

نقش مهار منتشر شونده قشری بر القای تشنج در هیپوکمپ موش صحرایی نر

غزاله غم‌خواری‌نژاد^۱، پرویز شهابی*^{۲،۳}، بهناز صادق زاده^۴، مینا صدیقی الوندی^۵، فیروز قادری پاکدل^۶ و

تاریخ دریافت 1392/11/05 تاریخ پذیرش 1393/01/20

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: مهار منتشر شونده قشری، پدیده‌ای پاتوفیزیولوژیک است و به‌صورت یک موج دپولاریزاسیون خود انتشار یابنده با یک دوره تحریک‌پذیری کوتاه‌مدت شروع شده و بلافاصله با مهار یاخته‌های عصبی دنبال می‌شود و سپس با یک فاز تحریک‌پذیری ثانویه طولانی‌مدت ادامه می‌یابد. مهار منتشر یکی از عوامل اصلی ایجادکننده صرع لوب گیجگاهی و میگرن است. هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش گیرنده‌های گلوتامات و تخلیه‌های انفجاری ایجاد شده به دنبال مهار منتشر بر شکل‌پذیری سیناپسی ناحیه هیپوکمپ است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی برش‌های مغزی ۱۸ سر موش صحرایی نر ویستار، در محدوده وزنی بین ۲۵۰-۳۵۰ گرم انجام شد. برش‌ها در قالب یک گروه کنترل و دو گروه دریافت‌کننده آنتاگونیست گیرنده‌های گلوتامات (AP5 و CNQX) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از بیهوشی عمیق، سر حیوان جدا و مغز از جمجمه خارج گردید و برش‌های افقی حاوی هیپوکمپ به ضخامت ۵۰۰ μm تهیه شده و با آنتاگونیست گیرنده GABA_A (بیکوکولین $1/25 \mu\text{M}$) مشروب شد. مهار منتشر با کمک KCl در بافت ایجاد شد، سپس تقویت طولانی‌مدت سیناپسی در نمونه القا گردید و پتانسیل‌های میدانی تحریکی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: به دنبال مهار گیرنده‌های گلوتامات بعد از القای مهار منتشر، در گروه‌های آزمایشی CNQX ($2/3 \pm 10.2/26$)، AP₅ ($1/1 \pm 10.2/88$) با استفاده از آنالیز آماری Mann Whitney U test کاهش معناداری در دامنه پتانسیل‌های میدانی تحریکی نسبت به گروه بیکوکولین ($6/7 \pm 134$) مشاهده گردید ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه بر نقش گیرنده‌های گلوتامات در القای مهار منتشر قشری دلالت دارد، چنانکه مهار این گیرنده‌ها از طریق آنتاگونیست‌های آن، منجر به سرکوب مهار منتشر شد. مطالعه فاز تحریک‌پذیری ثانویه، به فهم ما از سازوکار عملکرد مهار منتشر در اختلالات نورولوژیک کمک می‌کند. این یافته‌ها می‌توانند راه‌های درمان صرع را بهبود بخشند.

واژه‌های کلیدی: صرع، برش هیپوکمپ، مهار منتشر، بیکوکولین، گیرنده‌های گلوتامات

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره چهارم، ص ۳۱۸-۳۰۹، تیر ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه تبریز، خیابان آزادی، خیابان گلگشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، طبقه دوم، گروه فیزیولوژی، تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۴۴

Email: parvizshahabi@gmail.com

مقدمه

مهار منتشر شونده قشری (CSD)^۱ یک دپلاریزاسیون نوروئی برگشت‌پذیر است که در پاسخ به تحریکات شیمیایی، الکتریکی و مکانیکی سطح بافت مغز به وجود می‌آید (۱). مهم‌ترین خصیصه فیزیولوژیک SD، پتانسیلی با جریان مستقیم در قشر

^۱ استادیار فیزیولوژی مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز - ایران

^۲ استادیار فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز - ایران (نویسنده مسئول)

^۳ گروه علوم تشریح و بیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران - ایران

^۴ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز - ایران

^۵ دانشیار فیزیولوژی مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه - ایران

^۶ دانشیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه - ایران

^۷ Cortical Spreading Depression

دارویی هستند. بیشتر مطالعاتی که تاکنون انجام شده بر این عقیده است که کانون صرع لوب گیجگاهی مدار هیپوکمپ - قشر انتورینال است (۱۱). تحقیقات انجام شده مبنی بر این است که ارتباط تنگاتنگی بین مهار منتشر و تخلیه‌های صرعی وجود دارد و یکی از دلایل این نوع صرع، مهار منتشر قشری می‌باشد (۱۲، ۱۳). تمایل هیپوکمپ به شروع تشنج به دلیل توانایی آن در ایجاد تقویت سیناپسی طولانی‌مدت^۵ (LTP) می‌باشد. وجود یک مدار داخلی یک‌طرفه تحریکی و کاهش سلول‌های عصبی مهاری در هیپوکمپ، این ناحیه را مستعد شروع فعالیت تشنجی کرده است. ورودی این مدار در قشر انتورینال هیپوکمپ می‌باشد و پس از عبور از شکنج دنداندار، به CA_۳ و CA_۱ رفته و مجدداً به قشر انتورینال باز می‌گردد. این مدار یکی از مسیرهایی است که می‌تواند تشنج را ایجاد کرده و آن را تقویت نماید (۸). بررسی‌های قبلی گرجی و همکاران نشان داد که بعد از افزودن بیکوکولین (آنتاگونیست گیرنده GABA_A^۷) با غلظت پایین به محلول پرفیوژن بافت در فاز تحریک‌پذیری ثانویه، پتانسیل‌های میدانی صرعی^۸ (fEPSP) ایجاد می‌شود و الگوی گسترش fEPSP شکل تخلیه‌های انفجاری تغییر می‌یابد (۱۴). fEPSP ایجاد شده از طریق SD، با به‌کارگیری APV آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تغییرات همودینامیک، متابولیک و یونی مرتبط با SD تولید اسپایک‌های با ولتاژ بالا را تسهیل می‌کنند و نقش مهمی در صرع‌زایی دارند (۱۰). SD همزمانی فعالیت کانون‌های مختلف fEPSP را تسهیل می‌کند و تحریک‌پذیری بافت مغز موش صحرائی را افزایش می‌دهد.

