

## مقایسه‌ی تحریک‌پذیری نورون‌های هیپوکمپ در مراحل موضعی و عمومی تشنج‌های ایجاد شده به روش کیندلینگ در موش صحرایی

حمیرا مرادی چمه<sup>۱</sup>، سعید سمنائیان<sup>۲</sup>، مهیار جان احمدی<sup>۳</sup>، امیر شجاعی<sup>۱</sup>، اعظم عسگری<sup>۱</sup>، سید جواد میرنجفی زاده<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی دکترای گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup>استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup>استاد مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

\*نشانی نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، دکتر سیدجواد میرنجفی زاده

E-mail: mirnajaf@yahoo.com @modares.ac.ir

وصول: ۹۳/۶/۳۰، اصلاح: ۹۳/۸/۲۵، پذیرش: ۹۳/۹/۱۲

### چکیده

**زمینه و هدف:** کیندلینگ آمیگدال با تغییر در ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک سلول‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ همراه است. اما به‌درستی مشخص نیست که بروز این تغییرات در طی روند کیندلینگ آمیگدال از چه زمانی و در کدام مرحله تشنجی رخ می‌دهد. بنابراین، در این تحقیق ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نورون‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ به دنبال کیندلینگ موضعی آمیگدال، بررسی و با تغییرات ایجاد شده در کیندلینگ کامل مقایسه شد.

**مواد و روشها:** حیوانات با روش کیندلینگ سریع با اعمال پالس‌های مربعی ۱ میلی ثانیه‌ای، فرکانس ۵۰ هرتز، ۱۲ بار در روز، به مدت ۳ ثانیه و با فواصل ۵ دقیقه‌ای تحریک می‌شدند. در یک گروه از حیوانات با مشاهده‌ی مرحله‌ی ۲ تشنج (گروه کیندلینگ موضعی) و در گروهی دیگر با مشاهده مرحله‌ی ۵ تشنج (کیندلینگ کامل) تحریکات متوقف و ۲۴ ساعت بعد ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ به روش Whole-Cell Patch Clamp بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از کیندلینگ آمیگدال نشان داد شاخص سازش، رتوباز، زمان تاخیری تا وقوع اولین پتانسیل عمل و دامنه‌ی هیپرپلاریزاسیون متعاقب در گروه کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل نسبت به گروه کنترل به طور معناداری، کاهش و تعداد پتانسیل عمل افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان می‌دهند با وجود این که گروه کیندلینگ موضعی نسبت به گروه کیندلینگ کامل تحریکات کمتری دریافت می‌کند، اما همانند گروه کیندلینگ کامل، ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نورون‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ را تغییر داده و باعث افزایش تحریک‌پذیری این نورون‌ها می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** کیندلینگ موضعی آمیگدال، تشنج، نورون‌های هرمی هیپوکمپ، ثبت Whole Cell Patch Clamp

### مقدمه

ناگهانی و همزمان مجموعه‌ای از نورون‌ها همراه می‌باشد.

شایع‌ترین فرم صرع، صرع لوب گیجگاهی در

صرع، یک بیماری مزمن است که با تخلیه‌های

بالغینی است که به درمان مقاوم هستند (۳-۱) و معمولاً به دنبال اختلالات مغزی نظیر سکت، تروما و بیماری‌های نورودژنراتیو ایجاد می‌شود. یکی از مدل‌های آزمایشگاهی برای بررسی صرع، کیندلینگ می باشد که به دو نوع شیمیایی و الکتریکی تقسیم می‌گردد. در کیندلینگ الکتریکی، تحریکات الکتریکی ضعیف با فواصل زمانی مشخص به منطقه‌ی خاصی از مغز اعمال می‌شود. در ابتدا این محرک ضعیف قادر به ایجاد تشنج نیست، ولی به مرور زمان همان تحریک ضعیف سبب رفتار تشنجی کلینیکی در حیوان می‌گردد. کیندلینگ به‌عنوان مدل مناسبی برای صرع موضعی پیچیده که به‌طور ثانویه عمومی می‌شود معرفی شده است. در کیندلینگ الکتریکی تحریکات می‌بایستی قادر به ایجاد تخلیه‌های متعاقب (Afterdischarge) که ناشی از فعالیت همزمان گروهی از نورون‌هاست، باشند (۵، ۶). در طی روند کیندلینگ، امواج تخلیه‌ی متعاقب در ابتدا محدود به ناحیه‌ی تحریک شده است، اما پس از اعمال چندین تحریک این امواج در مسیرهای نورونی نزدیک کانون منتشر می‌شوند.

کیندلینگ موضعی، یک مدل آزمایشگاهی برای صرع لوب گیجگاهی است که ناشی از فعالیت گروه کوچکی از نورون‌های یکی از نیمکره‌های مغز بوده که کانون تشنج را تشکیل می‌دهد. علایم تشنجات کانونی بستگی به محل کانون تشنج دارد و می‌تواند شامل علایم حسی، حرکتی و اتونوم باشد و ممکن است در آن تشنج مشاهده نشود. در کیندلینگ موضعی، تخلیه‌های متعاقب به نواحی دورتر از کانون گسترش نمی‌یابد (۵) و کاهش تعداد سلول‌ها مشاهده نمی‌شود (۶). مرحله‌ای از روند کیندلینگ که تشنج‌ها محدود به کانون تحریک می‌باشند، کیندلینگ موضعی نامیده می‌شود. در کیندلینگ موضعی حیوانات مراحل رفتاری ۲ و ۳ تشنج را نشان می‌دهند (۷).

در حیوان کامل کیندل شده تحریکات کیندلینگ باعث تشنجات تونیک - کلونیک می‌شود، درحالی‌که در کیندلینگ موضعی بعد از تحریکات کیندلینگ تشنجات

تونیک و کلونیک مشاهده نمی‌شود.

در بین نواحی مختلف مغز، هیپوکمپ ناحیه‌ی مهمی در گسترش و تقویت امواج تشنجی است و در صرع لوب گیجگاهی تغییرات زیادی در فعالیت نورون‌های این ناحیه مشاهده می‌شود (۸). وایسر و همکاران Wieser در سال ۱۹۸۸ دریافتند که دو ناحیه‌ی زیر قشری هیپوکمپ و آمیگدال نقش مهمی در شروع تشنج دارند. نتایج ثبت‌های آن‌ها نشان داد که ۲۵ درصد تشنجات در صرع لوب گیجگاهی از هیپوکمپ، ۱۰ درصد از آمیگدال و ۶۵ درصد از این دو ناحیه به‌طور همزمان شروع می‌شوند. آستانه‌ی تشنج در هیپوکمپ و آمیگدال پایین می‌باشد و شاید این امر در مقاوم بودن این نواحی به داروهای ضد صرعی نقش داشته باشد (۹).

