

## تاثیر امواج تحریکی شبه دوزنقه‌ای بر جریان کلسیمی نوع L غشا جسم سلولی نورون F<sub>1</sub> حلزون باغی (*Helix aspersa*) در روش ثبت داخل سلولی (Voltage and Current Clamp)

توراندخت بلوچ نژاد مجرد Ph.D.\*<sup>‡</sup>، مهیار جان احمدی Ph.D.\*<sup>‡</sup>، مهرداد روغنی Ph.D.\*<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup> دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز علوم پایه پزشکی، گروه فیزیولوژی

\* دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

<sup>‡</sup> دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

<sup>‡</sup> آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه فیزیولوژی

### چکیده

**هدف:** جریانهای یونی دارای رفتار غیرخطی و تحریکات الکتریکی است که می‌تواند در کینتیک فعال یا غیر فعال شدن آنها تأثیر بگذارد. سرعت مراحل دپلاریزه کننده و هیپرپلاریزه کننده امواج تحریک کننده می‌تواند با تأثیر بر ویژگیهای الکترو فیزیولوژیکی جریانهای یونی نحوه فعالیت نورونها را تغییر دهند. در این مطالعه اثر پتانسیلهای فرمانی شبه دوزنقه‌ای بر ویژگیهای بیوفیزیکی کانال کلسیمی با آستانه بالا نوع L جسم سلولی نورون F<sub>1</sub> در حلزون باغی مورد مطالعه قرار گرفت.

**مواد و روشها:** ۸ نورون F<sub>1</sub> با استفاده از دو شکل پتانسیل فرمانی راست گوشه و شبه دوزنقه‌ای از پتانسیلهای نگهدارنده -۹۰ و -۴۰ میلی‌ولت تا +۹۰ میلی‌ولت در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم دپلاریزه شدند. سپس نوروتهای F<sub>1</sub> در حضور نیفدیپین، آتاگونست اختصاصی و انتخابی کانال کلسیمی با آستانه بالا نوع L، با استفاده از دو شکل پتانسیلهای فرمانی کلمپ شدند.

**یافته‌ها:** در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم پتانسیلهای فرمانی شبه دوزنقه‌ای در مقایسه با پتانسیلهای فرمانی راست گوشه جریان کلسیمی را ۳۶ درصد کاهش داده و ولتاژ آستانه را به طرف پتانسیلهای مثبت‌تر سوق دادند. در حضور نیفدیپین با آنکه پتانسیلهای فرمانی شبه دوزنقه‌ای در مقایسه با پتانسیلهای فرمانی راست گوشه موجب مثبت‌تر شدن ولتاژ آستانه شدند ولی در میزان حداکثر جریان تغییری به وجود نیاوردند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که هیپرپلاریزاسیون آهسته مرحله پایین رو کلمپ ولتاژ با تأثیر بر کینتیک کانالهای یونی، موجب تغییر رفتار آنها می‌گردد. شاید بتوان با استفاده از این شکل امواج و یا اشکال دیگر به طور الکترو فیزیولوژیک و بدون استفاده از مهار کننده‌های شیمیایی موجب فعال و یا غیر فعال شدن انتخابی کانالهای یونی شد.

**کل واژگان:** پتانسیل فرمانی شبه دوزنقه‌ای، جریان کلسیمی نوع L، نورون F<sub>1</sub>، Voltage Clamp

## مقدمه

در سلولهای تحریک پذیر جریان کلسیمی وابسته به ولتاژ نقش مهمی در اعمال متفاوت سلولی از جمله ترشح ماده میانجی، انقباض، تحریک پذیری الکتریکی، رشد و تمایز سلولی دارد (۶-۱).

در اکثر سلولها بیش از یک نوع جریان کلسیمی وجود دارد که هر یک ویژگی فارماکولوژیک و بیوفیزیکی خاص خود را دارد، به عنوان مثال در سلولهای عصبی (۷)، سلولهای ترشحی (۸) و سلولهای عضلانی (۹) بهره‌داران، دو نوع جریان کلسیمی با آستانه پایین<sup>۱</sup> و با آستانه بالا<sup>۲</sup> وجود دارد. مطالعات الکترو فیزیولوژیکی و فارماکولوژیک نشان می‌دهد که جریان کلسیمی با آستانه بالا در نورونهای محیطی دارای حداقل دو زیرگروه به نام N و L است. جریان کلسیمی نوع L به آگونیستها و آنتاگونیستهای مشتقات Dihydropyridine حساس است در حالی که جریان نوع N توسط V-conotoxin GVIA مهار می‌شود (۱۰، ۱۱، ۱۲). در نورونهای سیستم اعصاب مرکزی علاوه بر جریانهای کلسیمی نوع N و L جریانهای کلسیمی نوع P، Q و R نیز وجود دارد (۱۳، ۱۴). بررسی ویژگیهای کینتیکی کانالهای کلسیمی نقش هر یک از آنها را در پتانسیل‌های غشایی، مدت، دامنه و الگوی ارسال پتانسیل عمل (Bursting or Beating) مشخص کرده است (۲۱-۱۵). از آنجایی که اشکال متفاوت پتانسیل‌های فرمانی و سرعت دپلاریزه و یا هیپرپلاریزه کردن پتانسیل غشا می‌تواند کینتیک فعال و یا غیر فعال شدن کانالهای کلسیمی را تحت تأثیر قرار دهد لذا مقایسه اثر اشکال متفاوت پتانسیل‌های فرمانی می‌تواند اطلاعات بیشتری در مورد رفتار کانالها در پتانسیل‌های مختلف غشایی در اختیار ما قرار دهد. به عنوان مثال پتانسیل‌های فرمانی راست گوشه، غشا را سریعاً دپلاریزه و هیپرپلاریزه می‌کند و پتانسیل‌های فرمانی شبه دوزنقه‌ای در مقایسه با پتانسیل‌های فرمانی راست گوشه می‌توانند با هیپرپلاریزاسیون آهسته غشا تأثیر متفاوتی بر ویژگیهای پتانسیل عمل داشته و تحریک‌پذیری سلول را تغییر دهند (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵). در مطالعه حاضر، تأثیر شکل امواج شبه دوزنقه‌ای بر ویژگیهای الکترو فیزیولوژیک جریان کلسیمی نوع L غشا جسم سلولی نورون F<sub>۱</sub> حلزون باغی گونه Helix aspersa در مقایسه با امواج راست گوشه بررسی شده است.