از میان مطالعاتی که بر روی تحریک‌پذیری افزایش یافته بعد از SD و به دنبال آن مهار متعاقب فعالیت نورونی، انجام شده است، شناخت فاز ثانویه تحریک‌پذیری بعد از SD در بسیاری از بیماری‌های نورولوژیک بااهمیت است و لازم است که مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک آن مورد آنالیز قرار گیرد. به همین دلیل، بررسی دقیق گیرنده‌ها روش بسیار مناسبی برای فهم عمیق پاتوفیزیولوژی آن خواهد بود. با توجه به این‌که SD یکی از راه‌های ایجاد فعالیت‌های شبه تشنجی می‌باشد، بنابراین در مطالعه حاضر این سؤال مطرح می‌شود که نقش این وقایع شبه تشنجی بر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک ناحیه CA_۱ هیپوکمپ چیست تا با اثبات این ارتباط، راه جدیدی در درمان تشنج مقاوم به درمان‌های دارویی شناسایی شود.

مغز است که تغییر پتانسیل آهسته نامیده می‌شود^۱ (SPC) و یک موج سه فازی است که با جزء مثبت کوچک شروع می‌گردد که در برخی موارد نیز دیده نمی‌شود و بعدازآن یک موج منفی ۲۰-۵ mV مشاهده می‌شود که تحت شرایط سوخت و سازی طبیعی بدن ۳۰-۵۰ ثانیه طول می‌کشد، سپس این قسمت با یک موج مثبت با دامنه کوچک‌تر اما مدت‌زمان طولانی‌تر دنبال می‌شود (۲، ۳). تجمع پتاسیم خارج سلولی که از سلول‌های تحریک‌پذیر طی دوره‌های دپلاریزاسیون و رپولاریزاسیون آزاد می‌شود، SD را شروع می‌کند. همچنین مهار کانال‌های پتاسیمی توسط تترائیل آمونیوم، آستانه شروع SD را بالا می‌برد (۴).

گلوتامات و گیرنده‌های آن (AMPA^۲ و NMDA^۳) نقش کلیدی در القای CSD داشته و منجر به شروع آن می‌شوند. بر اساس مطالعات قبلی MK-801 مهارکننده‌های غیررقابتی گیرنده NMDA، منجر به مهار CSD شده و NBQX مهارکننده اختصاصی گیرنده AMPA، القای CSD را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). همچنین آنتاگونیست اختصاصی گیرنده NMDA، منجر به سرکوب CSD و آنتاگونیست غیررقابتی آن CCS-17355 سبب کاهش سرعت گسترش CSD می‌شود (۶). SKF-10047 آنتاگونیست غیررقابتی ضعیف NMDA نیز موجب سرکوب CSD می‌شود (۷). بنابراین بر اساس مطالعات مشخص می‌شود که گلوتامات و گیرنده‌های آن در القا و شروع مهار منتشر شونده قشری دخالت دارند.

گسترش غیرطبیعی مهار منتشر شونده قشری به علت دست‌کاری‌های فارماکولوژیکی، فعالیت تشنجی را افزایش می‌دهد. همچنین شواهدی از کشت بافت هیپوکمپ وجود دارد که نشان می‌دهد مهار منتشر منجر به تخریب بافتی شده و یک عامل خطر در بعضی از بیماری‌ها از جمله صرع و میگرن همراه با او است.

صرع به‌عنوان مهم‌ترین اختلال نورولوژیکی در کودکان و بزرگسالان شناخته شده است (۸). تقریباً ۱ درصد جمعیت جهان و ۱/۸ درصد از جمعیت ایران به این بیماری مبتلا هستند (۹) بروز حملات صرعی برای مبتلایان و همچنین خانواده‌هایشان علاوه بر یک بیماری یک مشکل اجتماعی محسوب می‌شود (۱۰). یکی از انواع صرع کانونی صرع لوب گیجگاهی^۴ (TLE) است. ۶۰-۸۰ درصد افراد مبتلا به صرع لوب گیجگاهی، مقاوم به درمان‌های

^۵. Long Term Potentiation

^۶. Cornu Ammonis area

^۷. Gamma-Amino butyric acid

^۸. Field excitatory post synaptic potentials

^۱. Slow Potential Change

^۲. α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

^۳. N-Methyl-D-aspartate

^۴. Temporal Lobe Epilepsy

مواد و روش‌ها

تهیه بافت زنده از مغز حیوانات:

در این مطالعه ۱۸ سر موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار، در محدوده وزنی ۳۵۰-۲۵۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. این مطالعه به روش *in vitro* بر روی مقاطع زنده هیپوکمپ انجام شد. جهت بیهوشی، حیوانات در یک دیسکاتور حاوی ایزوفلوران قرار گرفتند. بعد از اطمینان از بیهوشی عمیق، سر حیوان جدا و مغز حیوان خارج گردید و در محلول ACSF^۱ سرد با دمای ۳°C (اعداد به صورت mmol/L هستند، NaCl: ۱۲۴، KCl: ۴، CaCl_۲: ۲، MgSO_۴: ۱/۳، NaH_۲PO_۴: ۱/۲۴، NaHCO_۳: ۲۶، CO_۲ ۵ درصد و C_۶H_{۱۲}O_۶: ۱۰) که کربوژنه می‌شد قرار گرفت (CO_۲ ۵ درصد و O_۲ ۹۵ درصد). توسط میکروتوم (سری ۳۰۰۰ plus) از مغز برش‌هایی حاوی هیپوکمپ به ضخامت ۵۰۰ μm تهیه و در محفظه نگهداری بافت حاوی ACSF در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. بعد از ۳۰ دقیقه CaCl_۲ با غلظت ۱ mmol/L ACSF اضافه و با تغییر مقدار کربوژن، PH محلول در حدود ۷/۳۵-۷/۴۵ تنظیم شد. برش‌ها در قالب ۳ گروه شش‌تایی تقسیم شد. ۱ گروه بیکوکولین را به‌تنهایی دریافت کرده و به‌عنوان گروه کنترل محسوب شد و ۲ گروه به‌عنوان گروه آزمایش، بیکوکولین را همراه آنتاگونیست گیرنده‌های گلوتامات (CNQX - AP_۵) دریافت کردند. یک ساعت پس از اضافه کردن کلرید کلسیم و تثبیت بافت، برش مورد مطالعه از محفظه نگهداری بافت با یک قطره‌چکان به یک محفظه ثبت و روی یک غشاء ترانسپرنس منتقل شده و با ACSF سرد حاوی آنتاگونیست گیرنده GABA_A (بیکوکولین ۱/۲۵ μM / L ساخت شرکت Sigma) مشروب شد (۱۵). سرعت محلول مشروب ۲ ml در دقیقه بود. دمای محلول ACSF به‌توسط یک پروب اندازه‌گیری شده و در دمای ۳۰/۸ ثابت نگه‌داشته شد. کربوژن گرم و مرطوب به‌طور مداوم به روی نمونه هدایت می‌شد تا از خشک شدن آن جلوگیری کند.

