



Electrophysiological study of amygdala-induced changes in the excitability of CA1 hippocampal pyramidal neurons in male adult rats

Zohre Ghotbeddin¹, Javad Mirnajafi-Zadeh^{1†}, Saeed Semnanian¹, Mahyar Janahmadi^{2*}

1. Dept. Physiology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Neuroscience Research Centre and Dept. of Physiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 12 Dec 2011

Accepted: 15 Jan 2011

Abstract

Introduction: Many studies have shown that amygdala kindling produces synaptic potentiation by induction of changes in the neuronal electrophysiological properties and inward currents both in epileptic focus and in the areas which are in connection with the epileptic focus and have important role in seizure development and progression such as hippocampal CA1 region. However, cellular mechanisms of these processes are not clear. In the present study, changes in the electrophysiological properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons following amygdala kindling were examined in rat.

Methods: Animals were rapidly kindled by stimulation of right amygdala (12 stimulation per day, 1 ms pulse duration at 50Hz). Twenty-four hours after amygdala kindling, electrophysiological properties and inward currents of CA1 pyramidal neurons were assessed by using whole-cell patch clamp technique.

Results: Amygdala kindling findings show that percentage broadening of the last spike compared to the first spike during a trains of action potentials was significantly increased in kindled rats ($p < 0.05$). The number of rebound action potential was significantly increased from 1 ± 1 in control rats to 6 ± 1 in kindled rats ($p < 0.01$). The amplitude of post stimulus afterhyperpolarization potential (Post AHP) following a trains of action potential was also significantly ($p < 0.05$) increased in kindled group (-5 ± 2 mV) compared to normal rats (-3 ± 1 mV). Under voltage clamp condition, amygdala kindling produced a significantly larger inward current (-5344.25 ± 33.19 pA, $p < 0.001$) in CA1 pyramidal neurons compared to normal cells (-9203.6 ± 44.99 pA).

Conclusion: The present findings show that amygdala kindling resulted in neuronal hyperexcitability through alteration of the electrophysiological characteristics possibly by increasing the inward currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons.

Key words: Amygdala kindling, Seizure, Hippocampal Pyramidal Neurons, Whole Cell Patch Clamp Recoding, Inward current

* Corresponding author e-mail: mjanahmadi@yahoo.com
mirnajaf@modares.ac.ir

Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی الکتروفیزیولوژیک تغییرات ایجاد شده در تحریک پذیری نورونهای هرمی CA1 هیپوکمپ ناشی از کیندلینگ آمیگدال در موشهای صحرائی نر بالغ

زهره قطب الدین^۱، سید جواد میرنجفی زاده^۱، سعید سمنائیان^۱، مهیار جان احمدی^{۲*}

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۲۵ دی ۹۰

دریافت: ۲۱ آذر ۹۰

چکیده

مقدمه: نتایج تحقیقات بسیاری نشان می دهد که کیندلینگ آمیگدال با تغییر در ویژگی های الکتروفیزیولوژیک و جریان های رو به داخل نورون ها در کانون تشنج و نواحی مرتبط با آن نظیر سلول های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ، باعث تقویت سیناپسی می شود، اما مکانیسم سلولی آن هنوز به درستی مشخص نیست. در این تحقیق تغییرات در ویژگی های الکتروفیزیولوژیک نورون های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ در طی روند کیندلینگ آمیگدال مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: حیوانات با روش کیندلینگ سریع با اعمال پالس های مربعی به مدت ۱ میلی ثانیه، فرکانس ۵۰ هرتز، با شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب و به مدت ۳ ثانیه به فاصله ۵ دقیقه یکبار و ۱۲ بار در روز تحریک می شدند ($n=10$). بعد از بروز مرحله ۵ تشنج (۲۴ ساعت بعد) ویژگی های الکتروفیزیولوژیک و جریان های رو به داخل نورون های ناحیه CA1 هیپوکمپ به روش Whole-Cell Patch Clamp مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از کیندلینگ آمیگدال نشان می دهد که درصد طولانی شدن (% Broadening) طول مدت پتانسیل عمل در گروه کیندل (15±125) نسبت به گروه کنترل (15±105) افزایش معنی داری ($p<0.05$) یافت. تعداد پتانسیل عمل های rebound نیز به طور معنی داری از 1 ± 1 در گروه کنترل به 6 ± 1 در گروه کیندل افزایش یافت ($p<0.01$). دامنه AHP متعاقب تحریک (Post stimulus AHP) نیز در گروه کیندل (-5 ± 2 mV) نسبت به گروه کنترل (-3 ± 1 mV) افزایش معنی داری ($p<0.05$) یافت. در شرایط کلمپ ولتاژ، جریان های رو به داخل در گروه کیندل ($44/99 \text{ pA} \pm 92.03/6$) نسبت به گروه کنترل ($33/19 \text{ pA} \pm 5344/25$) افزایش معنی داری ($p<0.001$) پیدا کرد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که کیندلینگ آمیگدال با تغییر ویژگی های الکتروفیزیولوژیک احتمالاً با افزایش جریان های رو به داخل در نورون های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ باعث افزایش تحریک پذیری این نورون ها می شود.

واژه های کلیدی: کیندلینگ آمیگدال، تشنج، نورونهای هرمی هیپوکمپ، ثبت Whole Cell Patch، تحریک پذیری، جریان رو به داخل

مقدمه

مزمین می باشد که با تخلیه های ناگهانی و همزمان مجموعه ای از نورون ها همراه است. صرع لوب گیجگاهی شایع ترین اختلال صرعی در بالغین است که معمولاً به دنبال اختلالات مغزی نظیر سکت، تروما و بیماری های نورودژنراتیو ایجاد می شود. کیندلینگ که به دو صورت شیمیایی و الکتریکی انجام می شود یک مدل آزمایشگاهی برای ایجاد

صرع (epilepsy) مجموعه ای از اختلالات نورولوژیک

mjanahmadi@yahoo.com

* نویسنده مسئول مکاتبات:

mirnajaf@modares.ac.ir

وبگاه مجله:

www.phypha.ir/ppj

به داخلی که از طریق آنها صورت می‌گیرد می‌تواند نقش اساسی در کیندلینگ و تشنج متعاقب آن داشته باشد، در این تحقیق تغییر عملکردی این جریان‌ها و تأثیر آن بر تحریک پذیری نورونهای هرمی ناحیه CA1 را متعاقب القای تشنج بررسی شد

