



Neuroprotective effect of minocycline on PTZ-induced epileptiform activity and alterations of the shape of action potentials in snail neurons assessed by using intracellular recordings

Mahtab Bahrami¹, Zahra Ghasemi², Mahyar Janahmadi^{2*}

1. Dept. of Physiology, Medical School, International Branch, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Neurophysiology Research Center and Dept. of Physiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Evin, Tehran, Iran

Received: 5 Jul 2014

Accepted: 24 Jul 2014

Abstract

Introduction: Epilepsy is a neurological disorder that affects 1-2% of the world population and about 30% of patients are resistant to antiepileptic drug therapy. Therefore, new treatment alternatives are needed. In the present study, the possible neuroprotective effect of minocycline against epileptiform activity induced by pentylenetetrazole (PTZ) was assessed.

Methods: Conventional intracellular recordings were taken from F1 cells of *Helix aspersa*, under the current clamp condition. Following extracellular application of minocycline alone (300 and 600 μ M) or in combination with PTZ (25 mM), alterations in the firing pattern and action potential wave forms were studied and compared to the control group and the group treated with PTZ alone.

Results: In the presence of PTZ alone (25mM), neurons displayed paroxysmal depolarization shift (PDS)-like events and produced burst activity. When PTZ was applied following minocycline pretreatment, it did not produce burst activity, and even reduced the firing frequency. In addition, pre-exposure to minocycline prevented almost some of the changes in the AP shape induced by PTZ treatment.

Conclusion: The findings indicated that minocycline may be able to exert preventive effects against induction of epileptiform activity and could be possibly considered as a new treatment option for epilepsy.

Key words: Minocycline, Epileptiform activity, Pentylenetetrazole (PTZ), Snail neurons, Intracellular recording

* Corresponding author e-mails: mjanahmadi@yahoo.com
Janahmadi@sbmu.ac.ir

Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر محافظت نوروئی مینوسیکلین بر القاء فعالیت صرع گونه و تغییرات در شکل پتانسیل عمل ناشی از پنتیلین تترازول در نورون حلزون

مهتاب بهرامی^۱، زهرا قاسمی^۲، مهیار جان احمدی^{۳*}

۱. دپارتمان فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و دپارتمان فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۲ مرداد ۹۳

دریافت: ۱۴ تیر ۹۳

چکیده

مقدمه: صرع یکی از اختلالات نورولوژیک است که ۱-۲٪ جمعیت دنیا را تحت تأثیر قرار می‌دهد و حدود ۳۰٪ از بیماران صرعی نسبت به درمان دارویی مقاوم هستند. بنابراین، نیاز به یافتن دارویی جدید در جهت درمان این بیماری ضروری است. در مطالعه حاضر اثر احتمالی محافظت نوروئی مینوسیکلین بر فعالیت شبه صرعی ناشی از پنتیلین تترازول (PTZ) مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها: ثبت داخل سلولی تحت شرایط کلمپ جریان از سلولهای F1 حلزون باغی انجام شد. بدنبال کاربرد خارج سلولی مینوسیکلین به تنهایی یا به همراه (۲۵ mM) PTZ تغییرات در الگوی شلیک و ویژگی‌های پتانسیل عمل مورد بررسی قرار گرفت و نتایج با گروه کنترل و درمان شده با PTZ مقایسه گردید.

یافته‌ها: در حضور PTZ به تنهایی نورونها فعالیت انفجاری و وقایع شبه -paroxysmal depolarization shift (PDS) نشان دادند. وقتی PTZ بدنبال پیش درمان با مینوسیکلین بکار رفت نه تنها فعالیت انفجاری ایجاد نشد بلکه باعث کاهش فرکانس پتانسیل عمل نیز شد. علاوه بر این، کاربرد مینوسیکلین قبل از PTZ تقریباً مانع از بروز برخی از تغییرات ناشی از PTZ در شکل پتانسیل عمل شد.

نتیجه گیری: یافته ها نشان می‌دهد که مینوسیکلین می‌تواند مانع از بروز فعالیت انفجاری و صرع گونه شود و احتمالاً می‌تواند به عنوان راه درمانی جدید برای صرع در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: مینوسیکلین، فعالیت شبه صرعی، پنتیلین تترازول (PTZ)، نوروهای حلزون، ثبت داخل سلولی

مقدمه

پاتوفیزیولوژی و دارو درمانی این بیماری صورت گرفته است، مهمترین درمان مؤثر شناخته شده مهار تشنجات صرعی بعد و یا قبل از بروز حملات صرعی با استفاده از داروهای ضد صرع است که خود دارای اثرات جانبی هستند [۲۱، ۲۴، ۳۶]. با اینحال، میزان موفقیت درمان دارویی حدوداً ۷۰٪-۶۰٪ بوده و مابقی بیماران مقاوم به داروهای موجود بوده و نیاز به داروهای جدیدتر و مؤثرتری برای درمان دارند [۱].

با توجه به کاربرد روز افزون مینوسیکلین به عنوان یک داروی ضد التهاب و محافظت کننده نوروئی در بیماری‌های سیستم عصبی و با توجه به مکانیسم‌های اثر متنوع، به عنوان

صرع یکی از شایع‌ترین اختلالات سیستم عصبی مرکزی با شیوع حدود ۱-۵٪ درصد در جهان است، که تقریباً در تمامی سنین و در هر دو جنس دیده می‌شود [۴۲]. علیرغم بررسی‌های گسترده ای که در دهه های اخیر در زمینه

mjanahmadi@yahoo.com

* نویسنده مسئول مکاتبات:

Janahmadi@sbmu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

مواد و روش ها

آزمایش‌ها بر روی سلول F_1 در گانگلیون تحت مری حلزون باغی *Helix aspersa* انجام گرفت. حلزون‌ها از شمال کشور جمع آوری شده و پس از انتقال به آزمایشگاه در شرایط مناسب از لحاظ نور، درجه حرارت (23°C – 20°C) و دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. به منظور تغذیه آنها از برگ کاهو، کلم و خیار استفاده شد.