یکی از عوامل مؤثر در روند کیندلینگ، تعداد تحریکات می‌باشد. نشان داده شده که در طی روند کیندلینگ فعالیت حرکتی حیوانات با تعداد تحریکات رابطه‌ی مستقیم دارد (۱۰). با افزایش تعداد تحریکات و تشدید مراحل رفتاری تشنج، ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نورون‌ها علاوه بر کانون تحریک، در نواحی از مغز که از نظر آناتومیکی دورتر از کانون تحریک هستند ولی ارتباط آناتومیکی نزدیکی با کانون تحریک دارند، تغییر می‌کند (۱۱). اما به‌درستی مشخص نیست که این تغییرات الکتروفیزیولوژیک آیا پس از ایجاد کیندلینگ کامل در حیوانات قابل مشاهده است یا این‌که در مراحل قبل از آن نیز چنین تغییراتی ایجاد می‌شود. بنابراین در این تحقیق ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ در موش‌هایی که با تحریک الکتریکی آمیگدال مرحله‌ی ۲ (کیندلینگ موضعی) یا مرحله‌ی ۵ (کیندلینگ کامل) را نشان دادند، مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد

Wistar با محدوده‌ی وزنی ۸۰ تا ۹۰ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور کرج، تهیه و به صورت منفرد در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. دوره‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته رعایت می‌شد. آب و غذا آزادانه در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت. تمامی مراحل کار براساس پروتکل کار با حیوانات آزمایشگاهی تدوین شده از سوی کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفت.

### جراحی حیوانات و ایجاد مدل کیندلینگ

هر حیوان با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش شد. پس از بیهوش شدن حیوان، موهای سر آن، کوتاه و سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) ثابت شد. پس از شست‌وشوی پوست سر حیوان با بتادین، با استفاده از تیغ جراحی از فاصله‌ی بین دو چشم تا بین گوش‌ها برش داده شد. سپس پوست و فاسیای زیر آن کاملاً کنار زده تا سطح استخوان جمجمه و نقطه برگما مشخص شود. پس از مشخص شدن نقطه‌ی برگما، براساس اطلس واتسون و پاکسینوس (Watson and Paxinos (۱۲)، مختصات هسته‌ی قاعده‌ای - جانبی آمیگدال  $(\pm 2/4\text{mm})$ ،  $V = \frac{1}{\sqrt{2}}\text{mm}$  نسبت به پرده‌ی سخت شامه) که محل قرارگیری نوک الکتروده سه قطبی است، روی سطح استخوان جمجمه به دقت تعیین و سپس با مته‌ی دستی آن نقطه سوراخ گردید و الکتروده ۳ قطبی تحریک و ثبت در ناحیه‌ی قاعده‌ای - جانبی آمیگدال در نیمکره‌ی راست قرار گرفت. الکترودها از جنس فولاد ضد زنگ با پوشش تفلون و قطر ۱۲۷ میکرومتر (A.M System, USA) بودند. سپس دو الکتروده تک قطبی ( الکترودهای مرجع و زمین) با استفاده از پیچ لحیم شده به آنها، بر روی جمجمه در لوب پیشانی متصل شدند. دو پیچ کوچک دیگر برای استحکام روی نقاط دیگری از جمجمه وصل، و الکترودها و پیچ‌ها به وسیله‌ی سیمان دندان پزشکی روی سطح جمجمه ثابت شدند. در پایان

کارگذاری الکترودها، پین‌های متصل به آنها داخل مادگی سوکت مخابراتی قرار داده و سوکت توسط سیمان دندان- پزشکی به روی سر حیوان محکم شد.

پوست سر حیوان در سمت پس سری بخیه زده شد. پس از جراحی، یک هفته تا ده روز برای ترمیم زخم‌ها به حیوان استراحت داده شد.

پس از طی دوره‌ی بهبودی، برای ایجاد تشنج از روش کیندلینگ سریع استفاده شد. در این روش حیوانات با موج مربعی تک‌فازی با مدت پالس ۱ میلی ثانیه، فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه‌ی تولید امواج تخلیه‌ی متعاقب و به مدت ۳ ثانیه تحریک شدند. این تحریکات به فاصله‌ی هر ۵ دقیقه یک بار و ۱۲ بار در روز اعمال گردید. در گروهی از حیوانات (گروه کیندلینگ موضعی) اعمال تحریکات تا زمان بروز مرحله‌ی ۲ تشنج ادامه یافت. اما در گروهی دیگر (گروه کیندلینگ کامل) این تحریکات تا نشان دادن مرحله‌ی ۵ تشنج ادامه پیدا می‌کرد. مراحل رفتاری تشنج براساس معیارهای راسین Racine به صورت ذیل تقسیم‌بندی شد:

مرحله‌ی نخست: انقباضات عضلانی در صورت Facial clonus، مرحله‌ی دوم: حرکت دادن سر به طرف بالا و پایین Head nodding، مرحله‌ی سوم: انقباضات عضلانی اندام حرکتی جلویی Forlimbclonus. مرحله‌ی چهارم: ایستادن روی هر دو اندام حرکتی عقبی همراه با انقباضات عضلانی اندام‌های حرکتی جلویی Rearing و مرحله‌ی پنجم: ایستادن روی هر دو پا همراه با از دست دادن تعادل و افتادن Rearing & Falling: برای بررسی ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک سلول‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ از روش Whole-Cell Patch Clamp استفاده شد.

**ثبت داخل سلولی با روش Whole-Cell Patch Clamp**  
موش‌های صحرایی که تحریکات کیندلینگ دریافت کرده بودند و وزن آن‌ها پس از حدود دو هفته به ۱۵۰-۱۲۰ گرم افزایش یافته بود، ۲۴ ساعت پس از اعمال

11، شرکت Harvard Apparatus، انگلیس) با استفاده از دستگاه کشنده میکروالکتروود افقی (مدل P-97، شرکت Sutter instrument، آمریکا) طی چهار مرحله کشش تهیه شدند. ترکیب محلول داخل پیپت که مشابه محلول داخل سلولی است، برحسب میلی مولار شامل  $K^+$ -gluconate،  $2/54$  ATP 2Na،  $1$  EGTA،  $2$  MgCl<sub>2</sub>،  $0/5$  CaCl<sub>2</sub>،  $130$  HEPES  $10$  می باشد (pH= 7/2)، اسمولاریته  $290$  میلی اسمول بر کیلوگرم) (15، 16).