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از موش‌های صحرایی نر بالغ جوان نژاد Wistar با وزن تقریبی (۹۰-۸۰) گرم استفاده شد. هر حیوان با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شده و برای عمل جراحی در استریوتاکس قرار داده می‌شد. موقعیت آمیگدال نسبت به برگما تعیین گردیده و الکتروود ۳ قطبی تحریک و ثبت در این ناحیه قرار داده می‌گرفت. جنس الکتروودها از فولاد ضد زنگ بود. پس از بستن پیچ‌های لنگرگاه و الکتروودهای تحریک و ثبات، پین‌های متصل به الکتروودها درون بخش مادگی سوکت مربوطه قرار داده و سوکت با استفاده از سیمان دندانپزشکی بر روی جمجمه نصب می‌گردید [۱۴]. پس از طی دوره بهبودی (۷-۵ روز)، برای ایجاد تشنج از روش کیندلینگ سریع استفاده شد. در این روش حیوانات با موج مربعی تک فاز (فرکانس ۵۰ هرتز، با شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۳ ثانیه) تحریک شدند. این تحریکات به فاصله هر ۵ دقیقه یک بار و ۱۲ بار در روز اعمال می‌شد و تا زمان بروز مرحله ۵ تشنج تحریک‌ها اعمال می‌گردید. پس از اعمال تحریک کیندلینگ، امواج تخلیه متعاقب توسط الکتروود ثبت و توسط نرم افزار Biochart اندازه گیری می‌شد. مراحل رفتاری تشنج بر اساس معیارهای Racine [۱۸] به صورت زیر تقسیم بندی می‌شوند:

مرحله یک، انقباضات عضلانی صورت (Facial clonus)،
مرحله دوم، حرکت دادن سر به طرف بالا و پایین (Head nodding)،
مرحله سوم، کلونوس اندام جلویی (Forelimb clonus)،
مرحله چهارم، ایستادن روی هر دو پا (Rearing)،
توأم با کلونوس اندام جلویی و مرحله پنجم، ایستادن روی هر دو پا همراه با از دست دادن تعادل و افتادن (Rearing & Falling).

تشنج است که بیشترین تشابه را با حالت صرع در انسان دارد [۱۴، ۲۷]. مستعدترین نواحی مغزی از جمله آمیگدال برای ایجاد کیندلینگ در حیوانات در سیستم لیمبیک قرار دارند [۱]. کیندلینگ الکتریکی معمولاً به دو روش سریع و مزمن صورت می‌گیرد [۲۰].

در کیندلینگ الکتریکی تحریکات می‌بایستی قادر به ایجاد تخلیه‌های متعاقب (After Discharge) ثبت در EEG باشد که ناشی از فعالیت همزمان گروهی از نورون‌ها است [۶، ۱۵، ۳۱]. در طی روند کیندلینگ، امواج تخلیه متعاقب در ابتدا محدود به ناحیه تحریک شده است، اما پس از اعمال چندین تحریک این امواج در مسیرهای نورونی مختلفی منتشر شده و به نواحی دیگر مغز نیز می‌رسند. با گسترش این امواج، مراحل مختلف تشنج در رفتار حیوان مشاهده می‌شود. در بین نواحی مختلف مغز، هیپوکامپ ناحیه مهمی در گسترش و تقویت امواج تشنجی است و در صرع لوب گیجگاهی تغییرات زیادی در فعالیت نورون‌های این ناحیه مشاهده می‌شود [۳۷].

هیپوکامپ به عنوان مهم‌ترین کانون ایجاد صرع‌های موضعی پیچیده در انسان شناخته شده است و اکثر دانسته‌های نورومورفولوژیک و الکتروفیزیولوژیک در مورد صرع لوب گیجگاهی بر پایه یافته‌هایی است که از هیپوکامپ به دست آمده است. آسیب نورونی و افزایش تعداد آستروگلیاها (اسکلروزیس هیپوکامپی) تغییرات مورفولوژیکی مهمی هستند که در صرع لوب گیجگاهی مشاهده می‌شود. این تغییرات اکثراً در ناحیه CA1 هیپوکامپ و بخشی از سابیکولوم اتفاق می‌افتد [۳۲]. وجود یک مدار داخلی یک طرفه تحریکی و محدود بودن نورون‌های مهاری در هیپوکامپ، این ناحیه را مستعد تولید فعالیت تشنجی کرده است [۱۶، ۱۸].

به دنبال کیندلینگ ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نورون‌ها در کانون تحریک و نقاطی از مغز که از نظر آناتومیکی دورتر از کانون تحریک هستند ولی ارتباط آناتومیکی نزدیکی با کانون تحریک دارند، تغییر می‌کند. از جمله مهم‌ترین این تغییرات که در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ به دنبال کیندلینگ آمیگدال رخ می‌دهد، تغییر در فعالیت کانال‌های کلسیمی و کانال گیرنده گلوتاماترژیک و به دنبال آن جریان‌های رو به داخلی است که از طریق این کانال‌ها اتفاق می‌افتد [۲۶، ۱۱، ۱۶]. با توجه به اینکه تغییر در فعالیت این کانال‌ها و جریان‌های رو

در پروتکل کلمپ جریان برای اندازه گیری فعالیت برانگیخته غشایی جریان های دپلاریزه کننده (از صفر تا $0/5nA$) و هایپر پلاریزه کننده (از صفر تا $0/5nA$) به صورت امواج مربعی و به مدت ۸۰۰ میلی ثانیه با فواصل $0/1$ نانوامپری به سلول تزریق می شد. در کلمپ ولتاژ، جریان های برانگیخته غشا ثبت می شدند. برای ثبت جریان های روبه داخل، پتانسیل غشا در $65 mV$ - (نزدیک پتانسیل استراحت غشاء) کلمپ شده و سپس پتانسیل های فرمانی از $90 mV$ - تا $40 mV$ + با فواصل 10 میلی ولتی اعمال شد. آنگاه منحنی جریان - ولتاژ را رسم کرده و پیک جریان رو به داخل غشا بررسی شد.

گروه های مورد آزمایش عبارت بودند از:

۱- گروه کنترل: در این گروه فقط جراحی انجام می شد و پس از طی دوره بهبودی، به مدت ۶ روز نگهداری می شدند.

۲- گروه کیندل: در این گروه برای تحریک حیوانات از روش کیندلینگ سریع استفاده می شد. این گروه هر روز ۱۲ تحریک با فواصل ۵ دقیقه دریافت می کردند و این تحریکات تا زمانی که مرحله ۵ را نشان دهند، ادامه می یافت. در این دو گروه با استفاده از پروتکل کلمپ جریان و ولتاژ کمیت های درصد افزایش طول مدت پتانسیل عمل (% Broadening)، مقاومت غشاء ($M\Omega$)، دامنه Post AHP (mV)، تعداد پتانسیل های عمل Rebound و پیک جریان های رو به داخل در ولتاژهای مختلف فرمانی ذکر شده بررسی شدند.

