

نقش کانالهای کلسیمی و پتاسیمی در تنظیم الگوی فعالیت خودبخود در سلولهای پورکنز مخچه

هاشم حقدوست یزدی، مهیار جان احمدی و ژیلا بهزادی
گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

چکیده

مخچه مسئول هماهنگی حرکت و کنترل تعادل می باشد. سلولهای پورکنز، نورونهای اصلی در مدار نورونی مخچه می باشند و تصور می شود که هماهنگی در حرکت توسط سیگنالهای زمانبندی شده ای صورت می گیرد که در الگوی شلیک این سلولها منعکس می گردد. شناخت فعالیت ذاتی این سلولها در درک مکانیسم زمانبندی سیگنالهای حرکتی توسط مخچه اهمیت بسزایی دارد. در این تحقیق با استفاده از ثبت داخل سلولی در برشهای مغزی نقش خواص بیوفیزیکی غشاء از جمله فعالیت کانالهای کلسیمی و پتاسیمی، در رفتار الکتریکی سلولهای پورکنز مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای پورکنز اسپایکهای کلسیمی و یا سدیمی-کلسیمی را در قالب burst هایی شلیک می نمودند که بوسیله دوره های خاموش interburst از یکدیگر جدا می شوند. این سلولها همچنین burst ها و دوره های خاموش طولانی مدتی را نشان می دادند. کادمیم، مهار کننده عمومی کانالهای کلسیمی موجب حذف اسپایکهای کلسیمی گردید در حالیکه بر اسپایک سدیمی تاثیری نداشت. کاربرد 4-AP و TEA، بلوک کننده های عمومی کانالهای پتاسیمی، رفتار الکتریکی این سلولها را بهبود بخشیده و دوره های خاموش را محدود نمودند. 4-AP همچنین دوره های burst و interburst را طولانی نموده و فرکانس شلیک intraburst را کاهش داد. از طرف دیگر، اپامین، یک نوروتوکسین از سم زنبور و مهار کننده جریان پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس پایین و آلفا-دندروتوکسین (DTX)، مهار کننده کانالهای $Kv1$ ، دوره های burst و interburst را کوتاه نمودند. در این مطالعه همچنین مشخص گردید که اپامین و DTX فرکانس رخداد burst را افزایش می دهند و DTX فرکانس شلیک intraburst را کاهش می دهد. در مجموع، می توان گفت خواص ذاتی غشاء و بویژه کانالهای پتاسیمی نقش مهمی در تعیین الگوی شلیک در سلولهای پورکنز ایفا می نمایند.

واژه های کلیدی: سلولهای پورکنز، الگوی شلیک، برشهای مغزی، ثبت داخل سلولی، اپامین، آلفا-دندروتوکسین.

مقدمه

مهار ورودیهای سیناپسی با بلوک کننده های جریانات گلوتاماتینرژیک و گاباژریک منجر به حذف فعالیت خودبخود در این سلولها نمی گردد [۷ و ۸]. این موضوع نشان می دهد که شلیک در سلولهای پورکنز از خواص ذاتی غشاء منشأ گرفته و ورودیهای سیناپسی نقش تعدیل کننده و نه فعال کننده، را ایفا می نمایند.

گزارش های فراوانی در ارتباط با الگوی شلیک خودبخود در سلولهای پورکنز در دست می باشد. برخی گزارشها حاکی از آن است که فعالیت خودبخود در این سلولها به صورت شلیک تونیک اسپایکهای سدیمی انجام می شود [۱، ۳ و ۴]. برخی دیگر از محققین الگوی شلیک burst شامل یک اسپایک کلسیمی همراه با چندین اسپایک سدیمی مشاهده نموده اند [۲]. همچنین شلیک خودبخود در یک الگوی سه گانه شامل شلیک تونیک، burst و دوره خاموش در برشهای مخچه ای گزارش شده است [۷-۱۰]. در حالیکه در گزارشهای اخیر هر نورون ۳ مد شلیک را نشان می دهد، گزارشهایی وجود دارد که بیان می کنند نورونهای پورکنز مختلف الگوی شلیک متفاوتی دارا می باشند به این معنی که

مخچه مسئول هماهنگی و کنترل اعمال حرکتی، حفظ تعادل و تنظیم وضعیت می باشد. این وظایف از طریق تولید سیگنالهای زمان بندی شده دقیق برای تقویت و مهار عضلات آگونیست و آنتاگونیست انجام می شود. سلولهای پورکنز، نورون اصلی در مدار نورونی مخچه می باشند و تصور می شود که سیگنالهای زمان بندی شده بوسیله تغییرات گذرا در میزان شلیک این نورونها کد می گردد. درخت دندریتی وسیع به آنها اجازه می دهد ورودیهای تحریکی و مهاری گسترده ای را انسجام بخشیده و نتیجه را به سلولهای هدف در هسته های عمقی مخچه رله نمایند. بررسی های انجام شده در شرایط *in vivo* نشان داده اند که سلولهای پورکنز بصورت خودبخود فعال بوده و با فرکانس ۱۵۰-۱۰ Hz شلیک می نمایند [۱]. این سلولها به شلیک خودبخودی خود در نمونه های کاهش یافته ای مانند برشهای مغزی [۲-۴] و حتی اجسام سلولی جدا شده [۵ و ۶] ادامه می دهند. همچنین در برشهای مغزی

در محلول ذکر شده در درجه حرارت اتاق ($27-23^{\circ}\text{C}$) نگه داری می شدند.