ابتدا صدف حیوان به کمک انبر استخوان شکن برداشته شد و آنگاه با ایجاد شکافی طولی در ناحیه سر حیوان، گانگلیون تحت مری جدا و به محفظه ثبت با بستر سیلگارد (Dow corning, USA) منتقل شد که حاوی رینگر نرمال بود. بافت پیوندی احاطه کننده نورون های این مجموعه گانگلیونی پس از ثابت نمودن گانگلیون در محفظه مخصوص توسط پنس های بسیار ظریف و بدون استفاده از آنزیم های هضم کننده در زیر استریوسکوپ برداشته شد [۲۲، ۴۳]. پس از آشکار شدن سلول F_1 ، از شاخص هایی نظیر محل قرار گرفتن سلول، اندازه، رنگ و موقعیت آن نسبت به رشته های عصبی، جهت شناسایی سلول مورد نظر استفاده می گردید. سپس بافت مذکور در همین وضعیت درون محلول رینگر نرمال باقی می ماند، تا با شرایط جدید تطابق حاصل کند و سپس ثبت داخل سلولی فعالیت خودبخودی نورون تحت شرایط کلمپ جریان که در آن جریان تزریقی صفر بود انجام شد. مینوسیکلین در دو غلظت $300\mu\text{M}$ و $600\mu\text{M}$ بصورت محلول در رینگر نرمال حلزون تهیه شد [۸].

رینگر نرمال حلزون، محلولی نمکی حاوی (برحسب میلی مولار): NaCl (80)، CaCl_2 (10)، MgCl_2 (5)، KCl (4)، Glucose (10)، HEPES (5) [۴۵]. pH محلول با افزودن Trizma Base در حد $7/4$ – $7/6$ تنظیم شد. ثبت از پتانسیل های عمل خودبخودی سلول ها در شرایط کنترل و متعاقب پرفیوژن رینگر نرمال، PTZ (۲۵ mM) به تنهایی و یا مینوسیکلین ($300\mu\text{M}$ و یا $600\mu\text{M}$) به همراه PTZ توسط آمپلی فایر (Axoclamp 2B, Axon Instrument, USA) انجام شد.

الکترودها با محلول KCl سه مولار پر شده و مقاومتی حدود ۵–۲ مگا اهم داشتند. الکتروده مرجع در تمامی آزمایشات

هدف درمانی احتمالی جهت جلوگیری از بروز فعالیت صرع گونه در این تحقیق در نظر گرفته شد و به بررسی اثرات پیش گیرنده آن بر علیه فعالیت الکتریکی صرعی ناشی از PTZ در سطح سلولی پرداخته شد. پنتیلین تترازول (PTZ) یکی از مواد شیمیایی است که برای ایجاد مدل صرعی در حیوانات کاربرد زیادی دارد و صرع ایجاد شده توسط PTZ در نرم تنان، آنان را به مدل مناسبی برای یافتن مکانیسم سلولی صرع تبدیل نموده است [۳۰]. کاربرد PTZ در محیط خارج سلولی موجب بروز فعالیت های الکتریکی صرع گونه^۱ در نورون های حلزون می شود [۷، ۲۱، ۴۱].

از طرفی همانطور که اشاره شد، بررسی های متعددی نشان داده است که مینوسیکلین، نسل دوم از تتراسایکلین ها، در بسیاری از مدل های حیوانی که مرتبط با بیماری های نورودژنراتیو هستند، اثر محافظت نورونی دارد [۱۵، ۳۱]. همچنین با توجه به اثرات محافظتی نورونی در برابر ضربه و آسیب های تروماتیک این دارو احتمالاً می تواند بر فعالیت صرعی نورون ها ناشی از تروما نیز موثر باشد. اخیراً نشان داده شده است که مینوسیکلین می تواند باعث کاهش فعالیت انفجاری القاء شده توسط آمفتامین در نورون های حلزون شود [۸]. همچنین از طریق مهار تکثیر میکروگلیاها اثرات محافظت نورونی خود را اعمال می نماید [۱۸، ۲۵] و علاوه بر این، موجب کاهش شلیک پتانسیل عمل و جریان پس سیناپسی تحریکی و هم چنین موجب کاهش جریان های رو به داخل سدیمی و کلسیمی نیز می شود [۱۰].

اخیراً نیز نشان داده شده است که در سلول های عصبی حلزون مینوسیکلین باعث کاهش فعالیت انفجاری و تحریک پذیری بالای القاء شده توسط آمفتامین به صورت وابسته به دوز (900 – 300 میکرومولار) می شود [۸]. لذا با توجه به پتانسیل مینوسیکلین در کاهش فعالیت الکتریکی و کاهش فعالیت انفجاری نورونی به نظر می رسد می تواند به عنوان هدف درمانی احتمالی جهت بیماری صرع در نظر گرفته شود، به همین دلیل در بررسی حاضر به اثرات بازدارنده آن در جلوگیری از فعالیت صرع گونه ناشی از PTZ پرداخته شد.

یافته ها

تأثیر پیش درمانی مینوسیکلین در جلوگیری از بروز فعالیت الکتریکی صرع گوتنه ناشی از پنتیلین تترازول: در شرایط کنترل، نورون F1 دارای فعالیت ریتمیک خود به خودی بود (شکل A-۱). درحالی که، کاربرد PTZ (۲۵mM) به تنهایی، باعث تغییرات قابل توجهی در الگوی فعالیت الکتریکی و خصوصیات پتانسیل عمل شد (شکل B-۱). بطوریکه موجب القاء فعالیت انفجاری و وقوع PDS^۱ که از ویژگیهای القاء فعالیت صرعی توسط PTZ است، گردید. جهت بررسی اثر محافظتی مینوسیکلین در برابر القاء فعالیت الکتریکی صرع گوتنه، پس از اینکه سلول F1 تحت تأثیر مینوسیکلین قرار گرفت، پنتیلین تترازول به محیط خارج سلولی که حاوی مینوسیکلین بود، افزوده شد. در این شرایط، کاربرد مینوسیکلین با غلظت ۳۰۰ و یا ۶۰۰ میکرومولار قبل از افزودن PTZ مانع از بروز PDS شد و از فعالیت الکتریکی صرع گونه جلوگیری نمود (شکلهای D-۱-C).

تأثیر پیش درمانی مینوسیکلین در جلوگیری از بروز تغییرات در ویژگی های الکتروفیزیولوژیک ناشی پنتیلین تترازول در سلول های F1: به منظور بررسی اثر محافظتی مینوسیکلین در برابر القاء تغییرات الکتروفیزیولوژیک در پارامترهای پتانسیل عمل، پس از اینکه نورون های F1 تحت تأثیر مینوسیکلین قرار گرفتند، پنتیلین تترازول به محیط خارج سلولی که حاوی مینوسیکلین بود، افزوده شد و پاسخهای الکتریکی خودبخودی ثبت و مورد مقایسه با گروههای کنترل و PTZ به تنهایی قرار گرفت.