مقاومت پیپت پس از پرشدن با محلول داخل سلولی و قرارگرفتن نوک آن‌ها در aCSF، بین  $6-4$  مگا اهم بود. امواج الکتروفیزیولوژیک با فرکانس کمتر از  $3$  کیلو هرتز و سرعت نمونه برداری  $10$  کیلو هرتز، با کمک آمپلی فایر (مدل Multiclamp 700B، شرکت Axon، آمریکا) مجهز به سیستم مبدل آنالوگ به دیجیتال (مدل Digidata 1440، شرکت Axon، آمریکا)، گرفته و سپس به رایانه منتقل شدند. آنگاه با استفاده از نرم افزار PClamp نسخه  $10$  (شرکت Axon، آمریکا)، مشاهده و بر روی رایانه ذخیره شدند. تحلیل الکتروفیزیولوژیک داده‌ها با استفاده از نرم افزار Clampfit نسخه  $10/4$  انجام گردید. فعالیت برانگیخته‌ی سلول با استفاده از پروتکل کلمپ جریان ثبت شد. در پروتکل کلمپ جریان برای اندازه‌گیری فعالیت برانگیخته‌ی غشایی جریان‌های دپلاریزه‌کننده ( $0$  تا  $500$  پیکو آمپر) و دندان اره‌ای ( $200-0$  پیکوآمپر) به مدت  $1000$  میلی ثانیه به سلول تزریق شدند.

قبل از انجام هر آزمایش، با وجود مشاهده‌ی مستقیم سلول هرمی زیر میکروسکوپ، جریان دپلاریزه کننده از  $0$  تا  $500$  پیکو آمپر به مدت  $600$  میلی ثانیه به سلول تزریق شد و اگر در ثبت پتانسیل غشا، سازش Adaptation صورت گرفت (فاصله بین اسپایک‌ها به تدریج زیادتر می‌شد)، سلول مورد نظر به لحاظ الکتروفیزیولوژی به عنوان یک سلول هرمی ناحیه‌ی CA1 تأیید می‌گردید.

#### گروه‌های آزمایشی

آخرین تحریک کیندلینگ، با استفاده از اتر، بیهوش و سر آن‌ها جدا شد. مغز به سرعت برداشته شده و در محلول برش‌گیری سرد (دمای  $4-0$  درجه سانتی‌گراد) و کربوژنه ( $95$  درصد CO<sub>2</sub> و  $5$  درصد O<sub>2</sub>) گذاشته شد. برش‌های عرضی از هیپوکمپ راست با ضخامت  $400$  میکرومتر با استفاده از ویبروتوم (Vibrotome 1000 plus, USA) تهیه شد. محلول aCSF (مایع مغزی- نخاعی مصنوعی) Artificial cerebrospinal fluid (aCSF) برش‌گیری که دارای غلظت کلسیم پایین است برحسب میلی مولار حاوی  $2/5$  KCl،  $0/5$  CaCl<sub>2</sub>،  $2$  MgCl<sub>2</sub>،  $1$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>،  $26/2$  NaHCO<sub>3</sub>،  $238$  و  $D-11$  گلوکز بود.

اسمولاریته این محلول در محدوده‌ی  $294$  تا  $300$  میلی اسمول و pH آن در محدوده‌ی  $7/3$  تا  $7/4$  تنظیم گردید (13). برش‌های تهیه شده در محلول aCSF کربوژنه به مدت  $1$  ساعت در درجه حرارت  $32-35$  درجه‌ی سانتی‌گراد، انکوبه و پس از آن تا هنگام آزمایش در محلول ذکر شده در درجه‌ی حرارت اتاق نگهداری شدند. سپس برش‌های تهیه شده به محفظه‌ی ثبت منتقل شدند. محفظه‌ی ثبت با محلول aCSF استاندارد کربوژنه به‌طور مداوم با سرعت  $2-1$  میلی لیتر در دقیقه پرفیوژ شد. ACSF استاندارد برحسب میلی مولار حاوی  $125$  NaCl،  $3$  KCl،  $1/25$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>،  $25$  NaHCO<sub>3</sub>،  $10$  D-Glucose،  $2$  CaCl<sub>2</sub>،  $1/3$  MgCl<sub>2</sub> بود (14).

ثبت Whole cell patch clamp: از جسم سلولی نوروهای هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ و در دمای اتاق ( $23$  تا  $25$  درجه سانتی‌گراد) انجام گردید. برای مشاهده‌ی نوروها از میکروسکوپ (مدل Axioskop 2 FS MOT، شرکت Carl Zeiss، آلمان) مجهز به دوربین مادون قرمز (IR CCD camera، مدل IR-1000، شرکت MTI، آمریکا) و لنز شیئی با بزرگ‌نمایی  $40\times$  استفاده شد. الکترودهای مورد استفاده در این ثبت از میکروپیپت‌های شیشه‌ای فیلامنت دار از جنس بوروسیلیکات (قطر خارجی  $1/5$  میلی متر، مدل GC150-

فاصله‌ی بین اسپایک‌ها سه اسپایک آخر اندکس سازش به دست آمد.

ب) دامنه‌ی هیپرپلاریزاسیون متعاقب Post-AHP Amplitude پایان پالس دپلاریزه‌کننده: برای اندازه‌گیری این کمیت نیز از پالس‌های مربعی تحریکی صفر تا  $+500$  پیکوآمپر با فواصل  $100$  پیکوآمپر به مدت  $600$  میلی ثانیه استفاده شد. دامنه‌ی هیپرپلاریزاسیون متعاقب با اندازه‌گیری اختلاف پتانسیل پایه‌ی غشاء قبل از تزریق جریان دپلاریزه تا قله‌ی بخش هیپرپلاریزه محاسبه شد.

