

بررسی اثر سرب بر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک جریان‌های کلسیمی نورون F77 حلزونی باغی (*Helix aspersa*)

پروین زارعیان^۱، مهیار جان احمدی^۱، سید محمد فیروزآبادی^۱، فرشته معتمدی^۱
۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، بخش فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب
۲- دانشگاه تربیت مدرس، بخش فیزیولوژی پزشکی

چکیده

کانال‌های یونی عملکرد سلول در بافت‌های تحریک پذیر چون قلب و مغز و نیز در اندام‌ها و بافت‌های تحریک ناپذیری همچون کبد و بافت پوششی را کنترل می‌کنند. در تحقیق حاضر، اثر سرب بر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک جریان‌های کلسیمی در غشاء جسم سلولی نورون F77 حلزون باغی (*Helix aspersa*) مورد بررسی قرار گرفت. پتانسیل عمل و جریان‌های کلسیمی در حضور و عدم حضور سرب با استفاده از روش‌های ثبت دو میکروالکترودی (Current Clamp و Voltage Clamp) مورد مطالعه قرار گرفت. دو نوع جریان کلسیمی فعال شده از ولتاژهای بالا (HVA) ثبت شد: جریان حساس به نیفدیپین و جریان مقاوم به نیفدیپین. کاربرد خارج سلولی سرب در غلظت‌های ۱/۶ و ۳ میکرومولار موجب تغییر الگوی شلیک سلول F77 شد. دامنه و طول مدت پتانسیل عمل کلسیمی نیز کاهش یافت. یافته‌های Voltage Clamp نشان داد که بیش از ۵۰٪ جریان کلسیمی نوع HVA به وسیله سرب مهار گردید. اثر مهار کنندگی سرب بر جریان کلسیمی وابسته به زمان می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل می‌توان نتیجه گیری کرد که احتمالاً سرب با تأثیر بر کانال‌های کلسیمی HVA به ویژه نوع L عمل می‌نماید. واژه‌های کلیدی: پتانسیل عمل، جریان کلسیمی، سرب، Current Clamp، Voltage Clamp.

مقدمه

نیست و اگر چه نشان داده شده است که یون سرب باعث مهار کانال‌های یونی از جمله کلسیم و پتاسیم می‌شود، لکن مکانیسم اثر و به ویژه نوع کانال یونی کلسیمی که تحت اثر مهار سرب قرار می‌گیرد، هنوز مشخص نشده است. بعضی از اثرات سمی این فلز می‌تواند به علت تداخل آن با جریان‌های یونی از جمله جریان‌های رو به داخل کلسیمی از غشاهای سلولی باشد [۳۱]. یون کلسیم نقش کلیدی در تنظیم و تعدیل تعداد

یون سرب فاقد عملکرد بیولوژیک و فوق العاده سمی است. علاوه بر این به آسانی از سد خون - مغز عبور می‌کند [۲۳]. مقادیر بالای سرب باعث اثرات متعددی از جمله تخریب گلبول‌های قرمز، عضلات، لوله گوارش و نیز آسیب‌های مغزی می‌شود. در کودکان سرب باعث کاهش فعالیت هوشمندانه، یادگیری، قدرت شنوایی و تشدید فعالیت بدنی (Hyperactivity) می‌گردد [۱۲]. با این حال جایگاه اثر سرب در مغز به خوبی روشن

دنبال استفاده حاد و افزایش جریان کلسیمی را به دنبال استفاده مزمن آن گزارش کرده‌اند [۱۶، ۹]. در این بررسی‌ها اثر سرب روی کل جریان کلسیمی بررسی شده، لکن نوع کانال کلسیمی را که بیشتر تحت تأثیر سرب قرار می‌گیرد هنوز مشخص نشده است.

هدف از این تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک‌های ثبت داخلی سلولی (Voltage and Current Clamp) شناسایی و تعیین انواع مختلف کانال‌های کلسیمی، مکانیسم اثر سرب و تأثیر آن روی خصوصیات کینتیکی و بیوفیزیکی کانال‌های کلسیمی و پتانسیل عمل کلسیمی (Ca^{2+} -Spike) است.

مواد و روش‌ها

الف - آماده سازی سلول: حلزون‌ها از باغ‌های شمال کشور جمع آوری شدند. بعد از برداشتن صدف حیوانات با استخوان شکن، گانگلیون Circum-oesophageal خارج شده و در محفظه ثبت که توسط Sylgard 184 (USA Dow Corning) پوشیده شده بود، قرار گرفت. آزمایش‌ها بر روی جسم سلولی نورون F77 واقع در گانگلیون حاشیه‌ای راست که در واقع بخشی از گانگلیون Cicrum-oesophageal حیوان است، انجام شد. تشخیص این نورون بر اساس موقعیت، اندازه ($120 \mu m$)، رنگ، داشتن رنگدانه، پتانسیل استراحت، شکل و مدت پتانسیل عمل انجام شد [۲۵]. بافت‌های پیوندی به صورت مکانیکی و بدون استفاده از آنزیم‌های هضم کننده، با استفاده از پنس‌های بسیار ظریف برداشته شدند.

ب - داروها و مواد شیمیایی بکار رفته: ترکیب مایع خارج سلولی طبیعی بر حسب میلی مول شامل، $NaCl: 80$ ، $KCl: 4$ ، $CaCl_2: 5$ ، $MgSO_4: 5$ ، Heps: 5 و

بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک از جمله ره‌ایش نوروترانسمیتر، یادگیری، حافظه، پیام رسانی عصبی و سلولی و نیز کنترل بیوشیمی سلول دارد [۴۰، ۳۸، ۲۴]. یون کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی وابسته به لیگاند، کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ و یا معاوضه کننده سدیم - کلسیم وارد سلول می‌شود.

کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ متعددی در سلول‌های عصبی مهره‌داران و بی مهرگان شناسایی شده‌اند و روش‌های بیوفیزیکی، فارماکولوژیکی و مولکولی جهت شناسایی و مجزا نمودن انواع مختلف جریان کلسیمی بکار گرفته شده است. با بکارگیری معیارهای بیوفیزیکی، دو نوع جریان کلسیمی وابسته به ولتاژ در بسیاری از سلول‌های عصبی شناسایی گردیده است: جریان کلسیمی فعال شده در ولتاژ پایین (Low Voltage Activated) و یا LVA جریان کلسیمی فعال شده در ولتاژ بالا یا HVA (High Voltage Activated) این دو از نظر پتانسیل فعال شدن، سرعت غیر فعال شدن و حساسیت به مهار کننده‌ها با هم فرق دارند. جریان‌های کلسیم LVA پتانسیل‌های هیپرپلاریزه تری نسبت به جریان‌های کلسیمی HVA فعال شده دارند و سریعاً غیر فعال می‌گردند [۴۳، ۳۵، ۳۰، ۱۵].

هر کدام از جریان‌های کلسیمی نقش خاصی در عمل سلولی دارند. کانال‌های کلسیمی HVA در القاء تقویت دراز مدت (LTP) و ره‌ایش نوروترانسمیتر [۲۷، ۲۳] و کانال کلسیمی نوع T در رشد سلول، ترشح هورمون‌ها از سلول‌های نورواندوکرین، فعالیت ریتمیک در بعضی ساختمان‌های عصبی و سلول‌های مولد ضربان قلب [۱۵] نقش دارند.

