Neuroprotective Effects of Stiripentol on Oxygen-Glucose Deprivation in Primary Culture of Fetal Mice Cortical Neurons

Noorolhoda Fotovat Eskandari[1], Gelareh Vahabzadeh[1, 3*], Fereshteh Golab[1], Fariba Karimzadeh[2], Parvaneh Rahimi-Moghadam[3], Somayyeh Nasiripour[4], Robabeh Shabani[1]

[1]Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran
[3]Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Department of Clinical Pharmacy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Info:
Received: 10 Apr 2016 *Accepted*: 20 Oct 2016

ABSTRACT

Introduction: Excessive activation of NMDA receptors in ischemic injury as well as reduction of GABAergic system leads to discrepancies of ionic homeostasis and neuronal death. The aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of stiripentol (0.01, 0.1, 1, 5, 10, 30 µM) as a GABAA receptor agonist on primary cortical culture of mice on 4 h oxygen–glucose deprivation (OGD). ***Materials and Methods:*** After 24h of incubation of neuronal cells with stiripentol, the cells were transferred to glucose–free DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) and were exposed to 4h hypoxia in a small anaerobic chamber and incubated in standard condition for 24h. Cell viability was evaluated by MTT assay. ***Results:*** The results showed that different concentrations of stiripentol could increase the cell viability after 4h OGD Recovery (OGD/R). However, the protective effect of stiripentol was lower than the control group (the cells did not expose to OGD/R). ***Conclusion:*** Our results indicated that stiripentol could be a potential drug for treatment of brain ischemic condition. However, additional studies are needed to evaluate the mechanims of strripentol effect.

Key words:

1. gamma-Aminobutyric Acid
2. Ischemia
3. Mice

Corresponding Author: Gelareh Vahabzadeh
E-mail: *Gelareh.Vahabzadeh@gmail.com*
doi: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-10-06]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10]

اثرات محافظت نورونی استیریپنتول در برابر محرومیت از اکسیژن -گلوکز در کشت اولیهٔ نورون‌های قشری جنین موش سوری

نورالهدی فتوت اسکندری[۱]، گلاره وهاب زاده[۳،۱*]، فرشته گلاب[۱]، فریبا کریم زاده[۲]، پروانه رحیمی مقدم[۳]، سمیه نصیری پور[۴]، ربابه شعبانی[۱]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

[۲]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران

[۳]گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

[۴]گروه داروسازی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۲ فروردین ۱۳۹۵
تاریخ پذیرش: ۲۹ مهر ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: فعالیت بیش از حد گیرنده‌های NMDA در آسیب ایسکمی و همچنین کاهش سیستم گابا منجر به اختلاف هموستاز یونی و مرگ نورونی می‌شود. هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف استیریپنتول (۳۰، ۱۰، ۵، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ میکرومولار) به‌عنوان یک آگونیست گیرندهٔ گابا A بر کشت اولیهٔ قشر موش سوری در ۴ ساعت محرومیت از اکسیژن –گلوکز بود. **مواد و روش‌ها:** بعد از ۲۴ ساعت از انکوباسیون سلول‌های نورونی با استیریپنتول، سلول‌ها به DMEM فاقد گلوکز منتقل شدند و برای ۴ ساعت در یک جار بی هوازی کوچک بدون اکسیژن قرار گرفتند و به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شدند. زنده ماندن سلول با روش MTT ارزیابی شد. **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف استیریپنتول پس از ۴ ساعت بهبود محرومیت از اکسیژن –گلوکز می‌تواند زنده ماندن سلول را افزایش دهد. با این حال اثر حفاظتی استیریپنتول کمتر از گروه کنترل (سلول‌ها در معرض بهبود محرومیت از اکسیژن –گلوکز قرار نداشتند) بود. **نتیجه‌گیری:** نتایج ما نشان داد که استیریپنتول می‌تواند یک داروی بالقوه برای درمان شرایط ایسکمی مغز باشد. با این حال مطالعات بیشتری برای ارزیابی مکانیسم‌های اثر استیریپنتول مورد نیاز است.

کلید واژه‌ها:
۱. گاما آمینو بوتریک اسید
۲. ایسکمی
۳. موش

* **نویسنده مسئول:** گلاره وهاب زاده
آدرس الکترونیکی: *Gelareh.Vahabzadeh@gmail.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-10-06]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10]

مقدمه

اکسیژن و گلوکز دو عامل ضروری جهت تأمین انرژی مورد نیاز در مغز می‌باشند و بنابراین کاهش در هر یک از این مواد منجر به ایجاد آسیب‌های عملکردی و ساختاری در مغز از جمله هیپوکسی، هیپوگلایسمی و ایسکمی می‌شود (۱، ۲). این کمبود اکسیژن و گلوکز حاصل از ایسکمی باعث جلوگیری از باز جذب مجدد و افزایش رهاسازی گلوتامات از سلول گشته که نتیجهٔ این پیامد، تجمع وسیعی از گلوتامات در فضای خارج سلولی است. افزایش گلوتامات در فضای خارج سلولی، باعث فعال شدن بیش از حد گیرنده‌های گلوتامات مانند NMDA[1] شده که به دپلاریزاسیون سلول و در پی آن ورود یون کلسیم به سلول و در نهایت به مرگ سلولی منجر می‌شوند (۳، ۴). از طرفی در دیگر آزمایشات نشان داده شده است که مهار انتقال سیناپسی ناقل عصبی گابا نیز هم در قسمت نورون‌های پیش سیناپسی و هم در نورون‌های پس سیناپسی، موجب افزایش فعالیت تحریکی در طول ایسکمی مغزی می‌شود (۵).

