

بررسی اثر کاربرد گذرای پنتیلن تترازول بر فعالیت عصبی ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ موش صحرایی

حمید رضامهاجرانی ^{M.Sc.}، یعقوب فتح الهی ^{Ph.D.}، سعید سمنانیان ^{Ph.D.}*

آذر عمرانی ^{M.Sc.}*

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

* دانشگاه تهران، انستیتوی تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، گروه فیزیولوژی

چکیده

*** هدف:** بررسی شکل پذیری سیناپسی ناشی از تحریک کزازی در ناحیه CA1 مقاطع زنده مستعد فعالیت صرعی هیپوکمپ موش صحرایی.

*** مواد و روشها:** این مقاطع با کاربرد پنتیلن تترازول (PTZ: Pentylentetrazol) به غلظت ۳ mM به مدت ۲۰ دقیقه، به فعالیت صرعی مستعد شدند. فعالیت عصبی به صورت پتانسیل عمل میدانی یاخته‌های هرمی ناحیه CA1، قبل و بعد از اعمال تحریک کزازی ثبت شد. از نمودار ورودی - خروجی دامنه و تأخیر پتانسیل عمل میدانی برای بردن به میزان کارآیی سیناپس استفاده شد.

*** یافته‌ها:** ۲۰ دقیقه پس از کاربرد PTZ و ۵ دقیقه پس از تحریک کزازی، نمودارهای تحریک - پاسخ به سمت چپ جابجا شد و حداقل ۶۰ دقیقه پایدار باقی ماند. در مورد کاربرد PTZ، پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی نیز ظاهر شده و تا ۳۰ دقیقه پس از شستشوی PTZ، پایدار ماند. افزایش دامنه ناشی از تحریک کزازی پس از شستشوی PTZ، نسبت به گروه شاهد کمتر بود ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی دار نبود.

*** نتیجه‌گیری:** نتایج دال بر آن است که کاربرد PTZ به مدت ۲۰ دقیقه برای ایجاد یک مدل صرعی پایدار کافی است. PTZ مانند LTP (Logn-Term Potentiation) ناشی از تحریک کزازی، نمودار ورودی - خروجی را به سمت چپ جابجا می‌کند. تقویت حاصل از تحریک کزازی در این مدل، بر اثر کاربرد کوتاه مدت PTZ مسدود نمی‌شود، در حالی که فعالیت صرعی تشدید می‌گردد. بنابراین برای ایجاد فعالیت صرعی یک بستر تقویتی در فعالیت عصبی مورد نیاز است.

کل واژگان: شکل پذیری سیناپسی، پنتیلن تترازول، ناحیه CA1 هیپوکمپ، تقویت بلندمدت، فعالیت صرعی شکل

مقدمه

به افزایش کارایی سیناپسی در اتصالات تک سیناپسی LTP گفته می‌شود که در اثر تحریک‌گذرای تارهای آوران متعاقب یک تحریک کوتاه با فرکانس بالا روی می‌دهد (۱). LTP در واقع صورتی از شکل‌پذیری سیناپسی است که بار اول در هیپوکمپ مشاهده شد و LTP هیپوکمپی در سالهای اخیر به‌عنوان مدل غالب شکل‌پذیری سیناپسی وابسته به فعالیت در مغز پستانداران مطرح شده است.

از طرفی به‌دنبال معرفی تقویت بلندمدت و دستیابی به سر نخ‌های در مورد مکانیسم‌های مولکولی آن، تحقیقات نشان داد که مکانیسم‌هایی که طی LTP تجربی به کار گمارده می‌شوند، ضمن آماده‌سازی حیوانات مستعد به حملات صرع نیز بسیج می‌گردند. از این رو عده‌ای از دانشمندان LTP را به‌عنوان پایه و اساس عصبی این پدیده فرض کردند. نورونها و اصولاً شبکه‌های هیپوکمپ مستعد تخلیه‌های تشنجی هستند و در پیدایش، گسترش و پایان صرع لوب گیجگاهی دخالت دارند. بنابراین تحقیق در مورد هیپوکمپ چشم‌انداز روشنی را از جهت شناخت کارکرد دستگاه عصبی در شرایط طبیعی و تلاش برای یافتن راه درمان برخی بیماری‌های رایج عصبی گشوده است. در سالهای اخیر جهت مطالعه فرآیندهای پیچیده مغز در سطح سلولی و مولکولی تکنیک تهیه مقاطع زنده مغزی به کار رفته است. در این روش مقاطع مذکور در شرایط *in vitro* مورد مطالعات الکتروفیزیولوژیکی و... قرار می‌گیرند. برای مطالعه LTP و حمله‌های صرعی در هیپوکمپ نیز از این تکنیک در موارد زیادی استفاده شده است.

پنتیلن تترازول (PTZ) به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ ، یک ماده شیمیایی تشنج‌زا است. تزریق متناوب غلظتی از این دارو که به تشنج منجر نمی‌شود، به‌عنوان روشی است که برای تهیه حیوانات مستعد به حملات صرع به کار برده می‌شود. این ماده شیمیایی تشنج‌زا، تغییرات بیوشیمیایی ویژه‌ای در هیپوکمپ به بار می‌آورد که ماندگار به نظر می‌رسند (۲).

جهت ارزیابی تأثیر ماندگار LTP و PTZ بر فعالیت سلولهای ناحیه CA1 و وابستگی این تأثیرات به زمان و برای رسیدن به اهداف زیر، این طرح پیشنهاد می‌گردد:

۱- کاربرد گذرای پنتیلن تترازول تأثیر ماندگار بر فعالیت یاخته‌های عصبی ناحیه CA1 می‌گذارد.

۲- بررسی شکل‌پذیری سیناپسی در مقاطع زنده هیپوکمپ که بر اثر کاربرد PTZ مستعد به حمله صرعی شده‌اند.

