

The role of potassium channels in the regulation of calcium spike configuration in the cerebellar Purkinje neurons

Haghdoost-Yazdi H^{1*}, Esmacili M¹, Sophiabadi M¹, Azhdari-Zarmehri H¹, Janahmadi M²

1- Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I. R. Iran

2- Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

Received May 25, 2010; Accepted August 18, 2010

Abstract:

Background: Calcium spikes play important roles in the control of neuronal spontaneous activity. Cerebellar Purkinje neurons fire spontaneous calcium spikes. In this study, the role of potassium channels in the regulation of these spikes was studied.

Materials & Methods: Brain slices from the cerebellum of young rats were prepared and the Purkinje cells were visualized using an upright microscope. Using borosilicate micropipettes and Axoclamp 2B amplifier, intracellular recordings were taken from the cells. The role of different K⁺ channels in the regulation of calcium spikes configuration was determined using different K⁺ channels blockers and precise analysis of the recorded calcium spikes in the presence of blockers.

Results: Application of wide-range 4-aminopyridine and tetraethylammonium blockers increased duration and amplitude of afterhyperpolarization (AHP) of the calcium spikes and converted them from one-peak spike to two- or multiple-peaks spikes. Blockade of small conductance calcium dependent potassium channels increased duration of the spikes but had no effect on the AHP amplitude. Blockade of large conductance calcium dependent potassium channels increased duration of the calcium spikes and decreased the AHP amplitude.

Conclusion: Our results showed that properties of the calcium spikes in the cerebellar Purkinje neurons were largely controlled by different potassium channels, including calcium dependent types.

Keywords: Cerebellar Purkinje neurons, Multiple peaks calcium spikes, AHP, Calcium dependent potassium channels

* **Corresponding Author.**

Email: hhaghdoost@yahoo.com

Tel: 0098 912 481 8325

Fax: 0098 281 332 4971

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Autumn, 2010; Vol 14, No 3, Pages 182-189

نقش کانال‌های پتاسیمی در تنظیم شکل و ویژگی‌های پتانسیل‌های عمل کلسیمی در سلول‌های پورکنز مخچه

هاشم حقدوست یزدی^{۱*}، محمد رضا اسماعیلی^۱، محمد صوفی آبادی^۱، حسن اژدری زمره‌ری^۱، مهیار جان احمدی^۲

خلاصه

سابقه و هدف: اسپایک‌های کلسیمی نقش مهمی در کنترل فعالیت خود به خودی نورون‌ها ایفا می‌نمایند. سلول‌های پورکنز مخچه به صورت خود به خودی اسپایک‌های کلسیمی شلیک می‌نمایند. در این تحقیق، نقش کانال‌های پتاسیمی در شلیک این اسپایک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی برش‌های مغزی از مخچه موش‌های صحرایی جوان تهیه گردید و سلول‌های پورکنز با استفاده از میکروسکوپ upright مشاهده شدند. ثبت‌های داخل سلولی با استفاده از میکروپیت‌های شیشه‌ای و آمپلی فایر Axoclamp 2B از این سلول‌ها به عمل آمد. با استفاده از مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی مختلف و آنالیز دقیق اسپایک‌های کلسیمی ثبت شده در حضور این مهارکننده‌ها، نقش کانال‌های پتاسیمی مختلف در تنظیم ویژگی‌های این اسپایک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: کاربرد مهارکننده‌های عمومی ۴-آمینوپیریدین و تترائیل آمونیوم سبب افزایش دامنه، مدت زمان و دامنه هیپرپولاریزاسیون متعاقب (AHP) اسپایک‌های کلسیمی شده و آن‌ها را از حالت تک قله‌ای به شکل چند قله‌ای تبدیل نمود. مهار کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس پایین، مدت زمان این اسپایک‌ها را افزایش داد، ولی بردامنه AHP اثری نداشت. مهار کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا علاوه بر افزایش مدت زمان اسپایک‌های کلسیمی، دامنه AHP آنها را نیز کاهش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند ویژگی‌های اسپایک‌های کلسیمی در سلول‌های پورکنز مخچه به میزان زیادی تحت کنترل کانال‌های پتاسیمی مختلف از جمله انواع وابسته به کلسیم می‌باشد.

