژوهش قرار گرفته و اثرات قابل قبولی از خود نشان داده‌اند؛ به عنوان مثال در تحقیقات متعددی اثر آنتی اکسیدانت مشتق از چای سبز با نام EGCG (*Epigallocatechin gallate*) مورد بررسی قرار گرفته و اثرات نوروپروتکتیو آن به اثبات رسیده است [۱۸].

Liu و همکارانش (۲۰۰۴) اثر محافظتی آنتی اکسیدانتی با نام اسکوتلارین را در سلول‌های PC12 در مقابل آب اکسیژنه مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که این آنتی اکسیدانت مانع از افزایش کلسیم داخل سلولی، صدمه‌ی اکسیداتیو به مولکول‌های لیپیدی سلول و ازدیاد ROS درون سلول می‌گردد؛ اثراتی که همه به واسطه‌ی آب اکسیژنه ایجاد شده بود. مرگ نورونی ناشی از آب اکسیژنه با استفاده از این آنتی اکسیدانت مهار گردید [۱۵].

یک محدودیت بسیار مهم در عملکرد آنتی اکسیدانت‌ها در محیط بدن وجود سد خونی مغزی است که اجازه‌ی ورود بسیاری از ترکیبات آنتی اکسیدانتی از خون را به مغز نمی‌دهد. استفاده از نانوتکنولوژی به عنوان ابزاری جهت دستیابی آنتی اکسیدانت‌ها به سلول‌های مغزی به عنوان یک راه حل در پژوهش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج امیدوارکننده‌ای نشان داده است. به عنوان مثال در یک بررسی اثر Nanoparticulated quercetin در مدل حیوانی سکته‌ی مغزی مورد بررسی قرار گرفت و ثابت شد که نانو کردن این آنتی اکسیدانت طبیعی، این ترکیب را در جلوگیری از اکسید شدن پروتئین‌های سلول‌های مغزی نسبت به شکل غیر نانویی آن تواناتر کرد [۸].

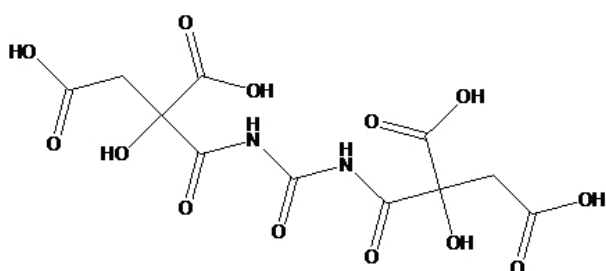
لیپیدهای موجود در ساختار غشا و نیز اسیدنوکلئیک موجب آسیب سلولی می‌گردد. از این رو صدمات اکسیداتیو نه تنها مکانیسم درگیر در فرآیند منتهی به از دست رفتن عملکرد طبیعی حسی و حرکتی در طی روند طبیعی پیری است بلکه در روند بیماری‌های نورولوژیکی از جمله آلزایمر و پارکینسون نیز نقش دارد [۲]. در بررسی‌های *in vitro*، برای شبیه سازی شرایط استرس اکسیداتیو از آب اکسیژنه که قادر به نفوذ به سلول است استفاده می‌شود [۷، ۹].

در تحقیقات متعددی با استفاده از آب اکسیژنه اثرات ایجاد استرس اکسیداتیو بر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک سلول مورد بررسی قرار گرفته است. Ito و همکارانش (۲۰۰۴) نشان دادند که آب اکسیژنه در سلول‌های گرانولی شکنج دنداندار موجب افزایش جریان کانال‌های کلسیمی نوع L می‌شود [۱]. Nie (۲۰۰۴) اثر این عامل مولد استرس اکسیداتیو را در سلول‌های هیپوکامپ مورد بررسی قرار داد و ثابت کرد که آب اکسیژنه جریان‌های سدیمی را افزایش می‌دهد [۲۱]. بنابراین، به نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو خواص الکتروفیزیولوژیک سلول‌های عصبی را تغییر می‌دهد.

استرس اکسیداتیو صرفاً یک عامل پاتولوژیک نبوده و در اعمال فیزیولوژیک نورونی نیز نقش دارد، به طور مثال تحقیقات نشان دادند که ROS برای القای LTP مورد نیاز است و از طریق ایجاد تغییرات ردوکس در مولکول‌های پروتئینی در مسیرهای سیگنالینگ نقش دارد [۷]. همچنین تولید سوپراکسید در ایجاد LTP در هیپوکامپ ضروری است و ایجاد سوپراکسید در CA1 هیپوکامپ برای القای LTP کافیهست. گرچه افزایش غلظت کلسیم در سلول پس سیناپسی برای القای LTP مورد نیاز است اما دیده شده است که با استفاده از یون سوپراکسید نیازی به افزایش جریان کلسیمی از طریق باز شدن کانال رسپتورهای NMDA نیست. از طرف دیگر نشان دادند که آب اکسیژنه دامنه‌ی LTP را از طریق فعال کردن کانال‌های کلسیمی نوع L (و نه کانال گیرنده‌ی NMDA) افزایش می‌دهد [۷۱].

همچنین در نماتودها، اکسیداسیون کانال‌های پتاسیمی به واسطه‌ی استرس اکسیداتیو مکانیسم اصلی از دست رفتن عملکرد طبیعی نورونی است. کانال‌های پتاسیمی که در بقا و کنترل تحریک پذیری نورون‌ها و عملکرد طبیعی نقش مهمی

استفاده از ثبت داخل سلولی مورد بررسی قرار دادیم. این نانوشلاتور توسط مهندس محمد حسن نظران در شرکت صدور احراز شرق سنتز شده است و به شماره ۶۳۶۲۵ در اداره ثبت اختراعات ایران ثبت گردیده است. این ماده دارای ساختمان شیمیایی $C_{11}H_{12}N_2O_{13}$ می باشد (شکل ۱) و وزن ملکولی آن ۳۸۲/۰۴ است.



شکل ۱- ساختمان شیمیایی نانو شلاتور آهن سنتتیک جدید.