بر طبق آزمایشات انجام شده مشخص شده است که در حالت عادی، هماهنگی دقیقی بین سیگنال‌های تحریکی و مهاری حاصل از گیرنده‌های آیونوتروپیک در مغز وجود دارد که باعث ایجاد یک ارتباط مؤثر در بین نورون‌ها می‌شود. از بین این گیرنده‌ها می‌توان گیرنده‌های گلوتامات و گابای A را نام برد که به ترتیب باعث انتقال ناقل عصبی تحریکی و مهاری می‌شوند (۶). بنابراین تعادل بین این سیگنال‌ها می‌تواند باعث ارتباط صحیحی در عملکرد بین سیناپس‌ها گردد. با این وجود، تحت شرایط ایسکمی و یا دیگر بیماری‌های مختلف عصبی و روانی این تعادل به هم خورده و منجر به مرگ سلول‌های عصبی می‌شود. اگر چه در طی این تغییرات نقش گیرنده‌های گلوتامات به خوبی مشخص شده است اما هنوز نقش گیرنده‌های گابا کاملاً بیان نگردیده است (۵، ۶).

در حال حاضر طیف گسترده‌ای از داروهای ضد صرع در دسترس می‌باشد. این داروها با مکانیسم‌های متفاوت و اثر بخشی بالینی ویژهٔ خود در انواع مختلف صرع به کار می‌روند. استیریپنتول از جمله داروهای ضد تشنج می‌باشد که جهت درمان بیماری صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد و باعث افزایش انتقال گابا می‌شود. به طوری که مشخص شده است غلظت‌های بالینی استیریپنتول در سیستم عصبی مرکزی می‌تواند موجب افزایش انتقال گابا و افزایش ورود یون کلر به داخل سلول گشته و از طرفی باعث افزایش طول زمان باز نگه داشتن کانال کلر در گیرندهٔ گابای A شود (۷). استیریپنتول در مدل‌های مختلف حیوانی توانسته است اثرات ضد صرعی خوبی از خود نشان دهد به طوری که در تشنج ناشی از پنتیلن تترازول و تا حدی تشنج ناشی از تحریک الکتریکی اثرات حفاظتی معنی‌داری داشته است (۸، ۹).

در طول ایسکمی فقدان اکسیژن و گلوکز دو رکن اصلی در آسیب سلولی ایجاد شده می‌باشد. بنابراین ایسکمی می‌تواند به‌عنوان یک مدل آزمایشی در محیط in-vitro با کاهش اکسیژن و گلوکز در محیط سلولی و به دنبال آن بازگرداندن سلول به حالت طبیعی ایجاد شود که اصطلاحاً به این مدل (OGD/R)[3] و یا محرومیت از اکسیژن و گلوکز می‌گویند (۱۰). بنابراین با توجه به اینکه استیریپنتول در حال حاضر به‌عنوان یک داروی کمکی در درمان بیماری صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد و از طرفی مکانیسم اثر آن از طریق گیرندهٔ گابای A می‌باشد، بنابراین هدف ما در این تحقیق بررسی اثرات استیریپنتول روی ایسکمی ایجاد شدهٔ حاصل از محرومیت اکسیژن و گلوکز در کشت اولیهٔ مغز جنین موش سوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ کشت اولیهٔ نورونی از قشر مغز جنین موش سوری

در این روش از قشر مغز جنین موش سوری ۱۸-۱۵ روزه استفاده شد. موش سوری باردار در طی روزهای ۱۸-۱۵ از بارداری، توسط کلروفرم بیهوش و نخاعی شد و جنین‌ها از رحم مادر جدا و در محیط کشت استریل قرار داده شد. در زیر هود آزمایشگاهی، جنین‌ها به یک پتری دیش حاوی محیط کشت بدون سرم منتقل شدند و سر آن‌ها از بدن جدا شد. با ثابت نگه داشتن سر جنین‌ها توسط پنس میکروسرجری و زیر میکروسکوپ لوپ، لایه‌های پردهٔ روی مغز جنین یکی یکی برداشته و قشر مغز آن‌ها جدا و به داخل یک پتری دیش حاوی محیط کشت همراه با سرم انتقال داده شد. بعد از جدا کردن قشر مغز جنین‌ها به کمک یک پنس استریل، آن‌ها را به آرامی از هم جدا کرده و سپس با پیپت پاستور به خوبی پیپتاژ کردیم تا یک سوسپانسیون سلولی به دست آمد. این سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰rpm سانتریفوژ شد و با استفاده از هموسیتومتر نئوبار اصلاح شده شمارش سلولی انجام و تعداد سلول‌های نمونهٔ سلولی محاسبه گردید (۱۲-۱۰).

سوسپانسیونی که در هر میلی‌لیتر آن $۱۰^۴ \times ۱۰$ سلول تهیه شد. این سوسپانسیون سلولی تهیه شده با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتر به درون چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه‌ای پوشانده شده با پلی الایزین (به‌عنوان بستر نورونی) اضافه شد. یک خانه از چاهک ۱۲

[1] N-methyl-D-aspartate
[2] Neurotransmitter
[3] Oxygen glucose deprivation/ recovery

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-10-06]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10]

خانه‌ای را بدون سلول (به‌عنوان Blank) و فقط حاوی محیط کشت نگه داشته شد. پلیت‌های تهیه شده را در انکوباتور حاوی دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد، ۵٪ دی اکسید کربن و ۹۵٪ اکسیژن قرار گرفت و پس از یک هفته محیط سلولی تعویض شد. در طول هفتهٔ دوم نیز محیط کشت نورون‌ها سه بار تعویض گردید. البته لازم به ذکر است که ۴۸ ساعت بعد از کشت سلولی، جهت مهار سلول‌های غیر نورونی، از سیتوزین آرابینوفورانوزید[4] (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خریداری شده از شرکت سیگما استفاده گردید و به مدت ۳ روز در معرض سلول‌ها قرار داده شدند. حدوداً ۱۴ روز بعد از روز کشت اولیه، نورون‌ها قابل استفاده برای آزمایش می‌شوند.

بعد از گذشتن ۱۴ روز از کشت سلولی، جهت بررسی اثرات استیریپنتول در شرایط عادی (بدون محرومیت از اکسیژن و گلوکز) بر روی قشر مغز جنین موش سوری، نورون‌ها در معرض غلظت‌های مختلف استیریپنتول (μM ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۳۰) در مقایسه با نورون‌های بدون داروی استیریپنتول (گروه کنترل بیرون) قرار گرفته‌اند. بنابراین در این آزمایش از ۶ غلظت دارویی استیریپنتول و یک گروه کنترل استفاده گردید. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از مجاور ساختن دارو با نورون‌ها، میزان زنده ماندن سلول‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

جهت تهیهٔ غلظت‌های مختلف استیریپنتول، ابتدا استوک مورد نظر ساخته می‌شود. جهت تهیهٔ استوک اولیه ۰/۰۰۱۱۷ گرم از پودر استریپنتول را در ۵ سی‌سی DMSO حل کرده سپس از استوک به دست آمده غلظت‌های مورد نظر ساخته می‌شود. لازم به ذکر می‌باشد که هر کدام از آزمایشات انجام شده در غلظت‌های مختلف داروی استیریپنتول حداقل ۴ بار تکرار شده است.

ایجاد مدل ایسکمی در محیط in vitro

در سال ۱۹۹۳ Goldberg و Choi نشان دادند که با قرار دادن سلول‌های کشت قشر مغز جنین موش در برابر OGD، مرگ سلولی ایجاد شده خصوصیاتی مشابه با مرگ نورونی وابسته به ایسکمی مغزی دارد (۱۱). بنابراین این مدل به‌عنوان یک مدل مناسب می‌تواند برای کشف مکانیسم‌های سلولی ایجاد شده با ایسکمی مورد استفاده قرار بگیرد. برای انجام OGD/R از روش فرانتیسوا استفاده شد (۱۳).

به این صورت که بعد از ۱۴ روز از گذشتن کشت سلولی، جهت بررسی اثرات داروی استیریپنتول بر روی قشر مغز جنین موش سوری در طی شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز، نورون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف استیریپنتول (μM ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵) قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محیط قبلی کشت مورد نظر را عوض کرده و محیط کشت DMEM فاقد گلوکز را به همراه غلظت‌های مختلف استیریپنتول (μM ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵) در مجاورت نورون‌ها قرار داده و بعد از آن سلول‌ها در مجاورت ۴ ساعت جار بی هوازی بدون اکسیژن قرار می‌گیرند. جهت ایجاد محیط بی هوازی از یک مخزن که توسط یک لوله به یک کپسول حاوی مخلوط گازهای ۹۵٪ N2 و ۵٪ Co2 متصل است استفاده می‌شود. این مخزن را در داخل حمام آب ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده سپس پلیت مورد نظر را درون آن گذاشته و درب آن به طور کامل بسته می‌شود، اکسیژن درون مخزن را به طور کامل گرفته و لولهٔ متصل به کپسول حاوی گازها را به یکی از دو سر درب مخزن اتصال داده و شیر آن باز نگه داشته می‌شود. بعد از یک دقیقه شیر اول درب مخزن را بسته و شیر دوم را باز کرده تا گازهای اضافی از آن خارج شوند. بعد از یک دقیقه شیر دوم نیز بسته می‌شود و با توجه به برنامهٔ زمانی OGD مورد نظر، مخزن حاوی پلیت مورد نظر را در حالت سکون قرار می‌دهیم. پلیت‌ها در برنامهٔ زمانی ۴ ساعته تحت تأثیر شرایط بدون اکسیژن و گلوکز قرار داده می‌شوند و پس از گذشت زمان لازم دوباره محیط کشت سلول‌ها را به حالت عادی (محیط کشت حاوی گلوکز عادی) برگردانده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار دادیم. سپس میزان بقاء سلولی توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. جهت بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها در این شرایط علاوه بر ۴ گروه غلظت دارویی استیریپنتول (μM ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵) از دو گروه کنترل نیز استفاده می‌شود. یکی از گروه‌های کنترل شامل سلول‌های نورونی بدون دارو و بدون شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز (کنترل بیرون) می‌باشند و گروه کنترل دوم شامل سلول‌های بدون دارو ولی در معرض محرومیت از شرایط اکسیژن و گلوکز (کنترل درون) می‌باشند. از آنجایی که یکی از گیرنده‌های مهم در ایجاد ایسکمی سلولی، گیرندهٔ NMDA می‌باشد لذا در این آزمایش از آنتاگونیست این گیرنده به نام MK-801 جهت مقایسه نسبت به استیریپنتول استفاده گردید.

بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT

این آزمون اولین بار توسط Mosmann در سال ۱۹۸۳ مطرح شد و نشان داده شد که توسط MTT به‌عنوان یک روش آزمایشگاهی مناسب که مکانیسم آن بر اساس رنگ سنجی آن است، می‌توان میزان حیات سلولی را مشخص کرد (۱۴).

۲۴ ساعت بعد از شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز، محیط کشت سلول‌ها را دور ریخته و روی هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید اضافه کرده و پس از آن ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) روی آن ریخته و سه ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از

[4] Cytosine 1-β-D-arabinoforanoside

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-10-06]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10]

این مدت، کل محیط کشت خارج و به هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه تکان دادن پلیت‌ها با شیکر، جذب نوری فورمازان در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت آنالیز آماری داده‌ها و مقایسهٔ بین گروهی از واریانس یکطرفهٔ ANOVA و آزمون TUKEY و به وسیلهٔ نرم‌افزار SigmaPlot ویرایش ۱۲ انجام گرفت و نتایج حاصله به صورت (Mean ± SEM) گزارش شد. $P<0.05$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

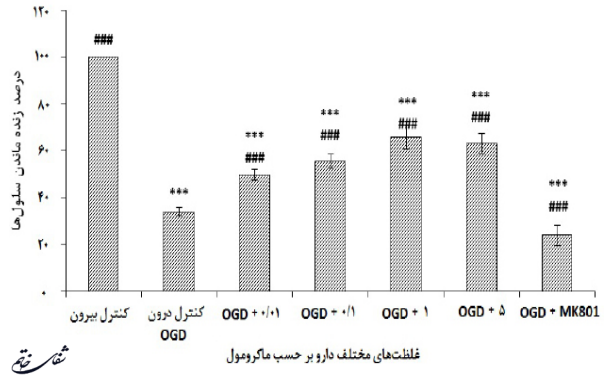
بررسی اثر محرومیت از اکسیژن و گلوکز روی کشت اولیهٔ قشر مغز جنین موش سوری

نمودار ۱ نشان دهندهٔ میزان زنده ماندن نورون‌های قشر مغز جنین موش سوری در شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز و مقایسهٔ آن با حالت عادی (بدون محرومیت از اکسیژن و گلوکز) می‌باشد (نمودار ۱). با توجه به نمودار مشخص شد که میزان بقاء سلولی در شرایط ۴ ساعت محرومیت از اکسیژن و گلوکز (۱/۸۵±۳۳/۹٪) به صورت معنی‌داری بسیار کمتر از گروه سلول‌های بدون محرومیت از اکسیژن و گلوکز می‌باشد.

نمودار ۱- بررسی میزان زنده ماندن نورون‌ها در دو گروه سلول‌های بدون محرومیت از اکسیژن و گلوکز و گروه سلول‌های مواجه شده با چهار ساعت محرومیت از اکسیژن و گلوکز. ***$P<0.001$ (به دست آمده در مقایسه با گروه سلول‌های بدون محرومیت از اکسیژن و گلوکز است).

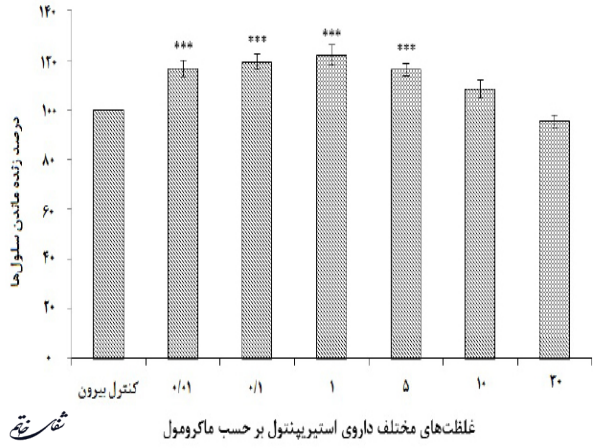
بررسی میزان زنده بودن کشت نورون‌های قشر مغز جنین موش سوری با داروی استیریپنتول

در نمودار ۲، میزان زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های مختلف استیریپنتول (۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۳۰ Mμ) در شرایط عادی (بدون محرومیت از اکسیژن و گلوکز) نسبت به گروه کنترل بیرون نشان داده شده است و همان‌گونه که مشاهده می‌شود داروی استیریپنتول دارای اثرات مرگ سلولی در حالت عادی (شرایط بدون محرومیت از اکسیژن و گلوکز) نمی‌باشد. (نمودار ۲). غلظت‌های دارویی استیریپتول (بر حسب ماکرومول) (۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۳۰ Mμ) روی قشر مغز جنین موش سوری در طی ۴ ساعت شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد (نمودار ۳). با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که اثرات حفاظتی غلظت‌های مختلف داروی استیریپنتول (بر حسب ماکرومول) (۰/۰۱، ۴۹/۴۸±۲/۴۱٪) ۱، (۰/۱، ۵۵/۳ ± ۳/۱٪) ۵ (۱، ۶۵/۷±۵/۰۵٪) و شرایط ۴ ساعت محرومیت از اکسیژن و گلوکز گروه کنترل درون (۱/۸۵ ±٪ ۳۳/۹) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بیرون (۱۰۰٪) کم شده است (نمودار ۳).



نمودار ۳- اثرات غلظت‌های مختلف داروی استیریپنتول در برابر ۴ ساعت ایسکمی در کشت اولیهٔ قشر مغز جنین موش سوری.
***$P<0.001$ (به دست آمده در مقایسه با گروه کنترل بیرون است) ###$P<0.001$ (به دست آمده در مقایسه با گروه کنترل درون است) کنترل بیرون نشان دهندهٔ نورون‌های بدون اضافه کردن دارو و بدون شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز می‌باشد. کنترل درون نشان دهندهٔ نورون‌های بدون اضافه کردن دارو ولی در معرض ۴ ساعت شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز می‌باشد.

(۱۱۶/۶±۳/۳۱٪) ۰/۰۱، (۱۱۹/۲±۳/۱۶٪) ۰/۱، (۴/۲۴ ±۱۲۱/۹۷٪) ۱، (۱۱۶/۰۱±۲/۴۵٪) ۵ توانسته‌اند به طور معنی‌داری باعث افزایش اثرات حفاظتی نسبت به کنترل بیرون شوند (*$P<0.001$).



نمودار ۲- اثرات غلظت‌های مختلف استیریپنتول در کشت اولیهٔ قشر مغز جنین موش سوری. ***$P<0.001$ (به دست آمده در مقایسه با گروه کنترل بیرون است) کنترل بیرون نشان دهندهٔ نورون‌های بدون اضافه کردن دارو و بدون شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز می‌باشد.

بررسی میزان زنده بودن کشت نورون‌های قشر مغز جنین موش سوری با داروی استیریپنتول در حالت شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-10-06]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10]

بحث و نتیجه‌گیری

ناقل عصبی گابا در سال ۱۹۵۰ در مغز شناخته شد و پس از آن در سال ۱۹۶۷ به‌عنوان یک ناقل عصبی مهاری اصلی در سیستم عصبی مرکزی معرفی گردید (۱۶، ۱۵). این ماده در حال حاضر به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیرنده‌های مهاری در مغز در درمان صرع بسیار مطرح می‌باشد (۱۵).

گیرنده‌های گابا دارای فعالیت‌های فیزیولوژیکی متعددی می‌باشد که از جملهٔ آن می‌توان صرع، اضطراب، خواب، حافظه، ترس، درد، اوتیسم و گرسنگی را نام برد (۱۶). گیرندهٔ گابا شامل سه نوع گیرندهٔ گابای A، گابای B وگابای C می‌باشد که دو گیرندهٔ گابای A و گابای B از نوع گیرنده‌های یونوتروپیک می‌باشند (۱۵). فعالسازی گیرنده‌های گابای A و گابای C که اغلب در انتهای پایانه‌های سیناپسی قرار دارند باعث مهار آزادسازی انتقال دهنده‌های عصبی مختلف از طریق عبور یون کلر از این گیرنده‌ها شده و منجر به بیشتر منفی‌تر شدن پتانسیل غشاء سلول و جلوگیری از پتانسیل عمل می‌شود (۱۶، ۶).

در طی آسیب ایسکمی ایجاد شده در مغز، فعالیت بین نورون‌ها دچار اختلال شده و تعادل بین ناقلین عصبی گلوتامینرژیک و گاباارژیک به هم خورده و به ترتیب منجر به افزایش و کاهش آن‌ها در مغز می‌شود (۱۷). در برش‌های هیپوکامپ موش صحرایی که دچار ایسکمی شده‌اند نشان داده شده است که در طی ساعت‌های اولیه بعد از ایسکمی، ناقل عصبی گابا از طریق اگزوسیتوز رها می‌شود اما در طی زمان‌های طولانی‌تر این ناقل عصبی قادر به آزاد شدن در پایانه‌های عصبی نمی‌باشد و دلیل آن برعکس شدن مکانیسم ترانسپورتر ناقل عصبی گابا در غشای پلاسمایی می‌باشد (۱۷). در آزمایشی که توسط اوربان و همکاران در سال ۱۹۸۹ و گائو در سال ۱۹۹۹ انجام گردید نشان داده شد که ۱۲ ساعت بعد از ایسکمی در هیپوکامپ (دورهٔ ریپرفیوژن)، کاهش فعالیت مهاری گابا ارتباط معنی‌داری با هایپراکسایتوتوکسیستی در سلول‌های عصبی داشته و همین امر منجر به آسیب نورون‌ها می‌شود (۱۹، ۱۸).

در بسیاری از مدل‌های ایسکمی ایجاد شده در محیط in vitro و in vivo نشان داده شده است که فعالیت گیرنده‌های گابا می‌توانند نقش بسزایی در حفاظت نورونی داشته باشد (۲۰). با توجه به تحقیقات به دست آمده مشخص شده است که گیرنده‌های گابا از دو طریق می‌توانند باعث کاهش مرگ سلولی در شرایط ایسکمیک شوند. یکی از مکانیسم‌های ذکر شده در مطالعات، فعالیت ناقل عصبی گاباارژیک می‌باشد که می‌تواند باعث تعدیل فعالیت ناقل عصبی گلوتامینرژیک شود و در واقع در شرایط الکتروشیمیایی فعالیت گیرندهٔ گابای A باعث مهار گیرنده‌های NMDA می‌شود. از طرف دیگر فعالیت گیرنده‌های گابا به طور مستقیم باعث کاهش اثرات پاتولوژیک در شرایط ایسکمیک در مراحل دیگر می‌شود (۲۰). به‌عنوان مثال در یکی از تحقیقات نشان داده شد که دیازپام به‌عنوان آگونیست گیرندهٔ گابا، توانست باعث مقابله با کاهش ATP و جلوگیری از آزاد شدن سیتوکروم c در هیپوکامپ موش صحرایی در شرایط OGD شود (۲۱).

در بسیاری از مطالعات، نقش اثرات حفاظتی آگونیست‌های گیرنده‌های گابای A همانند بنزودیازپین‌ها و باربی تورات‌ها روی مغز مشخص شده است (۲۲). بر طبق تحقیقات انجام شده بر روی حیوانات مختلف (موش صحرایی، موش سوری، خوکچهٔ هندی و خرگوش)، نقش داروهای گاباارژیک با مکانیسم‌های مختلف (آگونیست‌های گابا، مدولاتورهای گابا، مهارکننده‌های ترانسپورتر گابا) در حفاظت نورونی به دنبال ایسکمی مغزی مشخص شده است (۲۳). در مطالعه‌ایی که توسط رکلینگ و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که داروهای ضد صرع کلاسیک همانند فنوباربیتال، فنی توئین، اتوسوکسیماید، کلردیازپکساید و میدازولام به طور معنی‌دار و وابسته به غلظت توانستند باعث کاهش مرگ سلولی ایجاد شده در شرایط یک ساعت OGD در کشت هیپوکامپ شوند. همچنین آن‌ها نشان دادند که داروهای ضد صرع جدیدتر همانند کاربامازپین، فلبامات، لاموتریژین و تیاگابین نیز اثرات حفاظتی در حضور یک ساعت OGD در کشت هیپوکامپ را دارند (۲۴).

استیریپنتول به‌عنوان یک داروی ضد صرع جدید در کنترل بسیاری از تشنج‌ها و به‌خصوص در سندرم داروت[5]، که شکلی نادر و مقاوم به درمان از صرع کودکان می‌باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۵). اولین بار در سال ۲۰۰۶ اثرات این دارو بر روی گیرنده‌های گابای A توسط کویلیچینی و همکاران مشخص گردید. آن‌ها نشان دادند که استیریپنتول قادر است باعث افزایش زمان باز ماندن کانال‌های فعال گیرنده‌های گابای A شود (۷). در مطالعاتی که بر روی این دارو صورت گرفته نشان داده شده است که استیریپنتول می‌تواند باعث مهار انواع آنزیم‌های کبدی cytochrome P450، از جمله CYP1A2، CYP3A4 وCYP2C19 شود و از این طریق باعث افزایش غلظت خونی بعضی از داروهای ضد صرع از جمله والپروات، فنوباربیتال، فنی توئین و کاربامازپین می‌شود. اما از طرف دیگر نشان داده شده است که استیریپنتول به تنهایی نیز می‌تواند باعث ایجاد اثرات ضد صرعی از طریق افزایش زمان باز ماندن کانال کلر واقع در گیرنده‌های گابای A شود (۲۵).
همان‌گونه که در این مطالعه مشاهده شد غلظت‌های مختلف استیریپنتول اثرات سمی بر روی کشت قشر مغز جنین موش سوری در حالت عادی و بدون در معرض قرار

[5] Dravet syndrome

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-10-06]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10]

دادن ایسکمی ندارند. بنابراین این دارو باعث کاهش بقاء سلولی روی قشر مغز جنین موش سوری نشده است. گرچه این اثرات وابسته به دوز نمی‌باشد. در آزمایش بعدی اثرات غلظت‌های مختلف استیریپنتول در مجاورت ۴ ساعت ایسکمی مورد بررسی قرار گرفته است.

همان‌گونه که در نمودار ۳ مشاهده شد اثرات حفاظتی غلظت‌های مختلف استیریپنتول و گروه OGD نسبت به گروه کنترل بیرون کاهش پیدا کرده است. اما غلظت‌های مختلف این دارو در حضور ۴ ساعت شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز توانسته است باعث افزایش اثرات حفاظتی نورون‌ها نسبت به نورون‌های مجاور داده شده با شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز شود. بهترین اثر حفاظتی استیریپنتول در غلظت‌های ۱ و ۵ ماکرومولار بوده است که به ترتیب توانسته‌اند باعث افزایش درصد زنده ماندن نورون‌ها به ۶۵/۷٪ و ۶۲/۸٪ نسبت به گروه کنترل درون ۳۳/۹۱٪ (سلول‌های محروم از گلوکز و اکسیژن) شوند. بنابراین با توجه به این آزمایش می‌توان نقش حفاظتی استیریپنتول به‌عنوان یک آگونیست گیرندهٔ گابای A در طی روند ایسکمی را تا حدودی مشخص نمود. این در حالی است که آنتاگونیست گیرندهٔ NMDA، MK801، در طول ۴ ساعت شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز نتوانسته است اثرات حفاظتی از خود نشان دهد و میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها در این شرایط به ۲۳/۸۴٪ رسیده است و این موضوع نشان دهندهٔ این می‌باشد که هر چقدر طول زمان ایسکمی بیشتر باشد نقش گیرنده‌های NMDA در بقاء سلولی کمتر می‌شود و از طرفی نقش گیرنده‌های دیگر که اثرشان تعدیل در کاهش فعالیت گیرنده‌های NMDA است بیشتر می‌شود (۱۰).

تحقیقات دیگر نیز نقش داروهای گاباارژیک در حفاظت سلولی به دنبال ایسکمی را بیان نموده‌اند. به طور مثال در تحقیقی که توسط اگورا و همکاران بر روی داروی JM-1232 (آگونیست گیرندهٔ $GABA_A$) بر روی نورون‌های هیپوکامپ در موش صحرایی تحت شرایط OGD انجام گرفت نشان داده شد که این دارو می‌تواند باعث کاهش مرگ سلولی نورون‌ها و کاهش غلظت کلسیم درون سلولی در این شرایط شود. این در حالی است که با اضافه کردن فلومازنیل (آنتاگونیست گیرندهٔ بنزودیازپین) از کاهش مرگ سلولی JM-1232 کاسته شد (۲۶).

در مطالعهٔ دیگری که توسط زنگ و همکاران انجام گرفت نقش آگونیست‌های گیرنده‌های گابا در ایسکمی ایجاد شده در محیط آزمایشگاهی و حیوانی نشان داده شد. در این آزمایش در طول ایسکمی، فعالیت گیرنده‌های گابا با استفادهٔ توأم از آگونیست‌های آن (باکلوفن وموسیمول) موجب اثرات حفاظتی در سلول گردید. در طی این تحقیق نشان داده شد که اثرات این آگونیست‌ها باعث کاهش در تنظیم عملکرد گیرنده‌های NMDA از طریق کاهش فسفریله کردن تیروزین ساب یونیت NR2A می‌باشد (۲۷). در مطالعهٔ دیگری مشخص گردید که به دنبال ایسکمی‌های ایجاد شده در شرایط iv vivo به نظر می‌رسد قابل توجه‌ترین موضوع در اختلال عملکرد گیرنده‌های گابای A، کاهش ورود یون کلراید به داخل سلول، کاهش پتانسیل پس سیناپسی مهاری با واسطهٔ گیرنده و همچنین کاهش بیان این گیرنده‌ها در سطح سلول می‌باشد (۶). در این آزمایش که توسط میلک و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که در کشت نورون‌های هیپوکامپ مجاور داده شده با OGD، سطح گیرنده‌های گابای A روی سطح سلولی کاهش یافته است و همین امر موجب افزایش مرگ سلولی می‌شود. آن‌ها نشان دادند که این کاهش سطح گیرنده‌های گابای A توسط انسولین در طول یک ساعت OGD کاهش می‌یابد و باعث افزایش زنده ماندن نورون‌ها در این شرایط می‌شود (۶).

با توجه به آزمایشات انجام شده در این مطالعه می‌توان پیشنهاد کرد استیریپنتول به‌عنوان یک داروی ضد صرع می‌تواند باعث کاهش آسیب اثرات به وجود آمدهٔ حاصل از ایسکمی شود و ممکن است این اثرات از طریق گیرندهٔ گابای A ایجاد شود. هر چند باید تحقیقات گسترده‌تری بر روی این دارو و مکانیسم اثر آن روی حیوانات ایسکمی داده شده انجام شود.

منابع

1. Tian GF, Baker AJ. Protective effect of high glucose against ischemia-induced synaptic transmission damage in rat hippocampal slices. J Neurophysiol. 2002; 88(1): 236-48.

2. Vahabzadeh G, Ebrahimi S-A, Rahbar-Roshandel N, Mahmoudian MM. The effect of noscapine on oxygen-glucose deprivation on primary murine cortical neurons in high glucose condition. Iran J Pharm Res. 2016; 15(2): 501-12.

3. Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. Neurol Clin. 2006; 24(1): 1-21.

4. Dennis SH, Jaafari N, Cimarosti H, Hanley JG, Henley JM, Mellor JR. Oxygen/glucose deprivation induces a reduction in synaptic AMPA receptors on hippocampal CA3 neurons mediated by mGluR1 and adenosine A3 receptors. J Neurosci. 2011; 31(33): 11941-52.

5. Mele M, Aspromonte MC, Duarte CB. Downregulation of GABAA receptor recycling mediated by HAP1 contributes to neuronal death in in vitro brain ischemia. Mol Neurobiol. 2016: 1-13.

6. Mielke JG, Wang YT. Insulin exerts neuroprotection by counteracting the decrease in cell-surface GABAA receptors following oxygen–glucose deprivation in

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-10-06]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10]

cultured cortical neurons. J Neurochem. 2005; 92(1): 103-13.

7. Quilichini PP, Chiron C, Ben-Ari Y, Gozlan H. Stiripentol, a putative antiepileptic drug, enhances the duration of opening of GABAA-receptor channels. Epilepsia. 2006; 47(4): 704-16.

8. Poisson M, Huguet F, Savattier A, Bakri-Logeais F, Narcisse G. A new type of anticonvulsant, stiripentol. pharmacological profile and neurochemical study. Arzneimittel-Forsch. 1984; 34(2): 199-204.

9. Shen DD, Levy R, Moor MJ, Savitch JL. Efficacy of stiripentol in the intravenous pentylenetetrazol infusion seizure model in the rat. Epilepsy Res. 1990; 7(1): 40-8.

10. Vahabzadeh G, Rahbar-Roshandel N, Ebrahimi S-A, Mahmoudian M. Neuroprotective effect of noscapine on cerebral oxygen–glucose deprivation injury. Pharmacol Rep. 2015; 67(2): 281-8.

11. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. J Neurosci. 1993; 13(8): 3510-24.

12. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci. 1991; 88(14): 6368-71.

13. Frantseva MV, Carlen PL, El-Beheiry H. A submersion method to induce hypoxic damage in organotypic hippocampal cultures. J Neurosci Meth. 1999; 89(1): 25-31.

14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65(1): 55-63.

15. Llorente IL, Perez-Rodriguez D, Martínez-Villayandre B, Dos-Anjos S, Darlison MG, Poole AV, et al. GABA A receptor chloride channels are involved in the neuroprotective role of GABA following oxygen and glucose deprivation in the rat cerebral cortex but not in the hippocampus. Brain Res. 2013; 1533: 141-51.

16. Rashidi A, Ahmadi S. Subunits of gamma-aminobutyric acid receptors and their roles in neuropsychological disorders. Shefaye Khatam. 2014; 2(2): 70-80.

17. Mele M, Ribeiro L, Inácio AR, Wieloch T, Duarte CB. GABA A receptor dephosphorylation followed by internalization is coupled to neuronal death in in vitro ischemia. Neurobiol Dis. 2014; 65: 220-32.

18. Gao T, Pulsinelli W, Xu Z. Changes in membrane properties of CA1 pyramidal neurons after transient forebrain ischemia in vivo. Neuroscience. 1999; 90(3): 771-80.

19. Urban L, Neill K, Crain B, Nadler J, Somjen G. Postischemic synaptic physiology in area CA1 of the gerbil hippocampus studied in vitro. J Neurosci. 1989; 9(11): 3966-75.

20. Loetscher PD, Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Fahlenkamp A, et al. Argon: neuroprotection in in vitro models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. Crit Care Med. 2009; 13(6): 1. doi: 10.1186/cc8214.

21. Galeffi F, Sinnar S, Schwartz-Bloom RD. Diazepam promotes ATP recovery and prevents cytochrome c release in hippocampal slices after in vitro ischemia. J Neurochem. 2000; 75(3): 1242-9.

22. Bickler PE, Warner DS, Stratmann G, Schuyler JA. γ-Aminobutyric acid-a receptors contribute to isoflurane neuroprotection in organotypic hippocampal cultures. Anesth Analg. 2003; 97(2): 564-71.

23. Schwartz-Bloom RD, Sah R. γ-Aminobutyric acid A neurotransmission and cerebral ischemia. J Neurochem. 2001; 77(2): 353-71.

24. Rekling JC. Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. Neurosci Lett. 2003; 335(3): 167-70.

25. Fisher JL. The effects of stiripentol on GABAA receptors. Epilepsia. 2011; 52(s2): 76-8.

26. Ogura T, Hamada T, Matsui T, Tanaka S, Okabe S, Kazama T, et al. Neuroprotection by JM-1232 (−) against oxygen–glucose deprivation-induced injury in rat hippocampal slice culture. Brain Res. 2015; 1594: 52-60.

27. Zhang F, Li C, Wang R, Han D, Zhang Q-G, Zhou C, et al. Activation of GABA receptors attenuates neuronal apoptosis through inhibiting the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src after cerebral ischemia and reperfusion. Neuroscience. 2007; 150(4): 938-49.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-10-06]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.10]