متعاقب کاربرد خارج سلولی PTZ (۲۵ mM)، پتانسیل استراحت غشاء نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری ($P < 0.001$) به سمت ولتاژ دپلاریزه شیف پیدا کرد. حال آنکه کاربرد آن پس از مینوسیکلین با غلظت ۳۰۰ μM در مقایسه با هر دو گروه کنترل و PTZ پتانسیل غشا را به میزان بیشتری ($P < 0.001$) دپلاریزه تر نمود، پیش درمانی با مینوسیکلین ۶۰۰ μM بطور معنی داری نه تنها از دپلاریزه شدن پتانسیل غشا ناشی از PTZ جلوگیری نمود بلکه

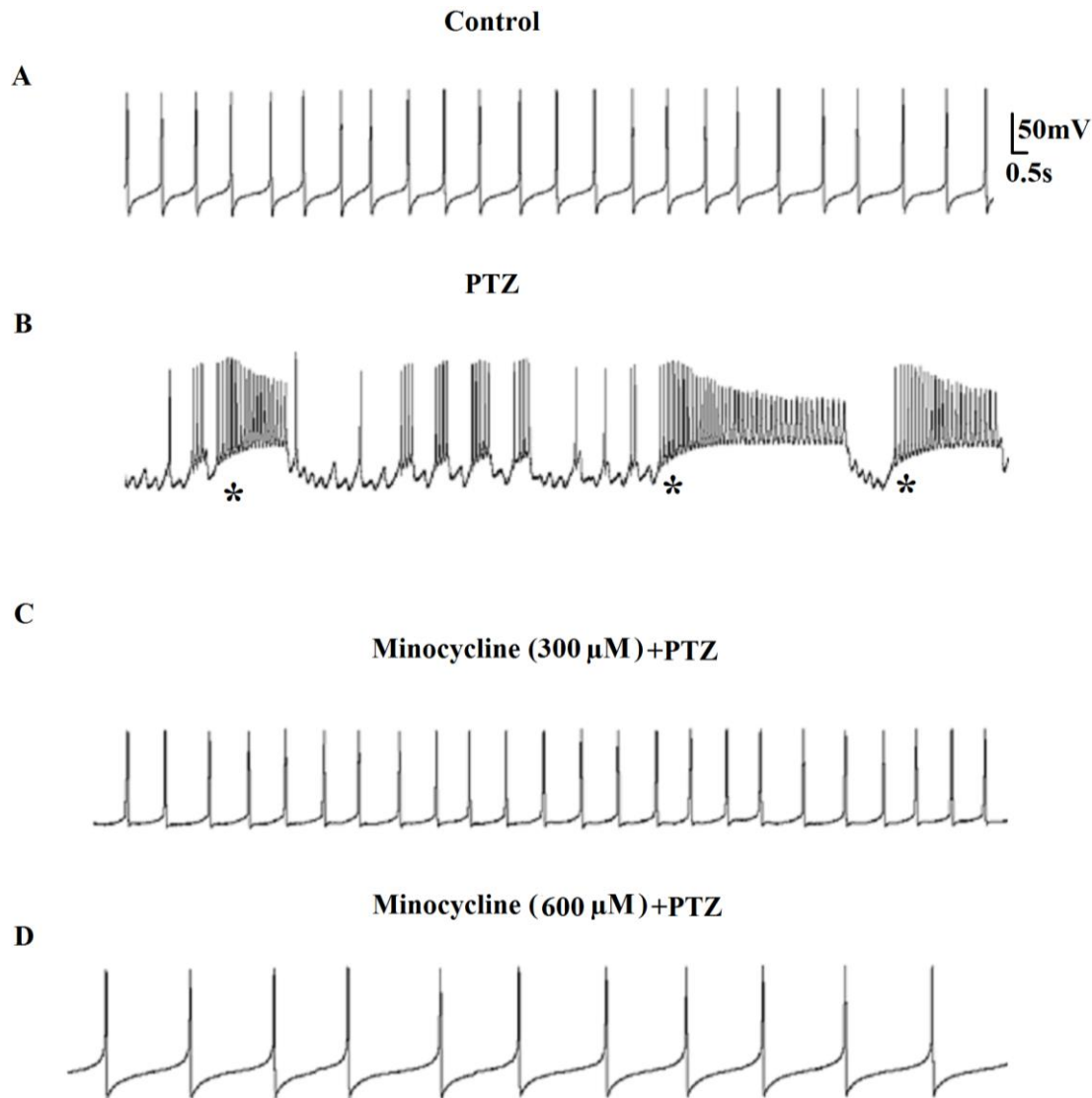
پل آگاری، شامل سیم نقره با پوشش کلرید نقره (Ag/AgCl) در سرنگی حاوی KCl سه مولار و آگار ۴٪ حل شده در رینگر نرمال بود که محفظه ی ثبت را به پتانسیل صفر (زمین) وصل می کرد. داده های ثبت شده از فعالیت سلول ها، توسط یک مبدل آنالوگ - دیجیتال ۱۶ بیتی (AD Instrument, Australia)، رقمی شده و جهت آنالیز ذخیره شدند.

آزمایش ها در ۴ گروه آزمایشی مجزا انجام گرفت. که شامل گروههای کنترل، PTZ (۲۵ mM) و مینوسیکلین ۳۰۰ μM به اضافه PTZ و مینوسیکلین ۶۰۰ μM به اضافه PTZ بود. در هر گروه حداقل از ۵ سلول ثبت داخل سلولی صورت گرفت پس از آنکه به مدت ۵ دقیقه ثبت پایه از فعالیت خودبخودی سلول های F1 در شرایط کنترل به عمل آمد به منظور بررسی اثر حفاظت نورونی مینوسیکلین، در یک گروه محلول رینگر حاوی مینوسیکلین با غلظت ۳۰۰ μM و در گروه دیگر محلول با غلظت بالاتر (۶۰۰ μM) به محیط خارج سلولی پرفیوژ شد و آنگاه از فعالیت الکتریکی سلول ها در این شرایط به مدت ۲۰ دقیقه ثبت به عمل آمد. سپس به منظور بررسی اثر محافظتی مینوسیکلین در مقابل صرع القاء شده توسط پنتیلین تترازول، از PTZ استفاده شد. بدین ترتیب که PTZ با غلظت ۲۵ میلی مولار به محلول رینگر نرمال هر کدام از گروه ها که قبلاً تحت تأثیر دو غلظت متفاوت از مینوسیکلین قرار گرفته بودند، افزوده شد و سپس ثبت الکتروفیزیولوژیک انجام گرفت.