مواد و روشها

* حیوانات

آزمایشها روی موش صحرایی سفید آزمایشگاهی نژاد NMRI انجام شد. حیوانات آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. وزن حیوانات ۱۸۰-۱۳۰ گرم بود و حیوانات در اتاقی که شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی داشت، در دمای ۲۴ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در تهیه مقاطع زنده هیپوکمپ و شروع بررسی الکتروفیزیولوژیکی مطابق این روش، حیوانات با استفاده از بخارهای اثر به‌طور عمیق بیهوش شده و سر آنها سریعاً جدا شد. پس از باز کردن استخوان سر، مغز سریعاً برداشته شد و در مایع مغزی نخاعی سرد و اکسیژنه قرار گرفت (اکسیژن‌دهی با کپسول حاوی ۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن، انجام شد). با استفاده از تیغ، مخچه و بخشی از ساقه که زیر آن قرار دارد از بقیه مغز جدا شد. مغز در محل شیار طولی نصف شد. یک نیمه مغز طوری روی کاغذ صافی خیس شده با مایع مغزی نخاعی سرد اکسیژنه قرار داده شد که سطح بریده آن در دسترس فرد باشد. انتهای جلوی آن قطع شده و در امتداد لبه دمی، عمل برش ادامه یافت تا هیپوکمپ سالم و دست‌نخورده جدا شود. هیپوکمپ در امتداد محور طولی روی یک قطعه مکعبی از آگار چسبانده شد و مجموعه روی پایه دستگاه ویروتوم نصب گردید. درون محفظه این دستگاه از مایع مغزی - نخاعی سرد اکسیژنه پر بود. عمل برش عمود بر محور طولی هیپوکمپ انجام شد تا راههای الکتروفیزیولوژیکی حفظ گردد. مقاطعی به ضخامت ۴۵۰ میکرون تهیه شد و در محفظه بافتی که مایع مغزی - نخاعی گرم و اکسیژنه، بافت موجود در آن را مشروب می‌کرد، قرار داده شد (یک پمپ پرستالیتیک با آهنگ ۲ ml/min برای مشروب کردن بافت استفاده شد). دمای محفظه بافتی به‌طور خودکار در حدود 32 ± 2 سانتی‌گراد حفظ گردید. این محفظه طوری ساخته شده است که در آن، مقاطع روی یک لایه توری با بافت ریز و در فصل مشترک مایع و گاز مرطوب قرار می‌گیرند. بعد از حدود ۲ ساعت، الکترودها در جایگاههای خاص قرار گرفته و بعد از ۳۰ دقیقه اعمال مربوط به آزمایش آغاز شد. به منظور تحریک الکتریکی از پالسهای مربعی به پهنای ۲۰۰-۱۵۰ ms با جریان ثابت ۲۵۰-۲۰۰ μA و فرکانس ۱/۰ هرتز استفاده شد. جهت تحریک کزازی فرکانس پالسها به ۱۰۰ هرتز تغییر یافت.

* ثبت پتانسیل میدانی^۱ از ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ

ثبت پتانسیل میدانی به دو صورت: پتانسیل عمل میدانی (PS)^۲ و پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی (PEPSP)^۳ از لایه جسم سلولی یاخته‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ ثبت شد. به‌منظور ثبت EPSP و PS، از میکروالکترودهای شیشه‌ای به مقاومت ظاهری ۱۰-۲۰ مگا اهم در لایه جسم سلولی استفاده شد.

پتانسیل‌های میدانی در پاسخ به تحریک شاخه‌های جانبی شافر تولید می‌شوند. ابتدا هر مقطع زنده به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه تحریک شد تا پاسخهای آن به حد پایدار رسید. مقطعی که پاسخ پایدار نداشت از مجموعه داده‌ها حذف شد. پس از پایدار شدن پاسخها، شدت جریان در محدوده ۲۵ تا ۲۰۰ میکروآمپر به شاخه‌های جانبی شافر اعمال

1. Field potential
2. Population Spike
3. Population Excitatory Postsynaptic Potential

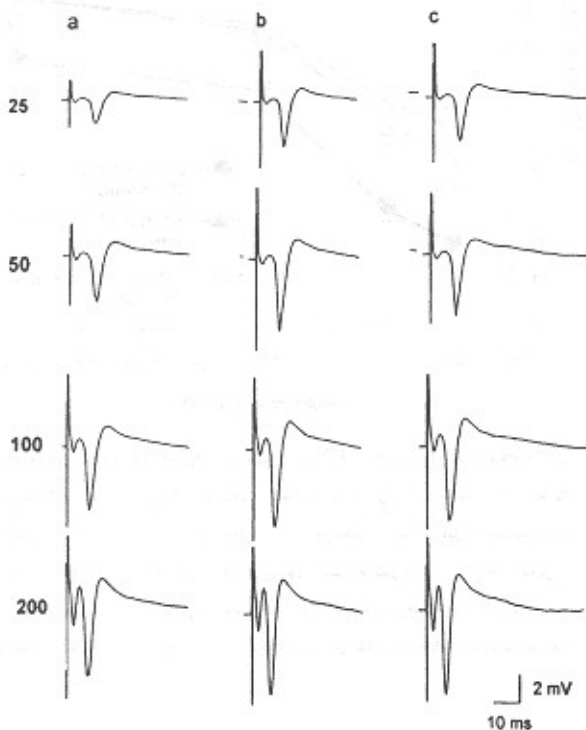


یافته‌ها

* اثر تحریک الکتریکی بر مشخصات پتانسیل میدانی مقاطع زنده هیپوکمپ

نمودار تحریک - پاسخ (دامنه PS در شدتهای مختلف تحریک)

شکل ۱ نمونه‌ای از پتانسیل‌های عمل میدانی را در لایهٔ یاخته‌های هرمی ناحیهٔ CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ نشان می‌دهد که به دنبال تحریک انشعابات جانبی شافر، قبل از تحریک کزازی، ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از تحریک کزازی در چهار شدت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر ثبت شده است. همانطور که از شکل پیداست، بعد از اعمال تحریک کزازی دامنهٔ PS افزایش و دورهٔ تأخیری PS کاهش یافته است و آثار تحریک کزازی بر مشخصات پتانسیل‌های میدانی حتی ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک نیز باقی مانده است.