مطالعات پیشین تأثیر سرب را بر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، کاهش در دامنه جریان کلسیمی را به

۱۰ برابر و فیلتراسیون ۳۰ کیلوهرتز اندازه گیری می‌گردید. الکتروود مرجع یا پل آگاری حاوی KCl سه مولار و سیم نقره روکش شده توسط AgCl از یک طرف در محلول خارج سلولی قرار می‌گرفت و از طرف دیگر به وسیله میکروالکتروود ثبت کننده ground می‌شد. با استفاده از روش‌های Current Clamp و Voltage Clamp دو میکروالکتروودی [۲۱] ویژگی‌های تحریک‌پذیری سلول و نیز خصوصیات الکتروفیزیولوژیک کانال‌های یونی فعال شده، بررسی شدند. در Voltage Clamp برای ثبت فعالیت کانال‌های کلسیمی در هر گروه از دو ولتاژ نگهدارنده ۹۰- و ۴۰- میلی‌ولت به ترتیب برای فعال شدن کانال‌های کلسیمی LVA و HVA استفاده شد. در حالتی که پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت بود از پتانسیل‌های فرمانی بین ۸۰- تا ۹۰+ میلی‌ولت و در حالتی که پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت بود از پتانسیل‌های فرمانی بین ۳۰- تا ۹۰+ میلی‌ولت استفاده می‌شد. مدت هر پتانسیل فرمانی ۵۰۰ میلی‌ثانیه و فاصله آن با پتانسیل فرمانی بعدی ۵۰۰ میلی‌ثانیه بود. به این ترتیب جریان‌های یونی با سرعت یک بار در دقیقه برانگیخته می‌شدند. به منظور ثبت فعالیت الکتریکی سلول و بررسی ویژگی‌های غیر فعال (Passive) غشاء سلول در Current Clamp از جریان‌های دپلاریزه کننده و هیپرپلاریزه کننده استفاده گردید. پاسخ‌ها به وسیله آمپلی‌فایر دریافت و تقویت شده، آنگاه با تواتر نمونه‌برداری ۳۰ کیلوهرتز و توسط برنامه نرم افزاری Pulse که در محیط Matlab تحت ویندوز نوشته شده بود جمع‌آوری، به داده‌های رقمی تبدیل و به صفحه کامپیوتر انتقال یافتند. به این ترتیب پتانسیل‌های عمل ثبت گردید و تحت شرایط Voltage Clamp میزان جریان‌های یونی به ازاء هر پتانسیل فرمانی به صورت

۱۰ Glucose: [۴۵]. به منظور حذف جریان رو به داخل سدیمی و رو به خارج پتاسیمی، محلول فاقد سدیم و پتاسیم با جایگزین کردن NaCl و KCl توسط TEA-Cl (Aldrich) (۸۴ mM) بکار رفت. حذف کامل جریان رو به داخل سدیمی و رو به خارج پتاسیمی با ثبت پتانسیل عمل کلسیمی که کفه طولانی از مشخصات بارز آن می‌باشد، تأیید می‌شد.

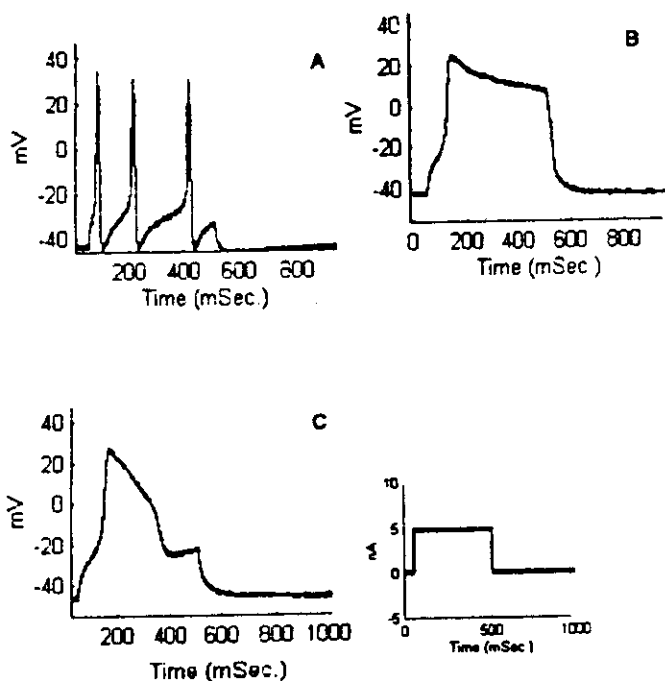
برای مهار و شناسایی کانال‌های کلسیمی از کلرید نیکل با غلظت ۴ mM (Sigma) و نیفدپین با غلظت ۱ μM (Sigma) که در اتانول ۰/۲٪ حل شده بود و در نور کم نگه داشته می‌شد، استفاده می‌گردید.

به عنوان محلول مادر از محلول استاندارد سرب (1010mg/mg/ml of pb in 1Wt%HNO₃, Aldrich) استفاده شد. در محلول پرفیوژن از دو غلظت نهایی ۰/۶ و ۳ میکرومولار سرب استفاده گردید. pH محلول خارج سلولی بین ۷/۶ و ۷/۸ و اسمولاریته رینگر طبیعی ۱۹۶/۳±۱/۵ و رینگر بدون سدیم - پتاسیم ۲۰۴/۲±۱/۷ میلی‌اسمول بود.

الکتروودها و ثبت الکتریکی: میکروپیت‌های شیشه‌ای حاوی فیلامان به وسیله دستگاه میکروالکتروود پولر عمودی (Narishige) کشیده شدند. به منظور کاهش Capacitive coupling بین دو میکروالکتروود داخل سلولی، نوک میکروالکتروودها تا فاصله ۱ میلی‌متری از نوک آنها با پارافیلیم پوشیده شدند. یکی از میکروالکتروودها برای تزریق جریان و دیگری برای ثبت تغییرات در پتانسیل غشا یا ثبت جریان‌های یونی استفاده شد. میکروالکتروودهای داخل سلولی با KCl سه مولار پر شده و مقاومت میکروالکتروودها (۳-۷ MΩ) در مایع خارج سلولی و داخل سلولی با آمپلی‌فایر Axoclamp 2B (Axon Instrument) با قدرت تقویت

منحنی جریان - ولتاژ با استفاده از برنامه Analyze برای هر نمونه رسم می‌شد. با استفاده از رسم منحنی جریان - ولتاژ در تجزیه تحلیل یافته‌های ثبت داخل سلولی می‌توان به آستانه فعال شدن کانال، حداکثر جریان یونی و ولتاژی که جریان به حداکثر میزان خود می‌رسد و نیز پتانسیل معکوس آن پی برد. تمامی ثبت‌ها در دمای اتاق انجام شد. برای بدست آوردن ثابت زمانی مرحله فعال شدن جریان‌های یونی ثبت شده از معادلات توانی (n بین ۱ تا ۴) استفاده شد.

ثبت فعالیت الکتریکی و جریان‌های یونی سلول در رینگر طبیعی: شکل (۱A) نمونه‌ای از پتانسیل عمل برانگیخته شده در رینگر طبیعی و جدول ۱ برخی از ویژگی‌های آن را نشان می‌دهد. بعد از رسیدن پتانسیل غشاء به آستانه شلیک، پتانسیل غشاء به سرعت دپلاریزه می‌شود و به حداکثر قله خود که نزدیک $35/2 \pm 1/4$ میلی‌ولت است می‌رسد و سپس وارد مرحله دپلاریزاسیون می‌گردد.



شکل ۱- پتانسیل عمل برانگیخته شده متعاقب تزریق ۵ نانوامپر جریان دپلاریزه کننده به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه از پتانسیل استراحت غشاء در رینگر طبیعی (A)، در رینگر بدون سدیم - پتاسیم قبل از افزودن نیفدیبین (B)، در رینگر بدون سدیم - پتاسیم بعد از افزودن نیفدیبین (C).

که این معادله A_0 ، A_1 و A_2 دامنه جریان در زمان صفر و t زمان و τ_1 و τ_2 ثابت زمانی است.

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

میانگین حداقل ۶ پاسخ در هر گروه برای پردازش اطلاعات مورد استفاده قرار گرفت و نتایج به صورت $Mean \pm S.E.M$ نشان داده شده است. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش‌های آماری ANOVA یک طرفه و Student's t-test استفاده گردید.

نتایج این تحقیق بر اساس ثبت‌های بدست آمده از نورون‌های F77 تحت شرایط Current Clamp و Voltage Clamp گزارش شده است. نورون‌های F77 در عدم حضور تحریک خارجی در بعضی از موارد دارای فعالیت خود به خودی می‌باشند و با تزریق جریان‌های دپلاریزه به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه و در محدوده بین ۱ تا ۱۰ نانوامپر الگوی شلیک منظمی را نشان می‌دهند.

نتایج

برای مطالعه و مقایسه فعالیت الکتریکی و تحریک‌پذیری سلول در تمامی گروه‌ها، تحت شرایط

را با پتانسیل عمل نیزه‌ای القاء شده در رینگر طبیعی نشان می‌دهد ($P < 0.05$). افزودن نیفدیپین (۱ Mm)، مهار کننده اختصاصی کانال کلسیمی نوع L، به محلول خارج سلولی باعث کاهش معنی‌دار مدت پتانسیل عمل شد ($P < 0.05$). شکل C ۱ نمونه‌ای از این پتانسیل عمل را در حضور نیفدیپین و جدول ۱ برخی از ویژگی‌های آن را نشان می‌دهد. طول مدت کفه پتانسیل عمل کاهش یافته است و فاز رپلاریزاسیون به دلیل مهار بخشی از جریان پتاسیمی رو به خارج فعال شده توسط کلسیم کاهش یافته است.