ویژگی های کمی پتانسیل عمل های ثبت شده توسط نرم افزار Chart اندازه گیری و ذخیره شد. این مقادیر کمی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده و مقایسه گروه ها با روش ANOVA یکطرفه انجام گرفت و اختلاف ها با $P \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند. پارامترهای الکتروفیزیولوژیک اندازه گیری شده در این مطالعه عبارت بودند از:

پتانسیل استراحت غشاء، سطح زیر منحنی در ناحیه قله پتانسیل عمل، مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی، فرکانس پتانسیل های عمل، دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون، میانگین طول مدت پتانسیل عمل در ۵۰٪ از دامنه پتانسیل عمل، دامنه پتانسیل عمل که از پتانسیل استراحت تا قله اسپایک را در بر می گیرد.

1. Paroxysmal depolarization shift

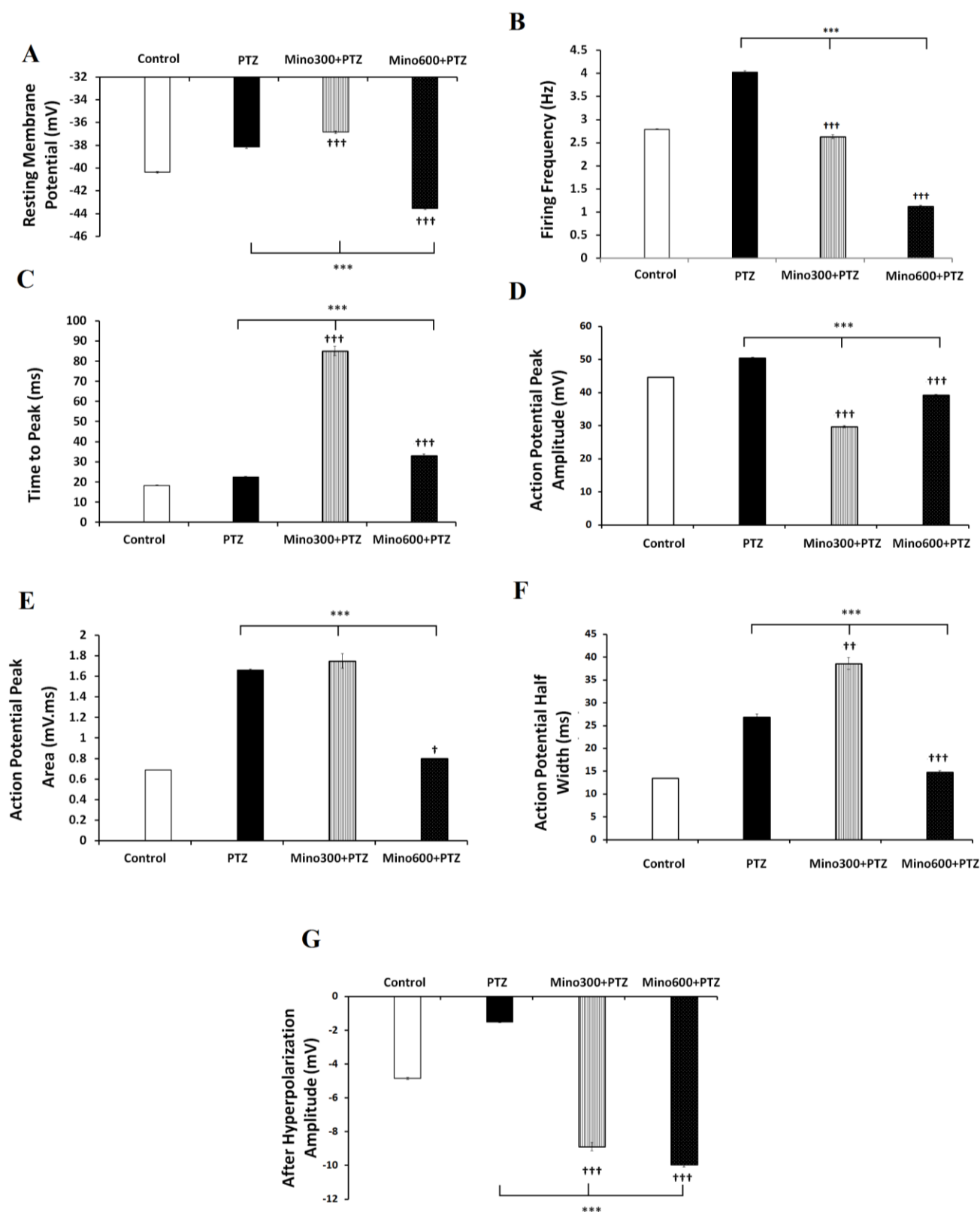


شکل ۱- اثر حفاظتی پیش درمانی با مینوسیکلین بر الگوی شلیک انفجاری و فعالیت صرع گونه ناشی از PTZ در نورون F1. پتانسیل‌های عمل خودبخودی ثبت شده (A) در شرایط کنترل، (B) در حضور PTZ (۲۵ mM)، (C) در حضور PTZ پس از پیش درمانی با Minocycline 300 μ M و (D) در حضور PTZ پس از پیش درمانی با Minocycline 600 μ M. ستاره (*) نشان دهنده وقوع PDS در الگوی شلیک انفجاری گروه PTZ است.

مدت پتانسیل عمل نیز پس از افزودن پنتیلین تترازول نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری ($P < 0.001$) یافت (شکل‌های C-۲ تا F-۲). حال آنکه پتانسیل متعاقب هیپر پلاریزاسیون در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری ($P < 0.001$) نشان داد (شکل G-۲).

کاربرد مینوسیکلین قبل از افزودن PTZ نه تنها مانع از اثر افزایشی پنتیلین تترازول بر مدت زمان رسیدن به قله پتانسیل عمل نشد بلکه بشدت آن را افزایش داد ($P < 0.001$)، (شکل C-۲). از طرف دیگر، افزودن PTZ پس از پیش معنی دار ($P < 0.001$) میانگین دامنه پتانسیل عمل در مقایسه

موجب هیپرپلاریزاسیون آن نسبت به گروه کنترل و PTZ شد (شکل A-۲). همچنین، در حضور PTZ به تنهایی میزان فرکانس شلیک پتانسیل‌های عمل افزایش معنی داری ($P < 0.001$) یافت، حال آنکه کاربرد مینوسیکلین با هر دو غلظت قبل از PTZ نه تنها مانع از بروز اثر افزایشی PTZ بر فرکانس پتانسیل عمل شد، بلکه بطور معنی داری ($P < 0.001$) فرکانس شلیک پتانسیل عمل را نسبت به گروه کنترل و گروه PTZ کاهش داد (شکل B-۲). مدت زمان حداکثر دامنه ولتاژی، میانگین دامنه، سطح زیر منحنی در ناحیه قله و طول درمانی با مینوسیکلین (۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) با کاهش