به‌منظور ایجاد SD، یک الکتروود شیشه‌ای با کلرور پتاسیم ۲ مولار پر شده و در تماس با قشر انتورینال (لایه I-II) قرار گرفت و یک پالس با فشار بالا برای تزریق پتاسیم کافی اعمال شد. قطر نوک الکتروود ۲ μm، فشار تزریق ۰/۱ بار در مدت ۲۰۰ میلی‌ثانیه بود. برای کاهش تأثیر میدان مغناطیسی از قفس فارادی و برای کم کردن ارتعاشات از میز ضد لرزش استفاده شد.

تحریک و ثبت الکتریکی:

به‌منظور ثبت خارج سلولی از یک الکتروود شیشه‌ای با مقاومت ۲/۵-۰/۵ مگا اهم حاوی محلول ACSF که توسط یک پل

AgAgCl-KCl به آمپلی‌فایر (DAM 80) متصل بود استفاده شد. برای اندازه‌گیری تغییرات پتانسیل، الکتروود ثبت در ناحیه CA_۱ قرار گرفت. پارامتر مورد اندازه‌گیری، دامنه fEPSP بود. برای ایجاد پتانسیل‌های برانگیخته در شاخه جانبی شافر از پالس‌های مربعی به پهنای ۲۰۰ میکروثانیه استفاده شد (WPI) stimulator، سپس نصف شدت جریانی که پاسخ ماکزیم را ایجاد می‌کرد برای تحریک مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه تنها سیگنال‌های بین ۱ تا ۱۰۰۰ کیلوهرتز اجازه عبور داشتند. به‌منظور تحریک تنانیک برای ایجاد LTP، از پروتکل ۱۰ قطار تنانیک، ۴ پالس در هر قطار، دوره هر قطار ۱۰۰ میلی‌ثانیه، طول مدت هر پالس ۰/۱ میلی‌ثانیه و فواصل بین پالس‌ها ۱۰ میلی‌ثانیه در شدت تحریکی یکسان با خط پایه استفاده شد. بعد از القاء SD با تزریق کلرور پتاسیم ۲ مولار در قشر انتورینال، fEPSP حداقل به مدت ۱۵ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه بعد از LTP ثبت شدند.

داروها:

نقش گیرنده‌های AMPA با حضور آنتاگونیست آن، CNQX^۲ (۱۰ میکرومولار ساخت شرکت Sigma) (۱۶) مورد مطالعه قرار گرفت. اضافه کردن CNQX به ACSF بعد از تثبیت بافت و القای SD صورت گرفت تا بر القاء آن تأثیری نداشته باشد. بلافاصله بعد از تثبیت دامنه fEPSP، تحریکات تنانیک به شاخه جانبی شافر اعمال شده و ۱۵ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه بعد از القای LTP، دامنه fEPSP‌ها اندازه‌گیری شدند. به‌منظور بررسی تأثیر گیرنده NMDA بر SD، آنتاگونیست آن، AP_۵^۳ (۴۰ میکرومولار ساخت شرکت Tocris) (۱۶) پس از القای SD به ACSF مشروب کننده بافت اضافه شد. به دنبال تثبیت دامنه fEPSP‌ها بعد از پرفیوژ دارو، تحریکات تنانیک به شاخه جانبی شافر اعمال شد. ۱۵ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه بعد از القای LTP، دامنه fEPSP‌ها اندازه‌گیری شدند.

آنالیز داده‌ها:

این مطالعه در گروه مطالعات پایه و توزیع داده‌ها به‌صورت غیر نرمال بود. ثبت خارج سلولی با برنامه LTP (نسخه ۰/۹۵ ساخت کشور انگلیس) صورت گرفت. همه مقادیر به‌صورت میانگین (M) ± انحراف معیار میانگین (SEM) ذکر شده‌اند. آنالیز آماری با نرم‌افزار Sigma Plot 8 و Sigma Stat 3 انجام شد و برای تعیین اختلاف معنی‌دار آماری در گروه کنترل از آزمون‌های t-زوج‌ها و برای مقایسه گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل از ann Whitney

^۲ 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione^۳ 2-amino-5-phosphonovaleric acid^۱ Artificial Cerebro Spinal Fluid