شکل ۱: نمونه‌ای از پتانسیل‌های عمل میدانی ثبت شده در لایهٔ یاخته‌های هرمی ناحیهٔ CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ. a: قبل از تحریک کزازی، b: ۳۰ دقیقه بعد از تحریک کزازی و c: ۶۰ دقیقه بعد از تحریک کزازی، در چهار شدت تحریک ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر.

شکل ۲ میانگین دامنهٔ PS را به صورت تابعی از شدت تحریک در ناحیهٔ CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ قبل و ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از اعمال تحریک کزازی نشان می‌دهد. همان‌طور که از نمودار پیداست، با افزایش شدت تحریک، دامنهٔ PS در مقاطع زنده افزایش یافته است. این نمودار نشان می‌دهد که میانگین دامنهٔ PS بعد از اعمال تحریک

1. Amplitude
2. Repeated measurement ANOVA
3. Completely randomized ANOVA

شد. پاسخهای مربوط دریافت، تقویت و پالایش (۱-۱۰ کیلو هرتز) شد. صورت نهایی پاسخ با استفاده از مبدل سیگنال‌های آنالوگ به دیجیتال به صورت رقمی تبدیل شده و با آهنگ ۲۰ کیلو هرتز نمونه برداری و در حافظه کامپیوتر ذخیره شد.

* تجزیه و تحلیل اطلاعات

به دنبال تحریک شاخه‌های جانبی شافر با شدت کافی، پاسخ لایهٔ یاخته‌های هرمی ثبت شد. این موج از Stimulus artifact، PEPSP و PS تشکیل شده است. متوسط پاسخهای ثبت شده، پس از برهم نهادن ۱۰ پاسخ متوالی تعیین و از روی اسراج متوسط، شاخصهای زیر اندازه گیری شد:

دامنهٔ PS^۱: از قلهٔ موج مثبت تا قلهٔ اولین موج منفی جهت ارزیابی پتانسیل‌های میدانی در گروههای مختلف از دامنهٔ PS استفاده گردید.

برای ارزیابی میزان صرع‌زایی براساس گزارشهای متعدد از میزان افزایش دامنهٔ پتانسیل میدانی و درصد بروز نسبی پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی استفاده شد.

هر یک از شاخصهای موردنظر برای پاسخ‌ها قبل و بعد از حضور پنتیلین تترازول یا ۶۰-۳۰ دقیقه بعد از شستشوی پنتیلین تترازول در هر سطحی از شدت جریان الکتریکی اندازه گیری شد. سپس برای هر مقطع زنده، میزان تغییر برحسب درصد در هر بخش از پاسخ به صورت زیر محاسبه گردید، مثلاً:

$$\frac{\text{دامنهٔ PS قبل از حضور پنتیلین تترازول - دامنهٔ PS بعد از حضور پنتیلین تترازول}}{\text{دامنهٔ PS قبل از حضور پنتیلین تترازول}} \times 100$$

این روش جهت محاسبهٔ تغییر برحسب درصد، در مورد تقویت و ماندگاری آن در ۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک با الگوی PBS نیز صورت پذیرفت:

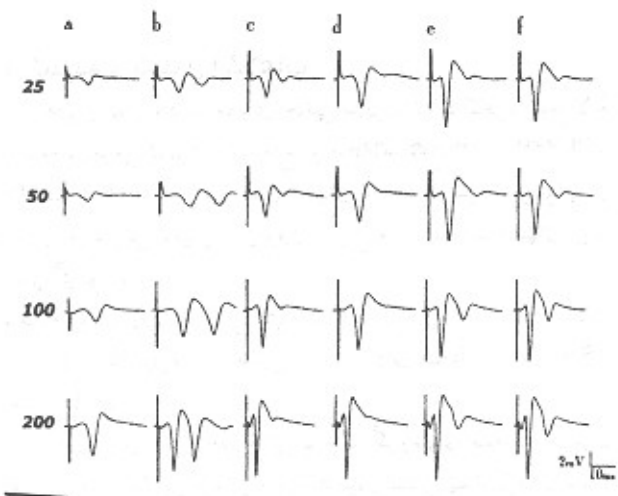
$$\frac{\text{دامنهٔ PS قبل از اعمال PBS - دامنهٔ PS بعد از اعمال PBS}}{\text{دامنهٔ PS قبل از اعمال PBS}} \times 100$$

* روشهای آماری

برای مقایسهٔ چند گروه، از آنالیز واریانس استفاده شد. در مواردی که گروهها مستقل نبوده‌اند و مراحل آزمایش بر روی یک نمونه تکرار می‌شود، از آنالیز واریانس متغیر تکراری^۲ استفاده شد (مثلاً مقایسهٔ میانگین دامنهٔ PS قبل و بعد از حضور پنتیلین تترازول). در صورتی که گروهها مستقل بودند، نتایج با استفاده از آنالیز واریانس کاملاً تصادفی^۳ مورد ارزیابی قرار گرفت (مثلاً مقایسهٔ درصد افزایش دامنهٔ PS در گروه PTZ-treated و گروه Naive). به دنبال آنالیز واریانس جهت مقایسهٔ میانگین گروهها از آزمون توکی استفاده شد. در همهٔ نمودارها، اطلاعات به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شده است. در هر روش آماری، $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار تلقی شده است.

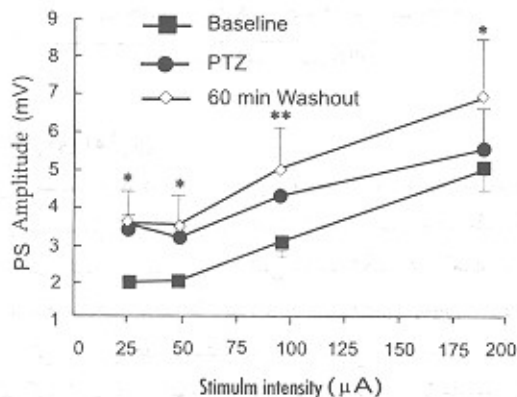


اعمال تحریک کزازی دامنه PS افزایش و دوره تأخیری PS کاهش یافته است و پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی دوباره ظاهر شده‌اند و این آثار حتی در ۶۰ دقیقه بعد از تحریک کزازی پایدار باقی مانده‌اند.