## مواد و روشها

این مطالعه روی حلزونهای باغی (Iranian garden snail) گونه Helix aspersa از خانواده نرم‌تنان با وزن ۷/۴-۶/۱ گرم که از منطقه بابل در فصل بهار جمع‌آوری شده بودند انجام شد. حلزونها بلافاصله به آزمایشگاه گروه فیزیولوژی منتقل و شرایطی مشابه محل زیست آنها فراهم گردید. به علاوه حیوانات محدودیتی در دسترسی به غذا (برگ کلم) و آب نداشتند. کلیه آزمایشها بر روی نورون F<sub>۱</sub> در گانگلیون پاریتال راست انجام شد. از چندین شاخص جهت شناسایی نورونهای F<sub>۱</sub> استفاده شد که از آن جمله می‌توان از محل و اندازه نورون در سطح گانگلیون، وضعیت قرارگرفتن آن نسبت به اعصاب و

فعالیت الکتریکی آن نام برد (۲۶). قبل از شروع هر آزمایش با قرار دادن حلزونها در آب، شرایط فیزیولوژیکی یکسانی برای فعال کردن حلزونهای مورد استفاده فراهم می‌شد. برداشتن بافت پیوندی و جدا کردن نورون F<sub>۱</sub> بوسیله پنبه‌های بسیار ظریف و بدون استفاده از آنزیم پروتئولیتیک انجام می‌شد. پس از جدا کردن نورون، آنرا در داخل محفظه نگهدارنده بافت با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر که داخل آن با یک الاستومر سیلیکون (Sylgard) پوشیده شده بود قرار می‌دادیم. تمام آزمایشها در حرارت ۲۳-۲۰ سانتیگراد و در داخل قفس Faraday ثبت می‌شد.

ثبت داخل سلولی برای اندازه‌گیری خواص غیر فعال (پتانسیل استراحت غشا، مقاومت و ظرفیت) و فعال غشا سلولهای عصبی و جریانهای یونی به کار می‌رود. در این کار تحقیقاتی ثبت داخل سلولی با استفاده از دو میکروالکتروود انجام شد. میکروالکتروودها از لوله‌های موئینه برسلیکات دارای فیلامان داخلی (Clark Electromedical Instruments, UK) تهیه می‌شدند. میکروالکتروودهای تزریق‌کننده جریان و ثبت‌کننده ولتاژ در داخل نگهدارنده‌های (Perspex) مجزایی که مستقیماً به پری‌آمپلی فایر (Headstage) متصل شده بودند قرار گرفته و در داخل هر میکروالکتروود شبیه‌ای سیم نقره‌ای با قطر ۸/۰ میلی‌متر که بخشی از آن توسط روکش AgCl پوشیده شده بود (Ag/AgCl) قرار داده می‌شد. متوسط مقاومت نوک میکروالکتروودها (Mean±SD) ۶۳±۰/۶ مگا اهم بود. این میکروالکتروودها با محلول کلرید پتاسیم سه مولار پر شده و به آمپلی فایر Axoclamp2B (Axon instruments, Inc Burlingame, USA) متصل می‌شدند. الکتروود مرجع (پل آگاری) حاوی کلرید پتاسیم سه مولار و آنگار حل شده در رینگر استاندارد، به منظور کاستن مقاومت سری در داخل محفظه نگه دارنده بافت، نزدیک به گانگلیون قرار داده می‌شد. جایگزینی محلولها با یکدیگر در داخل محفظه، از طریق یک پمپ پرفیوژن به سرعت ۴ میلی‌لیتر در دقیقه انجام می‌شد. پاسخ غشا سلول به صورت تغییرات ولتاژ با جریان با استفاده از یک مبدل آنالوگ به دیجیتال و دیجیتال به آنالوگ ۱۶ بیتی (LabMaster, Scientific solution) به صورت داده‌های رقمی در آمده و در یک کامپیوتر IBM Compatible از نوع Pentium ذخیره می‌گردید. تمهیدات نرم‌افزاری جهت ثبت و آنالیز بخشی از داده‌ها توسط دکتر محمد جعفرپور فیروزآبادی با استفاده از برنامه Matlab نوشته شده بود.

## \* Current Clamp

Current - Clamp روشی است که در آن با تزریق منظم جریانهای راست گوشه دپلاریزه‌کننده یا هیپرپلاریزه‌کننده، می‌توان بدون آنکه پتانسیل غشا کلمپ شود تغییرات آن را مشاهده کرد به عبارت دیگر در این روش وسیله‌ای برای برانگیختن پاسخهای ولتاژی

1. Low-Voltage Activated
2. High-Voltage Activated

نتایج حاصل از کلمپ ولتاژ و ثابت زمانی فعال شدن و غیر فعال شدن جریان کلسیمی به کمک نرم افزار Matlab مورد بررسی قرار گرفت و از برنامه Excel و Spss و Instat برای محاسبه میانگین و انحراف معیار داده‌ها و رسم منحنی‌ها استفاده شد. برنامه آماری مورد استفاده Paired t-test بود و سطح معنی‌دار (P) کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. در داده‌های حاصل از ثبت Voltage-Clamp، برای استخراج جریان خالص کلسیمی، جریان ظرفیتی تا آنجا که ممکن بود با استفاده از Capacitance Neutralization کاهش داده می‌شد.

در این کار تحقیقاتی برای پردازش داده‌ها، از معادلات نمایی زیر استفاده شد:

$$I = A_0 + A_1 \exp^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 \exp^{-\frac{t}{\tau_2}} + \dots$$

که در این معادله  $A_0$ ،  $A_1$  و  $A_2$  دامنه جریان در زمان صفر و  $\tau$  زمان و  $\tau_1$  و  $\tau_2$  ثابت زمانی است. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$  ارائه گردیده‌است.