واژگان کلیدی: سلول‌های پورکنز مخچه، اسپایک‌های کلسیمی چند قله‌ای، هیپرپولاریزاسیون متعاقب، کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره چهاردهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۱۸۹-۱۸۲

مقدمه

حرکات پی در پی ویژه را شامل می‌شود، نقش دارد [۱]. این اندام به تنهایی بیش از نیمی از تمامی نورون‌های مغز را دارا بوده که در یک مدار به خوبی شناخته شده به نام واحد عملی (module) مخچه قرار می‌گیرند. در مرکز این مدار نورون‌های پورکنز با درخت دندریتی وسیع قرار می‌گیرند که ورودی‌های سیناپسی از فیبرهای بالارونده و فیبرهای موازی و همچنین چندین سلول بینابینی دریافت کرده و به نوبه خود خروجی منحصر به فرد از قشر مخچه به سلول‌های هسته‌های عمقی مخچه را تشکیل می‌دهند. اختلال در عملکرد این نورون‌ها سبب بروز برخی اختلالات در کنترل حرکت و بروز بیماری‌هایی مانند آناکسی می‌شود [۴،۳،۱]. سلول‌های پورکنز دارای فعالیت خود به خودی می‌باشند که به صورت شلیک پتانسیل‌های عمل سدیمی در موش‌های صحرایی نابالغ [۷-۹]، پتانسیل‌های عمل کلسیمی [۹،۸] و شلیک انفجاری شامل پتانسیل‌های عمل کلسیمی همراه با پتانسیل‌های عمل سدیمی در موش‌های صحرایی بالغ ظاهر می‌شود [۸-۱۰]. این فعالیت خود به خودی به طور عمده توسط خواص ذاتی غشاء تنظیم می‌شود و مهار ورودی‌های سیناپسی بر روی این فعالیت اثر قابل ملاحظه‌ای ندارد [۷]. نشان داده شده است که دندریت‌های

مهمترین شکل پاسخ سلول‌های تحریک پذیر به تحریکات شلیک پتانسیل‌های عمل می‌باشد. این پتانسیل‌های عمل در نورون‌ها به طور عمده از نوع سدیمی می‌باشند؛ لکن در دهه اخیر مشخص شده است که برخی از نورون‌ها نوع دیگری از پتانسیل‌های عمل به نام پتانسیل‌های عمل یا اسپایک‌های کلسیمی شلیک می‌نمایند. این اسپایک‌ها از دندریت‌ها منشا گرفته و در مقایسه با پتانسیل‌های عمل سدیمی مدت زمان بیشتری دارا می‌باشند. پتانسیل‌های عمل کلسیمی در تنظیم فعالیت خود به خودی، تحریک‌پذیری و پاسخ به ورودی‌های سیناپسی در نورون‌ها نقش مهمی ایفا می‌نمایند [۶-۱]. مخچه در کنترل بسیاری از اعمال حرکتی از جمله حرکتی که نیاز به زمان بندی دقیق دارند، کنترل تعادل و وضعیت، برخی از اشکال یادگیری حرکتی و سازش رفلکسی و شماری از وظایف شناختی که برنامه ریزی و انجام

^۱ استادیار، مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

^۲ استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* نشانی نویسنده مسوول:

قزوین، دانشگاه علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

دوره‌نویس: ۳۳۲۴۹۷۱ ۰۲۸۱

تلفن: ۴۸۱۸۳۲۵ ۰۹۱۲

پست الکترونیک: hhaghdoost@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۹/۵/۲۷

