

خصایص یاخته های عصبی ناحیه CA1 هیپوکمپ مقاطع زنده مغزی در اثر تخلیه های انفجاری تشنجی ناشی از مهار منتشر شونده قشری

پرویز شهابی^۱، علی گرجی^{۲*}، یعقوب فتح الهی^۱، مهیار جان احمدی^۳، سید جواد میر نجفی زاده^۱، جلیل عرب خردمند^۴، ماریوس الکساندر ایکوف^۲
 ۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
 ۲. انستیتو فیزیولوژی I، دانشگاه مونستر، آلمان
 ۳. مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
 ۴. مرکز علوم اعصاب شفا، تهران، ایران

پذیرش: ۱۳ آذر ۸۹

دریافت: ۳۰ مهر ۸۹

چکیده

مقدمه: شواهد آزمایشگاهی بر ارتباط نزدیک بین مهارمنتشر و فراگیر (SD) و چند اختلال عصبی از جمله صرع دلالت می کند. صرع یکی از شایعترین اختلالات مغزی می باشد و به رغم تحقیقات گسترده، هنوز ساز و کار ایجاد آن ناشناخته است. هیپوکمپ یکی از مهمترین ساختارهای درگیر در تشنج می باشد. بنابراین اثرات SD بر فرآیند های آسیب شناختی منتهی به پتانسیل های میدانی تشنجی در هیپوکامپ با کاربرد ثبت داخل سلولی بررسی شده است.

روش ها: این مطالعه روی برش هیپوکمپ-بادامه-قشر نو موش صحرایی انجام شده است که در آن با KCl، مهار منتشر شونده ایجاد می گردید. در این برش، با کاربرد آنتاگونیست گیرنده بیکوکولین در غلظت زیر آستانه تشنج ($1/25 \mu\text{mol/L}$) به مدت ۴۵ دقیقه، SD منجر به ایجاد پتانسیل های میدانی Ictal و Interictal و در ثبت داخل سلولی، منجر به القاء PDS می شود.

یافته ها: مقایسه فعالیت سلولی قبل و بعد از القاء SD نشان داد که پتانسیل استراحت غشاء اندکی دپولاریزه شد، آستانه پتانسیل عمل کاهش یافت و فرکانس پتانسیل های عمل بعد از SD به طور معنی داری افزایش یافت. دامنه دپولاریزاسیون و دامنه تخلیه ها همچنین با SD به طور معنی داری سطح افزایش یافته ای نشان دادند. بیشتر نورونها از FA به SA تغییر یافتند که بر تحریک پذیری نورونی دلالت دارد.

نتیجه گیری: مهار منتشر شونده، در بافت های عصبی مستعد به فعالیت تشنجی با افزایش تحریک یا کاهش مهار، در وقوع صرع نقش دارد. در این مطالعه به ارتباط SD با علایم بالینی صرع توجه ویژه ای شده است. گسترش مهار منتشر شونده در نواحی مغزی مستعد فعالیت صرعی ممکن است بعضی از بیماران را به حملات تشنجی وادار کند.

واژه های کلیدی: صرع، برش افقی، مهارمنتشر شونده، فعالیت انفجاری تشنجی، بیکوکولین

مقدمه

ساخت سازوکارهای ایجاد صرع، از دیرباز یکی از موضوعات پژوهشی بشر بوده است و علیرغم تحقیقات گسترده، هنوز سازوکار اصلی این اختلال ناشناخته است. با توجه به این که ۴۰ درصد بیماران صرعی به دارو درمانی مقاوم می باشند، برای کشف شیوه های جدید درمان صرع به تحقیقات زیادی مبادرت شده است.

صرع^۱ یکی از شایعترین اختلالات عصبی می باشد.

gorjial@uni-uenster.de

www.phypha.ir/ppj

1. Epilepsy

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

سازوکارهای گسترش آنها احتمالا متفاوت است. فعالیت تشنجی ممکن است توسط SD مکرر، زیاد شود. و این احتمالا توسط مهار انتخابی عملکرد گاباژژیک می باشد. پیشنهاد شده است که SD احتمالا توسط هماهنگی نورونی واقع در کانون-های مختلف تخلیه های انفجاری، منتهی به تحریک پذیری بالا می گردد. گسترش SD های غیر طبیعی به صورت الکتریکی یا فارماکولوژیکی منجر به ایجاد کانون های فعالیت صرعی می گردد [۱۳].

در این مطالعه فرض بر این است که SD همزمانی کانون-های مختلف پتانسیل های میدانی شارپ ریتمیک را تسهیل می کند و باعث افزایش تحریک پذیری در بافت مغزی موش صحرایی می گردد. با توجه به این که SD یکی از راههای ایجاد وقایع شبه تشنجی می باشد، سؤال این است که SD با چه مکانیسم هایی باعث هم زمانی فعالیت کانون های مختلف پتانسیل های میدانی شارپ ریتمیک و افزایش تحریک پذیری در بافت مغزی می گردد؟ و این وقایع شبه تشنجی چه اثری بر ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک نواحی مهم در ایجاد تشنج از جمله CA1 هیپوکمپ دارد؟

مواد و روش ها

حیوانات مورد استفاده نر و از نژاد ویستار، با وزنی بین ۲۵۰-۳۵۰ گرم بودند. بیهوشی حیوانات در یک دیسکاتور با ایزوفلوران (۱- کلرو-۲ و ۲ و ۲- تری فلورو اتیل- دی فلورو متیل اتر) انجام می گرفت. در حدود 0.8 ml ایزوفلوران بر روی یک پد گازی در دیسکاتور خالی ریخته می شد و بعد از حدود ۲ دقیقه حیوان به داخل آن منتقل و در آن بسته می شد. بعد از اطمینان از بیهوشی عمیق حیوان، سر آن جدا گردیده و مغز حیوان خارج می گردید و سپس در محلول $(Y-I)^6$ (اعداد به mmol/L هستند؛ $1:24 \text{ NaCl}$ ، 4 KCl ، $1/24 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ ، $1/3 \text{ MgSO}_4$ ، 26 NaHCO_3 ، 1 CaCl_2 ، $10 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) سرد (دمای 3°C) که کربوژنه ($5\% \text{ CO}_2$ و $95\% \text{ O}_2$) می شد قرار

شایعترین صرع بالغین، صرع لوب گیجگاهی^۱ (TLE) می باشد. در بیشتر بیماران مبتلا به صرع لوب گیجگاهی، ساختارهای هیپوکمپ و آمیگدال ناحیه تولید کننده تشنجات می باشند [۱]. در انسان تشنج عمدتا از هیپوکمپ و نواحی مجاور آن در لوب گیجگاهی منشأ می گیرد. تمایل هیپوکمپ به شروع تشنج به دلیل توانایی آن در ایجاد تقویت سیناپسی طولانی مدت می باشد. وجود یک مدار داخلی یک طرفه تحریکی و محدود بودن نورون های مهاری در هیپوکمپ، این ناحیه را مستعد تولید فعالیت تشنجی کرده است. ورودی قشر انتورینال به شکتج دنداندار و سپس CA3 و از آنجا به CA1 و مجدداً از CA1 به قشر انتورینال، این حلقه ارتباطی یکی از مسیر هایی است می تواند باعث ایجاد تشنج و یا تقویت آن گردد [۲]. تحقیقات نشان می دهد که کمتر از ۳۰ درصد امواج SD^2 منتشره از قشر گیجگاهی، از طریق قشر انتورینال به ناحیه CA1 هیپوکمپ می رسد [۳].

ارتباط نزدیکی بین SD و فعالیت صرعی وجود دارد. مهار منتشر می تواند در مدل های حیوانی مختلف تخلیه های تشنجی ایجاد کند [۴، ۵، ۶]. به نظر می رسد علیرغم مطالعات زیاد، شناخت ارتباط بین مهار منتشر و تخلیه های انفجاری تشنجی در بافت های نورونی حیوانی از اهمیت ویژه ای برخوردار است [۷، ۸، ۹]. تحقیقات آزمایشگاهی در صرع کانونی به این مسأله معطوف شده اند که چطور فعالیت الکتریکی در یک نورون یا گروهی از نورون ها منجر به تولید تشنج می گردد. هر نورون داخل کانون تشنج پاسخ الکتریکی هماهنگ و کلیشه ای دارد که PDS^3 نامیده می شوند. پاسخ الکتریکی هماهنگ وابسته به وقایع بسیار هماهنگ شبکه ای^۴ می باشد که از یک EPSP^5 بزرگ ناشی می شود. این سیگنال الکتریکی بزرگ شاید نتیجه فعالیت همزمان مسیره های تحریکی راجعه باشد [۱۰]. روی PDS شماری پتانسیل عمل با بسامد بالا سوار می شوند و PDS با هیپرپلاریزاسیون ادامه می یابد [۱۱]. مشابه SD ، PDS بین نورون ها گسترش می یابد، اما با سرعت بالاتری ظاهر می شود [۱۲]. بنابراین،

4. Hypersynchronize
5. Excitatory Post Synaptic Potential
6. Yamamoto I

1. Temporal Lobe Epilepsy
2. Spreading Depression
3. Paroxysmal Depolarization Shift

روی سطح ناحیه مورد مطالعه قرار می‌گرفت. سپس با استفاده از میکرومانیپولاتور با کنترل الکترونیکی با حرکت‌های $2/5$ میکرونی در یک زاویه 60° نسبت به برش افقی از میان بافت عبور می‌کرد. کاهش اختلاف پتانسیل اندازه‌گیری شده نسبت به الکتروود رفرانس به مقداری در حدود 60 mV- و ثبت پتانسیل عمل به صورت خود به خودی یا با تزریق جریان مثبت، نشان دهنده محل نوک الکتروود بود.