### یافته‌ها

#### \* ثبت پتانسیل‌های عمل کلسیمی در نورونهای $F_1$

ثبت پتانسیل‌های عمل کلسیمی<sup>۱</sup> در نورون  $F_1$  پس از حذف جریانهای وابسته به ولتاژ رو به داخل سدیمی و رو به خارج پتاسیمی انجام شد. تحت این شرایط، زمانیکه پتانسیل استراحت غشا به طور متوسط  $1/4 \pm 35/3$  میلی‌ولت بود، پتانسیل‌های عمل کلسیمی خود به خودی ظاهر می‌شدند. (شکل ۱A، n=۸). وجود کفه در پتانسیل‌های عمل کلسیمی آنها را از پتانسیل عمل خود به خودی سدیمی ثبت شده در رینگ استاندارد متمایز می‌کرد. از آنجایی که متوسط آستانه شلیک (Firing)  $1/28 \pm 32/14$  میلی‌ولت بود، می‌توان آنها را قله‌های کلسیمی با آستانه بالا (High threshold  $\text{Ca}^{2+}$  spikes) نامید (۳، ۱۷).

#### \* ویژگیهای فارماکولوژیکی پتانسیل‌های عمل کلسیمی نورون $F_1$

پتانسیل‌های عمل کلسیمی نورون  $F_1$  تنها پس از مهار جریانهای سدیمی و پتاسیمی ظاهر می‌شدند. افزودن مهارکننده اختصاصی جریان کلسیمی با آستانه بالا نوع I، نیفدیبین (۱ میکرومولار)، به محلول فاقد سدیم و پتاسیم ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+ + \text{free}$ )، موجب کاهش دامنه ( $P < 0.01$ ) و زمان تأخیر آستانه پتانسیل عمل کلسیمی ( $P < 0.05$ ) و افزایش آستانه پتانسیل عمل کلسیمی ( $P < 0.05$ ) و حذف کفه شد (جدول ۱)، اما نتوانست آن را به طور کامل از بین ببرد و فعالیت خود به خودی سلول ادامه داشت (شکل ۱B).

غشا فراهم می‌شود. در این مطالعه، پتانسیل عمل خود به خودی سلول در رینگ استاندارد قبل و بعد از حذف جریانهای سدیمی و پتاسیمی ثبت شد و ویژگیهای آن مورد بررسی قرار گرفت. مدت پتانسیل عمل در نصف حداکثر دامنه پتانسیل عمل (Half-maximal amplitude) از سطح پتانسیل استراحت غشا تا قله پتانسیل عمل محاسبه شدند.

### Voltage Clamp \*

در روش Voltage - Clamp جریان به عنوان یک محرک به کار برده می‌شود و تغییرات پتانسیل غشا اندازه‌گیری می‌گردد. در این مطالعه با استفاده از ولتاژ کلمپ دو الکترودی (Standard two Electrodes Voltage-Clamp)، ویژگیهای بیوفیزیکی و الکترو فیزیولوژیکی جریان کلسیمی با آستانه بالا نوع I مورد بررسی قرار گرفت. در روش اول برای کلمپ ولتاژ غشا جسم سلولی نورون  $F_1$  پتانسیل‌های فرمانی دپلاریزه کننده راست گوشه با مرحله بالای و پایین‌رو مربعی و کفه ۳۹۰ میلی‌ثانیه‌ای (Rectangular Command potential) و در روش دوم برای کلمپ ولتاژ، پتانسیل‌های فرمانی شبه دوزنده‌ای با مرحله بالای مربعی، کفه ۳۹۰ میلی‌ثانیه‌ای و مرحله پایین رو نمایی (Exponential trailing phase) به کار گرفته شد. در هر دو روش پتانسیل غشا با استفاده از مراحل ۱۰ میلی‌ولتی به مدت ۳۹۰ میلی‌ثانیه از پتانسیل‌های نگه دارنده -۴۰ و -۹۰ میلی‌ولت تا پتانسیل +۹۰ میلی‌ولت دپلاریزه می‌شد. همراه با تغییر ولتاژ غشا، مهارکننده‌های جریانهای پتاسیمی و کلسیمی نیز به محلول خارج سلولی افزوده می‌شد. محلولهای لازم برای آزمایش جریانهای کلسیمی ترکیب رینگ استاندارد خارج سلولی برقرار زیر بود:

NaCl (۸۰ میلی‌مولار)،  $\text{CaCl}_2$  (۱۰ میلی‌مولار)،  $\text{MgCl}_2$  (۵ میلی‌مولار)، KCl (۴ میلی‌مولار)، گلوکز (۱۰ میلی‌مولار) و HEPES<sup>۱</sup> (۵ میلی‌مولار) (۲۷).

در محلول فاقد سدیم-پتاسیم، TEA<sup>۲</sup> (۸۴ میلی‌مولار) جایگزین پتاسیم و سدیم خارج سلولی می‌شد همچنین جریانهای رو به خارج پتاسیمی، از طریق تزریق اینتروز TEA آن به داخل جسم سلولی نورون  $F_1$  (۵/۵ مولار، با جریان +۵ نانوآمپر به مدت ۱۵ دقیقه)، و افزودن 4-AP<sup>۳</sup> (۵ میلی‌مولار)، به محلول پرفیوژن نیز مهار می‌گردید. برای مهار جریان کلسیمی فعال شده در ولتاژهای بالا (HVA) از Nifedipine (۱ میکرومولار) محلول در اتانول ۰/۳ درصد به صورت خارج سلولی استفاده شد. اسمولاریته محلولهای مورد استفاده توسط اسمومتر (Osmo mat 030 Gonotec Co.) اندازه‌گیری شد. اسمولاریته رینگ استاندارد  $250 \pm 1/7$  و اسمولاریته رینگ فاقد سدیم و پتاسیم  $196 \pm 1/45$  میلی‌اسمول بر کیلوگرم آب بود. تنظیم pH محلولهای مورد استفاده در حد ۷/۸-۷/۶ از طریق Trizma base و Trizma hydrochloride انجام می‌شد. مواد شیمیایی مورد نیاز از کارخانه سیگما و آلدردیج تهیه شده‌بود.

