

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی (فیزیولوژی جانوری)

اثرات لینالول بر الگوی فعالیت نورونی حلزون و بر همکنش با مکانیسم های سلولی دخیل در القای فعالیت صرعی

مکتب پزشکی پارس پیژوه

## چکیده

# اثرات لینالول بر الگوی فعالیت نورونی حلزون و بر همکنش با مکانیسم های سلولی دخیل در القای فعالیت صرعی

لینالول، مونوترپن الکلی است که در اسانس روغنی تعدادی از گیاهان آروماتیک وجود دارد. این ترکیب اثرات ضد التهابی، ضد درد و انواعی از اثرات بیولوژیک بر سیستم عصبی را داراست. در تحقیق حاضر، ما تکنیک ثبت داخل سلولی را برای مطالعه اثرات لینالول بر فعالیت نورون های حلزون به کار بردیم. اعمال لینالول (0/1 mM) به سرعت فرکانس پتانسیل های عمل خودبه خودی را افزایش و شیب فاز رپلاریزاسیون و دوره و دامنه پتانسیل هایپرپولاریزان متعاقب را کاهش داد. لینالول همچنین دامنه پتانسیل عمل را کاهش داد اما به نظر می رسد این تاثیر نتیجه دیپلاریزاسیون آهسته غشاء باشد و نه مهار مستقیم کانال های سدیمی زیرا با تثبیت ولتاژ استراحت غشاء در حدود کنترل (با تزریق مداوم جریان منفی) کاهش دامنه پتانسیل های عمل هم حذف گردید. اعمال لینالول (0/2 mM) به تدریج الگوی فعالیت را از حالت منظم به فعالیت انفجاری تغییر داد که این الگوی فعالیت بعد از شستشو با رینگر نرمال به آهستگی برگشت پذیر بود. فعالیت انفجاری در حضور نیفدیپین (مهارکننده اختصاصی کانال های کلسیمی L-type) کاهش و در حضور نیکل کلرید (مهارکننده غیر اختصاصی کانال های کلسیمی) حذف شد. افزودن H89 (مهارکننده پروتئین کیناز A) و کلریتین (مهارکننده پروتئین کیناز C) فعالیت انفجاری القاء شده توسط لینالول را حذف کرد و سبب بازگشت پتانسیل های عمل منفرد و منظم شد. این نتایج پیشنهاد می کند لینالول می تواند فعالیت صرعی را بویژه از طریق مهار کانال های پتاسیمی در نورون های حلزون القاء نماید. به نظر می رسد تاثیر مستقیم لینالول بر کانال های یونی در تغییر فعالیت نورون ها نقش داشته باشد که با شروع سریع تاثیر لینالول مطابقت دارد، اما با توجه به تاثیر مهارکننده های پروتئین کینازها این تاثیر به تعدیل غیرمستقیم از طریق فسفریلاسیون کانال های یونی نیز وابسته است.

کلمات کلیدی: پتانسیل عمل، لینالول، نورون حلزون، فعالیت انفجاری، کانال های یونی

## فهرست مطالب

عنوان.....	صفحه.....
مقدمه: فصل اول	
۱-۱) بیان مساله .....	۲
۲-۱) دلایل استفاده از نورونهای حلزون .....	۵
فصل دوم: مروری بر تحقیقات پیشین	
۱-۲) صرع .....	۸
۲-۲) اسانس‌های گیاهی .....	۹
۳-۲) اثرات بیولوژیک اسانس های گیاهی .....	۱۰
۱-۳-۲) اثرات سیتوتوکسیک اسانس ها .....	۱۰
۲-۳-۲) اثرات موتاژنیک اسانس‌ها در سطح هسته و سیتوپلاسم .....	۱۰
۳-۳-۲) اثرات انتی موتاژنیک اسانس‌ها .....	۱۰
۴-۳-۲) اثرات سرطان‌زایی اسانس‌ها .....	۱۱
۴-۲) ترکیبات اسانس‌ها و عملکرد آنها روی سیستم عصبی مرکزی و محیطی .....	۱۱
۱-۴-۲) اکالیپتول .....	۱۲

- ۱۳..... (۲-۴-۲) اوچنول
- ۱۳ ..... (۳-۴-۲) منتول
- ۱۴ ..... (۴-۴-۲) سیترونلول
- ۱۵..... (۵-۴-۲) لینالول
- ۱۷ ..... (۵-۲) کانال‌های یونی و مشارکت آنها در فعالیت الکتریکی نوروں‌ها
- ۱۷..... (۱-۵-۲) کانال‌های کلسیمی
- ۱۹ ..... (۲-۵-۲) کانالهای پتاسیمی
- ۱۹ ..... (۱-۲-۵-۲) کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ
- ۲۰ ..... (۲-۲-۵-۲) کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم
- ۲۱ ..... (۳-۵-۲) کانالهای سدیمی
- ۲۲ ..... (۱-۳-۵-۲) جریانهای سدیمی گذرا و مداوم
- ۲۳ ..... (۶-۲) تعدیل کانال‌های یونی توسط فسفوریلاسیون
- ۲۳..... (۱-۶-۲) گیرنده متابوتروپیک
- ۲۵..... (۷-۲) پروتئین کینازها
- ۲۵ ..... (۱-۷-۲) PKA و اثر بر کانال‌های یونی
- ۲۷ ..... (۲-۷-۲) PKC و اثر بر کانال‌های یونی

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱) حیوانات ..... ۳۰

۳-۲) تشریح و آماده سازی گانگلیون عصبی جهت ثبت ..... ۳۱

۳-۳) محلول‌ها و داروها ..... ۳۲

۳-۴) ثبت داخل سلولی ..... ۳۲

۳-۵) مراحل آزمایش ..... ۳۴

۳-۶) پارامترهای الکتروفیزیولوژیک مورد مطالعه ..... ۳۴

۳-۷) آزمون آماری ..... ۳۶

#### فصل چهارم: نتایج

۴-۱) ویژگی های فعالیت خودبخودی و برانگیخته نورون های حلزون در شرایط

کنترل ..... ۳۸

۴-۲) اثرات غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میلی مولار لینالول بر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک

نورون‌های حلزون ..... ۳۹

۴-۲-۱) ویژگی های پتانسیل عمل خود بخودی در حضور لینالول ۰/۱ میلی مولار ۳۹.

۴-۲-۲) ویژگی های پتانسیل عمل خودبخودی در حضور لینالول ۰/۲ میلی مولار ۴۷.

۴-۳) ویژگی های پتانسیل عمل خودبخودی در حضور لینالول و مهار کننده های

کانال های کلسیمی نیکل کلرید و نیفدپین ..... ۵۱

۴-۴) ویژگی های پتانسیل عمل خودبخودی در حضور لینالول و مهار کننده‌های

پروتئین کینازها، کلریتین و H89 ..... ۵۳

#### فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵۷	..... بحث (۱-۵)
۵۷	..... تغییر در ویژگی های پتانسیل عمل در حضور لینالول (۱-۱-۵)
۶۰	..... تغییر در فعالیت نورونی و بروز الگوی burst در حضور لینالول (۲-۱-۵)
۶۳	..... نتیجه گیری (۲-۵)
۶۳	..... پیشنهادات برای مطالعات آینده (۳-۵)
۶۵	..... فهرست منابع و ماخذ

فهرست منابع پارس پیژوه

## فهرست شکل‌ها

عنوان.....	صفحه.....
شکل ۱-۳. حلزون باغی.....	۳۰
شکل ۲-۳. گانگلیون تحت مری تثبیت شده در محفظه ثبت.....	۳۱
شکل ۳-۳. نمایی از وسایل ثبت داخل سلولی.....	۳۳
شکل ۴-۳. نحوه اندازه‌گیری برخی پارامترهای پتانسیل عمل.....	۳۵
شکل ۱-۴. الگوی فعالیت خودبخودی نورون در شرایط کنترل، ۵ و ۱۰ دقیقه پس از مجاورت با غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول.....	۴۰
شکل ۲-۴. مقایسه پتانسیل ثبت شده از یک نورون در سه زمان کنترل، ۵ دقیقه و ۱۰ دقیقه پس از افزودن لینالول.....	۴۲
شکل ۳-۴. الگوی فعالیت خودبخودی در شرایط کنترل، ۳ دقیقه پس از مجاورت با غلظت ۰/۲ میلی مولار لینالول و پس از شستشوی محفظه حاوی لینالول با رینگر.....	۴۸
شکل ۴-۴. مقایسه پتانسیل ثبت شده از یک نورون در دو زمان کنترل و ۲ دقیقه پس	

از افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار ..... ۴۹

شکل ۴-۵. پس از بروز فعالیت burst در نتیجه افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار NiCl  
به محفظه ثبت اضافه گردید ..... ۵۲

شکل ۴-۶. پس از بروز فعالیت burst در نتیجه افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار،  
نیفدیپین به محفظه ثبت اضافه گردید ..... ۵۳

شکل ۴-۷. پس از بروز فعالیت burst در نتیجه افزودن لینالیول ۰/۲ میلی مولار، H89  
به محفظه ثبت اضافه گردید ..... ۵۴

شکل ۴-۸. پس از بروز فعالیت burst در نتیجه افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار،  
کلریتین به محفظه ثبت اضافه گردید ..... ۵۵

فهرست نمودارها و جدول‌ها

عنوان.....	صفحه.....
نمودار ۱-۴. مقایسه میانگین پتانسیل استراحت غشاء و فرکانس پتانسیل عمل در شرایط کنترل و در ۵ و ۱۰ دقیقه پس از افزودن غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول به رینگر حلزونی نرمال.....	۳۹.....
نمودار ۲-۴. مقایسه استانه و دامنه در پتانسیل عمل ثبت شده در حضور غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول.....	۴۱.....
نمودار ۳-۴. مقایسه میانگین سطح زیر منحنی، فاصله بین پتانسیل‌های عمل و طول مدت پتانسیل عمل در شرایط کنترل و در ۵ و ۱۰ دقیقه پس از افزودن غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول به رینگر حلزونی نرمال (n=۸).....	۴۳.....
نمودار ۴-۴. مقایسه میانگین دامنه AHP و طول مدت AHP بین سه حالت کنترل، ۵ و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول ۰/۱ میلی مولار (n=۸).....	۴۴.....
نمودار ۵-۴. مقایسه میانگین شیب فاز دپلاریزاسیون و شیب فاز رپلاریزاسیون بین سه حالت کنترل، ۵ و ۱۰ دقیقه پس از افزودن لینالول ۰/۱ میلی مولار (n=۸).....	۴۵.....
نمودار ۶-۴. مقایسه میانگین مدت دوره مهاری بعد از فعالیت برانگیخته پس از تزریق جریان‌های دپلاریزان (۲-۱nA) در شرایط کنترل و ۱۰ دقیقه پس از افزودن غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول به رینگر حلزونی نرمال (n=۶).....	۴۶.....

نمودار ۴-۷. مقایسه آستانه و دامنه در پتانسیل های عمل ثبت شده در حضور غلظت  
۰/۲ میلی مولار لینالول (n=۶) ..... ۴۷

نمودار ۴-۸. مقایسه میانگین شیب فاز دپلاریزاسیون و شیب فاز رپلاریزاسیون بین  
دو حالت کنترل و ۲ دقیقه پس از افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار (n=۸) ..... ۴۹

نمودار ۴-۹. مقایسه میانگین مدت دوره مهاری بعد از فعالیت برانگیخته پس از تزریق  
جریان های دپلاریزان (۱-۲nA) در شرایط کنترل و در ۱۰ دقیقه پس از افزودن غلظت  
۰/۲ میلی مولار لینالول به رینگر حلزونی نرمال (n=۶) ..... ۵۰

جدول ۴-۱. مقاومت ورودی سلول در شرایط کنترل و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول  
۰/۱ میلی مولار ..... ۴۷

جدول ۴-۲. مقاومت ورودی سلول در شرایط کنترل و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول  
۰/۲ میلی مولار ..... ۵۰

# فصل اول

## ۱- مقدمه

### ۱-۱ بیان مساله

صرع از جمله اختلالات سیستم عصبی مرکزی است که در آن یک ناحیه محدود مغزی و یا نواحی گسترده‌ای از مغز فعالیت‌های کنترل نشده خودبخودی نشان می‌دهند. این بیماری مجموعه‌ای از سندرم‌های جداگانه است که یا اولیه‌اند و یا متعاقب صدمات مغزی به وجود می‌آیند. کانون صرع‌زا می‌تواند به وسیله فاکتورهای متفاوت و متنوع ژنتیکی و محیطی ایجاد شود (Cavalheiro et al., 1991; Lopez da Silva et al., 1992). شواهدی مبنی بر دخالت تغییر در سیستم‌های نوروترنسمیتری مختلف به ویژه گلوتامات، آسپارتات و گابا در ایجاد صرع وجود دارد (Pinto et al., 2005). به طور کلی تغییر در الگوی فعالیت سیناپس‌ها و مختل شدن عملکرد کانال‌های یونی، بعنوان مکانیسم‌های اصلی زمینه‌ساز حمله‌های صرعی شناخته شده‌اند (Nobels, 2003; Wuttke and Lerche, 2006).

اسانس‌های گیاهی<sup>۱</sup> و انواع عصاره‌های گیاهی از رایج‌ترین فرآورده‌های استخراجی از گیاهان هستند که در طب سنتی و نوین جهت درمان صرع مصرف می‌شوند. اسانس‌های روغنی به دلیل تبخیر شدن در دماهای معمولی روغن‌های فرار نیز نامیده می‌شوند. ترپن‌ها<sup>۲</sup> و فنیل-پروپانوئیدها<sup>۳</sup> دو دسته گسترده از اسانس‌های روغنی هستند (de Almeida et al., 2011). این محصولات حاوی طیف وسیعی از ترکیبات با ویژگی‌های ساختمانی متنوع هستند که برخی از آنها قادرند از بروز الگوی فعالیت صرعی در نوروها جلوگیری کنند. اثرات درمانی چنین ترکیباتی غالباً بر ایند برهم کنش و تاثیر چندین ترکیب است که می‌توانند تقویت کننده (سینرژیک) یا مخالف هم باشند. تصور عمومی مبنی بر بی‌ضرر بودن فرآورده‌های گیاهی باعث شده که در بسیاری موارد بیماران به خود درمانی با چنین محصولاتی روی آورند و حتی پزشک معالج خود را از مصرف چنین ترکیباتی آگاه نکنند که می‌تواند برهم‌کنش نامطلوب با داروهای تجویز شده توسط پزشک را به دنبال داشته باشد (Spinella, 2001; Ruha et al., 2003). شناسایی مکانیسم‌های دخیل در اثرات فرآورده‌های گیاهی با پتانسیل درمانی می‌تواند ضمن کمک به کاربرد موثرتر آنها در درمان صرع از بروز برهم‌کنش‌های نامطلوب نیز جلوگیری نماید.

مونوترپن‌ها از جمله رایج‌ترین ترکیباتی هستند که هم در فرآورده‌های گیاهی با اثر صرع زا<sup>۴</sup> و هم فرآورده‌هایی با اثرات ضد صرعی حضور دارند (Burkhard et al., 1999). این ترکیبات با فرمول مولکولی  $C_{10}H_{16}$  به طور وسیعی در گیاهان و به ویژه در اسانس‌های روغنی یافت می‌شوند (Ishida, 2005) و با تعدیل سیستم گابارژیک و گلوتاماترژیک اثرات ضد صرعی خود را

---

<sup>1</sup>Essential oils

<sup>2</sup> Terpens

<sup>3</sup> Phenylpropanoids

<sup>4</sup> Epileptogene

اعمال می‌کنند (Sayyah et al., 2004). به برخی از مونوترپن‌ها از جمله لینالول<sup>۱</sup>، اوجنول<sup>۲</sup>، منتول<sup>۳</sup> و لیمونن<sup>۴</sup> اثرات ضدصرعی نسبت داده شده است (Burkhard et al., 1999).

لینالول، مونوترپنی است که به عنوان ترکیب اصلی در بسیاری از اسانس‌های روغنی معطر وجود دارد. مطالعات متعددی تاثیر آرام‌بخشی و ضد صرعی لینالول را گزارش کرده‌اند. گیاهانی مانند گشنیز *Coriandrum sativum* و برگ‌بو *Laurus nobilis* که در طب سنتی به عنوان ترکیبات ضد تشنج به کار رفته و اثرات ضد صرعی آنها تایید شده حاوی لینالول هستند (Elisabetsky et al., 1995; Sayyah et al., 2002). اثرات آرام‌بخشی و خواب‌آوری روغن *Aniba rosaeodora*، به میزان بالای لینالول در آن نسبت داده شده است (de Almeida et al., 2009a).

رسپتورهای NMDA نقش کلیدی در تولید و گسترش حملات صرعی دارند. جلوگیری از رهایش و تاثیر تحریکی گلوتامات از طریق مهار رقابتی رسپتورهای NMDA به عنوان مکانیسم اصلی اثرات ضد صرع این مونوترپن پیشنهاد شده است. در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که لینالول اثر ضد تشنجی خود را از طریق اثر مهارى روی متصل شدن گلوتامات در کورتکس موش صحرائی و تاثیر بر روی انتقالات گاباژیک و گلوتامات ارژیک ایجاد می‌نماید (Brum et al., 2001). de Almedia و همکاران با توجه به تاثیر این روغن در کاهش تحریک-پذیری عصبی و کاهش دامنه پتانسیل عمل در عصب سیاتیک و نظر به فقدان رسپتورهای NMDA یا گابا در تنه‌ی عصب پیشنهاد کرده‌اند که این تاثیر تا حدودی از طریق تاثیر بر کانال‌های یونی مانند مهار کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ یا افزایش کنداکتانس پتاسیمی اعمال می‌شود (de Almedia et al., 2009). از آن جایی که تعدیل کانال‌های وابسته به ولتاژ

---

<sup>1</sup> linalool

<sup>2</sup> Eugenol

<sup>3</sup> Menthol

<sup>4</sup> limonene

به وسیله داروها یک اصل درمانی است، لینالول ممکن است از این طریق با فرآیندهای سلولی مرتبط با صرع تداخل نماید (Altrup et al., 2003).

## ۲-۱) دلایل استفاده از نورون‌های حلزون

در تحقیقات انجام شده روی الگوی فعالیت صرعی و روش‌های درمان آن از مدل‌های حیوانی مختلف استفاده شده است. با این حال مکانیسم‌های اساسی ایجاد کننده الگوی فعالیت صرعی در نمونه‌های جانوری مختلف مشابه است. از طرفی نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که الگوی فعالیت صرعی ایجاد شده در نورون‌های حلزون با الگوی فعالیت ثبت شده در سیستم عصبی مهره‌داران از جمله انسان شباهت دارد (Altrup et al., 2003; Janahmadi et al., 2008).

مزایای تکنیکی متعدد نورون‌های گانگلیون بی‌مهرگان در مقایسه با نورون‌های مهره‌داران از جمله وجود نورون‌های بزرگ قابل تشخیص، تنوع کانال‌های یونی و امکان مطالعه گانگلیون در شرایط *in vitro* بدون تغییر در ویژگی‌های ساختمانی و عملکردی باعث شده تا این نورون‌ها در موارد متعددی جهت مطالعه مکانیسم‌های پایه سیستم عصبی مورد استفاده قرار گیرند. نرم‌تنان بزرگترین نورون‌ها را در سلسله جانوران دارند و اندازه بزرگ نورون‌هایشان، شناسایی و ورود الکتروود به سلول را تسهیل می‌کند و از طرفی خونسرد بودن این رده جانوری، مشکلات نگهداری آن‌ها را در شرایط *in vitro* کاهش می‌دهد. این عوامل باعث شدند بسیاری از مطالعات اولیه الکتروفیزیولوژیک برای نخستین بار روی نورون‌های نرم‌تنان انجام شوند (Hodgkin and Hoxley, 1939; 1952). در مقایسه با نمونه‌های بی‌مهره، مطالعه مکانیسم‌های سلولی و مولکولی در نورون‌های پستانداران اغلب مستلزم مراحل آماده‌سازی است

که ممکن است همراه با تغییراتی در سازمان‌بندی کلی نورون‌ها باشد. بعلاوه اندازه بسیار کوچک نورون‌ها و نیاز به شرایطی با حداقل تغییرات نسبت به شرایط *in vivo*، انجام ثبت داخل سلولی را مشکل می‌سازد. عملکرد سیستم عصبی بی‌مهرگان و مهره‌داران از جهات بسیاری شبیه می‌باشد، از جمله داشتن گیرنده‌های حسی، شبکه عصبی مرکزی، خروجی‌های حرکتی و مجموعه‌ای از ناقل‌های عصبی، مسیرهای انتقال سیگنال و انواع کانال‌های یونی مشابه (Altrup et al., 1992). بنا به دلایل ذکر شده استفاده از گانگلیون حلزون در مطالعات الکتروفیزیولوژیک مرتبط با فعالیت صرعی به نظر معقول و مفید می‌رسد.

## فصل دوم

مناجیح پیرس پرومہ

## ۲- مروری بر تحقیقات پیشین

### ۲-۱) صرع

صرع یک اختلال پیچیده عصبی می باشد که ۱ تا ۲ درصد از کل جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار داده است (cascino, 1994). تشنجهای صرعی در نتیجه فعالیت الکتریکی بیش از حد و غیر طبیعی نورونها در مغز رخ می دهند و بر سلامت و کیفیت زندگی فرد تأثیرات شدیدی می گذارد (Zainuddin et al., 2012).

تغییر در الگوی فعالیت سیناپس ها و مختل شدن عملکرد کانال های یونی مکانیسم های اصلی زمینه ساز حمله های صرعی می باشند (Nobels, 2003; Wuttke and Lerche, 2006). عدم تعادل بین تحریک و مهار در شرایط صرعی ممکن است از تغییر فعالیت ذاتی برخی نورون ها و یا از تغییرات سیناپسی ناشی شود. تغییر در عملکرد نوروترنسمیترهای گلوتامات و گابا بیش از سایر نوروترنسمیترها در پاتوژنز صرع دخیل است (Meldrum et al., 1999).

