اثر داروی صرع‌زای پنتیلن تترازول بر جریانهای یونی نورون D5 حلزون باغی با استفاده از روش ثبت داخل سلولی

مهین گنج خانی .M.Sc☆، مهیار جان احمدی .Ph.D★♦، هادی فتحی مقدم .Ph.D★، سکینه عمرانی .M.Sc★
روح الله فردوسی .D.V.M★

☆ دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب

★ دانشگاه علوم پزشکی اهواز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، آموزش دانشگاه

♦آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی ۱۸۱-۱۹۸۳۵،دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه فیزیولوژی

چکیده

* **هدف:** بررسی اثر داروی صرع زای پنتیلن تترازول (PTZ: Pantelentetrazol) بر جریانهای یونی رو به داخل و رو به خارج کاتیونی در نورون D5 حلزون باغی *Helix aspersa*

* **مواد وروشها:** آزمایشها روی سلول D5 واقع در گانگلیون پاریتال چپ حیوان انجام شد. با استفاده از روش ثبت داخل سلولی دو میکروالکترودی (Two electrode voltage clamp) جریانهای یونی رو به داخل و رو به خارج کاتیونی غشا ثبت گردیده و خصوصیت جریانهای یونی در شرایط صرع با استفاده از کاربرد خارج سلولی داروی صرع زای پنتیلن تترازول (۲۵ میلی مولار) مورد بررسی قرار می گرفت.

* **یافته‌ها:** کاربرد PTZ (۲۵ میلی مولار) به صورت خارج سلولی، بلافاصله موجب افزایش شلیک پتانسیلهای عمل خود به خودی شد و ۴ تا ۷ دقیقه بعد تغییرات شدید ساختاری در پتانسیل عمل سلول ، D5 ایجاد شد. حداکثر جریان رو به داخل ۷ دقیقه پس از افزودن PTZ۱۶/۵ در صدکاهش یافت و ولتاژ آن ۲۳/۱۸ درصد به سمت ولتاژهای منفی شیفت نمود.همچنین حداکثر جریان رو به خارج ۶/۷۵ در صدکاهش نشان داد.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این بررسی نشان می‌دهد که پنتیلن تترازول با اثر بر ویژگیهای بیوالکتریک سلول موجب افزایش تحریک پذیری آن می‌شود. همچنین با اثر بر جریانهای یونی روبه داخل و رو به خارج غشا موجب بروز صرع می‌شود.

گل واژگان: صرع، پنتیلن تترازول، ثبت داخل سلولی، حلزون باغی

مقدمه

صرع یکی از شایعترین بیماریهای سیستم اعصاب است، به طوری که ۵۰ میلیون نفر در دنیا، به این بیماری مبتلا هستند (۱). با این حال، تاکنون درمان اساسی و قاطعی در مورد آن انجام نشده است.به منظور دست‌یابی به راه‌حل اساسی برای درمان صرع، پایستی تحقیقاتی را در سطح سلولی انجام داد و مشخص نمود که چرا شلیکهای منظم و طبیعی سلول به امواج انفجاری[1] و تشنجی تبدیل می‌شوند و اختلاف اصلی بین نورونهای طبیعی و نورونهایی که تخلیه‌های تشنجی دارند، چیست و چه وقایع درون سلولی در حین تشنج اتفاق می‌افتد.

یافته‌های قبلی نشان می‌دهد که همزمان با ظهور امواج تشنجی در الکتروانسفالوگرام قشر مغز پستانداران، تغییر پتانسیلی در غشای سلولها به صورت دپلاریزاسیونهای بزرگ و ناگهانی، همراه باگروهی از امواج نیزه‌ای ایجاد می‌شود که آنها را امواج انفجاری و یا PDS[2] می‌نامند (۳،۲).

نکته جالب توجه آن است که این امواج انفجاری را نه فقط در قشر مغز پستانداران، بلکه در نورونهای ویژه‌ای در گانگلیونهای حلزون هم می‌توان با استفاده از داروی صرع زای PTZ به صورت خارج سلولی القا نمود (۳، ۴). سیستم عصبی این حیوان با وجود سادگی نسبی، اطلاعات مهمی در مورد عملکرد دستگاه عصبی پیچیده‌تر پستانداران در اختیار ما قرار می‌دهد. اصولاً عملکرد سیستم عصبی بی‌مهرگان و مهره‌داران شبیه یکدیگر است؛ بدین ترتیب که هردو دارای گیرنده‌های حسی، شبکه عصبی مرکزی، خروجیهای حرکتی و مجموعه مشابهی از نوروترانسمیترها هستند.به همین دلیل و نیز به علت مزایای تکنیکی دیگر از سیستم عقصبی بی مهرگان به عنوان مدلهای بیولوژیک استفاده می‌شود (۵).

تاکنون چندین مکانیسم در مورد علت صرع‌زایی PTZ از جمله اثر روی کانالهای وابسته به ولتاژ، لیگاند، پمپهای یونی و آنزیمها ذکر شده است. اما محل و مکانیسم عمل صرع زایی این دارو هنوز به خوبی شناخته نشده است (۶).

اولین قدم در تحقیق حمله‌های صرعی، روشن کردن نقش کلسیم داخل سلولی در طی امواج انفجاری در نورونهای حساس به PTZ است. مطالعات چندسال اخیر، تغییر غلظت کلسیم آزاد داخل سلولی و نحوه توزیع کلسیم به دنبال تجویز PTZ، همچنین تشابه عملکرد دو داروی ضد صرع با آنتاگونیستهای آلی کلسیم (۷) و نیز اثر مسدود کننده‌های کانال کلسیمی در تخلیه‌های صرعی (۸) را نشان داده است.

Wiemann و همکارانش (۹) نشان دادند که وراپامین به‌عنوان مسدودکننده اختصاصی کانال کلسیمی نوع L، اثر ضد صرعی بر نورونها اعمال می‌کند.

از سوی دیگر؛ برخی محققین نقش احتمالی کانالهای پتاسیم در صرع زایی را مورد بحث قرار داده‌اند. بعضی از مطالعات انجام شده دراین رابطه نشان داده است که:

۱- مهارکننده‌های جریان پتاسیم، مواد تشنج زای موثری هستند (۱۰) و استفاده از این مواد در حیوانات آزمایشگاهی یا برشهای هیپوکامپ، سبب تخلیه‌های تشنجی طولانی مدت می‌شود (۱۱).

۲- کاهش در هدایت پتاسیمی منجر به تولید شلیکهای نورونی می‌شود (۱۲).

۳- بازکننده‌های کانال پتاسیمی در کاهش فعالیتهای صرعی نقش دارند (۱۳).

۴- بیان ژن مربوط به کانال پتاسیمی، به دنبال فعالیت تشنجی تغییر می‌کند (۱۴).

به این ترتیب، با توجه به نقش جریانهای پتاسیم وابسته به کلسیم و وابسته به ولتاژ، در کنترل تحریک پذیری نورونی، تغییر این جریانهای غشایی ممکن است در ایجاد صرع دخالت داشته باشد (۳) بنابراین انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری است.

به این ترتیب، با توجه به شواهد فوق و بادرنظرگرفتن اینکه علیرغم استفاده وسیع PTZ در مدلهای حیوانی به منظور القای صرع، مکانیسم اثر سلولی آن هنوز به درستی روشن نیست، برآن شدیم تابه بررسی مکانیسم اثر PTZ بویژه تأثیر آن بر خصوصیات الکتروفیزیولوژیک جریانات یونی رو به داخل و رو به خارج بپردازیم.

مواد و روشها

در این مطالعه، آزمایشها روی جسم سلولی نورون D5 جدا شده از گانگلیون پاریتال چپ حلزونهای باغی[3] با وزن‌تقریبی ۴/۷-۶ گرم انجام گرفت. حلزونها از منطقه شمال ایران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. حیوانات در شرایط زیستی مناسبی از لحاظ نور، دسترسی به غذا و آب و درجه حرارت مناسب (۲۳- ۲۰ سانتی‌گراد) نگهداری شدند. کلیه آزمایشها روی گانگلیون زیر مری حیوان انجام می‌شد. گانگلیون بعداز خارج شدن از سر حیوان، در محلول رینگر مخصوص و در درجه حرارت اتاق در محفظه ثبت داخل سلولی که کف آن با Sylgard(Dow corning, USA) 184 پوشیده شده بود، به وسیله سوزنهای ظریف ثابت شد (۱۵). بافتهای پیوندی اطراف سلولها در زیر میکروسکوپ تشریح و بدون استفاده از آنزیمهای پروتئولیتیک و باکمک پنسهای بسیار ظریف برداشته شد. با آشکار شدن سلولها از چندین شاخص برای شناسایی سلول D5، مانند محل قرار گرفتن سلول، اندازه، رنگ، موقعیت آن نسبت به اعصاب و فعالیت الکتریکی استفاده شد. ثبت داخل سلولی با استفاده از دو میکروالکترود با مقاومت تقریبی ۹-۵ مگااهم انجام گرفت. میکروالکترودها از لوله‌های موئینه بروسیلیکات دارای فیلامان داخلی (Clark electromedical instruments, UK) تهیه شدند. یکی از میکروالکترودهابه منظور تزریق جریان (میکروالکترود ۲ با HG=۱) و میکروالکترود دیگر به منظور ثبت ولتاژ (میکروالکترود ۱ با HG =۰/۱) به کار رفت که هر یک درون نگهدارنده‌های Perspex مجزایی قرار گرفته و مستقیما به پری آمپلی فایر[4] متصل شدند. در داخل میکروالکترود شیشه‌ای، سیم نقره‌ای به

1. Bursting Activity
2. Par- oxysmal Depolarization Shift
3. Iranian garden snail
4. Headstage snail

قطر ۰/۴ میلی‌متر قرار داده می‌شد که بخشی از آن پوشش Ag/AgCl داشت. میکروالکترودهای شیشه‌ای با محلول کلرید پتاسیم ۳ مولار پر شده و به آمپلی فایر Axoclamp 2B (Axon Instraments,Inc) متصل شدند. الکترود دیگری به نام الکترود مرجع (پل آگاری)، حاوی کلرید پتاسیم ۳ مولار و آگار حل شده در رینگر استاندارد در خارج سلول و نزدیک گانگلیون قرار گرفت. به کمک آمپلی فایر مزبور و با به‌کارگیری برنامه پالس، جریان معینی به داخل سلول تزریق یا ولتاژ غشا در سطح معینی کلامپ شد. سپس پاسخ غشای سلول، به صورت تغییرات ولتاژ یا تغییرات جریان با استفاده از یک مبدل آنالوگ به دیجیتال (A/D) و دیجیتال به آنالوگ (D/A) به‌صورت داده‌های رقمی درآمد و در یک کامپیوتر از نوع پنتیوم ذخیره و در نهایت با به‌کارگیری برنامه نرم‌افزاری Analyse تجزیه و تحلیل شد.

* روشهای الکتروفیزیولوژی

روش جریان کلامپ

ابتدا فعالیت خود به خودی سلول در رینگر استاندارد ثبت و سپس پروتکل کلامپ جریان اجرا شد؛ به این ترتیب که جریانهای دپلاریزه و هیپرپلاریزه از ۱+ تا ۱۰+ نانوآمپر و از ۱- تا ۱۰- نانوآمپر هر یک به مدت ۴۵۰ میلی ثانیه به سلول تزریق، پاسخهای برانگیخته غشایی ثبت و سپس ویژگیهای پتانسیل عمل بررسی شد.

روش ولتاژ کلامپ

با استفاده از این روش ویژگیهای بیوفیزیکی و الکتروفیزیولوژیک جریانهای رو به داخل و رو به خارج غشای جسم سلولی نورون D5 مطالعه شد. دراین بررسی از ولتاژ کلامپ دو الکترودی استفاده شد. پروتکل مورد نظر به این ترتیب بود که پتانسیل غشا به فواصل ۱۰ میلی‌ولتی به مدت ۴۵۰ میلی‌ثانیه از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- تا پتانسیل ۵۰+ با فواصل ولتاژی ۱۰ میلی ولت دپلاریزه شد.

* محلول مورد استفاده در آزمایش

ترکیب رینگر استاندارد خارج سلولی بر حسب میلی‌مولار به‌صورت 80 NaCl, 10 $CaCl_2$, 5 $MgCl_2$, 4 KCl ,10 glucose, 5 HEPES[1] فوق بود (۱۵). اسمولاریته محلولها به کمک اسمومتر (Osmomat 030, Gonotec Co) اندازه‌گیری شد.

اسمولاریته محلولهای مورد آزمایش ۲۰۶ - ۲۰۲ میلی اسمول بر کیلوگرم آب بود. pH محلولهای مورد استفاده نیز به کمک Trizma hydrochloride و Trizma base در حد ۷/۸-۷/۶ تنظیم شد.

آزمایشها در دو مرحله طراحی شد. در مرحله نخست پروتکلهای کلامپ جریان و کلامپ ولتاژ روی جسم سلولی نورون D5 در محیط رینگر استاندارد انجام و ثبت شد. در مرحله دوم، محلول رینگر محتوی PTZ با غلظت ۲۵ میلی مولار (۱۶) پرفیوز شده و مجدداً ثبت انجام گرفت.

* روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از ولتاژ کلامپ به کمک نرم افزار Analyse در محیط Matlab بررسی شد و مجدداً از برنامه Excel برای محاسبه میانگین، انحراف معیار داده‌ها و رسم منحنی‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد ارائه شدند.

یافته‌ها

* نتایج کلامپ جریان

ابتدا از جسم سلولی ۲۷ نورون D5 حلزون باغی در رینگر استاندارد ثبت داخل سلولی به عمل آمد. بدین ترتیب که ابتدا فعالیت خود به خودی سلول ثبت شد. سپس جریانهای دپلاریزه کننده و هیپرپلاریزه کننده (۱۰-۱ نانوآمپر) به مدت ۴۵۰ میلی ثانیه توسط یکی از میکروالکترودها به داخل سلول تزریق شده و تغییرات ولتاژ توسط میکروالکترود دیگر ثبت شد. در شکل ۱ (A-C) پتانسیلهای برانگیخته سلول پس از تزریق ۱، ۵ و ۱۰ نانوآمپر به داخل سلول نشان داده شده است.

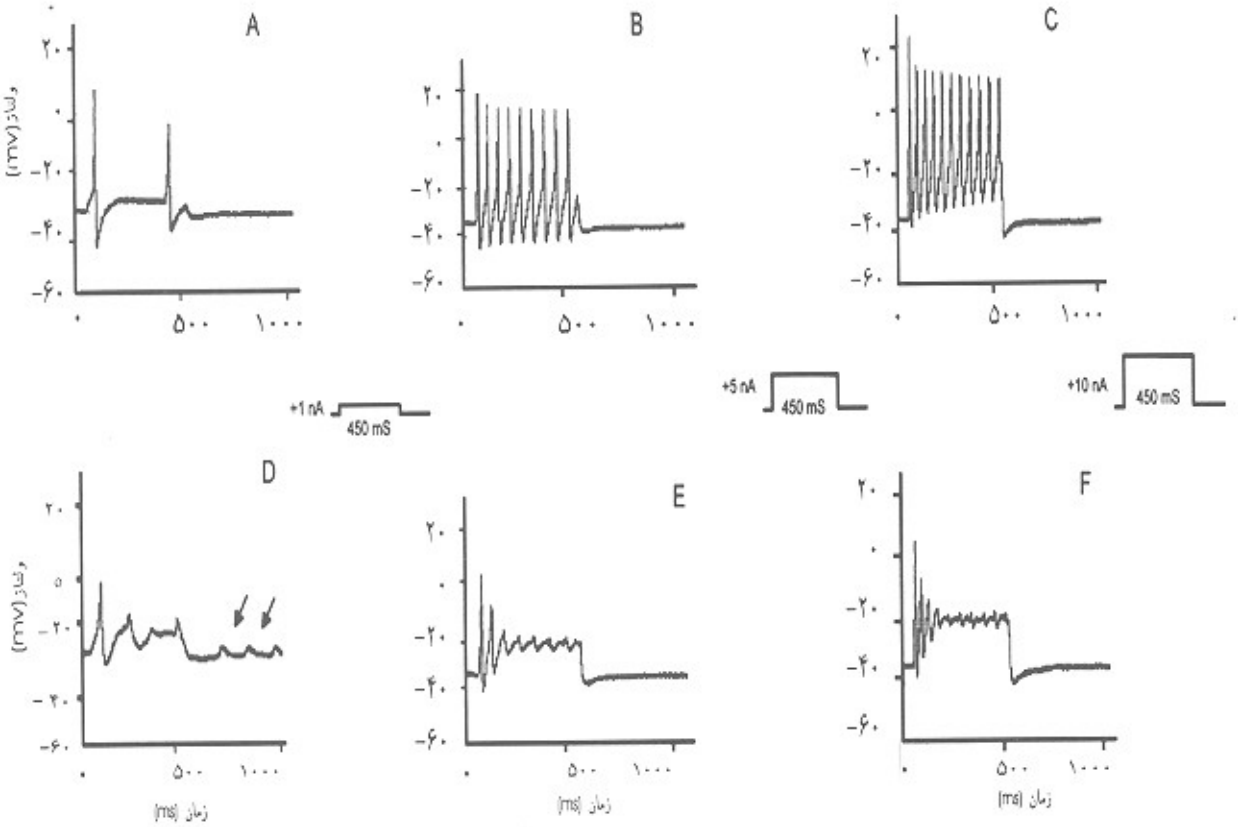
پس از مطالعه فعالیت خود به خودی سلول و نیز تاثیر جریانهای دپلاریزه کننده بر فعالیت بیوالکتریک سلول D5 به منظور حصول اطمینان از سالم بودن سلول، اثر داروی صرع زای پنتیلن تترازول (PTZ) بر ویژگیهای الکتریکی سلول بررسی شد.

کاربرد PTZ (با غلظت ۲۵ میلی مولار) به صورت خارج سلولی، بلافاصله موجب افزایش شلیک پتانسیلهای عمل خودبخودی شده و ۴ تا ۷ دقیقه بعد، تغییرات شدید ساختاری در پتانسیل عمل خود به خودی سلول D5 ایجاد نمود. شکل ۱ (D-F) تغییرات ایجاد شده در پتانسیلهای برانگیخته سلول به دنبال تزریق جریانهای ۱، ۵ و ۱۰ نانو آمپر را در حضور PTZ نشان می‌دهد.

جدول ۱: بررسی ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک جریانهای رو به داخل و رو به خارج در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی ولت در رینگر استاندارد، ۳ دقیقه بعد از اضافه کردن پنتیلن تترازول ۲۵ میلی مولار

	رینگر استاندارد	رینگر استاندارد+PTZ
آستانه جریان (mV)	-۶/۳۷±۴/۴۱	-۴۱/۴±۸۰/۲۲
ولتاژ حداکثر جریان رو به داخل (mV)	-۶/۳۷±۴/۴۱	-۷/۹۱±۳/۴۴
میزان حداکثر جریان رو به داخل (nA)	-۴/۶±۰/۸۲	-۳/۷۶±۰/۸۱
ولتاژ حداکثر جریان رو به خارج (mV)	۴۳/۴۵±۱/۴۶	۴۰/۲۳±۲/۷۸
میزان حداکثر جریان رو به خارج (nA)	۴/۳۶±۰/۷۴	۴/۲۳±۰/۹۶

1-(N-[2-Hydroxyethyl].piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])



شکل ۱: فعالیت الکتریکی برانگیخته شده سلول پس از تزریق جریانهای دپلاریزه ۰.۱، ۵ و ۱۰ نانوآمپر در رینگر استاندارد: (A-C) و ۵ دقیقه پس از به کار بردن PTZ: (D-F) علامت فلش نشان دهنده بروز EPSP به دنبال PTZ است که به دلیل افزایش تحریک پذیری سلول رخ می‌دهد.

* نتایج کلامپ ولتاژ

با روش ثبت داخل سلولی کلامپ ولتاژ، جریانهای یونی غشای جسم سلولی نورون D5 در رینگر استاندارد ثبت شد (جدول ۱ و ۲).

شکل A-۲ جریانهای رو به داخل[1] و رو به خارج[2] حاصل از دپلاریزاسیون غشا توسط پتانسیلهای فرمانی[3] از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی ولت و در محدوده ولتاژهای ۴۰- تا ۵۰+ میلی ولت در مراحل ۵۰۰ میلی ثانیه را در رینگر استاندارد نشان می‌دهد. شکل B-۲ نشان دهنده ارتباط ولتاژ - جریان[4] ثبت شده از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی ولت است.

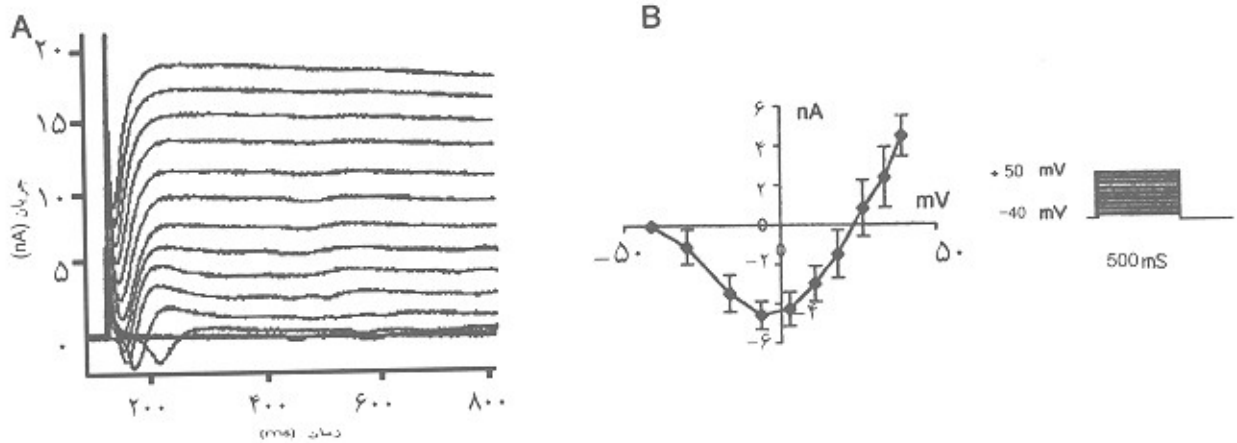
ثبت جریانهای رو به داخل و رو به خارج از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی ولت نشان می‌دهد که به ترتیب متوسط حداکثر جریان رو به داخل و ولتاژ آن ۰/۹۱±۳/۹۸- نانوآمپرو ۴/۲۴±۸/۶۷- میلی ولت است و متوسط حداکثر جریان رو به خارج و ولتاژ آن، به ترتیب ۱/۰۳±۶/۸۱ نانوآمپر و ۱/۱۵±۳۹/۸ میلی ولت است (جدول ۲).

شکل (A-۳) نشان دهنده جریانهای رو به داخل و رو به خارج حاصل از دپلاریزاسیون غشا در رینگراستاندارد محتوی PTZ (۲۵ میلی مولار) بعد از ۷ دقیقه است. شکل B-۳ رابطه ولتاژ- جریان در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی ولت تحت این شرایط را نشان می‌دهد.

جدول ۲: بررسی ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک جریانهای رو به داخل و رو به خارج در پتانسیل نگهدارنده ۴۰mV- در رینگر استاندارد، ۷ پس از اضافه کردن PTZ ۲۵ میلی مولار

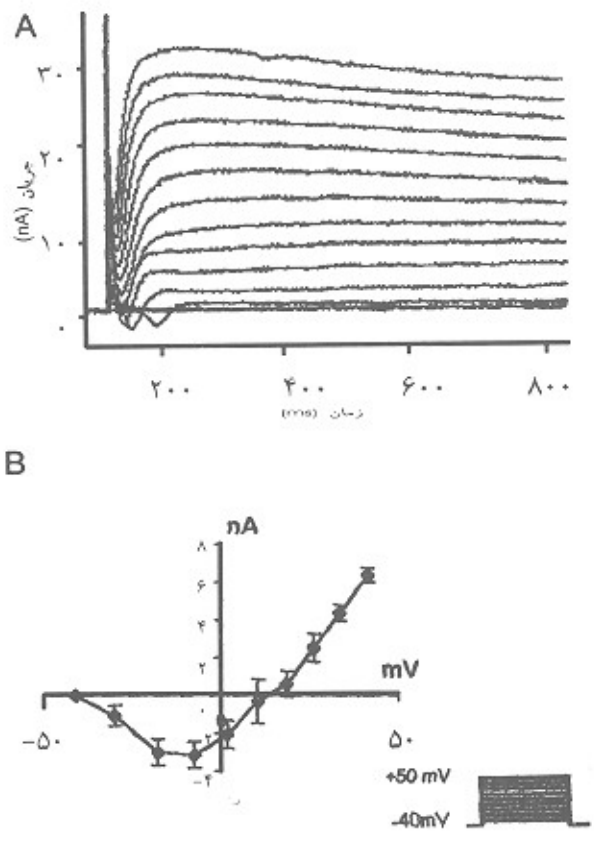
	رینگراستاندارد	رینگراستاندارد+PTZ
آستانه جریان (mV)	۰/۵±۴۰/۹۸-	۰/۱۴±۴۰/۹۶-
ولتاژ حداکثر جریان رو به داخل (mV)	۴/۲۴±۸/۶۷-	۴/۰۵±۱۰/۶۸-
میزان حداکثر جریان رو به داخل (nA)	۸۰/۹۱±۳/۹-	۰/۶۴±۳/۳۲-
ولتاژ حداکثر جریان رو به خارج (mV)	۱/۱۵±۳۹/۸	۱/۰۴±۴۱/۴۳
میزان حداکثر جریان رو به خارج (nA)	۱/۰۳±۶/۸۱	۰/۳۷±۶/۳۵

1. Inward current
2. Outward currents
3. Command potentials
4. I-V Relationship



شکل ۲: جریانهای رو به داخل و رو به خارج حاصل از دپلاریزاسیون غشای جسم سلولی نورون DS، از پتانسیل ۴۰- تا ۵۰+ میلی ولت در مراحل ۱۰ میلی ولت به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه در رینگر استاندارد: (A). ارتباط ولتاژ - جریان (Mean±SEM) جریانهای رو به داخل و رو به خارج در پتانسیلهای فرمانی مختلف از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- تا ۵۰+ میلی ولت: (B).

متوسط حداکثر جریان رو به داخل و ولتاژ آن در حضور PTZ پس از ۳ دقیقه، به ترتیب ۰/۸۱±۳/۷۶- نانوآمپر و ۳/۴۴±۷/۹۱- میلی ولت و متوسط حداکثر جریان رو به خارج و ولتاژ آن به ترتیب ۰/۹۶±۴/۲۳ نانوآمپر و ۲/۷۸±۴۰/۲۳ میلی ولت است.



شکل ۳: جریانهای رو به داخل و رو به خارج حاصل از دپلاریزاسیون غشای جسم سلولی نورون DS، از پتانسیل ۴۰- تا ۵۰+ میلی ولت در مراحل ۱۰ mV به مدت ۵۰۰ ms در حضور PTZ (۲۵ مولار): (A). ارتباط ولتاژ - جریان (Mean±SEM) جریانهای رو به داخل و رو به خارج در پتانسیلهای فرمانی مختلف از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- تا ۵۰+ میلی ولت (B)

متوسط حداکثر جریان رو به داخل و ولتاژ آن در حضور PTZ پس از ۷ دقیقه، به ترتیب ۰/۶۵±۳/۳۲- نانوآمپر و ۴/۰۵±۱۰/۶۸- میلی ولت و متوسط حداکثر جریان رو به خارج و ولتاژ آن به ترتیب ۰/۳۷±۶/۳۵ نانوآمپر و ۱/۰۴±۴۱/۴۳ میلی ولت است.

به این ترتیب، ۳ دقیقه پس از افزودن PTZ به محیط خارج سلولی، حداکثر جریان رو به داخل ۱۸/۲ درصد کاهش یافته و ولتاژ آن ۲۴/۱۷ درصد به طرف مقادیر منفی انتقال یافته است. از سوی دیگر، حداکثر جریان رو به خارج ۲/۹۸ درصد کاهش داشته و ولتاژ آن ۷/۴ در صد به سمت ولتاژهای منفی‌تر سوق یافته است. از سوی دیگر، ۷ دقیقه پس از اضافه کردن PTZ، حداکثر جریان رو به داخل ۱۶/۵ درصد کاهش یافته و ولتاژ آن ۲۳/۱۸ درصد به طرف ولتاژهای منفی و جریان رو به خارج نیز ۶/۷۵ درصد کاهش داشته و ولتاژ آن ۴ درصد به سمت ولتاژهای مثبت انتقال یافته است.

بحث

نتایج مانشان می‌دهد که داروی صرع زای پنتیلن تترازول علاوه بر آثاری که بر خصوصیات بیوالکتریک سلولی یا به عبارتی بر ویژگیهای پتانسیل عمل می‌گذارد، جریانهای یونی رو به داخل و رو به خارج[1] رائیز تغییر می‌دهد. در این تحقیق، ۳ و ۷ دقیقه پس از افزودن PTZ، جریانهای رو به داخل نسبت به وضعیت کنترل کاهش نشان داد. این نتیجه در راستای نتایج تحقیقات Brown و همکارانش است (۱۷). آنها گزارش نمودند که استفاده از PTZ با غلظت ۲۰ میلی‌مولار سبب دپلاریزاسیون تونیک و پایدار غشا همراه با گروهی از پتانسیلهای عمل می‌شود. تزریق یون کلسیم به داخل سلول هم پاسخی مشابه با اثر PTZ ایجاد نمود با این تفاوت که ماهیت ناپایداری داشت. همچنین در نورونهایی که تحت تاثیر PTZ قرار گرفته بودند استفاده از مواد شلات کننده کلسیم[2] نظیر EGTA[3] و نیز کاربرد ماده‌ای به نام

1. Total inward current
2. Ca^{2+}- Chelators
3. Ethylenglycol-bis-N, N, N´, N´-tetraacetic acid

TMB-8[1] که باعث مسدود شدن رهایش کلسیم از محلهای ذخیره داخل سلولی می‌شود، اثر PTZ را متوقف نمودند. این گروه برای بررسی نقش یون کلسیم خارج سلولی در بروز اثرهای PTZ، از سالین حاوی یون کبالت (که سبب مسدود شدن عبور کلسیم از غشا می‌شود) استفاده نمودند. نتایج آنهانشان داد که در حضور یونهای کبالت، اثرهای PTZ حفظ شده اما این پاسخ به مدت ۱۰ دقیقه به طول انجامید. آنها نتیجه گرفتند که یونهای کلسیم خارج سلولی برای شروع پاسخ نسبت به PTZ ضروری نیستند اما برای حفظ طولانی مدت اثرهای آن مورد نیازند. نتایج آزمایشهای تحقیق حاضر با توجه به اینکه ۳ و ۷ دقیقه بعد از پرفیوژن رینگر حاوی PTZ ثبت شد، مشابه نتایج فوق است.

از طرف دیگر، Sugaya و همکارانش با اندازه‌گیری غلظت کلسیم داخل سلولی به کمک میکروالکترودهای حساس به کلسیم، نشان دادند که در طی فعالیت انفجاری ناشی از PTZ در نورونهای حلزون، کلسیم از محلهای ذخیره داخل سلولی آزاد شده و به سمت غشا حرکت می‌کند. این محققین پیشنهاد کردند که برای بروز فعالیت انفجاری، افزایش متوسطی در غلظت کلسیم داخل سلولی مورد نیاز است که غلظت آن از غلظت طبیعی داخل سلولی بیشتر است (۱۶). اصولاً بروز تغییرات غلظت کلسیم داخل سلولی در طی فعالیت صرعی، توسط محققین زیادی مطرح شده ولی هر یک از آنها مکانیسم متفاوتی را در این زمینه پیشنهاد نموده‌اند و هنوز مشخص نیست که آیا افزایش کلسیم که در طی فعالیت صرعی اتفاق می‌افتد، توسط ورود کلسیم از طریق غشا ناشی می‌شود یا اینکه ورود کلسیم از خارج سلول منجر به رهایش کلسیم از ذخیره‌های داخل سلولی می‌گردد. به عبارت دیگر، رهایش القا شده کلسیم به وسیله یون کلسیم اتفاق می‌افتد (۹).

Onozuka و همکارانش حین کار روی نوعی حلزون خشکی ژاپنی (Euhadra peliomphala) مکانیسمی را به این ترتیب پیشنهاد نمودند که PTZ با فعال کردن آدنیلات سیکلاز سبب افزایش cAMP داخل سلولی شده و آن هم به نوبه خود باعث رهایش یونهای کلسیم از ذخیره‌های داخل سلولی می‌شود. افزایش یونهای کلسیم سبب فسفریلاسیون پروتئینهای غشایی شده و در نهایت هدایت غشا حین فعالیت صرعی تغییر می‌کند (۱۸).

در مقابل گروه دیگری از محققین افزایش جریان کلسیم را به دنبال استفاده از PTZ گزارش نموده‌اند. از جمله Walden و همکارانش نشان دادند که حین بروز صرع، غلظت یونهای کلسیم خارج سلولی کاهش می‌یابد و نیز آنتاگونیستهای آلی کلسیم قادر به کاهش امواج صرعی در سطح یک سلول عصبی و نیز جمعیت‌های نورونی هستند (۱۹). همچنین Lucke و همکاران نیز بااستفاده از میکروالکترودهای مخصوص کلسیم و اندازه‌گیری غلظت کلسیم خارج سلولی نشان دادند که حداقل قسمتی از افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی در شرایط تشنج، مربوط به ورود کلسیم از فضای خارج سلولی است (۲). در این بررسی ماز غلظت ۲۵ میلی مولار پنتیلن تترازول استفاده نمودیم ولی این گروه غلظت ۴۰ میلی مولار PTZ را به کار برده‌اند و احتمال دارد که غلظت بالاتر PTZ در افزایش جریانهای رو به داخل مؤثر باشد.

از آنجا که بیماری صرع با افزایش تحریک پذیری نورونها همراه است؛ علاوه بر نقش یون کلسیم در این پدیده، نقش یون پتاسیم هم مورد بحث محققین است. Feher و همکارانش نشان دادند که جریانهای رو به خارج پتاسیمی IA و IK توسط PTZ تضعیف می‌شوند (۲۰). Hartung و Hermann هم نشان دادند که جریانهای اصلاح کننده پتاسیمی[2] در حضور PTZ کاهش می‌یابد (۲۱). نتایج این تحقیق نشان داد که ۳ و ۷ دقیقه پس از حضور PTZ حداکثر جریان رو به خارج به ترتیب ۲/۹۸ و ۶/۷۵ درصد کاهش داشته است. به این ترتیب به نظر می‌رسد که کاهش جریان پتاسیمی و خروج کمتر یونهای مثبت از سلول، آن را تحریک پذیرتر نموده و برای فعالیت صرعی مستعد می‌نماید.

به هر حال مکانیسم واقعی عملکرد PTZ روی کانالهای پتاسیمی هنوز مشخص نشده و نیاز به تحقیقات بعدی دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان مراتب تقدیر خود را از آقای دکتر سید محمد فیروزآبادی که طراحی نرم‌افزار Analyse و پالس رابرای آنالیز و ثبت انجام داده‌اند، ابراز می‌دارند. هزینه انجام این پروژه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به منظور انجام طرح پژوهشی تأمین گردیده که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. White HS: Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. Epilepsia 1999; 40(5): S2-S10

2. Lucke A, Speckmann EJ, Altrup U, Lehmenkahler A, Walen J: Decrease of free calcium concentration at the outer Surface of identified Snail neurons during paroxysmal depolarization Shifts. Neurosci Let 1990; 112: 190-193

3. Walden J, Speckmann E-J, Witte OW: Membrane currents induced by pentylenetetrazol in identified neurons of Helix pomatia. Brain Res 1988; 473: 264-305

4. Sugaya A, Sugaya E, Tsujitani M: Pentylenetetrazol induced intracellular potential changes of the neuron of the Japanese land snails Euhadra peliomphala. Jpn J Physiol 1973; 23: 261-274

5. Altrup U, Gerlach G, Reith H, Said MN, Speckmann E-J: Effects of valproate in a model nervous system (Buccal ganglia of Helix pomatia): I. Antiepileptic actions. Epilepsia 1992; 33(4): 743-752

6. Medeja M, Stocker M, Mubhoff U, Pongs O, Speckmann EJ: Potassium current in epilepsy: effects

1. Tetra Methyl Bromide
2. Rectifier potassium curents

of the epileptogenic agent pentylenetetrazol on a cloned potassium channel. Brain Res 1994; 656: 287-294
7. Papp A, Feher O: Analysis of the slow inward current induced by pentylenetetrazol. Exp Brain Res Series 1991; 20: 31-34
8. Papp A, Feher O, Erdelyi L: Properties of the slow inward current induced by pentylentetrazol in Helix neurons. Epilepsy Res 1990; 6: 119-125
9. Wiemann M, Jones D, Straub H, Altrup U, Speckmann E-J: Simultaneous blockade of intracellular calcium increases and of neuronal epileptiform depolarizations by verapamil. Brain Res 1996; 734(1-2): 49-54
10. Yamaguchi S, Rogawski MA: Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. Epilepsy Res 1992; 11: 9-16
11. Beck H, Blumcke I, Kral T, Clusmann H, Schramm H, Wiestler OD, Hernemann U, Elger CE: Properties of a delayed rectifier potassium current in dentate granule cells isolated from the hippocampus of patients with chronic temporal lobe epilepsy. Epilepsia 1996; 37(9): 892-901
12. Schwartzkorin PA, Prince DA: Effects of TEA on hippocampal neurons. Brain Res 1980; 185: 169-181
13. Gandolfo G, Romettino S, Gottesmann C, Luijtelaar GV, Coenen A, Bidard JN, Lazduski M: K+ channels openers decrease seizures in genetically epileptic rats. Eur J Pharmacol 1989; 167: 181-183
14. Tsaur ML, Sheng M, Lowenstein DH, Jan YN, JanLY: Differentiation expression of K+ channel mRNA inthe rat brain down- regulation in the hippocampus following seizures. Neuron 1992; 8: 1055-1067
15. Taylor PS: Selectivity and patch measurement of A-current in Helix aspersa neurons. J Physiol 1987; 388: 437-447
16. Sugaya E, Furnichi H, Takagi T, Kajiwara K, Komatsubara J: Intracellular calcium concentration during pentylenetetrazol- induced bursting activity in snail neurons. Brain Res 1987; 416: 183-189
17. Brown AM, McCrohan CR: Differential responses of the of two identified neurons pond snail Lymnaea stagnalis to the convulsant drug pentylenetetrazol. Brain Res 1991; 565: 247-253
18. Onozuka M, Kishii K, Furuichi H, Sugaya E: Behavior of intracellular cyclic nucleotide and calcium in pentylenetetrazol- induced bursting activity in snail neurons. Brain Res 1983; 269: 277-286
19. Walden J, Strub H, Speckmann E-J, Epileptogenesis: Contributions of calcium ions and antiepileptic calcium antagonists. Acta Neurol Scand 1992; 86: 41-46
20. Feher O, Erdelyi L, Papp A: The effect of pentylenetetrazol on the Metacerebral neuron of *Helix pometia*. Gen Physiol Biophys 1988; 7: 505-516
21. Hartung K, Hermann A, Differential effects of pentylenetetrazol on ion currents of *Aplysia* neurones. Brain Res 1987; 419: 55-64