شکل ۲- مقایسه اثرات محافظتی پیش درمانی با دو غلظت متفاوت مینوسیکلین ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرو مولار بر القاء تغییرات الکتروفیزیولوژیک ناشی از PTZ در پارامترهای پتانسیل عمل. تاثیر کاربرد PTZ، Mincycline 300 μ M+PTZ و Mincycline 600 μ M+PTZ بر پتانسیل استراحت غشا (A)، فرکانس پتانسیل عمل (B)، مدت زمان رسیدن به قله (C)، حداکثر دامنه پتانسیل عمل (D)، سطح زیر منحنی در ناحیه قله (E)، میانگین طول مدت پتانسیل عمل در ۵۰٪ از دامنه پتانسیل عمل (F)، دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل (G). * بیانگر تفاوت معنی دار میانگین گروهها با کنترل ($P \leq 0.05$), *** $P \leq 0.001$, ⁺ بیانگر تفاوت معنی دار میانگین گروه های پیش درمان شده با مینوسیکلین با گروهی که در معرض PTZ به تنهایی قرار گرفتند.

درمان صرع باشد [۲۳]. آبراهام و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که درمان با مینوسیکلین از طریق جلوگیری از فعال شدن میکروگلیاها موجب مهار روند صرع زایی می‌شود و اثرات دراز مدت آسیب رسان صرع را کاهش می‌دهد. با این حال تأثیر آن در سطح سلولی بطور کامل بررسی نشده است. بنابراین، هدف اصلی مطالعه حاضر، بررسی الکتروفیزیولوژیک اثرات محافظت نورونی مینوسیکلین در برابر القاء فعالیت الکتریکی شبه صرعی توسط پنتیلین تترازول می‌باشد. بدین منظور از دو غلظت متفاوت مینوسیکلین $300 \mu\text{M}$ و $600 \mu\text{M}$ محلول در رینگر نرمال استفاده شد [۸].

تحقیقات اخیر نشان داده است که مینوسیکلین می‌تواند فعالیت‌های انفجاری ناشی از آمفامین را در نورون‌های حلزون مهار نماید و این اثر وابسته به دوز می‌باشد [۸]. نتایج حاصل از مطالعه ما نیز اثر متفاوت مینوسیکلین را در دو دوز بکار رفته بر بعضی از پارامترهای پتانسیل عمل و نه همه آنها را نشان داد. با توجه به اینکه پارامترهای مهم جهت بررسی میزان تحریک پذیری سلول شامل پتانسیل استراحت غشاء، پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون و فرکانس شلیک پتانسیل عمل می‌باشد، در این مطالعه تأثیر پیش درمانی با مینوسیکلین بر جلوگیری یا کاهش تغییرات الکتروفیزیولوژیک ناشی از پنتیلین تترازول بطور دقیق‌تری بر پارامترهای فوق‌الذکر مورد بررسی قرار گرفت.

فعالیت صرعی نتیجه غلبه عوامل تحریکی بر عوامل مهاری در شبکه عصبی مرکزی می‌باشد و PDS، از بارزترین ویژگی‌های فیزیولوژیک فعالیت صرعی است. بنابراین جهت ایجاد یک مدل صرعی، در این مطالعه از PTZ (25mM) به عنوان ماده القاء کننده صرع، که قادر به ایجاد PDS نیز هست، استفاده شد [۲۶]. نورون‌های حلزون به عنوان مدل صرعی مناسب و مشابه با پستانداران در این تحقیق انتخاب شد [۹، ۲۷].

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کاربرد مینوسیکلین قبل از القاء فعالیت صرعی توسط PTZ مانع از ایجاد PDS و یا فعالیت انفجاری سلول شد. PDS، دپلاریزاسیون طولانی مدت وابسته به کلسیم است که همراه با ایجاد قطاری از پتانسیل‌های عمل سدیمی و کلسیمی است. در واقع فعالیت گیرنده‌های AMPA، NMDA و کانال‌های

با گروه کنترل و گروه دریافت کننده PTZ به تنهایی همراه بود (شکل D-۲). لکن، کاربرد آن پس از مینوسیکلین با غلظت $300 \mu\text{M}$ موجب افزایش سطح زیر منحنی در ناحیه قله پتانسیل عمل نسبت به گروه کنترل ($P < 0.001$) گردید در حالیکه پس از مینوسیکلین با غلظت $600 \mu\text{M}$ موجب کاهش معنی داری ($P < 0.05$) آن نسبت به گروه PTZ شد (شکل E-۲). طول مدت پتانسیل عمل در 50% از دامنه پتانسیل عمل نیز تحت تأثیر PTZ گرفت، بطوریکه در حضور PTZ به تنهایی افزایش معنی داری نسبت به کنترل یافت (شکل F-۲)، و وقتی که پس از مینوسیکلین با غلظت $300 \mu\text{M}$ میکرومولار بکار رفت اثر افزایشی PTZ بر طول مدت پتانسیل عمل تشدید شد. در حالیکه، در حضور مینوسیکلین با غلظت $600 \mu\text{M}$ میکرومولار کاربرد PTZ همراه با کوتاه شدن معنی دار ($P < 0.001$) طول مدت پتانسیل عمل نسبت به گروه PTZ به تنهایی بود (شکل F-۲).

همچنین، دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون (AHP^۱) نورون F1 در حضور PTZ به تنهایی کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل یافت (شکل G-۲). اما پس از پیش درمانی با مینوسیکلین با هر دو غلظت، کاربرد PTZ نتوانست باعث کاهش دامنه AHP شود و در عوض با افزایش معنی دار آن نسبت به گروه کنترل و گروه PTZ همراه بود (شکل G-۲).

بحث

شواهد بسیاری نشان می‌دهند که التهاب عصبی در جنبه های بسیاری از بیماریهای سیستم اعصاب مرکزی از جمله صرع نقش دارد. فعالیت بیش از حد سلول‌های گلیال از جمله آستروسیت‌ها می‌تواند با رهائش سیتوکاین‌ها و گلیوترانسمیترهایی^۲ همچون گلوتامات همراه باشد [۴۶]، که باعث افزایش تحریک پذیری نورون‌ها می‌شود و از این طریق در توسعه فعالیت صرعی نقش دارد. از طرف دیگر نشان داده شده است که تعدیل ضد التهابی می‌تواند راهی برای

1. After hyperpolarization
2. Gliotransmitters

رو به داخل سدیم و حدود ۳۰٪ جریان کلسیمی را در نورون های هیپوکامپ بلوک می کند [۱۱]. مطالعات بیشماری وجود کانال های کلسیمی نوع L و T را در نورون حلزون نشان داده اند بطوریکه ۵۵٪ از جریان های کلسیمی در این نورون ها از نوع L و مابقی از نوع T می باشند [۲، ۳، ۴۴]. بنابراین با توجه به نقش مهم ورود سدیم و کلسیم طی وقوع پتانسیل عمل و تأثیر آن بر تحریک پذیری، می توان تغییرات ایجاد شده در پارامترهای الکتروفیزیولوژیک ثبت شده ناشی از مینوسیکلین از جمله کاهش فرکانس شلیک را توجیه کرد.

علاوه بر این، یکی دیگر از پارامترهای پتانسیل عمل که تحت تأثیر PTZ به تنهایی و نیز پس از پیش درمانی با مینوسیکلین قرار گرفت، AHP بود که یک عامل اساسی در تعیین میزان فعالیت نورون ها به شمار می رود و افزایش و کاهش آن بر فرکانس پتانسیل عمل اثر می گذارد. رابطه معکوس بین دامنه AHP و فرکانس شلیک پتانسیل عمل در مطالعات متعدد نشان داده شده است [۲۹]. بطوریکه با کاهش AHP فرکانس پتانسیل عمل افزایش می یابد. با اینحال در مواردی نیز نشان داده شده است که با افزایش دامنه AHP میزان فعالیت نورونی افزایش یافته است و علت این امر را حذف مرحله غیر فعال شدن کانالهای سدیمی دانسته اند که با هیپرپلاریزاسیون غشا ناشی از افزایش دامنه AHP رخ می دهد و بدین ترتیب با افزایش ورود سدیم فرکانس پتانسیل عمل افزایش می یابد [۳۳].

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مینوسیکلین با غلظت ۶۰۰ میکرومولار موجب افزایش دامنه AHP شد. در بسیاری از نورون های مهره داران و بی مهرگان از جمله حلزون، فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل و پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون توسط فعالیت دو دسته از کانال های K^+ ، یعنی کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ به ویژه نوع یکسو ساز تأخیری [۴۰] و وابسته به غلظت یون آزاد کلسیم داخل سلولی (BK و SK) تعیین می شود و فعالیت کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم در الگوی شلیک و فرکانس

کلسیمی وابسته به ولتاژ در ایجاد این دپلاریزاسیون طولانی نقش دارد [۴۶]. تحقیقات اخیر نشان داده اند که مینوسیکلین بصورت وابسته به دوز ($900-300 \mu M$) از طریق مهار مسیر PKA- cAMP موجب از بین رفتن PDS ناشی از کاربرد آمفتامین می شود [۸].

مطالعات پیشین نشان داده اند که در ایجاد فعالیت انفجاری و هیپرپلاریزاسیون غشاء متعاقب PDS که پس از کاربرد PTZ رخ می دهد کانال های K^+ وابسته به کلسیم و وابسته به ولتاژ، جریان های کلری وابسته به ولتاژ و وابسته به گیرنده های GABA-A و نیز جریان های K^+ وابسته به گیرنده های GABA-B نقش مهمی دارند.

یکی دیگر از نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، هیپرپلاریزه شدن پتانسیل استراحت غشاء و جلوگیری از اثر دپلاریزه کننده PTZ متعاقب پیش درمانی با مینوسیکلین ($600 \mu M$) بود. یون پتاسیم تعیین کننده اصلی پتانسیل استراحت غشاء بوده و علاوه بر این جریانات پتاسیمی در بروز AHP و کنترل تحریک پذیری و شدت ارتباطات سیناپسی بین نورون ها نقش دارند [۲۸]. کانال های K^+ در تثبیت و حفظ پتانسیل غشاء و بسیاری از اعمال فیزیولوژیک از جمله: تحریک پذیری نورون ها، پیام رسانی سلولی تنظیم کننده رهایش ناقل عصبی، تنظیم حجم سلول دخیلند [۲۰]. تأثیر مینوسیکلین بر افزایش فعالیت کانال های نشتی پتاسیمی که در ایجاد پتانسیل غشا نقش دارند توسط محققین دیگر نشان داده شده است [۲۹]. از طرف دیگر، نتایج حاضر نشان داد که PTZ به تنهایی موجب القاء دپلاریزاسیون پتانسیل غشا سلول گردید. پاپ و همکارانش در سال ۱۹۸۷ نشان دادند که PTZ با افزایش ورود سدیم و کلسیم باعث دپلاریزه شدن پتانسیل غشا می شود. آنها با بکار بردن بلوکرهای کلسیمی نتیجه گرفتند که PTZ با اثر بر روی کانالهای کلسیمی و از بین رفتن انتخاب پذیری این کانالها و اجازه ورود یون سدیم منجر به دپلاریزه شدن پتانسیل غشا می شود [۳۵]. گونزالز و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که مینوسیکلین موجب مهار کانالهای وابسته به ولتاژ سدیمی و کلسیمی می شود [۱۷]. همچنین، تحقیقات قبلی نشان داده اند که مینوسیکلین با غلظت ۱۰۰ میکرومول تحت شرایط cell patch clamp Whole- به میزان ۲۰٪ جریان

1. Long lasting Ca^{2+} channels
2. Transient Ca^{2+} channels
3. Big Conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel
4. Small Conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel

پتاسم خارج سلولى موجب کاهش تحريك پذيرى نورونى مى‌شود. در وقوع چنین شرايطى کانال‌هاى آبی آکواپورین-4 (AQP4) گلیا دخالت دارند [۵]. این کانال‌ها با تبادل دوطرفه و مستقیم آب بین فضای خارج سلولى و خون، اسمولاریتی مایع میان بافتی و حجم فضای خارج سلولى را تنظیم مى‌نماید [۵، ۶]. بدین ترتیب که با ایجاد سیستم بافرینگ K^+ از طریق کانال‌هاى یکسوساز تأخیری روبه داخل^۳ و انتقال آب از راه کانال‌هاى (AQP4) به داخل سلول تعادل اسمولى را حفظ مى‌نماید، افزایش غلظت موضعی K^+ با دیپلاریزه کردن پتانسیل غشاء زمینه وقوع فعالیت صرعى را فراهم مى‌نماید [۳۷]. با توجه به اینکه آستروسیت‌ها نقش اصلی در هومئوستاز پتاسیم و آب دارند [۳۴]. شاید مینوسیکلین از طریق مهار فعالیت افزایش یافته گلیاها در شرایط صرعى، و از طریق تأثیر بر بافرینگ یون پتاسیم، مانع از ادامه فعالیت صرعى نورون‌ها شوند. بطور کلی این مطالعه نشان داد که مینوسیکلین با کاهش تحريك پذيرى نورونى مى‌تواند مانع از بروز فعالیت صرعى گونه ناشى از PTZ شود و همچنین موجب تغییر پارامترهاى دخیل در ساختار پتانسیل عمل مى‌گردد که در تحريك پذيرى نورونى نقش دارند. لذا با توجه به اثر مهارى آن بر فعالیت الکتریکی صرعى گونه شاید بتواند به عنوان یکی از راههای درمان صرعى استفاده شود.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر، بخشی از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی شعبه بین الملل می‌باشد و هزینه انجام آن بطور شخصى توسط استاد راهنما (مهیار جان احمدی) تامین گردید. محل انجام تحقیق مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

پتانسیل عمل نقش دارند [۱۳، ۱۶]. افزایش دامنه AHP متعاقب کاربرد مینوسیکلین احتمالاً مى‌تواند حاصل فعالیت این دسته از کانالهای پتاسیمی باشد. شلیک پتانسیل عمل در سلول‌های حلزون وابسته به ورود سدیم، کلسیم یا هر دو است. عملکرد کانال‌های سدیمی که شدیداً توسط هیپرپلاریزاسیون القایی ناشی از AHP تنظیم مى‌شود، نقش مهمی در تنظیم الگوی شلیک و افزایش تحريك پذيرى سلول دارد [۳۲]. جریانات سدیمی رو به داخل فعال شونده به واسطه دیپلاریزاسیون غشاء تا ولتاژ آستانه و باز شدن کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ عامل اصلی بروز فاز بالاروی پتانسیل عمل هستند و کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نیز در روند دیپلاریزاسیون غشاء طی پتانسیل عمل فعال مى‌شوند [۳، ۴]. ورود کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، جریانات K^+ حساس به کلسیم را فعال مى‌کند. تغییر در عملکرد این نوع کانال‌ها، موجب تغییر در دامنه AHP و شکل پتانسیل عمل و فرایندهای فیزیولوژیک وابسته به کلسیم را تغییر مى‌دهد [۳۹].

از طرفی، تحقیقات نشان داده اند که مینوسیکلین موجب مهار فعالیت گلیاها مى‌شود [۱۸]. گلیاها که آستروسیت‌ها و میکروگلیاها را شامل مى‌شود نقش‌های مختلفی در عملکرد نورونى دارند، از جمله در شکل پذيرى^۱ و عملکرد سیناپسى، تنظیم عناصر خارج سلولى توسط بافرینگ نوروترانسمیترها و یون‌ها و غلظت آب، تنظیم جریان خون موضعی و تبادل مواد انرژی زا مى‌باشد [۱۲، ۱۴]. تغییر در شکل و عملکرد گلیاها در انواع مختلف صرعى دیده مى‌شود و موجب افزایش تحريك پذيرى و گسترش صرعى مى‌شود [۵]. آستروسیت‌ها جریان آب و یون K^+ را مابین سلول‌های مغز و فضای خارج سلولى تنظیم مى‌کند. تحريك پذيرى نورونى قویاً با سطح K^+ فضای خارج سلولى و حجم این فضا در ارتباط مى‌باشد. کاهش حجم فضای خارج سلولى موجب افزایش تحريك پذيرى و بروز فعالیتهای صرعى گونه مى‌شود و به عکس کاهش آن از طریق ایجاد محیط هیپر اسمولار باعث کاهش تحريك پذيرى نورونى مى‌شود [۳۸]. کاهش یا مهار عملکرد سلول‌های گلیا با ایجاد محیط هیپر اسمول از طریق کاهش باز یافت یون

2. Aquaporin 4
3. Inward Rectifier K^+ Channel

1. Plasticity

References

- [1] Adams RD, Victor M, Allan R, **Principle neurology**. Mc-Grawhill, 1997, p. 313-330.
- [2] Bingmann D, Speckmann EJ, Action of pentylenetetrazol (PTZ) on CA₃ neurons in hippocampal slices of guinea pigs. **EXP Brain Res** 64 (1986) 94-104.
- [3] Bal R, Janahmadi M, Green GGR, Sanders DJ, Two kinds of transient outward currents, IA and IAdopol, in F₇₆ and D₁ soma membranes of the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. **J Membr Biol** 179 (2001) 71-78.
- [4] Bal R, Janahmadi M, Green GGR, Sanders DJ, Effect of Calcium and Calcium Channel Blockers on Transient Outward Current of F₇₆ and D₁ Neuronal Soma Membranes in the Subesophageal Ganglia of *Helix aspersa*. **J Membr Biol** 173 (2000) 179-185.
- [5] Binder DK, Nagelhus E A, Ottersen OP, Aquaporin-4 and epilepsy. **Glia** 60 (2012) 1203-1214.
- [6] Binde DK, Steinhäuser C, Functional changes in astroglial cells in epilepsy. **Glia** 54(2006) 358-368.
- [7] Chen YH, Tsai MC, Action potential bursts in central snail neurons elicited by d-amphetamine: roles of ionic currents. **Neuroscience** 96 (2000)237-248.
- [8] Chen YH, Lin PL, Wong RW, Wu YT, Hsu HY, Tsai MC, Lin MJ, Hsu YC, Lin CH, Minocycline inhibits D-amphetamine-elicited action potential bursts in a central snail neuron. **Neuroscience** 223 (2012) 412 -28.
- [9] Chen YH, Tsai MC, Bursting firing of action potentials in central snail neurons elicited by d-amphetamine: role of cytoplasmic second messengers. **Neurosci Res** 27 (1997) 295-304.
- [10] Defaux A, Zurich MG, Honegger P, Monnet T, Minocycline promotes remelination in aggregation rat brain cell culture after interferon-gamma plus lipopolysaccharide induced demyelination. **Neuroscience** 187 (2011) 84-92.
- [11] Deitmer JW, Araque A, **Astrocyte Ca²⁺ signaling**. In: Squire, Encyclopedia of Neuroscience. L.R ed.Oxford: Academic press, 2009, p. 565-572.
- [12] De Lanerolle NC, Lee TS, Spencer DD, Astrocytes and epilepsy. **Neurotherapeutics** 7 (2010) 424-438.
- [13] Faber ES, Sah P, Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. **Neuroscientist** 9 (2003)181-194.
- [14] Friedman A, Kaufer D, Heinemann U, Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. **Epilepsy Res** 85 (2009) 142-149.
- [15] Giuliani F, Hader W, Yong VW, Minocycline attenuates T cell and microglia activity to impair cytokine production in T cell-microglia interaction. **J Leuko Bio** 78 (2005) 135-143.
- [16] Gola M C, Ducreux C, Chagneux H, Ca²⁺ activated K⁺ current involment in neuronal function reveald by in situe single channel analysis in *Helix* neurones. **J Physiol** 420 (1990) 73-109.
- [17] González JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernandez-Gomez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandía L, García AG, Jordán J, Hernández-Guijo JM. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. **Eur J Neurosci** 26 (2007) 2481-2495.
- [18] Hartung K, Hemamm A, Differential effects of pentylenetetrazol on ion currents of Aplysia neuron. **Brain Res** 419 (1987) 55-64.
- [19] Hallworth NE, Wilson CJ, Bevan MD, Apamin-sensitive small conductance calcium-activated potassium channels, through their selective coupling to voltage-gated calcium channels, are critical determinants of the precision, pace, and pattern of action potential generation in rat subthalamic nucleus neurones in vitro. **J Neurosci** 23 (2003) 7525-7542.
- [20] Hille B, **Ion channels of excitable membranes**. 3rd ed. Sinaure Associates Inc. Massachusettes USA: Sunderland, 2001.
- [21] Janahmadi M, Niazi F, Denial S, Kamalinejad M, Effects of the fruit essential oil of *Cuminum cyminum* Linn. (Apiaceae) on pentylenetetrazol-induced epileptiform activity in F₁ neurons of *Helix asperse*. **J Ethnopharmacol** 104 (2006) 278-82.
- [22] Janahmadi M, Malmierca MS, Hearne PG, Green GG, Sandres DJ, Morphological and electrophysiological features of F₇₆ and D₁ neurones of the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa* in vitro and in culture. **Anat Embryol (Berl)** 199 (1999) 563-572.
- [23] Hubbard JA, Hsu MS, Fiacco TA, Binder DK, Glial cell changes in Epilepsy: Overview of the clinical problem

- and therapeutic opportunities. *Neurochem Int* 63 (2013) 638-651.
- [24] Katzung G, *Basic & Clinical Pharmacology*. Appleton & Lang. 8th ed. Sanfransisco: Wolf publishing Ltd, 2000, p.351-353.
- [25] Klocker NO, Mubhoff V, Madeja M, Speckmann EJ, Activation of ATP-sensitive potassium channels in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes by the epileptogenic agent pentylenetetrazol. *Eur J Physiol* 431(1996) 736-740.
- [26] Kerkut GA, Lambert JDC, Gayton RJ, Loker JE, Walker RJ, Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 50 (1975) 1-25.
- [27] Kiss T, Hairpin L, Papp N, Elekes K, Dopamine and serotonin receptors mediating contraction of the snail, *Helix pomatia*, salivary duct. *Neuroscience* 116 (2003) 775-790.
- [28] Krause M, Pedarzani P, A protein phosphatase is involved in cholinergic suppression of the Ca^{2+} - activated K^{+} current sIAHP in hippocampal pyramidal neuron. *Neuropharmacology* 39 (2000) 1274-1283.
- [29] Lannigan BG, Evans DA. The effect of minocycline on potassium leakage from red cells: a study of the genetics and relationship to vestibular adverse reactions. *J Med Genet* 19 (1982) 354-359.
- [30] Meech RW, Strumwasser F, Intracellular calcium injection activates potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 42 (1972) 493-9.
- [31] Maier K, Merkler D, Gerber J, Taheri N, Kunnert AV, Williams SK, Neusch C, Bähr M, Diem R, Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation. *Neurobiol Dis* 25 (2007) 514-525.
- [32] Mercer JN, Chan CS, Tkatch T, Held J, Surmeier DJ, sodium channels are critical to pacemaking and fast spiking in globus pallidus neurons. *J Neurosci* 27 (2007) 13552-13566.
- [33] Miles GB, Dai Y, Brownstone RM. Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J Physiol* 566 (2005) 519-532.
- [34] Orkand RK, Extracellular potassium accumulation in the nervous system. *Fed Proc* 39 (1980) 1515-1518.
- [35] Papp A, Fehér O, Erdélyi L. The ionic mechanism of the pentylenetetrazol convulsions. *Acta Biol Hung* 38 (1987) 349-361.
- [36] Rang HP, Dale M M, *Pharmacology*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone (1999) 566-578.
- [37] Rutecki PA, Lebeda FJ, Johnston D, Epileptiform activity induced by changes in extracellular potassium in hippocampus. *J Neurophysiol* 54 (1985) 1363-1374.
- [38] Saly V, Andrew RD, CA_3 neuron excitation and epileptiform discharge are sensitive to osmolality. *J Neurophysiol* 69 (1993) 2200-2208.
- [39] Sah P, McLachlan EM, Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneuron. *J Neurophysiol* 68 (1992) 1834-1841.
- [40] Silva NL, Pechura CM, Barker JL, Postnatal rat nigrostriatal dopaminergic neurons exhibit five types of potassium conductances. *J Neurophysiol* 64 (1990) 262-272.
- [41] Sugaya E, Furuichi H, Takagi T, Kajiwar K, Komatsubara J, Intracellular calcium concentration during pentylenetetrazol - induced bursting activity in snail neurons. *Brain Res* 416 (1987) 183-186.
- [42] Ure JA, Perassolo M, Update on the pathophysiology of the epilepsies. *J Neurol Sci* 177 (2000) 1-17.
- [43] Vatanparast J, Janahmadi M, Asgari AR, Forskolin potentiates the paraoxon-induced hyperexcitability in snail neurons by blocking afterhyperpolarization. *Neurotoxicology* 28 (2007) 1178-1183.
- [44] Vatanparast J, Janahmadi M, Asgari AR, The functional consequences of paraoxon exposure in central neurones of land snail, *Caucasotachea atrolabiata*, are partly mediated through modulation of Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143 (2006) 464-472.
- [45] Vatanparast J, Janahmadi M, Sepehri H, Haeri-Rohani A, Asgari AR. Forskolin attenuates the paraoxon-induced hyperexcitability in snail neurons. *Physiol Pharmacol* 10 (2006) 27-32.
- [46] Wetherington J, Serrano G, Dingledine R, Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* 58 (2008) 168-178.