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۴

پرستالتیک (Burleigh Instruments Ltd, Harpenden, Herts, UK) سوپرفیوز می‌گردید. به منظور مهار جریان‌های سیناپسی، اسید کاینورنیک، مهار کننده جریان‌ات گلوتاماتی سریع با غلظت ۱ میلی مولار [۲۲] و پیکروتوکسین، مهار کننده اختصاصی گیرنده های GABA نوع A با غلظت ۱۰۰ میکرومولار [۲۳] به محلول پرفیوژن اضافه می‌شد. سلول‌های پورکنز بر اساس موقعیت، اندازه، شکل و درخت دندریتی شناسایی می‌شدند. ثبت داخل سلولی از جسم سلولی با استفاده از آمپلی فایر AxoClamp 2B (Axon Instruments Inc., USA) در مد بریج (که ثبت کارنت کلامپ را امکان پذیر می‌نماید) و با کمک میکروپی‌پت‌های شیشه‌ای با دیواره ضخیم و از جنس بروسیلیکات (WPI, 120F with inner filament) با مقاومت ۸۰-۴۰ مگا اهم انجام می‌گردید. میکروپی‌پت‌ها با استفاده از یک پولر افقی (APP-1, 52500, Stoelting, USA) کشیده شده و با محلول ۳ KCl مولار پر می‌شدند.

اکتساب داده‌ها و آنالیز: ثبت‌ها در ۳۰ KHz فیلتر گردیده و با استفاده از مبدل A/D (Powerlab ADInstrument) در ۴۰ رقی می‌شده و در یک رایانه IBM با کمک نرم افزار Chart ویرایش ۵ (Powerlab ADInstrument) ذخیره می‌شدند. آنالیز داده‌ها با نرم افزار Chart صورت گرفت. به منظور بررسی نقش کانال‌های پتاسیمی اثر ۴ مهارکننده پتاسیمی ۴ آمینوپیریدین (4-AP، تترائیل آمونیوم (TEA)، اپامین و ایبریوتوکسین (IBTX)) در ۴ گروه مجزا از نورون‌ها مورد بررسی قرار گرفت؛ به این صورت که پس از ورود الکتروده سلول و ثبت فعالیت الکتریکی آن برای حداقل ۲۰ دقیقه و پس از آن که مطمئن می‌شدیم فعالیت الکتریکی ثابت و پایدار است، داروی مورد نظر به کار برده می‌شد. به منظور اطمینان از کلسیمی بودن پتانسیل عمل، کادمیم در یک گروه مجزا از نورون‌ها اعمال گردید. نتایج به دست آمده پس از کاربرد دارو با نتایج به دست آمده قبل از اعمال دارو در همان نورون مقایسه گردیده و با آزمون t جفتی مقایسه می‌شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته می‌شد. دامنه پتانسیل‌های عمل کلسیمی از قله تا انتهای هیپرپولاریزاسیون متعاقب سریع، مدت زمان آن از شروع پتانسیل عمل تا فاز رپولاریزاسیون و دامنه هیپرپولاریزاسیون متعاقب از ولتاژ شروع پتانسیل عمل تا انتهای هیپرپولاریزاسیون متعاقب سریع در نظر گرفته می‌شد.

مواد و داروها: 4-AP و TEA با غلظت ۲ میلی مولار [۲۴]، اپامین با غلظت ۲۰۰ نانومولار، IbTX با غلظت ۱۰۰ نانومولار و کادمیم با غلظت ۱۰۰ میکرومولار [۱] به کار برده شدند. تمامی این داروها

سلول‌های پورکنز پتانسیل‌های عمل کلسیمی ایجاد می‌نمایند که منشا اصلی فعالیت خود به خودی سلول‌های پورکنز می‌باشد [۱۲، ۱۱]. این پتانسیل‌های عمل همچنین در تنظیم پاسخ سلول‌های پورکنز به ورودی‌های سیناپسی نقش برجسته‌ای ایفا می‌نمایند [۱]. کانال‌های پتاسیمی دسته بزرگی از کانال‌های یونی می‌باشند که در تنظیم تحریک پذیری و فرکانس شلیک، تنظیم شکل و رپولاریزاسیون پتانسیل‌های عمل نقش مهمی ایفا می‌نمایند [۱۶-۱۳]. سلول‌های پورکنز بسیاری از انواع این کانال‌ها را بیان می‌نمایند. نشان داده شده است این کانال‌ها در رپولاریزاسیون و تنظیم فرکانس شلیک نورون‌های پورکنز سهم قابل توجهی دارا می‌باشند [۲۱، ۱۷-۱۶]. در این مطالعه با استفاده از مهار کننده‌های برخی از کانال‌های پتاسیمی نقش این کانال‌ها در شلیک پتانسیل‌های عمل کلسیمی در سلول‌های پورکنز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