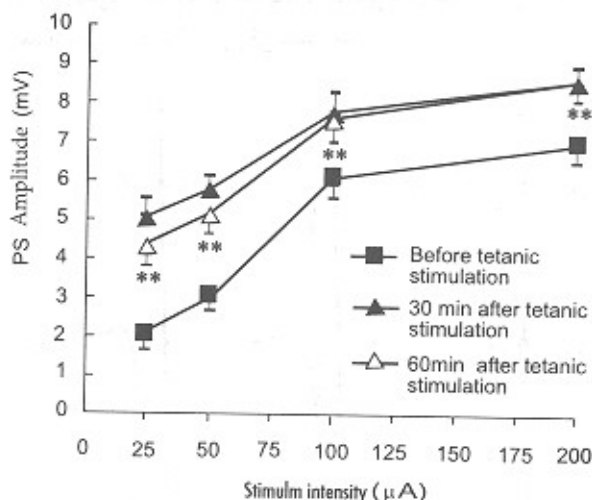
شکل ۳: نمونه‌ای از پتانسیل‌های میدانی ثبت شده در لایه پایخته‌های هرمی ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ. a: قبل از کاربرد PTZ. b: ۲۵ دقیقه بعد از کاربرد PTZ. c: ۳۰ دقیقه بعد از تحریک کزازی. d: ۶۰ دقیقه بعد از شستشوی PTZ. e: ۳۰ دقیقه پس از اعمال تحریک کزازی و f: ۶۰ دقیقه پس از اعمال تحریک کزازی. در چهار شدت تحریک ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر.

شکل ۴ میانگین دامنه PS را به صورت تابعی از شدت تحریک در ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ قبل و ۲۰ دقیقه بعد از کاربرد PTZ و ۶۰ دقیقه بعد از شستشوی PTZ نشان می‌دهد. این نمودار بیانگر آن است که میانگین دامنه PS بعد از کاربرد و شستشوی PTZ در هر چهار شدت تحریک و بویژه در شدت‌های تحریک پایین (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروآمپر) از میانگین دامنه PS قبل از کاربرد PTZ بالاتر است.



شکل ۴: نمودار تحریک پاسخ برای میانگین دامنه PS (mV) ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ قبل و ۲۰ دقیقه بعد از کاربرد PTZ (۳mM) و ۶۰ دقیقه بعد از شستشوی PTZ در چهار شدت تحریک ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر. در همه موارد مقادیر نشانگر میانگین داده‌ها با SEM یک طرفه (+) یا (-) هستند. آزمون آماری استفاده شده آنالیز واریانس متغیر تکراری است و مقادیر از ۸ مقطع زنده بدست آمده است. * P<0.05 ** P<0.01

کزازی و گذشت ۳۰ و ۶۰ دقیقه از آن در هر چهار شدت تحریک و بویژه در شدت‌های تحریک پایین، از میانگین دامنه PS قبل از اعمال تحریک کزازی بالاتر است. مقایسه آماری با استفاده از آنالیز واریانس متغیر تکراری نشان می‌دهد که تفاوت کلی بین گروه‌ها معنی‌دار است ($P<0.0001$)، اما آزمون توکی دال بر آن است که این تفاوت در تمام شدت‌ها بین گروه قبل از تحریک کزازی با گروه‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تحریک کزازی با $P<0.01$ معنی‌دار است. درحالی‌که بین گروه ۳۰ دقیقه بعد از تحریک کزازی و گروه ۶۰ دقیقه پس از تحریک کزازی اختلاف تنها در شدت‌های ۲۵ ($P<0.05$) و ۵۰ میکروآمپر ($P<0.01$) معنی‌دار است.



شکل ۵: نمودار تحریک پاسخ برای میانگین دامنه PS (mV) ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ قبل و بعد از ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک کزازی با الگوی PB در چهار شدت تحریک ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر. تفاوت میانگین دامنه PS قبل از تحریک کزازی با ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از اعمال تحریک کزازی در چهار شدت متغیر با $P<0.01$ معنی‌دار است. در همه موارد مقادیر نشانگر میانگین داده‌ها با SEM یک طرفه (+) یا (-) هستند. آزمون آماری استفاده شده آنالیز واریانس متغیر تکراری است و مقادیر از ۸ مقطع زنده بدست آمده است.

* اثر کاربرد گذرای PTZ و تحریک کزازی متعاقب آن بر مشخصات پتانسیل میدانی مقاطع زنده هیپوکمپ نمودار تحریک - پاسخ (دامنه PS در شدت‌های مختلف تحریک)

شکل ۳ نمونه‌ای از پتانسیل‌های عمل میدانی را در لایه پایخته‌های هرمی ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ نشان می‌دهد که به دنبال تحریک انشعابات جانبی شافرا، قبل و ۲۰ دقیقه بعد از کاربرد PTZ، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از شستشوی، قبل از تحریک الکتریکی کزازی با الگوی PB و ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از تحریک کزازی فوق در چهار شدت تحریک ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر ثبت شده است.

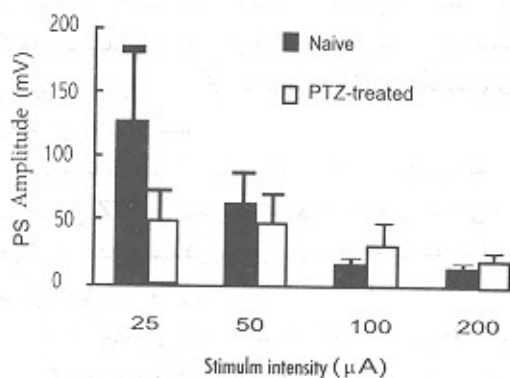
همانطور که از شکل پیداست بعد از کاربرد PTZ، در چهار شدت مذکور، دامنه PS افزایش و دوره تأخیری PS کم شده و پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی ظاهر شده‌اند. از طرفی بعد از شستشوی PTZ، تعداد و دامنه‌های پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی کاهش یافته است. پس از

پتانسیل‌های عمل میدانی در شدتهای تحریک بالاتر، بیشتر است (بطورکلی در تمامی مقاطع زنده، بعد از کاربرد PTZ بروز نسبی پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی در چهار شدت مذکور بسیار بالا رفته و در عین حال با افزایش شدت تحریک، بروز نسبی پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی افزایش یافته است).