ج) رتویاز (حداقل جریان مورد نیاز برای ایجاد پتانسیل عمل): جریان دپلاریزه به صورت دندان اره‌ای، اعمال و اختلاف جریان از شروع اعمال جریان دپلاریزه کننده دندان اره‌ای تا آستانه‌ی تولید پتانسیل عمل در نظر گرفته شد.

د) تعداد اسپایک‌ها: برای اندازه‌گیری این کمیت جریان دپلاریزه به صورت دندان اره‌ای، اعمال و تعداد اسپایک‌های ایجاد شده در طی اعمال جریان شمرده شد. ه) زمان تاخیری شروع پتانسیل عمل: برای اندازه‌گیری این کمیت جریان دپلاریزه به صورت دندان اره‌ای، اعمال و اختلاف فاصله‌ی زمانی میان شروع پروتکل دندان اره‌ای تا ایجاد اولین پتانسیل محاسبه گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه‌ی  $6/01$  (شرکت نرم‌افزاری GraphPad، آمریکا) به روش تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون متعاقب Bonferroni استفاده شد. داده‌ها به صورت (میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین) و  $P < 0.05$  به عنوان حداقل سطح معناداری منظور گردید.

### یافته‌ها

آنالیز آماری نتایج حاصل از ثبت داخل سلولی نشان داد که به دنبال جریان دپلاریزه‌کننده‌ی  $200$  تا  $500$  پیکوآمپر شاخص آداپتاسیون به‌طور معناداری در گروه

گروه کنترل: در این گروه جراحی انجام نمی‌شد و فقط ثبت داخل سلولی انجام می‌گرفت.

گروه شم: در این گروه حیوانات جراحی می‌شدند و پس از طی دوره‌ی بهبودی، به مدت  $3$  روز (میانگین مدت زمان لازم برای رسیدن به مرحله‌ی  $2$  تشنج در گروه کیندل) یا  $5$  روز (میانگین مدت زمان لازم برای رسیدن به مرحله‌ی  $5$  تشنج) نگهداری شدند. از آنجا که تفاوت معناداری در هیچ یک از کمیت‌های ثبت شده در روش ثبت داخل سلولی بین گروه کنترل و شم مشاهده نشد، داده‌های این دو گروه با هم ادغام و به‌عنوان یک گروه کنترل واحد در نظر گرفته شد.

گروه کیندلینگ موضعی: این گروه هر روز  $12$  تحریک با فواصل  $5$  دقیقه دریافت می‌کردند و این تحریکات تا زمانی که مرحله‌ی  $2$  تشنج را نشان بدهند، ادامه می‌یافت.

گروه کیندلینگ کامل: این گروه هر روز  $12$  تحریک با فواصل  $5$  دقیقه دریافت می‌کردند و این تحریکات تا زمانی که مرحله‌ی  $5$  تشنج را نشان بدهند، ادامه می‌یافت.

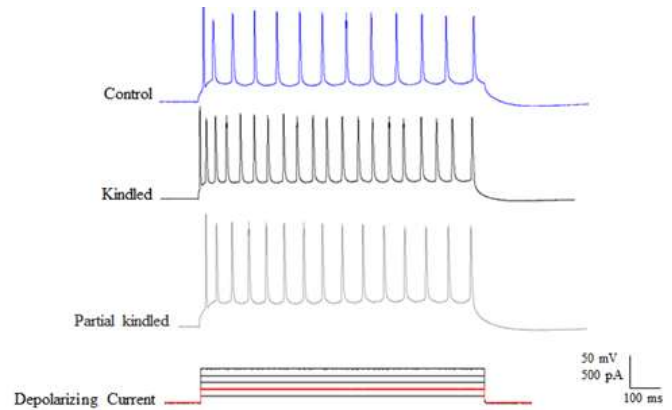
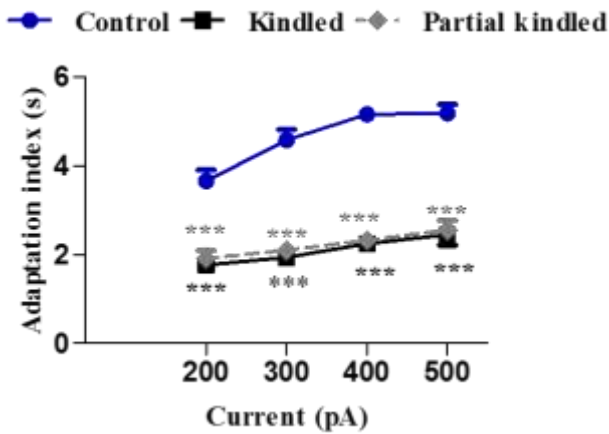
$1$  روز پس از اعمال آخرین تحریک کیندلینگ ثبت داخل سلولی به روش Whole cell patch clamp از جسم سلولی نورون‌های هر می CA1 هیپوکمپ انجام می‌شد.

### کمیت‌های مورد اندازه‌گیری

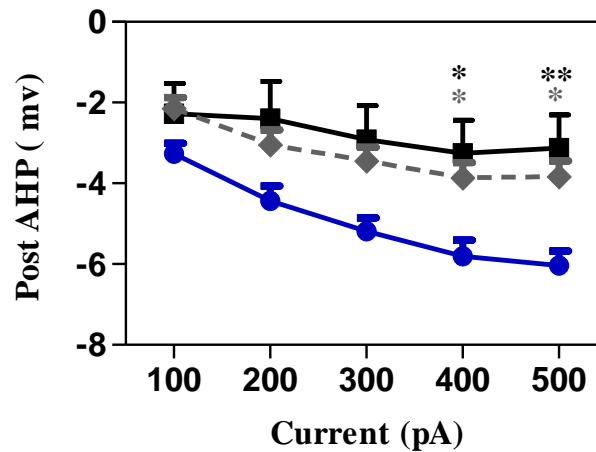
در گروه‌های آزمایشی با استفاده از کلمپ جریان، کمیت‌های ذیل اندازه‌گیری شد:

الف) شاخص سازش: برای اندازه‌گیری این کمیت از پالس‌های مربعی تحریکی صفر تا  $+500$  پیکوآمپر با فواصل  $100$  پیکوآمپر به مدت  $600$  میلی ثانیه استفاده شد.