مواد و روش ها

تمامی آزمایش ها بر روی سلول F1 در گانگلیون تحت مری حلزون باغی *Helix aspersa* انجام گرفت ($n > 5$). 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. برای تغذیه آنها از برگ کاهو، کلم و خیار استفاده 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 ای حاوی بستر سیلگارد (Dow corning, USA) و رینگر نرمال حلزون تثبیت می شد. رینگر نرمال حلزون محلولی نمکی (بر حسب میلی

بعلاوه، ماده ای که هدایت آن با استفاده از نانوتکنولوژی انجام می گیرد (به این معنی که یا ابعاد مولکول ساخته شده در مقیاس نانو باشد و یا از ساختارهای نانو مانند آپتامر، دندیرمر، میسل، لیپوزوم ها و نانوتیوب های کربن به عنوان حامل استفاده شود) به لحاظ ویژگی های بنیادی و زیست فعالی به خواص ویژه ای دست می یابد، به شکلی که به محقق این امکان داده می شود که با دستکاری چنین ساختاری ویژگی های آن را جهت هدف مطلوب تحت کنترل در آورد. از مهمترین ویژگی های ماده ای که با استفاده از این تکنولوژی قابل تعدیل و تنظیم است می توان به این موارد اشاره کرد: میزان حلالیت، رهایش کنترل شده در مدت زمان کوتاه و یا طولانی، انتخاب پذیری و هدفمندی اختصاصی مولکول [۲۵، ۲۸].

یکی از انواع ساختارهای آنتی اکسیدانت، شلاتورهای آهن هستند. آهن، فراوان ترین فلز انتقالی در سیستم های بیولوژیک است [۱۲]. این فلز، عنصری ضروری برای انتقال اکسیژن، تنفس، متابولیسم و تقسیم سلولی است. هومئوستاز آهن در بدن به شدت کنترل می شود؛ چرا که در صورت وجود مقادیر کنترل نشده از این عنصر، از مسیر واکنش فنتون، خطرناک ترین شکل رادیکال آزاد (رادیکال هیدروکسیل) تولید می شود که می تواند به انواع بیومولکول های مهم از قبیل پروتئین، چربی و اسید نوکلئیک آسیب برساند [۱۹].

شل ها از واژه ی یونانی Chela به معنی چنگال خرچنگ گرفته شده است. شلات کننده های فلزی با این عناصر به شکلی باند می شوند که در ترکیب، یک الکترون گیرنده (مثل هیدروژن یا فلز) یک باند کووالان هم ارز را با یک الکترون دهنده (یک لیگاند شلات کننده) شکل می دهد. در پژوهش های متعدد اثرات آنتی اکسیدانتی بسیاری از شلات کننده های آهن بررسی شده و به اثبات رسیده است. به عنوان مثال، EGCG (ترکیب موجود در چای سبز است که دارای خاصیت شلات کنندگی آهن است) در بررسی های گوناگونی خاصیت آنتی اکسیدانتی و نوروپروتکتیو بودن خود را نشان داده است و توانسته است از نورون ها در مقابل آسیب های ناشی از عوامل مولد رادیکال آزاد حفاظت کند [۳، ۱۰].

در این بررسی برای اولین بار اثرات الکتروفیزیولوژیک تنها نانو آنتی اکسیدانت سنتتیک (با پایه ی شلاتوری آهن) را بر ویژگی های تحریک پذیری نورون های عصبی حلزون با

این شرایط ثبت به عمل آمد. به منظور بررسی اثر آنتی اکسیدانتی نانوشلاتور ابتدا آنرا با غلظت پایین به محیط حاوی H_2O_2 پرفیوژ کرده و به مدت ۱۰ دقیقه از فعالیت سلول‌ها ثبت گرفته شد و در مرحله بعد به مدت ۲۰ دقیقه در حضور غلظت بالای نانوشلاتور از فعالیت سلول‌ها ثبت گرفته شد. سپس در پایان به منظور بررسی برگشت پذیری اثرات H_2O_2 بر روی فعالیت سلولی شستشو صورت گرفت، بدین صورت که محلول حاوی H_2O_2 و نانوشلاتور از محیط خارج شد و سلول‌ها در معرض رینگر نرمال قرار گرفتند.

در گروه دوم، به منظور بررسی اثر حفاظتی نانوشلاتور بر روی فعالیت سلولی، پس از ۱۰ دقیقه ثبت پایه از فعالیت سلول‌ها در رینگر نرمال، ابتدا نانوشلاتور با غلظت پایین (۲۶۳ میکرومولار) به محیط اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه ثبت از فعالیت سلول‌ها محلول حاوی غلظت بالای نانوشلاتور به محیط خارج سلولی پرفیوژ شد و به مدت ۲۰ دقیقه از فعالیت سلول‌ها ثبت گرفته شد. سپس محلول حاوی H_2O_2 به محیط اضافه شد و در این شرایط به مدت ۱۰ دقیقه از فعالیت سلول‌ها ثبت به عمل آمد. در نهایت شستشو انجام شد. ویژگی‌های کمی پتانسیل عمل‌های ثبت شده توسط نرم افزار Chart اندازه گیری و ذخیره شد. آنگاه این مقادیر کمی بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده و مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش آزمون ANOVA یک طرفه انجام گرفت و اختلاف‌های با $P \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

پارامترهای الکتروفیزیولوژیکی که در شرایط مختلف اندازه گیری شدند عبارتند از: پتانسیل استراحت غشاء، دامنه پتانسیل عمل که از پتانسیل استراحت تا قله اسپایک را در بر می‌گیرد. مدت زمان حداکثر دامنه، ولتاژی که بیان کننده‌ی فاصله زمانی از شروع اسپایک تا جایی که حداکثر شیب وجود دارد. سطح زیر منحنی در ناحیه قله پتانسیل عمل، فرکانس یا تعداد پتانسیل‌های عمل در واحد زمان و دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون.