جریان کل کلسیمی پس از مهار جریان‌های رو به خارج پتاسیمی و رو به داخل سدیمی ثبت شد. برخی از ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک جریان کلسیمی فعال شده از دو پتانسیل نگهدارنده ۹۰- و ۴۰- میلی‌ولت در جدول ۴ آمده است. قله جریان کلسیمی از پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت حدود ۱۳٪ بیشتر از قله جریان کلسیمی در ولتاژ نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت است ولی ولتاژی که در آن قله جریان را داریم، در هر دو پتانسیل نگهدارنده مشابه است. همچنین منحنی جریان - ولتاژ در این دو پتاسیم نگهدارنده بر هم قابل انطباق هستند (شکل A ۴). برای بررسی دقیق‌تر و شناسایی انواع جریان‌های کلسیمی از مهارکننده اختصاصی کانال کلسیمی نوع L یعنی نیفدیپین (۱ μ M) استفاده شد. بعد از افزودن نیفدیپین به مایع خارج سلولی، قله جریان کلسیمی در پتانسیل‌های نگهدارنده ۹۰- و ۴۰- میلی‌ولت به ترتیب ۵۴٪ و ۴۱٪ کاهش را نشان داد. این نتایج نشان می‌دهند که احتمالاً بیش از ۵۰٪ کل جریان کلسیمی در جسم سلولی F77 از طریق کانال‌های کلسیمی نوع L حمل می‌شوند.

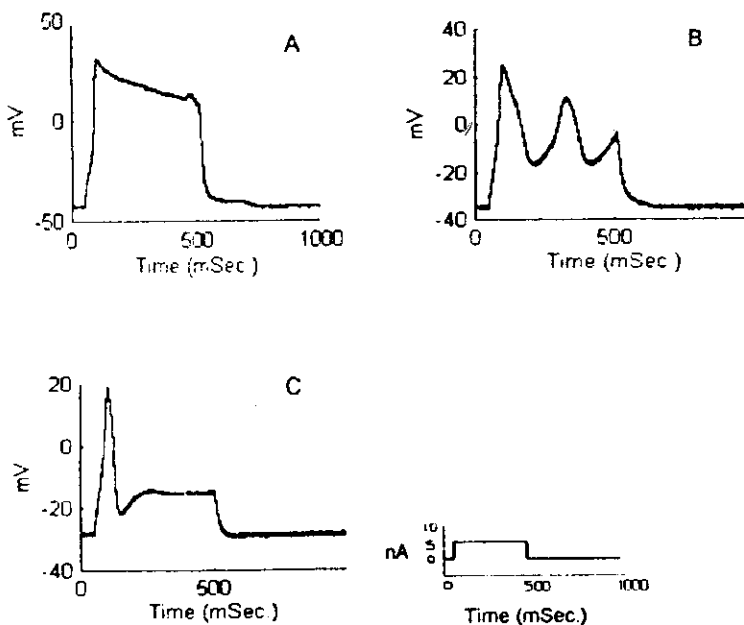
ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک جریان مقاوم به نیفدیپین در جدول ۴ نشان داده شده است. همانطور که منحنی جریان ولتاژ نشان می‌دهد، نیفدیپین سبب جابجایی

ثبت جریان‌های یونی غشاء سلول F77 در رینگر طبیعی تحت شرایط Voltage Clamp نشان می‌دهد که در این سلول یک جریان یونی بزرگ رو به داخل که به سرعت غیر فعال می‌شود و یک جریان یونی بزرگ رو به خارج و تأخیری که عمدتاً توسط یون پتاسیم حمل می‌شود، وجود دارد (شکل ۳A). جریان رو به داخل شامل جریان‌های سدیمی و کلسیمی است. جریان رو به داخل کلسیمی که نسبتاً کوچک است وقتی می‌تواند خود را نشان دهد که شرایط برای ثبت این جریان فراهم شود (به بخش روش‌ها مراجعه شود).

برای ثبت جریان‌های یونی فعال شده از ولتاژهای بالا در رینگر طبیعی از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت استفاده شد. پتانسیل آستانه برای فعال شدن جریان‌های رو به داخل، حدود ۳۰- تا ۴۰- میلی‌ولت است و مقدار جریان 32 ± 0.66 -۳ نانوآمپر است. منحنی جریان - ولتاژ در شکل B ۳ نشان داده شده است. از آنجا که مطالعه حاضر به منظور شناسایی و تعیین خصوصیات جریان‌های کلسیمی انجام شده است، بنابراین سعی شد جریان‌های کلسیمی را از دو جریان یونی سدیمی و پتاسیمی جدا نماییم.

ثبت فعالیت الکتریکی و جریان‌های کلسیمی در رینگر بدون سدیم - پتاسیم: شکل B ۱ نمونه‌ای از پتانسیل عمل را در رینگر بدون سدیم - پتاسیم و جدول ۱ برخی از ویژگی‌های پتانسیل عمل کلسیمی را نشان می‌دهد. همانطور که از شکل B ۱ پیداست این پتانسیل عمل، پتانسیل عمل کفه‌داری است که به دنبال مرحله رپلاریزاسیون، پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون دیده نمی‌شود. همانند آنچه که در سلول ماهیچه قلبی دیده می‌شود. دامنه، مدت و قله پتانسیل عمل تفاوت معنی‌داری

تحت تأثیر سرب ($0.6 \mu\text{M}$) مدت پتانسیل عمل در دقایق هشتم و دوازدهم 58% و قلۀ پتانسیل عمل در دقیقه دوازدهم 23% کاهش معنی دار را نسبت به حالت کنترل نشان می دهند (جدول ۲). اثر سرب وابسته به زمان است و با گذشت زمان اثر کاهش دهندگی آن بر ویژگی های پتانسیل عمل (مدت و قلۀ پتانسیل عمل) افزایش بیشتری می یابد.



شکل ۲- ثبت پتانسیل های عمل کلسیمی متعاقب ۵ نانوآمپر جریان دپلاریزه کننده به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه از پتانسیل استراحت غشاء پتانسیل عمل کلسیمی در رینگر فاقد سدیم - پتاسیم، قبل از بکار بردن سرب (0.6 میکرومولار) (A). ۵ دقیقه بعد از استفاده از سرب (0.6 میکرومولار) (B). ۵ دقیقه بعد از استفاده از سرب (3 میکرومولار) (C).