با وجود در دسترس بودن داروهای ضد صرعی، حدود یک سوم افراد مبتلا به صرع تشنجهایی را نشان می دهند که حتی با بهترین داروهای موجود کنترل نمی شوند. بسیاری از افراد مبتلا به صرع به درمان دارویی طولانی مدت نیاز دارند که اغلب با عوارض جانبی ناتوان کننده و تداخلات دارویی همراه است (Reddy et al., 2010). در دهه های اخیر مشخص شدن عوارض

جانبی داروهای شیمیایی منجر به بازنگری روش‌های درمانی طبیعی و آغاز سری جدیدی از پژوهش‌ها در زمینه گیاهان دارویی شد (Braun and Cohen, 2007).

## ۲-۲) اسانس‌های گیاهی

از دیر باز گیاهان معطر به خاطر خواص دارویی و نگهدارنده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بودند و بعنوان طعم دهنده نیز استفاده می‌شدند. اسانس‌های روغنی ترکیباتی چند جزئی، پیچیده و طبیعی هستند. این اسانس‌ها عمدتاً متشکل از ترپن‌ها و برخی از ترکیبات غیر ترپنی می‌باشند که به طور گسترده برای پیشگیری و درمان بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (de Almeida et al., 2011). اسانس‌ها به طور معمول از ترپن‌های آروماتیک فرار و فنیل پروپانویدها تشکیل شده‌اند. این مولکول‌ها آزادانه از غشای سلول عبور می‌کنند و ممکن است نقش‌های سیگنالینگ متنوعی را در سلول داشته باشند. بعلاوه گزارشاتی حاکی از مداخله ترکیبات اسانس‌های گیاهی با کانال‌های یونی و رسپتورها وجود دارد (Goncalves et al., 2008).

### الف) ترپن‌ها:

ترپن‌ها گروه متنوعی از محصولات طبیعی که شامل بیش از ۲۰۰۰ عضو هستند و از لحاظ ساختاری و عملکردی از کلاس‌های مختلفی تشکیل شده‌اند. واحد ساختاری آن‌ها ایزوپرن<sup>۱</sup> ( $C_5H_8$ ) نام دارد که از ۵ کربن تشکیل شده است. ترپن‌های اصلی شامل مونوترپن‌ها ( $C_{10}$ ) و سسکوئی‌ترپن‌ها<sup>۲</sup> ( $C_{15}$ ) می‌باشند (Bakkali, et al., 2008).

---

<sup>1</sup>Isoprene

<sup>2</sup>Sesquiterpenes

## ب) ترکیبات آروماتیک

ترکیبات آروماتیک از فنیل پروپان مشتق می‌شوند و شامل آلدهیدها، الکل‌ها، فنول‌ها، مشتقات متوکسی و ترکیبات متیل‌دی‌اکسی می‌باشند (Bakkali, et al., 2008).

## ۳-۲) اثرات بیولوژیک اسانس‌های گیاهی

### ۱-۳-۲) اثرات سیتوتوکسیک اسانس‌ها

اثرات سیتوتوکسیک اسانس‌ها شامل آسیب‌های غشائی، افزایش نفوذپذیری غشاء، اختلال در توزیع یون‌ها، کاهش پتانسیل غشاء، اختلال در پمپ پروتون و کاهش ذخیره‌ی ATP می‌باشد (Ultee et al., 2000; 2002). اسانس‌ها می‌توانند با لخته کردن سیتوپلاسم به لیپیدها و پروتئین‌ها آسیب برسانند (Burt, 2004; Gustafson et al., 1998).

### ۲-۳-۲) اثرات موتاژنیک اسانس‌ها در سطح هسته و سیتوپلاسم

اسانس‌های گیاهی مختلف القاء کننده‌ی جهش<sup>۱</sup>های هسته‌ای نیستند. با این حال استثنایابی نیز وجود دارند. در سطح سیتوپلاسمی اسانس‌های گیاهی قادرند به غشاء و DNA میتوکندریایی آسیب زده و منجر به ایجاد جهش‌هایی در ژن‌های مربوط به پروتئین‌های دخیل در تنفس سلولی شوند (Bakkali et al., 2008).

### ۳-۳-۲) اثرات آنتی موتاژنیک اسانس‌ها

اسانس‌ها ویژگی‌های آنتی موتاژنیک خود را از طریق مکانیسم‌های زیر اعمال می‌کنند:

---

<sup>1</sup>Mutation

ممانعت از نفوذ موتازن‌ها به سلول (Shankel et al., 1993)، غیرفعال کردن موتازن‌ها به شیوه-  
ی Scavenging مستقیم (Ipek et al., 2005)، مهار تبدیل متابولیت‌ها از فرم پیش‌موتازن<sup>۱</sup> به  
موتازن توسط فاکتور P450 (Ramel et al., 1986; Waters et al., 1996) و یا فعال کردن  
پروسه‌ی سم زدایی آنزیمی<sup>۲</sup> موتازن‌ها (Kada and Shimoi, 1987).

## ۲-۳-۴) اثرات سرطان‌زایی<sup>۳</sup> اسانس‌ها

برخی از اسانس‌های گیاهی یا ترکیبات به دست آمده از آن‌ها بعنوان سرطان‌زاهای ثانویه عمل  
می‌کنند (Guba, 2001).

## ۲-۴) ترکیبات اسانس‌ها و عملکرد آن‌ها روی سیستم عصبی مرکزی و محیطی

استفاده سنتی از ترکیبات گیاهی و به ویژه ترپن‌های گیاهی با اهداف درمانی به زمانهای بسیار  
دور بازمی‌گردد. هرچند مکانیسم و چگونگی اعمال اثر این ترکیبات تا حد زیادی ناشناخته  
هستند اما پیشنهاد شده که این ترکیبات دارای اثرات فارماکولوژیک مختلفی روی سیستم  
عصبی می‌باشند. این فرضیه با یافته‌های مطالعات مختلف حمایت می‌شود. بعنوان مثال گزارش  
شده که استفاده از اسانس‌های گیاهی باعث ایجاد اثرات ضد تشویش و ضد اضطراب<sup>۴</sup> در حیوان  
آزمایشگاهی می‌شوند (Umezu., 1999; 2000). با این حال بخش کمی از مطالعات صورت

---

<sup>1</sup>Promutagen

<sup>2</sup>Enzymatic detoxification

<sup>3</sup> Carcinogenicity

<sup>4</sup> Anxiolytic

گرفته، در ارتباط با برهمکنش ترین‌ها با کانال‌های یونی و رسپتورها می‌باشد (Goncalves et al., 2010). در ادامه بطور مختصر به معرفی تعدادی از ترکیبات گیاهی و اثرات بیولوژیک آن‌ها می‌پردازیم.

## ۲-۴-۱) اکالیپتول

اکالیپتول<sup>۱</sup> یا 1,8-cineol یک مونوترپن است که در اسانس روغنی بسیاری از گیاهان از جمله اوکالیپتوس، ریحان<sup>۲</sup>، برگ‌بو و شاهپسند درختچه‌ای یافت می‌شود. این ماده بی‌رنگ دارای بوی معطر مشابه بوی کافور است و به دلیل بو و مزه مطبوع به عنوان عطر و در ساخت لوازم آرایش مورد استفاده قرار می‌گیرد. کامفر، اکالیپتول و ترکیباتی با ساختار مشابه عموماً بعنوان بی‌حس‌کننده‌های موضعی در پزشکی مصرف می‌شوند (Vogt-Eisele et al., 2007) و کاربردهای متنوع تری از جمله اثرات ضد التهابی<sup>۳</sup> به واسطه‌ی اثرات مهاری آن بر تولید واسطه‌های التهاب مانند سیتوکین‌ها، پروستاگلاندینها و لوکوترینها و برخی اثرات روانی برای آنها شناخته شده است (Moussaieff et al., 2008). اکالیپتول همچنین دارای اثرات ضد تومور<sup>۴</sup> و ضد میکروبی می‌باشد و انتقال دارو از طریق پوست را تسهیل می‌کند. تاثیر صرع‌زایی اسانس روغنی برخی گیاهان به مونوترپن‌های دوحلقه‌ای کتونی از جمله کامفر و اکالیپتول نسبت داده شده است (Burkhard et al, 1999).

---

<sup>1</sup> Eucalyptol

<sup>2</sup> Basil

<sup>3</sup> Anti-inflammatory

<sup>4</sup> Antitumor

## ۲-۴-۲) اوجنول

اوجنول یک فنیل پروپن است که از گیاهان متعددی از جمله درخت جوز<sup>۱</sup>، میخک<sup>۲</sup>، دارچین<sup>۳</sup> و ریحان استخراج می‌شود، با اکسید روی ترکیب شده و صمغی را ایجاد می‌کند که به خاطر ویژگی‌های ضدباکتریایی، ضدالتهاب، بی‌حس‌کنندگی موضعی و ضد دردش بطور گسترده‌ای در دندانپزشکی به کار می‌رود (Hashimoto et al., 1988; Ohkubo et al., 1997; Kim et al., 2003; Pizzo et al., 2006; Chaieb et al., 2007; Zheljzakov et al., 2008). این ترکیب بعنوان چاشنی و طعم دهنده در محصولات غذایی و همچنین ماده خوشبوکننده در محصولات آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Opdyke, 1975). اوجنول در سیستم عصبی اثرات متعددی را اعمال می‌کند از جمله: حفاظت از سلول‌های عصبی در برابر ایسکمی و پپتید بتاآمیلوئید (Irie and Keung, 2003; Wie, et al., 1997; Won et al., 1998)، مهار هدایت پتانسیل‌های عمل در عصب سیاتیک (Kozam, 1997)، بهبود بخشیدن به عوارض عصبی و نورونی ناشی از دیابت (Nangle et al., 2006) و سرکوب پتانسیل‌های میدانی صرعی که نشان دهنده‌ی یک پتانسیل درمانی برای اوجنول در صرع می‌باشد (Muller et al., 2006).

## ۲-۴-۳) منتول

منتول از جمله مونوترپن‌هایی است که بعنوان ترکیب اصلی در بسیاری از اسانس‌های روغنی معطر وجود دارد و به طور مصنوعی نیز تهیه می‌شود. منتول علاوه بر مصارف تجاری، ترکیب عمده بسیاری از گیاهانی است که دارای کاربردهای پزشکی هستند. منتول دارای تاثیر بی‌حس‌کنندگی موضعی و اثرات ضد التهابی است. اثرات ضد دردی منتول از طریق فعال کردن

---

<sup>1</sup> Nutmeg

<sup>2</sup> Clove

<sup>3</sup> Cinnamon

اختصاصی رسپتورهای اوپیوئیدی کاپا<sup>۱</sup> انجام می‌شود (Zhang, Galeottia, et al., 2002). همکارانش نشان دادند که منتول با افزایش انتخابی مهار تونیک که به وسیله رسپتورهای با تمایل بالای گابا وساطت می‌شود، تحریک‌پذیری نورون‌های هیپوکامپ را کاهش داده و از این طریق فعالیت صرعی القاء شده توسط کیندلینگ<sup>۲</sup> شیمیایی یا الکتریکی را تقلیل می‌دهد (Zhang et al., 2008).

## ۲-۴-۴) سیترونلول

سیترونلول<sup>۳</sup> یک مونوترپن الکیلی با ساختاری خطی است که در اسانس‌های گونه‌های متعدد گیاهی از جمله علف لیمو<sup>۴</sup> وجود دارد (Lis-Balchin et al., 1998). مطالعات نشان می‌دهند که سیترونلول در مهار تشنجات تونیک-کلونیک موضعی و تشنجات کلونیک عمومی مؤثر است. همچنین می‌تواند اثر محافظتی در برابر تشنجات ناشی از پیکروتوکسین و پنتیلن تترازول داشته باشد. بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که بخشی از فعالیت ضد تشنجی سیترونلول مربوط به اثر تعدیل‌کنندگی آن بر روی انتقالات گابا آرژیک باشد (Leidenheimer et al., 1991; Gale, 1992). از طرفی گزارشی حاکی از اثر ضد تشنجی سیترونلول از طریق مهار کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ و در نتیجه کاهش تحریک‌پذیری نورونی وجود دارد (de Sousa et al., 2006).

---

<sup>1</sup> Kappa-opioid receptor

<sup>2</sup> Kindling

<sup>3</sup> Citronellol

<sup>4</sup> Cymbopogon

لینالول مونوترپن الکلی است که به شکل‌های انانتیومر Licareol و Corlandrol وجود دارد و در گیاهانی مانند اسطوخدوس<sup>۱</sup>، گشنیز، برگ بو و ریحان یافت می‌شود (de Sousa et al., 2011). در طب سنتی و مدرن از لینالول و گیاهان تولید کننده لینالول به عنوان ضد باکتری، ضد درد، ضد التهاب، ضد تومور و ضد تشنج استفاده می‌شوند (Hosseinzadeh et al., 2012; Gu et al., 2010). لینالول اثر ضد تشنجی خود را از طریق مهار باند شدن گلوتامات در کورتکس موش صحرایی و تاثیر بر روی انتقالات گابا آرژیک و گلوتامات آرژیک ایجاد می‌نماید (Brum et al., 2001). لینالول آنتاگونیست رقابتی گیرنده‌های NMDA است و انتقال گلوتامات آرژیک را در هر دو شرایط *in vivo* و *in vitro* از طریق بر همکنش با گیرنده NMDA تعدیل می‌کند. لینالول همچنین آزادسازی و جذب گلوتامات تحریک شده با پتاسیم را در سیناپتوزوم‌های کورتیکال کاهش می‌دهد (Batista et al., 2010; Linck et al., 2009). لینالول همانند امیل استات (amyl acetate)، استوفنون (acetophenone) و لیمون قابلیت حلالیت بالایی در چربی نشان می‌دهد و از طریق تغییر دادن محیط لیپیدی غشا می‌تواند به طور مستقیم با انواع معینی از کانال‌های یونی برهمکنش داشته باشد (Kawai, 1999; Kawai et al., 1997; Kawai and Miyachi, 2000). بعلاوه این مواد خوشبو نه تنها کانال‌های دریچه‌دار وابسته به ولتاژ را مهار می‌کند، بلکه کانال‌های دریچه‌دار وابسته به لیگاند مانند کانال‌های دریچه‌دار گلوتامات (Ohkuma et al., 2002) و کانال‌های دریچه‌دار حساس به نوکلئوتیدهای حلقوی را نیز مهار می‌کنند (Kawai and Miyachi, 2000; Kurahashi et al., 1994). لینالول اثرات بیولوژیک متعددی در سیستم‌های عصبی مرکزی یا حسی دارد. استنشاق لینالول در مهره‌دارانی مانند انسان، اثرات آرام‌بخش بوجود می‌آورد (Buchbauer et al., 1991; Sugawara et al., 1998) و همچنین استنشاق این مونوترپن تحرک موش را بطور قابل توجهی کاهش می‌دهد (Jirovetz et al., 1991). مطالعات اخیر روی سلول‌های گیرنده سوسمار آبی، نورون‌های شبکه سمندر و سلول‌های پورکنژ مخچه موش نشان داده که لینالول به صورت غیر انتخابی اما برگشت‌پذیر جریان‌های وابسته به ولتاژ را سرکوب می‌کند (Narusuye et al., 2005). Leal-Cardoso و همکارانش در ۲۰۱۰ اثرات فارماکولوژیکی لینالول را روی نورون‌های

---

<sup>1</sup> Lavender

حسی سوماتیک با جزئیات بیشتری مورد بررسی قرار دادند و مدعی شدند که احتمالاً مکانیسم اصلی مختل شدن تحریک‌پذیری نورونی، مهار کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ توسط لینالول است.

لینالول اثرات محافظتی قابل توجهی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن در بافت مغزی دارد و همچنین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Çelik and Ozkaya, 2002). لینالول گیرنده‌های نیکوتینی را در اتصالات عصب-عضله تعدیل و تونوسیتة عضلات اسکلتی را با تأثیر بر روی سیستم cAMP کاهش می‌دهد و سبب شل شدن عضلات می‌شود (Lis-Balchin and Hart., 1999). لینالول سبب تعدیل انتقال گاباژیک شده و باعث افزایش تمایل اتصال گابا به گیرنده گابا A می‌گردد (Brum et al., 2001). این ترکیب همچنین بطور وابسته به غلظت و برگشت‌پذیر تحریک‌پذیری تمام انواع فیبرهای میلینه عصب سیاتیک را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر، لینالول تولید پتانسیل عمل نورون‌های گانگلیون ریشه پشتی را بدون تغییر پتانسیل استراحت غشا مسدود و کانالهای سدیمی دریچه‌دار ولتاژی را در نورون‌های ایزوله گانگلیون ریشه پشتی مهار می‌کند (Leal-Cardoso et al., 2010). لینالول فعالیت ضد سرطانی را از طریق آپوپتوز سلول‌های HL-60 سرطان خون (Gu et al, 2010) و فعالیت ضد التهابی را با کاهش دادن ادم پنجه در موش نشان داده است (Leal-Cardoso et al., 2010). برخی مطالعات نشان داده‌اند که لینالول قادر به کاهش درد القاء شده با انواع وسیعی از سیستم‌های نوروترنسمیتری است و فعالیت ضد درد را در آزمون صفحه داغ نشان داده است. این اثر توسط تعدیل کردن گیرنده‌های NMDA، D2، دوپامین، M2 موسکارینی، آدنوزینی، کانال‌های  $K_{ATP}$  و سیگنالینگ نیتریک اکسید واسطه می‌شود (Peana et al., 2003).

## ۵-۲) کانال‌های یونی و مشارکت آن‌ها در فعالیت نورونی

نورون‌ها در سیستم عصبی در محیطی سرشار از یون‌ها قرار دارند و حفظ تعادل این یون‌ها در داخل و خارج نورون‌ها امری ضروری می‌باشد. یون‌ها بواسطه فعالیت انواع کانال‌ها و گیرنده‌های سلولی در دوسوی غشاء تبادل می‌شوند و هرگونه تغییر در عملکرد آن‌ها می‌تواند موجب برهم خوردن تعادل یونی و تغییر در عملکرد طبیعی نورون‌ها شود. اغلب مسیرهای درگیر در تاثیر ترکیبات مختلف بر نورون‌ها نیز بر کانال‌های یونی و عملکرد آن‌ها تاثیر می‌گذارند.

### ۲-۵-۱) کانال‌های کلسیمی

کانال‌های کلسیمی نقش مهمی در عملکرد طبیعی سلول‌ها ایفا می‌کنند. این کانال‌ها نخستین بار در سلول‌های عضلانی شناسایی شدند ولی در سایر سلول‌ها مثل نورون‌ها و سلول‌های ترشحی نیز حضور دارند. ورود کلسیم فرآیندهای متنوعی از جمله فعال شدن آنزیم‌های وابسته به کلسیم، نوسانات پتانسیل غشا، راه‌اندازی انواعی از مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی، آزاد سازی نوروترانسمیترها، تنظیم بیان ژن، و آپوپتوز را به راه می‌اندازد (Perez-Reyes, 2003; Clapham, 2007). کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ<sup>۱</sup> پروتئین‌های عرضی غشاء هستند که ورود کلسیم به داخل سلول را طی دیپلاریزاسیون‌های غشایی امکان‌پذیر می‌سازند. به طور کلی این کانال‌ها به دو دسته‌ی HVA<sup>۲</sup> و LVA<sup>۳</sup> تقسیم می‌شوند. کانال‌های HVA نسبت به کانال‌های LVA برای فعالیت خود به دیپلاریزاسیون غشایی بیشتر احتیاج دارند همچنین طی دیپلاریزاسیون‌های طولانی مدت جریان کلسیمی طولانی‌تری ایجاد می‌کنند.

<sup>1</sup> Voltage-gated calcium channel

<sup>2</sup> High voltage activated

<sup>3</sup> Low voltage activated

مهمترین زیرواحد این کانال‌ها زیرواحد  $\alpha_1$  می‌باشد. این زیرواحد با وزن ۲۵۰-۲۶۰ کیلودالتون بزرگترین زیرواحد کانال بوده و بخش منفذ، حسگر ولتاژ و جایگاه شناخته شده تنظیم کانال بوسیله‌ی پیامبرهای ثانویه، داروها و سموم را شامل می‌شود (Catterall et al., 2003). در کانال‌های HVA زیرواحد  $\alpha_1$  با تعدادی زیرواحد فرعی  $\beta$ ،  $\alpha_2$ ،  $\gamma$  و  $\delta$  گرد هم آمده و یک کمپلکس کانالی را تشکیل می‌دهد (Ertel et al., 2000; Catterall et al., 2005). این زیر-واحدهای فرعی اثرات مهمی بر کنتیک، وابستگی به ولتاژ و ویژگی‌های فارماکولوژیکی این کانال‌ها دارند. وجود زیر واحدهای فرعی در کانال‌های LVA هنوز مورد بحث است.

رایج‌ترین تقسیم‌بندی کانال‌های کلسیمی بر اساس معیارهایی چون قابلیت هدایت، کنتیک فعال و غیر فعال شدن و ویژگی‌های فارماکولوژیک می‌باشد. در این تقسیم‌بندی کانال‌های HVA به انواع کانال‌های L-type، N-type، P/Q-type و R-type، تقسیم‌بندی می‌شوند (Tsien et al., 1987; Randall and Tsien, 1995).

کانال‌های L-type توسط دی‌هیدروپیریدین‌ها مهار می‌شوند. برای فعال شدن خود به دیپلاریزاسیون بالا احتیاج دارند و دارای هدایت یونی بالا هستند. این کانال‌ها بیشتر در جسم سلولی و دندریتهای نزدیک نورون‌ها قرار دارند و مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی را به راه می‌اندازند. توکسین‌های پلی‌پپتیدی ویژه‌ای از سموم عنکبوت، حلزون و رطیل مانند IVA –  $\omega$ agatoxin، Conotoxin GVIA و SNX-482 به ترتیب کانال‌های P/Q، N و R را مهار می‌کنند (Adams et al., 1993). این کانال‌ها برای فعال شدن خود به دیپلاریزاسیون غشایی کمتر از کانال‌های L-type احتیاج دارند و عمدتاً در نورون‌ها بیان شده و بیشتر در آزادسازی نوروترانسمیترها نقش دارند، همچنین ورود کلسیم به جسم سلولی و دندریتهای را وساطت می‌کنند (Catterall et al., 2003). موش‌هایی با جهش در کانال‌های P/Q درجاتی از تشنجات غائب<sup>۱</sup> را نشان می‌دهند (Jouveneau et al., 2001).