پارامترهای اندازه‌گیری شده در ثبت داخل سلولی شامل؛ (۱) پتانسیل استراحت غشاء^۱ (RMP) نسبت به خط پایه (۲) آستانه پتانسیل عمل (Thr of AP) اختلاف بین خط پایه و شلیک پتانسیل عمل (۳) دامنه (Amp): به صورت اختلاف بین آستانه و ماکزیمم قسمت مثبت منحنی (۴) طول مدت پتانسیل عمل در Half Amplitude Width (dur of AP_{HAW}) (۵) دامنه AHP (AHP_{Amp}) و طول مدت AHP (AHP_{dur}) (۶) فرکانس پتانسیل عمل در دقیقه می‌باشند و پارامترهای اندازه‌گیری شده بعد از تزریق جریان مثبت: (۱) دامنه دپولاریزاسیون پتانسیل غشاء (AD) (۲) دامنه تخلیه (Amp) (۳) فاصله بین دو تا اسپایک در زمان تخلیه^۲ (ISI) بودند. همچنین الگوی تخلیه نورونها: (۱) نورونهای با سازش پذیری سریع^۳ (FA) (۲) نورونهای با سازش پذیری آهسته^۴ (SA) (۳) نورونهای با خاصیت ذاتی انفجاری^۵ (IB) بود و پارامترهای اندازه‌گیری فعالیت صرعی: (۱) طول مدت PDS (PDS_{dur}) (۲) دامنه دپولاریزاسیون (AD) (۳) فاصله بین اسپایک‌ها (ISI) بودند.

ثبت خارج سلولی، توسط یک میکروالکتروود شیشه‌ای و الکتروود رفرانس مورد استفاده قرار گرفت. در ثبت خارج سلولی میکرو الکتروود با محلول Y-II پر می‌شد و مقاومت الکتروود بین $2/5$ - $0/5$ مگا اهم بود که توسط یک پل AgAgCl-KCl به آمپلی فایر متصل می‌شد. برای ثبت پتانسیل‌های میدانی صرعی^۶ (EFP)، الکتروود ثبت در ناحیه CA₁ قرار می‌گرفت و دامنه پتانسیل‌های میدانی صرعی (EFP_{Amp}) بین ماکزیمم نقاط

می‌گرفت و با یک میکروتوم اسلایس‌های ترکیبی حاوی قشر-هیپوکمپ-بادامه (شکل ۱) به ضخامت $500 \mu\text{m}$ تهیه می‌گردید. نمونه‌ها در دمای 28°C در Y-I نگهداری می‌شدند و بعد از 30 دقیقه CaCl_2 با غلظت 1 mmol/L اضافه می‌شد. pH محلول نگهداری بافت بین $7/45$ - $7/35$ بود. تنظیم pH با مقدار کربوژن صورت می‌گرفت. بعد از نیم ساعت از اضافه کردن کلرید کلسیم، بافت مورد مطالعه از محفظه نگهداری بافت توسط یک قطره چکان به یک محفظه Interface بر روی یک غشاء ترانسپرنس منتقل و توسط محلول (Y-II) (اعداد به mmol/L هستند؛ 124 NaCl ، 4 KCl ، $1/24$ ، $1/3$ ، NaH_2PO_4 ، 26 MgSO_4 ، 2 CaCl_2 ، 10 ؛ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) سوپرفیوز می‌شد. دمای محلول Y-II به طور مداوم توسط یک پروب اندازه‌گیری می‌شد و در دمای $30/8^\circ\text{C}$ به طور ثابت نگهداری می‌شد. سرعت محلول سوپرفیوز به طور دقیق کنترل می‌شد و تقریباً 2 ml در دقیقه بود. کربوژن مرطوب و گرم به روی نمونه هدایت می‌شد تا از خشک شدن آن جلوگیری شود. یک الکتروود شیشه‌ای با KCl ، 2 مولار پر شده و در یک نگهدارنده ویژه ثابت می‌گردید و با یک لوله پلاستیکی به یک تزریق کننده فشار متصل شده و در حالی که نوک الکتروود در تماس با قشر انتورینال (لایه II-I) بود، یک پالس با فشار بالا جهت تزریق پتاسیم کافی برای ایجاد SD اعمال می‌شد. قطر نوک الکتروود $2 \mu\text{m}$ ، فشار تزریق $0/1$ بار به مدت 200 میلی ثانیه بود. در این آزمایش باید مطمئن شد که جهت تزریق KCl برخلاف جهت جریان محفظه ثبت است.

برای ثبت پتانسیل غشاء سلول یک الکتروود شیشه‌ای و یک الکتروود رفرانس مورد استفاده قرار گرفت. الکتروود شیشه‌ای از فیلامانهای بروسیلیکات با قطر خارجی $1/5 \text{ mm}$ و قطر داخلی $0/87 \text{ mm}$ بود و توسط یک میکرو الکتروود پولر sutter مدل P-87 افقی الکترودهایی با مقاومت بین 160 - 70 مگا اهم تهیه می‌شد. محلول مورد استفاده برای پر کردن الکترودها، پتاسیم متیل سولفات 2 مولار بود که بعد از عبور از یک صافی برای پر کردن الکترودها مورد استفاده قرار می‌گرفت. این الکتروود توسط یک سیم AgAgCl به آمپلی فایر متصل می‌شد. آمپلی فایر مورد استفاده دارای مد Bridge بود که برای تزریق جریان مورد استفاده قرار می‌گرفت. بعد از قرار گرفتن بافت در محفظه ثبت و سوپرفیوز با محلول Y-II الکتروود داخلی سلولی بر

1. Resting Membrane Potential
2. Inter-spike Interval
3. Fast Adapting Neuron
4. Slow Adapting Neuron
5. Intrinsically Bursting Neurons
6. Epileptic Field Potential

آستانه پتانسیل عمل (Thr of AP) بین $1/9 \text{ mV}$ و $8/7 \text{ mV}$ دامنه (Amp) اندازه گیری شده در محدوده 48 mV و $8/5 \text{ mV}$ طول مدت پتانسیل عمل ($\text{dur of AP}_{\text{HAW}}$) بین $88/5 \text{ ms}$ و $2/8 \text{ ms}$ دامنه AHP بین $1/1 \text{ mV}$ و $8/8 \text{ mV}$ طول مدت AHP نیز بین $22/3 \text{ ms}$ تا 343 ms و فرکانس اندازه گیری شده نیز در محدوده $36/\text{min}$ و $900/\text{min}$ قرار داشتند (جدول ۱، شکل ۱ و ۲).

به علاوه موج مربعی مثبت با شدت جریان $0/1 \text{ nA}$ ، $0/2$ ، $0/3 \text{ nA}$ ، $0/4 \text{ nA}$ به داخل همه نورونها تزریق شد (شکل ۴). نتایج حاصل را به صورت دامنه دپولاریزاسیون (AD)، دامنه پتانسیل عمل (Amp) و فاصله بین اسپایک ها (ISI) نشان می دهد.

مثبت و منفی و طول مدت (EFP_{dur})، بین خطوط دور شدن و برگشتن به پتانسیل استراحت غشاء اندازه گیری می گردید.

یافته ها

از آنجایی که هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت سلولی نورونهای نواحی مختلف قبل و بعد از القاء می باشد. بخش نتایج منحصر به نواحی هیپوکمپ می باشد و بررسی در نواحی دیگر مغز هنوز ادامه دارد. نتایج حاصل از فعالیت نورونی قبل از ایجاد SD بر پایه اندازه گیری از ۱۴ نورون می باشد که تحت شرایط کنترل، داده های حاصل از آنها جمع آوری شده است. پتانسیل استراحت غشاء سلولها بین $45/7 \text{ mV}$ و $65/1 \text{ mV}$ مقادیر