برای تجزیه و تحلیل آماری داده های مربوط از نرم افزار آماری SPSS version 19 و آزمون t-test استفاده شد و $P < 0/05$ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

آنالیز آماری نتایج حاصل از Whole-Cell Patch Clamp نشان داد که کیندلینگ آمیگدال موجب کاهش مقاومت غشا نورونهای هرمی ناحیه CA1 از $1/26 M\Omega \pm 64/74$ در گروه کنترل به $2/42 M\Omega \pm 60/23$ در گروه کیندل شد لیکن این

برای بررسی ویژگی های الکتروفیزیولوژیک و ثبت جریان های رو به داخل سلول های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ از روش Whole-Cell Patch Clamp تحت شرایط کلمپ جریان و ولتاژ استفاده شد.

ثبت الکتروفیزیولوژیک Whole-Cell Patch Clamp

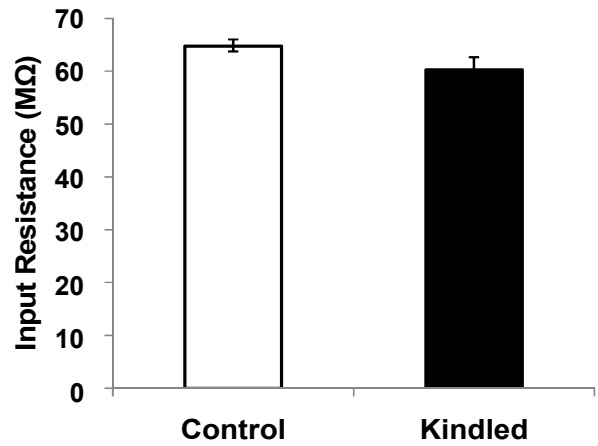
موش های صحرایی که تحریکات کیندلینگ دریافت کرده بودند و وزن آن ها پس از حدوداً دو هفته به $150-120$ گرم افزایش یافته بود با استفاده از اتر بیهوش و سر آنها جدا می شد. برش های عرضی از هیپوکمپ با ضخامت $300 \mu m$ با استفاده از ویبروتوم تهیه می شد. محلول ACSF برش گیری که دارای غلظت کلسیم پایین است حاوی (Mm): Sucrose 206, KCl 2.8, NaH_2PO_4 1.25, $NaHCO_3$ 26, D-Glucose 10, $CaCl_2$ 0.1, MgCl₂ 5 می باشد (pH برابر $7/4$ و اسمولاریته $300 mOsm/kg$) [۳، ۲۹۶]. برش ها در محلول ACSF کربوژنه به مدت یک ساعت در درجه حرارت $32-35$ درجه سانتی گراد انکوبه شده و پس از آن تا هنگام آزمایش در محلول ذکر شده در درجه حرارت اتاق نگهداری می شدند. برش های تهیه شده به محفظه ثبت منتقل می شدند. محفظه ثبت با محلول ACSF استاندارد کربوژنه به طور مداوم با سرعت $1-2$ میلی لیتر در دقیقه پرفیوژ می شد. ACSF استاندارد شامل (Mm): $NaCl$ 126, KCl 2.5, NaH_2PO_4 1.25, $NaHCO_3$ 26, D-Glucose 10, $CaCl_2$ 2, MgCl₂ 1 می باشد [۱۲، ۱۷]. (pH برابر $7/4$ و اسمولاریته $300 mOsm/kg$). الکترودهای مورد استفاده در این ثبت پیپت های شیشه ای از جنس بوروسیلیکات (O.D: 1.5mm, I.D: 0.86mm) بودند. ترکیب محلول داخل پیپت شامل (Mm): $K-methyl$ 135 SO_4 , KCl 1, $MgCl_2$ 1, $ATPMg$ 2, $GTPNa$ 0.4, EGTA 5 و HEPES 10 می باشد [۵، ۱۷، ۱۰]. (pH برابر $7/2$ و اسمولاریته $290 mOsm/kg$). مقاومت پیپت پس از پر شدن با محلول فوق، $5-6 M\Omega$ بود. نوروتهایی که مقاومت سری (Series resistance) پایداری نداشتند و یا بیش از ۱۵٪ تغییر در مقاومت کل غشا داشتند، مورد بررسی قرار نگرفتند. تمام ثبت ها در دمای اتاق ($22-23$) صورت می گرفت. فعالیت خود به خودی و برانگیخته سلول با استفاده از پروتکل کلمپ جریان و ولتاژ ثبت می شد.

داری در گروه کیندل (0.2 ± 0.02 میلی ولت) نسبت به گروه کنترل (2 ± 0.5 میلی ولت) کاهش پیدا کرد ($p < 0.0001$) (شکل‌های B & D).

همچنین، درصد طولانی شدن (% Broadening) طول مدت پتانسیل، که بیانگر تغییر عملکرد کانال‌های یونی رو به داخل و یا رو به خارج است، در پتانسیل‌های عمل برانگیخته حاصل از تزریق جریان‌های دپلاریزه کننده 0.1 تا 0.5 نانومتر با فواصل 0.1 نانوآمپر اندازه گیری شد. نتایج کلمپ جریان نشان داد که درصد طولانی شدن طول مدت پتانسیل عمل در گروه کیندل (145 ± 40) نسبت به گروه کنترل (125 ± 20) افزایش معنی داری ($p < 0.05$) را نشان داد (شکل ۳).

مقایسه درصد افزایش تغییر طول مدت پتانسیل عمل (A) در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل متعاقب تزریق جریان‌های 0.1 تا 0.5 نانو آمپر. * نشان دهنده اختلاف آماری $p < 0.05$ در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل تنها در پاسخ به جریان‌های 0.4 و 0.5 نانو آمپر است ($n=10$).

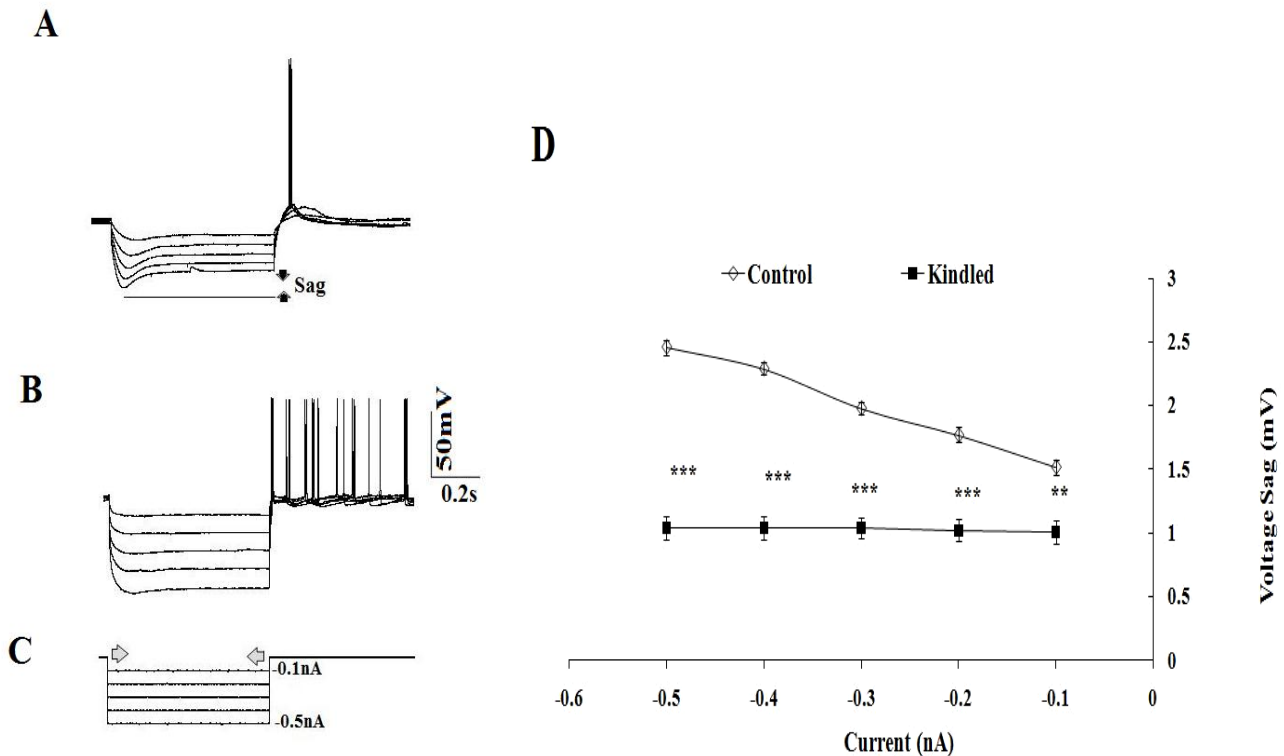
بمنظور مقایسه بهتر تغییر طول مدت، اولین و آخرین



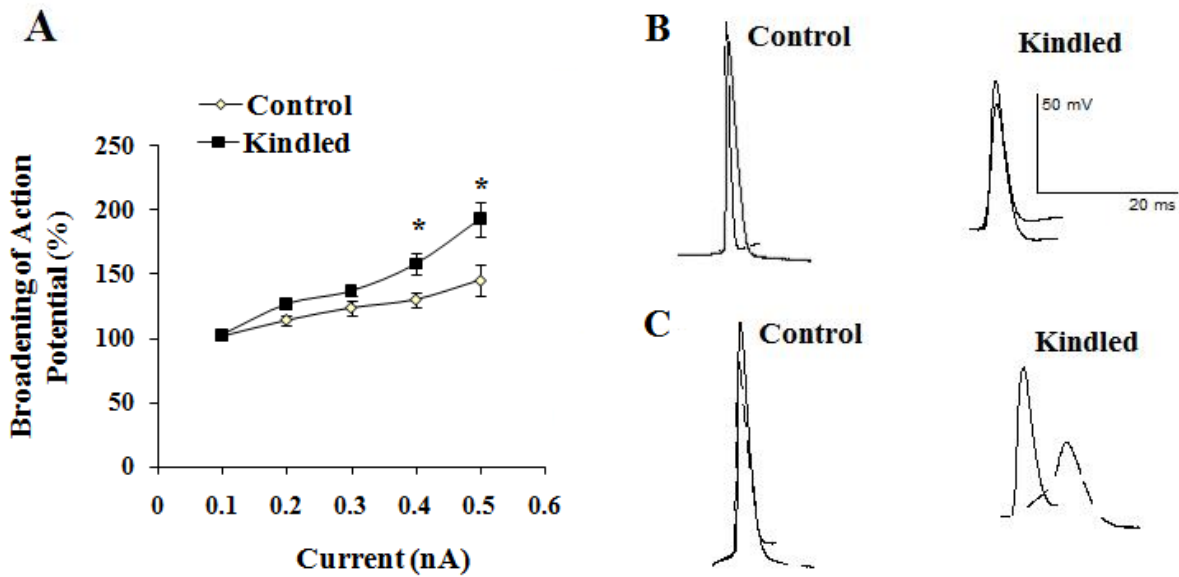
شکل ۱- تأثیر کیندلینگ آمیگدال بر مقاومت غشاء نورونهای هرمی ناحیه CA1. (A) مقایسه آماری تغییر مقاومت غشاء در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل (میانگین \pm خطای معیار).

کاهش از نظر آماری معنی داری نبود ($n=10$) (شکل ۱).

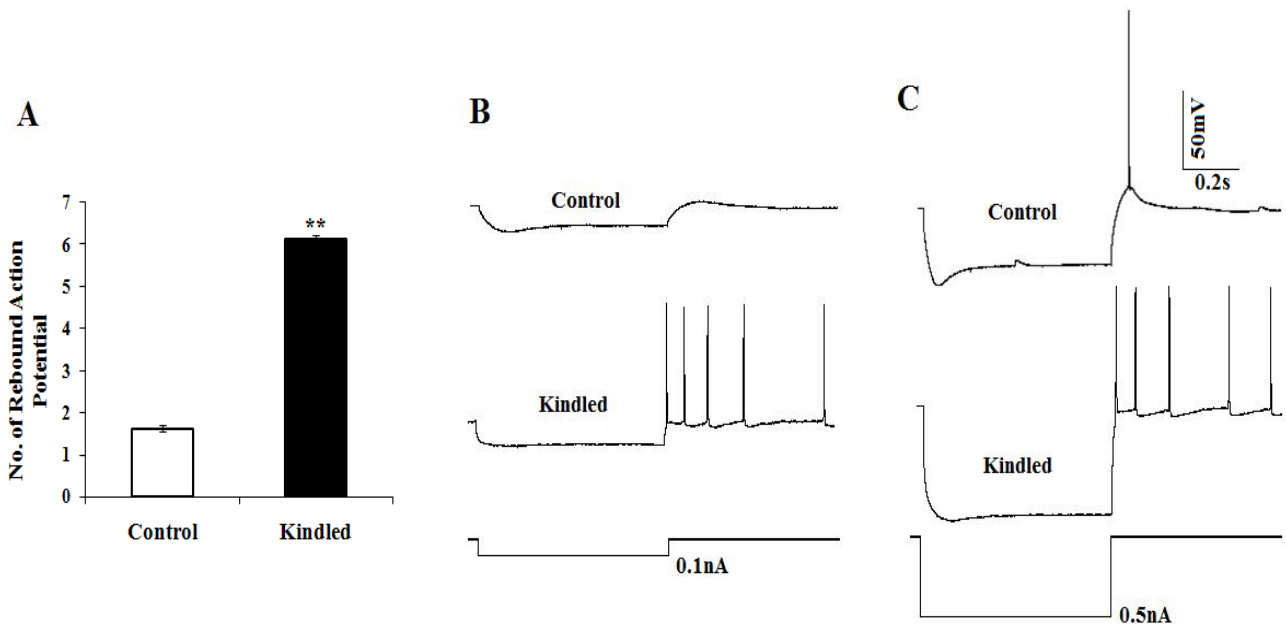
تزریق جریان‌ات هیپرپلاریزه کننده باعث تولید ولتاژ دپلاریزه کننده "Sag" در گروه کنترل شد (شکل‌های C & D & ۲) که با افزایش دامنه جریان تزریق شده، دامنه Sag نیز افزایش می‌یافت. حال آنکه ولتاژ Sag، به طور معنی



شکل ۲- تأثیر کیندلینگ آمیگدال بر ولتاژ دپلاریزه کننده Sag در نورونهای هرمی ناحیه CA1. (A) ایجاد ولتاژ Sag در گروه کنترل و در گروه کیندل (B). نحوه القای ولتاژ Sag با تزریق جریان‌ات هیپرپلاریزه کننده (C). مقایسه آماری تأثیر کیندلینگ بر ولتاژ دپلاریزه کننده در دو گروه کنترل و کیندل شده (***) و **** نشان دهنده اختلاف آماری به ترتیب $p < 0.01$ و $p < 0.001$ نسبت به گروه کنترل است ($n=10$).



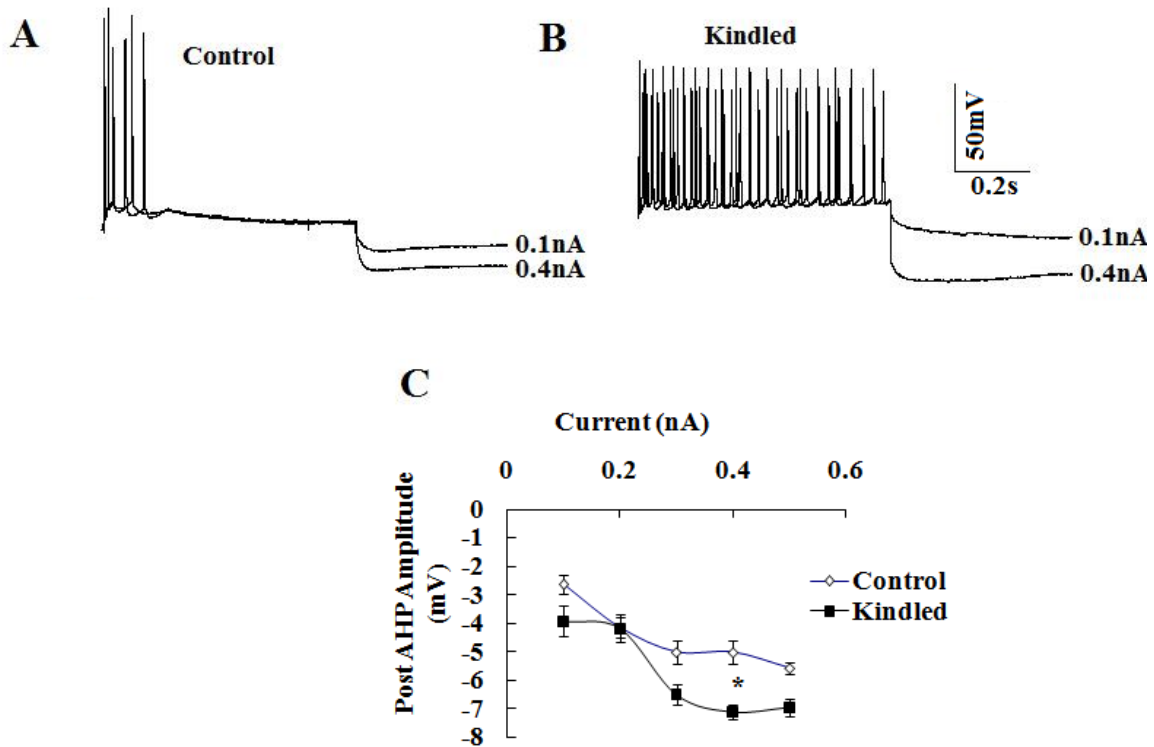
شکل ۳- تغییر طول مدت پتانسیل عمل سلولهای هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ متعاقب کیندلینگ آمیگدال. مقایسه درصد افزایش تغییر طول مدت پتانسیل عمل (A) در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل متعاقب تزریق جریانهای ۰/۱ تا ۰/۵ نانو آمپر. * نشان دهنده اختلاف آماری $p < 0.05$ در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل تنها در پاسخ به جریانهای ۰/۴ و ۰/۵ نانو آمپر است. (n=۱۰). بمنظور مقایسه بهتر تغییر طول مدت، اولین و آخرین پتانسیل عمل تولید شده با جریان ۰/۱ (B) و ۰/۵ نانو آمپر (C) در دو گروه کنترل و کیندل.



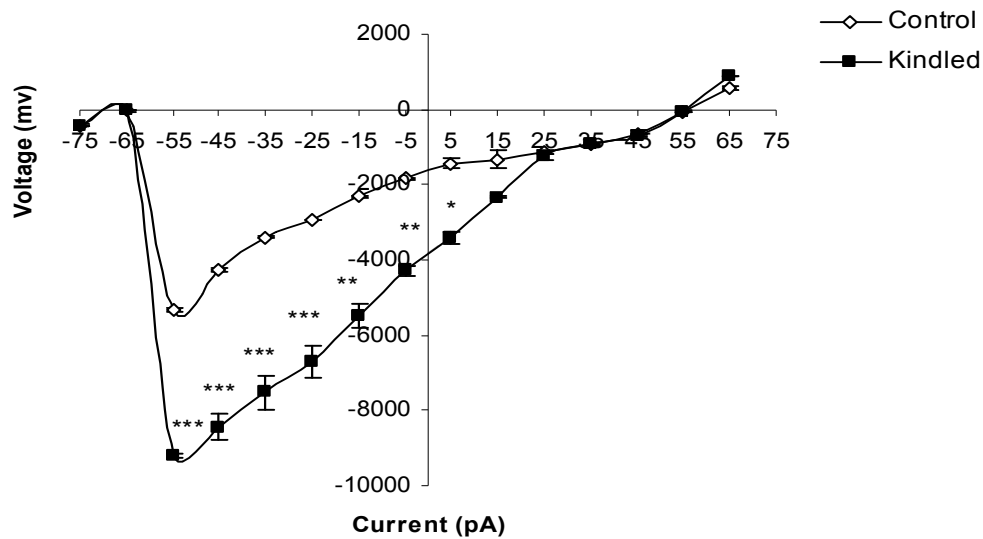
شکل ۴- تأثیر کیندلینگ بر تعداد پتانسیلهای عمل برانگیخته متعاقب خاتمه تزریق جریان هیپریپلاریزه کننده (rebound action potential) تعداد پتانسیل عملهای rebound به دنبال تزریق جریان ۰/۱ نانوآمپر (A) و ۰/۵ نانوآمپر (B) در گروه کیندل و گروه کنترل. مقایسه آماری میانگین تعداد پتانسیل عملهای rebound در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل (C). ** نشان دهنده اختلاف آماری $p < 0.01$ در گروه کیندل در مقایسه با کنترل است. (n=۱۰).

دامنه هایپرپلاریزاسیون متعاقب قطاری از پتانسیلهای عمل برانگیخته (Post AHP) ناشی از تزریق جریانهای دپلاریزه ۰/۱ و ۰/۵ نانوآمپر که بیانگر فعالیت کانالهای پتاسیمی وابسته کلسیمی است نیز در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، لیکن این افزایش تنها پس از تزریق جریان ۰/۴

پتانسیل عمل تولید شده با جریان ۰/۱ (B) و ۰/۵ نانو آمپر (C) در دو گروه کنترل و کیندل. تعداد پتانسیل عملهای rebound نیز به طور معنی داری از 6 ± 1 در گروه کیندل به تعداد 1 ± 1 در گروه کنترل کاهش یافت (شکل ۴).



شکل ۵- تأثیر کیندلینگ بر دامنه Post AHP. نمونه ثبت‌های حاصل از کلمپ جریان ناشی از تزریق جریان‌های ۰/۱ و ۰/۴ نانوامپر در شرایط کنترل (A) و پس از کیندلینگ آمیگدال (B) در سلول هرمی هیپوکامپ. (C) هیستوگرام نشان دهنده تأثیر کیندلینگ بر دامنه Post AHP. *بیانگر اختلاف آماری ($p < 0.05$) گروه کیندل شده نسبت به گروه کنترل.



شکل ۶- منحنی جریان-ولتاژ، افزایش معنی دار جریان‌های رو به داخل (Inward Current) در گروه کیندل شده نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد. *** بیانگر اختلاف معنی دار ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل است.

+۶۵ میلی ولت با فواصل ۱۰ میلی ولتی، جریان رو به داخلی در ولتاژ -۶۵ میلی ولت شروع شد و در -۵۵ میلی ولت به حداکثر میزان خود رسید و این افزایش در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل معنی دار بود ($p < 0.001$) (شکل ۶).

نانوامپر از نظر آماری معنی داری بود ($p < 0.05$) (شکل ۵). کلمپ ولتاژ نیز نشان دهنده تأثیر کیندلینگ آمیگدال بر جریان‌های رو به داخل (Inward Current) بود. پس از کلمپ پتانسیل غشاء در ولتاژ -۹۰ میلی ولت و اعمال ولتاژهای فرمانی از -۹۰ تا

بحث

که به دنبال جریان I_h رخ می‌دهد منجر به دپلاریزاسیون آهسته غشایی و ایجاد ولتاژ Sag می‌شود [۲۲]. مطالعات متعددی نشان دادند که تنظیم کاهشی (down-regulation) جریان I_h موجب کاهش تحریک پذیری نورونی می‌شود [۲۱]. همچنین، Surges و همکاران (سال) نشان دادند که داروی ضد تشنجی Gabapentin از طریق افزایش این جریان و متعاقب آن افزایش ولتاژ Sag اثرات ضد تشنجی خود را می‌گذارد [۲۵]. نتایج تحقیق حاضر نیز که بیانگر کاهش دامنه ولتاژ Sag می‌باشد در راستای مطالعات فوق‌الذکر می‌باشد. از طرف دیگر، بیش از دو دهه از فرضیه نقش مهم جریانات کلسیمی در ایجاد صرع می‌گذرد و بررسی‌های پیشین نشان داده است که جریانات کلسیمی نوع T که در بطور طبیعی در نورونهای ناحیه CA1 هیپوکامپ غالب نیستند بعد از وقوع حالت صرع القاء شده بطور تجربی افزایش می‌یابند. برای فعال کردن جریان T ابتدا با هیپرپلاریزاسیون غشاء می‌بایستی غیرفعال شدن آن حذف شود، آنگاه، با خاتمه تحریک و بازگشت پتانسیل غشاء به سطح استراحت به سرعت فعال شده و موجب بروز پتانسیلهای rebound می‌شود. بر این اساس، با توجه به حذف پتانسیل Sag و افزایش هیپرپلاریزاسیون غشاء در گروه کیندل شده شانس وقوع پتانسیلهای rebound افزایش می‌یابد. بنابراین، افزایش تعداد پتانسیل‌های عمل rebound به دنبال خاتمه تزریق جریان‌های منفی در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل می‌تواند ناشی از افزایش جریان کلسیمی نوع T باشد چون این نوع جریان در کنترل شلیک‌های پیاپی سلول‌های عصبی نقش دارد. در این بررسی نتایج کلمپ ولتاژ نیز نشان داد که جریان رو به داخل سریع در گروه کیندل شده تقویت می‌شود، که احتمالاً از طریق کانالهای سریع کلسیمی واسطه‌گری می‌شود.

همچنین، کیندلینگ آمیگدال موجب افزایش طول مدت پتانسیلهای عمل برانگیخته در قطاری از پتانسیلهای عمل مکرر ناشی از تزریق جریانات دپلاریزه کننده در سلولهای هرمی هیپوکامپ شد. افزایش طول مدت پتانسیل عمل (% Broadening) در برخی از نورون‌های پستانداران از جمله سلول‌های هرمی CA1 هیپوکامپ اتفاق می‌افتد. غیر فعال شدن کانال‌های پتاسیمی دخیل در فاز رپلاریزاسیون پتانسیل عمل از جمله K می‌تواند باعث افزایش طول مدت پتانسیل

در مطالعه حاضر جهت بررسی تغییرات الکتروفیزیولوژیک ناشی از کیندلینگ آمیگدال بر فعالیت برانگیخته نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ، از تکنیک whole cell patch clamp تحت شرایط کلمپ جریان و ولتاژ استفاده شد. نتایج بدست آمده از فعالیت‌های برانگیخته با استفاده از پروتکل کلمپ جریان، بیانگر کاهش مقاومت غشاء در گروه کیندل شده نسبت به گروه کنترل بود. تغییر در مقاومت غشاء می‌تواند نشان دهنده تغییر احتمالی در اندازه و مرفولوژی سلول و یا حاصل تغییر مستقیم کندانانس‌های یونی باشد. فعالیت سلولها وابسته به ترکیبی از کندانانس یونی ذاتی و تعامل با ورودی‌های سیناپسی تحریکی و مهارتی است [۹]. مطالعات نشان می‌دهند که به دنبال کیندلینگ میزان جریان‌های کلسیمی فعال شونده در ولتاژهای پایین (T-type) و جریان‌های فعال شونده در ولتاژهای بالا (L-type) افزایش می‌یابد [۲۹، ۱۱۶]. بر این اساس احتمال داده می‌شود که این جریان‌های تحریکی باعث دپلاریزاسیون آهسته غشاء سلولی و کاهش مقاومت و به دنبال آن افزایش حساسیت نورونی به ورودی‌های سیناپسی تحریکی و مهارتی شود [۱۱]. در این تحقیق، نتایج بدست آمده از فعالیت‌های برانگیخته با استفاده از پروتکل کلمپ جریان، بیانگر کاهش دامنه ولتاژ Sag، افزایش طول مدت پتانسیل عمل، افزایش تعداد پتانسیل‌های rebound و افزایش دامنه Post AHP سلولهای هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه کیندل شده نسبت به گروه کنترل بود.

پتانسیل دپلاریزه کننده Sag حاصل فعالیت کانالهای کاتیونی غیر انتخابی Na^+ و K^+ موسوم به I_h است که در ولتاژهای زیر آستانه فعال است و بر پتانسیل غشاء، آستانه شلیک پتانسیل عمل، الگوی فعالیت الکتریکی و تلفیق سیناپسی اثر می‌گذارد [۲۸]. به عبارت دیگر، این جریان نقش بسیار مهمی در خصوصیات ذاتی غشاء دارد و از آنجاییکه تغییر در خصوصیات ذاتی غشاء می‌تواند منجر به بروز حملات صرعی و تشنج شود، بنابراین تغییر در ویژگی‌های این کانال‌ها و متعاقباً جریان I_h که از طریق آنها صورت می‌گیرد می‌تواند یکی از دلایل اصلی بروز تشنج باشد. تغییر در پتانسیل غشایی

عمل شود [۲]. در نورونهای مختلف این جریان‌های پتاسیمی شامل پتاسیمی تأخیری یکسوساز و غیر فعال شونده سریع هستند. در سلولهای هیپوکامپ پیشنهاد شده جریان پتاسیمی گذرا (IA) مسئول رپلاریزاسیون اسپایک است، بنابراین غیر فعال شدن آن می‌تواند باعث طولانی شدن پتانسیل عمل شود [۲۳]. هرچند بررسی‌های نیز نشان داده‌اند که غیر فعال شدن کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم به ویژه نوع کنداکتانس بالا (BK) نقش دارند. بنابراین، با توجه به افزایش دامنه Post AHP طولانی شدن مدت پتانسیل عمل در این مطالعه احتمالاً می‌تواند ناشی از افزایش جریانات کلسیمی و متعاقب آن فعال شدن کانالهای مذکور است که در گروه کیندل رخ می‌دهد [۲۱]. افزایش فرکانس تحریکات در ضمن کلمپ جریان موجب افزایش ورود کلسیم و متعاقب آن دپلاریزاسیون غشاء و در نتیجه غیر فعال شدن کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم در ضمن پتانسیلهای عمل آخری در یک قطاری از پتانسیلهای عمل می‌شود. همچنین افزایش فعالیت کانال‌های کلسیمی LVA و HVA می‌تواند باعث افزایش دامنه AHP در گروه کیندل شود [۱۹].

نتایج بدست آمده از ثبت جریان روبه داخل با استفاده از پروتکل کلمپ ولتاژ، افزایش جریان‌های رو به داخل (Inward Currents) را در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. با توجه به فعال شدن جریان رو به داخل در ولتاژ ۶۵- میلی ولت و رسیدن آن به حداکثر میزان خود در ولتاژ ۵۵- میلی ولت به نظر می‌رسد که این جریان احتمالاً به میزان زیادی از طریق کانالهای کلسیمی نوع سریع و زودگذر باشد، هرچند این احتمال نیاز به بررسی‌های بیشتر با استفاده از مهار کننده‌های کانال‌های یونی وابسته به ولتاژ نوع T و نیز ایزوله کردن جریان از سایر جریانات یونی دارد.

کلسیم یک پیامبر ثانویه است که نقش مهمی در تنظیم تحریک پذیری نورونی دارد و یا به طور مستقیم از طریق دپلاریزاسیون غشا و یا غیرمستقیم از طریق تغییر در آستانه شلیک پتانسیل عمل و یا تغییر در فرکانس شلیک پتانسیل

عمل می‌تواند روی تحریک پذیری نورونی اثر بگذارد. مطالعات نشان می‌دهند که جریان‌های کلسیمی سلول‌های CA1 هیپوکامپ می‌توانند در مدل تشنجی کیندلینگ نقش داشته باشند و به دنبال کیندلینگ میزان جریان‌های کلسیمی فعال شونده در ولتاژهای پایین (T type) و جریان‌های فعال شونده در ولتاژهای بالا (L type) افزایش می‌یابد و این افزایش به دلیل کوتاه شدن زمان غیر فعال شدن کانال است [۳۰].

همچنین مشخص شده که فعالیت کانال‌های نوع L در شکل‌گیری LTP نقش دارد و با توجه به این که تشابه زیادی بین LTP و کیندلینگ وجود دارد (از جمله اینکه فرکانس‌های تحریکی که باعث ایجاد LTP می‌شوند مشابه فرکانس‌هایی هستند که برای ایجاد کیندلینگ لازم است و هر دو پدیده منجر به افزایش پاسخ دهی نورون‌ها به صورت دراز مدت می‌شود) و از آنجایی که LTP به عنوان یکی از مکانیسم‌های سلولی ایجاد کیندلینگ مطرح شده است، لذا افزایش فعالیت کانال‌های نوع L به دنبال کیندلینگ احتمال وقوع تخلیه‌های متعاقب و بروز تشنج را افزایش می‌یابد [۲۹].

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد که کیندلینگ آمیگدال با تغییر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک به ویژه از طریق افزایش جریان‌های رو به داخل در نورون‌های هر می ناحیه CA1 هیپوکامپ باعث افزایش تحریک پذیری این نورون‌ها می‌شود.

سپاسگزاری

هزینه انجام تحقیق حاضر توسط صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری تأمین گردیده است و بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از ریاست محترم صندوق اعلام می‌دارند. محل انجام تحقیق مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

References

- [1] Bausch SB, Axonal sprouting of GABAergic interneurons in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 7 (2005) 390-400.
- [2] Bean BP, The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews* 8 (2007) 451-465.
- [3] BECK H, STEFFENS R, HEINEMANN U, ELGER CH, Ca1, 2-Dependent Inactivation of High-Threshold Ca21 Currents in Hippocampal Granule Cells of Patients With Chronic Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurophysiol* 82 (2011) 946-954.
- [4] Bender RA, Baram TZ, Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Progress in Neurobiology* 86 (2008) 129-140.
- [5] Esclapez M, Hirsch JC, Khazipov R, Ben-Ari Y, Bernard C, Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *J Neurobiol* 94 (1997) 12151-12156.
- [6] Faas GC, Vreugdenhilm M, Wadman WJ, Calcium currents in pyramidal CA1 neurons in vitro after kindling epileptogenesis in the hippocampus of the rat. *J Neurosci* 75(1996) 57-67.
- [7] Funahashi M, Mitoh Y, Kohjitani A, Matsuo R, Role of hyperpolarization-activated cation current (I_h) in pacemaker activity in area postrema neurons of rat brain slices. *J Physiol* 1 (2003)135-148.
- [8] Jung S, Jones TD, Lugo JN, Sheerin AH, Miller JW, Ambrosio R, Anderson AE, Poolos NP, Progressive dendritic HCNchannelopathy during epileptogenesis in the rat pilocarpine model of epilepsy. *J Neurosci* 27 (2007) 13012-13021.
- [9] Kaczmarek LK, Levitan IB, Neuromodulation: the biochemical control of neuronal excitability: *Oxford University Press*, USA, 1987.
- [10] Khazipov R, Khalilov L, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes G, Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *J Neurosci* 19 (2004) 590-600.
- [11] Lacinova L, Moosmang S, Langwieser N, Hofmann F, Kleppisch T, Ca1.2 calcium channels modulate the spiking pattern of hippocampal pyramidal cells. *Life Sciences* 82 (2008) 41-49.
- [12] Liu X, Stan Leung L, Partial hippocampal kindling increases GABAB receptor-mediated postsynaptic currents in CA1 pyramidal cells. *Epilepsy Research* 57 (2003) 33-47.
- [13] Madison DV, Nicoll RA, Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J physiology* 354 (1984) 319-331.
- [14] McNamara JO, Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 14 (1994) 3413-3425.
- [15] Peterson SL, Albertson TE, Neurotransmitter and neuromodulator function in the kindled seizure and state. *Prog Neurobiol* 19 (1982) 237-270.
- [16] Pritchard TC, Alloway KD, Limbic system, In: Medical neuroscience, Madison: Fence creek. (1999) 369-390.
- [17] Qi J, Yao J, Cheng F, Luscher B, Chen G, Downregulation of tonic GABA currents following epileptogenic stimulation of rat hippocampal cultures. *J Physiology* 577 (2006) 579-590.
- [18] Racine R, Rose PA, Burnham WM, Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *CJNS* 4 (1977) 273-278.
- [19] Sanabria ERG, Hailing S, Yaari Y, Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* 532 (2001) 205-216.
- [20] Sarkisian MR, Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders. *Epilepsy Behav* 2 (2001) 201-216.
- [21] Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X, Johnston D, Seizureinduced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neurons* 44 (2004) 495-508.
- [22] Simeone T.A, Rho J.M, Baram T.Z, Single channel properties of hyperpolarization-activated cation currents in acutely dissociated rat hippocampal neurons. *J Physiol* 2 (2005) 371-380.
- [23] Storm JF, Intracellular injection of a Ca²⁺ chelator inhibits spike repolarization in hippocampal neurons. *Brain Res* 435 (1987) 387-392.
- [24] Su H, Sochivko D, Becker A, Chen J, Jiang Y, Yaari Y, Beck H, Upregulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci* 22 (2002) 3645-3655.
- [25] Surges R, Freiman T.M, Feuerstein T.J. Gabapentin Increases the Hyperpolarization-activated Cation Current

- Ih in Rat CA1 Pyramidal Cells. *Epilepsia* 2 (2003) 150-156.
- [26] Ueda Y, Tsuru N, Simultaneous monitoring of the seizure related changes in extracellular glutamate and γ -aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res* 20 (1995) 213-219.
- [27] Ure JA, Perassolo M, Update on the pathophysiology of the epilepsies. *J Neurol Sci* 117 (2000) 1-17.
- [28] Van Welie I, van Hooft JA, Wadman WJ, Homeostatic scaling of neuronal excitability by synaptic modulation of somatic hyperpolarization-activated Ih channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 14 (2004) 5123-5128.
- [29] Vreugdenhil M, Wadman WJ, Enhancement of calcium currents in rat hippocampal CA1 neurons induced by kindling epileptogenesis. *Neuroscience* 49 (1992) 373-381.
- [30] Vreugdenhil M, Wadman WJ, Kindling-induced long-lasting enhancement of calcium current in hippocampal CA1 area of the rat: relation to calcium-dependent inactivation. *Neuroscience* 59 (1994) 105-114.
- [31] Wasterlain CG, Farber DB, Fairchild D, Cholinergic kindling: What has it taught us about epilepsy? 63 (1985) 119-132.
- [32] Watson C, Hippocampal sclerosis and the syndrome of medial temporal lobe epilepsy. *Expert Review of Neurotherapeutics* 3 (2003) 821-828.
- [33] Wellmer J, Su H, Beck H, Yaari Y, Long-lasting modification of intrinsic discharge properties in subicular neurons following status epilepticus. *Eur J Neurosci* 16 (2002) 259-266.
- [34] Womack MD, Khodakhah K, Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, 14 (2004) 3511-3521.
- [35] Yaari Y, Yue C, Su H, Recruitment of apical dendritic T-type Ca^{2+} channels by backpropagating spikes underlies de novo intrinsic bursting in hippocampal epileptogenesis. *J Physiol* 15 (2007) 435-450.
- [36] Zhang K, Peng B, Sanchez R.M. Decreased IH in Hippocampal Area CA1 Pyramidal Neurons after Perinatal Seizure-inducing Hypoxia. *Epilepsia* 6 (2006) 1023-1028.
- [37] Zhang SH, Sun HL, Fang Q, Zhong K, Wu DC, Wang S, Chen Z, Low-frequency stimulation of the hippocampal CA3 subfield is anti-epileptogenic and anti-ictogenic in rat amygdaloid kindling model of epilepsy. *Neurosci Lett* 455 (2009) 51-55.