فعالیت الکتروفیزیولوژیک سلول‌های پورکنز با استفاده از روش ثبت داخل سلولی بر روی برش‌های زنده مغزی ثبت گردید. روش کار به صورت مراحل زیر انجام گردید: آماده سازی برش‌های مغزی: موش‌های صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley در محدوده سنی ۳۰-۱۵ روزه با اتر بیهوش گردیده و با استفاده از گیوتین حیوانات کوچک، سر آن‌ها جدا می‌گردید. با برداشتن استخوان پس سری، مخچه نمایان شده و با استفاده از اسکالپل از باقی مغز جدا شده و در محلول مایع مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF) سرد شده قرار می‌گرفت. این محلول (بر حسب میلی مولار) شامل ۱۲۴ NaCl، ۵ KCl، ۱/۲ KH_2PO_4 ، ۱/۳ MgSO_4 ، ۲/۴ CaCl_2 و ۱۰ Glucose بود. این محلول به طور مداوم با ترکیب اکسیژن ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد (کربوژن) تهویه می‌گردید. پس از چند دقیقه بخش ورمیس مخچه جدا شده و برش‌های پاراسازیتال با ضخامت ۳۰۰ میکرومتر با استفاده از یک ویراتورم تهیه می‌شد. برش‌ها در محلول کربوژن شده ACSF به مدت یک ساعت در درجه حرارت 33°C انکوبه شده و در طول آزمایش در محلول ذکر شده در درجه حرارت اتاق (27°C - 23°C) نگه داری می‌شدند.

ثبت داخل سلولی: برش‌ها در محفظه ثبت از نوع غوطه ور قرار داده شده و با استفاده از میکروسکوپ (Olympus: BX 51 upright 40x water immersion WI) مجهز به لنزهای نومارسکی و با عدسی ACSF محفظه ثبت با محلول کربوژن به طور مداوم با سرعت ۲-۱ میلی لیتر در دقیقه توسط پمپ

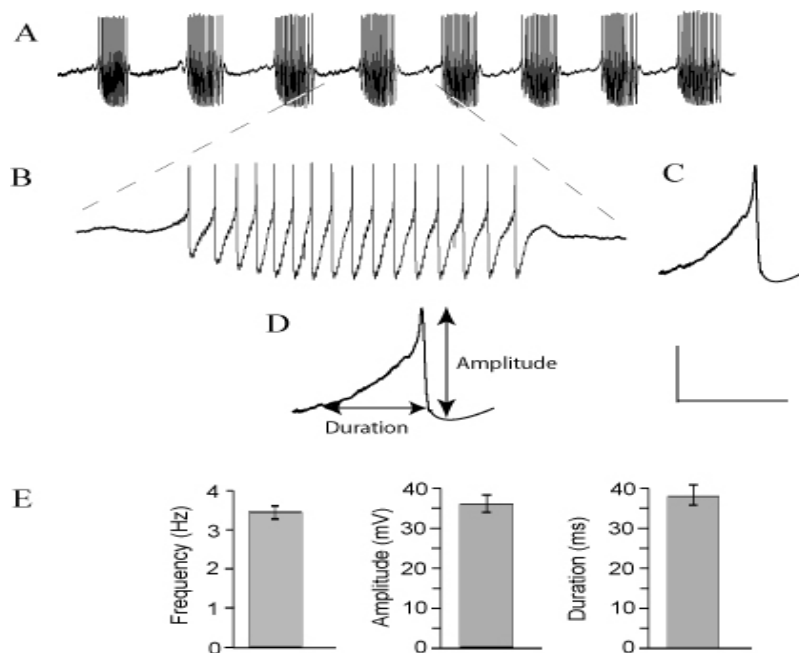
این فعالیت خود به خود به صورت دوره‌های فعالی که توسط دوره‌های خاموش و یا غیر فعال از یکدیگر جدا می‌شدند ظاهر می‌شد (شکل شماره ۱). همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود این پتانسیل‌های عمل نسبت به پتانسیل‌های عمل سدیمی مدت زمان طولانی‌تری دارا بوده و دارای یک قله بودند. هنگامی که کادمیم، مهار کننده کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ به محلول سوپرفیوژن اضافه می‌گردید، شلیک این پتانسیل‌های عمل متوقف می‌گردید ($n=6$)؛ از این رو، این پتانسیل‌های عمل وابسته به کلسیم بوده و از این به بعد با نام پتانسیل‌های عمل یا اسپایک-های کلسیمی خوانده می‌شوند.

