Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016

Physiology and Pharmacology, 18 (2), 144-155

Summer 2014 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effects of resveratrol on intrinsic neuronal properties of CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices

Gholam Hossein Meftahi[1,2], Mahyar Janahmadi[1*], Mohammad Javad Eslamizade[3]

1. Neurophysiology Research Center and Dept. of Physiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran,
2. Neuroscience Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Depat. of Neuroscience, School of Advanced Medical Technology, Iran University of Medical Sciences, Hemmat Highway, Tehran, Iran

Received: 9 May 2014 **Accepted: 17 Jun 2014**

Abstract

Introduction: Resveratrol possesses a wide range of biological effects. However, the cellular mechanisms of its effects are not fully understood. In the present study, the cellular actions of resveratrol on intrinsic electrophysiological properties of the rat hippocampal CA1 pyramidal neurons were examined.

Methods: The spontaneous and evoked firing properties of CA1 pyramidal neurons in adult rats exposed to resveratrol (100 µM) were examined using whole cell patch clamp recording under current clamp condition and the results were compared with control and vehicle treated groups.

Results: Treatment with resveratrol caused alterations in neuronal firing characteristics. Application of resveratrol shifted the resting membrane potential (RMP) towards hyperpolarizing voltage (from -58.62±0.89 mV in control to -67.06±0.89 mV after resveratrol). The after hyperpolarization potential (AHP) amplitude was significantly increased following extracellular application of resveratrol ($P < 0.001$). It also induced a significant increase in the peak amplitude of action potential in response to 100-300 pA depolarizing current pulses ($P<0.05$). Furthermore, resveratrol-treated neurons displayed a significantly increased time to peak in response to 400 and 500 pA depolarizing currents, when compared with either control or vehicle-treated groups ($P<0.05$). In addition, rise time to half-amplitude as well as rise tau and decay tau of action potential were significantly increased following resveratrol application ($P<0.01$, $P<0.01$ and $P<0.01$, respectively).

Conclusion: Treatment with resveratrol changes the action potential parameters, hyperpolarizes the RMP and reduces neuronal excitability and thereby may probably induce neuroprotective effects.

Key words: Electrophysiological Intrinsic Properties, Resveratrol, CA1 Pyramidal Neurons, Action Potential, Whole Cell Patch Clamp

* Corresponding author e-mail: mjanahmadi@yahoo.com
Janahmadi@sbmu.ac.ir

Available online at: www.phypha.ir/ppj

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۸ (۲)، ۱۴۴ – ۱۵۵
تابستان ۱۳۹۳

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثرات رزوراترول بر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک ذاتی نورون های هرمی CA1 در برش‌های هیپوکمپ موش صحرایی

غلام حسین مفتاحی[۱،۲]، مهیار جان احمدی[۱*]، محمد جواد اسلامی‌زاده[۳]
۱. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
۳. دپارتمان نوروساینس، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

دریافت: ۱۹ اردیبهشت ۹۳ پذیرش: ۲۷ خرداد ۹۳

چکیده

مقدمه: رزوراترول یک پلی‌فنول غیرفلاونوئید است که دارای اثرات بیولوژیک وسیعی می‌باشد. با این حال، مکانسیمهای سلولی اثرات کاملاً مشخص نشده‌اند. در این مطالعه اثرات سلولی رزوراترول بر ویژگی‌های ذاتی نورون‌های هرمی CA1 هیپوکمپ در موش صحرایی بررسی شد.

روش ها: در این مطالعه از روش ثبت patch clamp whole cell تحت شرایط کلمپ جریان برای بررسی اثرات رزوراترول (۱۰۰ µM) بر ویژگیهای ذاتی سلول‌های هرمی CA1 در زمان فعالیت خودبه‌خودی و فعالیت برانگیخته غشایی در برش‌های هیپوکمپ موش صحرایی استفاده شد و نتایج با دو گروه کنترل و حلال مقایسه شد.

یافته ها: رزوراترول تغییرات قابل‌توجهی در الگوی شلیک نورون‌ها ایجاد کرد. استفاده از رزوراترول سبب تغییر پتانسیل استراحت غشاء (RMP) به سمت ولتاژهای هیپرپلاریزه شد (از ۵۸/۶۲ ±۰/۸۹- میلی ولت در شرایط کنترل به ۶۷/۰۶ ±۰/۸۹- میلی ولت بعد از رزوراترول رسید، P<۰/۰۰۱). دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب تحریک به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) افزایش یافت. استفاده از رزوراترول سبب افزایش دامنه پیک در پاسخ به تزریق جریانات دپلاریزه کننده ۱۰۰ تا ۳۰۰ پیکو آمپر شد. همچنین زمان رسیدن به پیک وقتی که جریان‌های دپلاریزه کننده ۴۰۰ و ۵۰۰ پیکوآمپر تزریق می‌شد در مقایسه با گروه کنترل و شاهد به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافت. علاوه بر این، زمان رسیدن به نیمی از دامنه ، ثابت زمانی فاز بالارو و پایین‌رو پتانسیل عمل نیز در حضور رزوراترول به طور معنی‌داری (به ترتیب، P<۰/۰۱، P<۰/۰۱، P<۰/۰۰۱) افزایش یافت.

نتیجه گیری: رزوراترول از طریق تغییر پارامترهای پتانسیل عمل ، هیپرپلاریزه کردن پتانسیل غشا و کاهش تحریک‌پذیری نورونها احتمالاً می‌تواند اثرات محافظت نورونی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک ذاتی، رزوراترول، نورون‌های هرمی CA1، پتانسیل عمل، Patch Clamp Whole Cell

مقدمه

مطالعات بر روی مواد مؤثره استخراج شده از گیاهان برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌هایی نورودژنراتیو یکی از اهداف تحقیقاتی است که بتوان از آنها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده کرد. از این میان رزوراترول (3,5,4-trihydroxystilbene) یک پلی فنول است که در بیش از هفتاد گونه گیاهی از جمله انگور، بادام زمینی و توت یافت شده است [۸، ۱۱، ۱۲]. مطالعات نشان داده است این ماده خطر ابتلا به آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش می‌دهد و همچنین قلب، مغز و کلیه را از آسیب

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: mjanahmadi@yahoo.com
Janahmadi@sbmu.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016

