تاثیر امواج تحریکی شبه ذوزنقه‌ای بر جریان کلسیمی نوع L غشا جسم سلولی نورون F_1 حلزون باغی (Helix aspersa) در روش ثبت داخل سلولی (Voltage and Current Clamp)

تورانداخت بلوچ نژاد مجرد Ph.D.☆♦، مهیار جان احمدی Ph.D.★، مهرداد روغنی Ph.D.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز علوم پایه پزشکی، گروه فیزیولوژی

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

★ دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه فیزیولوژی

چکیده

* **هدف:** جریانهای یونی دارای رفتار غیرخطی و تحریکات الکتریکی است که می‌تواند در کینتیک فعال یا غیر فعال شدن آنها تأثیر بگذارد. سرعت مراحل دپلاریزه‌کننده و هیپرپلاریزه‌کننده امواج تحریک‌کننده می‌تواند با تأثیر بر ویژگیهای الکترو فیزیولوژیکی جریانهای یونی نحوه فعالیت نورونها را تغییر دهند. در این مطالعه اثر پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای بر ویژگیهای بیوفیزیکی کانال کلسیمی با آستانه بالا نوع L جسم سلولی نورون F_1 در حلزون باغی مورد مطالعه قرار گرفت.

* **مواد و روشها:** ۸ نورون F_1 با استفاده از دو شکل پتانسیل فرمانی راست‌گوشه و شبه ذوزنقه‌ای از پتانسیلهای نگهدارنده ۹۰- و ۴۰- میلی‌ولت تا ۹۰+ میلی‌ولت در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم دپلاریزه شدند. سپس نورونهای F_1 در حضور نیفدیپین، آنتاگونیست اختصاصی و انتخابی کانال کلسیمی با آستانه بالا نوع L، با استفاده از دو شکل پتانسیلهای فرمانی کلمپ شدند.

* **یافته‌ها:** در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای در مقایسه با پتانسیلهای فرمانی راست گوشه جریان کلسیمی را ۳۶ درصد کاهش داده و ولتاژ آستانه را به طرف پتانسیلهای مثبت‌تر سوق دادند. در حضور نیفدیپین با آنکه پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای در مقایسه با پتانسیلهای فرمانی راست‌گوشه موجب مثبت‌تر شدن ولتاژ آستانه شدند ولی در میزان حداکثر جریان تغییری به وجود نیاوردند.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که هیپرپلاریزاسیون آهسته مرحله پایین رو کلمپ ولتاژ با تأثیر بر کینتیک کانالهای یونی، موجب تغییر رفتار آنهامی‌گردد. شاید بتوان با استفاده از این شکل امواج و یا اشکال دیگر به طور الکترو فیزیولوژیک و بدون استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی موجب فعال و یا غیرفعال شدن انتخابی کانالهای یونی شد.

گل واژگان: پتانسیل فرمانی شبه ذوزنقه‌ای، جریان کلسیمی نوع L، نورون F_1، Voltage Clamp

مقدمه

در سلولهای تحریک پذیر جریان کلسیمی وابسته به ولتاژ نقش مهمی در اعمال متفاوت سلولی از جمله ترشح ماده میانجی، انقباض، تحریک پذیری الکتریکی، رشد و تمایز سلولی دارد (۶ - ۱).

در اکثر سلولها بیش از یک نوع جریان کلسیمی وجود دارد که هر یک ویژگی فارماکولوژیک و بیوفیزیکی خاص خود را دارد، به عنوان مثال در سلولهای عصبی (۷)، سلولهای ترشحی (۸) و سلولهای عضلانی (۹) مهره‌داران، دو نوع جریان کلسیمی با آستانه پایین[1] و با آستانه بالا[2] وجود دارد. مطالعات الکترو فیزیولوژیکی و فارماکولوژیک نشان می‌دهد که جریان کلسیمی با آستانه بالا در نورونهای محیطی دارای حداقل دو زیر گروه به نام N و L است. جریان کلسیمی نوع L به آگونیستها و آنتاگونیستهای مشتقات Dihydropyridine حساس است در حالی که جریان نوع N توسط V-conotoxin GVIA مهار می‌شود (۱۰، ۱۱، ۱۲). در نورونهای سیستم اعصاب مرکزی علاوه بر جریانهای کلسیمی نوع N و L جریانهای کلسیمی نوع P، Q و R نیز وجود دارد (۱۳، ۱۴). بررسی ویژگیهای کینتیکی کانالهای کلسیمی نقش هر یک از آنها را در پتانسیلهای غشایی، مدت، دامنه و الگوی ارسال پتانسیل عمل (Bursting or Beating) مشخص کرده است (۲۱ - ۱۵). از آنجایی که اشکال متفاوت پتانسیلهای فرمانی و سرعت دپلاریزه و یا هیپرپلاریزه کردن پتانسیل غشا می‌تواند کینتیک فعال و یا غیر فعال شدن کانالهای کلسیمی را تحت تأثیر قرار دهد لذا مقایسه اثر اشکال متفاوت پتانسیلهای فرمانی می‌تواند اطلاعات بیشتری در مورد رفتار کانالها در پتانسیلهای مختلف غشایی در اختیار ما قرار دهد. به عنوان مثال پتانسیلهای فرمانی راست گوشه، غشا را سریعاً دپلاریزه و هیپرپلاریزه می‌کنند و پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای در مقایسه با پتانسیلهای فرمانی راست گوشه می‌توانند با هیپرپلاریزاسیون آهسته غشا تأثیر متفاوتی بر ویژگیهای پتانسیل عمل داشته و تحریک‌پذیری سلول را تغییر دهند (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵). در مطالعه حاضر، تاثیر شکل امواج شبه ذوزنقه‌ای بر ویژگیهای الکترو فیزیولوژیک جریان کلسیمی نوع L غشا جسم سلولی نورون F_1 حلزون باغی گونه Helix aspersa در مقایسه باامواج راست گوشه بررسی شده است.

مواد و روشها

این مطالعه روی حلزونهای باغی (Iranian garden snail) گونه Helix aspersa از خانواده ترم‌تنان با وزن ۷/۴-۶/۱ گرم که از منطقه بابلسر در فصل بهار جمع‌آوری شده بودند انجام شد. حلزونها بلافاصله به آزمایشگاه گروه فیزیولوژی منتقل و شرایطی مشابه محل زیست آنها فراهم گردید. به علاوه حیوانات محدودیتی در دسترسی به غذا (برگ کلم) و آب نداشتند. کلیه آزمایشها بر روی نورون F_1 در گانگلیون پاریتال راست انجام شد. از چندین شاخص جهت شناسایی نورونهای F_1 استفاده شد که از آن جمله می‌توان از محل و اندازه نورون در سطح گانگلیون، وضعیت قرارگرفتن آن نسبت به اعصاب و فعالیت الکتریکی آن نام برد (۲۶). قبل از شروع هر آزمایش با قرار دادن حلزونهادر آب، شرایط فیزیولوژیکی یکسانی برای فعال کردن حلزونهای مورد استفاده فراهم می‌شد. برداشتن بافت پیوندی و جداکردن نورون F_1 بوسیله پنسهای بسیار ظریف و بدون استفاده از آنزیم پروتئولیتیک انجام می‌شد. پس از جداکردن نورون، آنرا در داخل محفظه نگهدارنده بافت با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر که داخل آن با یک الاستومر سیلیکون (Sylgard) پوشیده شده بود قرار می‌دادیم. تمام آزمایشها در حرارت ۲۳-۲۰ سانتیگراد و در داخل قفس Faraday ثبت می‌شد.

ثبت داخل سلولی برای اندازه‌گیری خواص غیر فعال (پتانسیل استراحت غشا، مقاومت و ظرفیت) و فعال غشا سلولهای عصبی و جریانهای یونی به کار می‌رود. در این کار تحقیقاتی ثبت داخل سلولی بااستفاده از دو میکروالکترود انجام شد. میکروالکترودها از لوله‌های موئینه بروسیلیکات دارای فیلامان داخلی (Clark Electromedical Instruments, UK) تهیه می‌شدند. میکروالکترودهای تزریق کننده جریان و ثبت کننده ولتاژ در داخل نگهدارنده‌های (Perspex) مجزایی که مستقیماً به پری‌آمپلی فایر (Headstage) متصل شده بودند قرار گرفته و در داخل هر میکروالکترود شیشه‌ای سیم نقره‌ای با قطر ۰/۸ میلی‌متر که بخشی از آن توسط روکش AgCl پوشیده شده بود (Ag/AgCl) قرار داده می‌شد. متوسط مقاومت نوک میکروالکترودها (Mean±SD) ۰/۶۳ ± ۶ مگا اهم بود. این میکروالکترودها با محلول کلریدپتاسیم سه مولار پر شده و به آمپلی فایر (Axon instruments, Inc Axoclamp2B Burlingame,USA) متصل می‌شدند. الکترود مرجع (پل آگاری) حاوی کلرید پتاسیم سه مولار و آگار حل شده در رینگر استاندارد، به منظور کاستن مقاومت سری در داخل محفظه نگه دارنده بافت، نزدیک به گانگلیون قرار داده می‌شد. جایگزینی محلولها با یکدیگر در داخل محفظه، از طریق یک پمپ پرفیوژن به سرعت ۴ میلی‌لیتر در دقیقه انجام می‌شد. پاسخ غشا سلول به صورت تغییرات ولتاژ با جریان با استفاده از یک مبدل آنالوگ به دیجیتال و دیجیتال به آنالوگ ۱۶ بیتی (LabMaster, Scientific solution) به صورت داده‌های رقمی در آمده و در یک کامپیوتر IBM Compatible از نوع Pentium ذخیره می‌گردید. تمهیدات نرم‌افزاری جهت ثبت و آنالیز بخشی از داده‌ها توسط دکتر محمد جعفرپور فیروزآبادی با استفاده از برنامه Matlab نوشته شده‌بود.

※ Current Clamp

Current - Clamp روشی است که در آن با تزریق منظم جریانهای راست گوشه دپلاریزه کننده یا هیپرپلاریزه کننده، می‌توان بدون آنکه پتانسیل غشا کلمپ شود تغییرات آن را مشاهده کرد به عبارت دیگر در این روش وسیله‌ای برای برانگیختن پاسخهای ولتاژی

1. Low-Voltage Activated
2. High-Voltage Activated

غشا فراهم می شود. در این مطالعه، پتانسیل عمل خود به خودی سلول در رینگر استاندارد قبل و بعد از حذف جریانهای سدیمی و پتاسیمی ثبت شد و ویژگیهای آن مورد بررسی قرار گرفت. مدت پتانسیل عمل در نصف حداکثر دامنه پتانسیل عمل (Half-maximal amplitude) از سطح پتانسیل استراحت غشا تا قله پتانسیل عمل محاسبه شدند.

* Voltage Clamp

در روش Voltage - Clamp جریان به عنوان یک محرک به کار برده می‌شود و تغییرات پتانسیل غشا اندازه گیری می‌گردد. در این مطالعه با استفاده از ولتاژ کلمپ دو الکترودی (Standard two Electrodes Voltage-Clamp)، ویژگیهای بیوفیزیکی و الکترو فیزیولوژیکی جریان کلسیمی با آستانه بالا نوع L مورد بررسی قرار گرفت. در روش اول برای کلمپ ولتاژ غشا جسم سلولی نورون F_1، پتانسیلهای فرمانی دپلاریزه‌کننده راست گوشه با مرحله بالارو و پایین‌رو مربعی و کفه ۳۹۰ میلی‌ثانیه‌ای (Rectangular Command potential) و در روش دوم برای کلمپ ولتاژ، پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای با مرحله بالارو مربعی، کفه ۳۹۰ میلی ثانیه‌ای و مرحله پایین رو نمایی (Exponential trailing phase) به کار گرفته شد. در هر دو روش پتانسیل غشا با استفاده از مراحل ۱۰ میلی‌ولتی به مدت ۳۹۰ میلی‌ثانیه از پتانسیلهای نگه دارنده ۴۰- و ۹۰- میلی‌ولت تا پتانسیل ۹۰+ میلی‌ولت دپلاریزه می‌شد. همراه با تغییر ولتاژ غشا، مهار کننده‌های جریانهای پتاسیمی و کلسیمی نیز به محلول خارج سلولی افزوده می‌شد.

محلولهای لازم برای آزمایش جریانهای کلسیمی ترکیب رینگر استاندارد خارج سلولی بقرار زیر بود:

NaCl (۸۰ میلی‌مولار)، $CaCl_2$ (۱۰ میلی‌مولار)، $MgCl_2$ (۵ میلی‌مولار)، KCl (۴ میلی‌مولار)، گلوکز (۱۰ میلی‌مولار) و HEPES[1] (۵ میلی‌مولار) (۲۷).

در محلول فاقد سدیم-پتاسیم، TEA[2] (۸۴ میلی‌مولار) جایگزین پتاسیم و سدیم خارج سلولی می‌شد همچنین جریانهای رو به خارج پتاسیمی، از طریق تزریق اینتفورز TEA آن به داخل جسم سلولی نورون F_1 (۰/۵ مولار، با جریان ۵+ نانوآمپر به مدت ۱۵ دقیقه)، و افزودن 4-AP[3] (۵ میلی‌مولار)، به محلول پرفیوژن نیز مهار می‌گردید. برای مهار جریان کلسیمی فعال شده در ولتاژهای بالا (HVA) از Nifedipine (۱ میکرومولار) محلول در اتانول ۰/۳ درصد به صورت خارج سلولی استفاده شد. اسمولاریته محلولهای مورد استفاده توسط اسمومتر (Osmo mat 030 Gonotec Co.) اندازه گیری شد. اسمولاریته رینگر استاندارد ۲۰۴/۲۵±۱/۷۰ و اسمولاریته رینگر فاقد سدیم و پتاسیم ۱۹۶/۳۳±۱/۴۵ میلی‌اسمول بر کیلوگرم آب بود. تنظیم pH محلولهای مورد استفاده در حد ۷/۸-۷/۶ از طریق Trizma hydrochloride و Trizma base انجام می‌شد. مواد شیمیایی مورد نیاز از کارخانه سیگما و آلدریچ تهیه شده‌بود.

* روشهای تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از کلمپ ولتاژ و ثابت زمانی فعال شدن و غیر فعال شدن جریان کلسیمی به کمک نرم افزار Matlab مورد بررسی قرار گرفت واز برنامه Excel و Spss و Instat برای محاسبه میانگین و انحراف معیار داده‌ها و رسم منحنی‌هااستفاده شد. برنامه آماری مورد استفاده Paired *t*-test بود و سطح معنی‌دار (P) کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. در داده‌های حاصل از ثبت Voltage-Clamp، برای استخراج جریان خالص کلسیمی، جریان ظرفیتی تا آنجا که ممکن بود با استفاده از Capacitance Neutralization کاهش داده می‌شد.

در این کار تحقیقاتی برای پردازش داده‌ها، از معادلات نمایی زیر استفاده شد:

$$I = A_0 + A_1 exp^{\frac{-t}{\tau_1}} + A_2 exp^{\frac{-t}{\tau_2}} + ...$$

که در این معادله A_0، A_1 و A_2 دامنه جریان در زمان صفر و τ زمان و τ_1 و τ_2 ثابت زمانی است. داده‌ها به صورت Mean±S.E.M ارائه گردیده‌است.

یافته‌ها

* ثبت پتانسیل‌های عمل کلسیمی در نورونهای F_1

ثبت پتانسیلهای عمل کلسیمی[4] در نورون F_1، پس از حذف جریانهای وابسته به ولتاژ رو به داخل سدیمی و رو به خارج پتاسیمی انجام شد. تحت این شرایط، زمانیکه پتانسیل استراحت غشا به طور متوسط ۱/۴±۳۵/۳- میلی‌ولت بود، پتانسیلهای عمل کلسیمی خود به خودی ظاهر می‌شدند (شکل ۱A، n=۸). وجود کفه در پتانسیلهای عمل کلسیمی آنها را از پتانسیل عمل خود به خودی سدیمی ثبت شده در رینگر استاندارد متمایز می‌کرد. از آنجایی که متوسط آستانه شلیک (Firing) ۱/۲۸±۳۲/۱۴- میلی‌ولت بود، می‌توان آنها را قله‌های کلسیمی با آستانه بالا (High threshold Ca^{2+} spikes) نامید (۳، ۱۷).

* ویژگیهای فارماکولوژیکی پتانسیل‌های عمل کلسیمی نورون F_1

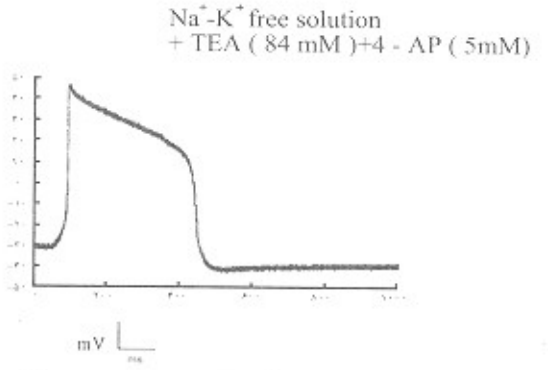
پتانسیلهای عمل کلسیمی نورون F_1 تنها پس از مهار جریانهای سدیمی و پتاسیمی ظاهر می‌شدند. افزودن مهارکننده اختصاصی جریان کلسیمی با آستانه بالا نوع L، نیفدیپین (۱ میکرومولار)، به محلول فاقد سدیم وپتاسیم (Na^+-K^+ free)، موجب کاهش دامنه ($P<0.01$) و زمان تأخیر آستانه پتانسیل عمل کلسیمی ($P<0.05$) و افزایش آستانه پتانسیل عمل کلسیمی ($P<0.05$) و حذف کفه شد (جدول ۱)، اما نتوانست آن را به طور کامل ازبین ببرد و فعالیت خود به خودی سلول ادامه داشت (شکل 1B).

1. 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic- acid
2. Tetraethylammonium chloride
3. 4-Aminopyridine
4. Calcium spikes

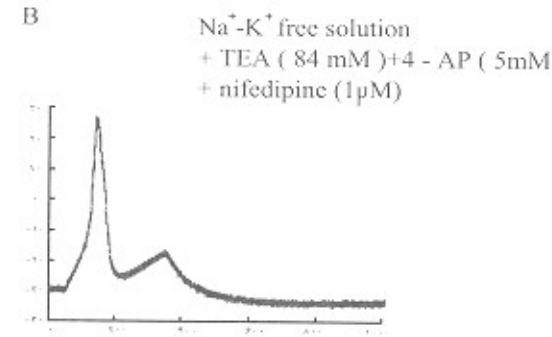
جدول ۱: بررسی ویژگیهای پتانسیل عمل خودبخودی نورون F_1 در رینگر استاندارد و رینگر فاقد سدیم و پتاسیم قبل و بعد از اضافه کردن نیفدیپین

ویژگیهای پتانسیل عمل / محلول	دامنه پتانسیل عمل (mV)	مدت پتانسیل عمل (ms)	فرکانس پتانسیل عمل (HZ)	آستانه پتانسیل عمل (mV)	زمان تاخیر عمل (ms)
رینگر استاندارد	۶۱/۵۳±۲/۲۸	۶/۰۷±۰/۸۹	۴/۱۴±۰/۷	-۳۳/۸۵±۲/۱۲	۲۲/۶۶±۵/۲۹
رینگر فاقد سدیم و پتاسیم	۷۵/۵±۳/۶۲**	۲۲۹/۶±۱۳/۳**	۱/۱±۰/۱**	-۳۱/۱۲±۱/۲۸	۹۷/۶±۵/۸۹**
رینگر فاقد سدیم و پتاسیم + نیفدیپین	۵۱/۳±۲/۰۳***+	۱۸۳/۸±۳/۴۷***+	۱/۲±۰/۲**	-۲۷±۱/۶*	۵۳/۲±۱۵/۲۲**

A



B



شکل ۱: فعالیت خود به خودی نورون F1 در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم قبل (A) و بعد از اضافه کردن نیفدیپتین به مایع خارج سلولی (B) ادامه می‌یابد.

بررسی ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک جریان کلسیمی با آستانه بالا نوع L در جسم سلولی نورون F_1 با استفاده از روش Two-electrode voltage clamp:

* الف - روش متداول استفاده از پتانسیلهای فرمانی دپلاریزه کننده راست گوشه

- در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم؛ پس از حذف جریانهای رو به خارج پتاسیمی و جریان رو به داخل سدیمی، ۶۵ درصد جریان رو به داخل باقی ماند که احتمالاً توسط یون کلسیم حمل می‌شد. به منظور شناسایی انواع کانالهای کلسیمی در جسم سلولی نورون F_1 از دو روش استفاده شد:

روش الکتروفیزیولوژیک

در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم برای تفکیک جریان کلسیمی با آستانه بالا از نوع L از جریان کلسیمی با آستانه پایین از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت استفاده شد. در پتانسیلهای فرمانی دپلاریزه کننده ۴۰- تا ۹۰+ میلی‌ولت، حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و ولتاژ آستانه به ترتیب ۰/۹۴±۳/۵۴- نانوآمپر، ۱/۰۲±۷/۱۷ و ۱/۶۶±۳۲/۵۳- میلی‌ولت و پتانسیل معکوس آن در حدود ۴۰+ میلی ولت بود. شکل 2A و 2B به ترتیب جریان رو به داخل کلسیمی را در ولتاژهای مختلف از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت و ارتباط ولتاژ - جریان را در این پتانسیل نگهدارنده نشان می‌دهد (n= ۸).

روش فارماکولوژیک

در این روش تأثیر آنتاگونیست اختصاصی و انتخابی جریان کلسیمی با آستانه بالا نوع L مورد بررسی قرار گرفت. در پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت، نیفدیپین (۱ میکرومولار)، آنتاگونیست اختصاصی کانالهای کلسیمی نوع L ۶۰ درصد جریان کلسیمی را مهار کرد و در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت، ۵۰ درصد جریان حداکثر بوسیله نیفدیپین مهار شد. در پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت متوسط حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و آستانه فعال شدن جریان مقاوم به نیفدیپین به ترتیب ۰/۳±۱/۷۸- نانوآمپر، ۳/۷۳±۲/۷۸ و ۲/۵۰±۲۸/۹۴- میلی‌ولت بود و پتانسیل معکوس آن در حدود ۳۸+ میلی‌ولت بود (شکل 3A ؛ n = ۷). در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت متوسط حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و آستانه فعال شدن این جریان به ترتیب ۰/۴۰±۱/۷۷- نانوآمپر، ۱/۶۶±۴/۱۷ و ۱/۹۵±۲۷/۸۵- میلی‌ولت بود و پتانسیل معکوس آن در حدود ۳۵+ میلی‌ولت بود (شکل 4A؛ n= ۷)

ثابت زمانی فعال شدن و غیر فعال شدن جریان کلسیمی

در حضور ۱۰ میلی‌مولار کلسیم خارج سلولی، ثابت زمانی فعال شدن و افت جریان کلسیمی در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت با استفاده از بیش از یک جزء نمایی (Exponential component) به دست آمد (n>1)، به عبارت دیگر فعال و غیر فعال شدن جریان کلسیمی مستلزم بیش از یک ثابت زمانی بود. ثابت زمانی فعال شدن جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L در ۲۱- میلی‌ولت، ۰/۳۳±۳/۰۶

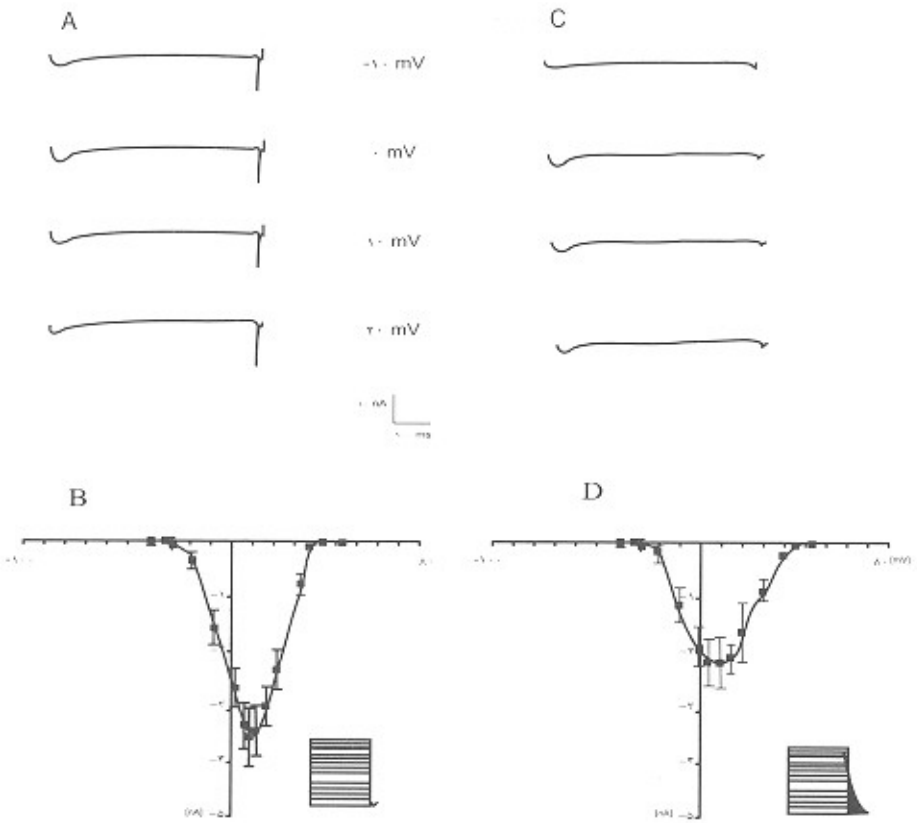
میلی‌ثانیه و در ۱۰+ میلی‌ولت، ۴۶/۰ ± ۱/۱ میلی‌ثانیه بود، چنانکه در پتانسیلهای مثبت‌تر سرعت فعال شدن جریان کلسیمی بیشتر می‌شد.

افت جریان کلسیمی به کاهش این جریان در طول دپلاریزاسیون غشا بوسیله پتانسیلهای فرمانی اطلاق می‌شود. این پدیده را می‌توان به صورت کاهش جریان در طول دپلاریزاسیون یا کاهش حداکثر جریان کلسیمی در طول مرحله بعدی دپلاریزاسیون دید. از طرف دیگر ثابت زمانی افت جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L در ۱۰- میلی‌ولت، ۴۱/۱ ± ۱۵/۳ میلی‌ثانیه و در صفر میلی‌ولت، ۱۰۵ ± ۱۹/۵ میلی‌ثانیه بود، به عبارت دیگر سرعت غیر فعال شدن جریان کلسیمی بسیار

فارماکولوژیک استفاده شد:

روش الکتروفیزیولوژیک

در این روش اثر پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت بر جریان کلسیمی مورد بررسی قرار گرفت. از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت (۴۰- تا ۹۰+ میلی‌ولت)، حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و ولتاژ آستانه به ترتیب ۴۱/۰ ± ۲/۲۹- نانوآمپر، ۲/۶۹ ± ۴/۴۱ و ۲/۵۳ ± ۲۸/۷۵- میلی‌ولت و پتانسیل معکوس آن در حدود ۵۰+ میلی‌ولت بود (شکل 2C و 2D).



شکل ۲: ثبت جریانهای کل رو به داخل کلسیمی (↗) جسم سلولی نورون فعالیت خود به خودی نورون F_1 در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم قبل (2A) و ارتباط جریان آنها (2B) در رینگر فاقد سدیم پتاسیم. ثبت کل جریانهای رو به داخل کلسیمی (↑) جسم سلولی نورون F_1 در پتانسیلهای فرمانی نیمه ذوزنقه‌ای مختلف از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- ملی ولت (2C) و ارتباط جریان - ولتاژ آنها (2D) در رینگر فاقد سدیم - پتاسیم

کمتر از سرعت فعال شدن آن بود. در پتانسیلهایی که نسبت بزان جریان کلسیمی به اغتشاش (Signal/Noise) بسیار کم بود (منفی‌تر از ۱۰- میلی‌ولت و مثبت‌تر از ۲۰ میلی‌ولت) عمل برازش انجام شدنی نبود.

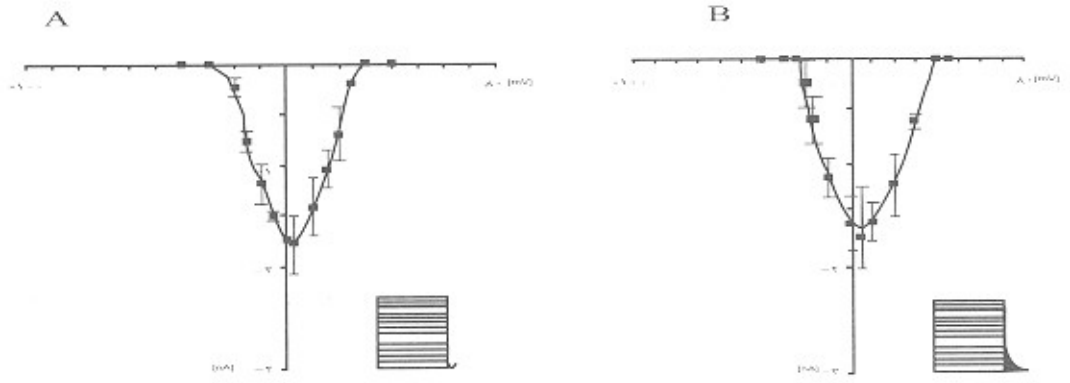
* ب - روش جدید استفاده از پتانسیلهای فرمانی دپلاریزه‌کننده شبه ذوزنقه‌ای

در رینگر فاقد سدیم و پتاسیم به منظور شناسایی انواع کانالهای کلسیمی در جسم سلولی نورون F_1 با استفاده از پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای همچون روش متداول، از روش الکترو فیزیولوژیک و

روش فارماکولوژیک

- در حضور نیفدیپین از پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت متوسط حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و آستانه فعال شدن جریان مقاوم به نیفدیپین به ترتیب ۷۸/۰ ± ۱/۶۱- نانوآمپر، ۳/۶۵ ± ۴/۶۴ و ۳/۶۷ ± ۲۴/۰۷- میلی‌ولت بود و پتانسیل معکوس آن در حدود ۴۵+ میلی‌ولت بود (شکل 3B؛ n = ۷).

از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت متوسط حداکثر جریان، ولتاژ حداکثر جریان و آستانه فعال شدن این جریان به ترتیب ۴۵/۰ ± ۱/۳۶- نانوآمپر، ۵/۹۴ ± ۲/۵۰ و ۲/۳۹ ± ۲۲/۰۵- میلی‌ولت بود و پتانسیل معکوس آن در حدود ۴۵+ میلی‌ولت بود (شکل 4B).



شکل ۳: ارتباط جریان - ولتاژ جریان کلسیمی مقاوم به نیفدیپین جسم سلولی نورون F_1 در پتانسیلهای فرمانی راست گوشه مختلف از پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت (A) و ارتباط جریان - ولتاژ این در پتانسیلهای فرمانی نیمه ذوزنقه‌ای مختلف از پتانسیل نگهدارنده ۹۰- میلی‌ولت (B) پس از افزودن نیفدیپین (۱ میکرومولار) به رینگر فاقد سدیم - پتاسیم

شکل ۴: ارتباط جریان - ولتاژ جریان کلسیمی مقاوم به نیفدیپین جسم سلولی نورون F_1 در پتانسیلهای فرمانی راست گوشه مختلف از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت (A) و ارتباط جریان - ولتاژ این جریان در پتانسیلهای فرمانی نیمه ذوزنقه‌ای مختلف از پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت (B) پس از افزودن نیفدیپین (۱ میکرومولار) به رینگر فاقد سدیم - پتاسیم

جدول ۲: مقایسه ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک جریانهای رو به داخل جسم سلولی نورون F_1 در پتانسیلهای نگهدارنده ۹۰- و ۴۰- میلی‌ولت در رینگر استاندارد و رینگر فاقد سدیم و پتاسیم قبل و بعد از اضافه کردن نیفدیپین با استفاده از پتانسیلهای فرمانی نیمه ذوزنقه‌ای و مستطیلی

		پتانسیل نگهدارنده (mV)	رینگر استاندارد	رینگر فاقد سدیم - پتاسیم	رینگر فاقد سدیم- پتاسیم + نیفدیپین
استانه جریان (mV)	Rectangular	-۹۰	-۴۴/۵±۶/۵۲	-۳۷/۸۷±۴/۱۱	-۲۸/۹۴±۲/۵۰
	Quasitrapezoidal	-۹۰	-۵۳/۴۲±۵/۲۰	-۳۵/۲۷±۳/۸۳	-۲۴/۰۷±۳/۶۷
ولتاژ جریان حداکثر (mV)	Rectangular	-۹۰	-۱/۶۳±۰/۷۳	۶/۱۴±۱/۲۲	۲/۷۸±۰/۷۴
	Quasitrapezoidal	-۹۰	-۱۰/۶±۳/۲۱	۵/۲۸±۱/۲۷	۴/۶۴±۳/۶۵
جریان حداکثر (nA)	Rectangular	-۹۰	-۵/۶۵±۰/۵۲	-۴/۳۶±۰/۵۰	-۱/۷۸±۰/۳۰
	Quasitrapezoidal	-۹۰	-۶/۱۵±۱/۱۵	-۲/۸۱±۰/۹۴	-۱/۶۱±۰/۷۸
استانه جریان (mV)	Rectangular	-۴۰	-۳۳/۵۰±۱/۷۹۵۵	-۲۲/۵۳±۱/۶۶	-۲۷/۸۵±۱/۹۵۵
	Quasitrapezoidal	-۴۰	-۴۳/۳۸±۱/۵۳	-۲۸/۷۵±۲/۵۳	-۲۲/۰۵±۲/۳۹
ولتاژ جریان حداکثر (mV)	Rectangular	-۴۰	-۵/۳۷±۱/۲۰	۷/۱۷±۱/۲۰	۳/۱۷±۱/۶۲
	Quasitrapezoidal	-۴۰	-۸/۳۳±۲/۵۳	۴/۴۱±۲/۶۹	۵/۹۲±۲/۵۰
جریان حداکثر (nA)	Rectangular	-۴۰	-۴/۲۵±۱/۲۰	۳/۵۴±۰/۵۴	-۱/۷۷±۰/۴۰
	Quasitrapezoidal	-۴۰	-۳/۶۱±۱/۳۳	-۲/۲۹±۰/۴۱	-۱/۳۶±۰/۴۵

ثابت زمانی فعال شدن و غیر فعال شدن جریان کلسیمی ثبت شده با استفاده از پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای:

در حضور ۱۰ میلی‌مولار کلسیم خارج سلولی، ثابت زمانی فعال و غیرفعال شدن جریان کلسیمی در پتانسیلهای نگهدارنده ۹۰- و ۴۰- با استفاده از بیش از یک جزء نمایی (Exponential component) به دست آمد ($n>1$). ثابت زمانی فعال شدن جریان کلسیمی در ۲۱- میلی‌ولت، ۴/۱۱±۱/۱۷ میلی‌ثانیه و در ۱۰+ میلی‌ولت، ۲/۱۵±۰/۹۷ میلی‌ثانیه بود، چنانکه در پتانسیلهای مثبت‌تر سرعت فعال شدن جریان کلسیمی بیشتر می‌شد.

ثابت زمانی افت جریان کلسیمی در ۲۱- میلی‌ولت،

۱۲/۲۲±۵۶/۰۱ میلی‌ثانیه و در ۲۳+ میلی‌ولت، ۰/۷۹±۱۶۴/۴۴ میلی‌ثانیه بود. در حضور نیفدپین ثابت زمانی فعال شدن جریان کلسیمی مقاوم به نیفدپین ثبت شده به وسیله پتانسیلهای فرمانی راست گوشه و شبه ذوزنقه‌ای در ۲۴- میلی‌ولت به ترتیب ۰/۵۴±۱/۵۲ و ۰/۶۶±۳/۹۹ میلی‌ثانیه و در ۴+ میلی‌ولت به ترتیب ۴/۱۵±۹/۰۵ و ۲/۶۹±۱۶/۳۱ میلی‌ثانیه بود. ثابت زمانی افت این جریان در ۵+ میلی‌ولت به ترتیب ۱/۳۸±۱۴/۲۷ و ۶/۷۷±۷۶/۸۹ میلی‌ثانیه بود.

خلاصه نتایج حاصل از کلمپ ولتاژ به وسیله دو روش تحریکی متداول در جدول ۲ آمده است.

بحث

در حال حاضر یکی از روشهای متداول جهت فعال ساختن مجزا و متناوب دو گروه از اکسونها در یک تنه عصبی استفاده از امواج شبه ذوزنقه‌ای و راست گوشه برای تحریک اکسونهای کوچک و بزرگ می‌باشد (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵)، با وجود استفاده گسترده از امواج نیمه ذوزنقه‌ای در تحریک انتخابی فیبرهای عصبی، تاکنون مکانیسم تأثیر مستقیم این امواج بر جریانهای یونی غشا مورد بررسی قرار نگرفته است. از آنجایی که جریانهای یونی غیر خطی می‌باشند و تحت تأثیر ویژگیهای امواج تحریک کننده قرار می‌گیرند، بنابراین به نظر می‌رسد تغییر شکل پتانسیلهای فرمانی دپلاریزه کننده برای کلمپ ولتاژ بتواند با تأثیر بر کینتیک فعال و یا غیر فعال شدن کانالهای یونی غشا موجب تغییر رفتار آنها شده و عملکرد هر یک از آنها را در شرایط مختلف روشن سازد. در این مطالعه جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L جسم سلولی نورون F_1 با استفاده از Two electrode voltage clamp و مهارکننده‌های کانالهای وابسته به ولتاژ پتاسیمی و کلسیمی ثبت شدند و تأثیر دو شکل متفاوت از پتانسیلهای فرمانی بر ویژگیهای الکترو فیزیولوژیکی این جریان بررسی شد.

- مقایسه اثر دو شکل از پتانسیلهای فرمانی بر جریان رو به داخل کلسیمی با آستانه بالای نوع L در جسم سلولی نورون F_1.

نتایج حاصل از کلمپ ولتاژ به وسیله هر دو شکل از پتانسیلهای فرمانی نشان داد که در جسم سلولی نورون F_1 پس از حذف جریانهای رو به خارج پتاسیمی و جریان رو به داخل سدیمی، جریان رو به داخل باقیمانده که تقریباً ۴۰ تا ۶۵ درصد کل جریان رو به داخل را به خود اختصاص می‌دهد متعلق به جریان رو به داخل کلسیم است زیرا این جریان تنها در شرایطی آشکار می‌شود که جریانهای رو به خارج پتاسیمی و جریان رو به داخل سدیمی مهار شود. به علاوه از آنجایی که افزودن نیفدپین مهارکننده اختصاصی جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L موجب مهار تقریباً ۳۷ تا ۶۲ درصد جریان کلسیمی می‌گردد می‌توان نتیجه گرفت که ۳۷ تا ۶۲ درصد جریان کلسیمی غشا جسم سلولی نورون F_1 از نوع جریان کلسیمی با آستانه بالای نوع L می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که جسم سلولی نورون F_1 دارای حداقل دو نوع جریان کلسیمی با آستانه بالا (جریان حساس به نیفدپین یا نوع L و احتمالاً جریان نوع N) است. ویژگیهای الکترو فیزیولوژیکی این جریانها که از طریق پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای از پتانسیلهای نگهدارنده ۹۰- و ۴۰- میلی‌ولت (به ویژه ۴۰- میلی‌ولت) ثبت شده‌اند با آنچه با استفاده از پتانسیلهای فرمانی راست گوشه ثبت شده‌اند یکسان نیست چنانکه پتانسیل فرمانی شبه ذوزنقه‌ای ولتاژ آستانه جریان کلسیمی را مثبت‌تر (۲ تا ۴ میلی‌ولت) و ولتاژ جریان حداکثر را منفی‌تر (۱ تا ۳ میلی‌ولت) ساخت. به علاوه میزان جریان کلسیمی که بوسیله پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای حاصل می‌شد ۳۶ درصد ($P<0.05$) کمتر از آنچه که بوسیله پتانسیلهای فرمانی‌راست گوشه ثبت می‌شد بود. به نظر می‌رسد که با توجه به ثابت زمانی افت جریان کلسیمی، مرحله پایین رو نمایی پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای به تدریج تعداد کانالهای کلسیمی که قادر به باز شدن از طریق مرحله بالارو مربعی بعدی می‌باشند را کاهش می‌دهد و در هر مرحله تعداد کانالهایی که در مرحله غیر فعال خود می‌باشند را افزایش می‌دهد. به عبارت دیگر افت آهسته پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای De-inactivation کانالهای کلسیمی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همانطور که اشاره شد از آنجائیکه این نتایج در پتانسیل نگهدارنده ۴۰- میلی‌ولت قابل ملاحظه‌تر بود بنابراین به نظر می‌رسد نتایج مشاهده شده بیشتر به علت تأثیر پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای بر جریانهای کلسیمی HVA از جمله نوع L باشد. در حضور نیفدپین، پتانسیل فرمانی شبه ذوزنقه‌ای ولتاژ آستانه جریان مقاوم به نیفدپین و ولتاژ حداکثر جریان را مثبت‌تر کرده (۴ تا ۵ میلی‌ولت) ولی مقدار جریان ثبت شده از طریق این پتانسیلها با آنچه که بوسیله پتانسیلهای راست گوشه ثبت می‌شد تفاوت چندانی نداشت. با توجه به ثابت زمانی افت جریان مقاوم به نیفدپین به نظر می‌رسد مرحله نمایی پتانسیل فرمانی نیمه ذوزنقه‌ای این جریان کلسیمی را آهسته‌تر غیر فعال ساخته است به همین دلیل با آنکه پتانسیلهای فرمانی شبه ذوزنقه‌ای جریان کلسیمی مقاوم به نیفدپین را با سرعت کمتر فعال ساخته و به حداکثر خود رسانده است ولی میزان جریان به دست آمده از طریق دو نوع پتانسیل فرمانی تقریباً یکسان هستند.

تجربه حاضر نشان داد که می‌توان با استفاده از اشکال متفاوت امواج کلمپ کننده ولتاژ نه تنها اطلاعات بیشتری از کینتیک کانالهای یونی به دست آورد بلکه بدون استفاده از عوامل شیمیایی و تنها با تغییر برخی از ویژگیهای بیوفیزیکی کانالها می‌توان بر نحوه عملکرد آنها تأثیر گذاشت و بدین ترتیب می‌توان کانال خاصی را فعال یا غیرفعال نمود.

References

1. Chen L, El-sherif N, Boutjdir M: Unitary current analysis of L-type Ca^{2+} channels in human fetal ventricular myocyte. J Cardiovascular Electrophysiol 1999; 10(4): 692-700

2. Fieber LA: Characterization of Na^{+} and Ca^{2+} currents in bag cells of sexually immature aplysia californica. J Exp Biol 1998; 201: 745-754

3. Foehring RC, Armstrong WE: Pharmacological

dissection of high-voltage-activated Ca^{2+} current types in acutely dissociated rat supraoptic magnocellular neurons. J Neurophysiol 1996; 76(2): 977-983
4. Gao BX, Ziskind-Conhainn L: Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. J Neurophysiol 1998; 80(6): 3047-3061
5. Haydon PG, Man-Son-Hing H: Low- and High-Voltage-Activated calcium currents: Their relationship to the site of neurotransmitter release in an identified neuron of Helisoma. Neuron 1988; 1: 919-927
6. Huang SJ, Robinson DW: Activation and inactivation properties of voltage-gated calcium currents in developing cat retinal ganglion cells. Neuroscience 1998; 85(1): 239-247
7. Yarri Y, Hamon B, Lux HD: Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. Science 1987; 235: 680-682
8. Matteson DR, Armstrong CM: Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. J Gen Physiol 1986; 87: 161-182
9. Benham CD, Hess P, Tsien RW: Two types of calcium channels in single muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. Cir Res 1987; 61: 1-10, 1-16
10. Yu B, Shinnick-Gallagher P: Dihydropyridine and neurotoxin-sensitive and insensitive calcium currents in acutely dissociated neurons of the rat central amygdala. J Neurophysiol 1997; 77(2): 690-701
11. Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ: Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. Trends in Neuroscience 1995; 18: 89-98
12. Kammermeier PJ, Jones SW: High-voltage activated calcium currents in neurons acutely isolated from the ventrobasal nucleus of the rat thalamus. J Neurophysiol 1997; 77(1): 465-475
13. Mintz IM, Adams ME, Bean BP: P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. Neuron 1992; 9: 85-95
۱۴. بلوچ نژاد مجرد تورانـدخت، جـان احـمدی مـهیار: بـررسی ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک و فارماکولوژیک جریانهای کلسیمی و نـقش آنـها در تـحریک پـذیری سـلول F_1 در حـلزون بـاغی (Helix aspersa) بـا اسـتفاده از روش ثـبت داخـل سـلولی (Current and Voltage - Clamp). پـــژوهنده ۱۳۷۸؛ ۱۴: ۱۳۰-۱۲۱
15. Raman IM, Bean BP: Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar purkinje neurons. J Neurosci 1999; 19(5): 1663-1674
16. Shuttleworth CW, Smith TK: Action potential-dependent calcium transients in myenteric S neurons of the guinea-pig ileum. Neuroscience 1999; 92(2): 751-762
17. Sundgren-Andersson AK, Johansson S: Calcium spikes and calcium currents in neurons from themedial preoptic nucleous of rat. Brain Res 1998; 783: 194-209
18. Tennigkeit F, Schwarz DW, Puil E: Modulation of bursts and high-threshold calcium spikes in neurons of rat auditory thalamus. Neuroscience 1998; 83(4): 1063-1073
19. Viana F, Bayliss DA, Berger AJ: Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. J Neurophysiol 1993; 69: 2137-2149
20. Zhan XJ, Cox CL, Rinzel J, Sherman SM: Current clamp and modeling studies of low-threshold calcium spikes in cells of the cat's lateral geniculate nucleus. J Neurophysiol 1999; 81(5): 2360-2373
21. Swandulla D, Lux HD: Activation of a nonspecific cation conductance by intracellular Ca2+ elevation in bursting pacemaker neurons of Helix pomatia. J Neurophysiol 1985; 54: 1430-1443
22. Fang ZP, Mortimer JT: Alternate excitation of large and small axons with different stimulation waveform: an application to muscle activation. Med Biol Eng Comput 1991a; 29: 543-547
23. Fang ZP, Mortimer JT: Selective activation of small motor axons by quasitrapezoidal current pulses. IEEE Trans Biomed Eng 1991b; 38: 168-174
24. Gorman PH, Mortimer JT: Effect of stimulus parameters on recruitment with direct nerve stimulation. IEEE Trans Biomed Eng 1986; 30: 407-414
25. Fang ZP, Mortimer JT: A method to effect physiological recruitment order in electrically activated muscle. IEEE Trans Biomed Eng 1991c; 35(2): 175-179
26. Kerkut GA, Lambert JDC, Gayton RJ, Loker JE, Walker RJ: Mapping of nerve cells in the sub-oesophageal ganglia of Helix aspersa. Comp Biochem Physiol 1975; 50A: 1-25
27. Taylor PS: Selectivity and patch measurement of A-current in Helix aspersa neurones. J Physiol 1987; 388: 437-447