### \* روشهای تجزیه و تحلیل داده‌ها

1. 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic- acid
2. Tetraethylammonium chloride
3. 4-Aminopyridine
4. Calcium spikes



جدول ۱: بررسی ویژگیهای پتانسیل عمل خودبخودی نوروں F<sub>1</sub> در رینگ استاندارد و رینگ فاقد سدیم و پتاسیم قبل و بعد از اضافه کردن نیفدیپین

محلون	دامنه پتانسیل عمل (mV)	مدت پتانسیل عمل (ms)	فرکانس پتانسیل عمل (HZ)	آستانه پتانسیل عمل (mV)	زمان تاخیر عمل (ms)
رینگ استاندارد	61/03 ± 2/28	6107 ± 189	4/14 ± 0/7	-33/85 ± 2/12	22/66 ± 5/29
رینگ فاقد سدیم و پتاسیم	75/05 ± 3/63**	229/6 ± 13/2**	1/1 ± 0/1**	-31/14 ± 1/28	97/6 ± 5/88**
رینگ فاقد سدیم و پتاسیم + نیفدیپین	51/3 ± 2/03***	183/8 ± 2/47***	1/2 ± 0/1**	-27 ± 1/6*	53/2 ± 15/22**

**روش الکتروفیزیولوژیک**

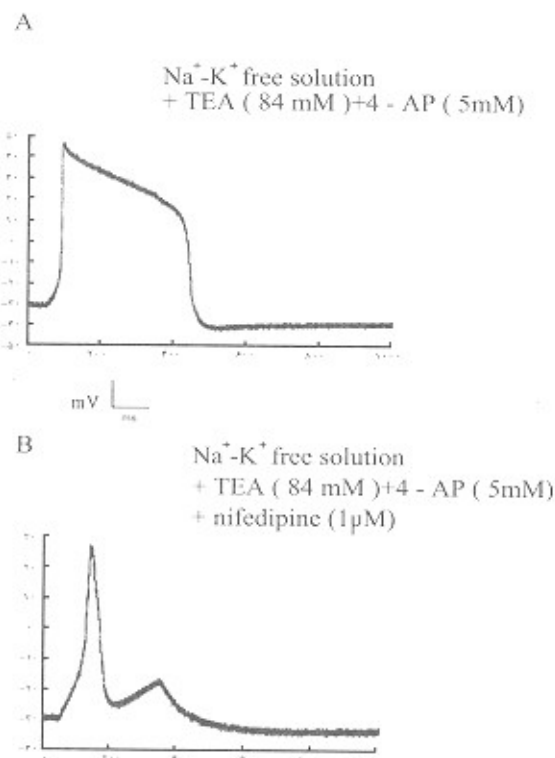
در رینگ فاقد سدیم و پتاسیم برای تفکیک جریان کلسیمی با آستانه بالا از نوع L از جریان کلسیمی با آستانه پایین از پتانسیل نگهدارنده -40 میلی ولت استفاده شد. در پتانسیلهای فرمانی دیپلاریزه کننده -40 تا +90 میلی ولت، حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و ولتاژ آستانه به ترتیب 3/54 ± 0/94 - نانوآمپر، 7/17 ± 1/02 و 32/53 ± 1/66 میلی ولت و پتانسیل معکوس آن در حدود +40 میلی ولت بود. شکل 2A و B به ترتیب جریان رو به داخل کلسیمی را در ولتاژهای مختلف از پتانسیل نگهدارنده -40 میلی ولت و ارتباط ولتاژ - جریان را در این پتانسیل نگهدارنده نشان می دهد (n = 8).

**روش فارماکولوژیک**

در این روش تأثیر آنتاگونیست اختصاصی و انتخابی جریان کلسیمی با آستانه بالا نوع L مورد بررسی قرار گرفت. در پتانسیل نگهدارنده -90 میلی ولت، نیفدیپین (1 میکرومولار)، آنتاگونیست اختصاصی کانالهای کلسیمی نوع L 60 درصد جریان کلسیمی را مهار کرد و در پتانسیل نگهدارنده -40 میلی ولت، 50 درصد جریان حداکثر بوسیله نیفدیپین مهار شد. در پتانسیل نگهدارنده -90 میلی ولت متوسط حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و آستانه فعال شدن جریان مقاوم به نیفدیپین به ترتیب 1/78 ± 0/3 - نانوآمپر، 2/78 ± 3/73 و 28/94 ± 2/50 - میلی ولت بود و پتانسیل معکوس آن در حدود +38 میلی ولت بود (شکل 3A، n = 7). در پتانسیل نگهدارنده -40 میلی ولت متوسط حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و آستانه فعال شدن این جریان به ترتیب 1/77 ± 0/40 - نانوآمپر، 4/17 ± 1/66 و 27/85 ± 1/95 - میلی ولت بود و پتانسیل معکوس آن در حدود +35 میلی ولت بود (شکل 3B، n = 7).

**ثابت زمانی فعال شدن و غیر فعال شدن جریان کلسیمی**

در حضور 10 میلی مولار کلسیم خارج سلولی، ثابت زمانی فعال شدن و افت جریان کلسیمی در پتانسیل نگهدارنده -40 میلی ولت با استفاده از بیش از یک جزء نمایی (Exponential component) به دست آمد (n > 1)، به عبارت دیگر فعال و غیر فعال شدن جریان کلسیمی مستلزم بیش از یک ثابت زمانی بود. ثابت زمانی فعال شدن جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L در -21 میلی ولت، 3/06 ± 0/33



شکل ۱: فعالیت خود به خودی نوروں F<sub>1</sub> در رینگ فاقد سدیم و پتاسیم قبل (A) و بعد از اضافه کردن نیفدیپین به مایع خارج سلولی (B) ادامه می یابد.

بررسی ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک جریان کلسیمی با آستانه بالا نوع L در جسم سلولی نوروں F<sub>1</sub> با استفاده از روش Two-electrode voltage clamp

**\* الف - روش متداول استفاده از پتانسیلهای فرمانی دیپلاریزه کننده راست گوشه**

- در رینگ فاقد سدیم و پتاسیم، پس از حذف جریانهای رو به خارج پتاسیمی و جریان رو به داخل سدیمی، 65 درصد جریان رو به داخل باقی ماند که احتمالاً توسط یون کلسیم حمل می شد. به منظور شناسایی انواع کانالهای کلسیمی در جسم سلولی نوروں F<sub>1</sub> از دو روش استفاده شد:



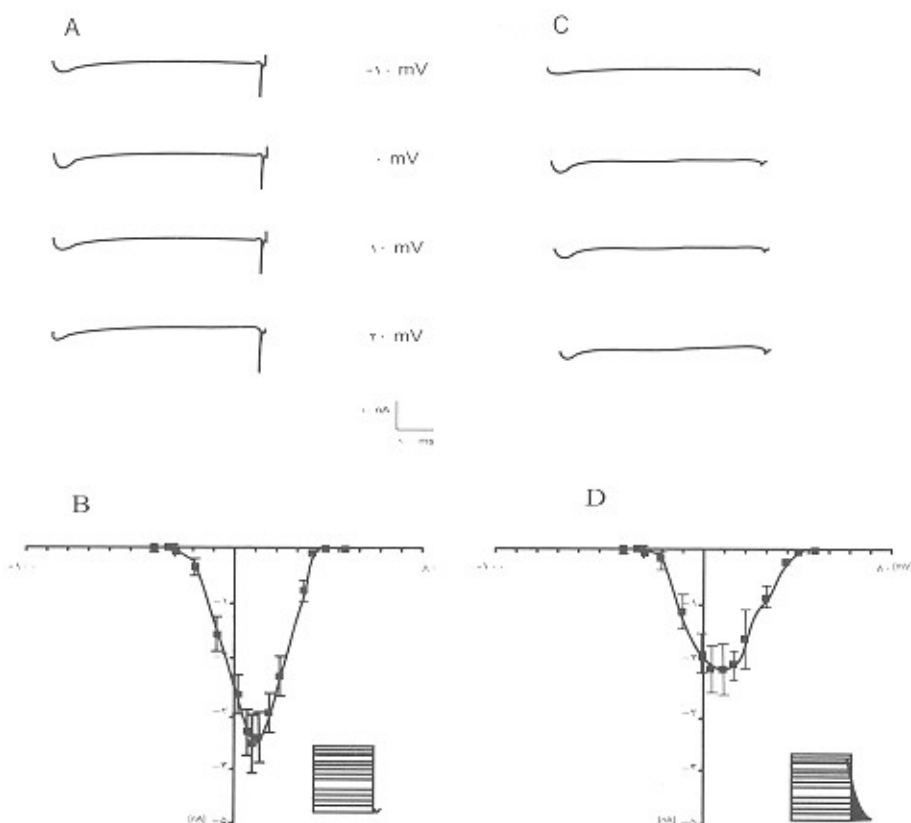
فارماکولوژیک استفاده شد:

### روش الکتروفیزیولوژیک

در این روش اثر پتانسیل نگهدارنده  $-40$  میلی‌ولت بر جریان کلسیمی مورد بررسی قرار گرفت. از پتانسیل نگهدارنده  $-40$  میلی‌ولت ( $-40$  تا  $+90$  میلی‌ولت)، حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و ولتاژ آستانه به ترتیب  $2/29 \pm 0/41$  نانوآمپر،  $4/41 \pm 2/69$  و  $2/53 \pm 2/75$  میلی‌ولت و پتانسیل معکوس آن در حدود  $+50$  میلی‌ولت بود (شکل 2C و 2D).

میلی‌ثانیه و در  $+10$  میلی‌ولت،  $1/1 \pm 0/46$  میلی‌ثانیه بود، چنانکه در پتانسیلهای مثبت‌تر سرعت فعال شدن جریان کلسیمی بیشتر می‌شد.

افت جریان کلسیمی به کاهش این جریان در طول دپلاریزاسیون غشا بوسیله پتانسیلهای فرمانی اطلاق می‌شود. این پدیده را می‌توان به صورت کاهش جریان در طول دپلاریزاسیون یا کاهش حداکثر جریان کلسیمی در طول مرحله بعدی دپلاریزاسیون دید. از طرف دیگر ثابت زمانی افت جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L در  $-10$  میلی‌ولت،  $41/1 \pm 15/3$  میلی‌ثانیه و در صفر میلی‌ولت،  $105 \pm 19/5$  میلی‌ثانیه بود، به عبارت دیگر سرعت غیر فعال شدن جریان کلسیمی بسیار



شکل 2. ثبت جریانهای کل رو به داخل کلسیمی (A) جسم سلولی نورون فعالیت خود به خودی نورون  $F_1$  در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم قبل (2A) و ارتباط جریان آنها (2B) در رینگر فاقد سدیم - پتاسیم. ثبت کل جریانهای رو به داخل کلسیمی (B) جسم سلولی نورون  $F_1$  در پتانسیلهای فرمانی نیمه نودنقه‌های مختلف از پتانسیل نگهدارنده  $-40$  میلی‌ولت (2C) و ارتباط جریان - ولتاژ آنها (2D) در رینگر فاقد سدیم - پتاسیم

### روش فارماکولوژیک

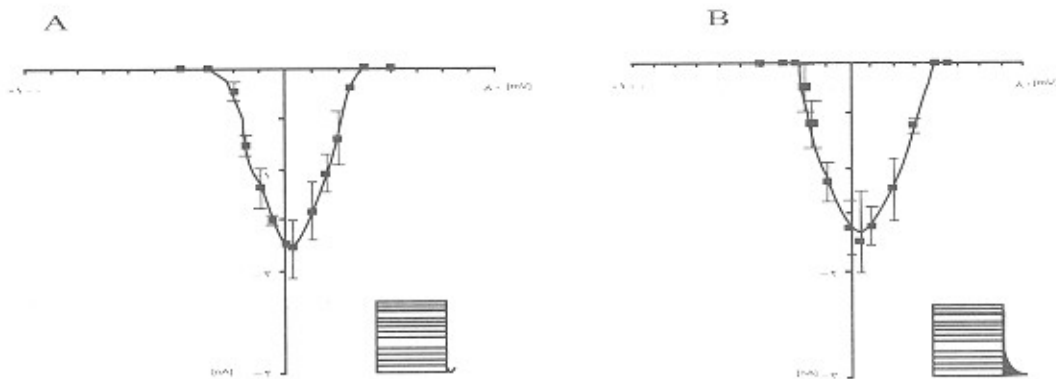
- در حضور نیفدپین از پتانسیل نگهدارنده  $-90$  میلی‌ولت متوسط حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و آستانه فعال شدن جریان مقاوم به نیفدپین به ترتیب  $1/78 \pm 0/71$  نانوآمپر،  $4/64 \pm 3/65$  و  $2/67 \pm 0/74$  میلی‌ولت بود و پتانسیل معکوس آن در حدود  $+45$  میلی‌ولت بود (شکل 3B) ( $n=7$ ).