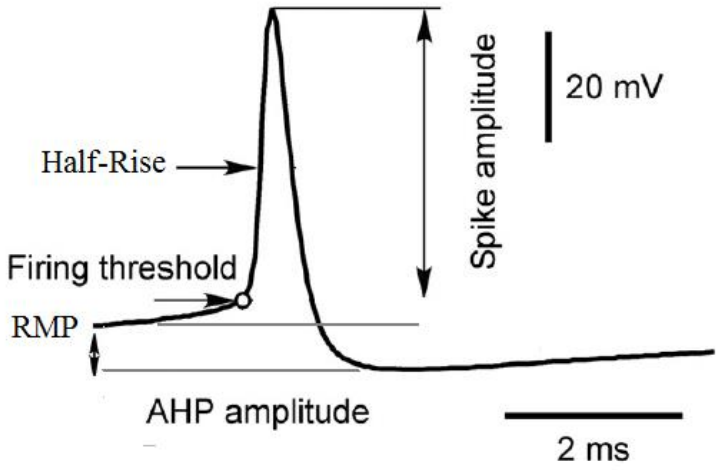
ایسکمی محافظت می‌کند [۴]. رزوراترول اثرات ضدپیری مفیدی همچون محافظت قلبی عروقی، ضد التهابی، ضد سرطانی، ضددیابت و محافظت عصبی دارد [۱۹، ۲۱]. ایسکمی مغزی سبب رها شدن مقدار زیادی گلوتامات می‌شود که فعالیت پتانسیل پس سیناپسی تحریکی (EPSPs) را در شرایط OGD (Oxygen Glucose Deprivation) افزایش می‌دهد. مهار این EPSPs ها می‌تواند از تحریک بیش از حد نورونها جلوگیری کند و در نتیجه آسیب نورونی را کاهش دهد. رزوراترول می‌تواند افزایش EPSPs خود به خودی که توسط OGD در برش‌های هیپوکامپ ایجاد می‌شود را مهار کند [۲۶]. علاوه براین نشان داده است که رزوراترول می‌تواند انتقال پس سیناپسی گلوتامات را مهار کند و همچنین می‌تواند بازجذب گلوتامات را بعد از آسیب‌های اکسیداتیو افزایش دهد و در نتیجه از تحریک پذیری بیش از حد نورون ها جلوگیری کند [۳، ۷، ۱۰]. همچنین این ماده می‌تواند موجب مهار رهایش گلوتامات و آسپارتات در شرایط ایسکمی شود [۱۵]. رزوراترول بازجذب گلوتامات را از طریق افزایش بیان ترانسپورترهای GLT1 آستروسیتی افزایش می‌دهد و بدین طریق از تحریک بیش از حد نورون ها جلوگیری می‌کند [۳، ۲۸]. همچنین جریانات القا شده توسط کاینات را مهار می‌کند و از این طریق دارای اثرات محافظتی در صرع می‌باشد [۲۴]. رزوراترول می‌تواند عملکرد حافظه را در بیمارانی که دچار مشکلات حافظه ای هستند بهبود دهد [۱۲، ۱۴، ۲۳]. بنابراین، بخش از اثرات محافظت عصبی رزوراترول را می‌توان به توانایی آن در کاهش غلظت خارج سلولی گلوتامات و آسپارتات و در نتیجه کاهش تحریک پذیری نورون ها نسبت داد [۱۵]. رزوراترول جریانات پتاسیمی وابسته به ولتاژ را در نورون های هیپوکمپ موش صحرایی مهار می‌کند و بنابراین می‌تواند در درمان آسیب‌های ایسکمی مغز مفید باشد [۶]. این ماده دارای اثرات ضد دردی در تست فرمالین می‌باشد که این اثرات ممکن است به این دلیل باشد که رزوراترول سبب فعال شدن کانال های پتایسمی وابسته به کلسیم می‌شود [۹]. همچنین در گانگلیون ریشه خلفی نخاع موش صحرایی جریانات سدیمی را در رفتاری وابسته به دوز کاهش می‌دهد [۱۳]. علاوه بر این رزوراتول فرکانس فعالیتهای صرعی و آسیب‌های پاتولوژیکی ناشی از آن را در نورون های CA1 و CA3 هیپوکمپ بعد از وقوع صرع لوب تمپورال کاهش می‌دهد [۲۵]. این مطالعات دال بر این است که رزوراترول می‌تواند در بهبود بعضی از انواع بیماری‌های نورلوژیک مفید باشد. با وجود شواهدی مبنی بر اثرات بیولوژیک رزوراترول، مطالعات اندکی درباره مکانیسم‌های سلولی اثرات این ماده صورت گرفته است و اطلاعات بسیار محدودی در این زمینه وجود دارد. با توجه به اینکه رزوراترول می‌تواند دارای اثرات محافظت عصبی باشد و از آنجایی که اطلاعات اندکی در مورد نقش‌های الکتروفیزیولوژیک آن وجود دارد بنابراین در این مطالعه اثرات احتمالی رزوراترول بر روی پاسخ‌های ذاتی الکتروفیزیولوژیک نورونهای CA1 هیپوکمپ بررسی شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی۸۰ تا ۱۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط سیکل تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته و دمای محیطی کنترل شده (۲۲ـ۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

ثبت الکتروفیزیولوژیک Whole-Cell Patch Clamp : حیوانات با استفاده از استنشاق اتر عمیقاً بیهوش و سر آنها سریعاً جدا شد. با برداشتن استخوان جمجمه بلافاصله مغز در محلول ACSF سرد شده قرار گرفت. محلول ACSF برش گیری شامل (بر حسب میلی مولار) sucrose 206, KCl 2.8, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 1, $MgSO_4$ 2, NaH_2PO_4 1.25, NaH_2CO_3 26, D-glucose 10, بود. این محلول بطور مداوم با ترکیب اکسیژن ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ (کربوژن) اکسیژنه گردید. سپس هیپوکمپ از سایر قسمت‌های مغز جدا و برشهای ساژیتال با ضخامت ۳۰۰ µm با استفاده از یک ویبروتوم (Vibrosilce MA752, Campden Instruments Ltd, UK) تهیه گردید. برشها در محلول کربوژنه شده ACSF به مدت یک ساعت در درجه حرارت ۳۴-۳۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از آن تا هنگام آزمایش در محلول ذکر شده در درجه حرارت اتاق (25^{o} C-۲۲) نگهداری شدند. پس از آن برش‌ها در محفظه ثبت قرار داده شده و با استفاده از