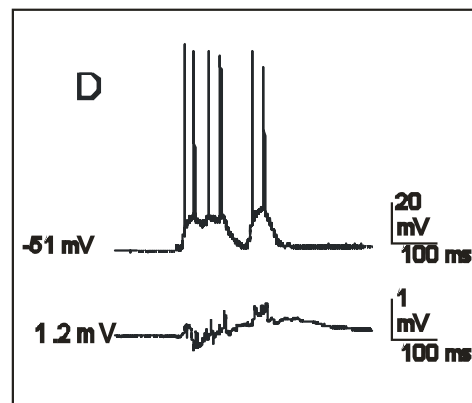
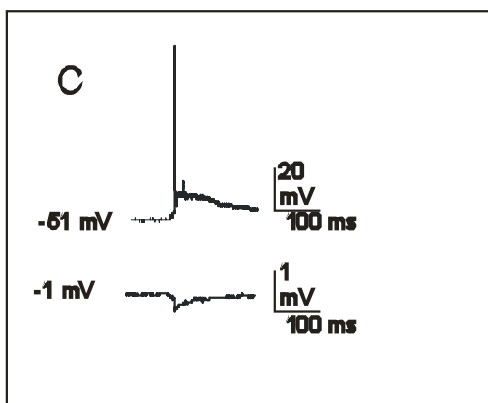
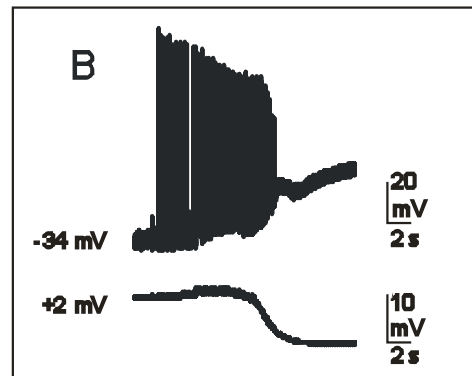
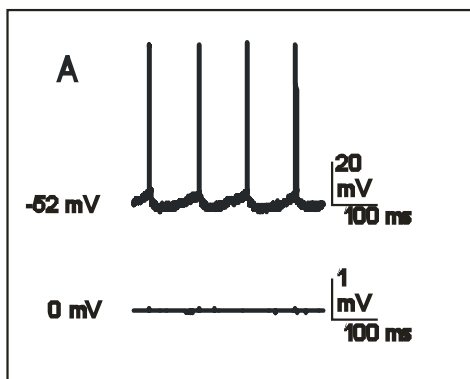
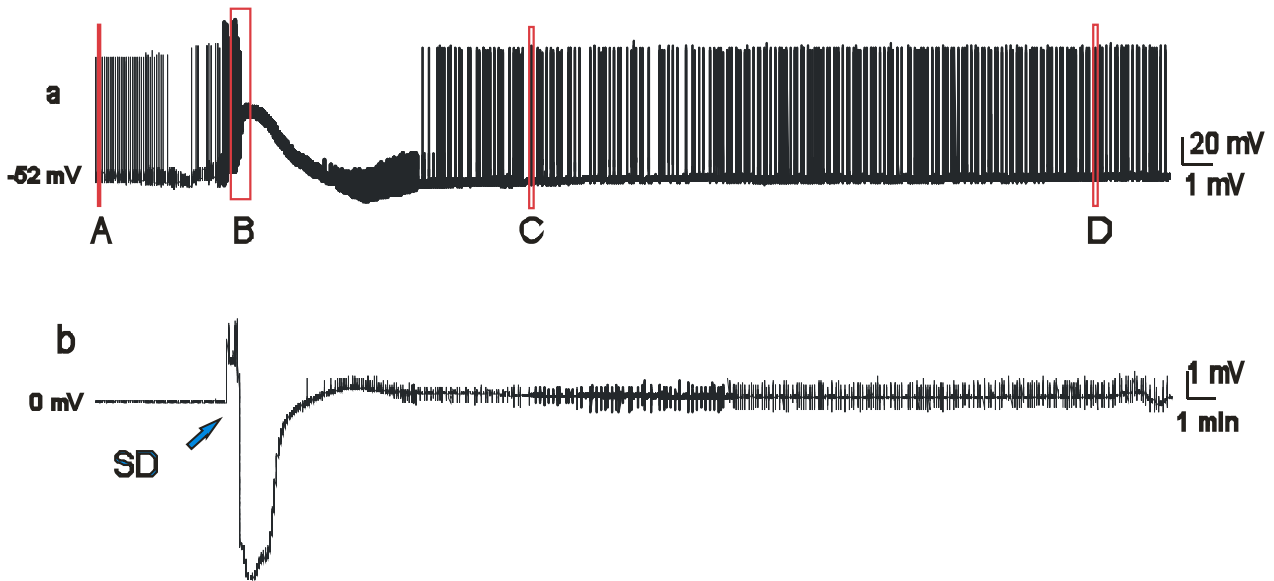
جدول ۱- میانگین $(M) \pm (S.E.M)$ برای پتانسیل استراحت غشاء (RMP)، آستانه پتانسیل غشاء (Thr of AP)، دامنه (Amp)، طول مدت پتانسیل عمل در Half Amplitude With ($\text{dur of AP}_{\text{HAW}}$)، دامنه (AHP_{amp}) و طول مدت AHP (AHP_{dur}) و فرکانس پتانسیل عمل (Freq) در هیپوکمپ قبل و بعد از SD. P-Value: نشان دهنده معنی داری بر حسب اختلاف بین دو اندازه با استفاده از تست t-زوجها می باشد.

	RMP (mV)	Thr of AP (mV)	Amp (mV)	dur of AP_{HAW} (ms)	AHP_{amp} (mV)	AHP_{dur} (ms)	Freq (min^{-1})
Before SD M \pm SEM	$-52/8 \pm 0/4$	$3/9 \pm 0/1$	62 ± 1	$14/1 \pm 0/9$	$3/5 \pm 0/2$	$81/7 \pm 4/7$	$349 \pm 61/7$
After SD M \pm SEM	$-51/4 \pm 0/5$	$3/2 \pm 0/2$	$58 \pm 0/9$	$10/5 \pm 0/9$	$3/8 \pm 0/1$	$81/8 \pm 3/9$	$530 \pm 70/4$
P-Value	$0/020$	$0/001$	$0/006$	$0/004$	$0/138$	$0/988$	$0/032$

جدول ۲- میانگین $(M) \pm (S.E.M)$ برای دامنه دپولاریزاسیون (AD)، دامنه پتانسیل عمل (Amp) و فواصل بین اسپایک (ISI). تخلیه های نورونی در هیپوکمپ با تزریق جریان مثبت با شدت های مختلف توسط الکترود داخل سلولی قبل و بعد از ایجاد SD. P-Value: نشان دهنده معنی داری بر حسب اختلاف بین دو اندازه با استفاده از تست t-زوجها می باشد.

	$0/1 \text{ nA}$			$0/2 \text{ nA}$		
	AD (mV)	Amp (mV)	ISI (mV)	AD (mV)	Amp (mV)	ISI (min^{-1})
Before SD M \pm SEM	$10/4 \pm 0/5$	$54/9 \pm 3/1$	$116/5 \pm 11/9$	$13/4 \pm 2/4$	$50 \pm 3/1$	$59/4 \pm 3$
After SD M \pm SEM	$22/6 \pm 5/5$	$65/8 \pm 12$	$58/9 \pm 10/7$	$18/1 \pm 0/8$	$62/7 \pm 2/7$	$44/2 \pm 5/8$
P-Value	$0/02$	$0/51$	$0/04$	$0/031$	$0/01$	$0/259$

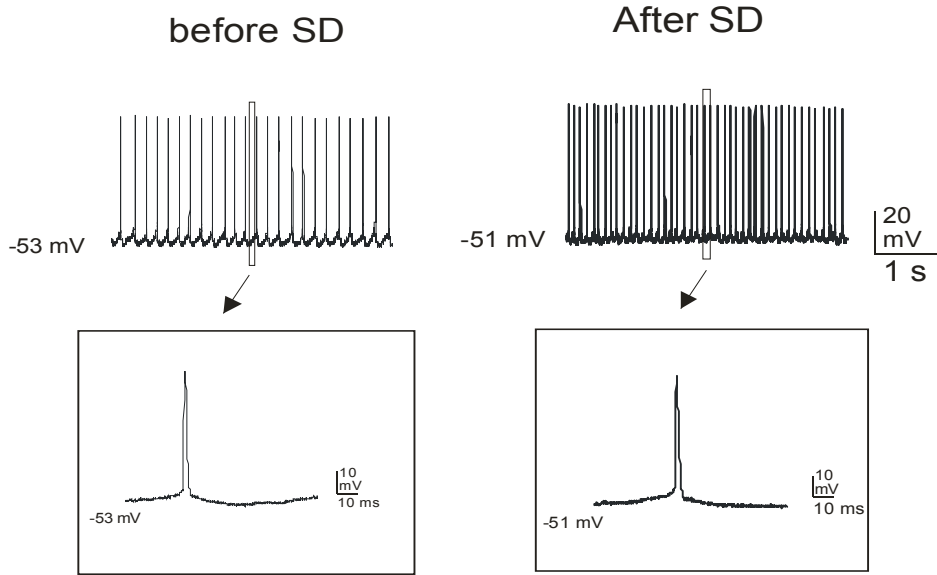
	$0/3 \text{ nA}$			$0/4 \text{ nA}$		
	AD (mV)	Amp (mV)	ISI (ms)	AD (mV)	Amp (mV)	ISI (ms)
Before SD M \pm SEM	$20 \pm 8/9$	$54/7 \pm 3/4$	$24/3 \pm 0/9$	$33/3 \pm 3/5$	$51/1 \pm 3/5$	$25/6 \pm 9/4$
After SD M \pm SEM	$27/8 \pm 6/5$	$52/5 \pm 0/63$	$13 \pm 0/8$	$36/2 \pm 3/1$	$73/5 \pm 2/6$	$18/9 \pm 2/7$
P-Value	$0/654$	$0/665$	$0/002$	$0/56$	$0/001$	$0/042$