ثبت داخل سلولی

برشها در محفظه ثبت قرار داده شده و با استفاده از میکروسکوپ Upright (Olympus; BX 51WI) و با عدسی 40× water immersion روییت می شدند. محفظه ثبت با محلول ACSF کربوژنه شده بطور مداوم با سرعت ۱-۲ میلی لیتر در دقیقه سورپرفیوژ می گردید. به منظور مهارجریانات سیناپسی، 1 mM Kynurenic acid، 100 μM picrotoxin یا 100 μM bicuculline (Ionotropic) [17]، و مهارکننده های اختصاصی کانالهای GABA_A [18] به محلول پرفیوژن اضافه می شد. حجم محفظه ثبت 3 ml بوده که سبب می شد چندین دقیقه برای شستشوی کامل محفظه صرف گردد. سلولهای پورکنژ بر اساس موقعیت، اندازه و شکل و درخت دندریتی شناسایی می شدند. ثبت داخل سلولی از جسم سلولی با استفاده از آمپلی فایر AxoClamp 2B (Axon Instruments Inc., USA) در bridge mode و با کمک میکروالکترودهای شیشه ای با دیواره ضخیم از جنس بروسیلیکات (WPI, 120F, with inner filament) با مقاومت 80-40 مگا اهم انجام می گردید. الکترودها با استفاده از یک پولر افقی (APP-1, 52500, Stoelting, USA) کشیده شده و با محلول KCl 3M پر می شدند.

اكتساب داده ها و آنالیز

ثبتها در 30 KHz فیلتر گردیده و با استفاده از مبدل A/D (Powerlab ADInstruments) در 40 KHz رقمی شده و در یک رایانه IBM با کمک نرم افزار چارت شماره 5 (Powerlab ADInstruments) ذخیره می شدند. آنالیز داده ها با نرم افزار چارت و آنالیز آماری داده ها و ترسیم نمودارها با برنامه Excel صورت گرفت. به منظور بررسی اثر داروها نتایج بدست آمده پس از کاربرد دارو با نتایج بدست آمده قبل از اعمال دارو در همان نرون مقایسه گردیده و با آزمون student's paired t test معنی دار بودن آن سنجیده می شد. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار بودن در نظر گرفته می شد. به منظور بررسی اثر یک مهارکننده بر مدت زمان burst، interburst و فیرکانس، مقادیر این پارامترها چندین دقیقه قبل از کاربرد دارو با چندین دقیقه پس از کاربرد دارو مقایسه می گردید.

مواد و داروها

4-aminopyridine (4-AP) و tetraethylammonium chloride (TEA) با غلظت mM و iberiotoxin (IBTX) با غلظت 200 نانومولار، Apamin و α -dendrotoxin (DTX) با غلظت 100 نانومولار و کادمیم با غلظت

برخی بصورت تونیک، برخی دیگر بصورت burst شلیک نموده وعده ای از آنها خاموش می باشند [11 و 12]. در ارتباط با مکانیسم شلیک خودبخود نیز تحقیقات زیادی صورت گرفته است. با استفاده از تکنیک ولتاژ کلمپ بر روی سلولهای جدا شده پورکنژ، جریان سدیمی حساس به تترادوتوکسین (TTX) به نام جریان Resurgent منشا اصلی جریان رو به داخل بین اسپایکی معرفی شده است [13]. در این نمونه ها که فاقد درخت دندریتی می باشند، همچنین جریان کلسیمی نوع T نیز سهم قابل ملاحظه ای از جریانات رو به داخل را به خود اختصاص می دهد [6]. از طرف دیگر مطالعات انجام گرفته بر روی برشهای حاد مخچه ای نشان می دهد که دندریتها نقش بسیار مهمی در شلیک خودبخود از طریق تولید اسپایکهای کلسیمی ایفا می نمایند. پس از تولید این اسپایکها به جسم سلولی هدایت شده و سبب تولید اسپایک سدیمی در آن می شوند [8 و 7].

جریانات پتاسیمی نقش بسزایی در تنظیم رفتار الکتریکی نورونها ایفا می نمایند [14-16]. در سلولهای پورکنژ، این جریانات مدت زمان و ریولاریزاسیون پتانسیل عمل [10 و 16]، هیپرپولاریزاسیون متعاقب اسپایک اولیه و تاخیری (early and late afterhyperpolarization) و فاصله بین اسپایکهای سدیمی [1] را تنظیم می نمایند. جریانات پتاسیمی وابسته به کلسیم نیز در آنها شناخته شده است که نقش مهمی در مدت زمان burst و ریولاریزاسیون پتانسیل عمل ایفا می نمایند [10 و 9]. در این تحقیق الگوی شلیک خودبخود در نورونهای پورکنژ در برشهای حاد مغزی در شرایطی که ورودیهای سیناپسی مهار شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین با توجه به اهمیت جریانات پتاسیمی در رفتار الکتریکی نورونها، نقش این جریانات با استفاده از مهارکننده های کانالهای پتاسیمی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

آماده سازی برشهای مغزی

موشهای صحرایی نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی 100-250 g با اتر بیهوش گردیده و با استفاده از گیوتین حیوانات کوچک سر آنها جدا می گردید. با برداشتن استخوان پس سری، مخچه نمایان شده و با استفاده از اسکالپل از باقی مغز جدا و در محلول ACSF سرد شده قرار می گرفت. محلول ACSF شامل (بر حسب میلی مولار)، CaCl_2 2/4، MgSO_4 1/3، KH_2PO_4 1/2، KCl 5، NaCl 124 و 10% Glucose بود. این محلول بطور مداوم با ترکیب اکسیژن 5% و دی اکسید کربن 5% (کربوژن) بابل می گردید. پس از چند دقیقه بخش ورمیس مخچه جدا شده و برشهای پاراساژیتال با ضخامت 300 μm با استفاده از یک ویراتورم (Vibrosilce 752M, Campden Instruments Ltd, UK) تهیه می گردید. برشها در محلول کربوژنه شده ACSF به مدت یک ساعت در درجه حرارت 36°C انکوبه شده و پس از آن تا هنگام آزمایش

کانالهای کلسیمی بر شلیک فراخوانده شده مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲ ملاحظه می گردد، مهار کانالهای کلسیمی باعث حذف اسپایک کلسیمی گردید در حالیکه بر اسپایک سدیمی اثری نداشته است.

ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک و فارماکولوژیک فعالیت خودبخودی در سلولهای پورکنژ

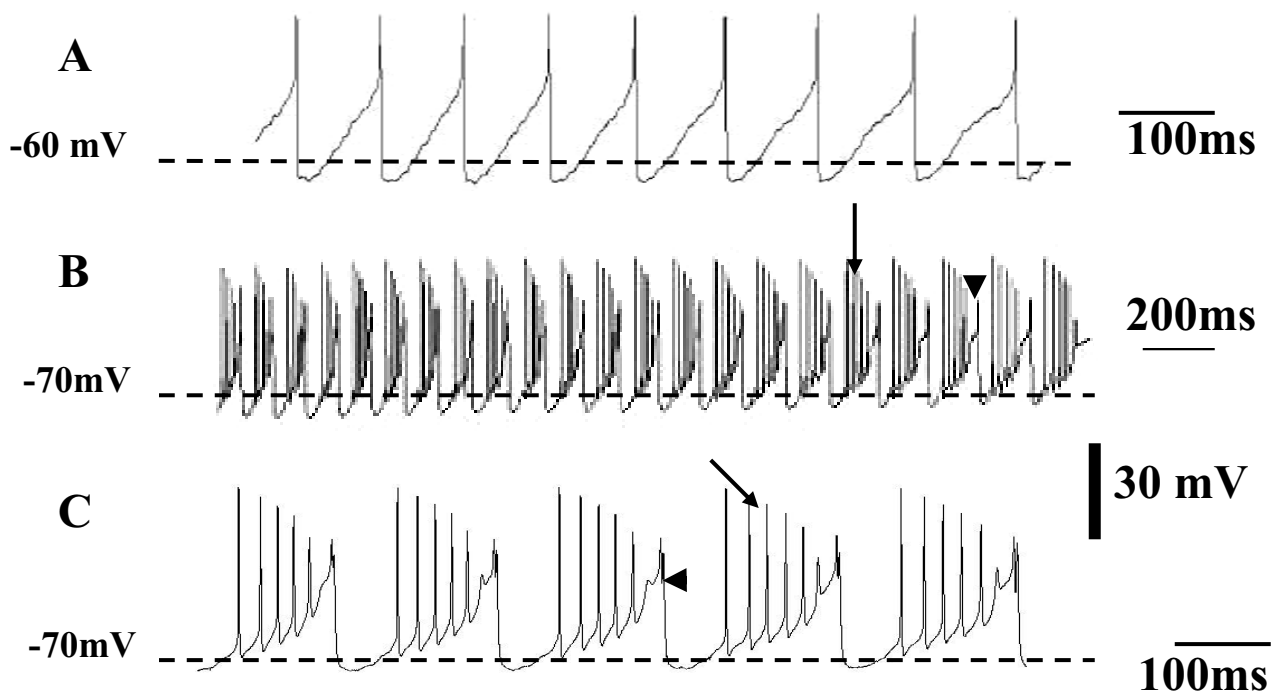
در حضور بلوک کننده های سیناپسی، تعداد قابل ملاحظه ای از سلولها دارای فعالیت خودبخود بودند. این فعالیت با دوره های فعال burst، که در آن تعداد متغیری اسپایک کلسیمی و یا سدیمی - کلسیمی در یک فاز دپولاریزه غشاء پدیدار می گردید، و دوره های خاموش و غیر فعال interburst، که در آن غشا در حالت هیپرپولاریزه قرار می گرفت، همراه بود (شکل ۳A). مدت زمان burst و interburst تنوع قابل ملاحظه ای را نشان می داد به گونه ای که در میان burst ها، برخی بطور متمایزی دارای دوره طولانی لکن احتمال رخداد بسیار کمتر نسبت به دیگر burst ها بودند. به منظور آنالیز دقیقتر، این burst ها که دارای مدت زمان بیشتر از ۲۵ ثانیه بودند، با نام burst طولانی مدت (longlasting burst = LB) متمایز گردیدند (شکل ۳B و C). همچنین دوره های غیر فعال تنها به دوره های interburst محدود نمی گردید و دوره های خاموش طولانی مدت نیز مشاهده می شد. در آنالیز کمی، دوره خاموش کمتر از ۲۰ ثانیه به عنوان interburst و طولانی تر از آن به عنوان دوره خاموش منظور گردید. این دوره های

۲۰۰-۱۰۰ میکرومولار بکار برده شدند. DTX, Apamin, IBTX. و کادمیم از شرکت سیگما، Kynurenic acid از شرکت Fluka، پیکروتوکسین و بیکوکولین از شرکت tocris تهیه گردیدند. داروها در آب مقطر حل شده و بصورت تغلیظ شده ۱۰۰ برابر در 20°C در الیکوت یکبار مصرف نگه داری می شدند. آنها با استفاده از سمپلر به محلول ثبت اضافه گردیده و پس از رقیق شدن در محلول داخل محفظه ثبت به غلظت نهایی می رسیدند.

نتایج

الگوی فعالیت الکتریکی در سلولهای پورکنژ

سلولهای پورکنژ شکل خاصی از شلیک را در فعالیت خودبخود و در پاسخ به پالس دپولاریزان نشان می دادند. این شلیک شامل یک دپولاریزاسیون غشایی که به آهستگی افزایش می یابد می باشد که در انتها شیب آن به مقدار زیادی افزایش یافته و با یک هیپرپولاریزاسیون نسبتاً عمیق تعقیب می گردد (شکل ۱A). در برخی از موارد بر روی این موج دپولاریزاسیون تعدادی اسپایک سریع قرار می گرفت (شکل C و ۱B). این شکل خاص شلیک مطابق با الگوی شلیک گزارش شده توسط (Llinas & Sugimori (1980) [۱] می باشد. در این گزارش آنها نشان داده اند که دپولاریزاسیون آهسته در واقع پتانسیل عمل کلسیمی بوده و اسپایکهای سریع که بر روی آن قرار می گیرد، پتانسیل عمل سدیمی می باشد. به منظور بررسی بیشتر، اثر کادمیم، مهار کننده عمومی