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016



شکل ۱- پارامترهای اندازه گیری شده پتانسیل عمل

میکروسکوپ Upright (Olympus; BX 51WI) و با عدسی ×60 (water immersion) و دوربین Infrared مشاهده می‌شدند. محفظه ثبت با محلول ACSF کربوژنه شده بطور مداوم با سرعت ۲-۱ میلی لیتر در دقیقه سوپرفیوز می‌شدند. ACSF ثبت شامل (Mm): NaCl 126، KCl 2.5، NaH_2PO_4 1.25، $NaH_2CO_3$26، D-Glucose10، $CaCl_2$ 2، $MgCl_2$ 1 بود (pH برابر ۷/۴ و اسمولاریته ۳۰۰mM). به منظور مهار جریانات سیناپسی Kynurenic acid (۱ Mm) برای مهار جریانات گلوتاماتی سریع، و Picrotoxin (۵۰ µM) برای مهار جریانات GABA به محلول پرفیوژن اضافه می‌شدند. حجم محفظه ثبت ۱/۵ میلی لیتر بود. سلولهای هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ بر اساس موقعیت، اندازه، شکل شناسایی می‌شدند. ثبت Whole-cell از جسم سلولی، سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ به عمل آمد. الکترودهای مورد استفاده در این ثبت پیپت های شیشه ای از جنس بوروسیلیکات (O.D: 1.5mm, I.D: 0.86mm) بود. ترکیب محلول داخل پیپت شامل (Mm): K-، KCl 10، methyl SO_4 135، $MgCl_2$ 1، Na_2ATP 2، Na_2GTP 0.4، EGTA 5 و Hepes 10 بود. (pH برابر ۷/۲ و اسمولاریته ۲۹۰ mOsm/kg). مقاومت پیپت پس از پر شدن با محلول فوق، ۶-۵ MΩ بود. تمام ثبت‌ها در دمای اتاق (۲۵-۲۲°C) صورت گرفت. فعالیت خودبه خودی و برانگیخته سلول با استفاده از پروتکل کلمپ جریان ثبت می‌شد. به این ترتیب، که جریانهای دپولاریزه به صورت امواج مربعی از 100pA تا 500pA و هر یک به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه به سلول تزریق و سپس پاسخ‌های برانگیخته غشایی ثبت می‌شد. در مورد فعالیت خودبخودی، تغییرات پتانسیل غشاء بدون تزریق جریان ثبت گردید. بعد از اتمام آزمایش، ویژگی های پتانسیل عمل و تغییرات ولتاژ غشاء با استفاده از نرم افزار Pclamp به صورت Off line مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

از دی متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان حلال رزوراترول (Tocris, Bristol, UK) استفاده شد. غلظت نهایی DMSO کمتر از ۰/۱٪ بود.

گروههای مورد آزمایش شامل: ۱- گروه کنترل (۴ موش و ۱۰ سلول) ۲- گروه حلال (محلول ASCF حاوی DMSO، ۴ موش و ۸ سلول) ۳- گروه رزوراترول (۱۰۰µM، ۵ موش و ۱۲ سلول). دوز رزوراتول بر اساس مطالعات قبلی که بیانگر اثرات سلولی رزوراترول است انتخاب گردید [۷، ۱۳] و به محلول ACSF افزوده شد و پرفیوز گردید. در این مطالعه در شرایط کلمپ جریان، پارامترهای الکتروفیزیولوژیک (شکل ۱) پتانسیل استراحت غشاء (RMP)، دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب (AHP Amplitude)، دامنه پتانسیل عمل (Peak Amplitude)، زمان رسیدن به پیک (Time to peak)، زمان رسیدن به ۵۰ درصد دامنه پتانسیل عمل (Time to rise Half-Amplitude)، ثابت زمانی فاز بالارو (Rise tau) و ثابت زمانی فاز پایین رو (Decay tau) بررسی شد.

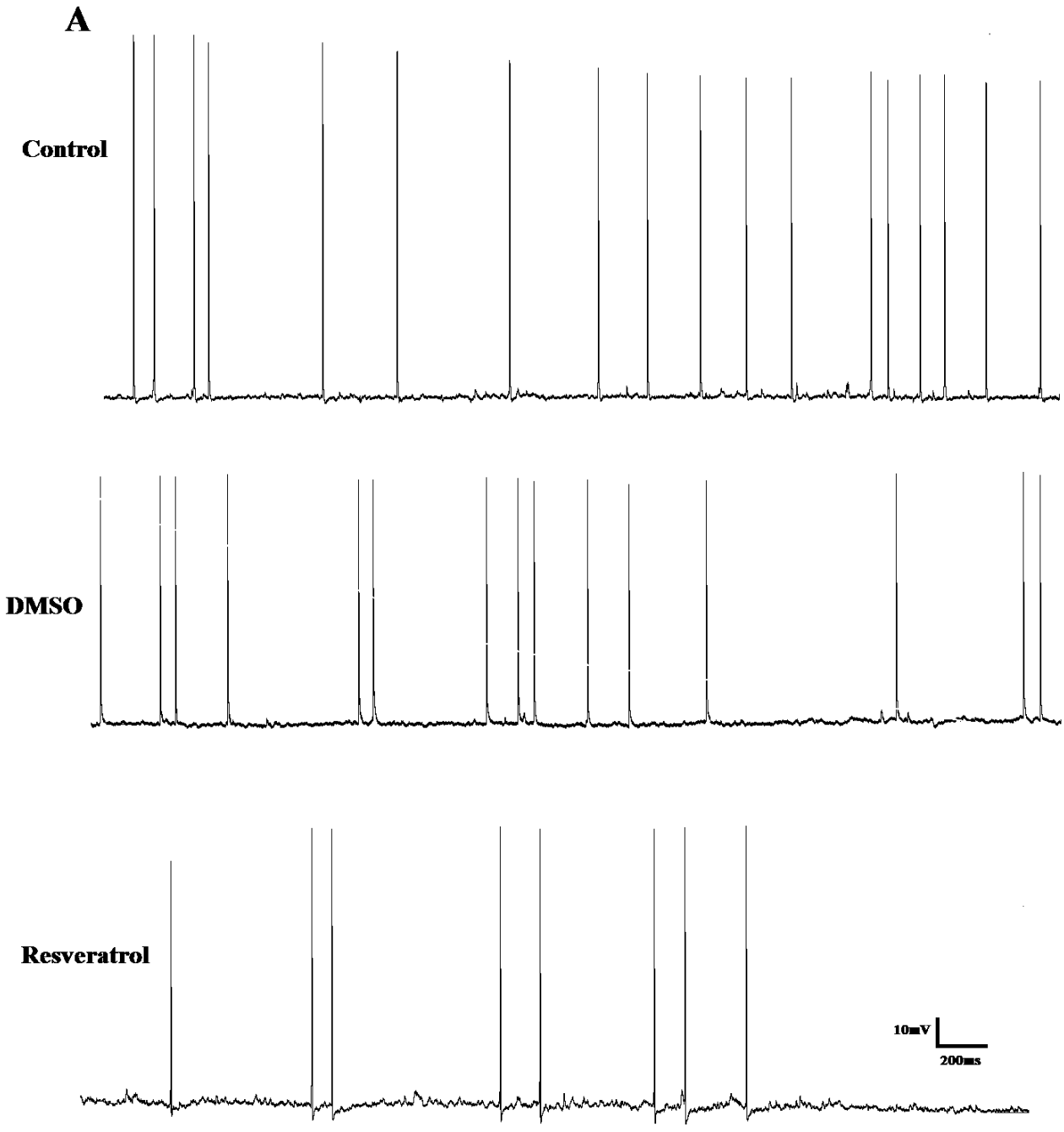
برای تجزیه و تحلیل آماری داده های از نرم افزار آماری SPSS (version 19) و آزمون آماری

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016

One-way ANOVA و تست متعاقب Tukey's استفاده شد و P< ۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت Mean ± SEM نشان داده شد.

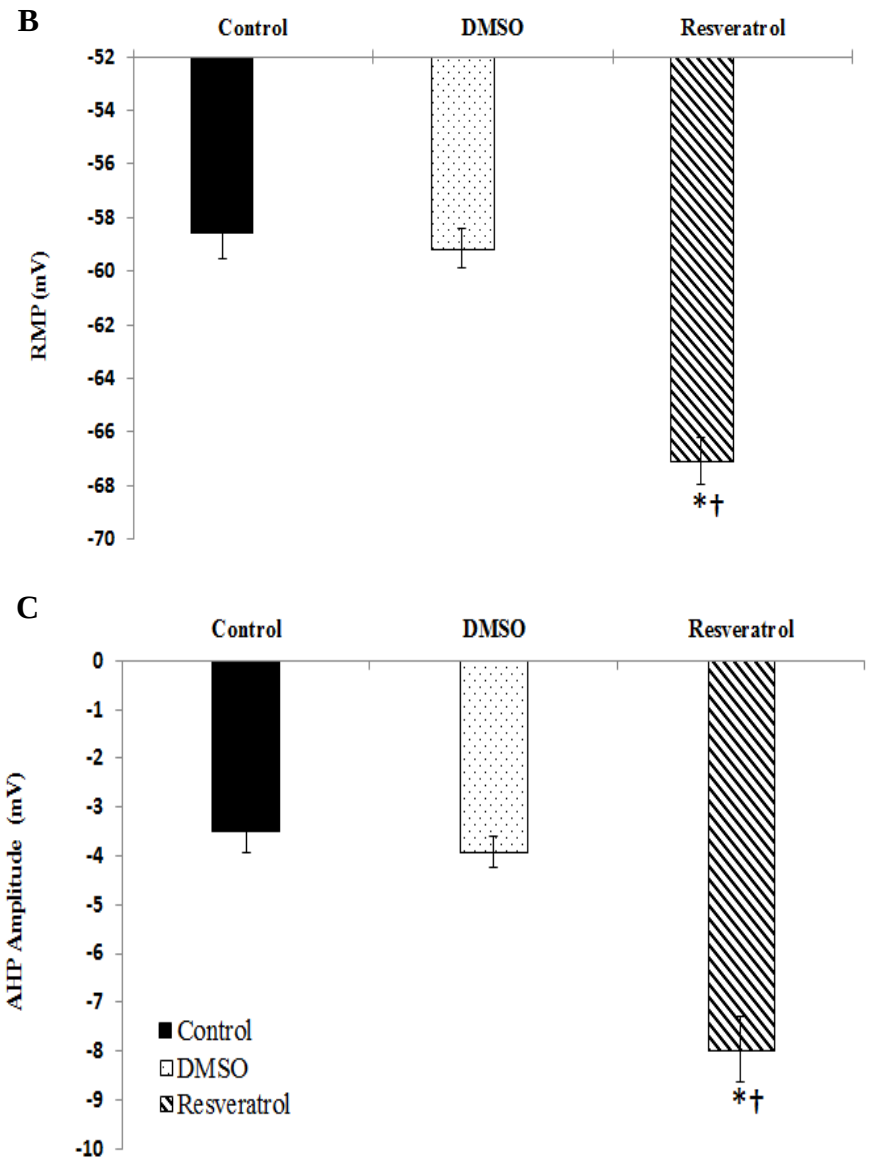
یافته ها

آنالیز آماری نتایج حاصل از Whole-Cell Patch Clamp در شرایط کلمپ جریان نشان داد که در شرایط فعالیت خودبه‌خودی (Spontaneous activity)، یعنی زمانی که هیچ جریانی به سلول تزریق نمی‌شود (شکل ۲A)، رزوراترول سبب تغییر پتانسیل استراحت غشاء (RMP) نورونهای هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ به سمت ولتاژهای منفی‌تر می‌شود ۰/۹±۵۸/۶۲-; F(2,15)=14.41,P<0.001، ۰/۷۳±۵۹/۱۲- و ۰/۸۹±۶۷/۰۶- میلی ولت به ترتیب در



شکل ۲A

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016



شکل ۲- تأثیر رزوراترول بر فعالیت الکتریکی، پتانسیل استراحت و دامنه AHP .

(A) ثبت فعالیت خودبخودی پتانسیل عمل در شرایط کنترل، در حضور DMSO بعنوان حلال رزوراترول و بدنبال کاربرد رزوراترول. (B) اثر رزوراترول بر پتانسیل استراحت (RMP) و بر دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون. * و† به ترتیب بیانگر اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل و حلال (DMSO)

گروههای کنترل (n=۱۰)، حلال (n=۹) و رزوراترول (n=۱۲، شکل B ۲). علاوه براین، در این شرایط دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب (AHP Amplitude)،که بیانگر فعالیت کانال های پتاسیمی بویژه وابسته به کلسیم است، در گروه رزوراترول (۰/۴۴±۷/۹۷- میلی ولت) نسبت به گروه کنترل (۰/۳۲ ± ۳/۵- میلی ولت) و حلال (۰/۶۷ ± ۳/۹۱- میلی ولت) افزایش معنی داری ($F(2,17)=24.62$, $P<0.001$) را نشان داد (شکل 2C). پاسخهای برانگیخته از طریق تزریق پالسهای دپلاریزه کننده ایجاد شد (شکل A ۳). تزریق جریان‌های دپلاریزه کننده ۱۰۰ تا ۳۰۰ پیکو آمپر موجب افزایش معنی دار $P<0.001$,$F(2,20)=11.8$; $F(2,15)=28.05$, $P<0.001$ و $F(2,18)=8.03$, $P<0.01$ به ترتیب در پاسخ به جریانات ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ پیکوآمپر). دامنه پتانسیل عمل در گروه رزوراترول شد (شکل B ۳)، لکن با تزریق جریانات بزرگتر (۴۰۰ و ۵۰۰ پیکوآمپر) تغییرات معنی داری بین گروهها مشاهده نشد. علاوه بر این زمان رسیدن به پیک پتانسیل عمل (Time to peak) در پاسخ به تزریق جریانات ۴۰۰ و ۵۰۰ پیکوآمپر به طور معنی‌داری افزایش یافت ($F(2,17)=5.50$, $P<0.05$) ; $F(2,19)=4.76$, $P<0.05$ به

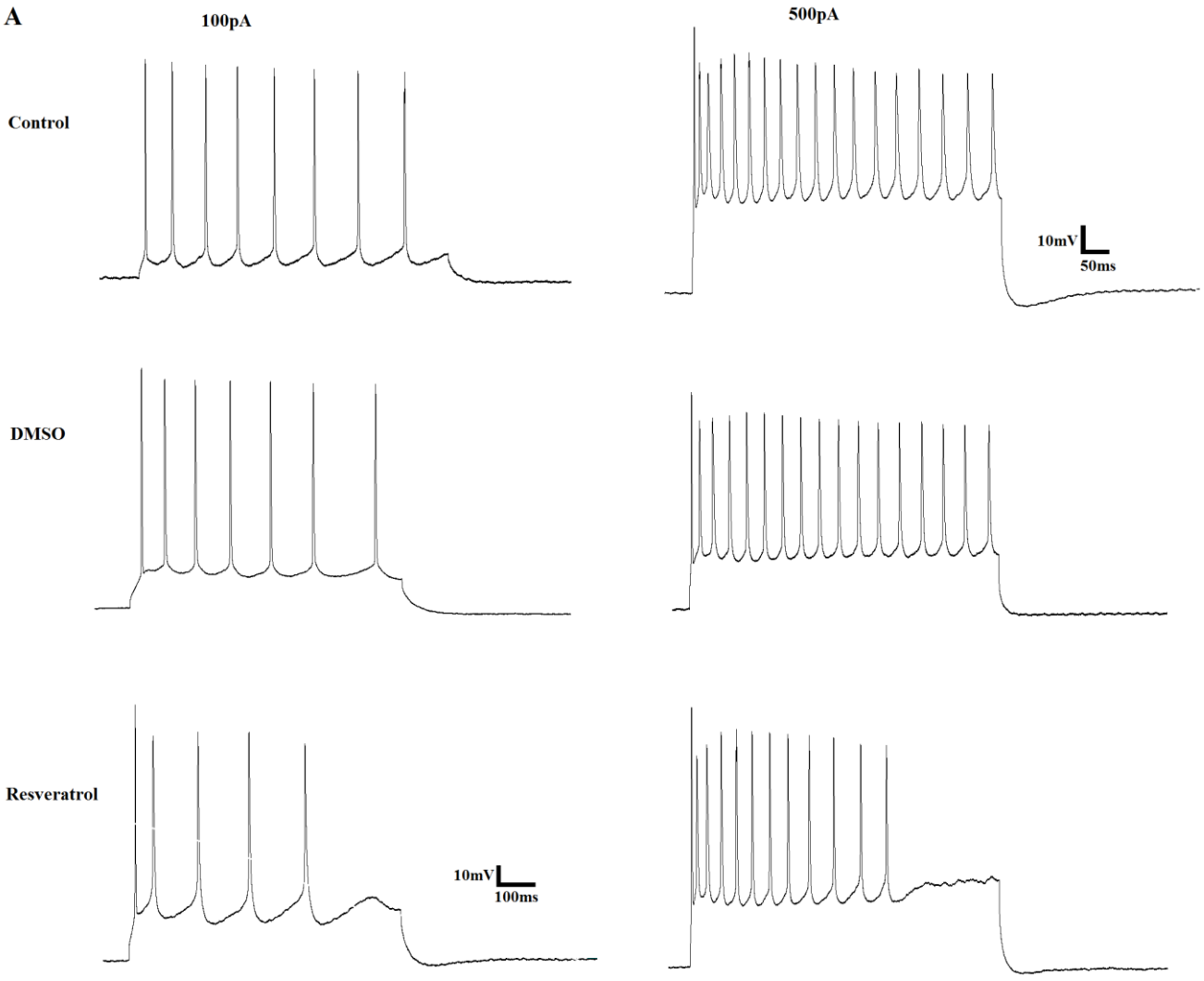
Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016

ترتیب با تزریق جریان ۴۰۰ و ۵۰۰ پیکو آمپر، شکل ۳C).

همچنین زمان رسیدن به ۵۰ درصد دامنه پتانسیل عمل تنها در پاسخ به تزریق جریان دپلاریزه ۵۰۰ پیکوآمپر به طور معنی داری در گروه رزوراترول افزایش یافت ($F(2,18)=6.68, P<0.01$، شکل ۴A). با افزایش دامنه جریانات دپلاریزه کننده، ثابت زمانی فاز بالارو در همه گروهها افزایش یافت ولی فقط در پاسخ به تزریق جریانات ۵۰۰ پیکوآمپر بین رزوراترول و سایر گروهها تغییرات معنی دار بود ($F(2,14)=7.35, P<0.01$ ، شکل ۴B). علاوه براین با افزایش دامنه جریانات دپلاریزه کننده ثابت زمانی فاز پایین رو در همه گروهها افزایش یافت که در گروه رزوراترول این پارامتر افزایش بیشتری نشان داد هر چند از نظر آماری معنی دار نبود، ولی در پاسخ به تزریق جریانات ۳۰۰ و ۴۰۰ پیکوآمپر در گروه رزوراترول نسبت به سایر گروهها این پارامتر به طور معنی داری افزایش یافت ($F(2,15)=20.14, P<0.001$، $F(2,14)=81.17, P<0.001$ به ترتیب در پاسخ به جریان ۳۰۰ و ۴۰۰ پیکوآمپر ، شکل ۴C).

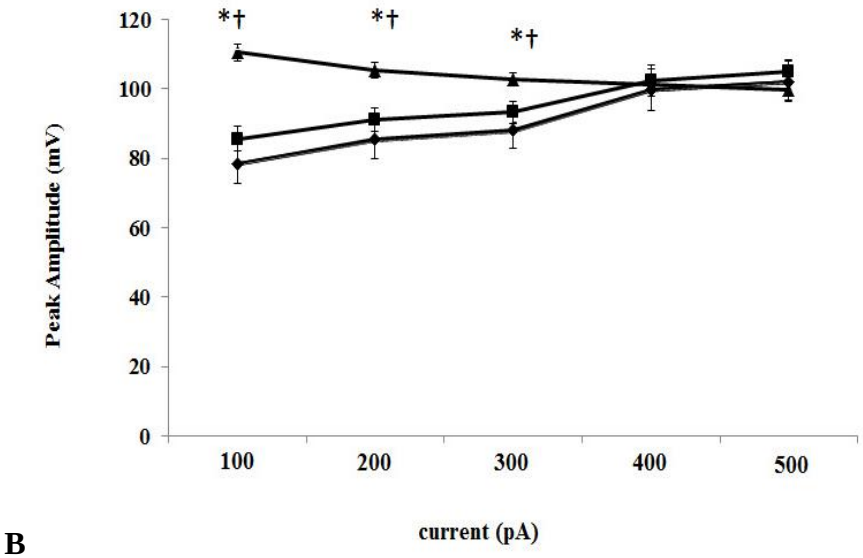
بحث

در مطالعه حاضر ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک ذاتی خودبخودی و برانگیخته نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ در حضور رزوراترول تحت شرایط کلمپ جریان بررسی شد. اگر چه مطالعاتی در مورد اثرات محافظت عصبی

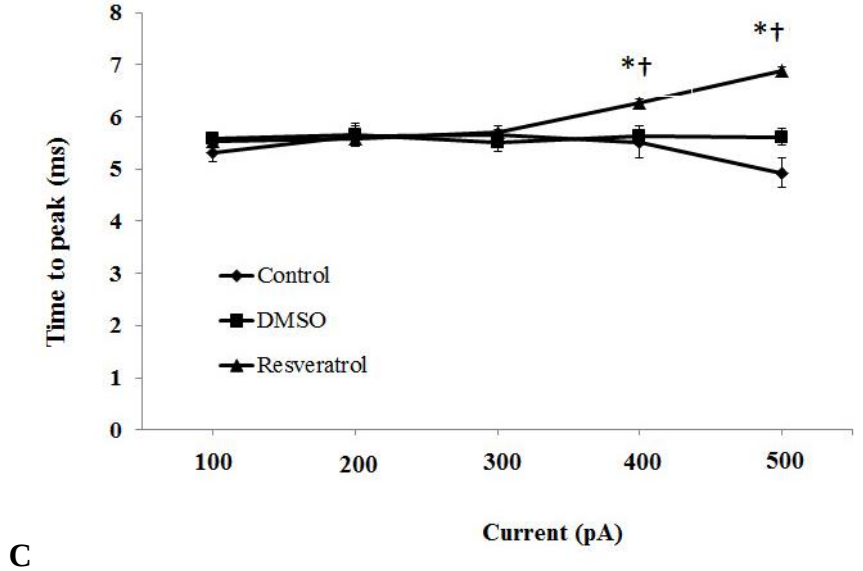


شکل ۳A

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016



B



C

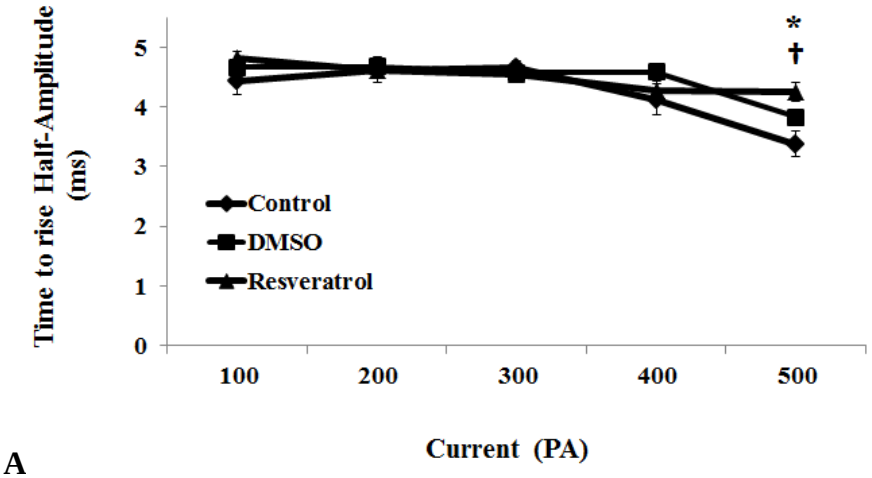
شکل ۳- مقایسه اثر رزوراترول بر پاسخهای برانگیخته نورونهای هرمی کشت شده. (A) نمونه ثبت پتانسیلهای عمل برانگیخته در پاسخ به تزریق جریان دپلاریزه کننده ۱۰۰ و ۵۰۰ پیکوآمپر در گروه کنترل، DMSO و رزوراترول. مقایسه اثر رزوراترول بر پیک دامنه (B) و زمان رسیدن به پیک (C).

رزوراترول صورت گرفته است ولی تاکنون هیچ مطالعه ای مبنی بر بررسی اثرات سلولی این ماده بر ویژگی های الکتروفیزیولوژیک ذاتی نورونها صورت نگرفته است.

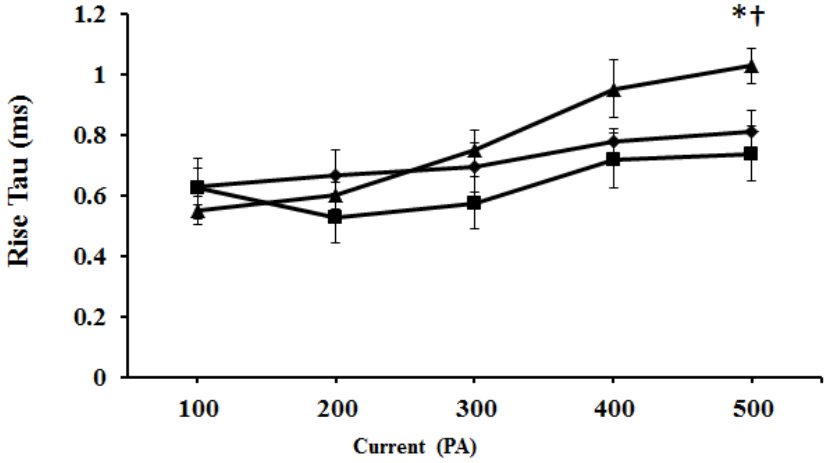
الگوی شلیک نورون ها به وسیله ورودیهای سیناپسی و کانال های یونی غشاء سلول کنترل می‌شود به طوریکه به سلول اجازه می‌دهد که حتی در عدم حضور ورودیهای سیناپسی فعالیت خودبخودی آنها متوقف نشود. بنابراین، فعالیت خودبخودی سلول‌ها از خصایص ذاتی غشاء منشأ می‌گیرد و ورودیهای سیناپسی بیشتر نقش تعدیل کننده را ایفا می‌نمایند. در این مطالعه از مهارکننده های سیناپسی Picrotoxin و Kynurenic acid برای مهار جریانات سیناپسی استفاده شد تا فعالیت ذاتی نورون های هیپوکمپ در حضور رزوراترول بررسی شود. از آنجائیکه در تحقیق حاضر ورودی‌های سیناپسی مهار می‌شدند بنابراین، تغییرات ایجاد شده ناشی از تعدیل عملکرد کانال‌های های یونی و فعالیت‌های ذاتی سلول می‌باشد.

کاربرد رزوراترول موجب شیفت RMP به سمت ولتاژهای هیپرپلاریزه و افزایش دامنه AHP شد. علاوه براین، نتایج بدست آمده از فعالیت برانگیخته با استفاده از پروتکل کلمپ جریان، نشان می‌دهد که رزوراترول سبب افزایش پیک دامنه

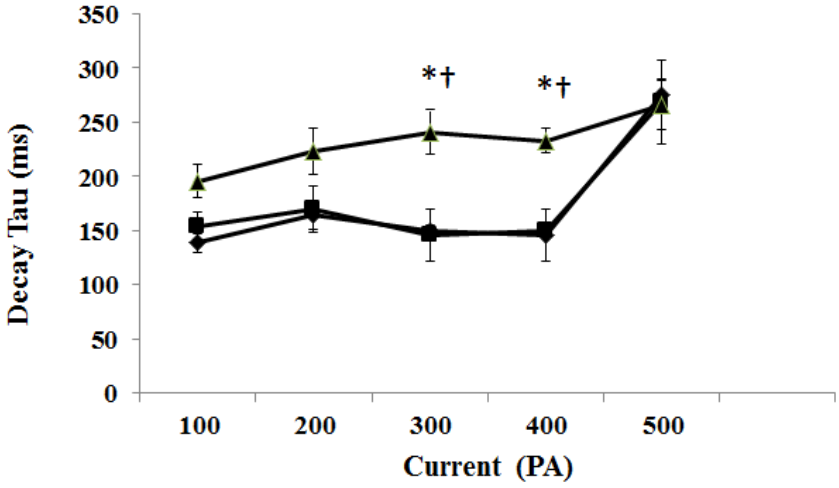
Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016



A



B



C

شکل ٤- مقایسه اثرات رزوراترول بر ویژگیهای فعال برانگیخته سلولهای هرمی کشت شده.
تأثیر رزوراترول بر زمان رسیدن به نیمی از دامنه (A)، بر ثابت زمانی فاز بالارو (B) و بر ثابت زمانی فاز پایین رو پتانسیل عمل (C).

(Peak Amplitude)، افـزایش زمـان رسـیدن بـه پیـک (Time to peak)، افـــزایش Time to rise Half-Amplitude، افزایش ثابتهای زمانی فاز بالارو و فاز پـایین رو نسبت به گروه کنترل و شاهد می‌شود.

بررسیهای پیشین نشان داده‌انـد کـه AHP یـک ویژگـی ذاتی نورون های هرمی اسـت کـه عمـدتاً بـه دلیـل عمکـرد

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016

کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم (K_{Ca2+}) می‌باشد [۵، ۱۶]. با توجه به افزایش دامنه AHP در حضور رزوراترول بنظر می‌رسد که احتمالاً این ماده باعث افزایش فعالیت کانالهای پتاسیمی حساس به کلسیم شده است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد رزوراترول سبب تعدیل فعالیت کانال های پتاسیم وابسته به کلسیم (K_{Ca2+}) در سلول‌های اندوتلیال می‌شود [۱۸، ۲۶]. علاوه براین، اثرات تحریکی رزوراترول بر کانال‌های K_{Ca2+} می‌تواند در ارتباط با هیپرپلاریزاسیون غشاء باشد و احتمالاً تغییر RMP به سمت ولتاژهای منفی‌تر می‌تواند به دلیل فعال شدن این کانال‌ها توسط رزوراترول باشد [۱۶].

همچنین، گزارش شده است که رزوراترول جریانات پتاسیمی وابسته به ولتاژ را در نورون‌های هیپوکمپ موش صحرایی مهار می‌کند و در نتیجه از این طریق می‌تواند اثرات محافظت عصبی در شرایطی که ایسکمی سبب آسیب مغز می‌شود داشته باشد [۷]. رزوراترول سبب فعال شدن کانال‌های پتاسیمی فعال شده توسط کلسیم (کانال‌های BK) می‌شود که پتانسیل غشا نورونی را تحت شرایط ایسکمی نگه می‌دارد. کانال های BK به مقدار زیادی در نورون‌های هرمی CA1 هیپوکامپ یافت می‌شوند. اثرات رزوراترول در ایسکمی می‌تواند به دلیل تقویت فعالیت کانال‌های BK باشد که یک مکانیسم مهمی برای محافظت عصبی رزوراترول در مراحل اولیه آسیب ایسکمی می‌باشد [۲۶].

غیرفعال شدن کانال‌های پتاسیمی دخیل در فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل می‌تواند سبب تغییر الگوی پتانسیل عمل شود[۱]. در نورون های مختلف این جریان‌های پتاسیمی شامل پتاسیمی تأخیری یکسوساز و غیرفعال شونده سریع هستند. در سلول‌های هیپوکمپ پیشنهاد شده جریان پتاسیمی گذرا (IA) مسئول رپلاریزاسیون اسپایک است بنابراین غیرفعال شدن آن می‌تواند سبب تغییر در ثابت زمانی فاز بالارو و ثابت زمانی فاز پایین رو در اثر استفاده از رزوراترول شود [۲۲]. رزوراترول کانال های پتاسیمی Delayed rectifier (Ik_{dr}) و کانال های پتاسیمی سریع (IA) را در نورون‌های هرمی هیپوکامپ مهار می‌کند[۶]. بنابراین رزوراترول از طریق مهار جریانات پتاسیم فعال شده با ولتاژ ممکن است اثرات خود را اعمال کند [۶]. بنابراین رزوراترول از طریق تغییر در پتانسیل استراحت غشاء و افزایش دامنه AHP می‌تواند تحریک پذیری نورن های را کاهش دهد.

مطالعاتی نشان داده است که رزوراترول می‌تواند روی سیستم گلوتامینرژیک اثر گذاشته و از این طریق فعالیت نورون ها را تغییر دهد. در این راستا Li و همکاران نشان دادند که رزوراترول شلیک‌های عصبی خودبه خودی و رها شدن گلوتامات را که در شرایط ایسکمی در نورون های CA1 هیپوکمپ رخ می‌دهد را مهار می‌کند، که نشان می‌دهد رزوراترول می‌تواند اثرات مهاری بر روی فعالیت نورون ها داشته باشد [۱۵، ۱۶]. همچنین رزوراترول رسپتورهای گلوتامات پس سیناپسی را مهار می‌کند. رسپتورهای کاینات و NMDA نسبت به AMPA حساسیت بیشتری به رزوراترول دارند. بنابراین این ماده انتقال سیناپسی تحریکی را از طریق مهار رسپتورهای گلوتاماتی پس سیناپسی مهار می‌کند [۲۲].

کلسیم یک پیامبر ثانویه است که نقش مهمی در تنظیم تحریک پذیری نورونی دارد و یا به طور مستقیم از طریق دپلاریزاسیون غشا و یا غیرمستقیم از طریق تغییر در آستانه شلیک پتانسیل عمل و یا تغییر در فرکانس شلیک پتانسیل عمل می‌تواند روی تحریک پذیری نورونی اثر بگذارد. مطالعاتی نشان داده‌اند که رزوراترول می‌تواند روی فعالیت کانال های کلسیمی و سدیمی اثر گذارد و از این طریق می‌تواند روی ویژگی های ثابت زمانی فاز بالارو و ثابت زمانی فاز پایین اثر داشته باشد [۵، ۲۰، ۲۲، ۲۷]. Chang و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که رزوراترول در کورتکس مغز رها شدن گلوتامات را به میزان زیادی کاهش می‌دهد که این اثر به دلیل کاهش فعالیت کانال وابسته به ولتاژ کلسیم و کاهش فعالیت MAPK می‌باشد [۲].

رزوراترول می‌تواند جریانات کانال های سدیمی را در نورون های گانگلیون شاخ پشتی نخاع مهار می‌کند [۲]. علاوه براین مطالعاتی نشان داده است که این ماده به طور قابل توجهی می‌تواند تخلیه نورون‌ها را که در شرایط صرعی ایجاد می‌شود کاهش دهد و از افزایش تخلیه نورونها ناشی از Bay K8644، فعال کننده کانال کلسیمی وابسته به ولتاژ، جلوگیری کند که بنظر می رسد این اثرات از طریق مهار کانال های کلسیمی نوع L دریچه دار ولتاژی صورت می‌گیرد [۱۷].

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016

علاوه براین رزوراترول سبب مهار جریانات کلسیمی نوع L در میوسیت های عروق می‌شود [۱۸، ۲۶].

این یافته ها نشان می‌دهد که رزوراترول می‌تواند با تغییر ویژگی های الکتروفیزیولوژیک و با اعمال اثرات مهاری تحریک پذیری نورون های هرمی CA1 هیپوکمپ را کاهش دهد. بنابراین، با توجه به نتایج حاضر بنظر می رسد که این ماده می‌تواند در بیماری‌های مغزی که فعالیت نورون ها به میزان زیادی افزایش می‌یابد به عنوان یک ماده محافظت کننده عصبی که از تحریک بیش از حد نورون ها جلوگیری می‌کند مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

هزینه انجام تحقیق حاضر توسط مرکز تحقیقات علوم اعصاب و معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی تأمین گردیده است و بخشی از پایان نامه دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی می‌باشد. محل انجام تحقیق مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

References

[1] Bean BP, The action potential in mammalian central neurons. ***Nat Rev Neurosci*** 8 (2007) 451-465.

[2] Chang Y, Wang SJ, Inhibitory effect of glutamate release from rat cerebrocortical nerve terminals by resveratrol. ***Neurochem Int*** 54 (2009) 135–141.

[3] De Almeida LM, Pineiro CC, Leite MC, Brolese G, Tramontina F, Feoli AM, Gottfried C, Goncalves CA, Resveratrol Increases Glutamate Uptake, Glutathione Content, and S100B ecretion in Cortical Astrocyte Cultures. ***Cell Mol Neurobiol*** 27 (2007) 661–668.

[4] Della-Morte DK, DeFazio A, Bao YC, Raval AP, Resveratrol Pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a SIRT1 – UCP2 pathway. ***Neuroscience*** 159 (2009) 993–1002.

[5] Faber ES, Sah P, Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. ***J Neurosci*** 22 (2002) 1618-1628.

[6] Gao ZB, Hu GY, Trans-resveratrol, a red wine ingredient, inhibits voltage-activated potassium currents in rat hippocampal neurons. ***Brain Res*** 1056 (2005) 68–75.

[7] Gao ZB, Chen XQ, Hu GY, Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. ***Brain Res*** 1111 (2006) 41-47.

[8] Gong QH, Feng J, Resveratrol Attenuate Neuroinflamation-mediated Cognitive Deficits in rats. ***J Health Sci*** 56 (2010) 655-663.

[9] Granados-Soto V, Argüelles CF, Ortiz MI, The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. ***Neuropharmacology*** 43 (2002) 917-923.

[10] Harada N, Zhao J, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K, Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. ***J Nutr Biochem*** 22 (2011) 1150-1159.

[11] Hsieh TC, Uptake of resveratrol and role of resveratrol-targeting protein, quinone reductase 2, in normally cultured human prostate cells. ***Asian J Androl*** 11 (2009) 653-661.

[12] Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE, Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's diseas. ***Neurochem Int*** 54 (2009) 111-118.

[13] Kim HI, Kim TH, Song JH, Resveratrol inhibits Na+ currents in rat dorsal root ganglion neurons. ***Brain Res*** 1045 (2005) 134-141.

[14] Kim HJ, Lee KW, Lee HJ, Protective effects of piceatannol against beta-amyloid-induced neuronal cell death. ***Ann N Y Acad Sci*** 1095 (2007) 473–482.

[15] Li C, Yan Z, Yang J, Chen H, Li H, Jiang Y, Zhang Z, Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. ***Neurochem Int*** 56 (2010) 495-500.

[16] Li HF, Chen SA, Wu SN, Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on $Ca2^{+}$ –activated K current in vascular endothelial cells.***Cardiovasc Res*** 45 (2000)

Downloaded from phypha.ir at 16:41 IRST on Monday December 5th 2016

1035-1045.

[17] Li M, Wang QS, Chen Y, Wang ZM, Liu Z, Guo SM, Resveratrol inhibits neuronal discharges in rat hippocampal CA1 area. ***Acta Physiol Sin*** 57 (2005) 355–360.

[18] Liew R, Stagg MA, MacLeod KT, Collins P, The red wine polyphenol, resveratrol, exerts acute direct actions on guinea-pig ventricular myocytes. ***Eur J Pharmacol*** 519 (2005) 1-8.

[19] Pervaiz S, Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. ***FASEB J*** (2003) 1975-1985.

[20] Qian C, Ma J, Zhang P, Luo A, Wang C, Ren Z, Kong L, Zhang S, Wang X, Wu Y, Resveratrol attenuates the Na^{+} -dependent intracellular Ca^{2+} overload by inhibiting H2O2-induced increase in late sodium current in ventricular myocytes. ***PLoS One*** 7 (2012) e51358.

[21] Raval AP, Dave KR, Perez-Pinzon MA, Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 26 (2006) 1141-1147.

[22] Storm JF, Intracellular injection of a $Ca2^{+}$ chelator inhibits spike repolarization in hippocampal neurons. ***Brain Res Rev*** 435 (1987) 387-392.

[23] Vieira de Almeida LM, Pineiro CC, Leite MC, Brolese G, Leal RB, Gottfried C, Goncalves CA, Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. ***Neurochem Res*** 33 (2008) 8-15.

[24] Wang YS, Simonyi A, Rottinghaus G, Sun GY, Sun AY, Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. ***Neurochem Res*** 29 (2004) 2105–2112.

[25] Wu Z, Xu Q, Zhang L, Kong D, Ma R, Wang L, Protective effect of resveratrol against kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. ***Neurochem*** 34 (2009) 1393-400.

[26] Zhang H, Schools GP, Lei T, Wang W, Kimelberg HK, Zhou M, Resveratrol attenuates early pyramidal neuron excitability impairment and death in acute rat hippocampal slices caused by oxygen-glucose deprivation. ***Exp Neurol*** 212 (2008) 44-52.

[27] Zhang LP, Yin JX, Liu Z, Zhang Y, Wang QS, Zhao J, Effect of resveratrol on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. ***Acta Pharmacol Sin*** 27 (2006) 179-183.

[28] Zhou H, Chen Q, Kong DL, Guo J, Wang Q, Yu SY, Effect of Resveratrol on Gliotransmitter Levels and p38 Activities in Cultured Astrocytes. ***Neurochem Res*** 36 (2011) 17-26.