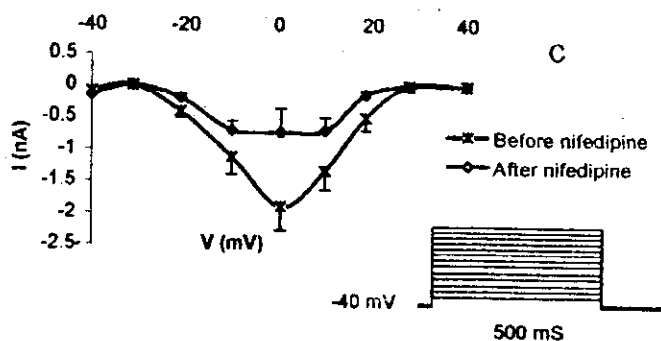
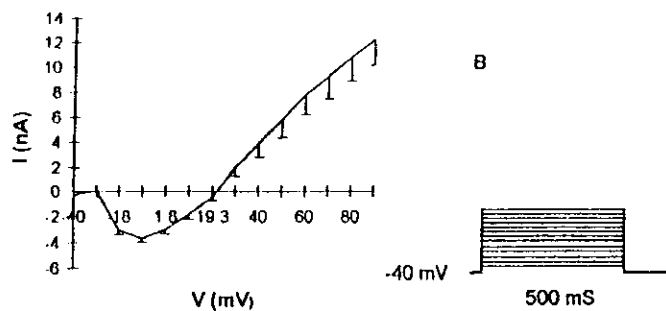
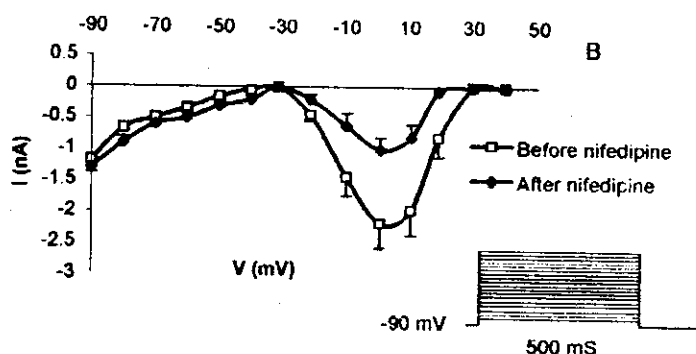
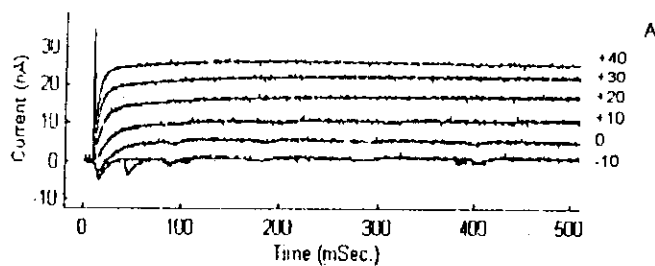
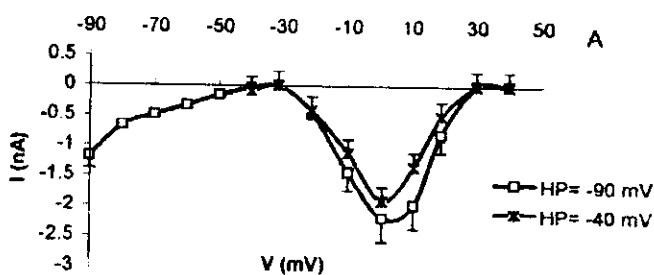
متعاقب کاربرد خارج سلولی سرب ($3 \mu\text{M}$) پتانسیل استراحت غشاء، مدت پتانسیل عمل و قلۀ پتانسیل عمل در جسم سلولی نورو ف77، ۱۲ دقیقه پس از افزودن سرب ($3 \mu\text{M}$) به محیط خارج سلولی به طور کامل مهار گردید.

اندکی در این منحنی نسبت به منحنی جریان کل کلسیمی در عدم حضور نیفدیپین به سمت پتانسیل های هیپرپلاریزه تر شده است. میزان جابجایی قلۀ جریان 0.6 میلی ولت از پتانسیل نگهدارنده -90 میلی ولت (شکل B) و 1 میلی از پتانسیل نگهدارنده -40 میلی ولت (شکل C) می باشد. افزودن نیکل (4 mM) در حضور نیفدیپین به محلول خارج سلولی، منجر به مهار کامل جریان کلسیمی (جریان مقاوم به نیفدیپین) در هر دو پتانسیل نگهدارنده شد.

همچنین ثابت زمانی مرحله فعال شدن جریان کلسیمی در سه پتانسیل فرمانی 10 ، 0 ، -10 میلی ولت با استفاده از معادلات توانی (exponential) به دست آمد. مرحله فعال شدن جریان کلسیمی با معادله سه توانی ($n=3$) برازش شد (به بخش روش ها مراجعه شود). بنابراین فعال شدن جریان کلسیمی با سه ثابت زمانی سریع، متوسط و آهسته انجام می شود. ثابت زمانی سریع (τ_f)، متوسط (τ_m) و آهسته (τ_s) در پتانسیل فرمانی که بیشترین جریان را داریم ($1 \pm 0.6 \text{ mV}$)، به ترتیب 24.7 ± 10.4 و 2.02 ± 0.55 ، 0.94 ± 0.48 است. پس از شناسایی و تعیین خصوصیات الکتروفیزیولوژیک و فارماکولوژیک جریان های کلسیمی وابسته به ولتاژ در جسم سلولی F77، مکانیسم اثر سرب بر جریان های کلسیمی مورد بررسی قرار گرفت.

اثر سرب بر پتانسیل عمل کلسیمی و جریان های کلسیمی وابسته به ولتاژ

سرب با دو غلظت 0.6 و 3 میکرومولار به محلول خارج سلولی افزوده شد. شکل ۲ نمونه هایی از پتانسیل عمل را قبل و بعد از افزودن سرب نشان می دهد. پتانسیل عمل در دقایق ۵، ۸ و ۱۲ بعد از افزودن سرب ثبت شد.



شکل ۳- گروهی از جریان‌های یونی ثبت شده در رینگر طبیعی و توسط پالس‌های ولتاژی از ولتاژ نگهدارنده -۴۰ میلی‌ولت به فواصل ۱۰ میلی‌ولت (A). منحنی جریان - ولتاژ در رینگر طبیعی (B).

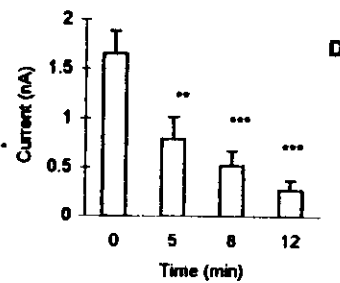
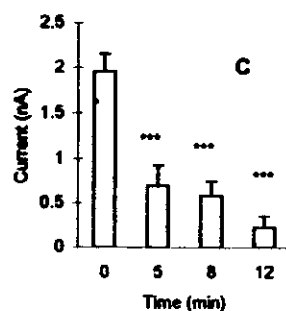
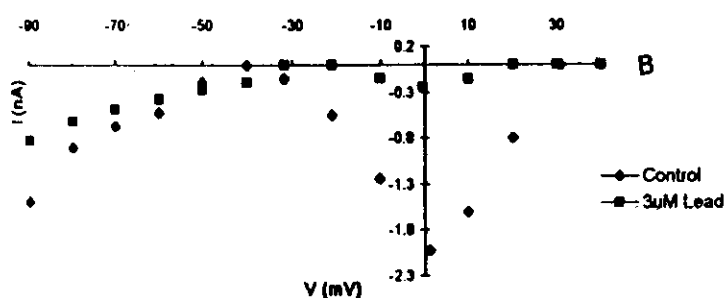
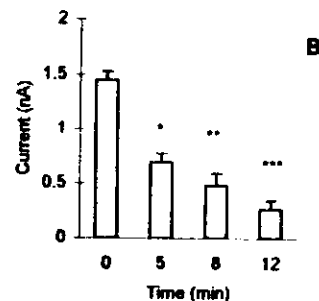
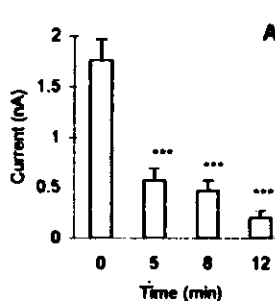
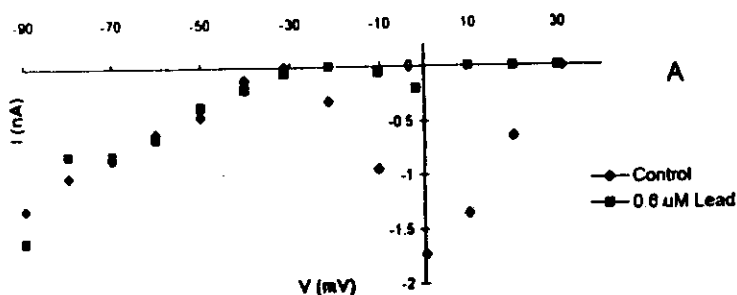
مقایسه اثر دو غلظت سرب روی ویژگی‌های پتانسیل عمل، تفاوت معنی‌داری را تا دقیقه هشتم نشان نمی‌دهد.

جریان کلسیمی فعال شده از پتانسیل نگهدارنده -۹۰ میلی‌ولت، در دقایق پنجم، هشتم و دوازدهم بعد از افزودن سرب ($0.76 \mu\text{M}$) به ترتیب موجب 73% ، 64% و 88% ، در حالیکه از پتانسیل نگهدارنده -۴۰ میلی‌ولت به ترتیب موجب 52% ، 66% و 73% کاهش معنی‌دار می‌شود (شکل ۵ A و ۵ B).