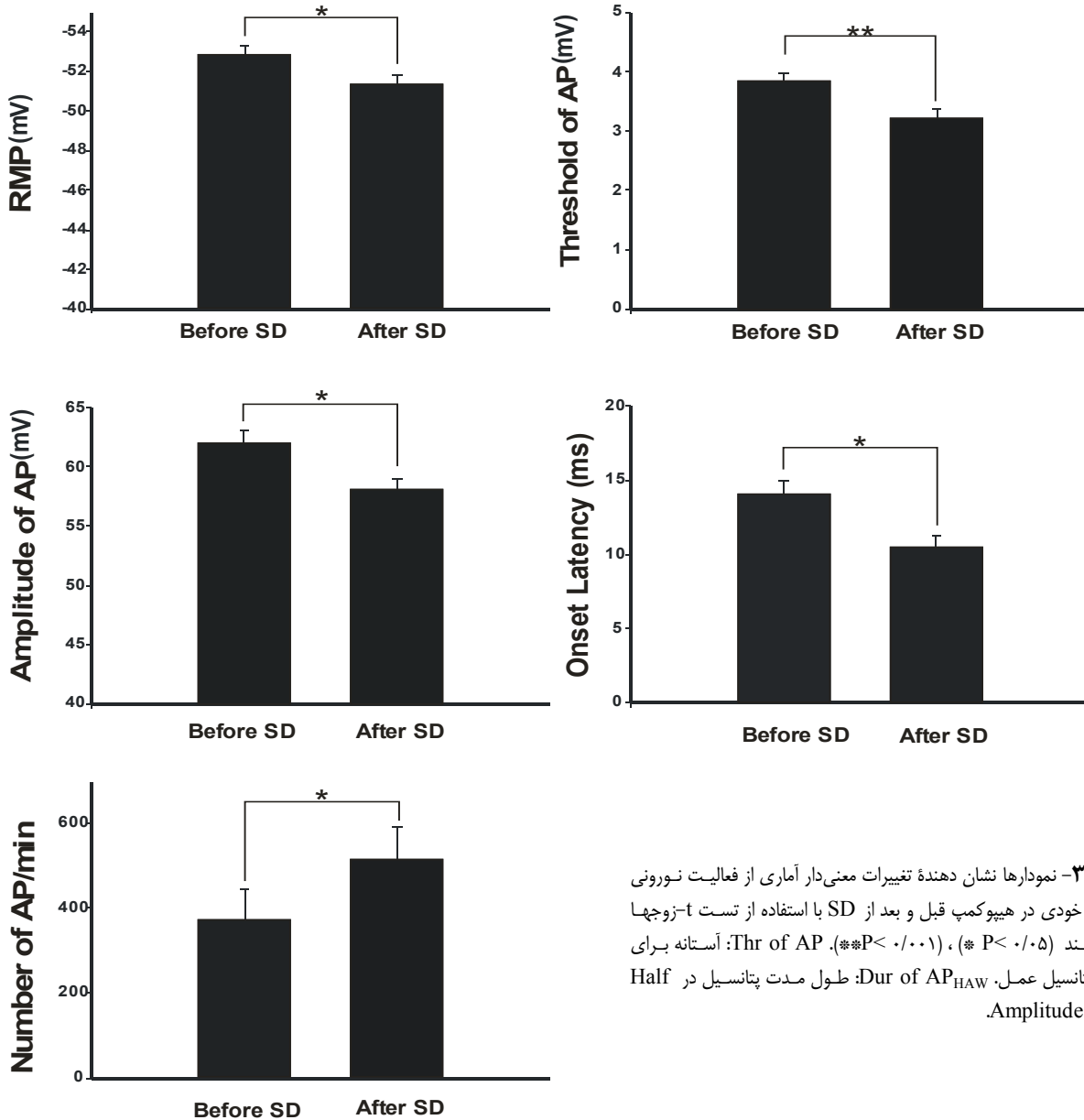
شکل ۱- نمونه‌ای از ثبت درون یاخته‌ای در هیپوکمپ. a: ثبت درون یاخته‌ای و b: ثبت برون یاخته‌ای. علامت پیکان نشان دهنده إلقاء SD، A: فعالیت خود به خودی به مدت ۵ دقیقه قبل از SD، B: مرحله اولیه تحریک‌پذیری ۳۰ ثانیه بعد از SD، C/D: فعالیت صرعی ۱۰ و ۳۰ دقیقه بعد از SD.

سازش آهسته (SA) نشان دادند و ۶ تا سلول پتانسیل عملی نشان ندادند. تزریق جریان 0.2 nA منجر به دپولاریزاسیون پتانسیل غشاء (AD) از $5/2 \text{ mV}$ به $20/6 \text{ mV}$ ، محدوده دامنه بین $41/5 \text{ mV}$ و $60/2 \text{ mV}$ و مقادیر ISI بین $36/7 \text{ ms}$ و $74/5 \text{ ms}$ (جدول ۲، شکل ۴) گردید.

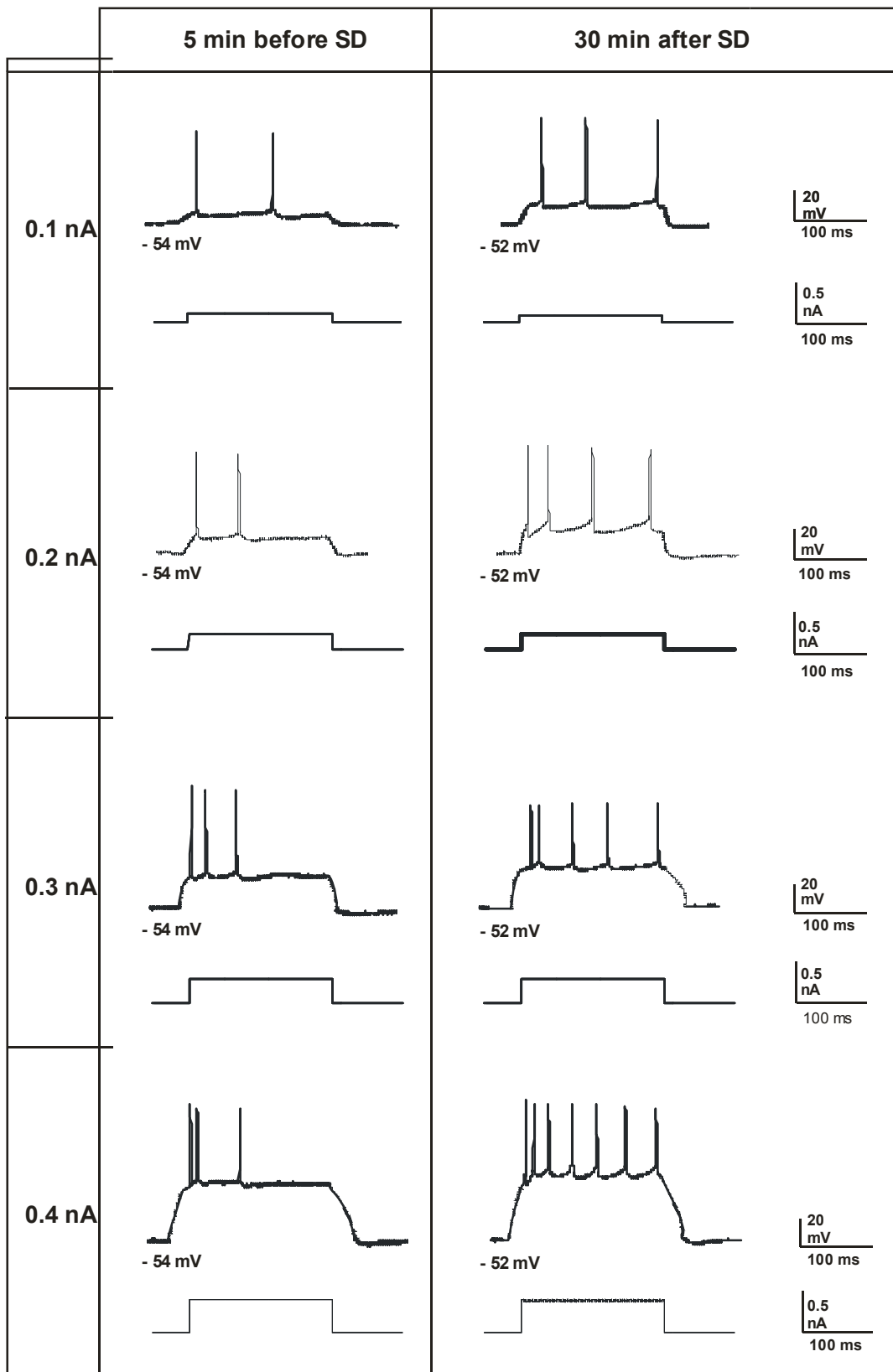
تزریق جریان 0.1 nA منجر به دپولاریزاسیون پتانسیل غشاء (AD) از $8/5 \text{ mV}$ به $11/3 \text{ mV}$ ، دامنه پتانسیل‌های عمل بین $48/6 \text{ mV}$ و $61/3 \text{ mV}$ و فاصله بین اسپایک‌ها (ISI) بین $100/2 \text{ ms}$ و $139/8 \text{ ms}$ شد (جدول ۲، شکل ۴). ۶ تا از ۱۴ تا سلول با سازش سریع (FA) و ۲ تا الگوی تخلیه