در هر پالس تحریکی، میانگین فاصله بین اسپایک‌ها برای حداقل  $3$  اسپایک اول و نیز برای حداقل  $3$  اسپایک آخر محاسبه می‌شد. سپس از تقسیم میانگین فاصله‌ی بین اسپایک‌ها سه اسپایک اول بر میانگین



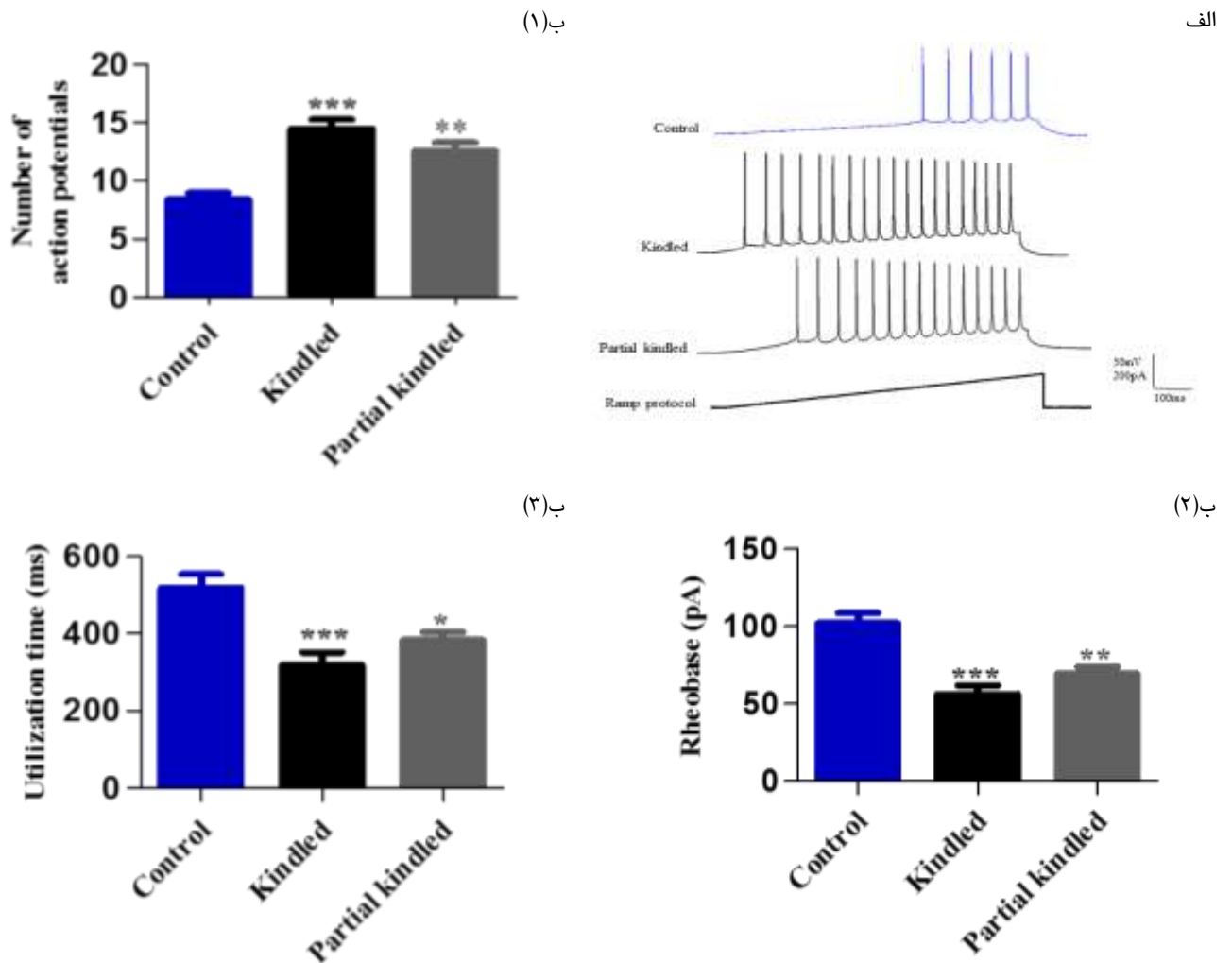
ج



شکل ۱: الف) نمونه ثبت پتانسیل های عمل ایجاد شده در پاسخ به تزریق جریان های دپلاریزه ۱۰۰ تا ۵۰۰ پیکوآمپر در گروه کنترل، کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل آمیگدال. ب) تاثیر کیندلینگ بر شاخص سازش (بالا) و دامنه پتانسیل هیپرپلاریزاسیون متعاقب (پایین) در سلول های هرمی ناحیه CA1 در گروه کنترل، کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل. \* نشان دهنده  $P < 0.05$ ، \*\* نشان دهنده  $P < 0.01$  و \*\*\* نشان دهنده  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

نشان داد. (شکل ۱-ب)، اما اختلاف معناداری بین میزان کاهش این کمیت در دو گروه کیندلینگ کامل و کیندلینگ موضعی وجود نداشت. اعمال تحریکات کیندلینگ باعث افزایش معنادار تعداد پتانسیل های عمل به دنبال اعمال جریان دپلاریزه کننده راست گوشه ای در هر دو گروه کیندلینگ موضعی ( $n=23$ ) ( $13.3 \pm 2.4$ ) و کیندلینگ کامل ( $n=15$ ) ( $15.5 \pm 1.9$ ) نسبت به گروه کنترل ( $n=11$ ) ( $10.85 \pm 3.3$ ) شد، اما همانند کمیت های قبلی، بین دو گروه کیندلینگ کامل و کیندلینگ موضعی تفاوتی دیده نشد.

کیندلینگ موضعی ( $n=25$ ) و کیندلینگ کامل ( $n=15$ ) نسبت به گروه کنترل ( $n=15$ ) در سلول های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ کاهش یافت. این کاهش از نظر آماری معناداری بود ( $p < 0.001$ ) (شکل ۱-الف)، اما اختلاف معناداری در این کمیت بین دو گروه کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل وجود نداشت. دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب در محدوده تزریق جریان دپلاریزه کننده ی ۲۰۰ تا ۵۰۰ پیکوآمپر در گروه کیندلینگ موضعی نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد ( $p < 0.001$ ) ( $n=18$ ). در گروه کیندلینگ کامل ( $n=7$ ) نیز این کمیت نسبت به گروه کنترل ( $n=7$ ) کاهش



شکل ۲: (الف) نمونه ثبت پتانسیل های عمل ایجاد شده به دنبال تزریق جریان دپلاریزه کننده دندان اره ای در شرایط کنترل و پس از کیندلینگ موضعی و کامل آمیگدال. (ب) مقایسه تغییرات تعداد پتانسیل عمل (۱)، رثوباز (۲) و زمان تاخیری تا شروع اولین پتانسیل عمل (۳) در گروه های کنترل، کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل آمیگدال. \* نشان دهنده  $P < 0.05$ ، \*\* نشان دهنده  $P < 0.01$  و \*\*\* نشان دهنده  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل می باشد

پیکوآمپر) ( $n=24$ ) و کیندلینگ کامل ( $56/27 \pm 5/5$  پیکوآمپر) ( $n=24$ ) نسبت به گروه کنترل ( $102/2 \pm 6/5$  پیکوآمپر) ( $n=11$ ) مشاهده شد ( $p < 0.001$ ، شکل ۲-ب)، اما بین دو گروه کیندلینگ کامل و کیندلینگ موضعی تفاوتی وجود نداشت. به دنبال اعمال جریان دپلاریزه کننده دندان اره ای، زمان تاخیری تا شروع اولین پتانسیل عمل نیز در گروه کیندلینگ موضعی ( $383/4 \pm 20/5$  میلی ثانیه،  $n=24$ ) و کیندلینگ کامل ( $319/2 \pm 31/8$  میلی ثانیه،  $n=24$ ) نسبت به گروه کنترل ( $519/2 \pm 34/8$  میلی ثانیه،  $n=11$ ) کاهش معناداری داشت

اعمال تحریکات کیندلینگ باعث افزایش معنادار تعداد پتانسیل های عمل به دنبال جریان دپلاریزه کننده دندان اره ای در هر دو گروه کیندلینگ موضعی ( $12/5 \pm 0/7$ ) ( $n=24$ ) و کیندلینگ کامل ( $14/5 \pm 0/7$ ) ( $n=24$ ) نسبت به گروه کنترل ( $8/4 \pm 0/5$ ) ( $n=11$ ) شد ( $p < 0.001$ ، شکل ۲-الف)، اما همانند کمیت های قبلی، بین دو گروه کیندلینگ کامل و کیندلینگ موضعی تفاوتی دیده نشد. میزان رثوباز در گروه کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل کاهش یافت. به طوری که تفاوت معناداری در این کمیت بین گروه کیندلینگ موضعی ( $69/64 \pm 4/3$

( $p < 0.001$ ، شکل ۲-ج)، اما تفاوت معناداری بین گروه‌های کیندلینگ کامل و کیندلینگ موضعی در این دو کمیت نیز به چشم نخورد.

## بحث

هدف از این تحقیق، بررسی ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نوروهای ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ در موش‌هایی است که با تحریک الکتریکی آمیگدال مرحله‌ی ۲ (کیندلینگ موضعی) یا مرحله‌ی ۵ (کیندلینگ کامل) را نشان دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تحریکات کیندلینگ فعالیت ذاتی نوروهای هر می CA1 هیپوکمپ را تغییر می‌دهد. در سلول‌های هر می گروه‌هایی که تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند، شاخص سازش، رثوباز، زمان تأخیری تا وقوع اولین پتانسیل عمل، دامنه‌ی هیپرپلاریزاسیون متعاقب نسبت به گروه کنترل کاهش و تعداد اسپایک‌ها افزایش یافت که این امر نشان‌دهنده‌ی تحریک‌پذیری این نوروها در نتیجه‌ی تحریکات کیندلینگ می‌باشد. اما نکته‌ی جالب این بود که میزان تغییر کمیت‌های فوق در هر دو گروه کیندلینگ کامل و کیندلینگ موضعی یکسان بود و تفاوت آماری معناداری بین دو گروه مشاهده نشد.

نتایج به‌دست آمده از فعالیت‌های برانگیخته با استفاده از پروتکل کلمپ جریان، بیانگر کاهش شاخص سازش در گروه‌های کیندلینگ کامل و کیندلینگ موضعی نسبت به گروه کنترل بود. یکی از عوامل مؤثر بر میزان شاخص سازش اندازه‌ی دامنه هیپرپلاریزاسیونی است که به‌دنبال هر پتانسیل عمل ایجاد می‌شود. این هیپرپلاریزاسیون در تنظیم تحریک‌پذیری و انتشار فعالیت صرعی نقش دارد و جلوگیری از تغییرات آن به‌دنبال تشنج به‌عنوان یک هدف در درمان و کنترل بیماران صرعی در نظر گرفته می‌شود. کاهش دامنه‌ی این هیپرپلاریزاسیون، باعث افزایش پاسخ سلول به محرک تحریکی و کاهش آدپتاسیون می‌گردد. بنابراین کاهش

دامنه‌ی هیپرپلاریزاسیون متعاقب و به‌دنبال آن آدپتاسیون، باعث افزایش تحریک‌پذیری و فعالیت همزمان نوروهای هر می ناحیه‌ی CA1 می‌شود (۱۷). دامنه‌ی هیپرپلاریزاسیون متعاقب به جریان پتاسیمی  $I_{m}$  و  $I_{k, Ca^{+2}}$  وابسته هستند (۱۸). گزارش شده‌است که مسدودکننده‌های کانال کلسیم با کاهش  $I_{k, Ca^{+2}}$  باعث کاهش دامنه‌ی هیپرپلاریزاسیون متعاقب و در نتیجه افزایش فرکانس پتانسیل عمل و فعالیت نوروها می‌شود (۱۹, ۲۰).

همان‌گونه‌که در نتایج بیان شد، به‌دنبال اعمال جریان دپلاریزه‌کننده، تعداد پتانسیل‌های عمل در گروه‌های کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. این افزایش تعداد پتانسیل‌های عمل در ضمن کلمپ جریان موجب افزایش ورود کلسیم و متعاقب آن دپلاریزاسیون غشا می‌شود (۲۳-۲۱).

دپلاریزاسیون غشا خود باعث غیرفعال شدن کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم به دنبال وقوع قطاری از پتانسیل‌های عمل می‌گردد (۲۴). به دنبال غیرفعال شدن کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم، دامنه‌ی پتانسیل هیپرپلاریزاسیون متعاقب و آدپتاسیون کاهش می‌یابد.