از پتانسیل نگهدارنده  $-40$  میلی‌ولت متوسط حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و آستانه فعال شدن این جریان به ترتیب  $1/36 \pm 0/45$  نانوآمپر،  $5/94 \pm 2/50$  و  $2/22 \pm 0/55$  میلی‌ولت بود و پتانسیل معکوس آن در حدود  $+45$  میلی‌ولت بود (شکل 3B).

کمتراز سرعت فعال شدن آن بود. در پتانسیلهایی که نسبت بیزان جریان کلسیمی به اغتشاش (Signal/Noise) بسیار کم بود (منفی‌تر از  $-10$  میلی‌ولت و مثبت‌تر از  $+20$  میلی‌ولت) عمل برازش انجام شدنی نبود.

### \* ب - روش جدید استفاده از پتانسیلهای فرمانی دپلاریزه‌کننده شبه دوزنقه‌ای

در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم به منظور شناسایی انواع کانالهای کلسیمی در جسم سلولی نورون  $F_1$  با استفاده از پتانسیلهای فرمانی شبه دوزنقه‌ای همچون روش متداول، از روش الکتروفیزیولوژیک و



شکل ۳: ارتباط جریان - ولتاژ جریان کلسیمی مقاوم به نیفدیپین جسم سلولی نورون F<sub>1</sub> در پتانسیلهای فرمانی راست گوشه مختلف از پتانسیل نگهدارنده -۹۰ میلی‌ولت (A) و ارتباط جریان - ولتاژ این در پتانسیلهای فرمانی نیمه دوزنقه‌ای مختلف از پتانسیل نگهدارنده -۹۰ میلی‌ولت (B) پس از افزودن نیفدیپین (۱ میکرومولار) به رینگر فاقد سدیم - پتاسیم



شکل ۴: ارتباط جریان - ولتاژ جریان کلسیمی مقاوم به نیفدیپین جسم سلولی نورون F<sub>1</sub> در پتانسیلهای فرمانی راست گوشه مختلف از پتانسیل نگهدارنده -۲۰ میلی‌ولت (A) و ارتباط جریان - ولتاژ این جریان در پتانسیلهای فرمانی نیمه دوزنقه‌ای مختلف از پتانسیل نگهدارنده -۲۰ میلی‌ولت (B) پس از افزودن نیفدیپین (۱ میکرومولار) به رینگر فاقد سدیم - پتاسیم

۳۸

جدول ۱: مقایسه ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک جریانهای رو به داخل جسم سلولی نورون F<sub>1</sub> در پتانسیلهای نگهدارنده -۹۰ و -۴۰ میلی‌ولت در رینگر استاندارد و رینگر فاقد سدیم و پتاسیم قبل و بعد از اضافه کردن نیفدیپین با استفاده از پتانسیلهای فرمانی نیمه دوزنقه‌ای و مستطیلی

پتانسیل نگهدارنده (mV)	رینگر استاندارد	رینگر فاقد سدیم - پتاسیم	رینگر فاقد سدیم - پتاسیم + نیفدیپین	استانده جریان (mV)	ولتاژ جریان حداکثر (mV)	جریان حداکثر (nA)
-۹۰	-۴۴/۵۴ ± ۴/۵۲	۴۷/۸۷ ± ۴/۱۱	-۲۸/۹۴ ± ۲/۵۰	Rectangular	Quasitrapezoidal	۹۰
-۹۰	-۵۲/۴۲ ± ۵/۲۰	-۳۵/۲۷ ± ۳/۸۳	-۲۴/۰۷ ± ۲/۶۷	Rectangular	Quasitrapezoidal	۹۰
-۹۰	-۱/۶۳ ± ۰/۷۳	۶/۱۴ ± ۱/۲۲	۲/۷۸ ± ۰/۷۴	Rectangular	Quasitrapezoidal	۹۰
-۹۰	-۵/۶۵ ± ۰/۵۲	۵/۲۸ ± ۱/۲۷	۲/۶۴ ± ۳/۶۵	Rectangular	Quasitrapezoidal	۹۰
-۹۰	-۲/۱۵ ± ۱/۱۵	-۲/۸۱ ± ۰/۹۶	-۱/۶۱ ± ۰/۷۸	Rectangular	Quasitrapezoidal	۹۰
-۴۰	-۳۳/۵۰ ± ۱/۷۹	-۲۲/۵۳ ± ۱/۶۶	-۲۷/۸۵ ± ۱/۹۵	Rectangular	Quasitrapezoidal	۴۰
-۴۰	-۴۴/۳۸ ± ۱/۵۳	-۲۸/۷۵ ± ۲/۵۳	-۲۲/۰۵ ± ۲/۳۹	Rectangular	Quasitrapezoidal	۴۰
-۴۰	-۵/۳۷ ± ۱/۷۰	۷/۱۷ ± ۱/۲۰	۳/۱۷ ± ۱/۶۶	Rectangular	Quasitrapezoidal	۴۰
-۴۰	-۸/۳۳ ± ۲/۵۳	۶/۴۱ ± ۲/۶۹	۵/۹۴ ± ۲/۵۰	Rectangular	Quasitrapezoidal	۴۰
-۴۰	-۶/۲۵ ± ۱/۲۰	۳/۵۴ ± ۰/۵۴	-۱/۷۷ ± ۰/۴۰	Rectangular	Quasitrapezoidal	۴۰
-۴۰	-۳/۶۱ ± ۱/۳۳	-۲/۲۹ ± ۰/۴۱	-۱/۳۶ ± ۰/۴۵	Rectangular	Quasitrapezoidal	۴۰

دست آمد ( $n > 1$ ). ثابت زمانی فعال شدن جریان کلسیمی در ۲۱- میلی‌ولت،  $1/17 \pm 4/11$  میلی‌ثانیه و در  $10 +$  میلی‌ولت،  $0/97 \pm 2/15$  میلی‌ثانیه بود، چنانکه در پتانسیلهای مثبت‌تر سرعت فعال شدن جریان کلسیمی بیشتر می‌شد. ثابت زمانی افت جریان کلسیمی در ۲۱- میلی‌ولت،

ثابت زمانی فعال شدن و غیر فعال شدن جریان کلسیمی ثبت شده با استفاده از پتانسیلهای فرمانی شبه دوزنقه‌ای: در حضور  $10$  میلی‌مولار کلسیم خارج سلولی، ثابت زمانی فعال و غیر فعال شدن جریان کلسیمی در پتانسیلهای نگهدارنده -۹۰ و -۴۰ با استفاده از بیش از یک جزء نمایی (Exponential component) به