از شرکت سیگما تهیه شدند. اسید کاینورنیک و پیکروتوکسین از شرکت توکرینس تهیه شدند. داروها در آب مقطر حل شده و به صورت تغلیظ شده ۱۰۰ برابر غلظت اعمال شده در 20°C در الیکوت یک بار مصرف نگه‌داری می‌شدند. داروها با اضافه شدن به محلول سوپرفیوژن در حد نیاز به غلظت نهایی می‌رسیدند.

نتایج

فعالیت خود به خودی سلول‌های پورکنژ

در حضور مهار کننده‌های سیناپسی بسیاری از سلول‌های پورکنژ ($n=36$) فعالیت خود به خودی از خود نشان می‌دادند.



شکل شماره ۱- فعالیت خود به خودی در سلول‌های پورکنژ در حضور مهار کننده‌های سیناپسی. A؛ فعالیت خود به خودی در سلول‌های پورکنژ؛ این فعالیت شامل دوره‌های فعال و غیر فعال بود. B؛ شکل گسترده از یک دوره فعال که شلیک خود به خود پتانسیل‌های عمل را در این دوره نشان می‌دهد. C؛ شکل گسترده یکی از پتانسیل‌های عمل. D؛ یکی از پتانسیل‌های عمل همراه با پروتوکول‌هایی که برای اندازه‌گیری برخی از ویژگی‌های آن استفاده می‌شده است. فرکانس شلیک پتانسیل‌های عمل توسط نرم افزار و با محاسبه مدت زمان بین قله تا قله آنها اندازه‌گیری می‌شد. این پتانسیل‌های عمل در حضور کادمیم، مهار کننده کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ ناپدید می‌شدند E؛ هیستوگرام‌ها، فرکانس (frequency)، دامنه (amplitude) و مدت زمان این پتانسیل‌های عمل را در شرایط کنترل نشان می‌دهد ($n=36$). مقیاس‌های اندازه‌گیری: محور عمودی ۲۰ میلی ولت برای تمامی ثبت‌ها. محور افقی در شکل A: ۱۰ ثانیه، در شکل B: ۱ ثانیه و در شکل C: ۵۰ هزارم ثانیه.

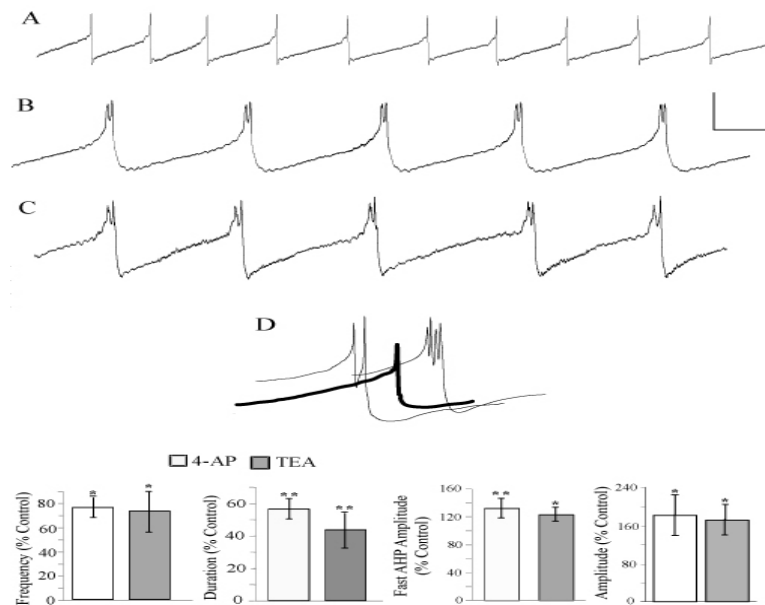
تاثیر مهار کننده‌های کانال‌های پتاسیمی بر ویژگی‌های پتانسیل‌های عمل کلسیمی