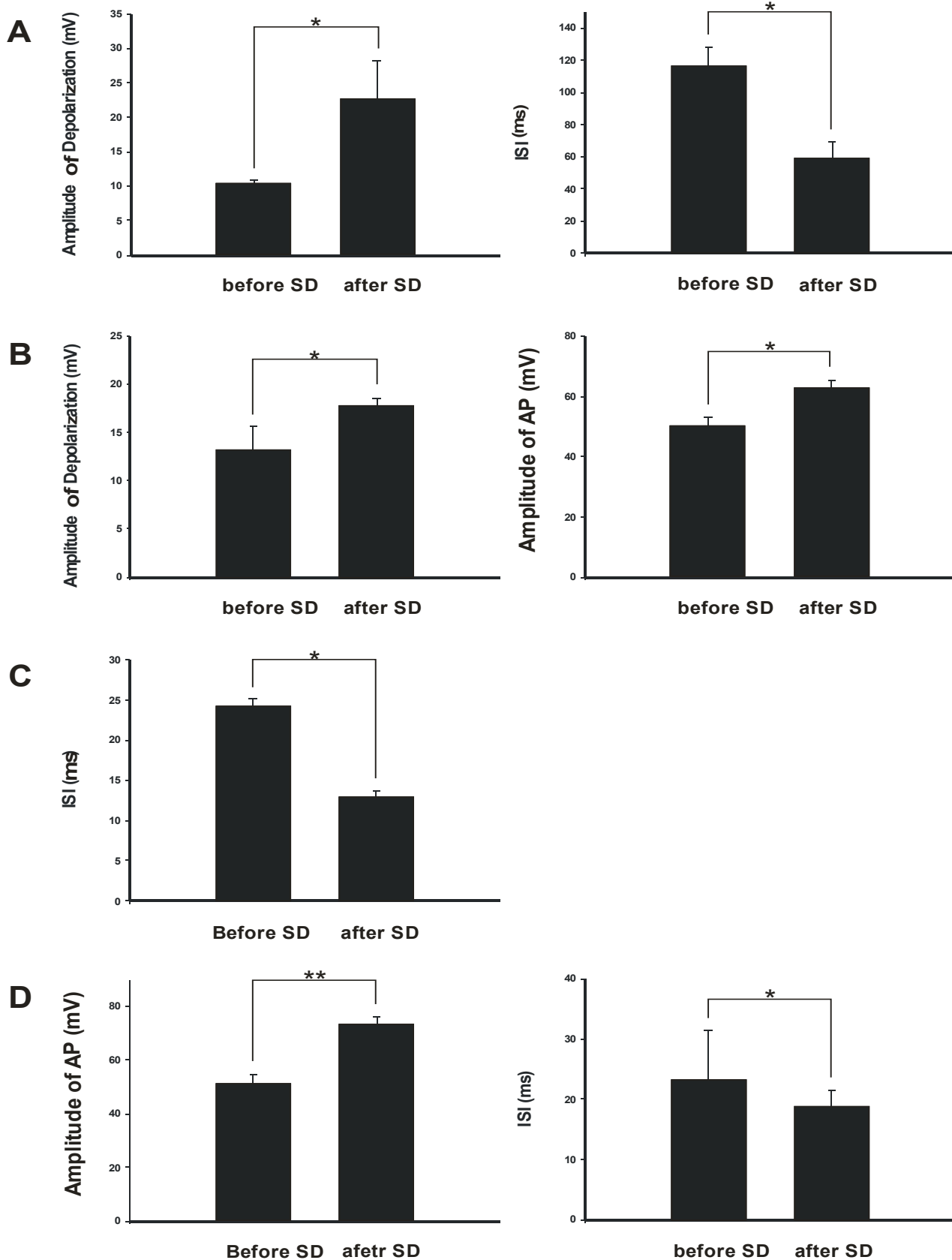
شکل ۲- نمایش جزئیات فعالیت خود به خودی نورون در هیپوکمپ قبل و بعد از SD.



شکل ۳- نمودارها نشان دهنده تغییرات معنی دار آماری از فعالیت نورونی خود به خودی در هیپوکمپ قبل و بعد از SD با استفاده از تست t-زوجها می باشند ($P < 0.05$), ($P < 0.001$), Thr of AP: آستانه برای ایجاد پتانسیل عمل. Dur of AP_{HAW} : طول مدت پتانسیل در Half Amplitude With



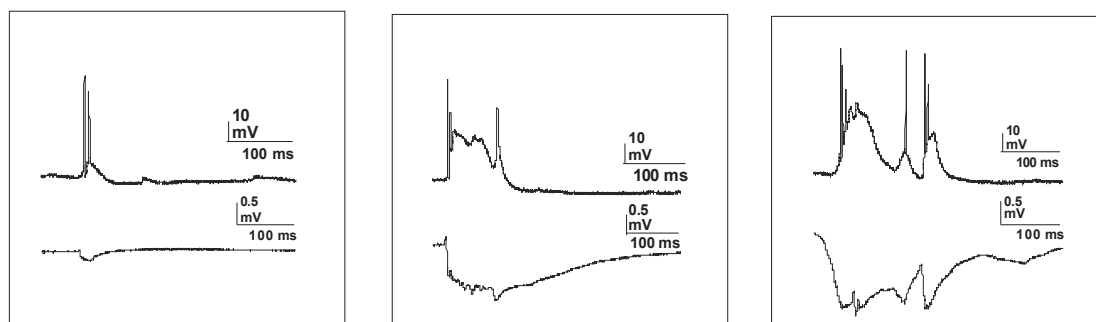
شکل ۴- نمونه‌هایی از ثبت درون یاخته‌ای پس از تزریق جریان مثبت با شدت‌های مختلف در هیپوکمپ. ۵ دقیقه قبل از SD و ۳۰ دقیقه بعد از SD.



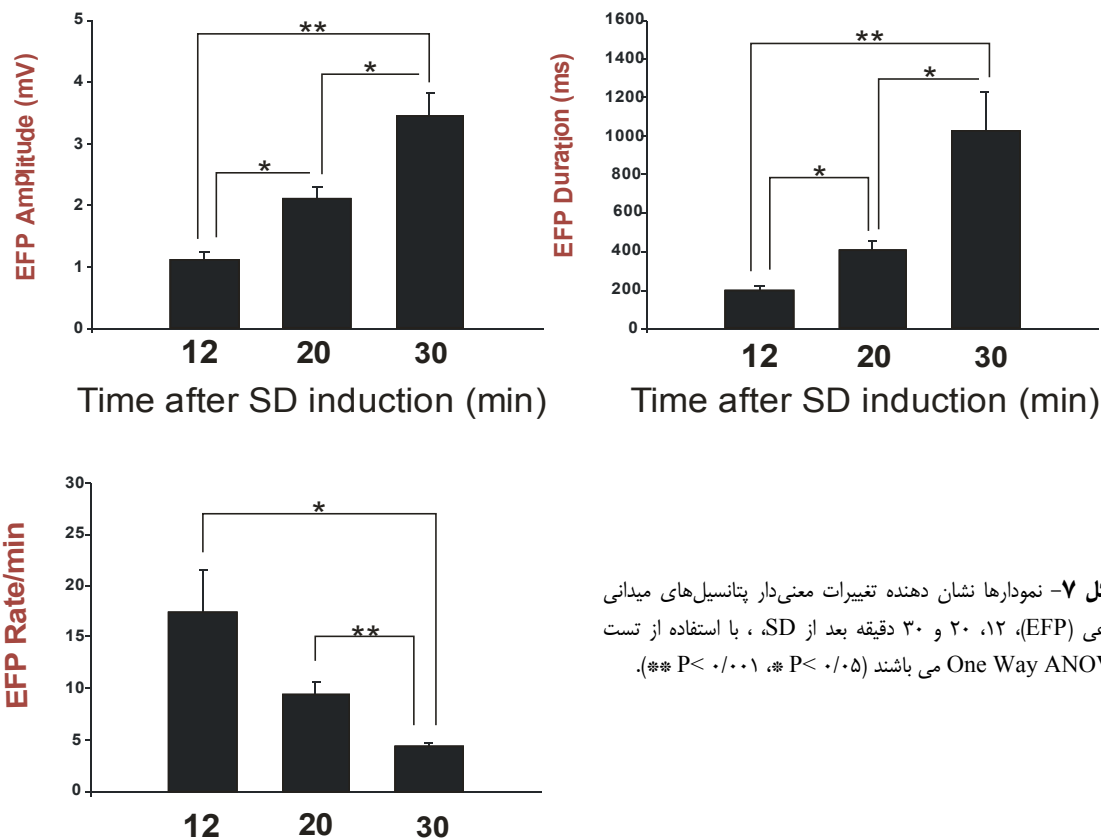
شکل ۵- نمودارها نشان دهنده تغییرات معنی دار آماری در فعالیت نورون، بعد از تزریق جریان مثبت داخل سلولی قبل و بعد از SD با استفاده از تست t-زوجها می باشند (A: تزریق جریان 0.1^{nA}، B: تزریق جریان 0.2^{nA}، C: تزریق جریان 0.3^{nA} و D: تزریق جریان 0.4^{nA}). (**P < 0.01, *P < 0.05)

جدول ۳- میانگین $S.E.M \pm (M)$ برای دامنه پتانسیل‌های میدانی صرعی (EFP_{amp})، طول مدت پتانسیل‌های میدانی صرعی (EFP_{dur}) و فرکانس پتانسیل‌های میدانی صرعی در هیپوکمپ، ۱۲، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بعد از SD. P-Value: نشان دهنده معنی‌داری بر حسب اختلاف بین دو اندازه با استفاده از با استفاده از تست t-زوجها می باشد.