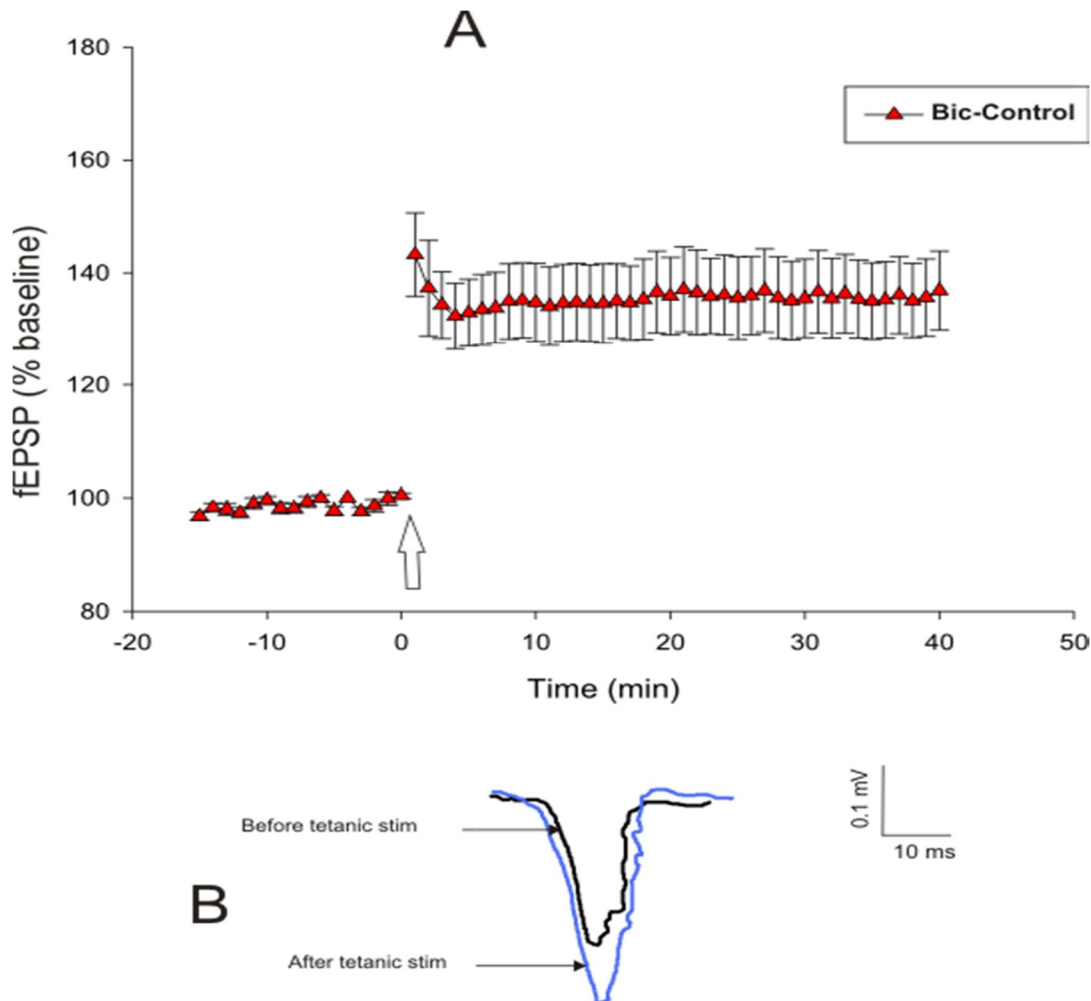
به القاء SD در این ناحیه شد، دامنه fEPSP ها به مدت ۱۵ دقیقه قبل از القاء LTP ($0.56 \pm 98/57$) و ۴۰ دقیقه بعد از القاء LTP ($134 \pm 6/7$) ثبت شدند. در ۴۵ درصد موارد، مهار در نمونه بافتی منتشر شد و به ناحیه CA1 رسید. مقایسه دامنه fEPSP ها با استفاده از آزمون t-زوجها انجام شد و افزایش معنی‌داری را در قدرت سیناپسی بعد از القاء LTP نشان داد. (n=۶, آزمون t زوجها $P < 0.001$) (شکل ۱).

U test استفاده شد. مقادیر $P < 0.001$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

تأثیر فعالیت تشنجی ایجاد شده توسط مهار منتشر قشری بر قدرت سیناپسی ناحیه CA1 هیپوکمپ:

بعد از تزریق کلرور پتاسیم ۲ مولار در قشر انتورینال که منجر



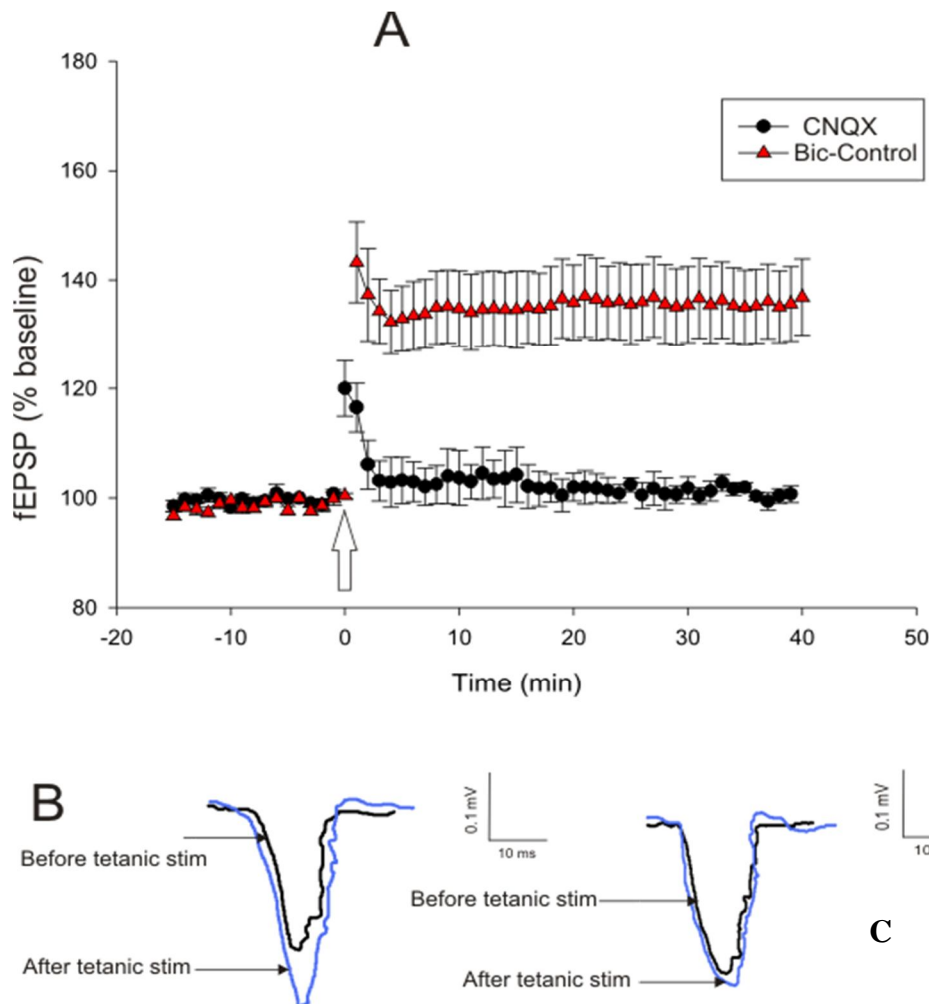
شکل (۱): اثر فعالیت تشنجی ایجاد شده توسط مهار منتشر بر LTP ناحیه CA1. A: نقاط قبل از صفر یک دوره ۱۵ دقیقه‌ای تثبیت قبل از LTP و زمان صفر زمان القاء LTP را نشان می‌دهد. نقاط بعد از صفر در این منحنی افزایش معنی‌داری را در دامنه fEPSP ها بعد از القاء LTP نشان می‌دهند. (n=۶ آزمون t زوجها $P < 0.001$). B: نمونه‌ای از ثبت fEPSP قبل و بعد از القاء LTP.