به منظور مطالعه نقش کانال‌های پتاسیمی بر ویژگی‌های اسپایک‌های کلسیمی در سلول‌های پورکنژ، در ابتدا اثر ۲ مهار کننده عمومی یعنی ۴-آمینوپیریدین، مهار کننده کانال‌های پتاسیمی سریع ($n=12$) و تترا اتیل آمینیوم، مهار کننده کانال‌های پتاسیمی

delayed rectifier ($n=9$) مورد بررسی قرار گرفت. شکل شماره ۲، اثر این دو مهار کننده را بر روی شلیک اسپایک‌های کلسیمی نشان می‌دهد. هر دوی این مهار کننده‌ها سبب افزایش دامنه، کاهش فرکانس، افزایش مدت زمان و افزایش دامنه هیپرپولاریزاسیون متعاقب سریع این اسپایک‌ها گردیدند، ولی مهم‌ترین اثر این مهار کننده‌ها تغییر شکل اسپایک‌های کلسیمی از

های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا را مهار می نماید. شکل ۳ اثر این مهار کننده‌ها را بر اسپایک های کلسیمی نشان می دهد. کاربرد هر دو سم به طور جداگانه سبب افزایش معنی دار در مدت زمان این اسپایک ها گردید. IBTX (n=7) همچنین سبب کاهش دامنه اسپایک ها و کاهش دامنه هیپرپولاریزاسیون متعاقب سریع در آنها گردید، در حالی که اپامین (n=8) اثری بر این شاخص ها نداشت. کاربرد این سموم بر فرکانس شلیک اسپایک های کلسیمی و همچنین تعداد قله های آنها اثری نداشت.

حالت تک قله ای به شکل دو یا چند قله ای بود؛ به گونه ای که پس از سوپرفیوژن این مهار کننده ها، وقوع اسپایک های دو یا چند قله ای به میزان ۶۲۵ و ۴۷۵ درصد به ترتیب برای 4-AP و TEA افزایش یافت. در قدم بعدی نقش کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم مورد بررسی قرار گرفت. این کانال ها شامل دو گروه کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس پایین و با کنداکتانس بالا می باشند. اپامین سمی است که به طور اختصاصی کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس پایین را مهار می نماید و سم ایبریوتوکسین (IBTX) به طور اختصاصی کانال-



شکل شماره ۲- اثر مهار کننده های کانال های پتاسیمی وسیع الطیف بر اسپایک های کلسیمی. A, B و C ثبت از سلول های پورکنز به ترتیب در شرایط کنترل، در حضور 4-AP، TEA و تترائیل آمینوم (TEA) را نشان می دهند. D اسپایک های کلسیمی ثبت شده در شرایط کنترل (ثبت ضخیم) و در حضور 4-AP یا TEA (ثبت نازک) بر روی هم قرار گرفته اند. به تعداد قله های پتانسیل های عمل توجه کنید. هیستوگرام ها اثر این دو مهار کننده را بر فرکانس شلیک (frequency)، مدت زمان (duration)، دامنه هیپرپولاریزاسیون متعاقب سریع (fast afterhyperpolarization) و دامنه (amplitude) اسپایک های کلسیمی را نشان می دهند. n=12 برای 4-AP و n=9 برای TEA. داده ها نسبت به اندازه های به دست آمده در شرایط کنترل (۱۰۰ درصد) نمایش داده شده اند. مقیاس های اندازه گیری: محور عمودی ۲۰ میلی ولت و محور افقی ۵۰ هزارم ثانیه برای A، B و C. برای D: ۲۰ هزارم ثانیه. $P < 0.05$ و $P < 0.01$.*