بعد از شستشوی PTZ، تعداد و دامنه پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی کاهش یافته است، ولی بعد از ۳۰ دقیقه شستشو، هنوز آثاری از پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی مخصوصاً در شدت ۲۰۰ میکروآمپر وجود دارد و پس از ۶۰ دقیقه شستشو این آثار تقریباً از بین رفته‌اند، اما ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از اعمال تحریک کزازی مجدداً این پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی به تعداد و دامنه‌ای کمتر از زمان استفاده از PTZ ظاهر شده‌اند.

* مقایسه پاسخ مقاطع زنده هیپوکمپ شاهد و مقطعی که تحت تأثیر PTZ قرار گرفته‌اند اثر PTZ بر دامنه PS

شکل ۶ میانگین درصد افزایش دامنه PS در ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ، ۶۰ دقیقه پس از اعمال تحریک الکتریکی کزازی در مقاطع Naive و ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک کزازی (پس از گذشت ۶۰ دقیقه از شستشوی PTZ) در مقاطع PTZ-treated، در چهار شدت تحریک ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر را نشان می‌دهد. همان‌طور که از نمودار پیداست در هر دو گروه با تحریک الکتریکی کزازی دامنه PS افزایش یافته است

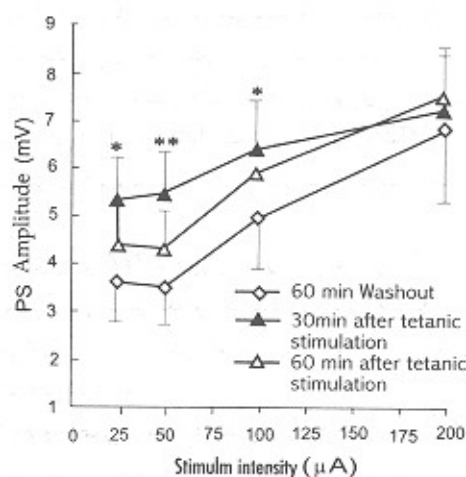


شکل ۶: نمودار ستونی میانگین درصد افزایش دامنه PS ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ. آزمون آماری مورد استفاده، آنالیز واریانس متغیر کاملاً تصادفی است. در همه موارد مقادیر، نمایانگر میانگین داده‌ها با SEM به‌طرفه (مثبت) هستند و این مقادیر بر گروه Naive از ۶ مقطع زنده و بر گروه PTZ-treated از ۸ مقطع زنده بیست آمده‌اند.

ولی در حضور PTZ و در شدتهای پایین‌تر، از میزان این افزایش کاسته شده است. مقایسه آماری با استفاده از آنالیز واریانس متغیر کاملاً تصادفی نشان می‌دهد که تفاوت کلی بین گروه‌ها معنی‌دار نیست و حاکی از آن است که کاربرد گذرای PTZ تأثیر چندانی بر میزان افزایش دامنه PS ناشی از تحریک کزازی ندارد.

همچنین افزایش این دامنه ۶۰ دقیقه پس از شستشو از بین نرفته و حتی افزایش یافته است که نمایانگر ماندگاری اثر PTZ بر دامنه PS است. مقایسه آماری با استفاده از آنالیز واریانس متغیر تکراری نشان می‌دهد که تفاوت کلی بین گروه‌ها معنی‌دار است ($P=0.0001$) اما آزمون توکی دال بر آن است که این تفاوت بین گروه قبل از اعمال PTZ و گروه ۳۰ دقیقه پس از شستشوی PTZ تنها در شدت ۲۵ میکروآمپر معنی‌دار است ($P<0.05$) و بین گروه قبل از اعمال PTZ و گروه ۶۰ دقیقه پس از شستشوی PTZ در همه شدتها معنی‌دار است که در شدت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروآمپر با $P<0.05$ و در شدت ۲۰۰ میکروآمپر با $P<0.01$ است.

شکل ۵ میانگین دامنه PS را به‌صورت تابعی از شدت تحریک ۶۰ دقیقه پس از شستشوی PTZ، ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از تحریک کزازی با الگوی PB نشان می‌دهد. همان‌طور که از نمودار پیداست میانگین دامنه PS، ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از اعمال تحریک کزازی بویژه در شدتهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰، بالاتر از میانگین دامنه PS در ۶۰ دقیقه پس از شستشوی PTZ است.



شکل ۵: نمودار تحریک پاسخ برای میانگین دامنه PS ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ. در همه موارد، مقادیر نشانگر میانگین داده‌ها با SEM به‌طرفه (مثبت) هستند. آزمون آماری استفاده شده آنالیز واریانس متغیر تکراری است و مقادیر از ۸ مقطع زنده بیست آمده است. $P<0.01$ * $P<0.05$ **

مقایسه آماری با استفاده از آنالیز واریانس متغیر تکراری نشان می‌دهد که تفاوت کلی بین گروه‌ها معنی‌دار است ($P<0.01$)، اما آزمون توکی دال بر آن است که این تفاوت فقط بین گروه ۶۰ دقیقه پس از شستشوی PTZ و گروه ۳۰ دقیقه پس از تحریک کزازی در شدت ۲۵ و ۱۰۰ میکروآمپر با $P<0.05$ و در شدت ۵۰ میکروآمپر با $P<0.01$ معنی‌دار است.

* ظهور پتانسیل‌های میدانی اضافی

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده، به دنبال کاربرد PTZ پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی ظاهر شده است. اما تعداد این

بحث

* آثار ماندگار کاربرد کوتاه مدت PTZ بر مشخصات پتانسیل عمل میدانی ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ

مطالعه و بررسی مکانیسمهای دخیل در تولید و انتشار فعالیت صرعی شکل با استفاده از مدل *in vitro* تشنج و به کار بردن PTZ بسیار سودمند است. در این مدل می توان آثار کاربرد گذرای PTZ را بر پتانسیل عمل میدانی ناحیه CA1 بررسی نمود. آزمایشهای ما نشان می دهد که PTZ تغییراتی را در ناحیه CA1 هیپوکمپ ایجاد می کند که ماندگار به نظر می رسد. از آنجا که تغییرات ماندگاری در فعالیت یاخته های عصبی به دنبال فعالیت تشنجی در مغز ایجاد می شود، لذا از این مدل می توان برای پی بردن به مکانیسمهای دخیل در بقای فعالیت تشنجی و کنترل آن استفاده نمود.

ارزیابی انتقال سیناپسی در ناحیه CA1 هیپوکمپ با استفاده از دامنه و دوره تأخیری پتانسیل عمل میدانی دال بر آن است که PTZ می تواند روابط ورودی - خروجی سیناپسی را بین شاخه های شافر و یاخته های هرمی ناحیه CA1 تغییر دهد.

از طرف دیگر با استفاده از اندازه گیری های مربوط به ثبت پتانسیل میدانی سیناپسهای مذکور بعد از حذف PTZ، می توان تا حدودی به تغییرات ماندگار در فعالیت یاخته های عصبی به دنبال کاربرد کوتاه مدت PTZ پی برد. افزایش میانگین دامنه پتانسیل عمل میدانی (PS) بعد از کاربرد و شستشوی PTZ قابل توجه است. از طرف دیگر پس از کاربرد PTZ، پتانسیل های عمل میدانی اضافی ظاهر می شوند؛ هر چند که با شستشوی PTZ، تعداد و درصد بروز پتانسیل های عمل میدانی اضافی کاهش می یابد. پایداری آثار مذکور، خصوصاً افزایش میانگین دامنه پتانسیل عمل میدانی بیانگر اثر ماندگار PTZ بر مکانیسمهای مربوط به وقوع این پتانسیل است.

نتایج ما نشانگر آن است که قرار دادن یاخته های عصبی هیپوکمپ در معرض PTZ در تحریک پذیری یاخته های عصبی ناحیه CA1 هیپوکمپ، تشدید ماندگار به وجود می آورد که با استفاده از ثبت پتانسیل میدانی، قابل اندازه گیری است.

تعداد یاخته های عصبی تخلیه شده و همزمانی تخلیه آنها، دو عامل تعیین کننده دامنه PS است. ممکن است عواملی مانند اثر میدان الکتریکی، اثر آفاتیپیک، تغییر در محیط برون یاخته ای، به همزمانی تخلیه یاخته های عصبی منجر شود و در نتیجه در افزایش دامنه PS نقش دارد. در شدتهای بالا (مثل ۲۰۰ میکروآمپر) که در آن اکثر یاخته ها از قبل بسیج شده اند، همزمانی تخلیه آنها نقش اصلی را در افزایش دامنه PS ایفا می کند. در عین حال، عوامل سیناپسی که موجب در هم شکستن مکانیسمهای مهارتی می شوند و نیز موجب تقویت مکانیسمهای تحریکی می گردند، موجب همزمانی تخلیه یاخته های عصبی و تولید فعالیتهای صرعی شکل می شوند (۳).

بنابراین افزایش دامنه PS به دنبال کاربرد PTZ می تواند ناشی از افزایش همزمانی تخلیه یاخته های عصبی از طریق آثار سیناپسی یا غیر

سیناپسی PTZ باشد. این یافته توسط نتایج بسیاری از مطالعات دیگر حمایت می شود: PTZ از طریق عوامل سیناپسی و غیرسیناپسی در افزایش تحریک پذیری یاخته های عصبی در صرع زایی نقش دارد و از طریق آثار سیناپسی خواص غشای عصبی را تشدید می کند (۴).

در یاخته هایی که از ورودیهای سیناپسی جدا شده اند، PTZ موجب نوساناتی در امواج آهسته پتانسیل غشا و الگوری تخلیه دسته ای می شود. مطالعات در تخمک *Xenopus* نشان داده است که PTZ یک جریان رو به داخل را که مربوط به کاهش نفوذپذیری به پتاسیم و افزایش نفوذپذیری به کلر است، القا می کند (۵).

PTZ به صورت وابسته به ولتاژ، روی کانالهای پتاسیمی یکسوکننده^۱ (یکی از فراوانترین انواع کانالهای پتاسیمی در مغز موش صحرایی) عمل می کند. در پتانسیل های منفی جریان پتاسیمی بوسیله PTZ افزایش می یابد و در نتیجه دپلاریزاسیونهای کوچک کاهش می یابند. این عمل به کاهش تخلیه های خودبه خودی منجر می شود. در این شرایط تعداد یاخته های عصبی که برای فرایند تشنج بسیج می شوند، افزایش می یابد. در پتانسیل های مثبت، جریان پتاسیمی به وسیله PTZ کاهش می یابد و دپلاریزاسیونهای بزرگ افزایش می یابند و در نتیجه به همزمانی و تشدید تحریک پذیری یاخته های عصبی منجر می شود.

مطالعه یاخته های عصبی قشر مغز موش سوری در محیط کشت با استفاده از روش Patch-clamp نشان داده است که PTZ با اثر بر زمان باز و بسته بودن کانالهای پتاسیمی حالتی شبیه تخلیه دسته ای^۲ القا می کند (۶).

از طرف دیگر PTZ با اثر بر انتقال سیناپسی برای کاهش مهارت یا تشدید تحریک از طریق تعدیل جریانهای غشایی وابسته به پیکهای عصبی می تواند موجب افزایش همزمانی تخلیه یاخته های عصبی و بروز فعالیت تشنجی شود (۷).

یاخته های عصبی واسطه در هیپوکمپ به طور عمده گابا ارژیک هستند و به عنوان پایه و اساس فیزیولوژیک برای مهارت پس خور^۳ و مهارت پیشگستر^۴ عمل می کنند.

شواهد زیادی نشان می دهند که ن_A در انتقال عصبی ناشی از گابا ممکن است در تولید تشنج در انسانها و مدل های حیوانی صرع نقش داشته باشند.

به کاربردن آنتاگونیستهای گیرنده گابای A موجب القای فعالیت صرعی شکل در مدل های *in vivo* و *in vitro* می شوند (۱۲). تعداد زیادی از یاخته های گابا ارژیک در کانونهای صرع از بین می روند که نشانگر اهمیت تغییرات گابا ارژیک برای تولید صرع است. ارتباط دقیقی بین کاهش گیرنده های پس سیناپسی گابا و فرکانس تشنج وجود دارد. از طرفی مطالعات نشان داده است که PTZ به طور انتخابی پاسخهای پس سیناپسی به گابا را با بستن کانال کلری مرتبط با گیرنده

1. Rectifier
2. Bursing-type open close state
3. Feed back
4. Feed forward



سطح نسخه برداری رخ می‌دهد (۱۰). محصول ژنهای اولیه، پروتئین‌های متصل به DNA هستند که تصور می‌شود در یک طرح هماهنگ نسخه برداری از ژنهای عمل کننده بعدی را تغییر دهند. ژنهای اخیر ممکن است آنزیمها، نوروپپتیدها، گیرنده‌ها، کانالهای یونی، پروتئینهای ساختمانی، فاکتورهای رشد و... را کدگذاری کنند و ممکن است تغییرات بیوشیمیایی و یا مورفولوژیک در مغز ایجاد کنند. بنابراین ژنهای اولیه ممکن است به عنوان سوئیچهای مولکولی عمل کنند و برنامه شکل پذیری را در یاخته‌های عصبی با طرحی مشابه با القای برنامه‌های رشد و تمایز در یاخته‌های در حال تقسیم، به راه اندازند. بنابراین تشدید ماندگار فعالیت یاخته‌های عصبی ناحیه CA1 هیپوکمپ به دنبال کاربرد PTZ می‌تواند از تغییر در اجزای پیش و پس سیناپسی، برون سیناپسی، ریخت‌شناسی و تغییرات بیوشیمیایی در یاخته‌های عصبی هیپوکمپ ایجاد شود. از طرف دیگر، تشدید آثار PTZ به دنبال سستشوی آن نیز می‌تواند تغییرات بیوشیمیایی ناشی از PTZ را که در درازمدت بروز نموده‌اند، بازگو نماید. هرچند که مکانیسم دقیق این آثار و ماندگاری آنها، نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

* اثر فعالیت صرعی شکل ناشی از PTZ بر شکل‌پذیری سیناپسی ناشی از تحریک الکتریکی کزاز

با توجه به اینکه کاربرد گذرای PTZ تغییراتی ماندگار در پاسخ ناحیه CA1 مقاطع زنده هیپوکمپ ایجاد می‌کند، می‌توان در این مدل آثار فعالیت‌های صرعی شکل ناشی از کاربرد گذرای PTZ را بر القا و پایداری شکل‌پذیری سیناپسی متعاقب آن بررسی نمود.

یکی از آثار ماندگار PTZ بر مشخصات پتانسیل میدانی ناحیه CA1 هیپوکمپ که قبلاً نیز به آن اشاره شد، افزایش دامنه PS است. ارزیابی انتقال سیناپسی با استفاده از اندازه‌گیری دامنه PS به دنبال کاربرد PTZ نشان داد که PTZ می‌تواند انتقال سیناپسی را در سیناپسهای شاخه جانبی شافر به دندریت یاخته‌های هر می ناحیه CA1 افزایش دهد. افزایش پایدار دامنه PS، ۶۰ دقیقه پس از سستشوی PTZ نشانگر اثر ماندگار PTZ بر دامنه PS است. در مطالعاتی که توسط Leung و همکارانش برای القای LTP ناشی از تحریک کزاز در مقاطع زنده هیپوکمپ انجام شد، الگوی مشابهی از تقویت دامنه پتانسیل میدانی گزارش شده است (۱۱). مقایسه منحنی‌های I/O قبل و بعد از القای LTP هیپوکمی در مقاطع زنده‌ای که در اثر آنتاگونیست‌های گابا در آنها، رفع مهار رخ داده است به سهولت انجام می‌گیرد. افسی ماندگار در سیستم گابا ارژیک بر اثر تشنجات و کیندلینگ ناشی از PTZ رخ می‌دهد (۴). تشدید پیش‌رونده کارآیی سیناپسی تحریکی از طریق حساسیت غشای پس سیناپسی به پیکهای عصبی که در انتقال مهار و شکل‌پذیری مهم هستند و دپلاریزاسیون پس سیناپسی بزرگتر که موجب افزایش یون کلسیم در یاخته پس سیناپسی می‌شود، ممکن است در تشدید تقویت ناشی از تحریک کزاز نقش داشته باشد. تحریک کزاز و فعالیت

گابای A مسدود می‌کند (۸). ثبت درون یاخته‌ای از ناحیه CA1 هیپوکمپ نشان داده است که PTZ با غلظت ۱ تا ۲ میلی مولار، بخش ابتدایی پتانسیل‌های پس سیناپسی مهاری (IPSP) یا بخش سریع را تضعیف می‌کند ولی روی قسمت انتهایی IPSP اثر ندارد (۹).