ایجاد SD صورت گرفت تا بر القاء آن تأثیری نداشته باشد. بلافاصله بعد از تثبیت دامنه fEPSP ها تحریکات تتانیک به شاخه جانبی شافر اعمال شده، ۱۵ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه بعد از القای LTP، دامنه fEPSP ها اندازه‌گیری شد. استفاده از CNQX نشان

اثر CNQX و فعالیت تشنجی ایجاد شده توسط مهار منتشر قشری بر قدرت سیناپسی ناحیه CA1 هیپوکمپ: نقش گیرنده‌های AMPA با حضور آنتاگونیست آن CNQX (۱۰ میکرومولار) مورد مطالعه قرار گرفت. تجویز CNQX بعد از

(میانگین \pm انحراف معیار: $134 \pm 6/7$) کاهش معنی داری دارد (Mann whitney U-test, $n=6$, $P<0/001$) (شکل ۲).

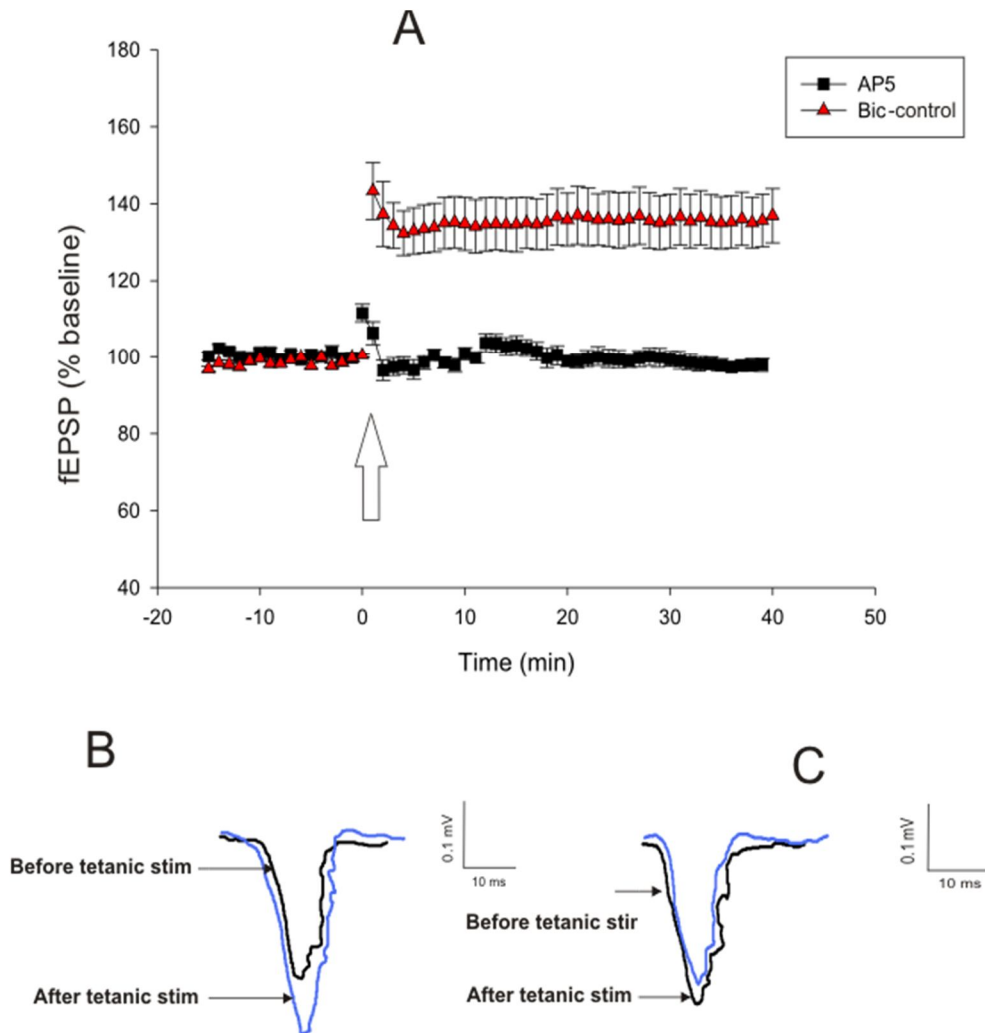
داد که درصد تقویت دامنه بعد از LTP در گروه CNQX (میانگین \pm انحراف معیار: $2/3 \pm 103/26$) نسبت به گروه کنترل



شکل ۲): اثر CNQX بر فعالیت تشنجی ایجاد شده توسط مهار منتشر قشری بر LTP ناحیه CA₁ هیپوکامپ. A: نقاط قبل از صفر یک دوره ۱۵ دقیقه‌ای تثبیت قبل از LTP و زمان صفر زمان القاء LTP را نشان می‌دهد. نقاط بعد از صفر در این منحنی کاهش معنی داری در دامنه fEPSP ها بعد از القاء LTP در گروه دریافت کننده CNQX نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند. ($n=6$, $P<0/001$, Mann whitney U-test). B: نمایش نمونه‌ای از ثبت fEPSP قبل و بعد از القاء LTP در گروه کنترل. C: نمایش نمونه‌ای از ثبت fEPSP قبل و بعد از القاء LTP در گروه دریافت کننده CNQX. علامت پیکان نشان‌دهنده محل تحریک تتانیک است.