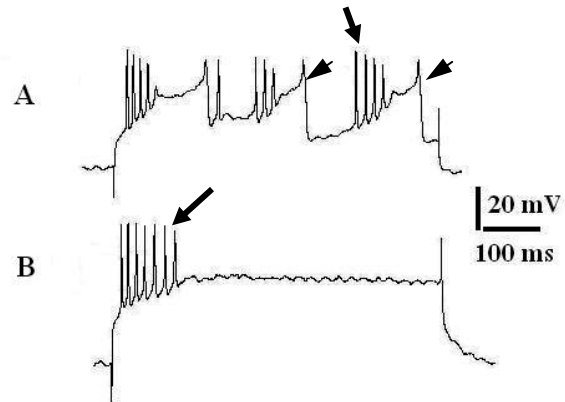


شکل ۱- انواع فعالیت الکتریکی در سلولهای پورکنژ. A. اسپایک کلسیمی بدون اسپایک سدیمی B و C. اسپایک سدیمی - کلسیمی. تعداد اسپایک سدیمی (فلش ها) سوار بر اسپایک کلسیمی (سر فلشها) در هر نورون متفاوت بود. در فعالیت خودبخود بیشتر نورونها تنها اسپایک کلسیمی شلیک می کردند و تعداد کمتری اسپایک سدیمی - کلسیمی نشان می دادند. هیچگونه شلیک تونیک اسپایک سدیمی در فعالیت خودبخود ثبت نگردید.

لکن به پالسهای دیپولاریزان به خوبی پاسخ می دادند که نشان می داد این سلولها از نظر الکتروفیزیولوژیک سالم می باشند.

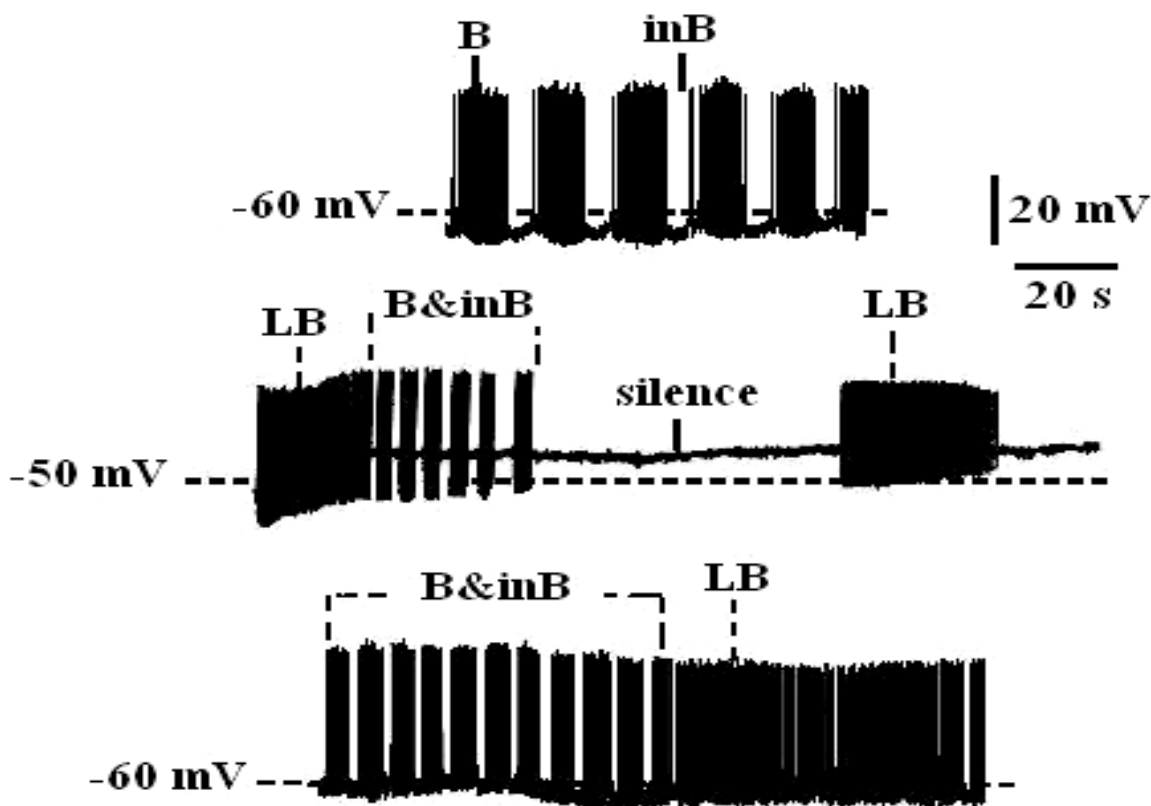
اثر مهار جریانات پتاسیمی بر الگوی شلیک خودبخود در سلولهای پورکنژ

با استفاده از مهارکننده های جریانات پتاسیمی نقش این جریانات در الگوی شلیک سلولهای پورکنژ مورد بررسی قرار گرفت و در شکلهای ۴، ۵ و ۶ اثر مهار این جریانات بر مدت زمان burst، interburst و فرکانس شلیک به تصویر کشیده شده است و جدول ۲ مقادیر کمی این کمیتها در شرایط کنترل و بعد از کاربرد دارو را نشان می دهد. 4-AP مهار کننده جریانات پتاسیمی $Kv1$ ، $Kv3$ ، $Kv4$ و با افینیتته کمتر $Kv2$ [۱۶] تاثیر قابل ملاحظه ای بر فعالیت خودبخود در این سلولها بر جای گذاشت. این مهار کننده، هنگامیکه بر سلولهای خاموش اعمال می گردید، تعداد قابل توجهی از آنها را فعال نموده (۴۷٪) و الگوی شلیک burst-interburst را در این نورونها منظم تر نمود. این دارو مدت زمان burst و interburst را بطور معنی داری طولانی کرده و شمار LB ها را نیز افزایش داد (از ۸ مورد به ۱۳ مورد در ۸ نورون). از طرف دیگر فرکانس شلیک خودبخود در burst ها کاهش معنی داری را متعاقب کاربرد 4-AP نشان داد. TEA مهار کننده جریانات delayed rectifier و جریانات پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا (big

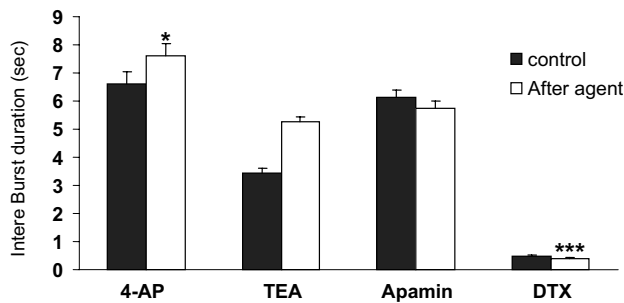


شکل ۲- اثر کادمیم بر پاسخ به پالس دیپولاریزان (0.5nA, 0.5sec) در سلولهای پورکنژ. A. شرایط کنترل و B. پس از کاربرد کادمیم (۲۰۰ میکرومولار). کادمیم با مهار کانالهای کلسیمی سبب حذف اسپایک کلسیمی (سر فلش) گردید در حالیکه اسپایک سدیمی (فلش) بدون تغییر باقی ماند.

خاموش یا توسط شلیک خودبخود خاتمه می یافتند و با دست کاریهای فارماکولوژیک و یا الکتروفیزیولوژیک سلول را از حالت خاموش بیرون می آورد. بطور خلاصه، در بررسی حاضر در ثبت از سلولهای پورکنژ فعال ۳ مد فعالیت خودبخود مشاهده گردید: ۱- مد burst-interburst ۲- مد burst طولانی مدت و یا LB ۳- مد خاموش. جدول ۱ داده های کمی در ارتباط با مدت زمان این پارامترها را نشان می دهد. تعدادی از نورونها هیچگونه فعالیت خودبخودی در شرایط کنترل نشان نمی دادند

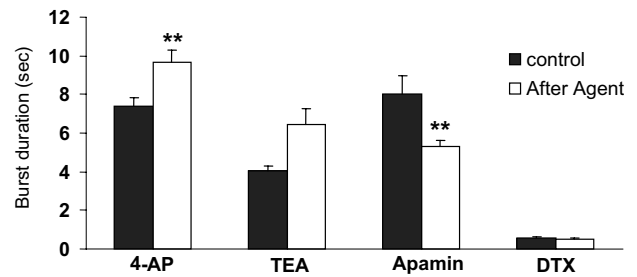


شکل ۳- الگوی شلیک خودبخودی در سلولهای پورکنژ. A. شلیک در سلولهای پورکنژ عمدتاً بصورت burst (B) بوده که با دوره های غیر فعال interburst (inB) از یکدیگر جدا می شدند. B و C: مدهای شلیک ثبت شده نشان داده شده است. B&inB: مد burst و interburst. LB: burst طولانی مدت. silence: دوره خاموش.



Agent	N	Event
4-AP	9	79
TEA	1	10
Apamin	6	149
DTX	2	53

شکل ۵- نمودار اثر بلوک کننده های کانالهای پتاسیمی بر مدت زمان interburst را نشان می دهد و جدول، تعداد نورون و حوادث منظور شده در آنالیز را نمایش می دهد. نمودارها نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد می باشند.



Agent	N	Event
4-AP	9	72
TEA	1	10
Apamin	6	145
DTX	2	53

شکل ۴- نمودار اثر بلوک کننده های کانالهای پتاسیمی بر مدت زمان burst را نشان می دهد و جدول، تعداد نورون و حوادث منظور شده در آنالیز را نمایش می دهد. نمودارها نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد می باشند.

جدول ۱- مدت زمان burst طولانی مدت (LB)، burst، interburst، دوره خاموش که در بین دوره های فعالیت خودبخود قرار می گرفت، و فرکانس شلیک در شرایط کنترل نشان داده شده است. N، تعداد نورون Event، تعداد حوادث اندازه گیری شده.

Event	N	Mean \pm SE	محدوده زمانی (s)	کمیت
۲۲	۹	۷۱/۴۶ \pm ۱۰/۷۵	۲۷-۲۱۱	LB (s)
۶۷۱	۱۵	۶/۳۲ \pm ۰/۳۷۱	۰/۷۱۸ - ۲۳/۴۱	مدت زمان burst (s)
۶۷۱	۱۵	۵/۶۹ \pm ۰/۲۹۷	۱/۰۳۸ - ۱۸/۷۴	مدت زمان interburst (s)
۵۱	۸	۶۷/۲۷ \pm ۱۵/۰۰۲	۲۰/۱ - ۲۳۲	مدت زمان دوره خاموش (s)
۵۹	۲۵	۴/۲ \pm ۰/۲۱	۰/۲ - ۱۰/۹۴	فرکانس شلیک (Hz)

جدول ۲- مقادیر بدست آمده برای burst، interburst و فرکانس شلیک intraburst در شرایط کنترل و پس از کاربرد مهارکننده های کانالهای پتاسیمی را نشان می دهد. N، تعداد نورون Event، تعداد حوادث اندازه گیری شده.

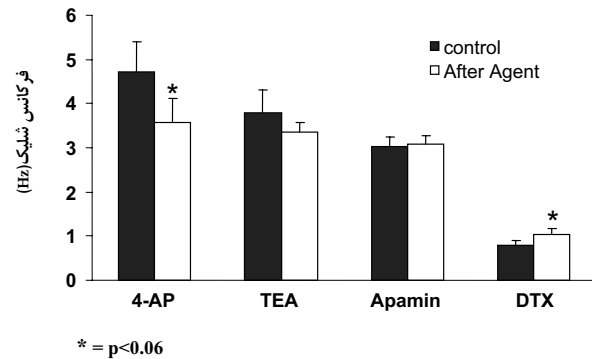
Event	N	Mean \pm SE بعد از دارو	Mean \pm SE قبل از دارو	پارامتر	دارو
۷۲	۹	۹/۶۵ \pm ۰/۶۶ **	۷/۳۶۴ \pm ۰/۴۵	زمان burst (s)	4-AP
۷۹	۹	۷/۶ \pm ۰/۴۵ *	۶/۶۲ \pm ۰/۴۳	زمان interburst (s)	
۱۲	۲۱	۳/۶ \pm ۰/۶ *	۴/۷ \pm ۰/۷	فرکانس (Hz)	
۱۷ و ۱۰	۱	۶/۴ \pm ۰/۸	۴/۱ \pm ۰/۲	زمان burst (s)	TEA
۲۰ و ۱۰	۱	۵/۳ \pm ۰/۲	۳/۴ \pm ۰/۲	زمان interburst (s)	
۸	۴	۳/۴ \pm ۰/۲	۳/۸ \pm ۰/۵	فرکانس (Hz)	
۱۴۵	۶	۵/۳ \pm ۰/۳ **	۸ \pm ۰/۹۵	زمان burst (s)	Apamin
۱۴۹	۶	۵/۷۵ \pm ۰/۲۲	۶/۱۱ \pm ۰/۲۶	زمان interburst (s)	
۵۵	۸	۳/۰۸ \pm ۰/۲	۳/۰۲ \pm ۰/۲۳	فرکانس (Hz)	
۵۳	۲	۰/۵۲ \pm ۰/۰۴	۰/۹۵ \pm ۰/۰۵	زمان burst (s)	DTX
۵۳	۲	۰/۴ \pm ۰/۱۲ ***	۰/۵ \pm ۰/۱۶	زمان interburst (s)	
۱۳	۳	۳۹/۶ \pm ۲/۴ *	۳۴ \pm ۳/۷	فرکانس (Hz)	

*. P<0.05 ** . P<0.01 ***. P<0.001

تفاوت قابل ملاحظه در این تحقیق با پژوهشهای انجام شده توسط این محققین، در سن نمونه های حیوانی استفاده شده می باشد: به این ترتیب که نورونها با شلیک تونیک از موشهای صحرایی جوانتر از ۲۰ روز گرفته شده اند در حالیکه حیوانات استفاده شده در این تحقیق بیش از ۳ هفته سن داشتند. شواهدی وجود دارند که نشان می دهد فعالیت ذاتی در سلولهای پورکنز بصورت نموی (developmental) تنظیم می شود [۹، ۱۱ و ۲۰] به گونه ای که در حیوانات جوان شلیک عمدتاً بصورت تونیک بوده ولی در حیوانات بالغ (بیش از ۳ هفته در مورد موش صحرایی بر طبق [۱۱ و ۲۱]) الگوی شلیک متفاوت شده و تخلیه burst دیده می شود. در این رابطه نشان داده شده است که دندریتهای سلولهای پورکنز پس از تولد تکامل یافته و سهم بیشتری در شلیک ذاتی ایفا می نمایند [۷، ۸، ۱۱ و ۲۱]. هنگامی که مغز بطور کامل تکامل می یابد، دندریتهای سلولهای پورکنز دارای تراکم بالایی از کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ می باشند که اجازه تولید پتانسیل های عمل کلسیمی را به آنها می دهد [۲، ۸، ۲۲-۲۵]. پس از تولید، پتانسیل های عمل کلسیمی به جسم سلولی هدایت شده و سبب شلیک اسپایکهای سدیمی در آن می شوند [۸]. در مجموع الگوی شلیک خودبخود در نورونهای پورکنز مغز بالغ بصورت تخلیه اسپایک سدیمی - کلسیمی بروز می نماید.

با توجه به این که اسپایکهای کلسیمی مذکور در دندریتهای تولید می شوند، داده های بدست آمده با کاربرد مهارکننده های کانالهای پتاسیمی 4-AP و TEA نشان می دهند که دندریتهای می توانند مبدأ تولید فعالیت خودبخود در این نورونها باشند. این مهارکننده ها شلیک خودبخود در نورونهای خاموش را القا نمودند. الگوی شلیک ایجاد شده همانند شرایط کنترل شامل اسپایک کلسیمی و یا سدیمی - کلسیمی بود و اسپایک سدیمی به تنهایی دیده نشد. با توجه به این که 4-AP مهار کننده جریان پتاسیمی غیر فعال شونده سریع (fast inactivating potassium channels) می باشد [۲۶] و به دلیل آن که این جریانات در پتانسیلهای زیر آستانه در سلولهای پورکنز فعال می باشند [۲۷]، این مهار کننده با افزایش تحریک پذیری نورونها، آنها را فعال کرده است. از طرف دیگر نشان داده شده است که هم 4-AP و هم TEA می توانند هدایت پتانسیلهای عمل کلسیمی از دندریتهای سلولهای پورکنز به جسم سلولی را بهبود بخشند [۲۲]. بنابراین، عدم شلیک تونیک اسپایک سدیمی در حضور 4-AP در ثبت های ما، نشان می دهد که این مهار کننده با افزایش تحریک پذیری نورونها، منجر به تولید اسپایکهای کلسیمی در دندریتهای شده و با تسهیل هدایت آنها، جسم سلولی را تحریک و سبب ایجاد اسپایک کلسیمی و یا سدیمی - کلسیمی در آن شده است.

کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم نقش بسزایی در رفتار الکتریکی سلولهای پورکنز ایفا می نمایند. در سلولهای پورکنز، متعاقب ورود مقادیر زیادی یون کلسیم، این کانالها فعال شده و به همراه کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ سبب هیپرپولاریزاسیون جسم سلولی و خاتمه شلیک پتانسیل عمل می شوند [۸]. نقش دو دسته از این کانالها، کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم با کندانسانس پایین (SK) و با کندانسانس بالا (BK)، در نورونها مورد بحث می باشد. در این میان نوع BK وابسته به ولتاژ بوده



Agent	N	Event
4-AP	12	12*
TEA	4	8
Apamin	8	55
DTX	3	13**

شکل ۶- نمودار اثر بلوک کننده های کانالهای پتاسیمی بر فرکانس شلیک خودبخود در نورونهای پورکنز را نشان می دهد و جدول، تعداد نورون و حوادث منظور شده در آنالیز را نمایش می دهد. نمودارها نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد می باشند. * میانگین فرکانس چندین دقیقه قبل از 4-AP با چندین دقیقه پس از آن مقایسه شده است. **: برای 4-AP، TEA و اپامین فرکانس شلیک intraburst و برای DTX فرکانس burst منظور شده است

conductance calcium activated K^+ channels, BK) [۱۵] نیز اثر قابل ملاحظه ای در فعال کردن سلولهای خاموش داشت لکن اثر آن نسبت به 4-AP ضعیف تر بوده و تنها ۰.۵٪ از سلولهای خاموش را فعال نمود. همچنین سلولهایی که تحت تاثیر TEA قرار می گرفتند، دوره های burst و interburst منظمی را نشان نمی دادند. اپامین، مهار کننده اختصاصی کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم با کندانسانس پایین (small conductance calcium activated K^+ channels, SK) [۹] نتوانست سلولهای پورکنز خاموش را فعال نماید (n=7) ولی بطور معنی داری مدت زمان burst را کوتاه نمود. تعداد LB ها نیز پس از اپامین کاهش اندکی یافت (از ۹ مورد به ۸ مورد در ۶ نورون). دندروتوکسین (DTX) مهار کننده اختصاصی کانالهای $Kv3$ [۱۶]، مدت زمان burst، interburst و فرکانس شلیک intraburst را کاهش داد. نورونهایی که تحت تاثیر DTX قرار گرفتند دارای دوره های burst و interburst کوتاهی بودند (شکل ۴ و ۵) و کاربرد بلوک کننده مذکور منجر به افزایش فرکانس شلیک burst گردید (شکل ۶).

بحث

در این تحقیق نشان داده شد که سلولهای پورکنز دارای فعالیت خودبخود بوده و اسپایکهای کلسیمی و یا سدیمی - کلسیمی را بصورت burst شلیک می نمایند. الگوی شلیک ثبت شده مطابق با الگوی شلیک گزارش شده توسط Llinas & Sugimori (1980) [۱] می باشد ولی با الگوی شرح داده شده توسط دیگر محققین مغایرت دارد [۱، ۱۹ و ۴]. این محققین یک تخلیه تونیک از اسپایکهای سدیمی را شرح داده اند.

تشکر و قدردانی

بررسی حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی میباشد. نویسندگان مقاله بدینوسیله مراتب قدردانی و سپاسگزاری خود را از ریاست محترم مرکز سرکار خانم دکتر معتمدی اعلام می دارند

منابع

- [1] Edgerton, J.R., Reinhart, P.H. Distinct contributions of small and large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels to rat Purkinje neuron function, *J Physiol*, 548 (2003) 53-69.
- [2] Llinas, R., Sugimori, M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices, *J Physiol*, 305 (1980) 171-195.
- [3] Hausser, M., Clark, B.A. Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration, *Neuron*, 19 (1997) 665-78.
- [4] Williams, S.R., Christensen, S.R., Stuart, G.I., Häusser, M. Membrane potential bistability is controlled by the hyperpolarization-activated current I_H in rat cerebellar Purkinje neurons in vitro, *J Physiol*, 539 (2002) 469-483.
- [5] Raman, I.M., Bean, B.P. Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons, *J Neurosci*, 19 (1999) 1663-1674.
- [6] Swensen, A.M., Bean, B.P. Ionic mechanisms of burst firing in dissociated Purkinje neurons, *J Neurosci*, 23 (2003) 9650-9663.
- [7] Womack, M., Khodakhah, K. Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons, *J Neurosci*, 22 (2002) 10603-10612.
- [8] Womack, M.D., Khodakhah, K. Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells, *J Neurosci*, 24 (2004) 3511-3521.
- [9] Womack, M.D., Khodakhah, K. Somatic and small-conductance calcium-activated potassium channels regulate the output of cerebellar Purkinje neurons, *J Neurosci*, 23 (2003) 2600-2607.
- [10] McKay, B.E., Turner, W. Kv3 channels enable burst output in rat cerebellar Purkinje cells, *Eur J Neurosci*, 20 (2004) 729-739.

[۱۶] و نقش خود را در ریولاریزاسیون و هیپریولاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل ایفا می نمایند [۱، ۲۹ و ۲۸]. از طرف دیگر نوع SK حساسیت کمتری به ولتاژ و بالاتری به غلظت کلسیم داخل سلولی داشته و تصور می شود که بصورت تونیک در تمامی زمانها در سلولهای پورکنژ فعال می باشد [۹]. در مغز پستانداران ۳ زیر واحد SK1، SK2 و SK3 شناسایی شده است که در مخرجه سطوح بالایی از بیان ژن SK3 وجود دارد. تمامی این زیرواحدها به اپامین، سم زنبور عسل، حساس می باشند [۳۰]. جریان SK در طول burst در سلولهای پورکنژ تا ۳۸٪ افزایش می یابد [۶] و مهار این جریان سبب کاهش مدت زمان burst و interburst می شود [۸]. نتایج ما نیز نشان داده اند که اپامین دوره های مذکور را کاهش می دهد. این نتایج نشان می دهد که انباشته شدن جریان SK سبب ختم دوره burst نمی شود. در تایید این مطلب در سلولهای جدا شده پورکنژ نشان داده شده است که مهار جریان پتاسیمی وابسته به کلسیم با کبالت، شلیک را متوقف می نماید و پیشنهاد شده است که این جریانات برای هیپریولاریزه کردن غشاء به میزانی که برای بازگشت اساسی کانالهای سدیمی کافی است، حیاتی می باشند [۵]. از طرف دیگر این جریان می تواند دوره interburst و از اینرو فرکانس رخداد burst را تحت تاثیر قرار دهد. از اینرو پیشنهاد می شود که جریان SK می تواند سهم بسزایی در زمان بندی سیگنالهای تولید شده در سلولهای پورکنژ ایفا نماید.

در این تحقیق نشان داده شد که جریانات حساس به DTX در سلولهای پورکنژ حضور داشته و در تنظیم مدت زمان burst و interburst نقش دارند. بیان شده است که جریان پتاسیمی به نام جریان D در نورونها وجود دارد که به DTX حساس می باشد [۱۶]. در نورونهای هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ این جریان نقش برجسته ای در تنظیم آستانه بالا برای اسپایکهای کلسیمی جسم سلولی ایفا کرده و تولید این اسپایکها را محدود به نواحی دندریتی می نماید [۳۱]. همچنین نشان داده شده است که از طریق مهار این جریان، DTX تحریک پذیری نورونهای هرمی نئوکورتکس را تعدیل می نماید [۳۲]. حضور این جریان نیز در سلولهای اصلی ناحیه جانبی امیگدال گزارش شده است که همراه با دیگر جریانات هیپریولاریزاسیون متعاقب سریع را تولید می نمایند [۲۸]. در ارتباط با وجود این جریان در سلولهای پورکنژ اختلاف نظر وجود دارد به گونه ای که برخی محققین این جریان را در سلولهای پورکنژ تشخیص داده اند [۱۰] در حالیکه دیگر محققین وجود آنرا تایید نموده اند [۳۳]. در سلولهای پورکنژ در کشت برشهای مغزی، DTX برالگوی تخلیه اثری نداشته است [۲۲]. داده های ما نشان می دهند که این جریان در سلولهای پورکنژ حضور داشته و در تنظیم الگوی شلیک سهیم می باشد. در مجموع می توان گفت جریانات پتاسیمی نقش زیادی در تنظیم الگوی شلیک خودبخود در نورونهای پورکنژ ایفا می نمایند. جریانات حساس به TEA و 4-AP با افزایش تحریک پذیری آنها و تسهیل هدایت اسپایک کلسیمی از دندریتها، فعالیت خودبخود را تقویت می نمایند و جریانات SK و جریان حساس به DTX (D current) در زمان بندی سیگنالهای خروجی از این سلولها سهیم می باشند.

- cerebellar slice cultures, *J Physiol*, 540.1(2002) 57-72.
- [23] Gavelier, P., Desplantez, T., Beekenkamp, H., Bossu, J.L. K⁺ channel activation and low-threshold Ca²⁺ spike of rat cerebellar Purkinje cells in vitro, *Neuroreport*, 14 (2003)167-171.
- [24] Mougnot, D., Bossu, J.L., Gähwiler, B.H. Low-threshold Ca²⁺ currents in dendritic recordings from Purkinje cells in rat cerebellar slice cultures, *J Neurosci*, 17 (1997) 160-170.
- [25] Kano, M., Schneggenburger, R., Vekhratsky, A., Konnerth, A. Depolarization-induced calcium signals in the somata of cerebellar Purkinje neurons, *Neurosci Res*, 24 (1995) 87-95.
- [26] Hille, B. Ion channels of Excitable membranes, 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA (2001).
- [27] Sacco, T., Tempia, F. A-type potassium currents active at subthreshold potentials in mouse cerebellar Purkinje cells, *J Physiol*, 543.2 (2002) 505-520.
- [28] Faber, E.S.L., Sah, P. Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdale, *J Neurosci*, 543.2 (2002) 1618-1628.
- [29] Shao, L.R., Halvorsrud, R., Graham, L.B., Storm, J.F. The role of BK-type Ca²⁺-dependent K⁺ channels in spike broadening during firing in rat hippocampal pyramidal cells, *J Physiol*, 521 (1999) 135-146.
- [30] Blank, T., Nijholt, I., Kye, M.J., Spiess, J. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels as targets of CNS drug development, *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3 (2004) 161-7.
- [31] Golding, N.L., Jung, H.Y., Mickus, T., and Spruston, N. Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons, *J Neurosci*, 19 (1999) 8789-8798.
- [32] Bekkers, J.M., Delaney, A.J. Modulation of excitability by α -dendrotoxin-sensitive potassium channels in neocortical pyramidal neurons, *J Neurosci*, 21 (2001) 6553-6560.
- [33] Southan, A.P., Robertson, B. Electrophysiological characterization of voltage-gated K⁺ currents in cerebellar basket and Purkinje cells: Kv1 and Kv3 channel subfamilies are present in basket cell nerve terminals, *J Neurosci*, 20 (2000) 114-122.
- [11] Cingolani, L.A., Gymnopoulos, M., Boccaccio, A., Stocker, M., Pedarzani, P. Developmental regulation of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel expression and function in rat Purkinje neurons, *J Neurosci*, 22(2002) 4456-4467.
- [12] Seo, W.S., Shin, J.H., Suh, C.K. 4-Aminopyridine (4-AP) augments Ca²⁺-dependent action potential and changes oscillatory firing patterns in rat cerebellar Purkinje cells, *Yonsei Medical Journal*, 40 (1999) 112-117.
- [13] Raman, I.M., Bean, B.P. Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons, *J Neurosci*, 17 (1997) 4517-4526.
- [14] Dolly, J.O., Parcej, D.N. Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels, *J Bioenerg Biomembr*, 28(1996) 231-53.
- [15] Mathie, A., Woollorton, J.R., Watkins, C.S. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents, *Gen Pharmacol*, 30 (1998) 13-24.
- [16] Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., et al. Molecular diversity of K⁺ channels, *Ann N Y Acad Sci*, 868 (1999) 233-85.
- [17] Stone, T.W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids, *Pharmacol Rev*, 45 (1993) 309-379.
- [18] Yoon, K.W., Covey, D.F., Rothman, S.M. Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons, *J Physiol*, 464 (1993) 423-439.
- [19] Jaeger, D., Bower, J.M. Prolonged responses in rat cerebellar Purkinje cells following activation of the granule cell layer: an intracellular in vitro and in vivo investigation, *Exp Brain Res*, 100 (1994) 200-14.
- [20] Falk, T., Muller, Y.L., Yool, A.J. Differential expression of three classes of voltage-gated Ca²⁺ channels during maturation of the rat cerebellum in vitro, *Brain Res Dev Brain Res*, 115(1999)161-70.
- [21] Hockberger, P.E., Tseng, H.Y., Connor, J.A. Development of rat cerebellar Purkinje cells: electrophysiological properties following acute isolation and in long-term culture, *J Neurosci*, 9 (1989) 2258-2271.
- [22] Cavelier, P., Pouille, F., Desplantez, T., Beekenkamp, H., Bossu, J.L. Control of the propagation of dendritic low-threshold Ca²⁺ spikes in Purkinje cells from rat