	+ ۱۲ min	+ ۲۰ min	+ ۳۰ min	P-Value
EFP_{amp} (mV) M \pm SEM	۱/۱ \pm ۰/۱	۲/۱ \pm ۰/۲	۳/۴ \pm ۰/۴	<۰/۰۰۱
EFP_{dur} (ms) M \pm SEM	۱۹۳/۷ \pm ۲۵/۹	۴۰۳/۵ \pm ۵۴/۷	۱۰۲۵/۷ \pm ۲۰۶/۲	<۰/۰۰۱
EFP_{freq} (1/min) M \pm SEM	۱۷/۴ \pm ۴/۱	۹/۵ \pm ۱/۲	۴/۴ \pm ۰/۴	<۰/۰۰۱



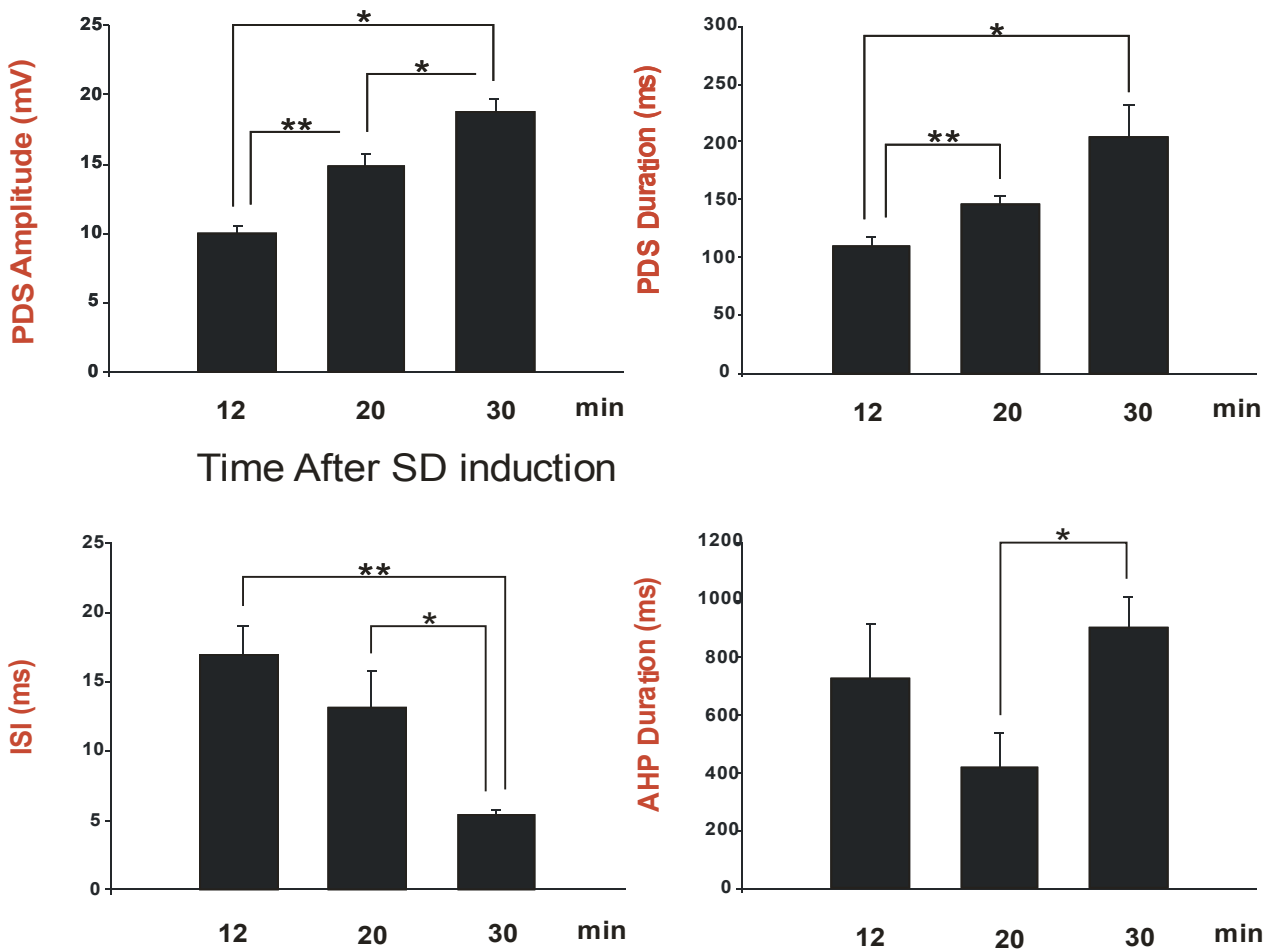
شکل ۶- جزئیات ثبت فعالیت نورونی پاروکسیسمال در هیپوکمپ ۱۲، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بعد از SD. بالایی: پتانسیل غشاء (MP)، پائینی: پتانسیل میدانی (FP).



شکل ۷- نمودارها نشان دهنده تغییرات معنی‌دار پتانسیل‌های میدانی صرعی (EFP)، ۱۲، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بعد از SD، با استفاده از تست One Way ANOVA می باشند ($P < ۰/۰۰۱$ ، $P < ۰/۰۵$).

جدول ۴- میانگین $S.E.M \pm (M)$ برای طول مدت فعالیت پاروکسیمال نورون (PDS_{dur})، دامنه دپولاریزاسیون (AD)، فواصل بین اسپایک (ISI) در هیپوکمپ ۱۲، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بعد از SD. P-Value: نشان دهنده معنی داری بر حسب اختلاف بین سه اندازه با استفاده از با استفاده از تست One Way ANOVA می باشد.

	+ ۱۲ min	+ ۲۰ min	+ ۳۰ min	P-Value
PDS_{dur} (ms) M \pm SEM	۱۱۰/۴ \pm ۶/۷	۱۴۶/۲ \pm ۶/۸	۲۰۴/۵ \pm ۴/۲۷	<۰/۰۰۱
AD (mV) M \pm SEM	۱۰ \pm ۰/۵	۱۴/۹ \pm ۰/۸	۱۸/۷ \pm ۰/۹	<۰/۰۰۱
ISI (ms) M \pm SEM	۱۷ \pm ۲/۱	۱۳/۲ \pm ۲/۵	۵/۵ \pm ۲/۵	<۰/۰۰۱



شکل ۸- نمودارها نشان دهنده تغییرات معنی دار فعالیت نورونی پاروکسیمال در هیپوکمپ ۱۲، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بعد از SD، با استفاده از تست One Way ANOVA می باشند ($P < ۰/۰۰۱$ ، $P < ۰/۰۵$).

۱۴ نورون FA و سه تا SA نشان دادند و ۲ تا پتانسیل عملی نشان ندادند.

در تزریق جریان ۰/۴ nA دامنه دپولاریزاسیون (AD) بین ۹ mV و ۵۱/۳ mV، دامنه مقادیری بین ۳۶/۵ mV و ۶۱/۷ mV و فاصله بین اسپایکها بین ۱۰/۱ ms و ۴۵ ms (جدول ۲، شکل ۴) بود. ۱۰ تا از سلولها سریع سازش (FA) بودند و

۶ تا از نورونها FA و دو تا SA نشان دادند و ۶ تا پتانسیل عملی نشان ندادند. تزریق جریان ۰/۳ nA منتهی به دپولاریزاسیون غشاء (AD) بین ۱۳/۶ mV و ۴۶/۲ mV، دامنه بین ۴۹/۴ mV تا ۶۱ mV و فواصل بین اسپایک (ISI) بین ۲۱/۴ ms و ۳۵/۲ ms (جدول ۲، شکل ۴) شد. ۹ عدد از

فقط ۴ تا الگوی SA را نشان دادند.

بعد از SD، ۱۴ تا نورون در هیپوکمپ آزمایش شدند. پتانسیل استراحت غشاء (RMP) بین -45 mV و $-65/6$ mV بود و اختلاف معنی داری بین مقادیر گروه کنترل در RMP ($P=0/02$)، جدول ۱ و شکل ۳) وجود داشت.