یافته ها

سلول‌های F1 در شرایط کنترل دارای پتانسیل استراحت -43 ± 0.15 میلی ولت (شکل ۲-A) و فرکانس شلیک

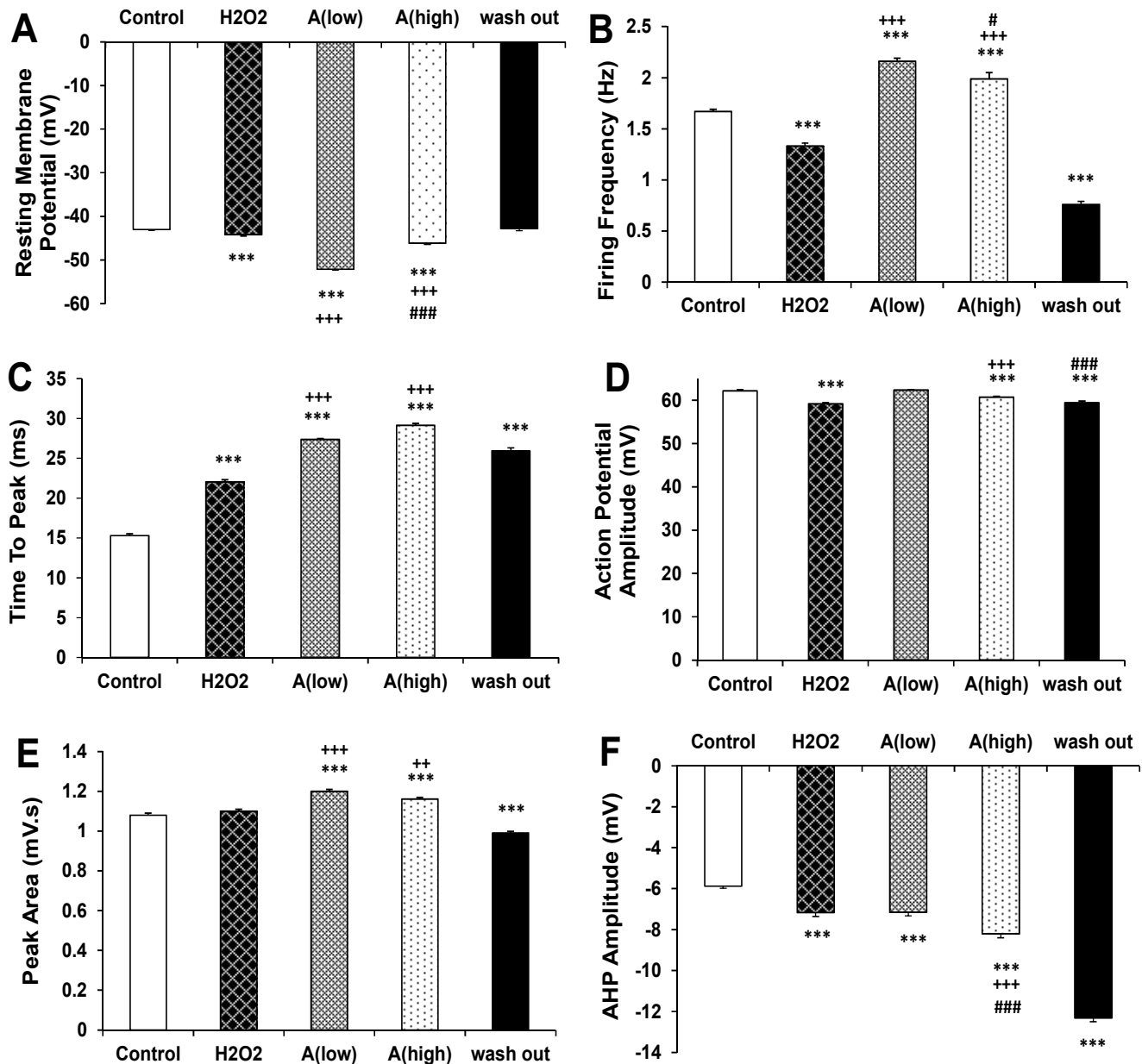
مولار): $NaCl(80)$, $CaCl_2(10)$, $MgCl_2(5)$, $KCl(4)$, $Glucose$, $HEPES(5)$ بود [۲۹]. pH محلول با افزودن Trizma Base در حد ۷/۶ تنظیم می‌شد. بافت پیوندی احاطه کننده‌ی نورون‌های این مجموعه گانگلیونی پس از ثابت نمودن گانگلیون در محفظه مخصوص توسط پنس‌های بسیار ظریف و بدون استفاده از آنزیم‌های هضم کننده در زیر استریومیکروسکوپ انجام می‌شد. پس از آشکار شدن سلول‌ها، از شاخص‌هایی نظیر محل قرار گرفتن سلول، اندازه، رنگ و موقعیت آن نسبت به رشته‌های عصبی، جهت شناسایی سلول مورد نظر استفاده می‌گردد. آنگاه نمونه در همین وضعیت درون محلول رینگر نرمال باقی می‌ماند، تا با شرایط جدید تطابق حاصل کند و سپس ثبت انجام می‌شد [۱۱].

قبل از انجام آزمایشات آب اکسیژنه (H_2O_2) با غلظت ۱ میلی مولار و نانوشلاتور با دو غلظت بالا (۲/۶ میلی مولار) و پایین (۲۶۳ میکرومولار) در محلول رینگر نرمال حلزون تهیه می‌شد. ثبت از پتانسیل‌های عمل خودبخودی سلول‌ها در شرایط کنترل و متعاقب تیمارهای مختلف، توسط آمپلی‌فایر Axoclamp 2B (Axon Instrument, USA) و با روش کلمپ جریان انجام می‌گرفت. میکروالکترودهای مورد استفاده از میکروپیت‌هایی با دیواره نازک از جنس بروسیلیکات (Clark Instrument, UK) بوده که به کمک میکروالکتروپولری عمودی (Narishige, Japan) تهیه می‌شدند. الکترودها با محلول KCl سه مولار پر شده و نمونه‌های بدون نشت که مقاومتی حدود ۵-۲ مگا اهم داشتند جهت ثبت مورد استفاده قرار می‌گرفتند. الکترودها مرجع در تمامی آزمایشات پلی آگاری، متشکل از سیم نقره با پوشش کلرید نقره ($Ag/AgCl$) در آگار ۴٪، بوده که محفظه‌ی ثبت را به پتانسیل صفر (زمین) وصل می‌کرد. داده‌های ثبت شده از فعالیت سلول‌ها، توسط یک مبدل آنالوگ-دیجیتال ۱۶ بیتی (AD Instrument, Australia)، رقمی شده و جهت آنالیز ذخیره می‌گردید.

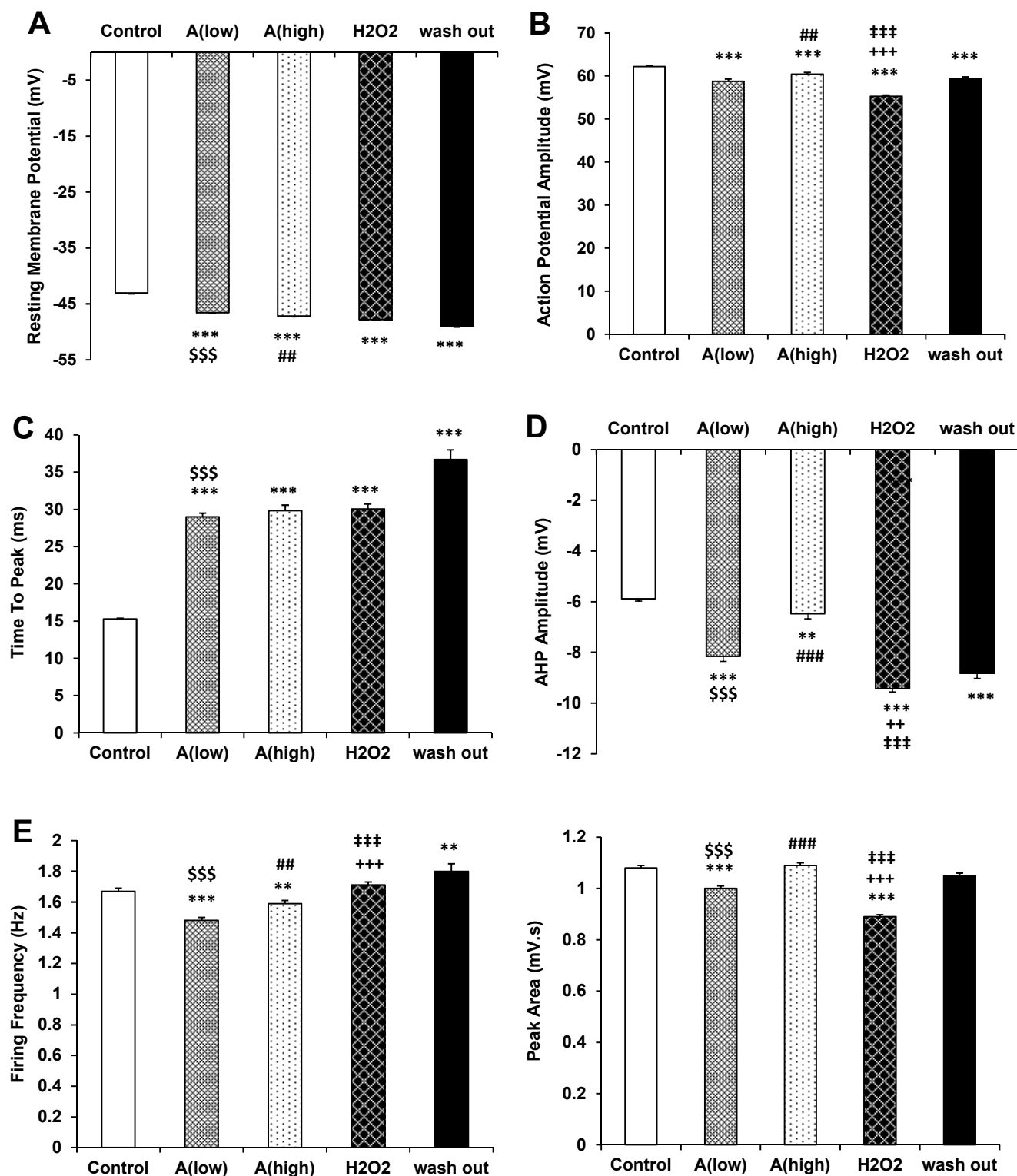
آزمایشات در دو گروه آزمایشی مجزا انجام گرفت. در هر گروه پس به مدت ۱۰ دقیقه ثبت پایه از فعالیت خودبخودی سلول‌های F1 در شرایط کنترل به عمل می‌آمد. در گروه اول، H_2O_2 با غلظت ۱ میلی مولار به محیط خارج سلولی پرفیوژ شد و آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه از فعالیت الکتریکی سلول‌ها در

در ثانیه بود. مقدار دامنه پتانسیل های متعاقب هیپرپلاریزاسیون $5/88 \pm 0/1$ میلی ولت بود (شکل ۲-F). در هر گروه پس از افزودن مواد مختلف تغییراتی در الگو و پارامترهای فعالیت الکتریکی سلول بوجود آمد و به شرح زیر می باشد:

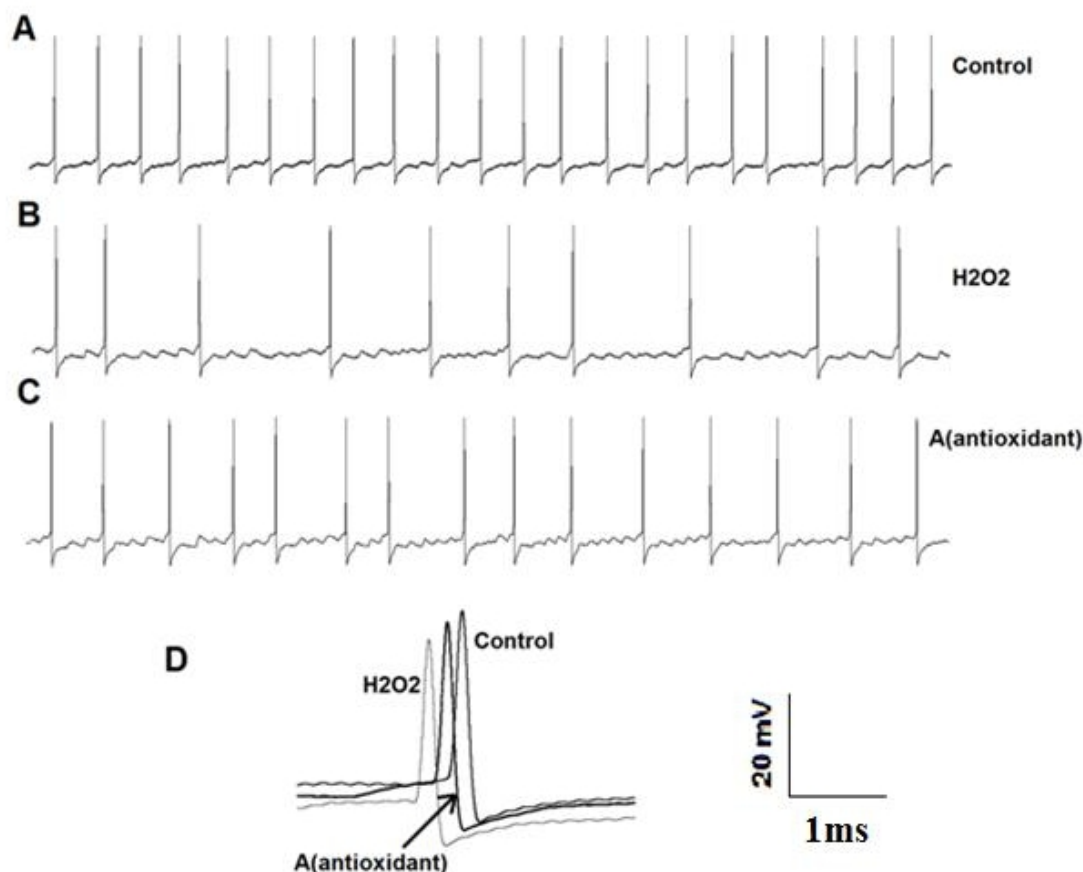
پتانسیل های عمل $1/67 \pm 0/2$ هرتز بودند (شکل ۲-B و شکل ۴-A). مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی در این شرایط $15/29 \pm 0/11$ میلی ثانیه بود (شکل ۲-C) و دامنه (شکل ۲-D) و سطح زیر منحنی در ناحیه قله پتانسیل عمل (شکل ۲-E) به ترتیب، $62/17 \pm 0/24$ میلی ولت و $1/08 \pm 0/01$ میلی ولت



شکل ۲- تأثیر آب اکسیژنه و آنتی اکسیدانت (A) علامت مخفف برای آنتی اکسیدان) بر ویژگی های الکتریکی سلول های عصبی F1. تأثیر تیمارهای مختلف 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) و دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل (F). * بیانگر تفاوت معنی دار میانگین گروه ها با کنترل ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), + نشانگر تفاوت معنی دار بین میانگین گروه H_2O_2 با گروه های آنتی اکسیدانت ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), # بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف آنتی اکسیدانت ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$).



شکل ۳- تاثیر آب اکسیژنه بر فعالیت الکتریکی سلول F1 پیش تیمار شده با آنتی اکسیدانت. تاثیر تیمارهای مختلف بر پتانسیل استراحت (A)، دامنه پتانسیل عمل (B)، مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی (C)، دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل (D)، فرکانس پتانسیل عمل (E)، سطح زیر منحنی در ناحیه قله (F). * بیانگر تفاوت معنی دار میانگین گروه ها با کنترل ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), + نشانگر تفاوت معنی دار بین میانگین گروه آنتی اکسیدانت با غلظت کم با گروه H_2O_2 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), † نشانگر تفاوت معنی دار بین میانگین گروه آنتی اکسیدانت با غلظت بالا با گروه H_2O_2 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), ‡ نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف آنتی اکسیدانت ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), § بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه اول (که ابتدا H_2O_2 را دریافت کردند) با گروه دوم (که قبل از H_2O_2 آنتی اکسیدانت را دریافت کرده اند).



شکل ۴- مقایسه اثر آب اکسیژنه و آنتی اکسیدانت بر الگوی شلیک. (A) کنترل، (B) آب اکسیژنه، (C) آنتی اکسیدانت. (D) پتانسیل عمل ثبت شده در حضور آب اکسیژنه و پس از افزودن آنتی اکسیدانت روی هم قرار گرفتند و با کنترل مقایسه شدند.

این شرایط افزایش یافت و در حضور مقادیر پایین آنتی اکسیدانت به $2/16 \pm 0/03$ هرتز و در حضور مقادیر بالای آن به $1/99 \pm 0/06$ هرتز رسید ($P \leq 0/001$) (شکل B-۲). همچنین در این شرایط مدت زمان رسیدن به قله افزایش یافت و به $27/38 \pm 0/5$ میلی ثانیه در حضور غلظت پایین و $29/13 \pm 1/4$ میلی ثانیه در حضور غلظت بالای آنتی اکسیدانت رسید ($P \leq 0/001$) (شکل C-۲). دامنه پتانسیل عمل در حضور غلظت پایین آنتی اکسیدانت دچار تغییر قابل توجهی نشد اما غلظت بالای این ترکیب موجب کوتاه تر شدن دامنه پتانسیل عمل و رسیدن آن به $60/68 \pm 0/26$ میلی ولت شد ($P \leq 0/001$) (شکل D-۲).

سطح زیر منحنی در ناحیه قله نسبت به شرایط کنترل افزایش یافت و به ترتیب در حضور مقادیر پایین و بالای آن به $1/2 \pm 0/009$ و $1/6 \pm 0/01$ میلی ولت در ثانیه رسید ($P \leq 0/001$) (شکل E-۲). آنتی اکسیدانت موجب منفی تر شدن دامنه پتانسیل های متعاقب هیپرپلاریزاسیون گردید بگونه ای

در گروه اول: افزودن H_2O_2 به محیط خارج سلولی با هیپرپلاریزاسیون پتانسیل غشا و کاهش در فرکانس شلیک بود (شکل های A&B-۲ و B-۴) و مقادیر آنها بترتیب به، $44/23 \pm 0/29$ میلی ولت و $1/33 \pm 0/03$ هرتز رسید ($P \leq 0/001$). مدت زمان رسیدن به قله ی پتانسیل عمل $22/03 \pm 0/45$ میلی ثانیه ($P \leq 0/001$) افزایش یافت (شکل C-۲). دامنه پتانسیل عمل $59/19 \pm 0/27$ میلی ولت رسید (شکل D-۲) و سطح زیر منحنی در ناحیه قله پتانسیل عمل $1/1 \pm 0/01$ میلی ولت در ثانیه شد. (شکل E-۲). دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزه تر شد و به $7/17 \pm 0/19$ ($P \leq 0/001$) رسید (شکل F-۲). افزودن آنتی اکسیدانت در غلظت های مختلف نیز با تغییراتی در فعالیت سلولی همراه بود به گونه ای که پتانسیل استراحت غشا در این شرایط هیپرپلاریزه تر شد و به $52/12 \pm 0/19$ و $46/13 \pm 0/35$ میلی ولت بترتیب در حضور غلظت های پایین و بالای آنتی اکسیدانت رسید ($P \leq 0/001$) (شکل A-۲). فرکانس شلیک پتانسیل عمل در

یافت و به 0.08 ± 0.09 میلی ولت در ثانیه رسید ($P \leq 0.001$) (شکل ۳-F) در این گروه نیز در پایان شستشو انجام گرفت و در این شرایط از فعالیت سلول‌ها ثبت به عمل آمد. تأثیر آب اکسیژنه و آنتی اکسیدانت بر ویژگیهای پتانسیل عمل بجز در یک مورد غیر قابل برگشت بود.

بحث

بررسی‌های متعدد نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو نقش بسیار مهمی در وقوع پدیده‌ی نورودژنراسیون دارد و از این رو در پاتوژنز (آسیب شناسی) بیماری‌هایی از قبیل آلزایمر و مولتیپل اسکلروزیس موثر است [۴، ۶]. علاوه بر نورودژنراسیون، رادیکال‌های آزاد در روند شروع و گسترش بیماری صرع نیز درگیر هستند. از این رو استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها به عنوان یک انتخاب درمانی جهت این بیماران مطرح می‌باشد [۲۷]. از جمله مکانیسم‌های مولد رادیکال‌های آزاد در بیماری صرع وجود تجمعات آهن فروس در CNS است، چرا که این فلز با اکسیژن و پراکسید هیدروژن واکنش داده و انواع خطرناکی از رادیکال‌های آزاد واکنشی را ایجاد می‌کند [۳۱].

سال‌ها از شناخته شدن نقش اپیپتوژنیک (صرع زای) نمک‌های آهن اگزوزن و خون می‌گذرد [۲۴، ۲۵]. در پژوهش انجام شده توسط Patel و همکاران (۲۰۰۸) دیده شد که در مدل حیوانی این بیماری استفاده از شلاتور آهن با نام HEBD از اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از صرع و نیز صدمه‌ی نورونی جلوگیری کرد. در این بررسی دیده شد که صرع موجب افزایش آهن ناپایدار در میتوکندری می‌گردد [۱۴، ۲۰].

در بررسی دیگری Yokoyama (۲۰۰۱) نشان داد که افزایش میزان آهن رژیم غذایی روزانه موجب کم اثر شدن اثرات ضد صرع داروی فینیتوئین می‌گردد [۲۳]. نتایج بررسی حاضر تا حدودی نشان دهنده‌ی موثر بودن این ساختار شلاتوری جدید می‌باشد. همان طور که نتایج این بررسی نشان داد این شلاتور موجب تثبیت پتانسیل غشا می‌گردد، به شکلی که زمان رسیدن به دامنه‌ی حداکثر پتانسیل عمل افزایش یافت و تا حدودی فرکانس را کاهش داد، به نحوی که با اضافه شدن پراکسید هیدروژن فرکانس با گروه کنترل یکسان شد و موجب

که مقدار آن به 0.18 ± 0.15 و 0.2 ± 0.08 میلی ولت بترتیب در حضور مقادیر پایین و بالای آنتی اکسیدانت رسید ($P \leq 0.001$) (شکل ۲-F). در مرحله شستشو، پس از حذف این محلول‌ها از محیط و جایگزین کردن رینگر نرمال، از فعالیت سلول‌ها ثبت به عمل آمد. تأثیر آب اکسیژنه و آنتی اکسیدانت بر ویژگیهای پتانسیل عمل بجز در یک مورد غیر قابل برگشت بود (شکل ۲).

در گروه دوم: افزودن آنتی اکسیدانت با غلظت‌های مختلف به محیط خارج سلولی قبل از کاربرد H_2O_2 منجر به شیفت پتانسیل استراحت غشا به سمت ولتاژهای منفی‌تر شد به گونه‌ای که در حضور غلظت پایین آن پتانسیل استراحت سلول به 0.16 ± 0.04 میلی ولت و در حضور مقادیر بالای آن به 0.13 ± 0.04 میلی ولت تغییر معنی داری یافت ($P \leq 0.001$)، در حالیکه افزودن H_2O_2 موجب تغییر بیشتری در پتانسیل غشا نشد (0.16 ± 0.07 ، شکل ۳-A). دامنه پتانسیل عمل در حضور مقادیر مختلف آنتی اکسیدانت نسبت به شرایط کنترل کاهش معنی داری پیدا کرد و در حضور غلظت‌های کم و زیاد بترتیب به، 0.46 ± 0.08 و 0.43 ± 0.06 میلی ولت رسید ($P \leq 0.001$) و کاربرد شلاتور مورد نظر مانع از بروز اثرات H_2O_2 نشد بطوریکه با افزودن H_2O_2 در حضور شلاتور سنتتیک دامنه پتانسیل عمل کاهش بیشتری یافت و به 0.24 ± 0.02 میلی ولت رسید (شکل ۳-B). مدت زمان رسیدن به قله افزایش یافت و به 0.5 ± 0.1 و 0.75 ± 0.08 میلی ثانیه بترتیب در حضور مقادیر بالا و پایین آنتی اکسیدانت رسید ($P \leq 0.001$) و H_2O_2 نتوانست تغییر بیشتری ایجاد نماید (شکل ۳-C). دامنه پتانسیل‌های متعاقب هیپرپلاریزاسیون منفی‌تر شد و 0.2 ± 0.08 میلی ولت در حضور غلظت پایین و 0.2 ± 0.08 میلی ولت در حضور غلظت بالای آنتی اکسیدانت شد ($P \leq 0.001$) و کاربرد آن نتوانست مانع از اثر افزایشی H_2O_2 بر دامنه AHP شود بطوریکه در این شرایط دامنه پتانسیل‌های عمل متعاقب به سمت ولتاژهای منفی‌تر شیفت پیدا کرد (0.13 ± 0.04 ، میلی ولت) (شکل ۳-D). فرکانس شلیک پتانسیل عمل نیز افزایش یافت و مقدار آن بترتیب به 0.2 ± 0.04 و 0.2 ± 0.05 هرتز به ترتیب در حضور غلظت پایین و بالای شلاتور سنتتیک رسید ($P \leq 0.001$) (شکل‌های ۳-E و ۳-C). سطح زیر منحنی در ناحیه قله کاهش

تغییر آن نگردید که احتمالاً بیانگر اثرات نوروپروتکتیو این شلاتور است. این درحالیست که وقتی شلاتور بعد از آب اکسیژنه استفاده شد (که خود موجب کاهش فرکانس شده بود) باعث افزایش فرکانس و بهبود وضعیت تحریک پذیری سلول شد، به نحوی که اثر این اکسیدان را بر دامنه پتانسیل عمل خنثی نموده و آن را به شرایط کنترل نزدیک کرد.

از آنجاییکه پراکسید هیدروژن دامنه پتانسیل های متعاقب هیپرپلاریزاسیون را افزایش داد و فرکانس را کاهش داد و در مطالعات متعددی تأثیر اکسیدان ها بر روی کانال های کلسیمی و پتاسیمی مشخص شده است، بعنوان مثال بیان شده که پراکسید هیدروژن، جریانات دپلاریزاسیونی فعال شونده توسط یون های Ca^{2+} و K^{+} را تغییر می دهد و موجب تغییر در پتانسیل عمل سلول می شوند [۳۲]. همچنین نشان داده شده که پراکسید هیدروژن در نوروپاتی های myenteric موجب افزایش غلظت سیتوزولی کلسیم گردید و بیان شد که پتانسیل غشا در حضور این عامل اکسیدان هیپرپلاریزه شد بگونه ای که مهار کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم از این هیپرپلاریزاسیون ممانعت کرد [۲۴]. علاوه بر این مطالعات مختلفی تأثیر عوامل ردوکس را بر روی کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا (BK) نشان داده اند. از این رو، می توان تأثیر افزایشی آب اکسیژنه را بر روی دامنه AHP ناشی از اثر تحریکی آن بر روی کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ و/یا پتاسیمی وابسته به کلسیم دانست. همچنین نتایج این تحقیق نشان دادند که آب اکسیژنه دامنه پتانسیل عمل را کم کرد و مدت زمان رسیدن به دامنه حداکثر پتانسیل عمل را افزایش داد. نتایج مطالعات ولتاژ کلمپ انجام شده توسط Pouokam و همکارانش (۲۰۰۹) نشان دهنده ی مهار شدید جریان سریع سدیمی، مسئول ایجاد پتانسیل های عمل، توسط آب اکسیژنه و کاهش تحریک پذیری سلولی بود. بنابراین می توان در اینجا نیز تأثیر کاهش آب اکسیژنه را بر روی دامنه پتانسیل عمل ناشی از اثر مهار آن بر فعالیت کانال های سدیمی وابسته ولتاژ دانست. در حضور H_2O_2 ، Fe^{2+} به آسانی به رادیکال هیدروکسیل تبدیل می شود و بدین صورت آنرا برای اعمال اثرات اکسیداتی خود آماده می کند [۲۴]. پس عوامل شلاتور کننده ی آهن تولید رادیکال آزاد را از H_2O_2 ممانعت می کنند و به همین دلیل است که ما در این تحقیق مشاهده

کردیم که اثر کاهش آب اکسیژنه بر روی فرکانس و دامنه پتانسیل عمل در حضور نانو شلاتور کاهش یافت و تحریک پذیری سلول بهبود پیدا کرد. احتمالاً افزایش فرکانس فعالیت نورونی متعاقب کاربرد شلاتور سنتتیک می تواند ناشی از افزایش رهایش کلسیم از ذخایر داخل سلولی باشد زیرا به علت شلات شدن یون های کلسیم خارج سلولی گرادیان شیمیایی لازم برای رهایش کلسیم از ذخایر داخل سلولی فراهم می گردد هرچند این احتمال نیاز به انجام آزمایشات کلمپ ولتاژ دارد. با این حال، افزایش سطح زیر منحنی در قله پتانسیل عمل و همچنین زمان رسیدن به قله در تایید این احتمال می باشد.

عدم برگشت پذیری برخی از پارامترهای الکتروفیزیولوژیک در بررسی حاضر پس از شستشو با رینگرنر مال احتمالاً می تواند موید اثرات کلسیم داخل سلولی باشد که نیاز به انجام تحقیقات بیشتر دارد.

نکته ی مهمی که باید مورد توجه قرار گیرد این است که در بررسی هایی که جهت ایجاد مدل استرس اکسیداتیو از آب اکسیژنه استفاده شده است غلظت آب اکسیژنه و مدت زمان تحت اثر قرار دادن سلول با آن در شکل پاسخ ایجاد شده بسیار موثر است [۲۹، ۳۰]؛ به شکلی که دیده شده است که تحت اثر قرار دادن نوروپاتی ها با آب اکسیژنه ابتدا سبب ایجاد یک هایپرپلاریزاسیون در پتانسیل غشا می گردد که در غلظت های بالاتر این اکسیدان (بالاتر از محدوده های فیزیولوژیک) مبدل به دپلاریزاسیون غیر قابل برگشت می گردد [۳۰]. از این رو با توجه به وجود مقادیر پاتولوژیک رادیکال های آزاد اکسیژن در بیماری هایی از قبیل صرع [۲۷]، اثر دیده شده از این نانو شلاتور (تثبیت پتانسیل غشا) می تواند در درمان بیماری ها بسیار مفید و سودمند باشد. هیپرپلاریزاسیون بیشتر غشا در حضور نانو شلاتور آهن سنتتیک، همچنین، می تواند در راستای ایجاد گرادیان الکتریکی لازم برای رهایش کلسیم از ذخایر داخل سلولی و از این طریق افزایش دامنه AHP باشد.

عملکرد کاهندگی این نانو شلاتور در ارتباط با پتانسیل استراحت سلول نشان دهنده ی اعمال یک مکانیسم فعال توسط آن است که آن را به عنوان یک انتخاب درمانی در ارتباط با سکنه ی مغزی، که با افزایش میزان آهن ناپایدار همراه است [۲۲]، مطرح می کند. ساختار نانوی این شلاتور که به موجب آن مولکول مورد نظر دارای خواص ویژه ای می گردد (به عنوان

چون صرع مطرح نمود. از این رو بررسی جوانب گوناگون اثرات پروتکتیو آن در بررسی های بعدی ضروری به نظر می رسد.