از القای LTP، دامنه fEPSP ها اندازه‌گیری شد. کاربرد AP₅ نشان داد که درصد تقویت دامنه در گروه AP₅ (میانگین \pm انحراف معیار: $1/1 \pm 102/88$) نسبت به گروه کنترل (میانگین \pm انحراف معیار) $134 \pm 6/7$) کاهش معنی داری دارد. ($n=6$, Mann whitney U-test, $P<0/001$) (شکل ۳).

اثر AP₅ و فعالیت انفجاری تشنجی ایجاد شده توسط مهار منتشر قشری بر قدرت سیناپسی ناحیه CA₁ هیپوکامپ؛ پس از ایجاد SD، آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA یعنی AP₅ (۴۰ میکرومولار) به محلول مشروب کننده بافت پرفیوژ گردید. بلافاصله بعد از تثبیت دامنه fEPSP ها، تحریکات تتانیک به شاخه جانبی شافر اعمال شده، ۱۵ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه بعد



شکل (۳): اثر AP₅ بر فعالیت تشنجی ایجادشده توسط مهار منتشر قشری و LTP ناحیه CA₁ هیپوکمپ. A: نقاط قبل از صفر یک دوره ۱۵ دقیقه‌ای تثبیت قبل از LTP و زمان صفر زمان القاء LTP را نشان می‌دهد. نقاط بعد از صفر در این منحنی کاهش معنی‌داری در دامنه fEPSP بعد از القاء LTP در گروه دریافت‌کننده AP₅ نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. (Mann whitney U-test و n=۶، P<۰/۰۰۱). B: نمایش نمونه‌ای از ثبت fEPSP قبل و بعد از القاء LTP در گروه دریافت‌کننده CNQX. علامت پیکان نشان‌دهنده محل تحریک تتانیک است.

بحث

نسبتاً پایدار می‌باشد. مرحله سوم یک عامل خطر آسیب‌شناختی برای ایجاد بعضی از بیماری‌ها از جمله صرع است. با توجه به اینکه مدل آزمایشگاهی به‌کاررفته در این تحقیق، مدل صرع مقاوم به درمان می‌باشد، می‌تواند به‌طور بالقوه در گسترش تحقیقات داروهای ضد صرع مورد استفاده قرار گیرد.

مسیر گلوتاماترژیک نقش دوگانه‌ای در شروع و گسترش SD بازی می‌کند در سال ۱۹۵۹ Van Harrevold پیشنهاد کرد که اسید گلوتامیک می‌تواند در غلظت نسبتاً پایینی از KCl، SD ایجاد کند و در فرضیه اصل سازوکار ایجاد SD، افزایش K⁺ برون یاخته‌ای سبب دپولاریزاسیون هر دو پایانه پیش و پس سیناپسی می‌شود. دپولاریزاسیون پایانه‌های پیش‌سیناپسی انتقال سیناپسی

مطالعه حاضر به بررسی اثر SD و فعالیت‌های شبه تشنجی ایجادشده توسط آن بر شکل‌پذیری سیناپسی نورون‌های هیپوکمپ به دنبال استفاده از غلظت زیر آستانه تشنجی بیکوکولین می‌پردازد. بر اساس نتایج این مطالعه، گیرنده‌های گلوتامات (AMPA-NMDA) نقش مهمی در القای SD و تحریک‌پذیری بالای بافت مذکور در حضور SD در اختلالاتی مانند تشنج دارند. در این مطالعه توجه ویژه‌ای به علائم بالینی صرع شده بیشتر علائم بالینی که طی حملات صرعی اتفاق می‌افتند با وقوع SD در ارتباط می‌باشند. SD دارای سه مرحله می‌باشد: مرحله تحریک‌پذیری اولیه، مرحله مهار و مرحله تحریک‌پذیری ثانویه که

سیناپسی در CA_1, CA_3 ، ساییکولوم و شکنج دندانه‌دار را افزایش می‌دهد و بعضی از مؤلفین اظهار می‌کنند که SD برای عملکرد سلول‌های عصبی مضر است (۲۸). در سال ۲۰۰۷، Berger اثرات تحریکی SD بر تحریک‌پذیری و کارایی سیناپسی قشر مغز انسان را نشان داد و ذکر کرد که بعد از یک فاز ابتدایی مهار موقت فعالیت سیناپسی که در اثر توزیع مجدد حجم عظیمی از یون‌ها و اختلال در هومئوستاز سلولی ایجاد می‌شود، افزایشی پایدار و معنی‌دار در دامنه fEPSP تحریکی وجود دارد، بنابراین کارایی انتقال سیناپسی و نیز القاء LTP افزایش می‌یابد (۲۹). دهبندی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر اساس یک مطالعه حیوانی به روش *in vitro* نشان دادند که افزایش اثر LTP بعد از SD احتمالاً نتیجه درگیری گیرنده‌های گلوتمات (AMPA - NMDA) و D_2 دوپامین می‌باشد (۳۰).

در این مطالعه، داروهای مورد استفاده، بعد از ایجاد SD به‌کاربرده شدند تا از اثر احتمالی آن‌ها بر القاء SD، جلوگیری شود. داده‌های حاضر نشان دادند که استفاده از CNQX و AP_5 دامنه fEPSP را به‌طور معنی‌دار کاهش می‌دهد و بیان‌کننده این مسئله است که گیرنده‌های AMPA و NMDA برای شکل‌پذیری سیناپسی به دنبال تخلیه‌های انفجاری تشنجی تولیدشده توسط SD در حضور آنتاگونیست $GABA_A$ ضروری هستند. این کاهش دامنه احتمالاً به‌وسیله اختلال در هومئوستاز یونی به وجود می‌آید.