افزودن سرب ($3 \mu\text{M}$) منجر به کاهش جریان کلسیمی فعال شده از پتانسیل نگهدارنده -۹۰ میلی‌ولت در دقایق پنجم، هشتم و دوازدهم به ترتیب 71% ، 70% و 87% کاهش در حالیکه از پتانسیل نگهدارنده -۴۰ میلی‌ولت موجب 52% ، 69% و 84% کاهش در جریان

شکل ۴- (A) منحنی جریان - ولتاژ برای جریان کلسیمی ثبت شده از ولتاژ نگهدارنده -۹۰ میلی‌ولت قبل از افزودن نیفدپین ($1 \mu\text{M}$) و بعد از نیفدپین ($1 \mu\text{M}$). (B) منحنی جریان - ولتاژ برای جریان کلسیمی ثبت شده از ولتاژ نگهدارنده -۴۰ میلی‌ولت قبل از افزودن نیفدپین ($1 \mu\text{M}$) و بعد از نیفدپین ($1 \mu\text{M}$).

کلسیمی می‌شود (شکل ۵ C و ۵ D). تأثیر سرب بر خصوصیات الکتروفیزیولوژیک جریان کلسیمی نیز وابسته به زمان است به طوری که با گذشت زمان اثر آن افزایش می‌یابد. منحنی جریان - ولتاژ در حضور هر دو غلظت



شکل ۶- (A) اثر سرب (۰/۶ میکرومولار) روی منحنی جریان - ولتاژ جریان کلسیمی ثبت شده از پتانسیل نگهدارنده -۹۰ میلی ولت قبل از افزودن سرب (۰/۶ میکرومولار) (◆) بعد از افزودن سرب (۰/۶ میکرومولار) (■). (B) اثر سرب (۳ میکرومولار) روی منحنی جریان - ولتاژ جریان کلسیمی فعال شده از پتانسیل نگهدارنده -۹۰ میلی ولت قبل از افزودن سرب (۳ میکرومولار) (◆) بعد از افزودن سرب (۳ میکرومولار) (■).

شکل ۵- اثر مهاری وابسته به زمان سرب بر جریان کلسیمی. اثر سرب (۰/۶ میکرومولار) بر جریان های کلسیمی فعال شده در پتانسیل نگهدارنده -۹۰ میلی ولت (A) و پتانسیل نگهدارنده -۴۰ میلی ولت (B). اثر سرب (۳ میکرومولار) بر جریان های کلسیمی فعال شده در پتانسیل نگهدارنده -۹۰ میلی ولت (C) و پتانسیل نگهدارنده -۴۰ میلی ولت (D). از تست آماری ANOVA یکطرفه استفاده شد. احتمال بصورت $P < 0.05$ * ; $P < 0.01$ ** ; $P < 0.001$ *** نشان داده شده است.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که در جسم سلولی نورون F77 حداقل دو جریان کلسیمی HVA وجود دارد. جریان کلسیمی حساس به نیفدیپین و جریان کلسیمی مقاوم به نیفدیپین، از طرفی خصوصیات

سرب (۰/۶ و ۳ میکرومولار) تا حدودی به سمت ولتاژهای هیپرپلاریزه جابجا می شود (شکل ۶). بین دو غلظت سرب از نظر کاهش حداکثر جریان کلسیمی تفاوت معنی دار وجود ندارد.

جدول ۱- ویژگی‌های پتانسیل عمل در رینگر طبیعی و رینگر بدون سدیم - پتاسیم. از تست آماری Student's t-test استفاده و احتمال بصورت $P < 0.05$ * نشان داده شده است.

پتانسیل استراحت غشاء (mV)	آستانه فعال شدن (mV)	مدت پتانسیل عمل (mS)	قله پتانسیل عمل (mV)	
-۴۸/۲±۱/۵	-۲۵/۸±۱/۸	۵/۷±۱	۳۵/۲±۱/۴	رینگر طبیعی (n=۸)
-۴۶/۷±۲/۸	-۳۱/۶±۲/۴	۴۰/۲/۸±۷/۸	۲۶/۷±۱/۵	رینگر بدون سدیم - پتاسیم قبل از نیفدیپین (n=۹)
-۴۱/۵±۱/۷	-۲۶/۲±۲/۰۲	۳۰/۶±۴۳*	۲۳/۴±۱/۸	رینگر بدون سدیم - پتاسیم بعد از نیفدیپین (n=۹)

جدول ۲- ویژگی‌های پتانسیل عمل در رینگر بدون سدیم - پتاسیم قبل و بعد از استفاده از محلول استاندارد سرب ۰/۶ میکرومولار در دقایق پنجم، هشتم و دوازدهم. از تست آماری Student's t-test استفاده و احتمال به صورت $P < 0.05$ * نشان داده شده است.

پتانسیل استراحت غشاء (mV)	آستانه فعال شدن (mV)	مدت پتانسیل عمل (mS)	قله پتانسیل عمل (mV)	قبل از سرب n=۸	دقیقه پنجم n=۸	دقیقه هشتم n=۷	دقیقه دوازدهم n=۶
-۳۹/۵±۱/۴	-۲۵/۴±۱/۲	۳۶/۲/۶±۴/۰	۱۵۱/۱±۴۹/۸*	-۳۶/۴±۱/۳	-۲۳/۸±۱	-۳۵/۸±۱/۷	-۳۵/۲±۱/۸
-۲۵/۴±۱/۲	-۲۳/۸±۱	۲۰/۶±۵۳/۴	۱۵۱/۱±۴۹/۸*	-۲۲/۷±۱/۱	-۲۲/۷±۱/۱	-۲۱/۵±۱/۶	-۲۱/۵±۱/۶
۲۷±۱/۶	۲۲/۶±۱/۱	۲۰/۹±۱/۵	۱۸±۲/۷*	۲۲/۶±۱/۱	۲۰/۹±۱/۵	۲۰/۹±۱/۵	۱۸±۲/۷*

جدول ۳- ویژگی‌های پتانسیل عمل در رینگر سدیم - پتاسیم قبل و ۵ دقیقه بعد از استفاده از محلول استاندارد سرب ۳ میکرومولار. از تست آماری Student's t-test استفاده و احتمال به صورت $P < 0.05$ * ; $P < 0.01$ ** نشان داده شده است.

پتانسیل استراحت غشاء (mV)	آستانه فعال شدن (mV)	مدت پتانسیل عمل (mS)	قله پتانسیل عمل (mV)	قبل از سرب n=۸	دقیقه پنجم n=۷	دقیقه هشتم n=۴
-۳۸/۹±۱/۱	-۲۵/۹±۰/۹	۳۷/۷±۳۰/۹	۲۸±۰/۹	-۳۱/۳±۱/۹*	-۲۰/۲±۱/۷	-۲۳±۲/۷
-۲۵/۹±۰/۹	۳۷/۷±۳۰/۹	۱۳۳/۹±۵۱/۶**	۱۸/۸±۳*	-۲۰/۲±۱/۷	۱۳۳/۹±۵۱/۶**	-۲۱/۳±۱/۶
۲۸±۰/۹	۱۳۳/۹±۵۱/۶**	۱۸/۸±۳*	۲۰/۹±۳/۸	-۲۰/۲±۱/۷	۱۳۳/۹±۵۱/۶**	۲۰/۹±۳/۸

جدول ۴- ویژگی‌های جریان‌های کلسیمی. جریان کل کلسیمی و جریان مقاوم به نیفدیین به وسیله پتانسیل‌های فرمانی مختلف و از دو ولتاژ نگهدارنده ۹۰- و ۴۰- میلی ولت فعال شده اند.

پتانسیل نگهدارنده	ولتاژ آستانه فعال شدن (mV)	ولتاژ قله جریان کلسیمی (mV)	قله جریان کلسیمی (nA)
جریان کل کلسیمی (n=6)	VH=-90 mV	-31/3±0/04	-2/18±0/04
	VH=-40 mV	-31/2±0/03	-1/9±0/037
جریان مقاوم به نیفدیین (n=6)	VH=-90 mV	-31/6±0/01	-1±0/02
	VH=-40 mV	-31/8±0/04	-0/73±0/037

تحت تأثیر سرب کاهش می‌یابند.

ویژگی‌های تحریک پذیری سلول در Current Clamp

در محیط یونی طبیعی با تحریک الکتریکی سلول، قسمت اعظم جریان رو به داخل به وسیله یون‌های سدیم حمل می‌شود. فعالیت نورونی تحت تأثیر تغییرات موضعی غلظت پتاسیم و سدیم خارج سلولی قرار می‌گیرد [۱]. افزودن TTX (مهارکننده اختصاصی کانال‌های سدیمی) به محیط خارج سلولی، موجب کاهش دامنه، قله و حداکثر سرعت مرحله بالا رو پتانسیل عمل می‌شود [۲۰]. کاهش غلظت پتاسیم خارج سلولی و یا کاربرد مهار کننده کانال‌های پتاسیمی مانند TEA-Cl و 4-AP (1 μM) موجب طولانی شدن مرحله رپلاریزاسیون و مدت پتانسیل عمل می‌گردد [۲۶، ۲۷]. 4-AP نه تنها از طریق مهار جریان رو به خارج پتاسیمی بلکه به طور مستقیم هم موجب تسهیل جریان رو به داخل کلسیمی می‌شود [۳۷]. کانال‌های یونی که به کلسیم نفوذ پذیرند، نقش مهمی در تولید پتانسیل عمل و در تعیین شکل آن دارند. در این بررسی پتانسیل استراحت غشاء سلول در رینگر بدون سدیم - پتاسیم حدود ۴۰- میلی‌ولت است. در این پتانسیل به دنبال تحریک الکتریکی سلول، کانال‌های

الکتروفیزیولوژیک این جریان‌های کلسیمی ثبت شده تحت شرایط Current Clamp و Voltage Clamp بعد از افزودن سرب تغییر یافت که خود بیانگر اثر مهارتی سرب بر کانال‌های وابسته به ولتاژ کلسیمی است. اصولاً حیواناتی که در محیط آلوده زندگی می‌کنند، می‌بایست تا حدودی با شرایط جدید تطابق پیدا کنند در غیر اینصورت روندهای فیزیولوژیک آنها آسیب خواهد دید و زندگی آنها به مخاطره می‌افتد. راه‌های تطابق اندام‌های مختلف و اعمال مختلف تحت این شرایط بستگی به مکانیسم‌های سلولی خاص دارد. در مورد سیستم عصبی، روندهای غشایی پایه هدف فلزات سنگین قرار می‌گیرند و منجر به تغییراتی در جریان‌های غشایی، حساسیت شیمیایی، انتقال عصبی، متابولیسم و ره‌ایش ترانس‌میترها می‌شوند. یون‌های فلزی مختلف ممکن است اهداف سلولی مختلف داشته باشند و اثرشان وابسته به نوع و خصوصیات نوروں هاست. در این مطالعه که با هدف شناسایی و تعیین انواع کانال‌های کلسیمی موجود در جسم سلولی نوروں F77، بررسی اثر سرب بر جریان‌های کلسیمی و پتانسیل عمل کلسیمی انجام شد، مشخص گردید که جریان‌های کلسیمی HVA که عمدتاً حساس به نیفدیین هستند،

همزمان با آن فعال می‌شوند می‌تواند پوشیده شوند، ضروری است که برای ثبت جریان‌های رو به داخل تمامی جریان‌های رو به خارج پتاسیمی مهار گردند. به همین منظور تترا اتیل آمونیوم کلراید ($84 \mu\text{M}$) برای مهار جریان پتاسیمی تأخیری (delayed rectifier) و ۴-آمینوپیریدین (4-AP) با غلظت 5 mM برای مهار جریان سریع پتاسیمی رو به خارج استفاده شد. در این تحقیق امکان ثبت جریان کل رو به داخل از پتانسیل نگهدارنده 90 - میلی‌ولت در رینگر طبیعی نبود. دلیل آن می‌تواند این باشد که در این پتانسیل کانال‌های پتاسیمی بیشتری به ویژه کانال‌های سریع رو به خارج پتاسیمی (I_A) بیشتری از حالت غیر فعال خارج شده اند و در واقع می‌توانند با دپلاریزاسیون فعال شوند و جریان رو به داخل را در تمامی پتانسیل‌های فرمانی بیوشانند [۶، ۷].

همانطور که شکل ۵ نشان می‌دهد، در نورون F77 آستانه فعال شدن جریان‌های کلسیمی پتانسیل فرمانی حدود 30 - میلی‌ولت است. در پتانسیل‌های فرمانی دپلاریزه‌تر، میزان جریان کلسیمی به تدریج افزایش می‌یابد چراکه با افزایش دپلاریزاسیون کانال‌های کلسیمی بیشتری باز می‌شوند. این افزایش تا پتانسیل فرمانی خاصی ادامه می‌یابد و بعد از آن کاهش جریان کلسیمی مشاهده می‌شود که بیانگر بسته شدن یا غیر فعال شدن کانال کلسیمی است. قله جریان از ولتاژ نگهدارنده 40 - میلی‌ولت کمتر از قله جریان از ولتاژ 90 - میلی‌ولت است لکن کینتیک جریان‌های کلسیمی، مانند وابسته به ولتاژ بودن این جریان و ولتاژی که در آن جریان به حداکثر میزان خود می‌رسد، در هر دو پتانسیل نگهدارنده 90 - و 40 - میلی‌ولت مشابه است (حدود صفر میلی‌ولت). در نورون‌های نئوکورتیکال موش سفید صحرائی نیز نتایج مشابهی گزارش گردیده است [۲۹]. دلایل چندی پیشنهاد

کلسیمی نوع HVA می‌توانند باز شوند [۴۲] و چون این کانال‌ها به کندی غیر فعال می‌گردند، بنابراین مرحله دپلاریزاسیون پتانسیل عمل و در واقع مدت پتانسیل عمل طولانی می‌گردد. در همین رابطه Kirkpatrick (۱۹۹۱) گزارش کرد که کانال‌های کلسیمی نوع HVA در طولانی شدن پتانسیل عمل در طی شلیک مکرر نورون سوپرا اپتیک موش سفید صحرائی (rat) نقش دارند [۲۶]. بنابراین همانطور که در این مطالعه هم نشان داده شد، انتظار می‌رود نیفدیپین ($1 \mu\text{M}$) به عنوان مهار کننده اختصاصی کانال کلسیمی نوع L موجب کاهش معنی‌دار مدت پتانسیل عمل گردد ($P < 0.05$). نتیجه این تحقیق نشان می‌دهد که در سلول F77 کانال کلسیمی نوع L در ایجاد پتانسیل عمل کلسیمی نقش اساسی دارد.

از طرفی افزودن سرب (0.6 و 3 میکرومولار) به محیط خارج سلولی باعث کاهش قله و مدت پتانسیل عمل گردید. با توجه به اینکه پتانسیل عمل برانگیخته شده در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم، کلسیمی است، بنابراین به نظر می‌رسد سرب با تأثیر بر جریان‌های کلسیمی غشاء روی ویژگی‌های پتانسیل عمل کلسیمی اثر می‌گذارد. در تحقیق حاضر نتایج Voltage Clamp کاهش معنی‌دار جریان کلسیمی کانال HVA را به وسیله سرب نشان می‌دهد و از آنجا که این کانال کلسیمی در مرحله کفه پتانسیل نقش دارد، بنابراین کاهش مدت پتانسیل عمل تحت تأثیر سرب قابل توجیه است.

ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک جریان‌های کلسیمی در Voltage Clamp :

در نورون‌های نرم تنان، جریان رو به خارج خیلی بزرگتر از رو به داخل هستند [۲۹، ۷]. از آنجا که جریان رو به داخل به وسیله جریان‌های رو به خارج پتاسیمی که

کلسیمی HVA حساس به نیکل و یا حتی یک نوع کانال کلسیمی LVA با آستانه بالای فعال شدن باشد.

برخی از یون‌های دو ظرفیتی مانند نیکل برای چسبیدن به محل‌های خاص در داخل کانال کلسیمی با یون کلسیم رقابت می‌کنند. نیکل به عنوان مهار کننده اختصاصی کانال‌های کلسیمی نوع T شناخته شده است [۳۲، ۱۷] که با غلظت (۱ mM) موجب ۵۰٪ کاهش در جریان کلسیمی نورون پپتیدارژیک Crustacean می‌شود [۳۶]. با توجه به اینکه این نورون فقط جریان کلسیمی نوع HVA را نشان می‌دهد به نظر می‌رسد نیکل در غلظت‌های میلی‌مولار، مشابه غلظتی که ما در این تحقیق استفاده کرده‌ایم روی جریان‌های کلسیمی HVA هم مؤثر است. بررسی‌های متعدد نشان می‌دهند که سایر فلزات دو ظرفیتی نیز می‌توانند اثر مهاری بر روی کانال‌های کلسیمی داشته باشند.

با صنعتی شدن جوامع بشری آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین دو ظرفیتی از جمله سرب رو به افزایش است. ذرات سرب با قطر کمتر از $10 \mu\text{m}$ مستقیماً از طریق ریه‌ها جذب می‌شوند. سرب ممکن است از طریق لوله گوارش هم وارد بدن گردد [۱۱]. غلظت سرب در مایعات بدن از جمله خون، بزاق و ادرار کمتر از $1 \mu\text{M}$ در لیتر گزارش شده است [۴۷، ۱۹] که نوروکسیک نمی‌باشد [۱۰].

در رابطه با غلظتی از سرب که موجب ۵۰٪ کاهش در جریان کلسیمی می‌شود، تاکنون تحقیقات انجام شده نتایج متفاوتی را گزارش کرده‌اند. مقدار IC_{50} در نورون‌های DRG موش سفید صحرايي $0.7/16 \mu\text{M}$ [۱۶]، در نورون‌های Aplysia آب شیرین که غلظت کلسیم آن $20 \mu\text{M}$ میلی‌مولار است [۴] و در سلول‌های PC12 که حاوی جریان کلسیمی نوع HVA است $50 \mu\text{M}$

می‌کنند که این جریان از طریق کانال‌های کلسیمی نوع HVA حمل می‌شود. نخست اینکه جریان کلسیمی ثبت شده به آهستگی غیر فعال می‌شود. ثانیاً منحنی جریان - ولتاژ بیانگر این است که این جریان در ولتاژهای دپلاریزه تری نسبت به جریان LVA شروع به فعال شدن می‌کند (بین ۳۰- و ۲۰- میلی‌ولت) و قله آن در ولتاژ حدود صفر میلی‌ولت ظاهر می‌شود. با توجه به اینکه قله جریان کلسیمی فعال شده در پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت بیش از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت است، احتمالاً در جسم سلولی این نورون علاوه بر جریان‌های کلسیمی نوع HVA، جریان‌های کلسیمی دیگری هم وجود دارد و یا یک نوع جریان کلسیمی HVA با دو کینتیک متفاوت است.

بعد از افزودن نیفدیپین ($1 \mu\text{M}$) بخش عمده‌ای از این جریان مهار می‌شود و اثر نیفدیپین در کاهش جریان کلسیمی در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت نسبت به پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت بیشتر می‌باشد. بررسی‌های دیگر در این زمینه نتایج مشابهی را نشان داده‌اند [۲۸، ۲۲، ۱۸]. علت اثر بیشتر نیفدیپین در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت نسبت به پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت این است که در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت به طور عمده تنها کانال‌های کلسیمی نوع HVA به خصوص نوع L می‌توانند با دپلاریزاسیون فعال شوند. بنابراین کانال کلسیمی نوع L بخش بزرگتری از جریان کل کلسیمی را در این پتانسیل حمل می‌کنند [۱۴]. با توجه به ویژگی‌های جریان مقاوم به نیفدیپین (جدول ۴) به نظر می‌رسد این جریان از طریق کانال‌های کلسیمی نوع HVA هدایت می‌شود. از طرف دیگر مهار جریان کلسیمی مقاوم به نیفدیپین به وسیله نیکل (۴ mM) می‌تواند بیانگر وجود یک نوع کانال

باعث جابجایی منحنی جریان - ولتاژ به سمت ولتاژهای دپلاریزه می‌شود [۵، ۴]. در تحقیق کنونی اثر مهار سرب سریع بود به طوری که بعد از ۵ دقیقه منجر به کاهش معنی‌دار جریان کلسیمی می‌شد البته این کاهش با گذشت زمان افزایش می‌یافت. اثر سریع سرب نشان می‌دهد که احتمالاً سرب از سطح خارج سلولی و از طریق اتصال به محل‌های باردار در سطح خارجی کانال عمل مهاری خود را اعمال می‌کند ولی کاهش بیشتر جریان کلسیمی با گذشت زمان یا به عبارتی اثر آهسته سرب می‌تواند ناشی از ورود سرب به داخل سلول باشد. در این صورت سرب از طریق مکانیسم‌های داخلی سلولی اثر مهاری خود را اعمال می‌کند [۴۱]. Simons-Pocock (۱۹۸۷) نشان دادند که قراردادن سلول‌های کرومافینی بخش مرکزی کلیه گوساله در معرض سرب به مدت ۲۰ دقیقه موجب ورود قابل ملاحظه سرب به داخل سلول می‌شود [۳۹].

در بررسی حاضر تشابه اثرات نیفدیپین و سرب بر روی کیتیک جریان کلسیمی مانند کاهش جریان در تمامی ولتاژها و جابجایی اندک در منحنی جریان - ولتاژ به سمت ولتاژهای هیپرپلاریزه‌تر این احتمال را که سرب وارد سلول شود را رد می‌نماید. مقایسه منحنی جریان - ولتاژ قبل و بعد از استفاده از سرب نشان می‌دهد که سرب باعث کاهش جریان کلسیمی در تمامی ولتاژها و جابجایی اندک در منحنی جریان ولتاژ به سمت پتانسیل‌های هیپرپلاریزه‌تر می‌گردد و این جابجایی با افزایش غلظت سرب افزایش می‌یابد (شکل ۶).

نتایج مشابهی به وسیله Evans (۱۹۹۱) و Busselberg (۱۹۹۳) در نورون‌های شاخ خلفی نخاع موش سفید صحرائی گزارش شده است. آنها نشان دادند که سرب با غلظت‌های بین ۰/۲۵ تا ۰/۶۴ میکرومول موجب جابجایی در منحنی جریان - ولتاژ نمی‌گردد [۱۶،

گزارش شده است [۸]، بخشی از این تفاوت در IC_{50} سلول‌های مختلف می‌تواند به دلیل حساسیت متفاوت نورون‌ها نسبت به سرب باشد [۴۴، ۳۳، ۱۶] و تفاوت در حساسیت هم می‌تواند احتمالاً مربوط به نوع و توزیع کانال‌های کلسیمی در نورون‌های مختلف باشد. Evans (۱۹۹۱) گزارش کرد که حساسیت کانال‌های کلسیمی نوع N نسبت به سرب بیش از کانال‌های کلسیمی نوع L و کانال‌های کلسیمی نوع T است [۱۶]. بخش دیگر از این تفاوت در IC_{50} سلول‌های مختلف می‌تواند ناشی از غلظت کلسیم در محیط خارج سلولی باشد. هر چه غلظت کلسیم در محیط خارج سلولی بیشتر باشد IC_{50} افزایش می‌یابد [۵]. در این مطالعه مقایسه تشابه اثر مهاری نیفدیپین و سرب تحت شرایط Voltage Clamp و Current Clamp نشان می‌دهد که هر دو احتمالاً جریان کلسیمی فعال شده در ولتاژهای بالا، به ویژه نوع L را کاهش می‌دهند.

مکانیسم عمل مهاری سرب

چندین مکانیسم احتمالی برای عمل مهاری فلزات سنگین از جمله سرب بر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ پیشنهاد شده است. سرب می‌تواند با اتصال به جایگاهی خاص در داخل کانال باعث مهار مستقیم کانال کلسیمی و کاهش در تعداد یون‌هایی که از کانال کلسیمی عبور می‌کنند، گردد [۴۴، ۵]. همچنین سرب می‌تواند در ضمن فعال شدن کانال کلسیمی از کانال‌های کلسیمی عبور نماید و با فعال کردن پروتئین کیناز C موجب کاهش دامنه جریان کلسیمی شود [۳۹، ۱۳]. سرانجام سرب می‌تواند با بارهای منفی موجود در سطح خارجی غشاء سلول بر اساس پدیده‌ای موسوم به Charge Screening واکنش نماید. در اینصورت سرب

کلسیمی است. به هر حال جهت روشن شدن مکانیسم دقیق اثر مهاری سرب نیاز به بررسی بیشتر به ویژه با استفاده از مهار کننده‌های پروتئین کیناز و یا اندازه‌گیری سرب در داخل سلول می‌باشد.

تشکر و قدردانی

هزینه انجام این پروژه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به منظور انجام طرح پژوهشی تأمین گردیده که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود. بخشی از نتایج آزمایش‌ها در چهاردهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران ارائه شد و به عنوان مقاله برتر معرفی گردید.

منابع

- [1] Belluzzi O., and Sacchi O. A five-conductance model of the action potential in the rat sympathetic neurone. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 55 (1991) 1-30.
- [2] Busselberg D., Platt B., Michael D., Carpenter D. O. and Haas H.L. Mammalian voltage-activated calcium channel currents are blocked by Pb^{2+} , Zn^{2+} and Al^{3+} . *J. Neurophysiol.* 71 (1994) 1491-1497.
- [3] Busselberg D. Michael D., and Platt. B. Pb^{2+} reduces voltage and N.Methyl-D-Aspartate (NMDA)- activated calcium channel currents. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 14 (1994) 711-722.
- [4] Busselberg D., Evans M.L., Haas H.L. and Carpenter D.O. Blockade of mammalian and invertebrate calcium channels by lead. *Neurotoxicol.* 14 (1993) 249-258.
- [5] Busselberg D., Evans M.L., Rahmann H., and Carpenter D.O. Lead and Zinc block a voltage-activated calcium channel of *Aplysia* neurons. *J. Neurophysiol.* 65 (1991) 786-795.
- [6] Connor J.A. and Stevens C.F. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in Gastropod neural somata. *J. Physiol.* 213 (1971) 21-30.
- [7] Connor J.A. and Stevens C.F. Inward and delayed outward membrane current in isolated neural somata under voltage clamp. *J. Physiol.* 213 (1971) 1-20.
- [8] Collen C.H., Vjekoslav M. Acute exposure to inorganic lead modifies high-threshold voltage-gated calcium currents in Rat PC12 cells. *Brain Res.* 738 (1996) 333-336.
- [9] Colleen C.H., Vjekoslav M. Chronic exposure to inorganic lead increases high threshold voltage gated calcium currents in Rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Brain Res.* 772 (1997) 63-70.
- [10] Davis J.M., Elias R.W. and Grant L.D. Current issues in human lead exposure and regulation of lead. *Neurotoxicol.* 14 (1993) 15-28.
- [11] Dalton C.B., McCammon J.B., Hoffman R.E. and Baron R.C. Blood lead levels in radiator repair workers in Colorado. *JOEM.* 39 (1997)

- 58-62.
- [12] Deborah C.R. Behavioral effects of lead: Commonalities between experimental and epidemiologic data. *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 337-351.
- [13] Domann R., Wunder L. and Busselberg D. Lead reduces depolarization induced calcium entry in cultured DRG neurons without crossing the cell membrane: Fura-2 measurements. *Cell. Mol. Neurobiol.* 17 (1997) 305-314.
- [14] Eliot L.S. and Johnson D. Types of calcium currents in acutely dissociated dentate granule neurons. *J. Neurophysiol.* 72 (1994) 762-777.
- [15] Ertel S. and Ertel E.A. Low-voltage activated T-type Ca^{2+} Channels. *TIPS.* 18 (1997) 37-42.
- [16] Evans M.L., Busselberg D. and Carpenter D.O. Pb^{2+} blocks calcium currents of cultured dorsal root ganglion cells. *Neuroscience Lett.* 129 (1991) 103-106.
- [17] Fisher T.E., Bourque C.W. Voltage gated calcium currents in the magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol.* 486 (1995) 571-579.
- [18] Foehring R.C. and Armstrong W.E. Pharmacological dissection of high voltage activated Ca^{2+} current types in acutely dissociated rat supraoptic magnocellular Neurons. *J. Neurophysiol.* 76 (1996) 977-983.
- [19] Gonzales M., Banderas J.A., Baez A., Belmont R. Salivary lead and cadmium in a young population residing in Mexico city. *Toxicol. Lett.* 93 (1997) 55-64.
- [20] Hollins B. and Ikeda S.R. Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J. Neurophysiol.* 76 (1996) 1195-1121.
- [21] Janahmadi M., Malmierca M.S., Hearne P.G., Green G.G.R. and Sanders D.J. Morphological and physiological features of F77 and D1 neurones of the subesophageal ganglia of *Helix aspersa* in vitro and in culture. *Anat. Embryol.*, 199 (1999) 563-572.
- [22] Jones S.W. and Jacobs L.S. Dihydropyridine actions on calcium currents of frog sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 10 (1990) 2261-2267.
- [23] Kerper L.E. and Hinkle P.M. Lead uptake in brain capillary endothelial cells: Activation by calcium store depletion. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 146 (1997) 127-133.
- [24] Ito K., Miura M., Furuse H., Zhixiong C., Kato H., Yasutomi D., Inoue T., Mikoshiba K., Kimura T., Sakakibara S. and Miyakawa H. Voltage gated Ca^{2+} channel blockers, ω -Agatoxin and Ni^{2+} , suppress the induction of θ -burst induced long term potentiation in guinea-pig hippocampal CA1 neurons. *Neurosci. Lett.* 183 (1995) 112-115.
- [25] Kerkut G.A., Lambert J.D.C., Gayton R.J., Loker J.E. and Walker R.J. Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50 (1975) 1-25.
- [26] Kirkpatrick K. and Bourque C.W. Dual role for calcium in the control of spike duration in rat supraoptic neuroendocrine cells. *Neurosci. Lett.* 133 (1991) 271-274.
- [27] Laszlog H.J., Henry Sershen, Sylvester E. Vizi and Abel Lajtha. N-type calcium channels are involved in the dopamine releasing effect of nicotine. *Neurochem. Res.* 17 (1992) 729-734.
- [28] Lorenzon N.M. and Foehring R.C. Characterization of pharmacologically identified voltage gated calcium channel currents in acutely isolated rat neocortical neurons. I. Adult neurons. *J. Neurophysiol.* 73 (1995) 1430-1443.
- [29] Lorenzon N.M. and Foehring R.C. Characterization of Pharmacologically identified voltage calcium channel currents in acutely isolated rat neocortical neurons. II. Postnatal development. *J. Neurophysiol.* 73 (1995) 1443-1451.
- [30] Magee J., Avery R.B., Christit B.R. and Johnston D. Dihydropyridine sensitive, voltage gated Ca^{2+} channels contribute to the resting intracellular Ca^{2+} concentration CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 76 (1996) 3460-3470.
- [31] Madeja M., Mubhoff U., Binding n., Witting U. Effects of Pb^{2+} on delayed rectifier

- potassium channels in acutely isolated hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, 78 (1997) 2649-2654.
- [32] Nooney J.M., Lambert R.C. and Feltz A. Identifying neuronal non-L Ca^{2+} channels more than stamp collecting? *TIPS.*, 18 (1997) 363-371.
- [33] Platt B. and Busselberg D. Combined actions of Pb^{2+} , Zn^{2+} and Al^{3+} on voltage activated calcium channel currents. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 14 (1994) 831-840.
- [34] Peineau N., Garnier D. and Argibay J.A. Rate dependence of action potential duration and calcium current in isolated guinea-pig cardiocytes. *Exp. Physiol.* 77 (1992) 615-625.
- [35] Przyseznik J. and Spencer A.N. Voltage activated calcium currents in identified neuron from a Hydrozoan Jellyfish, *Polyorchis. Penicillatus.* *J. Neurosci.* 12 (1992) 2065-2078.
- [36] Richmond J.E., Sher E. and Cooke I.M. Characterization of the Ca^{2+} current in freshly dissociated crustacean peptidergic neuronal somata. *J. Neurophysiol.* 73 (1995) 2357-2367.
- [37] Rogawski M.A. and Barker J.L. Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain Res.* 280 (1983) 180-185.
- [38] Simons T.J.B. Calcium and neuronal function. *Neurosurg. Rev.* 11 (1988) 119-129.
- [39] Simons T.J.B. and Pocock G. Lead enters bovine adrenal medullary cells through calcium channels. *J. Neurochem.* 48 (1987) 383-389.
- [40] Sun L.R. and Suszkiw J.B. Extracellular inhibition and intracellular enhancement of Ca^{2+} currents by Pb^{2+} in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurophysiol.* 74 (1995) 574-581.
- [41] Sundgren Anderson A.K., Johansson S. Calcium spikes and calcium currents in neurons from the medial preoptic nucleus of rat. *Brain Res.* 783 (1998) 194-209.
- [42] Swandulla D., Carbone E. and Lux H.D. Do calcium classification account for neuronal calcium channel diversity? *TINS.* 14 (1991) 46-51.
- [43] Szucs A., Salanki J. and Roza K.S. Effects of chronic exposure to cadmium or lead enriched environments on ionic currents of identified neurons in *lymnaea stagnalis* L. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14 (1994) 769-779.
- [44] Taylor P.S. Selectivity and patch measurement of A-current in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol.* 383 (1987) 437-447.
- [45] White E. and Terrar D.A. Action potential duration and the inotropic response to reduced extracellular potassium in guinea-pig ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* 76 (1991) 705-716.