می‌توان نتیجه گرفت که ۳۷ تا ۶۲ درصد جریان کلسیمی غشا جسم سلولی نوروں  $F_1$  از نوع جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که جسم سلولی نوروں  $F_1$  دارای حداقل دو نوع جریان کلسیمی با آستانه بالا (جریان حساس به نیفدین یا نوع L و احتمالاً جریان نوع N) است. ویژگیهای الکترو فیزیولوژیکی این جریانها که از طریق پتانسیلهای فرماتی شبه دوزنقه‌ای از پتانسیلهای نگهدارنده -۹۰ و -۴۰ میلی‌ولت (به ویژه -۴۰ میلی‌ولت) ثبت شده‌اند با آنچه با استفاده از پتانسیلهای فرماتی راست گوشه ثبت شده‌اند یکسان نیست چنانکه پتانسیل فرماتی شبه دوزنقه‌ای ولتاژ آستانه جریان کلسیمی را مثبت‌تر (۲ تا ۴ میلی‌ولت) و ولتاژ جریان حداکثر را منفی‌تر (۱ تا ۳ میلی‌ولت) ساخت. به علاوه میزان جریان کلسیمی که بوسیله پتانسیلهای فرماتی شبه دوزنقه‌ای حاصل می‌شد ۳۶ درصد ( $P < 0.05$ ) کمتر از آنچه که بوسیله پتانسیلهای فرماتی راست گوشه ثبت می‌شد بود. به نظر می‌رسد که با توجه به ثابت زمانی افت جریان کلسیمی، مرحله پایین رو نمایی پتانسیلهای فرماتی شبه دوزنقه‌ای به تدریج تعداد کانالهای کلسیمی که قادر به باز شدن از طریق مرحله بالارو مربعی بعدی می‌باشند را کاهش می‌دهد و در هر مرحله تعداد کانالهایی که در مرحله غیر فعال خود می‌باشند را افزایش می‌دهد. به عبارت دیگر افت آهسته پتانسیلهای فرماتی شبه دوزنقه‌ای De-inactivation کانالهای کلسیمی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همانطور که اشاره شد از آنجائیکه این نتایج در پتانسیل نگهدارنده -۴۰ میلی‌ولت قابل ملاحظه‌تر بود بنابراین به نظر می‌رسد نتایج مشاهده شده بیشتر به علت تأثیر پتانسیلهای فرماتی شبه دوزنقه‌ای بر جریانهای کلسیمی HVA از جمله نوع L باشد. در حضور نیفدین، پتانسیل فرماتی شبه دوزنقه‌ای ولتاژ آستانه جریان مقاوم به نیفدین و ولتاژ حداکثر جریان را مثبت‌تر کرده (۴ تا ۵ میلی‌ولت) ولی مقدار جریان ثبت شده از طریق این پتانسیلها با آنچه که بوسیله پتانسیلهای راست گوشه ثبت می‌شد تفاوت چندانی نداشت. با توجه به ثابت زمانی افت جریان مقاوم به نیفدین به نظر می‌رسد مرحله نمایی پتانسیل فرماتی نیمه دوزنقه‌ای این جریان کلسیمی را آهسته‌تر غیر فعال ساخته است به همین دلیل با آنکه پتانسیلهای فرماتی شبه دوزنقه‌ای جریان کلسیمی مقاوم به نیفدین را با سرعت کمتر فعال ساخته و به حداکثر خود رسانده است ولی میزان جریان به دست آمده از طریق دو نوع پتانسیل فرماتی تقریباً یکسان هستند.

تجربه حاضر نشان داد که می‌توان با استفاده از اشکال متفاوت امواج کلمپ کننده ولتاژ نه تنها اطلاعات بیشتری از کینتیک کانالهای یونی به دست آورد بلکه بدون استفاده از عوامل شیمیایی و تنها با تغییر برخی از ویژگیهای بیوفیزیکی کانالها می‌توان بر نحوه عملکرد آنها تأثیر گذاشت و بدین ترتیب می‌توان کانال خاصی را فعال یا غیرفعال نمود.

$12/22 \pm 56/01$  میلی‌ثانیه و در  $23 \pm$  میلی‌ولت،  $164/44 \pm 0/79$  میلی‌ثانیه بود. در حضور نیفدین ثابت زمانی فعال شدن جریان کلسیمی مقاوم به نیفدین ثبت شده به وسیله پتانسیلهای فرماتی راست گوشه و شبه دوزنقه‌ای در  $24 \pm$  میلی‌ولت به ترتیب  $1/52 \pm 0/54$  و  $3/99 \pm 0/66$  میلی‌ثانیه و در  $4 \pm$  میلی‌ولت به ترتیب  $9/05 \pm 4/15$  و  $16/31 \pm 2/69$  میلی‌ثانیه بود. ثابت زمانی افت این جریان در  $5 \pm$  میلی‌ولت به ترتیب  $14/27 \pm 1/38$  و  $76/89 \pm 6/77$  میلی‌ثانیه بود. خلاصه نتایج حاصل از کلمپ ولتاژ به وسیله دو روش تحریکی متداول در جدول ۲ آمده است.

## بحث

در حال حاضر یکی از روشهای متداول جهت فعال ساختن مجزا و متناوب دو گروه از اکسونها در بک تنه عصبی استفاده از امواج شبه دوزنقه‌ای و راست گوشه برای تحریک اکسونهای کوچک و بزرگ می‌باشد (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵)، با وجود استفاده گسترده از امواج نیمه دوزنقه‌ای در تحریک انتخابی فیبرهای عصبی، تاکنون مکانیسم تأثیر مستقیم این امواج بر جریانهای یونی غشا مورد بررسی قرار نگرفته است. از آنجایی که جریانهای یونی غیر خطی می‌باشند و تحت تأثیر ویژگیهای امواج تحریک کننده قرار می‌گیرند، بنابراین به نظر می‌رسد تغییر شکل پتانسیلهای فرماتی دپلاریزه کننده برای کلمپ ولتاژ بتواند با تأثیر بر کینتیک فعال و با غیر فعال شدن کانالهای یونی غشا موجب تغییر رفتار آنها شده و عملکرد هر یک از آنها را در شرایط مختلف روشن سازد. در این مطالعه جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L جسم سلولی نوروں  $F_1$  با استفاده از Two electrode voltage clamp و مهارکننده‌های کانالهای وابسته به ولتاژ پتاسیمی و کلسیمی ثبت شدند و تأثیر دو شکل متفاوت از پتانسیلهای فرماتی بر ویژگیهای الکترو فیزیولوژیکی این جریان بررسی شد.