مثال عبور از سد خونی-مغزی) و از سوی دیگر اثرات آنتی اکسیدانته دیده شده از آن نشان می دهد که می توان این ترکیب را به عنوان یک کاندید مناسب جهت درمان اختلالاتی

References

- [1] Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, Ito Y, Hydrogen peroxide modulates whole cell currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci Lett* 356 (2004) 25-28.
- [2] Annunziato L, Pannaccione A, Cataldi M, Secondo A, Castaldo P, Di Renzo G, Maurizio Tagliatela. Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? *Neurobiol Aging* 23 (2002) 819-34.
- [3] Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Mit T, Zheng H, Fridkin M, Weinreb O, Mandel S, Youdim MB, Neurorescue activity, APP regulation and amyloid-beta peptide reduction by novel multi-functional brain permeable iron- chelating- antioxidants, M-30 and green tea polyphenol, EGCG. *Curr Alzheimer Res* 4 (2007) 403-411.
- [4] Behl C, Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog Neurobiol* 57 (1999) 301-323.
- [5] Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, de la Fuente JM, Grazú V, Borm P, Estrada G, Ntziachristos V, Razansky D, Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Part Fibre Toxicol* 3 (2010) 3.
- [6] Bö L, Dawson TM, Wesselingh S, Mörk S, Choi S, Kong PA, Hanley D, Trapp BD, Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol* 36 (1994) 778-786.
- [7] Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR, Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progr Neuro Psycho pharmacol Biol Psychiat* 28 (2004) 771-799.
- [8] Das S, Mandal AK, Ghosh A, Panda S, Das N, Sarkar S, Nanoparticulated quercetin in combating age related cerebral oxidative injury. *Curr Aging Sci* 1 (2008) 169-174.
- [9] Dringen R, Pawlowski P, Hirrlinger J, Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 79 (2005) 157-165.
- [10] Fu Y, Koo MW, EGCG protects HT-22 cells against glutamate-induced oxidative stress. *Neurotox Res* 10 (2006) 23-30.
- [11] Ghasemi Z, Hassanpour-Ezatti M, Kamalinejad M, Janahmadi M, Functional involvement of Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated K^{+} channels in anethol-induced changes in Ca^{2+} dependent excitability of F1 neurons in *Helix aspersa*. *Fitoterapia* 82 (2011) 750-756.
- [12] Gotz M, Double K, Gerlach M, B. H. Youdim M, Riederer P, The Relevance of Iron in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012 (2006) 193-208.
- [13] Halliwell B, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18 (2001) 685-716.
- [14] Hammond EJ, Ramsay RE, Villarreal HJ, Wilder BJ, Effects of intracortical injection of blood and blood components on the electrocorticogram. *Epilepsia* 21(1980) 3-14.
- [15] Hao H, Guo-Qing L, Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. *Life Sciences* 74 (2004) 2959-2973.
- [16] Harman D, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11 (1956) 298-300.
- [17] Huddleston AT, Tang W, Takeshima H, Hamilton SL, Klann E, Superoxide-induced potentiation in the hippocampus requires activation of ryanodine receptor type 3 and ERK. *J Neurophysiol* 99 (2008) 1565-1571.
- [18] Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA, Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* 15 (2010) 7792-7814.
- [19] Kruszewski M, Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Muta Res* 531 (2003) 81-92.
- [20] Liang LP, Jarrett SG, Patel M, Chelation of

- mitochondrial iron prevents seizure-induced mitochondrial dysfunction and neuronal injury. *J Neurosci* 28 (2008) 11550-11556.
- [21] Meng Z, Nie A, Effects of hydrogen peroxide on sodium current in acutely isolated rat hippocampal CA1 neurons. *Toxicol Lett* 147 (2004) 45-52.
- [22] Millerot-Serruot E, Bertrand N, Mossiat C, Faure P, Prigent-Tessier A, Garnier P, Bejot Y, Giroud M, Beley A, Marie C, Temporal changes in free iron levels after brain ischemia Relevance to the timing of iron chelation therapy in stroke. *Neurochem Int* 52 (2008) 1442-1448.
- [23] Mizukami Y, Yamada S, Kokudo N, Takashima M, Yokoyama T, Dietary iron reduces the anticonvulsion activity of phenytoin in electroconvulsion via inhibition of brain penetration. *Brain Res* 915 (2001) 112-117.
- [24] Pouokam E, Rehn M, Diener M, Effects of H₂O₂ at rat myenteric neurones in culture. *ur J Pharmacol* 615 (2009) 40-49.
- [25] Rajiv S, Santosh S, Sugandha S, Nanotechnology: The Future Medicine. *J Cutan Aesthet Surg* 3 (2010) 32-33.
- [26] Sesti F, Liu S, Cai SQ, Oxidation of potassium channels by ROS: a general mechanism of aging and neurodegeneration? *Trends Cell Biol* 20 (2010) 45-51.
- [27] Shin EJ, Jeong JH, Chung YH, Kim WK, Ko KH, Bach JH, Hong JS, Yoneda Y, Kim HC, Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int* 59 (2011) 122-137.
- [28] Szebeni J, Nanomedicine: application of nanotechnology in medicine. Opportunities in neuropsychiatry. *Neuropsychopharmacol Hung* 13 (2011) 15-24.
- [29] Taylor PS, Selectivity and patch measurment of A-current channels in *Helix aspersa* neurons. *J Physiol* 388 (1987) 437-447.
- [30] Vogalis F, Harvey JR, Altered excitability of intestinal neurons in primary culture caused by acute oxidative stress. *J Neurophysiol* 89 (2003) 3039-3050.
- [31] Wang XS, Ong WY, Connor JR, Increase in ferric and ferrous iron in the rat hippocampus with time after kainate-induced excitotoxic injury. *Exp Brain Res* 143 (2002) 137-148.
- [32] Whyte KA, Hogg RC, Dyavanapalli J, Harper AA, Adams DJ, Reactive oxygen species modulate neuronal excitability in rat intrinsic cardiac ganglia. *Auton Neurosci* 150 (2009) 45-52.