کانال‌های کلسیمی LVA که نوع T هم نامیده می‌شوند در پتانسیل غشایی نزدیک پتانسیل استراحت غشاء (حدود ۷۰- میلی‌ولت) فعال می‌شوند، هدایت یونی پایین و دوره باز بودن کوتاه

<sup>1</sup> Absence epilepsy

دارند. این کانال‌ها بیشتر در جسم سلولی و دندریت نوروها بیان می‌شوند. از مهارکننده‌های رایج این نوع جریان‌ات کلسیمی می‌توان میبفرادیل<sup>۱</sup>، کورتوکسین<sup>۲</sup> (سم عقرب) و یون نیکل را نام برد (Perez-Reyes, 2003; Catterall et al., 2005). مطالعات متعددی وجود کانال‌های کلسیمی نوع L و T را در نوروهای حلزون نشان داده‌اند. مشخص شده که ۵۵٪ از جریان‌های کلسیمی در نوروهای حلزون از نوع L و مابقی از نوع T می‌باشد (Faizi et al., 2003; Vatanparast et al., 2006; Senatore and Spafford, 2010).

## ۲-۵-۲) کانال‌های پتاسیمی

کانال‌های پتاسیمی گروهی از پروتئین‌های غشایی دارای عملکردهای متعدد در سلول‌های تحریک‌پذیر و غیر تحریک‌پذیر هستند. در شرایط نرمال فعال شدن این کانال‌ها منجر به کاهش تحریک‌پذیری غشاء می‌شود به این دلیل که پتاسیم براساس شیب الکتروشیمیایی از سلول خارج می‌شود (Yuan and Chen, 2006). این کانال‌ها بویژه در تثبیت و حفظ پتانسیل غشا نقش مهمی را ایفا می‌کنند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک از جمله پیام‌رسانی سلولی، ترشح انسولین، تحریک‌پذیری نوروها، انتقال اپیتلیالی الکترولیت‌ها، انقباض عضله صاف، تنظیم حجم سلول و ضربان قلب دخیلند (Hille, 2001).

## ۲-۵-۲-۱) کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ

کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ، تنظیم‌کننده طول مدت فاز ریپلاریزاسیون پتانسیل عمل، هیپرپلاریزاسیون متعاقب (AHP) و فاصله بین اسپایک‌ها می‌باشند (Edgerton et al., 2003). از جمله این کانال‌ها، کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ جبران‌کننده تاخیری<sup>۳</sup> ( $K_{Dr}$ ) که به

<sup>1</sup> Mibefradil

<sup>2</sup> Kurtoxin

<sup>3</sup> Delayed rectifier

دلیل فعال شدن آهسته‌شان احتمالاً در فاز رپلاریزاسیون و تعیین عرض پتانسیل عمل مشارکت می‌کنند و کانال‌های پتاسیمی سریع غیر فعال شونده A-type که بواسطه کنتیک بسیار سریع‌شان در ایجاد فعالیت با فرکانس بالا مشارکت دارند (Jonas et al., 2004). هر دو نوع کانال مذکور با دپلاریزاسیون غشا فعال می‌شوند. با این حال جریان‌های KA نسبت به جریان‌های  $K_{Dr}$  بسیار سریع‌تر غیرفعال می‌شوند. جریان‌های پتاسیمی نوع M که غیر فعال شدنشان تا ۱۵ ثانیه طول می‌کشد و معمولاً بعنوان کانال‌هایی که غیرفعال نمی‌شوند شناخته می‌شوند و بواسطه همین ویژگی‌شان در پدیده تطابق<sup>۱</sup> مشارکت دارند (Mathie et al., 1998; Storm, 1990).

## ۲-۲-۵-۲) کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم

در بسیاری از نورون‌ها از جمله نورون‌های حلزون ورود کلسیم طی پتانسیل عمل گروهی از کانال‌های پتاسیمی را فعال می‌کند. فعالیت این کانال‌ها منجر به جریان‌های پتاسیمی رو به خارج می‌گردند که در رپلاریزاسیون و هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل (AHP) مشارکت دارند (Vatanparast et al., 2007). این کانال‌ها بر اساس ویژگی‌های بیوفیزیکی و فارماکولوژیکی به ۳ دسته ی BK، SK و IK تقسیم می‌شوند (Vegara et al., 1998). کانال‌های BK و SK تا حد زیادی در نورون‌های حلزون شناسایی شدند (Gola et al., 1990; Bal et al., 2001). کانال‌های BK هدایت‌پذیری بالایی داشته و فعال شدنشان مستلزم دپلاریزاسیون غشاء و حضور کلسیم می‌باشد (McManus, 1991) از نظر عملکردی کانال‌های BK در رپلاریزاسیون سریع و نیز در AHP سریع<sup>۲</sup> نقش دارند (Gu et al., 2007). در حالیکه کانال‌های SK فعال شدنشان وابسته به حضور کلسیم است (McManus, 1991)، هدایت‌پذیری کمی دارد و به ولتاژ غیرحساس می‌باشند (Hallworth et al., 2003; Sah, 1996). کانال‌های

<sup>1</sup>Accommodation

<sup>2</sup> Fast AHP (fAHP)

SK در AHP آهسته<sup>۱</sup> و متوسط<sup>۲</sup> مداخله می‌کنند (Sah and McLachlan, 1992). کانال‌های IK نسبت به دو مورد دیگر هدایت‌پذیری متوسطی دارند، به ولتاژ غیرحساس‌اند و در نوروها یافت نمی‌شوند و در سلول‌های محدودی مثل گلبول‌های قرمز و سلول‌های اپتالیایی بیان می‌شوند (Ishii et al., 1997).

## ۲-۵-۳) کانال‌های سدیمی

کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ برای شروع و انتشار پتانسیل‌های عمل در نوروها ضروری هستند. این کانال‌ها پروتئین‌های عرض غشائی و کمپلکسی از یک زیرواحد  $\alpha$  با وزن مولکولی ۲۶۰ کیلودالتون و دوزیرواحد مجزای  $\beta$  شامل  $\beta 1$  با وزن مولکولی ۳۶ کیلودالتون و  $\beta 2$  با وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون می‌باشند. هر زیرواحد  $\alpha$  پلی‌پپتید بزرگی از حدود ۲۰۰۰ باقیمانده اسید آمینه است که از چهار تکرار هومولوگ تشکیل شده و هر تکرار شامل شش قطعه عرض غشائی (S1-S6) است. چهار تکرار هومولوگ منفذ کانال را تشکیل می‌دهند و قطعه S4 در هر تکرار بعنوان سنسور ولتاژ عمل می‌کند. زیر واحد آلفا دارای نقش عملکردی اساسی در کانال‌های سدیمی است و این زیرواحد بعنوان جایگاه گیرنده برای تترودوتوکسین<sup>۳</sup> و ساکسی‌توکسین<sup>۴</sup> (بلوکرهای کانال سدیمی) عمل می‌کند و از طرفی سم عقرب<sup>۵</sup> (فعال کننده کانال سدیمی) کانال را تحت تاثیر قرار می‌دهد، بنابراین پیشنهاد شده که زیرواحد مذکور هم در هدایت یونی و هم در فرایند gating کانال دخیل می‌باشد. زیرواحد  $\beta 2$  از طریق پیوند دی‌سولفید با زیرواحد  $\alpha$  پیوند کووالان دارد، در حالی که زیرواحد  $\beta 1$  پیوند کووالان ندارد. زیرواحدهای  $\alpha$  و  $\beta$  به شدت گلیکوزیله هستند (Catteral, 1995). این کانال‌ها به شدت در

<sup>1</sup> Slow AHP(sAHP)

<sup>2</sup> Medium AHP (mAHP)

<sup>3</sup> Tetrodotoxin

<sup>4</sup> Saxitoxin

<sup>5</sup>Scorpion toxin

طی تکامل حفظ شده‌اند و در بافت‌های مختلف قابل تحریک از جمله عضله قلبی، عضله اسکلتی و سلول‌های عصبی ساختار یکسان دارند.

## ۲-۵-۴) جریان‌های سدیمی گذرا و مداوم

جریان سدیمی وابسته به ولتاژ ( $I_{Na}$ ) شامل ورود گذرای سدیم است که منجر به دپلاریزاسیون غشا می‌شود. کانال سدیمی بسته به پتانسیل غشا می‌تواند سه حالت عملکردی متفاوت داشته باشد: بسته، باز (فعال) و غیر فعال. جریان‌های عبوری از کانال‌های باز کنتیک سریعی دارد و در کمتر از یک میلی ثانیه به اوج می‌رسد و در حد چند میلی ثانیه به حد پایه کاهش می‌یابد (Cummins et al., 1994).

در حالیکه  $I_{Na}$  جریان مسئول فعالیت نورونی است، اما شواهدی مبنی بر حضور یک جریان سدیمی مداوم ( $I_{Nap}$ )<sup>۱</sup> که مخصوصاً در تعدیل تحریک‌پذیری نورونی مؤثر می‌باشد، نیز وجود دارد. این جریان در انواعی از نورون‌ها از جمله آکسون اسکونئید، تالاموس، استریاتوم و نئوکورتکس انسان گزارش شده است و معمولاً تنها کسر کوچکی (۱-۳٪) از کل جریان پیک سدیم را در نورون‌ها نشان می‌دهد؛ با این حال می‌تواند الگوی تولید پتانسیل عمل را بشدت تحت تأثیر قرار دهد (French et al., 1990; Crill, 1996; Wu et al., 2005).

هنوز جای بحث است که آیا جریان سدیمی مداوم از یک کانال وابسته به ولتاژ متفاوت از کانال سدیمی وابسته به ولتاژ گذرا منشأ می‌گیرد یا نه. یک تئوری اینست که  $I_{Nap}$  بوسیله یک زیرگروه اختصاصی از کانال‌های سدیمی تولید می‌شود. شواهدی که این فرضیه را حمایت می‌کنند نشان می‌دهند که  $I_{Nap}$  آستانه‌ای حدود ۱۰ میلی ولت کمتر از  $I_{Na}$  دارد. اما از سوی دیگر مشخص شده که  $I_{Nap}$  معمولاً بوسیله همان بلوک‌های  $I_{Na}$  مانند تترودوتوکسین مهار می‌شود. مطالعات بیولوژی مولکولی نشان می‌دهند که به احتمال قوی هر دو جریان مذکور از

<sup>۱</sup>Persistent sodium current

یک کانال منشأ می‌گیرند، با این تفاوت که شیوه gating کانال در این جریان‌ها یکسان نیست (یک روش Slow-gating برای جریان  $I_{Nap}$  وجود دارد) (Stafstrom, 2007).

## ۲-۶) تعدیل کانال‌های یونی توسط فسفریلاسیون

شواهد قابل توجهی وجود دارند که نشان می‌دهد مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی از جمله مسیرهای مربوط به پروتئین کینازها<sup>۱</sup> می‌تواند فعالیت کانال‌های یونی مختلف را تعدیل کنند. فسفریلاسیون کانال‌های یونی منجر به تغییرات ساختاری و به دنبال آن تغییرات عملکردی کانال‌های یونی و همچنین تغییر فعالیت الکتریکی نورون‌ها می‌شود (Iskande et al., 1995). پروتئین کینازها بواسطه تحریک گیرنده‌های گلوتمات متابوتروپیک<sup>۲</sup> (mGluRS) فعال می‌شوند. در ادامه مروری خواهیم داشت بر رسپتورهای مذکور و پروتئین کینازها.

## ۲-۶-۱) گیرنده متابوتروپیک

گلوتمات نوروترنسمیتر تحریکی عمده در مغز پستانداران است، وجود رسپتورهای گلوتمات تعدیلی-عصبی که گیرنده‌های گلوتمات متابوتروپیک نامیده می‌شوند، مکانیسمی را فراهم می‌آورد که به وسیله‌ی آن گلوتمات می‌تواند از طریق مسیرهای سیگنالینگ پیامبر ثانویه، تحریک-پذیری سلولی و انتقال سیناپسی را در سرتاسر سیستم اعصاب مرکزی تعدیل کند. mGluRS اعضای ابرخانواده رسپتور جفت شده با G-پروتئین<sup>۳</sup> (GPCR) می‌باشند که فراوان‌ترین خانواده‌ی ژنی رسپتور، در ژنوم انسانی هستند. GPCR، پروتئین‌های بایند شده به غشا هستند

<sup>1</sup> Protein kinases

<sup>2</sup> Metabotropic glutamate receptors

<sup>3</sup> G-protein-coupled receptor

که بوسیله‌ی لیگاندهای خارج سلولی نظیر پپتیدها و نوروترانسمیترها فعال می‌شوند، باعث انتقال سیگنال‌های درون سلولی از طریق برهمکنش‌ها با G-پروتئین می‌شوند و دارای N ترمینال بسیار بزرگ برای اتصال گلوتامات هستند (Kew and Kemp, 2005; Colleen M. Niswender and P. Jeffrey Conn, 2010). تغییر حاصله در ساختار GPCR ناشی از بایندینگ لیگاند G-پروتئین را فعال می‌کند. G-پروتئین از یک کمپلکس هتروتیرمیک زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  تشکیل شده است. G-پروتئین‌ها در حالت غیرفعالشان به گوانوزین ۵-دی فسفات (GDP) متصلند و فعال‌سازی G-پروتئین باعث مبادله‌ی گوانوزین ۵-تری فسفات (GTP) با GDP در زیرواحد  $\alpha$  می‌شود. سپس زیرواحدهای G-پروتئین فعال شده عملکرد افکتورهای مختلف نظیر آنزیم‌ها، کانال‌های یونی و عوامل رونویسی را تعدیل می‌کنند. غیرفعال‌سازی زمانی رخ می‌دهد که GTP متصل شده به GDP هیدرولیز می‌شود (Colleen M. Niswender and P. Jeffrey Conn, 2010).

هشت گیرنده متابوتروپیک گلوتامات با توالی‌های مولکولی مشخص تا به امروز شناخته شده که بر اساس سیستم‌های پیامبر ثانویه‌شان، همسانی توالی و فارماکولوژی آگونیستی و آنتاگونیستی به سه گروه متمایز تقسیم می‌شوند (Dingledine et al., 1999; Kunishima et al., 2000; Meldrum et al., 1999). گروه I شامل (۵ و ۱) mGlu می‌باشند که با  $Gq / G_{11}$  جفت می‌شوند و فسفولیپاز  $C\beta$  را فعال می‌کنند که منجر به هیدرولیز پلی فسفوانوزیتید (PI) و تولید اینوزیتول 1,4,5 تری فسفات (IP3) و دی‌آسیل گلیسرول (DAG) می‌شوند، این مسیر منجر به فعال‌سازی پروتئین کیناز C می‌شود (Colleen M. Niswender and P. Jeffrey Conn, 2010). گروه II شامل (3 و 2) mGlu و گروه III، شامل (4, 6, 7, 8) mGlu می‌باشند که فعالیت آدنیلیل سیکلاز را مهار می‌کنند. گروه II و III با پروتئین‌های  $Gi/o$  جفت می‌شوند و در سیستم اعصاب مرکزی مسیرهای را به راه می‌اندازند که منجر به، مهار کانال‌های کلسیمی حساس به ولتاژ، مهار یا تحریک cAMP، تحریک هیدرولیز PI و فعال‌سازی مسیرهای پروتئین کیناز فعال کننده میتوزن (MAP) می‌شود (Pin and Duvoisin, 1995; Conn and Pin, 1997).

## ۷-۲) پروتئین کینازها

پروتئین کینازها آنزیم‌هایی هستند که سوبستراهای پروتئینی را بوسیله‌ی انتقال یک گروه فسفات از یک دهنده با انرژی بالا مانند ATP و GTP فسفریله می‌کنند (Blagden and de Bono, 2005). فسفریله شدن پروتئین جنبه‌های متعدد عملکرد سلولی مانند تقسیم، متابولیسم، بقا و آپوپتوز را تنظیم می‌کنند (Cheetham, 2004, Kondapalli et al., 2005). این آنزیم‌ها نقش اساسی در یکپارچگی شبکه‌های سیگنالینگ در سلول‌های یوکاریوت دارند و فرایندهای سلولی بی‌شماری را طی رشد و تکامل تنظیم می‌کنند. پروتئین کینازها بر اساس آمینواسیدهایی که مورد هدف قرار می‌دهند به دو دسته تقسیم می‌شوند دسته‌ی اول تیروزین کینازها هستند که اسیدآمینو تیروزین را فسفریله کرده و خود شامل دو گروه تیروزین کیناز رسپتوری و تیروزین کیناز غیر رسپتوری می‌باشند. دسته‌ی دوم سرین-ترئونین کینازها هستند که سرین و ترئونین را فسفریله می‌کنند و محلول در سیتوپلاسم هستند. پروتئین کیناز A و C جزء دسته‌ی اخیر می‌باشند (Shchemelinin et al., 2006).

## ۷-۲-۱) PKA و اثر بر کانال‌های یونی

یکی از ساده‌ترین اعضای خانواده PK، پروتئین کیناز وابسته به cAMP می‌باشد. فرایندهایی که cAMP درون سلولی را افزایش می‌دهد منجر به فعال‌سازی PKA می‌شود. PKA از دو زیرواحد کاتالیکی و دو زیرواحد تنظیمی تشکیل شده‌اند که در حالت غیرفعال دو زیرواحد تنظیمی به یکدیگر متصل‌اند و جایگاه‌های فعال زیرواحد کاتالیکی را می‌پوشانند. زیرواحد تنظیمی دارای دو دمین متصل شونده به cAMP در پایانه‌ی کربوکسیلی خود می‌باشد. پروتئین‌های لنگری کیناز A (AKAP) که بعنوان داربست برای PKA به کار می‌روند، بوسیله پایانه‌ی آمینی زیرواحد تنظیمی آنزیم را در جایگاه‌های خاص در سلول متمرکز می‌کنند و

بنابراین محیط‌های کوچک برای سیگنالینگ PKA فراهم می‌شود. زیرواحد کاتالیک دارای یک دمین انتهایی آمینی برای اتصال به ATP و یک دمین انتهایی کربوکسیلی برای اتصال به سوبسترای خود و آمینواسیدهای حفاظت شده برای انتقال فسفات به سوبسترا می‌باشد (Taylor et al., 2004).

تعداد زیادی از مطالعات نشان داده‌اند که چندین پروتئین کیناز در تعدیل درد ضروری هستند بویژه شواهد قوی دلالت بر این دارند که PKA و PKC در ایجاد و حفظ حساس‌سازی مرکزی دخیل هستند. افزایش در تحریک‌پذیری نورونی مثل آنهایی که مرتبط با حساس‌سازی مرکزی هستند بطور عمده از تعدیل وابسته به فسفریله شدن کانال‌های یونی منتج می‌شوند. کانال‌های پتاسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ، تعیین‌کننده‌های مهم تحریک‌پذیری نورونی در سیستم اعصاب مرکزی هستند. بنابراین تغییرات در عملکرد کانال  $K^+$  احتمالاً به تحریک‌پذیری افزایش یافته در حساس‌سازی مرکزی کمک می‌کند. Hu و همکارانش نشان دادند که PKA و PKC جریانات A-type را در نورون‌های شاخ پشتی نخاع کاهش می‌دهند (Hu et al., 2003). به دلیل تنوع زیاد کانال‌های پتاسیمی PKA هم دارای اثر مهارى و هم تحریکی بر این کانال‌ها می‌باشد (Iskander, et al., 1995).

Ewald و همکارانش در سال ۱۹۸۵ گزارش کردند که فعالیت کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم در نورون حلزون، با فسفریله شدن توسط PKA افزایش یافت (Ewald et al., 1985).

نشان داده شده است که فسفریلاسیون و بویژه فسفریلاسیون وابسته به cAMP نقش اساسی در تنظیم کانال‌های کلسیمی فعال شده در ولتاژ بالا بازی می‌کند (Armstrong and Kalman, 1988). همچنین نشان داده شده است که فسفریلاسیون کانال‌های کلسیمی HVA توسط PKA یا PKC منجر به افزایش جریان‌های کلسیمی در سلول‌های تحریک‌پذیر می‌شود (Yang, Goldin and Smith, and Tsien, 1993). در سال ۱۹۹۲ گزارش کردند که در کانال‌های سدیمی مغز موش تنها فسفریلاسیون یک ناحیه برای کاهش جریان‌های سدیمی ضروری و کافی است که این کاهش جریان می‌تواند در نتیجه کاهش مدت زمان باز بودن کانال یا کاهش تعداد کانال‌هایی که قادر به باز شدن هستند باشد با این حال گزارشاتی مبنی بر افزایش جریان سدیمی توسط PKA نیز وجود دارد (Iskander, et al., 1995).

## ۲-۷-۲) PKC و اثر بر کانال‌های یونی

خانواده PKC در مسیرهای انتقال سیگنال شرکت می‌کنند و اثرات بسیاری از محرک‌های خارج سلولی مانند فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و داروها را تعدیل می‌کنند و هیدرولیز لیپیدها را افزایش می‌دهند (Jenny et al., 2005). این آنزیم برای فعالیت خود به دی‌آسیل‌گلیسرول و در برخی موارد کلسیم نیاز دارد. دی‌آسیل‌گلیسرول در نتیجه هیدرولیز برخی لیپیدها ایجاد می‌شود. فعالیت رسپتورهای متابوتروپیک گلوتامات نوع یک قادر به فعال‌سازی فسفولیپاز C و در نتیجه تولید اینوزیتول‌تری فسفات و دی‌آسیل‌گلیسرول به واسطه‌ی هیدرولیز فسفاتیدیل-اینوزیتول می‌باشد (Hermans and Challiss, 2001). این آنزیم دارای چهار دمین (C1-C4) می‌باشد. C1 حاوی موتیف‌های لازم برای اتصال به دی‌آسیل‌گلیسرول، C2 دارای نواحی شناخته‌شده برای اتصال لیپیدهای اسیدی و در بعضی موارد کلسیم و C3 و C4 نواحی متصل-شونده به ATP و سوستر را تشکیل می‌دهند. برخی از این کینازها به دلیل فقدان C2 غیر وابسته به کلسیم می‌باشند (Koya and L. King, 1998).

فعال‌سازی PKC با تعدیل تعدادی از کانال‌های یونی مرتبط است که پتانسیل غشاء یا تحریک پذیری غشاء را تنظیم می‌کند (Tanaka and Nishizuka, 1994). در برخی از سلول‌ها PKC منجر به افزایش جریان‌ات کلسیمی وابسته به ولتاژ از طریق تغییر در ولتاژ آستانه فعال‌سازی به سوی پتانسیل‌های غشایی منفی‌تر می‌شود (Swartz et al., 1993) و در برخی سلول‌های دیگر فعال‌سازی PKC منجر به مهار جریان‌ات کلسیمی می‌شود (Sena et al., 1995). اثر PKC بر کانال‌های پتاسیمی بسته به نوع کانال و نوع سلول می‌تواند مهاری یا تحریکی باشد (Iskander et al., 1995). PKC فعال شده منجر به تاثیرات تعدیلی گسترده‌ای بر تعدادی از هدایت‌های یونی نورو می‌شود که تحریک‌پذیری نورو می‌را تعیین می‌کنند، این تاثیرات شامل کاهش جریان‌ات پتاسیمی جبران‌کننده تاخیری (Tokimasa and Akasu, 1990)، کاهش جریان‌ات گابا (Krishek et al., 1994) و فعال‌سازی جریان‌ات کلسیمی مختلف، AMPA یا NMDA می‌باشد (Swartz et al., 1993). یک مطالعه مستقیم جریان‌ات یونی کنترل شده توسط PKC

در نورون‌های تنفسی بصل‌النخاع وجود دارد، Richter و Champagnat نشان دادند که تزریق درون سلولی فوربول استر (phorbol ester)، یک فعال‌کننده PKC، نورون‌های تنفسی را دپلاریزه می‌کند که بیانگر کاهش وابسته به PKC در کانداکتانس‌های  $K^+$  مداوم است (Champagnat and Richter, 1993).

فعال‌سازی PKC در نورون‌های هیپوکمپ باعث مهار جریان‌های پتاسیمی مداوم، که شامل جریان‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم یا  $I_{K-Ca}$  و غیر وابسته به کلسیم  $I_K$  می‌شود (Doerner et al., 1988)، در حالیکه در سلول‌های نوروبلاست، جریان‌های پتاسیمی نوع M را مهار می‌کنند (Malenka et al., 1986).

فعال‌سازی PKC توسط فوربول استر یا دی‌آسیل گلیسرول جریان سدیمی را در نورون‌های مغز موش کاهش می‌دهد (Numann et al., 1991).

## فصل سوم

مخارج و اجزای کلام

## ۳- مواد و روش‌ها

### ۳-۱) حیوانات

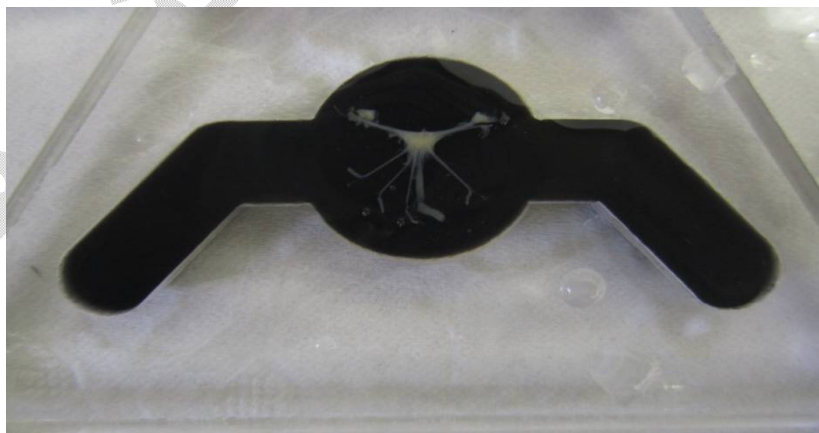
مدل آزمایشگاهی مورد استفاده در کلیه آزمایش‌ها، حلزون باغی (*Caucasotachea atrolabiata*) بود (شکل ۳-۱). نمونه بالغ حلزون باغی، دارای صدف بزرگی با قطر تقریبی ۳ سانتی متر، راست گرد، فشرده (طول کمتر از عرض) و دارای ۴ تا ۵ پیچ در طول صدف می‌باشند. صدف در رنگ‌های مختلف و معمولاً به رنگ قهوه‌ای تیره یا شاه بلوطی با نوارهای زرد رنگ دیده می‌شود. نمونه‌ها در شرایط مناسب از لحاظ درجه حرارت مناسب، نور و دسترسی به آب و غذا در شرایط آزمایشگاه نگهداری و با هویج، خیار و کاهو تغذیه می‌شدند.



شکل ۳-۱. حلزون باغی

## ۲-۳) تشریح و آماده سازی گانگلیون عصبی جهت ثبت

آزمایش‌ها بر روی نوروهای مجموعه گانگلیونی تحت مری<sup>۴۶</sup> انجام می‌گرفت (شکل ۲-۳). قبل از انجام آزمایش، بمنظور ایجاد شرایط فیزیولوژیک یکسان و حصول اطمینان از فعال بودن جانور، آن‌ها را درون ظرف آب قرار داده و پس از بیرون آمدن از صدف ابتدا صدف جانور بوسیله انبر استخوان شکن برداشته شده و سپس به کمک سوزن سر و پای حلزون بدون صدف روی چوب پنبه ثابت می‌شد. با ایجاد شکافی طولی در ناحیه گردن جانور، حلقه گانگلیونی دور مری شناسایی و از بدن خارج شده و به داخل محفظه ثبت با بستر سیلگارد و حاوی رینگر نرمال حلزون منتقل و سپس با سوزن حشره در این محفظه تثبیت می‌شد. نوروها در این مجموعه گانگلیونی بوسیله دو لایه بافت پیوندی احاطه شده‌اند. بخش پشتی گانگلیون دارای اعصاب کمتری بوده و با برداشتن لایه‌های پیوندی در این ناحیه، توسط پنس‌های بسیار ظریف در زیر استریومیکروسکوپ، نوروها آشکار می‌شدند.



شکل ۲-۳. گانگلیون تحت مری تثبیت شده در محفظه ثبت

<sup>46</sup> Suboesophageal ganglia

### ۳-۳) محلول ها و داروها

محلول رینگر نرمال حلزون شامل (بر حسب میلی مولار):

NaCl (80), CaCl<sub>2</sub> (10), MgCl<sub>2</sub> (5), KCl (4), HEPES (5) و Glocuse (10) بود (Taylor, 1987) و PH آن به کمک دستگاه PH متر و با استفاده از Trisma base در حد ۷/۴ تنظیم می گردید.

لینالول در یخچال نگهداری شده و قبل از انجام آزمایشها غلظت‌های مناسب آن تهیه و در حین انجام آزمایش غلظت‌های مورد نظر به محفظه ثبت سلولی افزوده می‌شد. سایر داروها شامل نیکل کلرید (مهارکننده غیر اختصاصی کانال‌های کلسیمی) و نیفدیپین<sup>۴۷</sup> (مهارکننده کانال کلسیمی نوع L) و کلریتترین (مهارکننده پروتئین کیناز C) و H89 (مهارکننده پروتئین کیناز A) می‌باشند که در یخچال نگهداری و مورد استفاده قرار گرفتند.

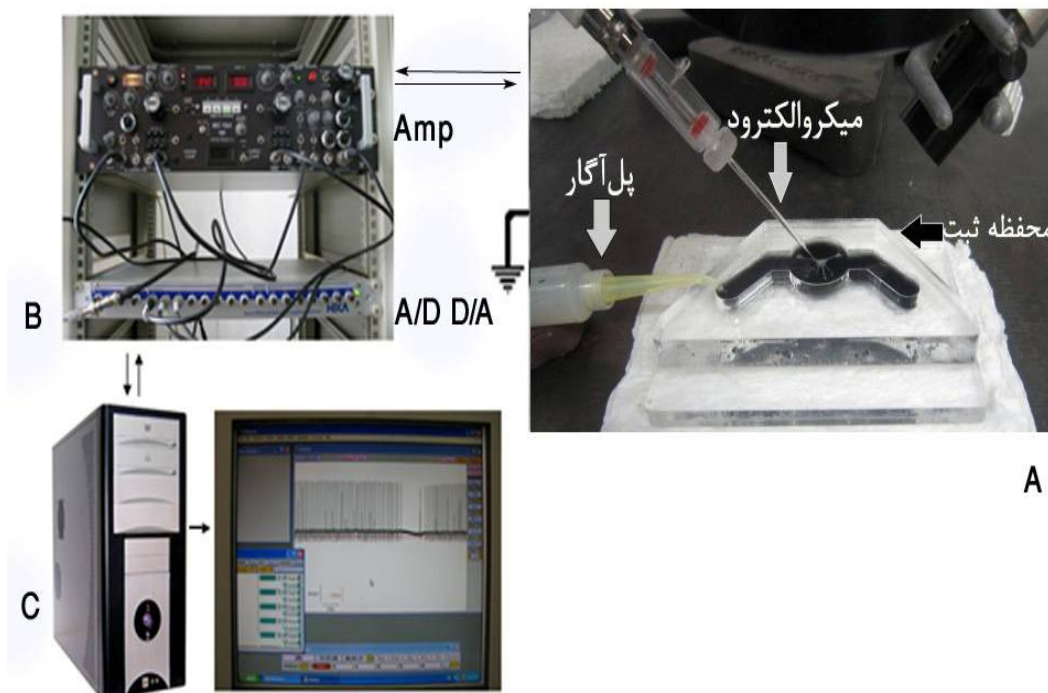
### ۳-۴) ثبت داخل سلولی

پتانسیل‌های عمل خودبخودی و برانگیخته در شرایط کنترل و متعاقب تیمارهای مختلف با روش تثبیت جریان با استفاده از آمپلی فایر (SEC-10LX (npi, Germany) ثبت گردید. میکروالکترودهای مورد استفاده از میکروپیت‌های دیواره نازک از جنس بروسیلیکات (USA) و با کمک یک میکروالکتروود پولر افقی (Sutter Instrument, USA) تهیه می‌شد. الکترودها با محلول KCl سه مولار پر شده و نمونه‌های بدون نشت که ۵-۱ مگا اهم مقاومت داشتند جهت

<sup>47</sup>Nifedipine

ثابت مورد استفاده قرار می‌گرفتند. یک سیم نقره با روکش کلرید نقره محلول داخل میکروالکتروده شیشه‌ای را به ورودی پره‌آمپلی فایر وصل می‌کرد. در تمام آزمایش‌ها از یک پل آگار بعنوان الکتروده مرجع استفاده می‌شد که محلول محافظه‌ی ثابت را به پتانسیل صفر (زمین) وصل می‌کرد (شکل ۳-۳).

پس از ورود الکتروده به نورون، ثابت پایه برای حدود پنج دقیقه به عمل می‌آمد و در صورتی که نورون از نظر ویژگی‌های الکتریکی غشاء دارای وضعیت مناسب و پایدار بود، ثابت پتانسیل‌های غشائی در وضعیت تثبیت جریان در شرایط کنترل و متعاقب تیمارهای مختلف به عمل می‌آمد. داده‌های ثبت شده توسط یک مبدل آنالوگ-دیجیتال (HEKA, Germany) رقمی شده و به کمک نرم افزار Patchmaster ذخیره می‌گردید و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار fitmaster انجام می‌شد.



شکل ۳-۳. نمایی از وسایل ثبت داخل سلولی. ولتاژ غشاء ثبت شده توسط میکروالکتروده (A) به ترتیب به آمپلی فایر، مبدل آنالوگ/دیجیتال و دیجیتال/آنالوگ (B) و نهایتاً به کامپیوتر (C) منتقل می‌شود.

### ۳-۵) مراحل آزمایش

ابتدا فعالیت خودبخودی و برانگیخته سلول با تکنیک کلمپ جریان ثبت می‌شد. پس از انجام این ثبت در هر گروه داروهای مورد نظر به محیط خارج سلولی تزریق شده و مجدداً در محلول جدید، فعالیت خودبخودی و برانگیخته ثبت می‌شد.

جهت بررسی و مطالعه فعالیت خودبخودی نورون‌ها در شرایط کنترل ابتدا به مدت ۵ دقیقه ثبت پایه در رینگر نرمال بعمل می‌آمد و فرکانس و ویژگی‌های اسپایک‌های خودبخودی نورون‌ها ثبت می‌شد. سپس بمنظور بررسی اثر مستقیم لینالول بر فعالیت الکتریکی سلول و نقش احتمالی آن در تحریک‌پذیری نورونی، این ماده با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میلی مولار به محفظه‌ی ثبت داخل سلولی افزوده می‌شد و همانند شرایط کنترل فعالیت خودبخودی و برانگیخته مورد مطالعه قرار می‌گرفت.

بمنظور بررسی نقش کانال‌های کلسیمی در رابطه با عملکرد لینالول، از مهار کننده‌های این کانال‌ها یعنی نیکل کلرید (مهار کننده غیر اختصاصی کانال‌های کلسیمی) و نیفدیپین<sup>۴۸</sup> (مهار کننده کانال کلسیمی نوع L) و به منظور بررسی نقش کینازها از کلریتین (مهارکننده‌ی پروتئین کیناز C) و H89 (مهارکننده‌ی پروتئین کیناز A) استفاده شد.

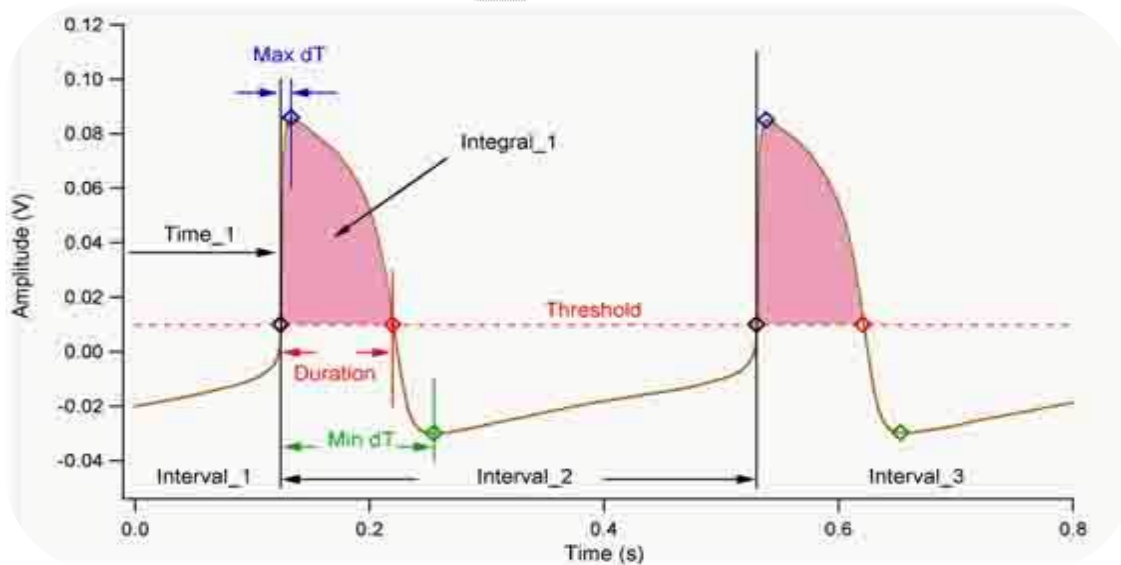
### ۳-۶) پارامترهای الکتروفیزیولوژیک مورد مطالعه

پارامترهای الکتروفیزیولوژیک مورد بررسی در این مطالعه از قرار زیر می‌باشند:

۱. پتانسیل استراحت غشاء (RMP)

<sup>48</sup>Nifedipine

۲. آستانه پتانسیل عمل (Threshold)
۳. فرکانس فعالیت الکتریکی خودبخودی
۴. طول مدت پتانسیل عمل در پتانسیل آستانه (Action potential duration)
۵. طول مدت فاصله بین پتانسیل عمل‌ها (Interspike interval)
۶. سطح زیر منحنی پتانسیل عمل (Integral)
۷. دامنه‌ی پتانسیل عمل (AP amplitude)
۸. دامنه ولتاژ پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزان ( $AHP^{49}$ )
۹. طول مدت دوره AHP (AHP Duration)
۱۰. شیب فاز دیپلاریزاسیون و رپلاریزاسیون پتانسیل عمل (D slope & R slope)
۱۱. فرکانس پتانسیل عمل در حین تزریق جریان مثبت
۱۲. دوره مهار فعالیت متعاقب تحریک (PSIP)<sup>50</sup>
۱۳. مقاومت ورودی سلول (input resistance)



شکل ۳-۴. نحوه اندازه گیری برخی پارامترهای پتانسیل عمل

<sup>49</sup> After Hyperpolarization

<sup>50</sup> Post Stimulus Inhibitory Period

### ۷-۳) آزمون آماری

اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر فعالیت‌های الکتریکی ثبت شده به کمک نرم افزار Fitmaster انجام شد و بمنظور مقایسه داده‌ها از آزمون آماری Repeated measure و تست Bonferroni استفاده شد. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش شده و اختلاف‌های با  $P < 0.05$  بعنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شدند.

منابع پارس پیرو همه

فصل چہارم

نتائج

## ۴- نتایج

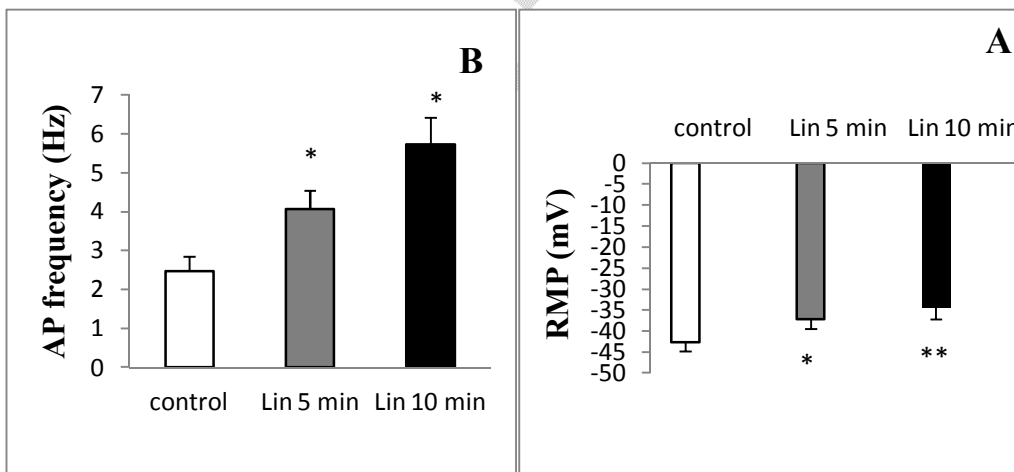
### ۴-۱) ویژگی‌های فعالیت خودبخودی و برانگیخته نورون‌های حلزون در شرایط کنترل

نورون‌های گانگلیون تحت مری حلزون در رینگر نرمال دارای میانگین پتانسیل استراحت mV  $42/65 \pm 2/16$  - و فعالیت ریتمیک خودبخودی منظم با میانگین فرکانس  $2/47 \pm 0/37$  Hz بودند. میانگین طول مدت پتانسیل عمل در آستانه پتانسیل عمل  $15/07 \pm 2/96$  ms و متوسط فاصله بین دو پتانسیل عمل  $0/455 \pm 0/057$  s بود. دامنه و سطح زیر منحنی پتانسیل عمل بترتیب  $72/20 \pm 3/54$  mV و  $373/76 \pm 78/72$   $\mu$ Vs بود. پتانسیل‌های متعاقب هیپرپلاریزاسیون (AHP)، دامنه‌ای در حدود  $6/52 \pm 0/58$  mV داشتند و متوسط طول مدت این پتانسیل‌های متعاقب  $0/097 \pm 0/015$  s بود. متوسط شیب فاز دپلاریزاسیون و شیب فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل بترتیب  $13/04 \pm 1/77$  mV/ms و  $6/30 \pm 1/13$  mV/ms بود.

## ۲-۴) اثرات غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میلی مولار لینالول بر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نورون‌های حلزون

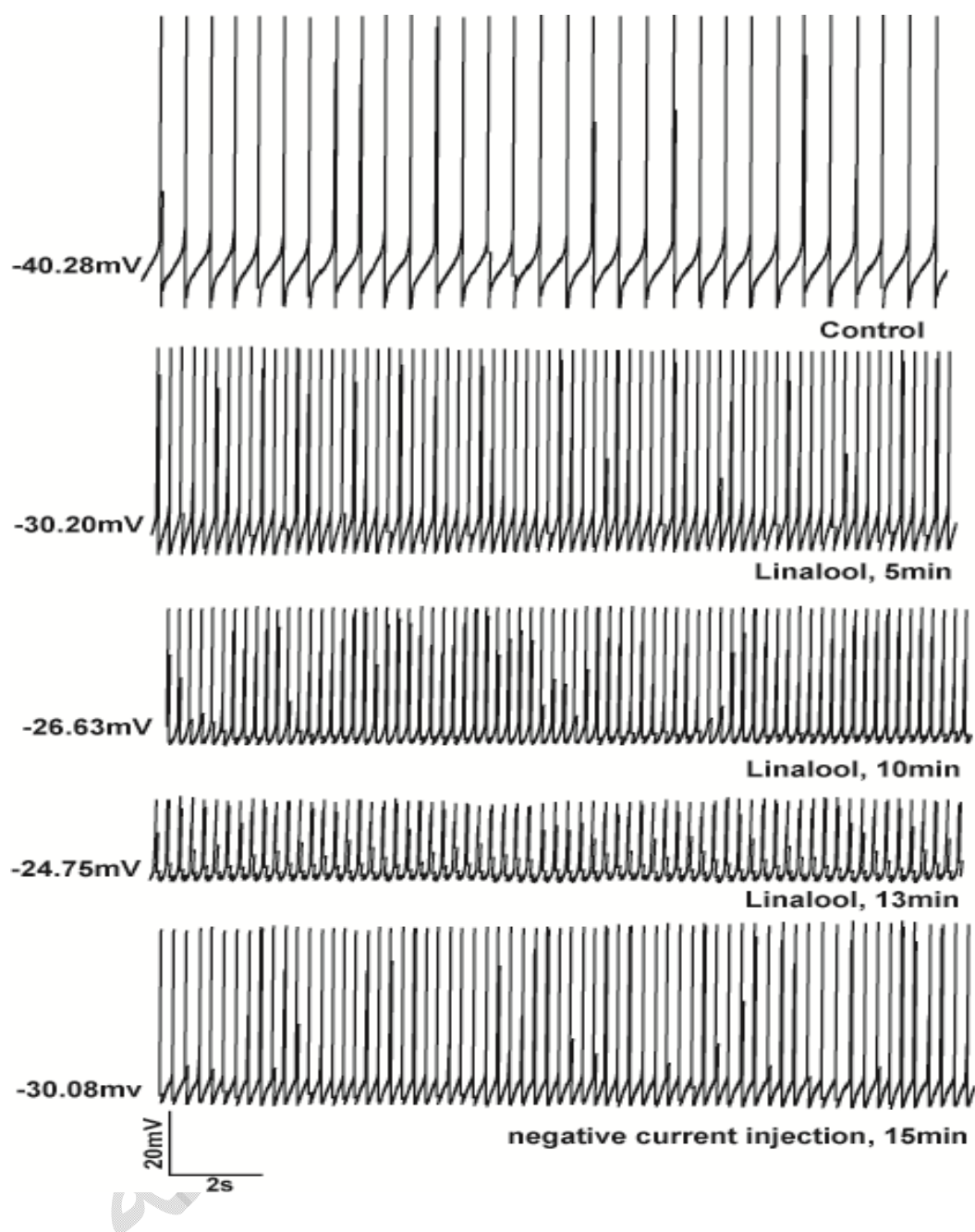
### ۲-۴-۱) ویژگی‌های پتانسیل عمل خودبخودی در حضور لینالول ۰/۱ میلی مولار

در حضور غلظت‌های ۰/۱ میلی مولار لینالول در محلول خارج سلولی پتانسیل استراحت طی ۵ و ۱۰ دقیقه افزایش یافت و این تأثیر از نظر آماری بین دو زمان ۵ و ۱۰ دقیقه و کنترل به ترتیب با  $P < ۰/۰۵$  و  $P < ۰/۰۱$  معنی‌دار بود. فرکانس پتانسیل‌های عمل طی ۵ و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول افزایش یافت که این افزایش بین زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه و کنترل با  $P < ۰/۰۵$  معنی‌دار بود (شکل ۴-۱ و نمودار ۴-۱).



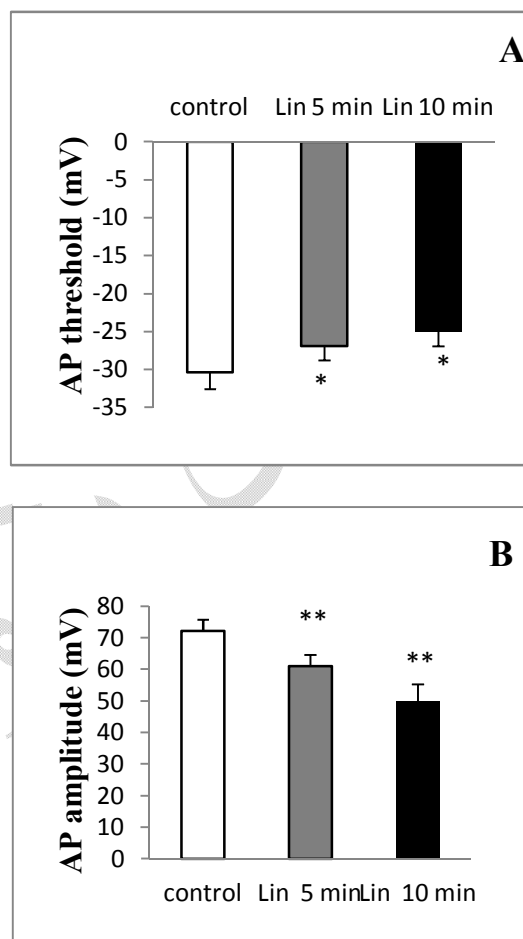
نمودار ۴-۱. نمودار مقایسه میانگین پتانسیل استراحت غشاء (A) و فرکانس پتانسیل عمل (B) در شرایط کنترل و در ۵ و ۱۰ دقیقه پس از افزودن غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول به رینگر حلزونی نرمال ( $n=8$ ).  $P < ۰/۰۵$ .

$P < ۰/۰۱$  و  $P < ۰/۰۰۱$  در مقایسه با کنترل.

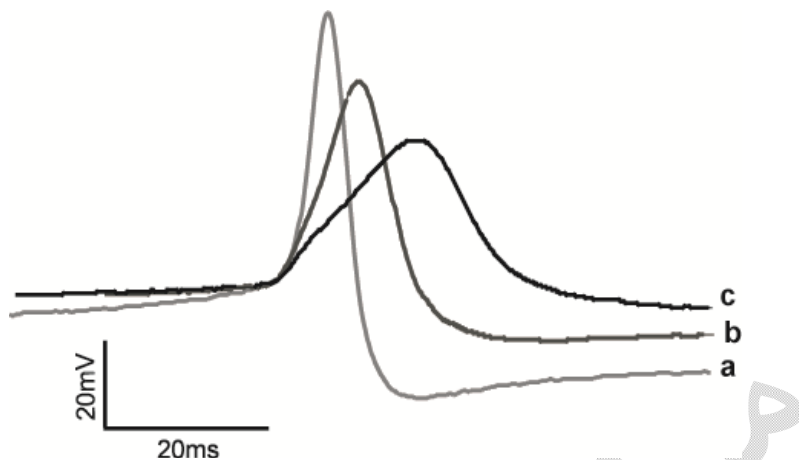


شکل ۴-۱. الگوی فعالیت خودبخودی در شرایط کنترل، ۵، ۱۰ و ۱۳ دقیقه پس از مجاورت با غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول. پس از افزودن لینالول فرکانس افزایش و دامنه اسپایک‌ها کاهش یافت. ۱۵ دقیقه پس از کاربرد لینالول با تزریق جریان منفی مستقیم و برگرداندن پتانسیل استراحت به حدود کنترل کاهش دامنه پتانسیل‌های عمل هم تا حدی حذف گردید.

آستانه پتانسیل عمل پس از کاربرد لینالول افزایش یافت و این افزایش بین دو زمان ۵ و ۱۰ دقیقه و کنترل با  $P < 0.05$  معنی دار بود. دامنه پتانسیل عمل در حضور لینالول کاهش یافت که این کاهش بین شرایط کنترل و زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه با  $P < 0.01$  و بین دو زمان ۵ و ۱۰ دقیقه با  $P < 0.05$  معنی دار بود (شکل ۲-۴ و نمودار ۲-۴) و ۱۵ دقیقه پس از کاربرد لینالول با تزریق جریان DC و برگرداندن پتانسیل استراحت غشاء به حدود کنترل دامنه پتانسیل‌های عمل نیز به میزان ثبت شده در شرایط کنترل نزدیک گردید (شکل ۴-۱).

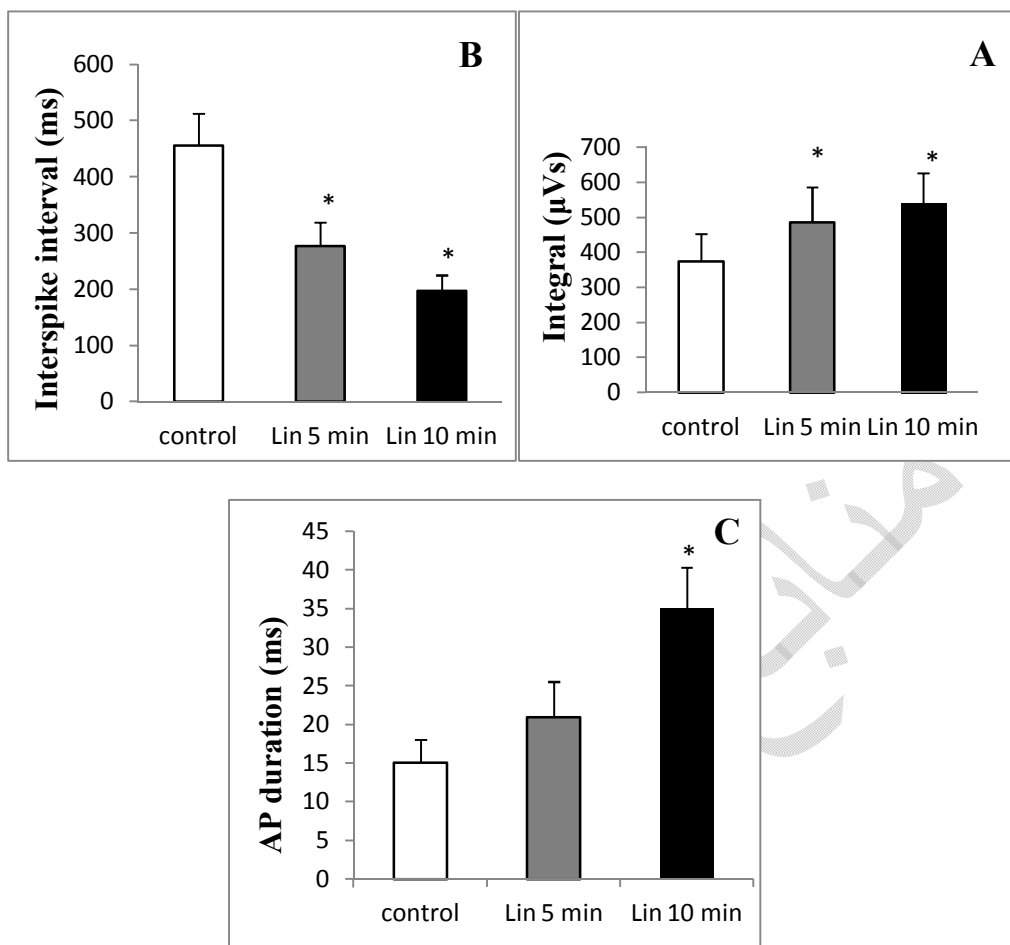


نمودار ۲-۴. نمودار مقایسه آستانه (A) و دامنه (B) در پتانسیل‌های عمل ثبت شده در حضور غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول ( $n=8$ ).  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  در مقایسه با کنترل. \*\*



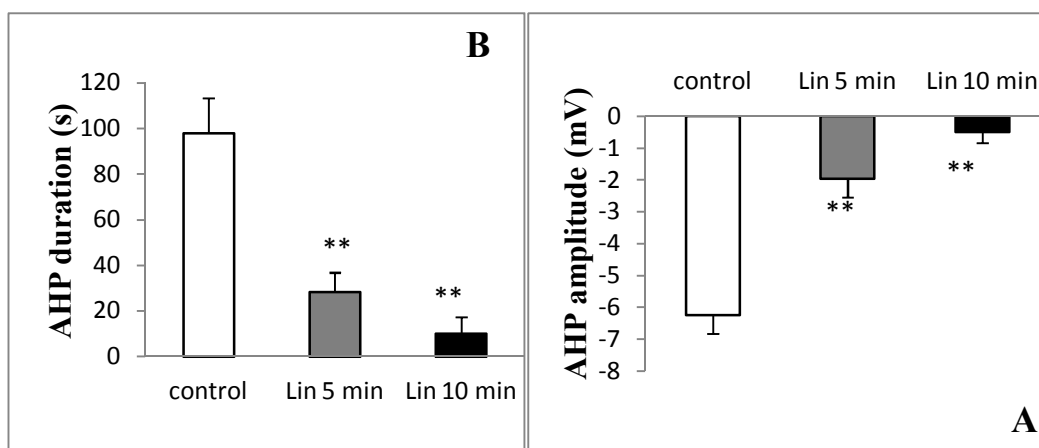
شکل ۴-۲. مقایسه پتانسیل ثبت شده از یک نورون در سه زمان کنترل (a)، ۵ دقیقه (b) و ۱۰ دقیقه (c) پس از افزودن لینالول ۰٫۱ میلی مولار. بدنبال بکارگیری لینالول دامنه پتانسیل عمل و شیب فازهای بالارو و پائین-رو آن کاهش و مدت زمان پتانسیل عمل افزایش یافت. برای سهولت در مقایسه دامنه پتانسیل عمل، تفاوت نسبی در پتانسیل استراحت در این شکل نشان داده نشده است.

سطح زیر منحنی در قله پتانسیل عمل در سه حالت کنترل، ۵ و ۱۰ دقیقه بطور معنی داری ( $P < 0.05$ ) پس از کاربرد لینالول با  $P < 0.05$  افزایش یافت. فاصله بین پتانسیل‌های عمل در طی ۵ و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول کاهش یافت و این کاهش ۵ و ۱۰ دقیقه پس از لینالول در مقایسه با کنترل با  $P < 0.05$  معنی دار بود. طول مدت پتانسیل عمل پس از کاربرد لینالول نسبت به کنترل افزایش یافت، که این افزایش بین ۱۰ دقیقه و کنترل با  $P < 0.05$  معنی دار بود (نمودار ۴-۳).



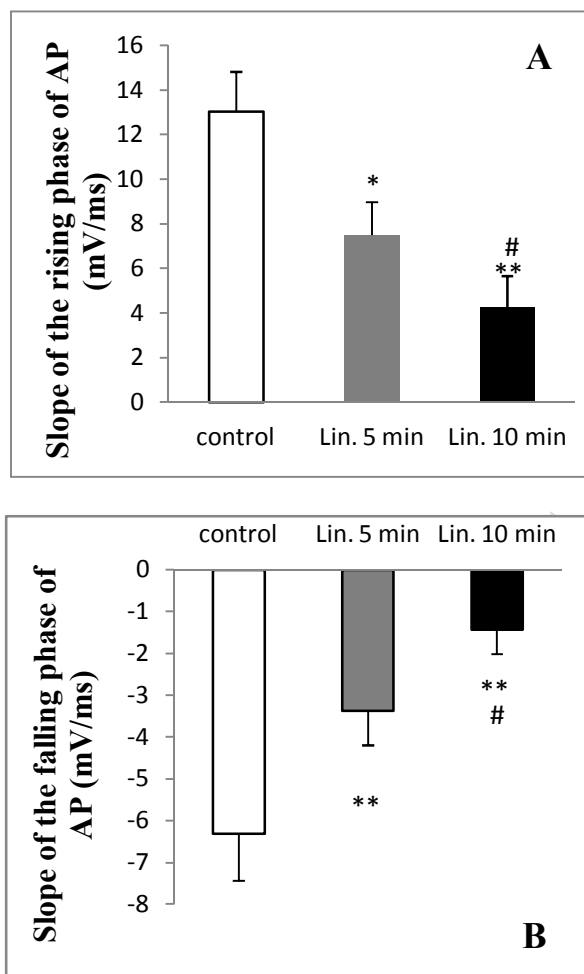
نمودار ۳-۴. مقایسه میانگین سطح زیر منحنی (A)، فاصله بین پتانسیل‌های عمل (B) و طول مدت پتانسیل عمل (C) در شرایط کنترل و در ۵ و ۱۰ دقیقه پس از افزودن غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول به رینگر حلزونی نرمال (n=۸).  $P < ۰/۰۵$  در مقایسه با کنترل.

لینالول دامنه AHP را در زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد بطور معنی‌داری کاهش داد، بطوریکه این کاهش بین دو زمان ۵ و ۱۰ دقیقه در مقایسه با کنترل با  $P < 0.01$  معنی‌دار بود. طول مدت AHP طی ۵ و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول نسبت به حالت کنترل بطور معنی‌داری با  $P < 0.01$  کاهش یافت (شکل ۴-۲ و نمودار ۴-۴).



نمودار ۴-۴. مقایسه میانگین دامنه‌ی AHP (A) و طول مدت AHP (B) بین سه حالت کنترل، ۵ و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول ۰/۱ میلی مولار ( $n=8$ ).  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  در مقایسه با کنترل.

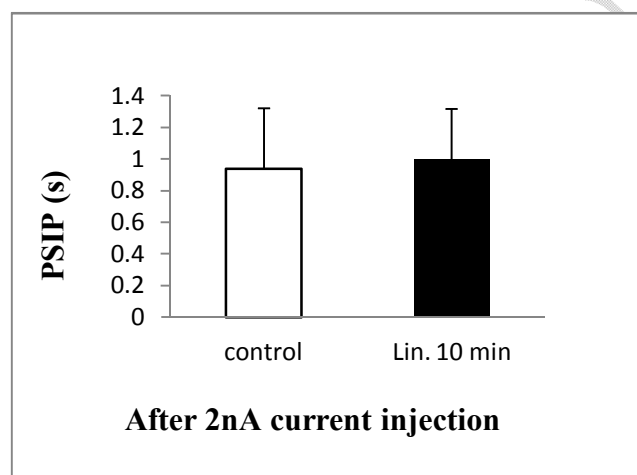
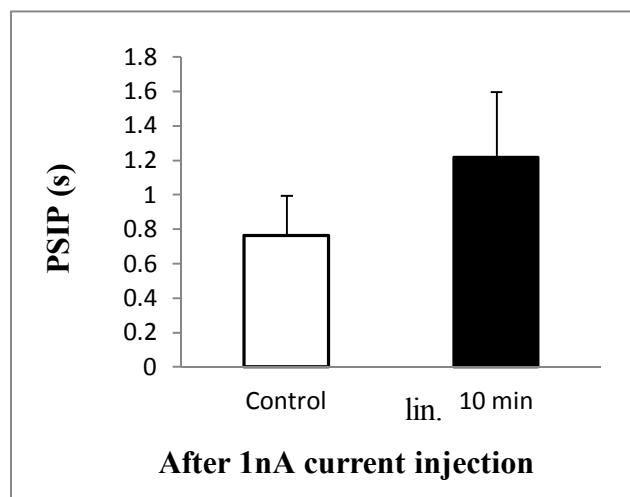
شیب فاز دپلاریزاسیون پتانسیل عمل طی ۵ و ۱۰ دقیقه پس از افزودن لینالول کاهش نشان داد که این کاهش ۵ و ۱۰ دقیقه پس از افزودن لینالول در مقایسه با کنترل به ترتیب با  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  و  $P < 0.01$  پس از افزودن لینالول در مقایسه با ۵ دقیقه با  $P < 0.05$  معنی‌دار بود. شیب فاز رپلاریزاسیون نیز پس از کاربرد لینالول کاهش معنی‌داری را نشان داد، این کاهش ۵ و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول در مقایسه با کنترل با  $P < 0.01$  و در زمان ۱۰ دقیقه نسبت به ۵ دقیقه پس از افزودن لینالول با  $P < 0.05$  معنی‌دار بود (شکل ۴-۲ و نمودار ۴-۵).



نمودار ۴-۵. مقایسه میانگین شیب فاز دپلاریزاسیون (A) و شیب فاز رپلاریزاسیون (B) بین سه حالت کنترل، ۵ و ۱۰ دقیقه پس از افزودن لینالول ۰/۱ میلی مولار (n=۸).  $P < ۰/۰۱$  و  $P < ۰/۰۰۱$  در مقایسه با کنترل و  $P < ۰/۰۵$  در مقایسه با ۵ دقیقه پس از کاربرد لینالول.

مدت دوره مهاری بعد از فعالیت برانگیخته<sup>۵۱</sup> (PSIP) پس از تزریق جریان‌های دپلاریزان (۲nA-۱) با افزایش شدت تحریک در هر یک از شرایط کنترل و در حضور لینالول افزایش یافت. لینالول نیز طول دوره مهاری بعد از فعالیت برانگیخته به ازاء هر جریان تحریکی را افزایش داد که این افزایش معنی‌دار نبود (نمودار ۴-۶).

<sup>51</sup> Post stimulus inhibitory period



نمودار ۴-۶. مقایسه میانگین مدت دوره مهاری بعد از فعالیت برانگیخته پس از تزریق جریان‌های دپلاریزان (۱-۲nA) در شرایط کنترل و در ۱۰ دقیقه پس از افزودن غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول به رینگر حلزونی نرمال (n=۶).

فرکانس پتانسیل‌های عمل برانگیخته در حین تزریق جریان‌های دپلاریزان (۱-۲nA) پس از کاربرد لینالول افزایش یافت که این افزایش معنی‌دار نبود.

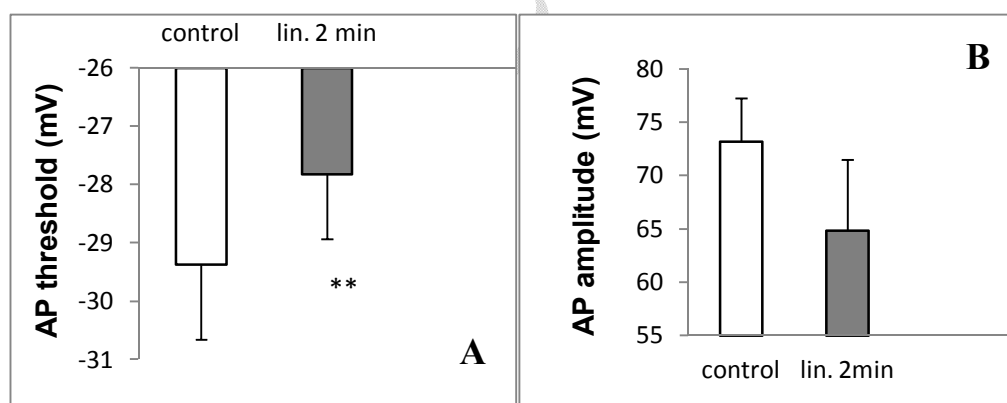
مقاومت ورودی سلول در طی تزریق جریان‌های هیپرپلاریزان (۱-۳nA)، پس از افزودن لینالول نسبت به حالت کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴-۱).

Time	control	10min
Input Resistance(MΩ)	11/24±2/77	10/62±2/39

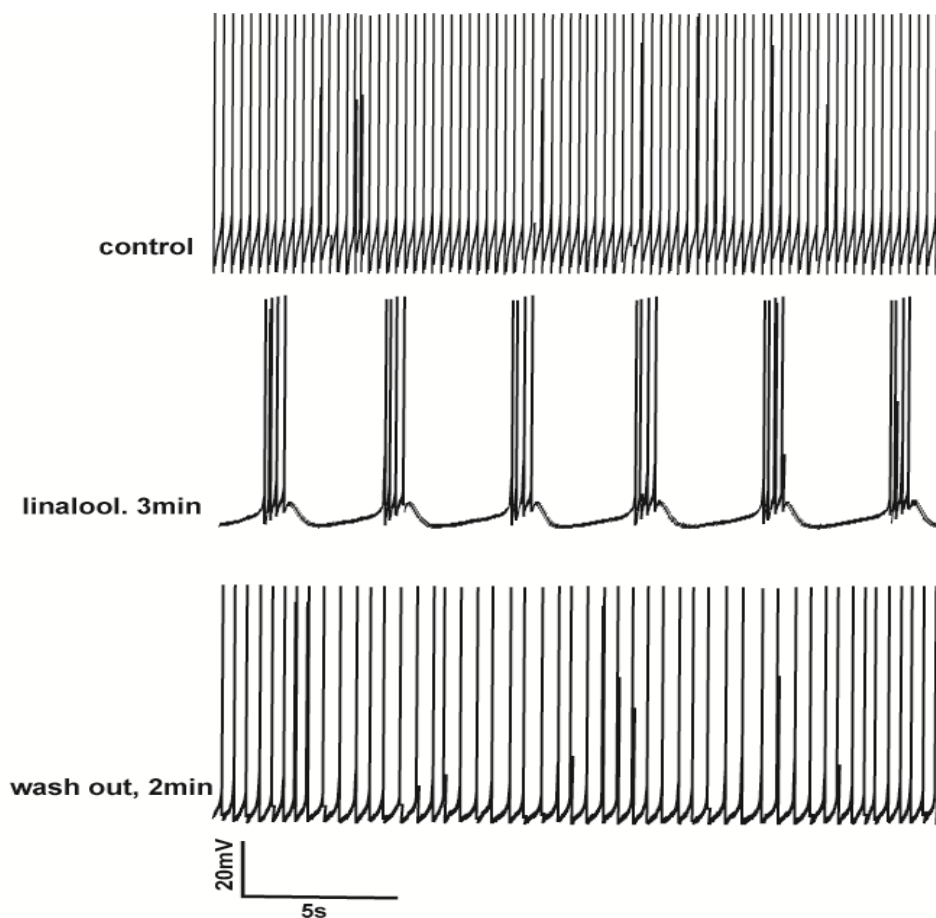
جدول ۴-۱. مقاومت ورودی سلول در شرایط کنترل و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول ۰/۱ میلی مولار.

#### ۴-۲-۲) ویژگی‌های پتانسیل عمل خودبخودی در حضور لینالول ۰/۲ میلی مولار

افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار به محلول خارج سلولی موجب افزایش معنی‌دار آستانه پتانسیل عمل شد که ۲ دقیقه پس از افزودن لینالول نسبت به کنترل با  $P < 0.01$  معنی‌دار بود. دامنه پتانسیل عمل طی ۲ دقیقه پس از کاربرد لینالول کاهش یافت که تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ۴-۷ و شکل ۴-۳).

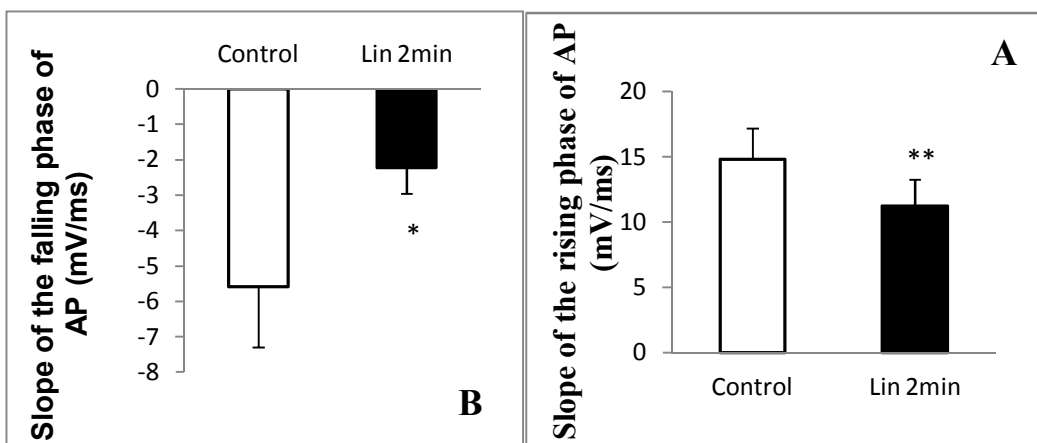


نمودار ۴-۷. نمودار مقایسه آستانه (A) و دامنه (B) در پتانسیل‌های عمل ثبت شده در حضور غلظت ۰/۲ میلی مولار لینالول (n=۶).  $P < 0.01$  در مقایسه با کنترل. \*\*

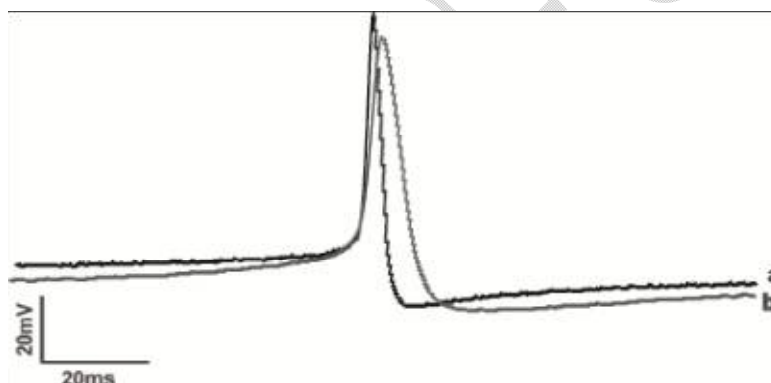


شکل ۴-۳. الگوی فعالیت خودبخودی در شرایط کنترل و ۳ دقیقه پس از مجاورت با غلظت ۰/۲ میلی مولار لینالول. لینالول طی ۳ دقیقه منجر به تغییر الگوی فعالیت خودبه‌خودی منظم نورون در حالت کنترل به الگوی burst شد. اثرات حاصل از غلظت ۰/۲ لینالول پس از شستشوی محفظه حاوی لینالول با رینگر حلزونی نرمال، تا حد زیادی برگشت پذیر بود.

شیب فاز دپلاریزاسیون پتانسیل عمل طی ۲ دقیقه پس از افزودن لینالول ۰,۲ میلی مولار کم شد که این کاهش با  $P < 0.01$  معنی دار بود. شیب فاز رپلاریزاسیون نیز ۲ دقیقه پس از کاربرد لینالول کاهش یافت، که این کاهش با  $P < 0.05$  معنی دار بود (نمودار ۴-۹ و شکل ۴-۶).

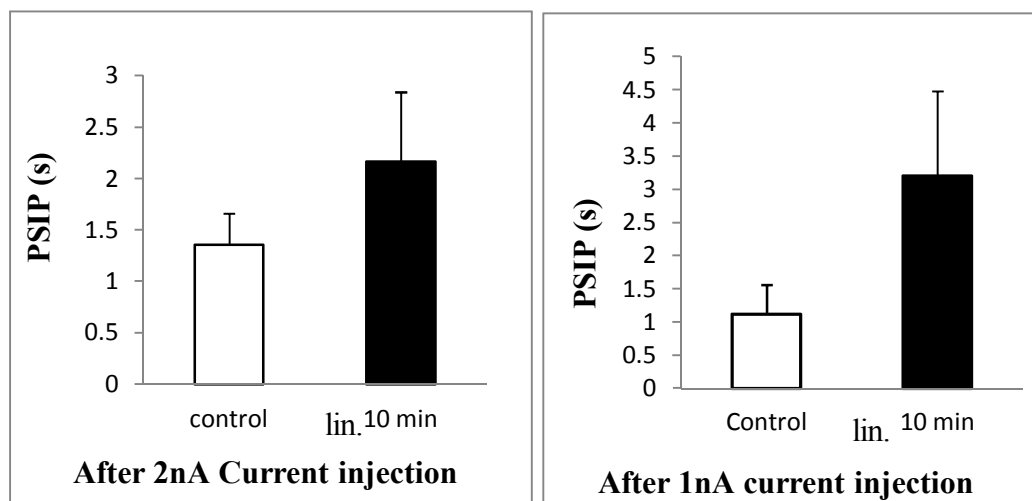


نمودار ۴-۸. مقایسه میانگین شیب فاز دپلاریزاسیون (A) و شیب فاز رپلاریزاسیون (B) بین دو حالت کنترل و ۲ دقیقه پس از افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار ( $n=8$ ).  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  در مقایسه با کنترل.



شکل ۴-۴. مقایسه پتانسیل ثبت شده از یک نورون در دو زمان کنترل (a) و ۲ دقیقه (b) پس از افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار. بدنال بکارگیری لینالول ۰,۲ میلی مولار شیب فاز دپلاریزاسیون و شیب فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل کاهش یافت.

مدت دوره مهاری بعد از فعالیت برانگیخته پس از تزریق جریان‌های دپلاریزان (۱-۲nA) با افزایش شدت تحریک در هر یک از شرایط کنترل و در حضور لینالول افزایش یافت که این افزایش اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ۴-۱۰).



نمودار ۴-۹. مقایسه میانگین مدت دوره مهاری بعد از فعالیت برانگیخته پس از تزریق جریان‌های دپلاریزان (۱-۲nA) در شرایط کنترل و در ۱۰ دقیقه پس از افزودن غلظت ۰/۲ میلی مولار لینالول به رینگر حلزونی نرمال (n=۶).

فرکانس شلیک پتانسیل‌های عمل در حین تزریق جریان‌های دپلاریزان (۱-۲nA) پس از کاربرد لینالول افزایش یافت که این افزایش معنی‌دار نبود.

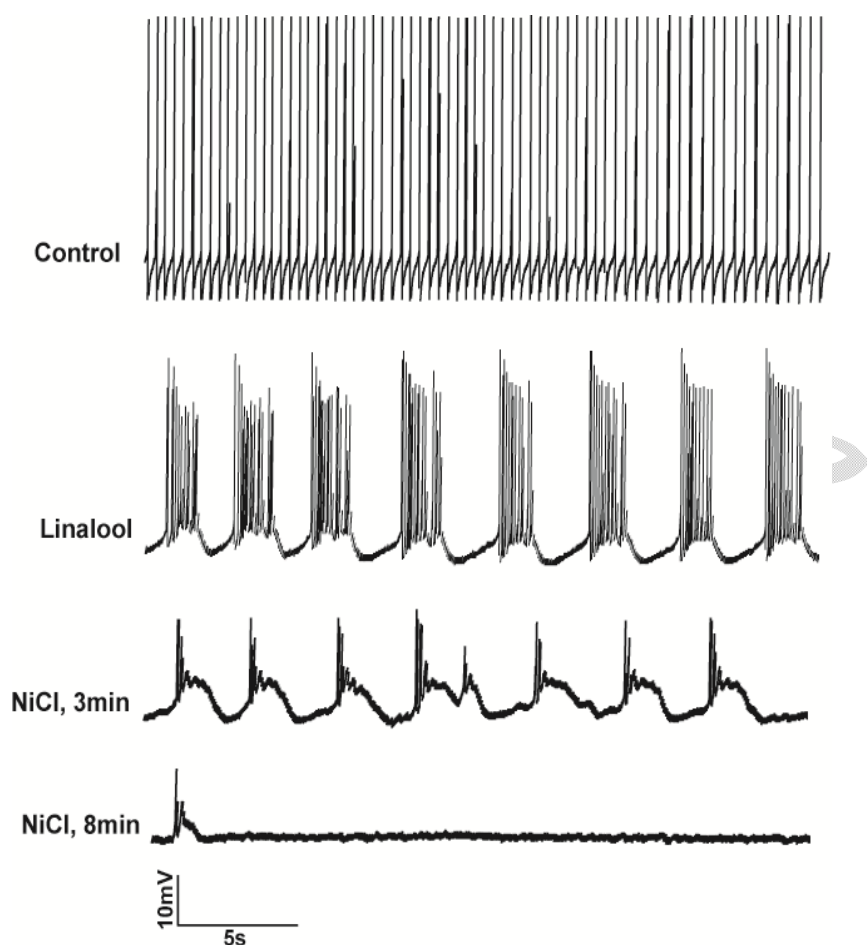
مقاومت ورودی سلول در طی تزریق جریان‌های هیپرپلاریزان (۱-۲nA)، پس از افزودن لینالول نسبت به حالت کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴-۲).

Time	Control	۱۰ min
Input Resistance(MΩ)	12/83±2/48	12/75±2/46

جدول ۴-۲. مقاومت ورودی سلول در شرایط کنترل و ۱۰ دقیقه پس از کاربرد لینالول ۰/۲ میلی مولار.

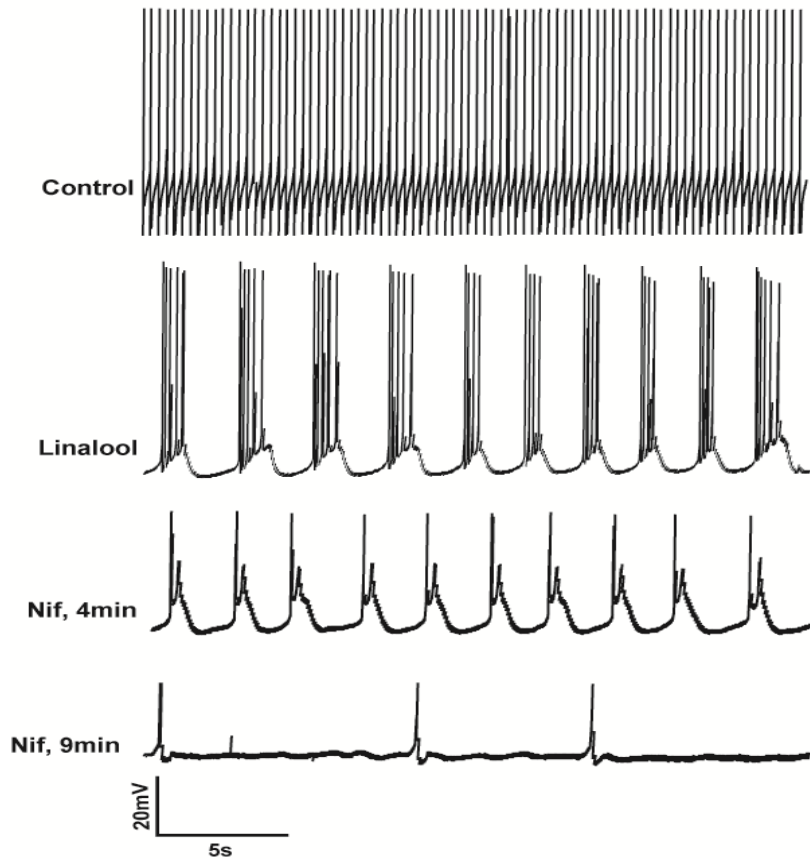
### ۳-۴) ویژگی‌های پتانسیل عمل خودبخودی در حضور لینالول و مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی نیکل کلرید و نیفدیپین:

به منظور بررسی نقش کانال‌های کلسیمی در بروز تغییرات در الگوی فعالیت ناشی از لینالول، به محفظه ثبت حاوی رینگر نرمال نیکل کلرید، مهار کننده غیر اختصاصی کانال‌های کلسیمی و نیفدیپین، مهار کننده کانال کلسیمی نوع L، افزوده شد و پاسخ سلول به لینالول پس از مهار کانال‌های کلسیمی بررسی شد. متعاقب بروز الگوی فعالیت burst در اثر لینالول، با افزودن NiCl (۴mM) به محیط خارج سلولی کاهش تدریجی الگوی فعالیت burst در حدود ۳ دقیقه پس از کاربرد NiCl، رخ داد. در غالب موارد در کمتر از ۸ دقیقه پس از افزودن NiCl حذف تدریجی burst مشاهده می‌شد (شکل ۴-۵).



شکل ۴-۵. پس از بروز فعالیت burst در نتیجه افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار، NiCl<sub>2</sub> به محفظه ثبت اضافه گردید. ۳ دقیقه پس از افزودن NiCl<sub>2</sub> به محیط خارج سلولی کاهش الگوی burst مشاهده شد. ۸ دقیقه پس از افزودن NiCl<sub>2</sub> حذف کامل الگوی burst قابل مشاهده است.

افزودن نیفدیپین (Nif) با غلظت ۴۰ μM به محفظه ثبت، بدنبال بروز فعالیت burst در اثر لینالول، منجر به کاهش الگوی burst در حدود ۴ دقیقه پس از کاربرد Nif شد در غالب موارد در حدود ۹ دقیقه پس از افزودن Nif الگوی فعالیت burst حذف شده و با اسپایک‌های منفرد جایگزین می‌شد. (شکل ۴-۶).



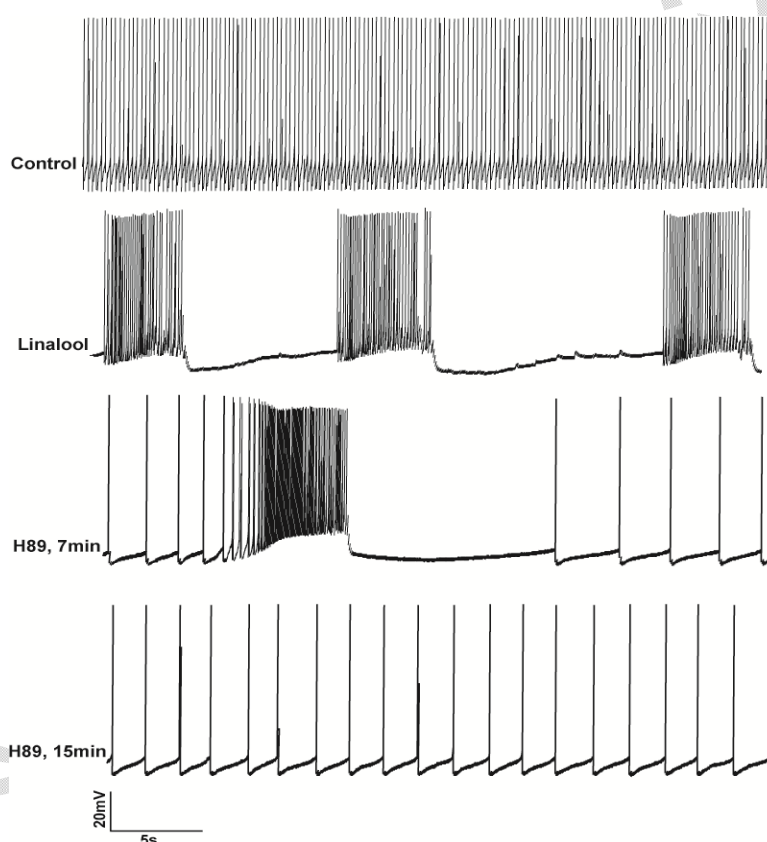
شکل ۴-۶. پس از بروز فعالیت burst در نتیجه افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار، Nif به محفظه ثبت اضافه گردید. ۴ دقیقه پس از افزودن Nif به محیط خارج سلولی کاهش الگوی burst مشاهده شد. ۹ دقیقه پس از افزودن Nif حذف الگوی burst و برقراری اسپایک‌های منفرد قابل مشاهده است.

#### ۴-۴) ویژگی‌های پتانسیل عمل خودبخودی در حضور لینالول و مهار کننده‌های پروتئین کینازها، H89 و کلریترین

به منظور بررسی نقش پروتئین کینازها در بروز تغییرات در الگوی فعالیت ناشی از لینالول، به محفظه ی ثبت حاوی رینگر نرمال H89، مهار کننده اختصاصی پروتئین کیناز وابسته به

cAMP و کلریترین، مهار کننده اختصاصی پروتئین کیناز C، افزوده شد و پاسخ سلول به لینالول پس از مهار این پروتئین کینازها بررسی شد.