- مقایسه اثر دو شکل از پتانسیلهای فرماتی بر جریان رو به داخل کلسیمی با آستانه بالای نوع L در جسم سلولی نوروں  $F_1$ . نتایج حاصل از کلمپ ولتاژ به وسیله هر دو شکل از پتانسیلهای فرماتی نشان داد که در جسم سلولی نوروں  $F_1$  پس از حذف جریانهای رو به خارج پتاسیمی و جریان رو به داخل سدیمی، جریان رو به داخل باقیمانده که تقریباً ۴۰ تا ۶۵ درصد کل جریان رو به داخل را به خود اختصاص می‌دهد متعلق به جریان رو به داخل کلسیم است زیرا این جریان تنها در شرایطی آشکار می‌شود که جریانهای رو به خارج پتاسیمی و جریان رو به داخل سدیمی مهار شود. به علاوه از آنجایی که افزودن نیفدین مهارکننده اختصاصی جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L موجب مهار تقریباً ۳۷ تا ۶۲ درصد جریان کلسیمی می‌گردد

## References

- Chen L, El-sheerif N, Boutjdir M: Unitary current analysis of L-type  $Ca^{2+}$  channels in human fetal ventricular myocyte. J Cardiovascular Electrophysiol 1999; 10(4): 692-700
- Fieber LA: Characterization of  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  currents in bag cells of sexually immature aplysia californica. J Exp Biol 1998; 201: 745-754
- Foehring RC, Armstrong WE: Pharmacological

- dissection of high-voltage-activated  $Ca^{2+}$  current types in acutely dissociated rat supraoptic magnocellular neurons. *J Neurophysiol* 1996; 76(2): 977-983
4. Gao BX, Ziskind-Conhainn L: Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 1998; 80(6): 3047-3061
5. Haydon PG, Man-Son-Hing H: Low- and High-Voltage-Activated calcium currents: Their relationship to the site of neurotransmitter release in an identified neuron of *Helisoma*. *Neuron* 1988; 1: 919-927
6. Huang SJ, Robinson DW: Activation and inactivation properties of voltage-gated calcium currents in developing cat retinal ganglion cells. *Neuroscience* 1998; 85(1): 239-247
7. Yarri Y, Hamon B, Lux HD: Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 1987; 235: 680-682
8. Matteson DR, Armstrong CM: Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J Gen Physiol* 1986; 87: 161-182
9. Benham CD, Hess P, Tsien RW: Two types of calcium channels in single muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Cir Res* 1987; 61: 1-10, 1-16
10. Yu B, Shinnick-Gallagher P: Dihydropyridine and neurotoxin-sensitive and insensitive calcium currents in acutely dissociated neurons of the rat central amygdala. *J Neurophysiol* 1997; 77(2): 690-701
11. Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ: Exocytotic  $Ca^{2+}$  channels in mammalian central neurons. *Trends in Neuroscience* 1995; 18: 89-98
12. Kammermeier PJ, Jones SW: High-voltage activated calcium currents in neurons acutely isolated from the ventrobasal nucleus of the rat thalamus. *J Neurophysiol* 1997; 77(1): 465-475
13. Mintz IM, Adams ME, Bean BP: P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 1992; 9: 85-95
۱۴. بلوچ نژاد مجرد توراندخت، جان احمدی مہیار: بررسی ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک و فارماکولوژیک جریانهای کلسیمی و نقش آنها در تحریک پذیری سلول  $F_1$  در حلزون باغی (*Helix aspersa*) با استفاده از روش ثبت داخل سلولی (Current and Voltage - Clamp). پژوهنده ۱۳۷۸؛ ۱۴: ۱۳۰-۱۲۱
15. Raman IM, Bean BP: Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar purkinje neurons. *J Neurosci* 1999; 19(5): 1663-1674
16. Shuttleworth CW, Smith TK: Action potential-dependent calcium transients in myenteric S neurons of the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 1999; 92(2): 751-762
17. Sundgren-Andersson AK, Johansson S: Calcium spikes and calcium currents in neurons from the medial preoptic nucleus of rat. *Brain Res* 1998; 783: 194-209
18. Tennigkeit F, Schwarz DW, Puil E: Modulation of bursts and high-threshold calcium spikes in neurons of rat auditory thalamus. *Neuroscience* 1998; 83(4): 1063-1073
19. Viana F, Bayliss DA, Berger AJ: Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 1993; 69: 2137-2149
20. Zhan XJ, Cox CL, Rinzel J, Sherman SM: Current clamp and modeling studies of low-threshold calcium spikes in cells of the cat's lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol* 1999; 81(5): 2360-2373
21. Swandulla D, Lux HD: Activation of a nonspecific cation conductance by intracellular  $Ca^{2+}$  elevation in bursting pacemaker neurons of *Helix pomatia*. *J Neurophysiol* 1985; 54: 1430-1443
22. Fang ZP, Mortimer JT: Alternate excitation of large and small axons with different stimulation waveform: an application to muscle activation. *Med Biol Eng Comput* 1991a; 29: 543-547
23. Fang ZP, Mortimer JT: Selective activation of small motor axons by quasitrapezoidal current pulses. *IEEE Trans Biomed Eng* 1991b; 38: 168-174
24. Gorman PH, Mortimer JT: Effect of stimulus parameters on recruitment with direct nerve stimulation. *IEEE Trans Biomed Eng* 1986; 30: 407-414
25. Fang ZP, Mortimer JT: A method to effect physiological recruitment order in electrically activated muscle. *IEEE Trans Biomed Eng* 1991c; 35(2): 175-179
26. Kerkut GA, Lambert JDC, Gayton RJ, Loker JE, Walker RJ: Mapping of nerve cells in the sub-oesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol* 1975; 50A: 1-25
27. Taylor PS: Selectivity and patch measurement of A-current in *Helix aspersa* neurones. *J Physiol* 1987; 388: 437-447