نتیجه‌گیری

پیش‌نیاز وقوع کلینیکی صرع، عدم تعادل بین مهار و تحریک نورونی می‌باشد. در آزمایشگاه این مسئله با اضافه کردن بیکوکولین در غلظت زیر آستانه‌ای ($1/25 \mu\text{mol.L}$) ایجاد شد. بر طبق نتایج ما در مطالعه حاضر، SD با افزایش تحریک‌پذیری سلول‌های هیپوکمپ به‌واسطه گیرنده‌های گلوتمات، منجر به افزایش LTP و وقوع فعالیت‌های صرعی شده و مهار این گیرنده‌ها توسط AP_5 و CNQX، LTP را در هیپوکمپ نسبت به گروه کنترل کاهش داد. این مسئله وابسته بودن LTP و SD را به NMDA و AMPA نشان می‌دهد و همسو با مطالعه‌ای است که اثبات می‌کند تعداد این گیرنده‌ها با SD افزایش می‌یابد (۱۴).

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از برای حمایت مالی از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشکده علوم پزشکی تبریز تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

وابسته به کلسیم را بر می‌انگیزد و گلوتمات آزاد می‌کند که به‌نوبه خود عناصر پس‌سیناپسی را بیشتر دپولاریزه می‌کند و سبب افزایش بیشتر در K^+ برون یاخته‌ای می‌گردد (۱۷). خروج گلوتمات، گیرنده‌های NMDA روی غشاء پس‌سیناپسی را فعال می‌کند. فعالیت گیرنده NMDA برای القاء SD در بافت‌های یاخته‌های عصبی مختلف، حیاتی می‌باشد. نشان داده‌شده که شلیک SD نیازمند فعالیت گیرنده‌های NMDA در بافت قشر نو انسان، موش صحرائی و در شبکه جوجه می‌باشد (۱۸). دیگر گیرنده‌های گلوتمات نیز در ایجاد SD درگیر می‌باشند اما اثراتشان توسط آنتاگونیست گیرنده NMDA مهار می‌شود. غلظت پایین CNQX نیز پتانسیل پس‌سیناپسی تحریکی را به سطح کنترل کاهش می‌دهد (۱۹، ۲۰)؛ بنابراین گلوتمات SD را از طریق عمل برگیرنده‌های NMDA و AMPA ایجاد می‌کند.

Uhlig در سال ۱۹۸۹ عنوان کرد دپولاریزاسیون قوی در جریان SD، کانال‌های وابسته به ولتاژ در غشاء سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌عنوان مثال کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ غیرفعال می‌شوند که به‌نوبه خود باعث مهار دامنه پتانسیل‌های برانگیخته می‌گردد (۲۱). همچنین گرچی در سال ۲۰۰۱ نشان داد که آزاد شدن و انتشار انواع ناقلین عصبی‌های تحریکی همچون نوروکینین، پپتید مرتبط با ژن کلسیتونین و سروتونین به تحریک‌پذیری کمک می‌کنند (۲۲). فاز ثانویه تحریک‌پذیری یاخته‌های عصبی می‌تواند در نتیجه اثرات این میانجی‌های شیمیایی باشد (۷). پس می‌توان نتیجه گرفت که SD تحریک‌پذیری یاخته‌های عصبی را افزایش می‌دهد همچنین در سال ۲۰۰۲، Leniger و همکارانش ارتباط بین افزایش تحریک‌پذیری با SD و وقوع میگرن و صرع را خاطر نشان کردند (۲۳). علاوه بر حافظه و یادگیری و پردازش احساسات، هیپوکمپ در کنترل حرکات بزرگ و تغییر وضعیت بدن نقش دارد (۲۴). صدمه یا اختلال به علت وقوع SD در ساختارهای هیپوکمپ، علائمی همچون اختلال در هیجان، احتباس آب و نیز حملات میگرن را به دنبال دارد (۲۶).

Wernsmann و همکارانش در سال ۲۰۰۶ ثابت کردند که کاهش سلول‌های عصبی ساختار هیپوکمپ در اثر SD، با علائمی همچون فراموشی یا بیش‌فعالی همراه است. ارتباط عملکردی هیپوکمپ با قشر انتورینال برای پردازش اطلاعات حسی اهمیت اساسی دارد. این ساختارهای لوب گیجگاهی میانی احتمالاً نقش مهمی در گسترش علائم نوروسایکوتیک و حسی‌پیکری و در اختلالات نورولوژیک همچون صرع و میگرن همراه با اورا دارند (۲۷). در مطالعات حیوانی ثابت‌شده است که SD فعالیت

References:

1. Freedman N. Learning and motor activity under spreading depression depending on EEG amplitude. *Physiol Behav* 1968. 3(3): 373-6.
2. Somjen GG, Aitken PG, Czéh GL, Herreiras O, Jing J, Young JN. Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;70(S1):S248-S254.
3. Aurora S, Cao Y, Bowyer S, Welch K m. a. The Occipital Cortex Is Hyperexcitable in Migraine: Experimental Evidence. *Headache: J Head and Face Pain* 1999;39(7):469-76.
4. Shapiro BE. Osmotic forces and gap junctions in spreading depression: a computational model. *J Comput Neurosci* 2001;10(1):99-120.
5. Lauritzen M, Hansen AJ. The Effect of Glutamate Receptor Blockade on Anoxic Depolarization and Cortical Spreading Depression. *J Cerebr Blood F Met* 1992;12(2):223-9.
6. Basarsky TA, Feighan D, MacVicar BA. Glutamate Release through Volume-Activated Channels during Spreading Depression. *J Neurosci* 1999;19(15):6439-45.
7. Pomper JK. Repetitive Spreading Depression-Like Events Result in Cell Damage in Juvenile Hippocampal Slice Cultures Maintained in Normoxia. *J Neurophysiol* 2005;95(1):355-68.
8. Goodwin M. A survey of a novel epilepsy clinic. *Seizure* 2002. 11(8): 519-22.
9. Bergin P, Sadleir L, Walker E. Bringing epilepsy out of the shadows in New Zealand. *N Z Med J* 2008;121(1268):U2894-U2894.
10. Baker GA. Perceived impact of epilepsy in teenagers and young adults: an international survey. *Epilepsy Behavior*, 2008. 12(3): 395-401.
11. Rosazza C, Ghielmetti F, Minati L, Vitali P, Giovagnoli AR, Deleo F, et al. Preoperative language lateralization in temporal lobe epilepsy (TLE) predicts peri-ictal, pre- and post-operative language performance: An fMRI study. *NeuroImage: Clinical* 2013;3:73-83.
12. Al Sufiani F, Ang LC. Neuropathology of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Research and Treatment* 2012;2012:e624519.
13. Aliashkevich AF, Yilmazer-Hanke D, Van Roost D, Mundhenk B, Schramm J, Blümcke I. Cellular pathology of amygdala neurons in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol* 2003;106(2):99-106.
14. Gorji A, Scheller D, Tegtmeier F, Köhling R, Straub H, Speckmann EJ. NiCl₂ and amiloride induce spreading depression in guinea pig hippocampal slices. *Cephalalgia* 2000;20(8):740-7.
15. Ghamkharnejad Gh SP, Sadighi M, Sadeghzadeh B. The Possible Role of Cortical Spreading Depression on Seizure Induction in Rat Lateral Amygdale. *J Ardabil Univ Med Sci* 2014. 14(1): 37-46. (persian)
16. Van Brederode JF, Rho JM, Cerne R, Tempel BL, Spain WJ. Evidence of altered inhibition in layer V pyramidal neurons from neocortex of Kcna1-null mice. *Neuroscience* 2001;103(4):921-9.
17. Van Harreveld A, Mendelson M. Glutamate-induced contractions in crustacean muscle. *J Cell Comp Physiol* 1959;54:85-94.
18. Van Harreveld A. Two mechanisms for spreading depression in the chicken retina. *J neurobiol* 1978; 9(6): 419-31.
19. Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Rev* 2001; 38(1): 33-60.
20. Smith JM, Bradley DP, James MF, Huang CL-H. Physiological studies of cortical spreading depression. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2006;81(4):457-81.
21. 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* 1989;101(1):51–6.
22. Gorji A, Scheller D, Straub H, Tegtmeier F, Köhling R, Höhling JM, et al. Spreading depression in human neocortical slices. *Brain Res* 2001;906(1-2):74–83.
23. Leniger T, von den Driesch S, Isbruch K, Diener HC, Hufnagel A. Clinical characteristics of patients with comorbidity of migraine and epilepsy. *Headache* 2003;43(6):672–7.
24. Gorji A, Speckmann E-J. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Eur J Neurosci* 2004;19(12):3371–4.
25. Jensen O, Lisman JE. Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multi-item working memory buffer. *Trends Neurosci* 2005;28(2):67–72.
26. Gallup AC. Why do we yawn? Primitive versus derived features. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35(3):765–9.
27. Wernsmann B, Pape H-C, Speckmann E-J, Gorji A. Effect of cortical spreading depression on synaptic transmission of rat hippocampal tissues. *Eur J Neurosci* 2006;23(5):1103–10.
28. Henning EC, Meng X, Fisher M, Sotak CH. Visualization of cortical spreading depression using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 2005;53(4):851–7.
29. Berger M, Speckmann E-J, Pape HC, Gorji A. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. *Cephalalgia* 2008;28(5):558–62.
30. Dehbandi S, Speckmann E-J, Pape HC, Gorji A. Cortical spreading depression modulates synaptic transmission of the rat lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 2008;27(8):2057–65.

Archive of SID

THE ROLE OF CORTICAL SPREADING DEPRESSION ON INDUCTION OF SEIZURES IN THE HIPPOCAMPUS OF MALE RATS

Ghazaleh Ghamkhari nejad¹, Parviz Shahabi^{1,2*}, Behnaz Sadeghzadeh³, Mina Sadighi Alvandi⁴,
Firouz Ghaderi Pakdel^{5,6}

Received: 24 Jan, 2014; Accepted: 9 Apr, 2014

Abstract

Background & Aims: Spreading depression is a pathophysiological phenomenon that is initiated by a self-propagating depolarization wave with a short-term excitability and is followed immediately by an inhibitory phase and then continues with a long-term secondary excitability. Spreading depression has a critical role in many disorders such as migraine and seizures. The purpose of this study was to investigate the role of glutamate receptors and burst activity induced by spreading depression on synaptic plasticity in hippocampus CA1 region.

Materials & Methods: This study was performed on brain slices of 18 male Wistar rats, weighing between 250- 350 g. The slices were studied at one group as control and two groups as glutamate receptor antagonists (AP5 and CNQX). After deep anesthesia, the animals were decapitated and the brain was removed from the skull. Horizontal slices (500 μm thick) containing the hippocampus region were prepared and perfused with GABA_A antagonist (bicuculline 1.25). SD was created with KCl and then LTP was induced and excitatory field potentials were recorded.

Results: Followed by inhibition of glutamate receptors_(NMDA, AMPA) after induction of spreading depression a significant reduction in the amplitude of excitatory field potentials was observed in test groups, CNQX (103.26 ± 3.2), AP5 (102.88 ± 1.1), compared to bicuculline (134 ± 6.7) with Mann Whitney U test. ($P < 0.001$)

Conclusion: The results of this study emphasize on the role of glutamate receptors in induction of cortical spreading depression, so the antagonists that inhibit these receptors lead to suppression of cortical spreading depression. The study of the phase secondary excitability of SD may help us to understand the mechanism of SD action in associated neurological disorders. This finding can improve the therapeutic strategies for treatment of epilepsy.

Keywords: Epilepsy, Hippocampal slices, Spreading depression, Bicuculline, Glutamate receptors.

Address: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran **Tel:** +98 411 3364644

E-mail addresses: parvizshahabi@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(4): 318 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Neurosciences Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

³ Department of Anatomy and Biology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Neurosciences Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁵ Associate Professor, Neurophysiology Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁶ Associate Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran