

Enhancement of Purkinje Neuronal Excitability by the Inhibition of Fast Voltage Gated K⁺ Channel Function in Ataxic Rats

I. Goudarzi, MSc.¹, M.R. Kaffashian, M.Sc.², M. Janahmadi, Ph.D.², Y. Fathollahi, Ph.D.¹, S. Hajizadeh, Ph.D.¹

1. Physiology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University
2. Neuroscience Research Center and Physiology Department, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

: *Corresponding Address: P.O.Box: 19835-181, Neuroscience Research Center and Physiology Department, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: mjanahmadi@yahoo.com

Abstract

Received: 9/Oct/2007, Accepted: 9/Dec/2007

Objective: The purpose of this study was to investigate the role of fast inactivating (IA) voltage dependent potassium channels in shaping the discharge activity of cerebellar Purkinje cells (PCs) in ataxic rats.

Materials and Methods: Male Sprague-Dawley rats (40-60 g) were used in this study. Ataxia was induced via single i.p. injection of 3-acethylpyridine (65 mg/kg). Four days following induction of ataxia, the rats were decapitated after being anesthetized using ether. 300 µm thick parasagittal slices were prepared from the vermis of the cerebellum. Sharp intracellular recording was achieved from Purkinje cells under continuous superfusion of ACSF containing synaptic blockers.

Results: Intracellular recording of 21 Purkinje neurons in cerebellar slice preparation showed that Purkinje cells of ataxic rats fire in three modes of tonic (23.81%), burst (19.05%) and silence (57.14%). Following the application of 4-AP, 83.33% of the silent PCs were spontaneously fired and the burst activity was robustly enhanced in bursting PCs. In addition, 4-AP significantly increased the duration of burst and active periods but decreased the duration of inactive period. It also increased the number of sodium spikes within each burst.

Conclusion: 4-AP sensitive current in Purkinje cell of ataxic rat involves in three modes of firing pattern. In addition, the inhibition of fast inactivating potassium channels (IA) with 4-AP enhances the spontaneous discharge activity of Purkinje cells.

Keywords: Purkinje Neurons, Voltage Gated Fast K⁺ Channels, Ataxia, Cerebellum, Intracellular Recording

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 4, Winter 2008, Pages: 232- 239

افزایش تحریک پذیری نورون‌های پورکنز به دنبال مهار عملکرد کانال‌های سریع پتاسیمی وابسته به ولتاژ در موش‌های صحرایی آتاکسیک

ایران گودرزی **M.Sc.**، محمدرضا کفایشیان **M.Sc.**، مهیار جان احمدی **Ph.D.**، یعقوب فتح الهی **Ph.D.**، سهراب حاجی زاده **Ph.D.**

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی
۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی

: آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۸۱-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی

پست الکترونیک: Email: mjanahmadi@yahoo.com

مکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۷/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۱۸

* **هدف:** بررسی نقش کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ سریع نوع A در الگوی فعالیت الکتریکی سلول‌های پورکنز موش‌های آتاکسیک

* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از موش صحرایی نر بالغ جوان در محدوده وزنی ۶۰-۴۰ گرم از نژاد Sprague-Dawley استفاده شد. برای ایجاد آتاکسی از نوروتوکسین ۳-استیل پیریدین (3-AP) با دوز ۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی استفاده شد. ۳ روز پس از القای آتاکسی، مطالعه الکتروفیزیولوژی با استفاده از تکنیک ثبت داخل سلولی از سلول‌های پورکنز برش‌های ورمیس مخچه انجام شد و رفتار و الگوی فعالیت الکتریکی قبل و بعد از کاربرد ۴-آمینوپیریدین (4-AP)، مهارکننده کانال‌های پتاسیمی غیرفعال شونده سریع نوع A، مورد مقایسه قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** در این مطالعه از ۲۱ سلول پورکنز ثبت گرفته شد که ۲۳/۸۱ درصد از سلول‌ها الگوی فعالیت تونیک، ۱۹/۰۵ درصد فعالیت انفجاری و ۵۷/۱۴ درصد از سلول‌ها الگوی خاموش را نشان دادند. کاربرد 4-AP در سلول‌های خاموش، بلافاصله سبب شلیک پتانسیل عمل در ۸۳/۳۳ درصد از موارد شد. 4-AP در سلول‌های با الگوی فعالیت انفجاری (Burst)، مدت زمان برست، دوره فعال و همچنین شمار اسپایک‌های سدیمی در هر برست را به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین مدت زمان دوره غیر فعال (Interburst)، متعاقب کاربرد 4-AP به طور معنی‌داری کاهش یافت.

* **نتیجه‌گیری:** جریان پتاسیمی حساس به 4-AP در تنظیم الگوی شلیک سلول پورکنز موش آتاکسیک نقش داشته است و 4-AP فعالیت خود به خودی را تقویت می‌کند که می‌تواند موجب بروز فعالیت انفجاری در سلول‌های پورکنز خاموش شود.

کلیدواژگان: سلول پورکنز، کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ سریع، آتاکسی، مخچه، ثبت داخل سلولی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۴، زمستان ۸۶، صفحات: ۲۳۹-۲۴۲

مقدمه

مخچه مسئول هماهنگی حرکت و حفظ تعادل در بدن است. معماری مخچه براساس تکرار یک مدار شناخته شده شکل می‌گیرد که در مرکز آن سلول‌های پورکنز قرار دارند. این سلول‌ها، خروجی منحصر به فرد قشر مخچه را تشکیل می‌دهند. وجود درخت دندردی وسیع به آنها اجازه می‌دهد اثر ورودی‌های تحریکی و مهاری گسترده دریافتی را انسجام ببخشند و نتیجه را به سلول‌های هدف در هسته‌های عمقی مخچه رله کنند. مخچه وظیفه هماهنگی حرکتی را از طریق تولید سیگنال‌های زمان‌بندی شده دقیق برای تقویت و مهار عضلات آگونیست و آنتاگونیست به انجام می‌رساند و تصور می‌شود که سیگنال‌های زمان‌بندی شده به وسیله تغییرات گذرا در میزان و الگوی شلیک این نورون‌ها کد می‌شود (۱). فرکانس و الگوی شلیک این نورون‌ها به وسیله ورودی‌های سیناپسی و کانال‌های یونی سلول کنترل می‌شود. به طوری که به سلول اجازه می‌دهند حتی در عدم حضور ورودی‌های سیناپسی به طور خودبه‌خودی فعالیت کند (۲). در ارتباط با الگوی شلیک خودبه‌خود در سلول‌های پورکنز

گزارش‌های فراوانی وجود دارد. برخی محققان الگوی شلیک تونیک متشکل از اسپایک‌های سدیمی (۵-۳) و برخی دیگر الگوی شلیک انفجاری (Burst) که شامل چندین اسپایک سدیمی و اسپایک کلسیمی است را گزارش کرده‌اند (۶). همچنین الگوی سه‌گانه‌ای نیز گزارش شده است که شامل قطاری کوتاه مدت از پتانسیل‌های عمل سدیمی است و با برست‌های کلسیمی و سدیمی و سپس دوره خاموشی همراه است (۱، ۲، ۷، ۸).

در حالی که اخیراً مطرح شده است هر نورون پورکنز می‌تواند ۳ الگوی شلیک را به طور مجزا نشان دهد، به طوری که برخی به صورت تونیک، برخی فعالیت انفجاری وعده‌ای از آنها خاموشند (۹، ۱۰).

عدم فعالیت فیزیولوژیک نورون‌های پورکنز موجب بروز آتاکسی می‌شود. آتاکسی مخچه‌ای، نوعی بیماری نورولوژیکی است که با عدم هماهنگی در حرکات، عدم ثبات در وضعیت و طرز ایستادن، ناهنجاری در راه رفتن و لرزش ارادی همراه است (۱۱). علل بروز آتاکسی‌های مخچه‌ای ممکن است متفاوت باشد (جهش‌های ژنتیکی، علل محیطی، سرطان و فاکتورهای نامشخص)

آماده سازی برش های ورمیس از مخچه

موش ها ابتدا با اتر بیهوش و با استفاده از گیوتین سر آنها جدا می شد. با برداشتن استخوان پس سری، مخچه نمایان می شد که با استفاده از اسکالپل از باقی مغز جدا می شد و در محلول مایع مغزی-نخاعی مصنوعی (Artificial Cerebrospinal Fluid: ACSF) سرد شده قرار می گرفت. محلول ACSF شامل (بر حسب میلی مولار)، $CaCl_2$ ۲/۴، $MgSO_4$ ۱/۳، KH_2PO_4 ۱/۲، KCl ۵، $NaCl$ ۱۲۴ و ۱۰ Glucose بود. این محلول به طور مداوم با ترکیب اکسیژن ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد (کربوژن) اکسیژنه می شد. پس از یک دقیقه، بخش ورمیس مخچه جدا و برش های پاراساژیتال با ضخامت ۳۰۰ میکرومتر با استفاده از یک ویراتورم (Vibrosilce 752M, Campden Instruments Ltd,) تهیه می شد. برش ها در محلول کربوژنه شده ACSF به مدت دو ساعت در درجه حرارت ۳۴ درجه سانتی گراد انکوبه و پس از آن تا هنگام آزمایش در محلول ذکر شده در درجه حرارت اتاق (۲۷-۲۳ درجه سانتی گراد) نگهداری می شدند. روش انجام کار توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تایید شده است.

جدول ۱: جدول امتیاز تغییرات راه رفتن (۲۰)

Points	Gait	گام
۰	Normal	طبیعی
-۱	Mud walking	خم و راست شدن بیش از حد پا و بالا رفتن دم
-۲	Tremor while walking	لرزش در هنگام راه رفتن
-۳	Motor deficits of hind limbs	نقص های حرکتی پاها
-۴	No weight bearing by hind limbs	وزن روی پاها نمی باشد

ثبت داخل سلولی

برش های ورمیس مخچه در محفظه ثبت قرار داده می شد و با استفاده از میکروسکوپ Upright (Olympus; BX 51WI) و با عدسی 60x water immersion رویت می شدند. محفظه ثبت با محلول ACSF کربوژنه شده به طور مداوم با سرعت ۱-۲ میلی لیتر در دقیقه سوپرفیوز می شد. به منظور مهار جریانات سریع سیناپسی، ۱ میلی مولار Kynurenic acid، مهارکننده جریانات گلوتاماتی سریع (۲۱) (lonotropic) و ۱۰۰ میکرومولار picrotoxin مهارکننده های اختصاصی کانال های GABAA (۲۲) به محلول پرفیوژن اضافه می شد. سلول های پورکنز بر اساس موقعیت، اندازه و شکل و درخت دندریتی توسط دوربین مادون قرمز شناسایی می شدند. ثبت داخل سلولی از جسم سلولی با استفاده از آمپلی فایر AxoClamp 700B (Axon Instruments Inc., USA) در bridge mode و با کمک میکروالکترودهای شیشه ای با مقاومت ۸۰-۶۰ مگا اهم انجام می شد. الکترودها با استفاده از یک پولر افقی (APP-1, Stoelting, USA) کشیده و با محلول ۳ KCl مولار پر می شدند.

جمع آوری و آنالیز داده ها

ثبت ها در کیلوهرتز ۳۰ فیلتر و با استفاده از مبدل A/D

اما مدارها و سلول های مخچه ای نیز قسمت های عمده ای هستند که در ضمن بروز بیماری دست خوش تغییر می شوند. سلول های پورکنز در قشر مخچه، شایع ترین نوع نورون های مخچه محسوب می شود که در بیماران آتاکسیک آسیب می بینند (۱۲).

دژنراسیون قشری مخچه نشانه اصلی این بیماری است و این دژنراسیون منجر به تغییر خروجی نورون های پورکنز می شود. از آنجایی که نورون های پورکنز تشکیل تنها خروجی قشر مخچه را می دهند و اساسا سیگنال های مهاری را به هسته های عمقی مخچه می فرستند، عدم عملکرد طبیعی نورون های پورکنز به نظر می رسد منجر به افزایش تحریک پذیری هسته های عمقی مخچه می شود. نورون های هسته های عمقی دارای شلیک خودبه خودی در عدم حضور ورودی های سیناپسی از پورکنز هستند. تعدیل شلیک نورون های هسته های عمقی توسط ورودی های پورکنز مسئول هماهنگی در اعمال حرکتی است (۱۳).

در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و آسیب های مزمن نخاعی از مهارکننده کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ (4-AP) برای رهایی از علامت نورولوژیک بلوک هدایتی استفاده می شود. کاربرد این مهارکننده، هدایت پتانسیل عمل را بهبود می بخشد و مدت زمان و دامنه پتانسیل عمل پیش سیناپسی را نیز افزایش می دهد و به وسیله بلوک کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ غشای اکسون های بدون میلین و یا در غشای پایانه سیناپسی سبب افزایش رهایش نوروترانسمیتر می شود (۱۴، ۱۵).

در بالین یک مورد کاربرد 4-AP در بیماران مبتلا به آتاکسی اپیزودیک تیپ ۲ گزارش شده است که نشان می دهد پس از تزریق، مانع از وقوع حملات آتاکسی شده و عدم استفاده از 4-AP حملات آتاکسی را بازگردانده است (۱۶). اما مکانیسم اثر آن در شرایط آتاکسی مشخص نیست.

با توجه به نقش کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ سریع در تنظیم تحریک پذیری غشای پس سیناپسی و کنترل دریافت و انسجام سیگنال های سیناپسی (۱۷، ۱۸) و همچنین اثرات 4-AP در کاهش وقوع حملات آتاکسی، در تحقیق حاضر مکانیسم اثر این مهارکننده کانال های پتاسیمی سریع بر روی الگوی فعالیت الکتریکی سلول های پورکنز موش های آتاکسیک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

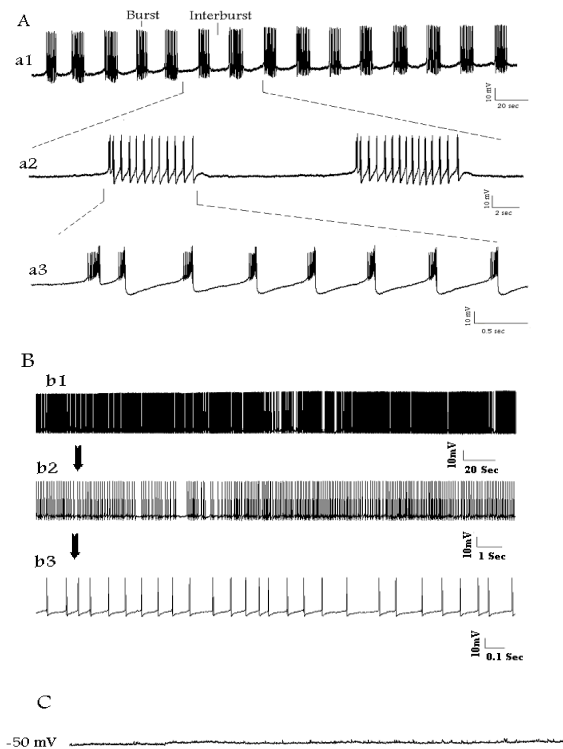
حیوانات

در این مطالعه از موش صحرایی نر بالغ جوان نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۶۰-۴۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت سیکل تاریکی-روشنایی و دمای محیطی کنترل شده (۲۲-۲۰ درجه سانتی گراد) نگهداری می شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

روش ایجاد آتاکسی

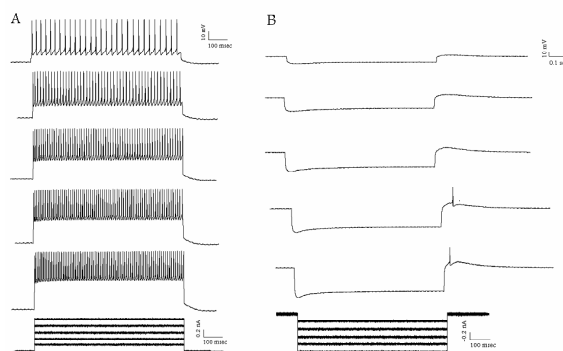
برای ایجاد یک مدل حیوانی آتاکسیک از نوروتوکسین ۳-استیل پیریدین (3-AP) با دوز ۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی استفاده شد. این نوروتوکسین با تخریب انتخابی هسته زیتون تحتانی سبب قطع آوران های بالا رونده مخچه می شود (۱۹). به دلیل تخریب زیتون تحتانی، قشر مخچه ورودی های فیبر صعودی اش را از دست می دهد و موش ها آتاکسیک می شوند.

تغییرات راه رفتن در حیوانات آتاکسیک با استفاده از جدول ۱ درجه بندی شد و حیواناتی که امتیاز ۴- را کسب کردند ۳ روز پس از الفای آتاکسی تحت مطالعه الکتروفیزیولوژی قرار گرفتند (۲۰).



شکل ۱: الگوهای شلیک خود به خودی در سلول‌های پورکنژ موش‌های آتاکسیک

۱A-a شلیک انفجاری را نشان می‌دهد که شامل دوره‌های فعال Burst است که توسط دوره‌های غیرفعال جدا می‌شود. ۱B-b الگوی شلیک تونیک را نشان می‌دهد ۲A-a و ۲B-b شلیک انفجاری و ۳B-b و ۳B-b شلیک تونیک را با Scale زمانی بزرگتر را نشان می‌دهند. C الگوی خاموش سلول‌های پورکنژ را نشان می‌دهد.



شکل ۲: پاسخ سلول پورکنژ خاموش موش‌های آتاکسیک به پالس‌های دپولاریزه و هیپرپولاریزه کننده
A: پاسخ سلول را به پالس‌های دپولاریزه کننده (۱nA-۰/۰۲) و B: پاسخ همان سلول را به پالس‌های هیپرپولاریزه کننده (۱nA-۰/۰۲-) نشان می‌دهد.

در حضور 4-AP، سلول‌های خاموش ابتدا پتانسیل پس سیناپسی مهاری نشان دادند و سپس سلول به میزان $1.0/92 \pm 1.73$ میلی‌ولت دپولاریزه شده و شروع به شلیک پتانسیل عمل کرد. 4-AP در ۸۳/۳۳ درصد سلول‌های خاموش توانست شلیک پتانسیل‌های عمل خود به خودی شامل برست‌های سدیمی-کلسیمی را برانگیزد (شکل ۳).

(Digidata, Axon instrument, Ca) در کیلوهرتز ۴۰ رقمی شده و در یک رایانه با کمک نرم‌افزار Pclamp 9.2 ذخیره می‌شدند. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار Clampfit و داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون Paired t test و برنامه Statistica مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت $Mean \pm SEM$ ارائه و مقادیر $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد و ترسیم نمودارها با برنامه Excel صورت گرفت.

مواد و داروها

۴-آمینوپیریدین (4-AP) با غلظت ۲ میکرومولار به کار برده شد. 4-AP از شرکت Sigma، Kynurenic acid از شرکت Fluka، پیکروتوکسین از شرکت Tocris تهیه شد. داروها روزانه در شروع ثبت تهیه می‌شد. 4-AP در آب مقطر حل شد و با استفاده از سمپلر به محلول ثبت اضافه شد و پس از رقیق شدن در محلول داخل محفظه ثبت به غلظت نهایی می‌رسید.

یافته‌ها

الگوی فعالیت خود به خودی سلول‌های پورکنژ موش‌های آتاکسیک سلول‌های پورکنژ در برش‌های ورمیس مخچه به دست آمده از موش‌های آتاکسیک ۳ الگوی فعالیت خود به خودی را نشان دادند: فعالیت تونیک، انفجاری (Burst) و خاموش. در این مطالعه از ۲۱ سلول پورکنژ ثبت گرفته شد که ۲۳/۸۱ درصد از سلول‌ها الگوی فعالیت تونیک، ۱۹/۰۵ درصد فعالیت انفجاری را نشان دادند و ۵۷/۱۴ درصد از سلول‌ها خاموش بودند. در شلیک تونیک سلول‌های پورکنژ پتانسیل‌های عمل سدیمی نشان می‌دادند (شکل ۱A) در حالی که شلیک انفجاری شامل دوره‌های فعال با تعداد متغیر برست‌های سدیمی و سدیمی-کلسیمی بود که در فاز دپولاریزه غشا ظاهر می‌شد و با دوره‌های غیرفعال بین برست‌ها که غشا در حالت هیپرپولاریزه قرار می‌گرفت، دنبال می‌شدند.

موش‌های آتاکسیک درصد بالاتری از سلول‌های پورکنژ خاموش را در مقایسه با موش‌های سالم شامل می‌شدند (۵۷/۱۴ درصد در مقابل ۴۴/۴۴ درصد به ترتیب در موش‌های آتاکسیک و سالم). همچنین پتانسیل استراحت غشای آنها $(-49/67 \pm 1/84)$ میلی‌ولت (در مقایسه با موش‌های سالم $(-55/66 \pm 2/55)$ میلی‌ولت) به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کمتر بود.

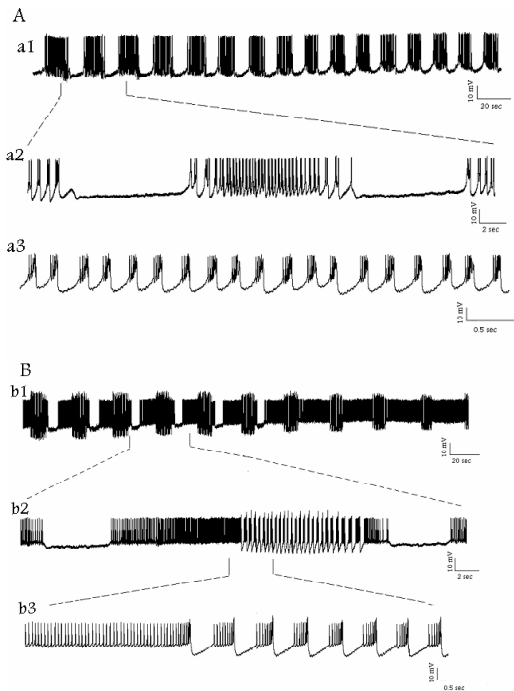
به منظور بررسی نقش کانال‌های پتاسیمی غیرفعال شونده وابسته به ولتاژ سریع نوع A در الگوی شلیک این نورون‌ها از (۲ میلی مولار 4-AP) استفاده شد.

اثر مهارکننده کانال‌های پتاسیمی سریع بر فعالیت الکترو فیزیولوژیک سلول‌های پورکنژ خاموش

نوع شایع الگوی شلیک در سلول‌های پورکنژ، الگوی خاموش است به طوری که سلول فعالیت خود به خودی از خود نشان نمی‌دهد اما در پاسخ به پالس‌های دپولاریزه کننده، پتانسیل عمل نشان می‌دهد و به پالس‌های هیپرپولاریزه کننده نیز پاسخ می‌دهد. در تحقیق حاضر نیز، ۶۳/۱۶ درصد از سلول‌های پورکنژ موش‌های آتاکسیک، الگوی خاموش را نشان دادند و در پاسخ به پالس‌های دپولاریزه کننده، پتانسیل عمل نشان می‌دادند (شکل ۲A) و به پالس‌های هیپرپولاریزه کننده نیز پاسخ دادند به طوری که پتانسیل غشا هیپرپولاریزه‌تر می‌شد (شکل ۲B).

افزایش تحریک پذیری نورون های پورکنژ با مهار I_A

4-AP ($8/1 \pm 6/3$ ثانیه) در مقایسه با پس از دارو ($19/58 \pm 3/29$ ثانیه) افزایش معنی داری ($p < 0/01$) را نشان داد. مدت زمان دوره غیرفعال بین برست ها ($9/9 \pm 2/15$ ثانیه) در مقایسه با مدت زمان دوره غیرفعال پس از 4-AP ($6/0 \pm 64/871$ ثانیه) کاهش معنی داری ($p < 0/05$) داشت و همچنین شمار اسپایک های سدیمی در هر برست را ($6/7 \pm 2/45$ از قبل از 4-AP به $20 \pm 3/21$ پس از 4-AP) به طور معنی داری ($p < 0/05$) افزایش داد (شکل 5 و 4C).



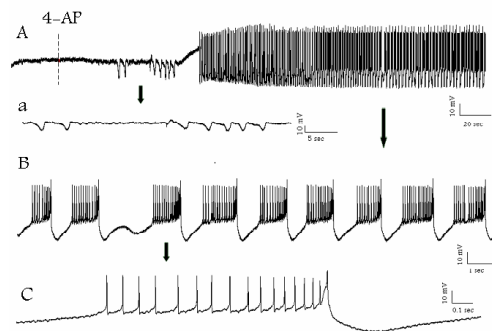
شکل 5: الگوی شلیک سلول های پورکنژ موش های آتاکسیک در 4-AP

شکل 5A-a الگوی شلیک را قبل از 4-AP و 4-AP پس از کاربرد 4-AP نشان می دهد. 2A-a، 2B-b، الگوی شلیک را با Scale زمانی بزرگتر به ترتیب قبل و بعد از 4-AP را نشان می دهد.

بحث

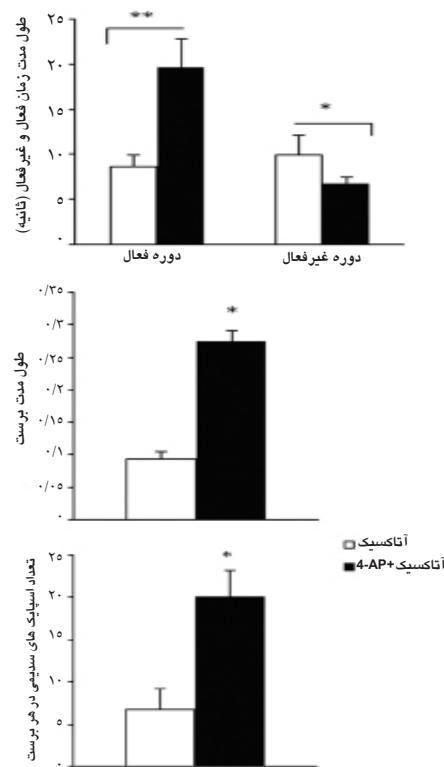
در این تحقیق نشان داده شد الگوی فعالیت خود به خودی نورون های پورکنژ موش های آتاکسیک به صورت های تونیک، انفجاری و خاموش است. متعاقب اثر دادن 4-AP بر سلول های خاموش، 83/33 درصد از آنها شروع به فعالیت انفجاری کردند. همچنین سلول هایی که الگوی فعالیت انفجاری داشتند، پس از اعمال 4-AP فعالیتشان تقویت شد و افزایش معنی داری در مدت زمان برست، دوره فعال و شمار اسپایک های سدیمی در هر برست نشان دادند. درصد سلول های پورکنژ خاموش در موش های آتاکسیک در مقایسه با موش های سالم 10 درصد افزایش داشت و همچنین پتانسیل استراحت غشا موش های آتاکسیک دپولاریزه تر از موش های سالم بود.

به نظر می رسد دلیل افزایش درصد سلول های خاموش در موش های آتاکسیک، دپولاریزاسیون پتانسیل استراحت غشا آنها باشد. احتمالاً در این پتانسیل استراحت، تعداد زیادی از کانال های



شکل 3: الگوی شلیک سلول های پورکنژ خاموش پس از کاربرد 4-AP

شکل A فعال شدن سلول خاموش را پس از کاربرد 4-AP نشان می دهد و B و C فعالیت انفجاری سلول را پس از کاربرد 4-AP با Scale زمانی بزرگتر نشان می دهد.



شکل 4: نمودار اثر مهارکننده کانال های پتاسیمی بر مدت زمان دوره فعال، غیرفعال، برست و شمار پتانسیل عمل های سدیمی. A مدت زمان دوره فعال و غیرفعال، B مدت زمان برست و C شمار اسپایک های سدیمی در هر برست را نشان می دهد. مقادیر میانگین داده ها با SEM است. $p < 0/01$ **, $p < 0/05$ *

اثر مهارکننده کانال های پتاسیمی سریع بر سلول های پورکنژ با فعالیت خود به خودی انفجاری

در سلول های پورکنژی که فعالیت انفجاری نشان می دادند 4-AP با مهار کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ سریع توانست باعث تغییر در بسیاری از پارامترهای الگوی فعالیت انفجاری شود. مدت زمان برست در سلول های پورکنژ موش های آتاکسیک ($0/093 \pm 0/011$ ثانیه) پس از 4-AP ($0/274 \pm 0/017$ ثانیه) به طور معنی داری ($p < 0/05$) افزایش یافت. همچنین مدت زمان دوره فعال قبل از

و متعاقب آن دپولاریزاسیون پتانسیل غشا رخ داد که حاصل آن افزایش تحریک پذیری و تخلیه‌های الکتریکی شدید متشکل از اسپایک‌های سدیمی-کلسیمی در سلول‌های مذکور شد. اگرچه پیکروتوکسین باعث مهار جراتات یونی حاصل از فعال شدن کانال گیرنده‌های اینوتروپیک GABAA و GABAC می‌شود اما در حضور 4-AP پتانسیل‌های پس سیناپسی مهارى ثبت شد که می‌تواند ناشی از فعالیت گیرنده‌های GABAB توسط 4-AP باشد. 4-AP موجب فعال شدن کنداکنانس‌های پتاسیمی می‌شود که در القای پتانسیل‌های پس سیناپسی مهارى تاخیری ناشی از فعالیت گیرنده‌های GABAB نقش دارد و حساس به یون سزیم نیستند. اما توسط باکلوفن فعال شوند (۳۷، ۳۸).

علاوه بر این، 4-AP باعث بروز پتانسیل‌های پس سیناپسی خود به خودی تحریکی با دامنه پایین شد که همراه با افزایش نوبز پایه بود. افزایش فعالیت خود به خودی سلول‌های پورکنز خاموش موش‌های آتاکسیک در حضور 4-AP می‌تواند ناشی از رفع غیرفعال شدن کانال‌های یونی سدیمی و یا کلسیمی متعاقب بروز پتانسیل‌های پس سیناپسی مهارى باشد که به علت دپولاریزه بودن پتانسیل استراحت سلول‌های پورکنز موش‌های آتاکسیک قبل از افزودن 4-AP در شرایط غیرفعال شدن قرار داشتند و به خاطر عدم ورود سدیم و یا کلسیم قادر به بروز فعالیت خود به خودی نبودند. از طرف دیگر شاید به دنبال فعالیت اینترنورون‌های گاباژیک افزایش خروج یون پتاسیم و متعاقب آن تجمع K^+ خارج سلولی با دپولاریزاسیون سلول‌های مجاور باعث تشدید فعالیت بیشتر اینترنورون‌ها و افزایش تحریک پذیری آنها شده است (۳۹). نقش تجمع K^+ به عنوان یک مکانیسم غیرسیناپسی در ایجاد فعالیت‌های صرعی و یا افزایش تحریک‌پذیری سلولی نیز قبلاً گزارش شده است (۴۰). بنابراین احتمالاً به علت دپولاریزاسیون متعاقب وقوع پتانسیل‌های پس سیناپسی مهارى، ورود Na^+ و Ca^{2+} به داخل سلول تسهیل و در نتیجه موجب تشدید فعالیت‌های الکتریکی سلول پورکنز می‌شود. به هر حال، بدون شک، مشخص کردن جریانات یونی دخیل در وقوع دپولاریزاسیون غشا نیاز به انجام آزمایش‌های ولتاژکلمپ دارد که هدف بررسی حاضر نبوده است.

تراکم کانال‌های سدیمی سریع در دندریت سلول‌های پورکنز کم است و پتانسیل عمل سدیمی در دندریت‌ها تولید نمی‌شود. اما دارای تراکم بالایی از کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع P/Q است که پتانسیل‌های عمل کلسیمی تولید می‌کند (۳۳) این پتانسیل‌های عمل کلسیمی به جسم سلولی هدایت و سبب شلیک اسپایک‌های سدیمی در آن می‌شوند (۲). در نتیجه، الگوی شلیک خود به خود در سلول‌های پورکنز مغز بالغ به صورت شلیک اسپایک‌های سدیمی-کلسیمی بروز می‌کند.

محققان نشان داده‌اند جریان A-type در سلول‌های پورکنز از هدایت پتانسیل‌های عمل کلسیمی به جسم سلولی ممانعت می‌کند (۳۳) و از طرفی منشاء پتانسیل‌های عمل کلسیمی دندریت‌های سلول‌های پورکنز است و همچنین به دلیل اینکه 4-AP حتی پاسخ تونیک پتانسیل عمل سدیمی را به برست‌های سدیمی-کلسیمی تبدیل کرده است، بنابراین می‌توان گفت که 4-AP سبب مهار کانال‌های پتاسیمی سریع دندریت شده است و از این طریق باعث افزایش تحریک‌پذیری سلول شده و همچنین هدایت پتانسیل‌های عمل کلسیمی به جسم سلولی را تسهیل کرده است. در مطالعات انجام شده روی سلول‌های پورکنز نشان داده‌اند که 4-AP طول مدت و دامنه پتانسیل‌های عمل کلسیمی را نیز افزایش می‌دهد. بنابراین احتمال دارد که در سلول‌های پورکنز با فعالیت خود به خودی انفجاری از این طریق سبب افزایش هدایت

سدیمی سریع غیرفعال‌اند و در دسترس نیستند. با توجه به این که این سلول‌ها به پالس‌های دپولاریزه کننده پاسخ دادند و پتانسیل عمل سدیمی شلیک کردند، خاموشی سلول‌ها می‌تواند ناشی از غیرفعال بودن و عدم دسترسی به کانال‌های سدیمی سریع باشد. مطالعه الکتروفیزیولوژی انجام شده روی سلول‌های پورکنز موش‌های آتاکسیک فاقد کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم نشان داده است بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها فعالیت خود به خودی نداشتند و خاموش بودند. همچنین پتانسیل استراحت غشای این سلول‌ها ۵۰- تا ۴۵- ذکر شده که نسبت به موش‌های کنترل دپولاریزه‌تر بوده است (۲۳).

4-AP مهار کننده کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ غیرفعال شونده سریع (Fast inactivating potassium channels) است. این کانال‌ها در سلول‌های پورکنز موش صحرایی مشاهده شده‌اند (۲۴) و اعتقاد بر این است در تنظیم تحریک‌پذیری و الگوی شلیک نورون (۱۷، ۲۵، ۲۶) و همچنین کنترل دریافت و انسجام سیگنال‌های سیناپسی، تعدیل انتقال سیناپسی تحریکی و رپولاریزاسیون اسپایک نقش دارد (۲۷). کاربرد 4-AP بر روی سلول‌های پورکنز برش‌های ورمیس مخچه به دست آمده از موش‌های آتاکسیک موجب القای فعالیت خود به خودی به فرم انفجاری شد که شامل برست‌های سدیمی-کلسیمی بود. این اثر 4-AP مطابق با تحقیق انجام شده توسط محققان دیگر روی سلول‌های پورکنز موش‌های سالم است اما درصد سلول‌هایی که پس از اعمال 4-AP فعال شدند، کمتر است.

حق‌دوست یزدی و همکارانش نشان داده‌اند پس از افزودن 4-AP به محفظه ثبت، ۴۷ درصد از سلول‌های خاموش فعال شدند و Seo نیز فعال شدن ۶۶/۶۶ درصد سلول‌های خاموش را پس از 4-AP گزارش کرده است (۲۷، ۲۸).

با توجه به اینکه پس از افزودن 4-AP به مایع پرفیوژن خارج سلولی، غشا به اندازه ۱۵-۱۰ میلی ولت دپولاریزه می‌شود و سپس سلول شروع به شلیک پتانسیل عمل می‌کند، به نظر می‌رسد جریان سریع پتاسیمی (IA) در پتانسیل استراحت غشای سلول‌های خاموش به میزان زیادی فعال است و پاسخ‌دهی سلول را کاهش می‌دهد. به طوری که پس از مهار این جریان با 4-AP، سلول دپولاریزه و فعال می‌شود.

در سال‌های اخیر، متخصصان علوم اعصاب علاقه‌مند به بررسی کانال‌های یونی و انتقال سیناپسی، توجه زیادی به کاربرد آمینوپیریدین‌ها، به ویژه، ۴ آمینوپیریدین داشته‌اند (۳۴).

4-AP مهارکننده کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ به ویژه نوع سریع علی‌رغم این که در مواردی می‌تواند مسمومیت سلولی یا باعث بروز فعالیت‌های صرعی شدید شود اما امروزه در درمان برخی بیماری‌ها مثل آتاکسی نیز کاربرد درمانی یافته است (۳۵). اگرچه 4-AP به عنوان یک داروی صرع‌زا نیز معرفی شده ولی بر اساس گزارش‌های موجود این ماده موجب القای فعالیت خود به خودی می‌شود که به میزان کمتری از تخلیه‌های صرعی شکل رخ می‌دهد و وابسته به انتقال سیناپسی نیست (۲۹). از جمله اینکه پرات و آولی در دو ناحیه هیپوکامپی پتانسیل‌های گاباژیک منظم و هم‌زمانی را پس از کاربرد 4-AP ثبت کرده‌اند (۳۰). پتانسیل‌های گاباژیک مشابهی در برش‌های مغزی نیواستریاتال و نیو کورتیکال موش صحرایی و انسان متعاقب کاربرد ۴ آمینوپیریدین نیز ثبت شده است (۳۱، ۳۲، ۳۶).

در بررسی حاضر نیز سلول‌های پورکنز برش‌های مخچه از ورمیس موش‌های آتاکسیک در حضور 4-AP، ابتدا موجب بروز پتانسیل‌های پس سیناپسی مهارى Gabaergic شدند

نتیجه گیری

در مجموع می توان گفت که جریان پتاسیمی حساس به 4-AP در تنظیم الگوی شلیک سلول پورکنز موش آتاکسیک نقش دارد و مهار این جریان فعالیت خود به خودی را تقویت و می تواند تولید فعالیت انفجاری کند و نیز سبب القای فعالیت در سلول های خاموش گردد. به منظور مطالعه بیشتر مکانیسم اثر 4-آمینوپیریدین بر کینتیک کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ سریع در شرایط آتاکسی لازم است آزمایش هایی با استفاده از روش کلمپ ولتاژ انجام شود.

تقدیر و تشکر

هزینه مطالعه حاضر توسط صندوق حمایت از پژوهشگران کشور تامین شده است و نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از ریاست محترم آن مرکز اعلام می دارند.

References

1. Womack M, Khodakhah K. Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*, 2002; 22: 10603-10612
2. Womack MD, Khodakhah K. Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, 2004; 24: 3511-3521
3. Edgerton JR, Reinhart PH. Distinct contributions of small and large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol.*, 2003; 548: 53-69
4. Häusser M, Clark BA. Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration, *Neuron*. 1997; 19: 665-678
5. Williams SR, Christensen SR, Stuart GI, Häusser M. Membrane potential bistability is controlled by the hyperpolarization-activated current IH in rat cerebellar Purkinje neurons in vitro. *J Physiol*, 2002; 539: 469-483
6. Llinas R, Sugimori M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J Physiol*, 1980; 305: 171-195
7. Womack MD, Khodakhah K. Somatic and small-conductance calcium-activated potassium channels regulate the output of cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*, 2003; 23: 2600-2607
8. McKay BE, Turner W. Kv3 channels enable burst output in rat cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci*, 2004; 20: 729-739
9. Cingolani LA, Gymnopoulos M, Boccaccio A, Stocker M, Pedarzani P. Developmental regulation of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel expression and function in rat Purkinje neurons. *J Neurosci*, 2002; 22: 4456-4467
10. Seo WS, Shin JH, Suh CK. 4-Aminopyridine (4-AP) augments Ca²⁺-dependent action potential and changes oscillatory firing patterns

پتانسیل های عمل کلسیمی به جسم سلولی، طول مدت برست و افزایش شمار اسپایک های سدیمی در هر برست شده است (۲۷).

در موش های آتاکسیک اختلال عملکرد سلول های پورکنز وجود دارد به نحوی که گفته می شود اثر مهار این سلول ها بر هسته های عمقی مخچه کاهش می یابد و در نتیجه سبب افزایش فرکانس شلیک پتانسیل های عمل در این هسته ها می شود. افزایش فرکانس شلیک پتانسیل های عمل در هسته های عمقی مخچه به عنوان یکی از مکانیسم های بیماری آتاکسی محسوب می شود (۱۳). 4-AP با تقویت فعالیت خود به خودی سلول پورکنز موش آتاکسیک، فعال کردن سلول های خاموش و کاهش درصد آنها احتمالاً می تواند به عنوان یک روش درمانی در بیماری آتاکسی مطرح شود.

- in rat cerebellar Purkinje cells. *Yonsei Medical Journal*, 1999; 40: 112-117
11. Shakkottai VG, Chou CH, Oddo S, Sailer CA, Knaus HG, Gutman GA, Barish ME, Laferla F, Chandy G. Enhanced neuronal excitability in the absence of neurodegeneration induces cerebellar ataxia. *J Clin Invest*. 2004; 113: 582-590
12. Fernandez AM, Gonzalez De la Vega A, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 1253-1258
13. Orr HT. Into the depths of ataxia. *J Clin Invest*. 2004; 113: 505-507
14. Hayes KC. 4-Aminopyridine and spinal cord injury: a review. *Restorative Neurology and neuroscience*. 1994; 6: 259-270
15. Jensen JM, Shi R. Effect of 4-Aminopyridine on stretched mammalian spinal cord: The role of potassium channel in axonal conduction. *J Neurophysiol*. 2003; 90: 2334-2340
16. Strupp M, Kala R, Dichgans M, Freilinger T, Glasauer S, Brandt T. Treatment of episodic ataxia type 2 with the potassium channel blocker 4-aminopyridine. *Neurobiology*. 2004; 62: 1623-1625
17. Kano M, Rexhausen U, Dressen J, Konnerth A. Synaptic excitation produce a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. *Nature*. 1992; 356: 601-604
18. Midtgaard J. Spatial synaptic integration in Purkinje cell dendrites. *J Physiol*. 1995; 89: 23-32
19. Fernandez AM, Carro EM, Lopez-Lopez C, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: addressing a common pathway in the pathological cascade? *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 50(1): 134-141

20. Watanabe Y, Kinoshita K, Koguchi A, Yamamura M. A new method for evaluation of motor deficits in 3-acetylpyridine-treated rats. *J Neurosci. Methods.* 1997; 77: 25-29
21. Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev.* 1993; 45: 309-379
22. Yoon KW, Covey DF, Rothman SM. Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol.* 1993; 464: 423-439
23. Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus HG, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF, Ruth P. Cerebellar ataxia and purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^{+} channel deficiency. *PNAS.* 2004; 101: 9474-9478
24. Cavalier P, Desplantez T, Beekenkamp H, Bossu JL. K^{+} channel activation and low-threshold Ca^{2+} spike of rat cerebellar purkinje cells in vitro. *Neuroreport.* 2003; 14: 167-171
25. Hille B. *Ion channels of excitable membrane.* 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA
26. Sacco T, Tempia F. A-type potassium currents active at subthreshold potential in mouse cerebellar Purkinje cells. *J Physiol.* 2002; 543.2: 505-520
27. Seo WS, Shin JH, Suh CK. 4-Aminopyridine (4-AP) augments Ca^{2+} dependent action potential and change oscillatory firing patterns in rat cerebellar Purkinje cells. *Yonsei Med. J.* 1999; 40: 112-117
28. Haghdoost Yazdi H, Janahmadi M, Behzadi G. The role of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in the modulation of 4-aminopyridine-induced burst firing in rat cerebellar Purkinje cells. *Brain Res.* 2007; 1156: 59-66
29. Perreault P, Avoli M. 4-Aminopyridine induced epileptiform activity and a GABA-mediated long lasting depolarization in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 1992; 12(1): 104-115
30. Perreault P, Avoli M. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 1991; 65: 771-785
31. Kita T, Kita H, Kitai ST. Effect of 4-Aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in vitro slice preparation. *Brain Res.* (1985); 361: 10-18
32. Avoli M, Perreault P, Olivier A, Villemure JG. 4-Aminopyridine induces a long lasting depolarizing GABAergic potential in human neocortical and hippocampal neurons maintained in vitro. *Neurosci. Lett.* 1998; 94: 327-332
33. Cavalier P, Pouille F, Desplantez T, Beekenkamp H, Bossu JL. Control of the propagation of dendritic low-threshold Ca^{2+} spikes in Purkinje cells from rat cerebellar slice cultures. *J Physiol.* 2002; 540.1: 57-72
34. Thesleff S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neurosci.* 1980; 5: 1413-1419
35. Spyker DA, Lynch C, Shabanowitz J, Jinn J. Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin Toxicol.* 1980; 16: 487-497
36. Szenté M, Baranyi A. Mechanism of aminopyridine-induced ictal seizure activity in the cat neocortex. *Brain Res.* 1987; 413: 368-373
37. Pham TM, Nurse S, Lacaille JC. Distinct GABAB action via synaptic and extrasynaptic receptors in rat hippocampus in vitro. *J. Neurophysiol.* 1998; 80: 297-308
38. Jarolimek W, Buak M, Misgeld U. Differences in the Cs^{+} block of baclofen and 4-aminopyridine induced potassium current of guinea pig CA3 neurons. *Synapse* 1994; 18: 169-177
39. Hounsgaard J, Nicholson C. Potassium accumulation around individual Purkinje cells in cerebellar slices of the guinea pig. *J Physiol. (Lond)* 1983; 340: 338-359
40. Haas H, Jefferys JGR. Low-calcium field bursts discharges of CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices. *J Physiol (Lond)* 1984; 354: 185-201