آستانه پتانسیل عمل (Thr of AP) مقادیر $1/1$ mV و $7/8$ mV را نشان داد. کاهش آستانه پتانسیل عمل بعد از SD همچنین معنی دار ($P < 0/001$)، جدول ۱، شکل ۳) بود. برای دامنه پتانسیل عمل (Amp) مقادیر بین $42/4$ mV و $75/1$ mV اندازه گیری شدند و اختلاف معنی داری ($P < 0/006$)، جدول ۱، شکل ۳) با دامنه پتانسیل عمل قبل از SD وجود داشت. همچنین زمان پتانسیل عمل (dur of AP_{HAW}) تغییرات معنی داری ($P < 0/004$) نشان داد و مقادیر بین $1/4$ ms و 34 ms (جدول ۱، شکل ۳) بودند. دامنه AHP مقادیری از $1/9$ mV تا $7/5$ mV (جدول ۱، شکل ۳، $P = 0/138$) را نشان داد. طول مدت AHP بین $37/5$ ms و $20/1$ ms (جدول، شکل ۳، $P = 0/998$) بود. فرکانس به طور معنی داری به مقادیری بین $190/min$ و $840/min$ (جدول ۱، شکل ۴، $P = 0/032$) تغییر کرد.

حتی بعد از SD شدت جریانهای $0/1$ nA، $0/2$ nA، $0/3$ nA و $0/4$ nA به داخل نورون تزریق شد. تزریق جریان $0/1$ nA سبب دپولاریزاسیون پتانسیل غشاء از $13/6$ mV به $32/8$ mV (جدول ۲، شکل ۵) گردید و این مقادیر به طور معنی داری ($P = 0/02$) با قبل SD تفاوت داشتند. دامنه (Amp) مقادیری بین $41/8$ mV و $80/2$ mV (جدول ۲، شکل ۵، $P = 0/051$) داشت. فواصل بین اسپایک (ISI) مقادیر $41/9$ ms و 90 ms (جدول ۲، شکل ۵) نشان دادند و اختلاف معنی داری ($P = 0/04$) با مقادیر قبل از SD داشتند. ۵ تا سلول الگوی شلیک FA و ۸ تا سلول الگوی SA نشان دادند و یک نورون هیچ پتانسیل عمل نداشت.

بعد از تزریق یک جریان $0/2$ nA دامنه دپولاریزاسیون (AD) در محدوده بین $10/3$ mV و $24/1$ mV (جدول ۲، شکل ۵) بود. این نتایج به طور معنی داری ($P = 0/031$) با مقادیر قبل از SD تفاوت دارند. دامنه پتانسیل عمل (Amp) بین $53/9$ mV و $74/1$ mV (جدول ۲، شکل ۵) بود که به طور معنی داری ($P = 0/01$) با مقادیر قبل از SD تفاوت داشت.

فواصل بین اسپایک ها (ISI) مقادیری بین $24/6$ ms و 61 ms (جدول ۲، شکل ۵، $P = 0/259$) نشان دادند. ۴ تا سلول الگوی تخلیه FA و ۸ تا سلول الگوی SA نشان دادند و ۲ تا هیچ پتانسیل عملی نشان ندادند. تزریق جریان $0/3$ nA دامنه دپولاریزاسیون را از $21/2$ mV تا $34/2$ mV (جدول ۲، شکل ۵، $P = 0/654$) منحرف کرد. دامنه (Amp) مقادیر $48/3$ mV تا $58/2$ mV (جدول ۲، شکل ۵، $P = 0/665$) را نشان داد.

برای فواصل بین اسپایک (ISI) مقادیر بین $8/4$ ms و $23/7$ ms (جدول ۲، شکل ۵) تعیین شدند که تفاوت معنی داری ($P = 0/002$) با قبل از SD داشتند. ۴ تا از سلولها FA، ۹ تا SA و ۱ تا از سلولها هیچ پتانسیل عملی نشان نداد.

تزریق جریان $0/4$ nA، دامنه دپولاریزاسیون (AD) را از $21/8$ mV به $49/6$ mV (جدول ۲، شکل ۵، $P = 0/56$) می برد. دامنه بین $66/3$ mV و $81/8$ mV (جدول ۲، شکل ۵) بود و به طور معنی داری ($P = 0/001$) در مقایسه با مقادیر قبل از SD افزایش داشت. حتی فواصل بین اسپایک (ISI) مقادیری بین $9/2$ ms تا $28/4$ ms (جدول ۲، شکل ۵) داشت و تغییر معنی داری ($P = 0/042$) نشان داد. ۴ تا از سلولها FA و ۱۰ تا SA بودند.

$9/3 \pm 1/9$ دقیقه بعد از SD فعالیت صرعی در برش مغزی مشاهده شد. پتانسیلهای میدانی بعد از ۱۲ دقیقه دامنه‌ای بین $0/2$ mV و $2/4$ mV داشتند. بنابراین بعد از ۲۰ دقیقه دامنه (EFP_{Amp}) بین $0/7$ mV و $4/7$ mV بعد از ۳۰ دقیقه بین $0/9$ mV و $7/6$ mV (جدول ۳، شکل ۷ و ۶) بودند، به علاوه افزایش معنی داری ($P = 0/001$) در مقادیر وجود داشت. طول مدت فعالیت صرعی (EFP_{dur}) بعد از ۱۲ دقیقه از 58 ms تا 432 ms، و بعد از ۲۰ دقیقه، فعالیت صرعی interictal به فعالیت ictal تغییر یافت و مقادیر در محدوده بین 87 ms و 982 ms بودند. بعد از ۳۰ دقیقه مقادیر بین 231 ms و 3955 ms (جدول ۳، شکل ۷ و ۶) تعیین شدند، بنابراین فقط فعالیت ictal با معنی داری ($P < 0/001$) وجود داشت. فرکانس فعالیت صرعی ۱۲ دقیقه بعد از SD بین $6/min$ و $48/min$ ، بعد از ۲۰ دقیقه بین $4/min$ و $17/min$ و بعد از ۳۰ دقیقه از $2/min$ تا $6/min$ (جدول ۳، شکل ۷ و ۶) بودند. سه زمان ذکر شده به طور معنی داری ($P < 0/001$) با هم تفاوت داشتند. به صورت داخل سلولی فعالیت صرعی نیز ثبت و اندازه‌گیری شد.

تحریک‌پذیری، ۱۲۰-۶۰ دقیقه بعد از SD به دنبال پتانسیل‌های برانگیخته بینایی در بیماران می‌گردد [۱۷]. این افزایش تحریک‌پذیری همچنین نمایانگر یک عامل خطر پاتوفیزیولوژیک برای وقوع صرع می‌باشد و بیانگر این است که ارتباط نزدیکی بین این دو بیماری وجود دارد و تعداد زیادی از افراد دارای هر دو بیماری هستند. افزایش بروز صرع در بیماران دارای می‌گرن و برعکس، توسط Leninger و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان داده شده است. بنابر این ما فرض کردیم که اگر تعادل تحریک و مهار مختل شود صرع رخ می‌دهد، در چنین حالتی یا مهار کاهش یافته یا تحریک افزایش یافته است. برای بررسی فرضیه فوق آزمایشات ما طراحی شدند.

در آزمایشات انجام گرفته، بافت مورد مطالعه با یک آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ (بیکوکولین) سوپرفیوز شد. اگرچه غلظت بیکوکولین زیر آستانه تشنج ($1/25 \mu\text{mol/L}$) بود و وقوع خود به خودی صرع مشاهده نشد، اما استعداد برش‌های مغزی برای تشنج صرعی توسط بلوک مهار نورونی افزایش یافت. بعد از القاء SD فعالیت شبه تشنجی در همه بافت‌های مورد آزمایش ایجاد شد. با ثبت داخل سلولی ثابت کردیم که آن یک فعالیت صرعی واقعی است. همچنین نشان داده شد که تعداد زیادی از پارامترهای پتانسیل عمل بعد از SD تغییر می‌یابد. و استنباط شد که تحریک‌پذیری نورونی پایه افزایش یافته است.

در هیپوکمپ نشان داده شده که پارامترهای پتانسیل عمل تغییر یافته و تحریک‌پذیری نورون‌های منفرد افزایش یافته است. پتانسیل استراحت غشاء اندکی دپولاریزه شده و آستانه پتانسیل عمل کاهش یافته است. بنابراین سلول‌ها مستعد تخلیه‌های خود به خودی شده‌اند، چنانکه فرکانس پتانسیل‌های عمل بعد از SD به طور معنی‌داری افزایش یافت. این نتایج توسط رفتار نورون با تزریق جریان مثبت تایید می‌شود. دامنه دپولاریزاسیون با SD به طور معنی‌داری افزایش یافته، دامنه تخلیه‌ها همچنین سطح افزایش یافته‌ای نشان داد. ISI به طور معنی‌داری کاهش یافت همچنین بیشتر نورونها از FA به SA تغییر یافتند که این نشان دهنده تحریک‌پذیری نورونی است. آزمایشات ما نشان داد که SD با روش‌های مختلفی فعالیت نورونی در هیپوکمپ را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

پتانسیل‌های عمل صرعی به صورت هماهنگ با فعالیت شبه صرعی (epileptiform) خارج سلولی ثبت و اندازه‌گیری شدند. دامنه دپولاریزاسیون (AD) ۱۲ دقیقه بعد از SD بین $5/4 \text{ mV}$ و $14/1 \text{ mV}$ ، بعد از ۲۰ دقیقه مقادیر بین $4/8 \text{ mV}$ و $20/4 \text{ mV}$ و بعد از ۳۰ دقیقه در محدوده بین $8/5 \text{ mV}$ و $31/4 \text{ mV}$ (جدول ۴، شکل ۸ و ۶) بودند و افزایش معنی‌داری $P < 0/001$ مشاهده می‌شد.

طول مدت PDS همچنین به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) افزایش یافت. مقادیر بعد از ۱۲ دقیقه بین $61/4 \text{ ms}$ و 145 ، بعد از ۲۰ دقیقه طول مدت بین $80/8 \text{ ms}$ و 224 ms و بعد از ۳۰ دقیقه در مقادیر $76/9 \text{ ms}$ تا 686 ms قرار داشتند (جدول ۴، شکل ۸ و ۶). فاصله بین اسپایک‌ها ISI به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) کوتاه شدند به طوری که بعد از ۱۲ دقیقه مقادیر از $6/9 \text{ ms}$ تا 41 ms ، بعد از ۲۰ دقیقه آنها بین 48 ms و 54 ms و ۳۰ دقیقه بعد از SD، فواصل بین اسپایک‌ها (ISI) مقادیری بین $3/7 \text{ ms}$ و $9/4 \text{ ms}$ (جدول ۴، شکل ۸ و ۶) داشتند.

بحث

به دنبال نتایج حاصل از این مطالعه امکان بحث درباره فرآیندهای پاتوفیزیولوژیکی مرتبط با SD فراهم می‌شود. در این مطالعه توجه ویژه‌ای به ارتباط SD با علایم کلینیکی صرع شده است. این داده‌ها بر پایه اثرات SD بر روی نورون‌های هیپوکمپ به دست آمده‌اند. SD یکی از فرآیندهای پاتوفیزیولوژیکی سیستم اعصاب مرکزی است که با ایجاد تغییراتی در محیط یونی، متابولیسم بافت مغزی و با خروج اسیدهای آمینه تحریکی و نوروترانسمیترها از سلول‌ها به فضای خارج سلولی همراه است [۱۴]. تعداد زیادی از علایم کلینیکی، کم و بیش به طور مستقیم مرتبط با مهار گسترش یابنده هستند. بهترین شاهد، ارتباط بین SD و میگرن همراه با اورا می‌باشد که معادل کلینیکی SD مورد ملاحظه قرار می‌گیرد [۱۵]. همچنین ثابت شده است که وقوع حملات میگرن با تغییر در تحریک‌پذیری نورونی ایجاد شده با SD ارتباط بسیار نزدیکی دارد [۱۶]. یکی از اثرات نورونی SD مهار ابتدایی فعالیت سلولی در جریان حملات میگرن و به دنبال آن افزایش

عنوان فعالیت صرعی واقعی مورد بررسی قرار گیرد. پیش نیاز وقوع کلینیکی صرع، عدم تعادل بین مهار و تحریک نورونی می‌باشد. در آزمایشگاه این مساله با اضافه کردن بیکوکولین در غلظت زیر آستانه‌ای ایجاد شده است. چنانکه در موقعی که یک کاهش مهار یا یک افزایش در تحریک پذیری وجود دارد، صرع دیده می‌شود. بر طبق نتایج ما SD منجر به شلیک فعالیت صرعی و نیز بعضی دیگر از بیماریها می‌شود. این ارتباط همچنین توسط محققین دیگر نیز فرض شده است [۹، ۲۲].

در بین تعداد زیادی از مطالعات بر روی فاز ابتدایی، تحریک پذیری افزایش یافته بعد از SD و مهار متعاقب فعالیت نورونی فهمیدن فاز ثانویه تحریک‌پذیری نورونی بعد از SD در بسیاری از بیماریهای نورولوژیک با اهمیت است و لازم است که مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک آن مورد آنالیز قرار گیرد. بدان جهت آنالیز دقیق گیرنده‌ها روش بسیار مناسبی برای فهم عمیق پاتوفیزیولوژی آن خواهد بود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه مونستر آلمان برای حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

References

- [1] McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 14 (1994) 3413-3425.
- [2] Amaral DG, lavenex P, Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The hippocampus Book*. Oxford university press; New York 2007, p. 200-203.
- [3] Dehbandi S, Speckmann EJ, Pape HC, Gorji A. Cortical spreading depression modulates synaptic transmission of the rat lateral amygdala. *Eur J Neurosc* 27 (2008) 2057-2065.
- [4] Pitkanen A, Tuunanen J, kalvianen R, Partanen K, Salemanpera T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 32 (1998) 233-53.
- [5] Yilmazer-Hanke DM, Wolf HK, Schramm J, Elger CE,

همچنین در سال ۲۰۰۲، Leninger و همکارانش ارتباط بین افزایش تحریک پذیری با SD و وقوع میگرن و صرع را خاطر نشان کردند [۱۸]. همچنین گزارشاتی از فعالیت صرعی حال از SD در بافت مغز انسان وجود دارد [۱۹]. علاوه بر حافظه و یادگیری و پردازش احساسات، هیپوکمپ در کنترل حرکات با دامنه بزرگ و تغییر وضعیت بدن نقش دارد [۲۰]. اگر صدمه یا اختلالی در ساختارهای هیپوکمپ ایجاد شود، علایمی همچون؛ فراموشی، بیش فعالی، اختلال در هیجانان، احتباس آب و نیز حملات میگرن مشاهده می‌شود [۲۱]. عبور SD از هیپوکمپ اثرات زیادی را ایجاد می‌کند بدان جهت فقط تعدادی از علایم کلینیکی مرتبط ذکر شدند. مدل آزمایشگاهی ما یک مدل مقاوم به درمان می‌باشد. بدان جهت مدلی است که می‌تواند به طور بالقوه در گسترش تحقیقات داروهای ضدصرع مورد استفاده قرار گیرد.

به طور خلاصه در بعضی از مطالعات فرض شده که تحریک‌پذیری ثانویه شبکه عصبی نورونی بعد از SD وجود دارد که تحقیقات ما در سطح داخل سلول می‌تواند این مساله را تایید کند. در مناطق مغزی مورد مطالعه تغییرات معنی‌داری در ویژگی نورون‌ها ثبت شد که همگی نشان دهنده افزایش تحریک‌پذیری نورونی بودند. همچنین نشان داده شد که SD بعد از ایجاد فعالیت شبه صرعی، می‌تواند در سطح نورونی به

- Wiesler OD, Blumcke I. Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 59 (2000) 907-920.
- [6] Aliashkevich AF, Yilmazer-Hanke DM, Van Roost D, Mundhenk B, Schramm J, Blumcke I. Cellular pathology of amygdala neurons in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol* 106 (2003) 99-106.
- [7] Tuunanen J, Halonen T, Pitkanen A. Decrease in somatostatin-immunoreactive neurons in the rat amygdaloid complex in a kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 26 (1997) 315-327.
- [8] Mangan PS, scott CA, Williamson JM, Bertram EH. Aberrant neuronal physiology in the basal nucleus of the amygdala in a model of chronic limbic epilepsy. *Neuroscience* 101 (2000) 377-391.

- [9] Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Rev* 38 (2001) 33-60.
- [10] Ayala G., Dichter RJ, Gummit H, Matsumoto H, Spencer WA. Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms. *Brain Res* 52 (1973) 1-17.
- [11] Witte OW, Uhlig S, Valle E. Separation of different types of afterpotentials following penicillin-induced paroxysmal depolarization shifts of neurons in the motor cortex of the rat. *Neurosci Lett* 101 (1989) 51-56.
- [12] Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, Sakowitz OW, Seemann JH, Thieme A, Lauritzen M, Strong AJ, Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarisations. *Brain* 129 (2006) 3224-3237.
- [13] Pomper JK, haak S, Petzold GC, Buchheim K, Gabriel S, Hoffmann U, Heinmann U. Repetitive spreading depression-like events result in cell damage in juvenile hippocampal slice cultures maintained in normoxia. *J Neurophysiol* 95 (2006) 355-68.
- [14] Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depressionlike depolarization. *Physiol Rev* 81 (2001) 1065-1096.
- [15] Goadsby PJ. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends Mol Med* 13 (2007) 39-44.
- [16] Moskowitz MA. Pathophysiology of headache – past and present. *Headache* 47 (2007) 58-63.
- [17] Shibata K, Osawa M., Iwata M. Pattern reversal visual evoked potentials in classic and common migraine. *Annu Rev Neurosci* 19 (1996) 165-186.
- [18] Leniger T, von den Driesch S, Isbruch K. Clinical characteristics of patients with comorbidity of migraine and epilepsy. *Headache* 43 (2003) 672-677.
- [19] Gorji A, Speckmann EJ. Spreading depression and epileptic activity in living human neocortical tissues. *Pflugers Arch* 449 (2005) 16-24.
- [20] Jensen O, Lisman JE. Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multi-item working memory buffer. *Trends Neurosci* 28 (2005) 67-72.
- [21] Daquin G, Micalle J, Blin O. Yawning. *Sleep Med Rev* 5 (2001) 299-312.
- [22] Gorji A, Speckmann EJ. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Eur J Neurosci* 19 (2004) 3371-3374.