اعمال تحریکات کیندلینگ در این تحقیق در هر دو گروه کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل به‌طور مشابه تعداد اسپایک‌ها را در سلول‌های هر می ناحیه‌ی CA1 به‌دنبال تزریق جریان دندان اره‌ای افزایش داد. از طرفی دیگر، رثوباز و زمان تأخیری تا شروع اولین پتانسیل عمل در گروه‌های کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل کاهش یافت. کاهش رثوباز نشان‌دهنده‌ی این است که برای شلیک اولین پتانسیل عمل در حین اعمال جریان دندان اره‌ای، به میزان جریان تزریقی کمتری نیاز است. این پدیده خود نشان‌دهنده‌ی افزایش تحریک‌پذیری نوروها می‌باشد. در همین راستا، کاهش زمان تأخیری تا مشاهده‌ی اولین پتانسیل عمل در حین اعمال جریان دندان اره‌ای نیز تأییدکننده‌ی افزایش تحریک‌پذیری نوروها در نتیجه‌ی فرایند صرع‌زایی است. این کمیت‌ها به هدایت



بین مراحل تشنجی ۲ و ۵ تفاوت وجود دارد، اما از نظر تغییر در خصوصیات الکتروفیزیولوژیک سلول‌ها مراحل ۲ و ۵ مشابه یکدیگر هستند. به عبارتی دیگر، وقتی حیوان به مرحله‌ی ۲ تشنج می‌رسد، سطح تحریک‌پذیری نورونی همانند حیوانی است که کاملاً کیندل شده می‌باشد. اما باید دقت نمود که این تشابه فقط در سطح یک نورون در این مطالعه مورد بررسی قرارگرفت و مطمئناً خصوصیات مدارهای نورونی در حیواناتی که مرحله‌ی ۲ تشنج را نشان می‌دهند نسبت به حیواناتی که به مرحله‌ی ۵ می‌رسند، کاملاً متفاوت است و این تفاوت و عامل اختلاف در مراحل رفتاری تشنج می‌باشد.

این یافته‌ها نشان می‌دهد که کیندلینگ موضعی آمیگدال با تغییر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک نورون‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ باعث افزایش تحریک‌پذیری این نورون‌ها می‌شود.

### تشکر و تقدیر

حمایت مالی این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و و صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری (Grant # 92040251) صورت گرفته است و بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را از این مراکز اعلام می‌کنند.

یونی وابسته است. تغییر این کمیت‌ها می‌تواند ناشی از افزایش دانسیته و کینتیک کانال سدیمی وابسته به ولتاژ باشد. کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ در ایجاد پتانسیل عمل و تحریک‌پذیری نقش دارند (۲۷-۲۵). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که موتاسیون در این کانال‌ها منجر به نوعی صرع ژنتیکی می‌شود. بلومنفیلد Blumenfeld و همکارانش پیشنهاد کردند که فعالیت کانال سدیمی Nav1.6 و به دنبال کیندلینگ افزایش می‌یابد و این کانال‌ها در افزایش تحریک‌پذیری نقش دارند (۲۸). واکسمن Waxman گزارش کرد که جریان Na persistent به دنبال کیندلینگ افزایش می‌یابد (۲۹). به علاوه، بعد از کیندلینگ تعداد کانال‌های سدیمی در دسترس و کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد که این عامل هم باعث افزایش تحریک‌پذیری می‌شود (۳۰, ۳۱). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تحریکات کیندلینگ جریان‌های کلسیمی نوع T را افزایش می‌دهند (۲۱, ۲۲). همچنین گزارش شده که بیان کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ به دنبال تحریکات کیندلینگ افزایش می‌یابد (۲۹).

عدم وجود تفاوت معنادار در این خصوصیات الکتروفیزیولوژیک نورون‌ها در گروه‌های کیندلینگ موضعی و کیندلینگ کامل نشان‌دهنده‌ی این است که میزان افزایش تحریک‌پذیری نورون‌ها در گروه‌هایی که به صورت موضعی یا کامل کیندل شدند، یکسان است. این بدان معناست که در مدل کیندلینگ هر چند از نظر رفتاری

### References

1. Picot MC, Baldy-Moulinier M, Daure's JP, Dujols P, Crespel A. The prevalence of epilepsy and pharmacoresistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. *Epilepsia*. 2008; 49(7): 1230-8.
2. Téllez-Zenteno JF, Hernández-Ronquillo L. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Research and Treatment*. 2012; 2012: 1-5.
3. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Helen J, Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010; 51(4): 676-85.
4. McIntyre DC, Gilby KL. Kindling as a model of human epilepsy. *Can J Neurol Sci*. 2009;36: Suppl 2:S33-5.
5. Ebertram E. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia*. 2007;48: Suppl 2:65-74.
6. Leung LS, Wu C, Wu K, Shen B, Sutherland R, Zhao D. Long lasting behavioral and electrophysiological effects induced by partial hippocampal kindling. In: Corcoran ME, Moshe S, editors. *Kindling 5*. New York: Plenum; in press. 1997: 395-408.

7. Racine R, Rose PA, Burnham WM. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *J Neurol Sci.*1977;4: 273-8.
8. Wasterlain CG, Farber DB, Fairchild D. Cholinergic kindling: What has it taught us about epilepsy? *J Neural Transm.* 1985;63(2):119-32.
9. Wieser HG. Human limbic seizures: EEG studies, origin, and patterns of spread. In: Meldrum BS, Ferendelli JA, Weiser HG, editors. *Anatomy of Epileptogenesis, Current problems in epilepsy.* London: John Libbey. 1988; 6: 127-38.
10. Kalynchuk LE, Pinel JPJ, Treit D, Kippin TE. Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. *Biol Psychiatry.*1997; 41(4): 438-51.
11. Ghotbedin Z, Janahmadi M, Mirnajafi-Zadeh J, Behzadi G, Semnani S. Electrical low frequency stimulation of the kindling site preserves the electrophysiological properties of the rat hippocampal CA1 pyramidal neurons from the destructive effects of amygdala kindling: The basis for a possible promising epilepsy therapy. *Brain Stimul.* 2013; 6(4): 515-23.
12. Paxinos G, Watson C. *The rat Brain in stereotaxic coordinates.* New York: Academic Press; 1986.
13. Vreugdenhil M, Wadman WJ. Enhancement of calcium currents in rat hippocampal CA1 neurons induced by kindling epileptogenesis. *Neurosciences.* 1992; 49(2): 373-81.
14. Liu X, Leung LS. Partial hippocampal kindling increases GABA<sub>A</sub> receptor-mediated postsynaptic currents in CA1 pyramidal cells. *Epilepsy Res.* 2003; 57(1): 33-47.
15. Khazipov R, Khalilov L, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2004; 19: 590-600.
16. Qi J, Yao J, Cheng F, Luscher B, Chen G. Down regulation of tonic GABA currents following epileptogenic stimulation of rat hippocampal cultures. *J Physiol.*2006; 577: 579-90.
17. Asproдини EK, Rainnie DG, Anderson AC, Shinnick-Gallagher P. In vivo kindling does not alter afterhyperpolarizations (AHPs) following action potential firing in vitro in basolateral amygdala neurons. *Brain Res.* 1992; 588(2): 329-34.
18. Faber ES, Sah P. Independent roles of calcium and voltage-dependent potassium currents in controlling spike frequency adaptation in lateral amygdala pyramidal neurons. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(7):1627-35.
19. Madison DV, Nicoll RA. Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons, in vitro. *J Physiol.*1986; 372: 221-44.
20. Madison DV, Nicoll RA. Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurons in vitro. *J Physiol.*1984; 354: 319-31.
21. Cain SM, Snutch TP. T-type calcium channels in burst-firing, network synchrony, and epilepsy. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1828(7):1572-8.
22. Cheong E, Shin HS. T-type Ca<sup>2+</sup> channels in absence epilepsy. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1828(7):1560-71.
23. Siwek M, Henseler C, Broich K, Papazoglou A, Weiergräber M. Voltage-gated Ca<sup>(2+)</sup> channel mediated Ca<sup>(2+)</sup> influx in epileptogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 740:1219-47.
24. Zhang L, Kolaj M, Renaud LP. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup> conductances contribute to a slow AHP in thalamic paraventricular nucleus neurons: a novel target for orexin receptors. *J Neurophysiol.* 2010; 104(4):2052-62.
25. Marini C, Mantegazza M. Na<sup>+</sup> channelopathies and epilepsy: recent advances and new perspectives. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2010;3(3):371-84.
26. Hargus NJ, Nigam A, Bertram EH, Patel MK. Evidence for a role of Nav1.6 in facilitating increases in neuronal hyperexcitability during epileptogenesis. *J Neurophysiol.* 2013; 110(5):1144-57.
27. Hargus NJ, Merrick EC, Nigam A, Kalmar CL, Baheti AR, Bertram EH, Patel MK.
28. Temporal lobe epilepsy induces intrinsic alterations in Na channel gating in layer II medial entorhinal cortex neurons. *Neurobiol Dis.* 2011; 41(2):361-76.
29. Blumenfeld H, Lampert A, Klein JP, Mission J, Chen MC, Rivera M, et al. Role of hippocampal sodium channel Nav1.6 in kindling epileptogenesis. *Epilepsia.*2009; 50(1): 44-55.
30. Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins TR, Black JA. Sodium channels and their genes: Dynamic expression in the normal nervous system, dysregulation in disease states (1). *Brain Res.* 2000; 886(1-2): 5-14.
31. Xu X, Guo F, Lv X, Feng R, Min D, Ma L, et al. Abnormal changes in voltage-gated sodium channels Na(V)1.1, Na(V)1.2, Na(V)1.3, Na(V)1.6 and in calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase II, within the brains of spontaneously epileptic rats and tremor rats. *Brain Res Bull.* 2013; 96:1-9.
32. Guo F, Xu X, Cai J, Hu H, Sun W, He G, et al. The up-regulation of voltage-gated sodium channels subtypes coincides with an increased sodium current in hippocampal neuronal culture model. *Neurochem Int.* 2013; 62(3): 287-95.

# Comparing the Excitability of Hippocampal Neurons in Focal and Generalized Stages of Kindling Induced Seizures in Rat

**Homeira Moradi Chameh.,**

Ph.D. Student of Physiology, Department of Physiology, Tarbiat Modares University of Tehran, Tehran, Iran.

**Saeed Semnian.,**

Professor, Department of Physiology, Tarbiat Modares University of Tehran, Tehran, Iran.

**Mahyar Janahmadi.,**

Professor, Department of Physiology and Neuroscience Research Center, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran.

**Amir Shojaei.,**

Ph.D. Student of Physiology, Department of Physiology, Tarbiat Modares University of Tehran, Tehran, Iran.

**Azam Asgari.,**

Ph.D. Student of Physiology, Department of Physiology, Tarbiat Modares University of Tehran, Tehran, Iran.

**\*Seyyed-Javad Mirnajafizadeh.,**

Professor, Department of Physiology, Tarbiat Modares University of Tehran, Tehran, Iran.

Received:21/09/2014, Revised:16/11/2014, Accepted:03/12/2014

## Correspond Author:

Seyyed-Javad Mirnajafizadeh,  
Tehran, Tarbiat Modares  
University of Tehran, Department  
of Physiology and Neuroscience  
Research Center,  
E-mail: mirnajaf@modares.ac.ir

## Abstract

**Background & Objectives:** Amygdala kindling is accompanied with alteration of the electrophysiological characteristics of pyramidal cells in CA1 area of hippocampus. However, it is not clear that when and in which seizure stage do these changes occur during kindling. In the present study, changes in the electrophysiological properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons following partial amygdala kindling in rats were compared to full kindled state.

**Materials & Methods:** Animals were rapidly kindled by 1 ms square waves, 50 Hz, for 3 s. These stimulations were applied to the amygdala 12 times per day at 5 min intervals. Animal received kindling stimulation until achieving stage 2 (partial kindled group) and stage 5 (full kindled group). 24 hours after the last kindling stimulation electrophysiological properties of CA1 pyramidal neurons were assessed by using whole-cell patch clamp technique.

**Results:** Obtained data from amygdala kindling showed that adaptation index, Rheobase, utilization time and the amplitude of afterhyperpolarization potential in partial kindled and full kindled compare to control were significantly decreased and the numbers of action potentials were significantly increased.

**Conclusion:** The present findings showed that in spite of in partial amygdala kindling, the number of stimulations that rats will receive is lower than full kindled animal but it can change neuronal hyperexcitability through alteration of the electrophysiological characteristics.

**Keywords:** *Partial amygdala kindling, Seizure, Hippocampal pyramidal neurons, Whole cell patch clamp recoding.*