ظهور پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی به دنبال کاربرد مواد تشنج‌زا به عنوان یکی از شاخصهای صرعی در مطالعات مختلف گزارش شده است. به دنبال کاربرد PTZ نیز پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی ظاهر شده‌اند که نمایانگر نقش PTZ در تشدید تحریک‌پذیری و تولید فعالیت صرعی شکل در یاخته‌های عصبی هیپوکمپ است. اگرچه نخستین پتانسیل عمل میدانی به وسیله مکانیسمهای سیناپسی و در اثر تحریک سری دندریتهای یاخته‌های هر می به وسیله انشعابات جانبی شافر ایجاد می‌شود، تولید پتانسیل عمل میدانی اضافی به مکانیسمهای Coupling متکی است که ارتباط کافی برای حفظ همزمانی تحریک بین جمعیتی از یاخته‌های هر می ناحیه CA1 را فراهم می‌کند. از طرفی، چون پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی می‌توانند به‌طور فاماکولوژیک تضعیف شوند، احتمالاً از طریق مکانیسمهای موضعی تر تولید و منتشر می‌شوند. ثبت همزمان درون و برون یاخته‌ای نشان داده است که پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی به نوسانات دپلاریزه کننده کوچک در پتانسیل متعاقب دپلاریزه کننده (PAD) ^۱ مرتبطند. این نوسانات، تغییرات غشایی ناشی از تخلیه‌های متعاقب یاخته‌های هر می ناحیه CA1 هیپوکمپ هستند. بنابراین افزایش تعداد پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی احتمالاً منعکس کننده الگوی تخلیه همزمان شده تعدادی از یاخته‌های هر می ناحیه CA1 هیپوکمپ است که تحریک‌پذیری بالایی دارند (۳). از طرف دیگر، افزایش تعداد پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی به شدت تحریک وابسته است. به‌طوری که در شدتهای تحریک بالاتر، تعداد پتانسیل‌های مذکور افزایش می‌یابد. افزایش مدت پتانسیل پس سیناپسی تحریکی، می‌تواند موجب افزایش تعداد پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی شود. بنابراین ظهور پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی به دنبال کاربرد PTZ این یافته را که PTZ از طریق افزایش همزمانی تخلیه یاخته‌های عصبی هیپوکمپ موجب تشدید تحریک‌پذیری یاخته‌های عصبی می‌شود، تأیید می‌کند. علاوه بر این احتمالاً PTZ با انسداد پاسخهای پس سیناپسی گابا و تضعیف پتانسیل‌های پس سیناپسی مهاری و فعال‌سازی NMDA، موجب افزایش مدت پتانسیل‌های پس سیناپسی تحریکی و در نتیجه دپلاریزاسیون مداوم غشاء و ظهور پتانسیل‌های عمل میدانی اضافی می‌شود (۴). تشدید ماندگار انتقال سیناپسی به دنبال کاربرد PTZ که با افزایش دامنه PS، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از سستشوی PTZ قابل اندازه‌گیری است، نشانگر اثر ماندگار PTZ بر مشخصات پتانسیل میدانی است.

PTZ روی بیان برخی از ژنها اثر می‌گذارد. محصول این ژنها و اعمال آنها می‌تواند به عنوان مکانیسمهای تغییرات فیزیولوژیک ماندگار PTZ باشد. شش ساعت بعد از تزریق PTZ نسخه برداری از ژنهای C-Fos، c-Jun و نوروپپتید Y در هیپوکمپ افزایش می‌یابد. بنابراین تنظیم مقادیر mRNA مربوط به ژنهای اولیه و دو نوروپپتید، حداقل در

با توجه به مشابهت الگوی تقویت دامنه ناشی از PTZ، با تقویت دامنه ناشی از تحریک کزازی و همچنین مشابهت روندهای بیوشیمیایی در این دو مسیر، شاید بتوان گفت که کاربرد کوتاه مدت PTZ به صورت تقلیدی از تحریک کزازی، در تشکیل LTP نقش داشته باشد.

گیرنده NMDA منجر به افزایش کلسیم داخل یاخته‌ای می‌شود و ورود کلسیم، جریانهای رو به داخل ناشی از گابای A را کاهش می‌دهد. به عبارت دیگر، ورود کلسیم موجب تغییر تراکم یا رفتار کیتیکی گیرنده‌هایی می‌شود که در شکل‌پذیری سیناپسی دخیل هستند (۱۲).

References

1. Pourmotabbed A, Motamedi F, Fathollahi Y, Mansouri F, Semnani S: Involvement of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels on augmentation of long term potentiation in hippocampal CA1 area of morphine dependent rats. *Brain Res* 1998; 31: 125-134
2. Fathollahi Y, Motamedi F, Semnani S, Zardoshti M: Repeated administration of pentylentetrazol alters susceptibility of rat hippocampus to primed burst stimulation: evidence from in-vitro study on CA1 of hippocampal slices. *Brain Res* 1996; 738: 138-141
3. Omrani A: Examination of adenosine effect on pentylentetrazol induced epileptiform activity in CA1 region of hippocampal slices. Tarbiat Modarres University, A. M.Sc. thesis 1998
4. Krug M, Grecksch G, Schulzeck K: Pentylentetrazol kindling changes the ability to induce potentiation phenomenon in the hippocampal CA1 region. *Physiol Behav* 1997; 62: 721-727
5. Klocher N, Mubhoff U, Madeja M, Speckman EJ: Activation of ATP sensitive potassium channels in follicle enclosed *Xenopus* oocytes by the epileptogenic agent pentylentetrazol: *Eur J Physiol* 1996; 431: 288-296
6. Sugaya E, Sugaya A, Takagi T, Tsuda T, Kajiwara K, Yasuda K, Kumatsubara J: Pentylentetrazol-induced changes of the single potassium channel in primary cultured cerebral cortical neurons. *Brain Res* 1989; 497: 239-244
7. Pellmar TC, Wilson WA: Synaptic mechanism of pentylentetrazol: selectivity for chloride conductance. *Science* 1994; 197: 217-220
8. Fathollahi Y, Motamedi F, Semnani S, Zardoshti M: Examination of persistent effect of repeated administration of pentylentetrazol on rat hippocampal CA1: evidence from in-vitro study on hippocampal slices. *Brain Res* 1997; 758: 92-98
9. Engel J, Pedley TA: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, Lippincot-Reven press, Philadelphia, 1998, pp 430-476
10. Ruethrich H, Grecksch G, Becker A, Krug M: Potentiation effects in the dentate gyrus of pentylentetrazol-kindled rat. *Physiol Behav* 1996; 60: 21-24
11. Leung LS, Ambrose SA: Long-term potentiation as a function of test pulse intensity: a study using input/output profiles. *Brain Res Bull* 1994; 33: 435-440
12. Weiler IG, Childers WS, Greenough WT: Calcium ions impedes translation initiation at the synapse. *J Neurochem* 1996; 66: 197-202