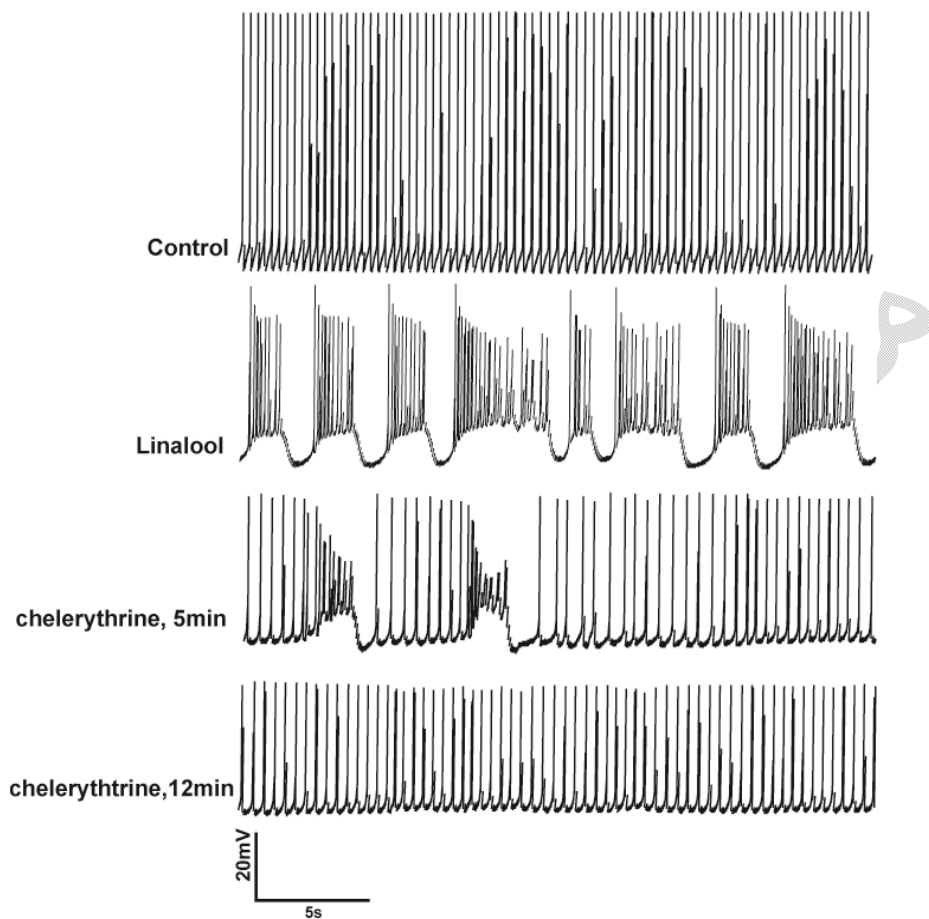
متعاقب بروز الگوی فعالیت burst در اثر لینالول، با افزودن H89 ( $66\mu\text{M}$ ) به محیط خارج سلولی تعدیل تدریجی الگوی فعالیت burst در حدود ۷ دقیقه پس از کاربرد H89، رخ داد. در غالب موارد در کمتر از ۱۵ دقیقه پس از افزودن H89 الگوی فعالیت burst بتدریج حذف شده و با اسپایک‌های منفرد جایگزین می‌شد (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷. پس از بروز فعالیت burst در نتیجه افزودن لینالول  $0.2$  میلی مولار، H89 به محفظه ثبت اضافه گردید. 7 دقیقه پس از افزودن H89 به محیط خارج سلولی تعدیل الگوی burst مشاهده شد. ۱۵ دقیقه پس از افزودن H89 حذف الگوی burst و برقراری اسپایک‌های منفرد قابل مشاهده است.

افزودن کلریترین (chelerythrine) با غلظت ( $13\mu\text{M}$ ) به محفظه ثبت، بدنال بروز فعالیت burst در اثر لینالول، منجر به کاهش الگوی burst در کمتر از ۵ دقیقه پس از کاربرد کلریترین

شد در غالب موارد، حدود ۱۲ دقیقه پس از افزودن کلدت به الگه، فعالیت burst حذف شده و با اس



شکل ۴-۸. پس از بروز فعالیت burst در نتیجه افزودن لینالول ۰/۲ میلی مولار، به محفظه ثبت اضافه گردید. دقیقه پس از افزودن chelerythrine به محیط خارج سلولی کاهش الگوی burst مشاهده شد. ۱۲ دقیقه پس از افزودن chelerythrine حذف الگوی burst و برقراری اسپایک‌های منفرد قابل مشاهده است.

## فصل پنجم

### بحث و نتیجه گیری

## ۵) بحث و نتیجه‌گیری

### ۵-۱) بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که لینالول فعالیت الکتریکی سلول‌های عصبی حلزون را افزایش می‌دهد. همچنین مطالعه ویژگی‌های اسپایک‌ها در حضور لینالول نشان داد بسیاری از تغییرات اعمال شده در الگوی فعالیت نوروهای حلزون توسط لینالول، از تغییرات ایجاد شده در جریان‌ات غشایی سلول‌ها بویژه جریان‌ات کلسیمی، پتاسیمی وابسته به ولتاژ و پتاسیمی وابسته به کلسیم و همچنین مسیرهای فسفریلاسیون پروتئین کینازها حاصل می‌شود.

### ۵-۱-۱) تغییر در ویژگی‌های پتانسیل عمل در حضور لینالول

در حضور غلظت  $0.1 \text{ mM}$  لینالول، دامنه اسپایک‌های سدیمی کاهش معنی‌دار را نشان داد. در رینگر نرمال جریان‌ات سدیمی رو به داخل که با دپلاریزاسیون غشا تا حد آستانه و باز شدن کانال‌های سدیمی فعال می‌شوند، عامل اصلی فاز بالارو پتانسیل عمل هستند. با اینحال دپولاریزاسیون آهسته و طولانی مدت غشاء باعث می‌شود تعدادی از کانال‌های سدیمی پس از فعال شدن اولیه، غیرفعال شده و در همین وضعیت باقی بمانند. این وضعیت می‌تواند تعداد

کانالهای سدیمی که عملاً در پتانسیل عمل مشارکت می‌کنند را کاهش داده و باعث کاهش دامنه پتانسیل عمل گردد. با توجه به کاهش قابل توجه در دامنه اسپایک‌های سدیمی در حضور لینالول ۰/۱ میلی مولار طی ۵ تا ۱۰ دقیقه از زمان مجاورت با لینالول به نظر می‌رسد این تاثیر نتیجه دپلاریزاسیون تاخیری و آهسته غشاء باشد و نه مهار مستقیم کانالهای سدیمی زیرا با تزریق جریان مستقیم و برگرداندن ولتاژ استراحت به حدود شرایط کنترل کاهش دامنه پتانسیل‌های عمل بطور قابل توجهی جبران گردید.

کاهش در دامنه و مدت AHP در حضور لینالول، کانال‌های پتاسیمی موثر در بروز AHP یعنی کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ نوع جبران کننده‌ی تاخیری و هر دو نوع کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم را بعنوان اهداف اثر لینالول مطرح می‌کند. حداقل سه جریان پتاسیمی در نورون‌های حلزون شناسایی شده است که شامل جریان پتاسیمی سریع غیر فعال شونده (نوع A)، جریان پتاسیمی وابسته به کلسیم و جریان پتاسیمی جبران کننده تاخیری می‌باشند. در حالیکه نوع اول به  $4\text{-AP}^{2+}$  حساس است، نوع وابسته به کلسیم به TEA داخل سلولی حساس می‌باشد (Thompson, 1977; Bukanova, et al., 2002; Staras, et al., 2002). در بسیاری از نورون‌های مهره‌داران و بی‌مهرگان از جمله نورون‌های حلزون فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل و پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون توسط فعالیت کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ بویژه نوع جبران کننده تاخیری (Silva, et al., 1990) و وابسته به غلظت کلسیم سیتوزولی، BK و SK، تعیین می‌شوند و فعالیت کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم اساساً در شکل و فرکانس و نیز الگوی شلیک پتانسیل عمل نقش دارند (Gola, et al., 1990; Faber and Sah, 2003). مهار کانال‌های  $K_{Dr}$  توسط تترا اتیل آمونیوم و کوکائین منجر به کاهش قابل توجه دامنه فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل در نورون‌های حلزون و بروز فعالیت انفجاری می‌شود (Chen et al., 2006). بررسی‌های قبلی نشان داده که کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم نوع SK توسط پپتید مستخرج از سم زنبور عسل یعنی اپیمین، مهار و موجب کاهش دامنه و طول مدت AHP پتانسیل عمل می‌شود (Vatanparast and Janahmadi., 2009). از آنجائیکه AHP یک عامل اساسی تعیین کننده در میزان فعالیت نورون‌هاست،

---

<sup>52</sup> 4-aminopyridine

کاهش آن افزایش فرکانس اسپایک‌ها را در پی دارد. در بسیاری از نورون‌ها از جمله نورون‌های حلزون، کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم نقش اصلی را در ایجاد AHP و تنظیم فرکانس اسپایک‌ها بر عهده دارند، تغییر در عملکرد این نوع کانال‌های پتاسیمی، که موجب تغییر در دامنه و مدت AHP می‌شود، می‌تواند تحریک‌پذیری نورونی و آستانه القایی فرایندهای فیزیولوژیک وابسته به کلسیم را تغییر دهد (Sah et al., 1992; Kumer and Foster, 2002; Faber and Sah, 2003; Lin et al., 2010). در بررسی حاضر نیز دامنه و مدت AHP تحت تاثیر غلظت ۰/۱ میلی مولار لینالول کاهش یافت. احتمالاً لینالول بواسطه تاثیر مهاری بر کانال‌های پتاسیمی نوع جبران کننده تاخیری و کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم منجر به کاهش دامنه و مدت AHP و در نتیجه افزایش تحریک‌پذیری نورونی شده است. از طرفی با توجه به گزارش‌های متعدد مبنی بر رابطه معکوس بین فرکانس پتانسیل عمل و مدت زمان AHP (Hallworth et al., 2003; Vatanparast et al., 2007) بخشی از افزایش فرکانس مشاهده شده در حضور لینالول ۰/۱ میلی مولار را می‌توان به مدت زمان کاهش یافته AHP نسبت داد. بدنبال کاربرد لینالول ۰/۱ میلی مولار یک دیپلاریزاسیون آهسته در پتانسیل استراحت غشاء ایجاد گردید. مثبت‌تر شدن پتانسیل غشاء خود می‌تواند توجیهی برای افزایش فرکانس اسپایک‌ها پس از بکارگیری لینالول باشد. از آنجاییکه کانال‌های پتاسیمی فعال شونده توسط کلسیم نقش مهمی در کنترل پتانسیل غشا بازی می‌کنند، فعال شدن این کانال‌ها موجب هیپرپلاریزه شدن و مهار آن‌ها دیپلاریزاسیون غشا را در پی دارد (Zhang et al., 2003; Dilly, et al., 2005; Yazdi et al., 2007). دیپلاریزاسیون آهسته غشاء تحت تاثیر لینالول می‌تواند از مهار نسبی کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم نتیجه شده باشد که به نوبه خود می‌تواند بر تحریک پذیری سلولی تاثیر بگذارد.

در روند رپلاریزاسیون پتانسیل غشاء، انواعی از کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ (بوپژه نوع  $K_{Dr}$ ) و کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم، BK و SK، مشارکت دارند. هر دو گروه عمده کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم، BK و SK، در نورون‌های حلزون شناسایی شده‌اند (Gola, et al., 1990; Bal, et al., 2001). فعالیت کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم در شکل و الگوی شلیک پتانسیل عمل نقش مهمی دارند. کانال‌های BK وابسته به ولتاژ غشاء و

غلظت کلسیم درون سلولی هستند و قابلیت هدایت بالایی دارند. این کانال‌ها بخاطر کنتیک سریع در فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل نیز شرکت دارند. درحالیکه کانال‌های SK وابسته به ولتاژ غشا نبوده و تنها به غلظت کلسیم وابسته هستند و در رپلاریزاسیون پتانسیل عمل سهیم نیستند ولی در فرکانس‌های بالا شدیداً فعال شده و بعنوان یک عامل بازدارنده قوی firing عمل می‌کنند (Sah, 1996., Bal, et al., 2001; Faber and Sah, 2003). کانال‌های BK بوسیله پاکسیلین<sup>۵۳</sup> مهار می‌شوند، درحالیکه کانال‌های SK توسط ایپیمین مهار می‌شوند (Crest and Gola, 1993).

در حضور لینالول ۰/۱ و ۰/۲ میلی مولار شیب فاز دپلاریزاسیون و رپلاریزاسیون پتانسیل عمل کاهش معنی‌داری را نشان داد. با توجه به نقش کانال‌های سدیمی در ایجاد فاز دپلاریزاسیون، احتمالاً غیرفعال شدن تعدادی از کانال‌های سدیمی در نتیجه دپلاریزاسیون نسبی غشاء در کاهش شیب و دامنه فاز بالارو پتانسیل عمل نقش دارد. از طرفی کاهش در شیب فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل احتمالاً در نتیجه اثر مهارى لینالول بر روی کانال‌های پتاسیمی دخیل در فاز رپلاریزاسیون، بویژه نوع جبران کننده تاخیری و BK، می‌باشد. افزایش طول مدت اسپایک‌ها در حضور لینالول را می‌توان در نتیجه اثر مهارى لینالول بر کانال‌های دخیل در فاز رپلاریزاسیون و کاهش شیب فاز رپلاریزاسیون توجیه کرد.

## ۵-۱-۲) تغییر در فعالیت نوروئی و بروز الگوی burst در حضور لینالول

در حضور غلظت ۰/۲ میلی مولار لینالول الگوی کلی فعالیت از فرم منظم به الگوی burst تغییر یافت. تا کنون نقش انواعی از جریان‌های یونی در بروز الگوی burst در نوروئ‌های حلزون بررسی شده است. که از آن میان می‌توان به مهار کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم و  $K_{Dr}$  اشاره کرد (Crest and Gola, 1993; Pedarzani et al., 2001; Hallworth et al., 2003; Chen and Tsia 2006). کانال‌های پتاسیمی نوع  $K_{Dr}$  که در روند رپلاریزاسیون پتانسیل عمل

<sup>53</sup>Paxilline

شرکت دارند نیز جهت حفظ الگوی منظم ضروری هستند، مهار این کانال‌ها توسط آمفتامین (Chen and Tsia 2000)، تترااتیل‌آمونیم و کوکائین (Chen and Tsia, 2006) در افزایش تحریک‌پذیری سلول و بروز الگوی burst نشان داده شده است. مهار  $K_{Dr}$  برای ایجاد فعالیت burst در نورون لازم می‌باشد (Chen et al., 2006). در بسیاری از نورون‌ها کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم بویژه نوع SK برای حفظ الگوی اسپایک‌های منفرد و منظم ضروری هستند و فعالیت آن‌ها مانع از افزایش بیش از حد فرکانس و بروز الگوی burst می‌گردد در حالیکه مهار آن‌ها باعث اختلال و ناهماهنگی در الگوی فعالیت منظم شده و نورون را مستعد بروز فعالیت burst می‌کند (Crest and Gola, 1993; Pedarzani et al., 2001; Hallworth, 2003).

بنابراین با توجه به نتایج این بخش از مطالعه ما احتمالاً کاهش فعالیت کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم و کانال‌های پتاسیمی نوع جبران‌کننده تاخیری در حضور غلظت ۰/۲ میلی مولار لینالول در اختلال الگوی طبیعی و منظم اسپایک‌های سدیمی موثر است. شواهد بدست آمده در این تحقیق حذف الگوی burst در حضور مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی حضور جریان‌ات کلسیمی در شرایط بروز فعالیت انفجاری در حضور لینالول را تایید می‌کنند.

طی مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که غشاء نورون‌های حلزون تراکم نسبتاً بالایی از کانال‌های کلسیمی خصوصاً نوع L و T دارند. به گونه‌ای که کانال‌های کلسیمی موجود در جسم سلولی نورون‌های حلزون حتی به منظور ایجاد پتانسیل عمل‌های کلسیمی، در غیاب ورود سدیم، کافی می‌باشد (Chamberlain and Kekut., 1969; Vatanparast et al., 2006). کاربرد نیکل کلرید (مهارکننده غیراختصاصی کانال‌های کلسیمی با تاثیر عمده بر کانال‌های کلسیمی نوع T) بدنبال بروز الگوی burst حاصل از بکارگیری غلظت ۰/۲ میلی مولار لینالول، در همه موارد منجر به حذف کامل الگوی burst و در نهایت حذف کامل فعالیت خودبه‌خودی نورون شد. بکارگیری نیفدپین (مهارکننده اختصاصی کانال‌های کلسیمی نوع L) با کاهش شدت الگوی burst و در نهایت با حذف این الگو همراه بود. با توجه به شواهد موجود می‌توان بیان کرد که علاوه بر حضور جریان‌های کلسیمی در شرایط القاء فعالیت انفجاری در حضور لینالول، احتمالاً این ترکیب تقویت جریان‌های مذکور را نیز باعث می‌شود. با توجه به اینکه ورود کلسیم طی پتانسیل عمل عمدتاً در فاز رپلاریزاسیون رخ می‌دهد (Llinas et al., 1981) مهار

کانال‌های پتاسیمی علاوه بر اثر مستقیمی که در افزایش تحریک‌پذیری دارد، بواسطه تأثیرش در جهت افزایش طول مدت فاز رپلاریزاسیون بطور غیر مستقیم باعث افزایش ورود کلسیم و بنابراین تشدید تحریک‌پذیری می‌شوند. بنابراین می‌توان اثرات افزایشنده غلظت  $0/2$  میلی مولار لینالول بر تحریک‌پذیری را تا حد زیادی به اثرات مهارش بر کانال‌های پتاسیمی نسبت داد.

همچنین بر اساس نتیجه تحقیق حاضر کاربرد H89 (مهارکننده پروتئین کیناز A) و کلریترین (مهارکننده پروتئین کیناز C) بدنبال بروز الگوی burst حاصل از بکارگیری غلظت  $0/2$  میلی مولار لینالول، در همه موارد منجر به حذف کامل الگوی burst و جایگزینی اسپایک‌های سدیمی منظم شد، که نشان دهنده مشارکت پروتئین کینازها در اثرات اعمال شده توسط لینالول  $0/2$  میلی مولار می‌باشد. فسفریلاسیون کانال‌های کلسیمی HVA توسط PKA یا PKC منجر به افزایش جریان‌های کلسیمی در سلول‌های تحریک‌پذیر می‌شود (Yang and Tsien, 1993). PKA و PKC جریانات A-type را در نورون‌های شاخ پشتی نخاع کاهش می‌دهند (Hu et al., 2003) و همچنین فعال سازی PKC در نورون‌های هیپوکمپ باعث مهار جریان‌های پتاسیمی مداوم، که شامل جریان‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم یا  $I_{K-Ca}$  و غیر وابسته به کلسیم  $I_K$  می‌شود (Doerner et al., 1988). بنابراین محتمل است که PKA و PKC از طریق مهار کانال‌های پتاسیمی باعث افزایش تحریک‌پذیری سلول می‌شوند و در بروز الگوی burst مشارکت می‌کنند. بنظر می‌رسد لینالول علاوه بر تاثیر مستقیم می‌تواند بطور غیر-مستقیم از طریق پروتئین کینازها، باعث فسفریله شدن کانال‌های یونی شود در نتیجه فعالیت آنها را تعدیل کند.

## ۵-۲) نتیجه‌گیری

با توجه به تغییر در الگوی فعالیت نورونی و اثرات افزایشی فعالیت نورون‌ها در حضور غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ لینالول، نتایج تحقیق حاضر تایید کننده اثرگذاری لینالول بر فعالیت الکتریکی سلول‌ها بواسطه تاثیر بر فعالیت کانال‌های یونی بویژه کانال‌های پتاسیمی جبران کننده تاخیری و حساس به کلسیم، کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ و مسیره‌های فسفریلاسیون پروتئین کینازها است. نتایج این تحقیق با تائید صرع زایی لینالول در شرایط تاثیر مستقیم بر سلول با یافته‌های برخی محققان در تائید اثرات ضد صرع این ترکیب در مهره داران در تناقض است. شرایط تجویز سیستمیک در نمونه‌های مهره دار و نیز تفاوت در ویژگیهای غشاء در مدل سلولی می‌تواند در تفاوت مشاهده شده نقش داشته باشد که تائید آن به مطالعات بیشتر نیاز دارد. بر این اساس می‌توان بسیاری از اثرات تحریکی اسانس‌های گیاهی حاوی لینالول بر فعالیت الکتریکی سلول‌ها را ناشی از تاثیر این ماده بر عملکرد کانال‌های کلسیمی و پتاسیمی دانست.

## ۵-۳) پیشنهادات برای مطالعات آینده

- ۱- انجام آزمایشات ولتاژ کلمپ بمنظور تعیین دقیق اثرات لینالول بر هدایت کانال‌های یونی.
- ۲- انجام آزمایشات بر روی نورون‌های ایزوله (در محیط کشت) یا در حضور مهارکننده‌های گیرنده‌های سیناپسی.
- ۳- استفاده از بلوکرهای اختصاصی کانال‌های یونی جهت تفکیک اثرات لینالول بر هر یک از کانال‌ها به تنهایی و انجام آزمایشات ولتاژ کلمپ.

۴- انجام آزمایش بر برش‌های مغزی موش صحرایی و سایر مهره‌داران

منابع پارس پزوهه

## فهرست منابع و مآخذ

- Altrup, U., Ha dera, M., Storz, U. (2003). Endogenous pacemaker potentials develop into paroxysmal depolarization shifts (PDSs) with application of an epileptogenic drug. *Brain Res.* 975, 73–84.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Bal, R., Janahmadi, M., Green, G.G.R., Sanders, D.J. (2001). Two kinds of transient outward currents, IA and IAdepol, in F76 and D1 soma membranes of the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *J. Membr. Biol.* 179, 71-78.
- Batista, P.A., Werner, M.F., Oliveira, E.C., Burgos, L., Pereira, P., Brum, L.F., Story, G.M., Santos, A.R. (2010). The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *J. Pain.* 11: 1222-1229.
- Blagden, S., de Bono, J. (2005). Drugging cell cycle kinases in cancer therapy. *Curr. Drug Targets.* 6, 325-335.
- Braun, L., Cohen, M. (2007). *Herbs and Natural Supplements: An Evidence-based Guide*. Second ed, Australia, ISBN: 072953796X.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jager, W., Dietrich, H., Plank, C. (1991). Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z Naturforsch [C]*. 46, 1067–1072.
- Burkey, J.L., Sauer, J.M., McQueen, C.A., Sipes, I.G. (2000). Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners – a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutat. Res.* 453, 25–33.
- Burkhard, P.R., Burkhardt, K., Haenggeli, C.A., Landis, T. (1999). Plant-induced seizures: reappearance of an old problem. *J. Neurol.* 246, 667-670.

- Brum, L.F., Emanuelli, T., Souza, D.O., Elisabetsky, E. (2001). Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. *Neurochem. Res.* 26, 191-194.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Cascino, GD. (1994). Epilepsy: contemporary perspective on evaluation and treatment. *Mayo.Clinic. Proc.* 69, 1199-1211.
- Catterall, W.A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 493-531.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., Waxman, S.G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 411-425.
- Catterall, W.A., Striessing, J., Snutch, T.P., Perez-Reyes, E. (2003). International union of pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 55, 579-581.
- Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Jkonomidou, c., Turski, L. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 32:778-782.
- Çelik, S., Ozkaya, A. (2002). Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 547-552.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia Caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a show review. *Phytother. Res.* 21, 501-506.
- Chamberlain, S.G., Kerkut, G.A. (1969). Voltage clamp analysis of sodium and calcium inward currents in snail neurons. *comp. Bichem. Physiol.* 28, 787-801.
- Champagnat, J. Richter, D. W. (1993). Second messenger-induced modulation of the excitability of respiratory neurones. *NeuroReport* 4, 861-863.

- Cheetham, G. M. (2004) Novel protein kinases and molecular mechanisms of autoinhibition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 700-705.
- Chen, Y.H., Lin, C.H., Lin, P.L., Tsia, M.C. (2006). Cocaine elicits action potential bursts in a central snail neuron: The role of delayed rectifying K<sup>+</sup> current. *Neuroscience*. 138, 257–280.
- Chen, Y.H., Tsai, M.C. (2000). Action potential bursts in central snail neurons elicited by d-amphetamine: roles of ionic currents. *Neuroscience*. 96,237–248.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 426, 517-524.
- Colleen, M., Niswender and P. Jeffrey Conn. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 50, 295–322.
- Crest, M., Gola, M. (1993). Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels are involved in both spike shaping and firing regulation in *Helix* neurones. *J. Physiol.* 465, 265–287.
- Crill, W.E. (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 349–362.
- Cummins, T.R., Xia, Y., Haddad, G.G. (1994). Functional properties of *ra* and human neocortical voltage-sensitive sodium currents. *J. Neurophysiol.* 71, 1052–1064.
- de Almeida, R.N., Agra Mde, F., Maior, F.N., de Sousa, D.P. (2011). Essential Oils and Their Constituents: Anticonvulsant Activity. *Molecules*. 16: 2726-2742.
- de Almeida, R.N., Araújo, D.A., Goncalves, C.R., Montenegro, F.C., de Sousa, D.P., Leite, D.P., Mattei, R., Benedito, M.A., de Carvalho, J.G., Cruz, J.S., Soares Maia, J.G. (2009a).
- de Sousa, D.P., Gonçalves, J.C., Quintans-Júnior, L., Cruz, J.S., Araújo, D.A., de Almeida, R.N. (2006). Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neurosci.Lett.* 401, 231-235.
- de Sousa, D.P., Nobrega, F.F., de Lima, M.R., de Almeida, R.N. (2011). Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils. *Z. Naturforsch. C.* 66: 353-359.

- Dilly, S., Graulich, A., Farce, A., Seutin, V., Liegeois, J.F., Chavatte, P. (2005). Identification of a pharmacophore of SKCa channel blockers. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 20, 517-523.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews.* 51, 7– 61.
- Doerner, D., Thomas, A., Pitler, E. (1988). Protein Kinase C Activators Block Specific Calcium and Potassium Current Components in Isolated Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, November. 8(11): 4089-4078
- Edgerton, J.R., Reinhart, P.H. (2003). Distinct contributions of small and large conductance Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol.* 548, 53-69.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 28, 533-535.
- Ewalij DA, Williams A, Levifan IB. (1985). Modulation of single Ca<sup>2+</sup>-dependent K-channel activity by protein phosphorylation. *Nature* 315:503—506.
- Faber, E.S., Sah, P. (2003). Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist.* 3, 181-194.
- Faizi, M., Janahmadi, M., Mahmoudian, M. (2003). The effect of mebudipine and dibudipine, two new Ca<sup>2+</sup> channel blockers, in comparison with nifedipine on Ca<sup>2+</sup> spikes of F1 neuronal soma membrane in *Helix aspersa*. *Acta Physiol. Hung.* 90,243 254.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J.Jr. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 46, 470-472.
- French, C.R., Sah, P., Buckett, K.J., Gage, P.W. (1990). A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J. Gen. Physiol.* 95, 1139–1157.
- Galeottia,N., Di Cesare Mannelli,L., Mazzanti,G., Bartolini,A., Ghelardini,C. (2002). Menthol: a natural analgesic compound. *Neurosci. Lett.* 322, 145-148.

- Gola, M.C, Ducreux, C., Chagneux, H. (1990).  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  current involvement in neuronal function revealed by in situ single channel analysis in *Helix* neurons. *J. Physiol.* 420, 73–109.
- Goncalves, J.C., Alves, A.M., de Araujo, A.E., Cruz, J.S., Araujo, D.A. (2010). Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 645,108–112.
- Goncalves, J.C., Oliveira, F.S., Benedito, R.B., de Sousa, D.P., de Almeida, R.N., Araújo, D.A.M. (2008). Antinociceptive activity of (–)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol Pharm Bull.* 31, 1017–1020.
- Gu, N., Vervaeke, K., Storm, J.F. (2007). BK potassium channels facilitate highfrequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 580, 859-882.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 194–198.
- Gu, Y., Ting, Z., Qiu, X., Zhang, X., Gan, X., Fang, Y., Xu, X., Xu, R. (2010). Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Toxicology.* 268: 19-24.
- Hallworth, N.E., Wilson, C.J., Bevan, M.D. (2003). Apamin-sensitive small conductance calcium-activated potassium channels, through their selective coupling to voltage-gated calcium channels, are critical determinants of the precision, pace, and pattern of action potential generation in rat subthalamic nucleus neurones in vitro. *J. Neurosci.* 23, 7525-7542.
- Hashimoto, S., Uchiyama, K., Maeda, M., Ishitsuka, K., Furumoto, K., Nakamura, y. (1988). In vivo and in vitro effects of zinc oxide-eugenol (ZOE) on biosynthesis of cyclooxygenase. *J. Dent. Res.* 67, 1092-1096.
- Hermans E., Challiss RA. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 359, 465–84.
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sinaure Associates Inc., Sunderland, Massachusettes USA.

- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1939). Action potential recorded from inside a nerve fiber. *Nature*. 104,710-711.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116,473-496.
- Hosseinzadeh, H., Imenshahidi, M., Hosseini, M.R., Razavi, B.M. (2012). Effect of Linalool on Morphine Tolerance and Dependence in Mice. *Phytother. Res.* 26: 1399-1404.
- Hu, H.J., Glauner, R.W., Gereau, I.V. (2003). ERK Integrates PKA and PKC Signaling in Superficial Dorsal Horn Neurons. I. Modulation of A-Type K<sub>+</sub> Currents. *J Neurophysiol* 90: 1671–1679.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoglu, M., Husnu Can Baser, K. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem.* 93, 551–556.
- Irie, Y., Keung, W.M. (2003). Rhizoma acori graminei and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid- $\beta$  peptide. *Brain Res.* 963, 282–289.
- Iskander, I., Ismailov, II., Benos, DJ. (1995). Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney Int*, 48(4), 1167-1179.
- Sena, C. M., Tome, A. R., Santos, R. M. (1995). Protein kinase C activator inhibits voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. *FEBS Letters* 359, 137-141.
- Shchemelinin, I., Sefc, L., Necas, E. (2006). Protein Kinases, Their Function and Implication in Cancer and Other Diseases. *Folia Biologica (Praha)* 52, 81-101.
- Swartz, K. J., Merritt, A., Bean, B. P. & Lovinger, D. M. (1993). Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission. *Nature* 361, 165-168.
- Tanaka, C., Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annual Review of Physiology.* 17, 551-567.
- Thompson, S.H. (1977). Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurons. *J. Physiol.* 265,465–488.

- Tokimasa, T., Akasu, T. (1990). ATP regulates muscarine-sensitive potassium current in dissociated bull-frog primary afferent neurones. *Journal of Physiology* 426, 241-264.
- Ishida, T. (2005) Biotransformation of terpenoids by mammals, microorganisms, and plant- cultured cells. *Chem. Biodivers.* 2, 569-590.
- Ishii, TM, Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C.T., Adelman, J.P., Maylie, J. (1977). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proceeding of National Academy of Sciences of the USA.* 94, 11651-11656.
- Iskander I. Ismailov and DE J. Benos. (1995). Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney International*, Vol. 48, 1167—1179.
- Janahmadi, M., Farajnia, S., Vatanparast, J., Abbasipour, H., Kamalinejad, M.(2008). The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* L. (Umbelliferae) induces neuronal hyperexcitability in snail partly through attenuation of after-hyperpolarization. *J. Ethnopharmacol.* 120, 360-365.
- Jenny, M., Wrulich, O. A., Schwaige, W., Ueberall, F. (2005). Relevance of atypical protein kinase C isoforms to the drug discovery process. *Chembiochem.* 6, 491-499.
- Jirovetz, L., Jager, W., Buchbauer, G., Nikiforov, A., Raverdino, V. (1991). Investigations of animal blood samples after fragrance drug inhalation by gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and selected ion monitoring. *Biol Mass Spectrom.* 20, 801–803.
- Jonas, P., Bischofberger, J., Fricker, D., Miles, R.(2004). Interneuron Diversity series: Fast in, fast out—temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends Neurosci.* 27, 30–40.
- Kada, T., Shimo, K. (1987).Desmutagens and bio-antimutagens – their modes of action.*Bioessays.* 7, 113–116.
- Kawai F (1999) Odorants suppress T- and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in olfactory receptor cells by shifting their inactivation curves to a negative voltage. *Neurosci Res* 35:253–263.
- Kawai, F., Miyachi, E. (2000). Direct suppression by odorants of cyclic nucleotide-gated currents in the newt photoreceptors. *Brain Res* 876, 180–184.
- Kew, J.N.C., Kemp, J.A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology.* 179: 4-29.

- Kim, S.S., Oh, O.J., Min, H.Y., Park, E.J., Kim, Y., Park, H.J., Han, Y.N., Lee, S.K. (2003). Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci.* 73, 337–348.
- Koya, D. and L. King G. (1998). Protein Kinase C Activation and the Development of Diabetic Complications. *DIABETES*, VOL. 47, 859–866.
- Kozam, G. (1977). The effect of eugenol on nerve transmission. *OralSurg. Oral Med. Oral Pathol.* 44, 799–805.
- Krishek, B. J., XIE, X., Blackstone, C., Haganir, R. L., Moss, S. J. (1994). Regulation of GABA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 12, 1081-1095.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., Morikawa, K., 2000. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971–977.
- Kumar, A., Foster, T.C. (2002). 17beta-estradiol benzoate decreases the AHP amplitude in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 88,621 626.
- Kurahashi, T., Lowe, G., Gold, GH. (1994) Suppression of odorant responses by odorants in olfactory receptor cells. *Science* 265, 118–120.
- Leal-Cardoso, J.H., da Silva-Alves, K.S., Ferreira-da-Silva, F.W., dos Santos-Nascimento, T., Joca, H.C., de Macedo, F.H., de Albuquerque-Neto, P.M., Magalhães, P.J., Lahlou, S., Cruz, J.S., Barbosa, R. (2010). Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na<sup>+</sup> current in dissociated dorsal root ganglia neurons. *Eur J Pharmacol.* 645, 86–93.
- Leidenheimer, N.J., Browning, M.D., Harris, R.A. (1991). GABA<sub>A</sub> receptor phosphorylation: multiple sites, actions and artifacts. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 84–87.
- Llinás, R., Steinberg, I.Z., Walton, K. (1981). Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. *Biophys. J.* 33, 289–321.
- Linck, V.M., da Silva, A.L., Figueiró, M., Piato, A.L., Herrmann, A.P., Dupont Birck, F., Caramão, E.B., Nunes, D.S., Moreno, P.R., Elisabetsky, E. (2009). Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine.* 16: 303-307.

- Lis-Balchin, M., Patel, J., Hart, S. (1998). Studies on the mode of action of essential oils of scented-leaf Pelargonium (Geraniaceae). *Phytother. Res.* 12, 215-217.
- Lopez da Silva, F.H., Kamphius, W., Wadman, W.J. (1992). Epileptogenesis as a plastic phenomenon of the brain, a short review. *Acta Neurol Scand.* 140:34-40.
- Malenka, R. C., D. V., Madison, R., Andrade, R. A. (1986). Phorbol esters mimic some cholinergic actions in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 6: 475480.
- Mathie, A, Woollorton, J.R., Watkins, C.S. (1998). Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol.* 30, 13-24.
- McManus, O.B. (1991). Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 537-560.
- Meldrum, B.S., Akbar, M.T., Chapman, A.G. (1999). Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 36: 189-204.
- Moussaieff, A., Shein, N. A., Tsenter, J., Grigoriadis, S., Simeonidou, C., Alexandrovich, A. G., et al. (2008). Incensole acetate: a novel neuroprotective agent isolated from *Boswellia carterii*. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 28(7), 1341-1352.
- Müller, M., Pape, H.C., Speckmann, E.J., Gorji, A. (2006). Effect of eugenol on spreading depression and epileptiform discharges in rat neocortical and hippocampal tissues. *Neuroscience.* 140, 743–751.
- Nangle, M.R., Gibson, T.M., Cotter, M.A., Cameron, N.E. (2006). Effects of eugenol on nerve and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Planta Med.* 72, 494– 500.
- Narusuye, K., Kawai, F., Matsuzaki, K., Miyachi, E. (2005). Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *J Neural Transm.* 112, 193–203.
- Noebels, J.L. (2003). The biology of epilepsy genes, *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 599-625.
- Numann R, Caylterall WA, Scfieuer T. (1991). Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science.* 254:115.

- Ohkuma, M., Kawai, F., Miyachi, E. (2002). Direct suppression by odorants of ionotropic glutamate receptors in newt retinal neurons. *J Neural Transm* 109: 1365–1371.
- Ohkubo, T., Kitamura, K. (1997). Eugenol activates  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *J. Dent. Res.* 34, 1737-1744 .
- Peana, A.T., D'Aquila, P.S., Chessa, M.L., Moretti, M.D.L., Serra, G., Pippia, P. (2003). Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur. J. Pharmacol.* 460: 37-41.
- Pedarzani, P., Mosbacher, J., Rivard, A., Cingolani, L.A., Oliver, D., Stocker, M., Adelman, J.P., Fakler, B. (2001). Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *J Biol Chem.* 276, 9762-9769.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 83, 117-161.
- Pin J-P, Duvoisin R: The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34: 1-26, 1995.
- Pinto, DJ., Patrick, S.L., Huang, W.C., Connors, B.W. (2005). Initiation, propagation, and termination of epileptiform activity in rodent neocortex in vitro involve distinct mechanisms. *J. Neurosci.* 25, 8131-8140.
- Pizzo, G., Giammanco, G.M., Cumbo, E., Nicolosi, G., Gallina, G. (2006). In vitro antibacterial activity of endodontic sealers, *J. Dent.* 34, 35–40.
- Ramel, C., Alekperov, U.K., Ames, B.N., Kada, T., Wattenberg, L.W. (1986). International Commission for Protection against environmental mutagens and carcinogens. ICPEMC Publication N\_ 12. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutat. Res.* 168, 47–65.
- Randall, A., Tsien, RW. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 15, 2995-3012.
- Reddy, D.S., Gangisetty, O., Briyal, S. (2010). Disease-modifying activity of progesterone in the hippocampus kindling model of epileptogenesis. *Neuropharmacology.* 59: 573-581.

- Rosewood oil induces sedation and inhibits compound action potential in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 124: 440-443.
- Ruha, A. M., Graeme, K. A., and A. Field (2003) Late seizure following ingestion of Vicks Vapo Rub. *Acad. Emerg. Med.* 10, 691.
- Sah, P. (1996). Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurons: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* 19, 150–154.
- Sah, P., McLachlan, E.M. (1992). Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneuron. *J. Neurophysiol.* 68, 1834-1841.
- Sayyah, M., Nadjafnia, L., Kamalinejad, M. (2004) Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 94, 283-287.
- Sayyah, M., Valizadeh, J., Kamalinejad, M. (2002) Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole and maximal electroshock induced seizures. *Phytomedicine.* 9, 212-216.
- Senatore, A., Spafford, J.D. (2010). Transient and big are key features of an invertebrate T-type channel (LCav3) from the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *J. Biol. Chem.* 285, 7447-7458.
- Shankel, D.M., Kuo, S., Haines, C., Mitscher, L.A. (1993). Extracellular interception of mutagens. *Basic Life Sci.* 61, 65–74.
- Silva, N.L., Pechura, C.M., Barker, J.L. (1990). Postnatal rat nigrostriatal dopaminergic neurons exhibit five types of potassium conductances. *J. Neurophysiol.* 64, 262-272.
- Spinella, M. (2001). Herbal Medicines and Epilepsy: The potential for benefit and adverse effects. *Epilepsy Behav.* 2: 524–532.
- Stafstrom, C.E. (2003) Epileptogenesis beyond the hippocampus. *Epilepsy Curr.* 3, 66–67.
- Stafstrom, C.E. (2007). Persistent Sodium Current and Its Role in Epilepsy. *Epilepsy Curr.* 7, 15-22.
- Staras, K., Gyori, J., Kemenes, G. (2002). Voltage-gated ionic currents in an identified modulatory cell type controlling molluscan feeding. *Eur. J. Neurosci.* 15, 109–119.
- Storm, J.F. (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog. Brain Res.* 83, 161–187.

- Sugawara, Y., Hara, C., Tamura, K., Fujii, T., Nakamura, K., Masujima, T., Aoki, T. (1998). Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Anal Chim Acta* 365: 293–299.
- Taylor, S.S., Yang, J., Wu, J., Haste, N.M., Radzio-Andzelm, E., Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1697, 259–269.
- Tsien, R.W., Fox, A.P., Hess, P., McCleskey, E.W., Nilius, B., Nowycky, M.C., Rosenberg, R.L. (1987). Multiple types of calcium channel in excitable cells. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 41, 167-187.
- Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568.
- Ultee, A., Kets, E.P., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 174, 233–238.
- Umezu, T. (1999). Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacol, Biochem. Behav.* 64, 35–40.
- Umezu, T. (2000). Behavioral effects of plant-derived essential oils in the Geller type conflict test in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 83, 150–153.
- Vatanparast, J., Janahmadi, M. (2009). 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, 57-66.
- Vatanparast, J., Janahmadi, M., Asgari, A.R. (2007). Involvement of protein kinase C and IP<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> release in activity modulation by paraoxon in snail neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 571, 81–87.
- Vatanparast, J., Janahmadi, M., Asgari, A.R. (2006). The functional consequences of paraoxon exposure in central neurons of land snail, *Caucasotachea atrolabiata*, are partly mediated through modulation of Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 143, 464-472.
- Vegara, C., Latorre, R., Marrion, N.V., Adelman, J.P. (1998). Calcium activated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 321-329.
- Vogt-Eisele, A.K., Weber, K., Sherkheli, M.A., Panten, J., Gisselmann, G., Hatt, H. (2007) Monoterpenoid agonists of TRPV. *Pharmacol.* 151, 530-540.

- Wie, M.B., Won, M.H., Lee, K.H., Shin, J.H., Lee, J.C., Suh, H.W., Song, D.K., Kim, Y.H. (1997). Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci.Lett.* 225, 93–96.
- Won, M.H., Lee, J.C., Kim, Y.H., Song, D.K., Suh, H.W., Oh, Y.S., Kim, J.H., Shin, T.K., Lee, Y.J., Wie, M.B. (1998). Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampal neurons from global ischemia in gerbils. *Neurosci.Lett.* 254, 101–104.
- Wu, N., Enomoto, A., Tanaka, S., Hsiao, C.F., Nykamp, D.Q., Izhikevic, E., Chandler, S.H. (2005). Persistent sodium currents in mesencephalic neurons participate in burst generation and control of membrane excitability. *J. Neurophysiol.* 93, 2710–2722.
- Wuttke, T.V., Lerche, H. (2006). Novel anticonvulsant drugs targeting voltage-dependent ion channels. *Expert Opin Investig Drugs.* 15, 1167-1177.
- Yang, J. Tsien, R. W. (1993). Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* 10, 127-136.
- Yazdi, H.H., Janahmadi, M., Behzadi, G. (2007). The role of small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in the modulation of 4-aminopyridine-induced burst firing in rat cerebellar Purkinje cells. *Brain Res.* 1156, 59-66.
- Yuan, L.L., Chen, X. (2006). Diversity of potassium channels in neuronal dendrites. *Prog.Neurobiol.* 78, 374–389.
- Zhang, X.B., Jiang, P., Gong, N., Hu, X.L., Fei, D., Xiong, Z.Q., Xu, L., Xu, T.L. (2008). A-type GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol. *PLoS One.* 3, e3386.
- Zhang, X.F., Gopalakrishnan, M., Shieh, C.C. (2003). Modulation of action potential firing by iberiotoxin and NS1619 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 122, 1003-1011.
- Zheljazkov, V.D., Callahan, A., Cantrell, C.L. (2008). Yield and oil composition of 38 basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions grown in Mississippi. *J. Agric. Food Chem.* 56, 41–245.

## **Abstract**

### **The effects of Linalool on neuronal activity and interaction with cellular mechanisms involved in epileptiform activity in snail neurons**

**By**

**Sara bazleh**

Linalool is a monoterpene alcohol that is found in the essential oils of several aromatic plants. This compound shows anti-inflammatory, antinociceptive properties and possesses various biological effects in the nervous systems. In this work, we employed intracellular recording technique to study the effect of linalool on the firing properties of snail neurons. Extracellular application of linalool (0.1 mM) rapidly increased the frequency of spontaneous action potentials and reduced repolarization rate and suppressed both duration and amplitude of afterhyperpolarization. Linalool also reduced the amplitude of action potential but this effect seemed to be a consequent to the slow membrane depolarization rather than a direct blocking effect on Na<sup>+</sup> channels, since it was eliminated when the resting membrane potential was held at the control value by constant negative-current injection. The extracellular application of linalool (0.2 Mm) gradually changed the pattern of activity from regular firing to burst activity, which was slowly reversed after washout with normal Ringer. Burst activity was reduced in the presence of nifedipine (blocker of L-type calcium channels) and eliminated in the presence of nickel chloride (nonspecific blocker of calcium channels). Bath application of H89 (selective inhibitor of cAMP-dependent protein kinase) and chelerythrine (selective inhibitor of protein kinase C) eliminated linalool-induced burst activity and restored regular single spike activity. These results suggest that linalool can induce epileptiform activity in snail neurons especially through an inhibitory action on potassium channels. The action of linalool on neuronal activity seems to employ direct action on ion channels, as evidenced by its fast initiation, but is dependent on an indirect modulatory action through ion channels phosphorylation.

**Key words:** action potential, Linalool, snail neuron, burst activity, ion channels