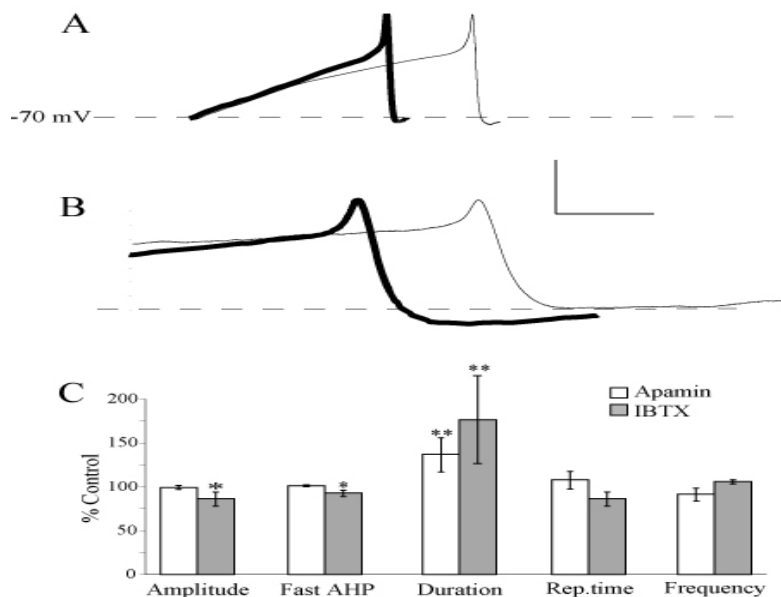
بحث

آن ها را به میزان زیادی افزایش می دهند. بر اساس داده های این تحقیق مهار کانال های BK و نه SK دامنه اسپایک های کلسیمی و AHP آنها را کاهش می دهد. تقویت و افزایش دامنه پتانسیل های عمل کلسیمی توسط 4-AP توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است [۲۵، ۲۴]. همچنین نتایج ما در تایید نتایج Etzion و همکاران [۲۱] می باشد که گزارش داده اند 4-AP شلیک پتانسیل های عمل کلسیمی دوگانه (دو پتانسیل عمل متصل به یکدیگر) را افزایش می دهد. منشا تولید اسپایک های کلسیمی در سلول های پورکنز دندریت ها می باشند. این اسپایک ها از طریق هدایت دندروسوماتیک به جسم

نتایج این تحقیق نشان می دهند که سلول های پورکنز مخچه به صورت خود به خودی اسپایک های کلسیمی شلیک می نمایند. این اسپایک ها در حضور مهار کننده های وسیع الطیف کانال های پتاسیمی، 4-AP و TEA به طور قابل توجهی تقویت شده و از حالت تک قله ای به شکل دو یا چند قله ای تبدیل می شوند. این مهار کننده ها همچنین مدت زمان اسپایک ها و دامنه AHP در آنها را افزایش می دهند. از طرف دیگر مهار کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم بر تعداد قله های این اسپایک ها اثری نداشته، ولی مدت زمان

های پتاسیمی توسط 4-AP و TEA هدایت دندروسوماتیکی را تقویت می‌نمایند [۲۶].

سلولی می‌رسند. نشان داده شده است که کانال‌های پتاسیمی نقش مهمی در هدایت دندروسوماتیک اسپایک‌های کلسیمی در سلول‌های پورکنز ایفا می‌نمایند [۲۶، ۲۷]. گزارش شده است که مهار کانال-



شکل شماره ۳- اثر اپامین، مهار کننده کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا بر اسپایک‌های کلسیمی. A و B. ثبت‌های بر روی هم انداخته شده به ترتیب اثر اپامین و IBTX را بر اسپایک‌های کلسیمی نشان می‌دهند (ثبت ضخیم در شرایط کنترل و ثبت نازک پس از کاربرد دارو). هیستوگرام اثر این مهار کننده‌ها را بر دامنه (amplitude)، دامنه هیپرپولاریزاسیون متعاقب سریع (fast afterhyperpolarization)، مدت زمان (duration) و فرکانس شلیک (frequency) پتانسیل‌های عمل کلسیمی نشان می‌دهد. n=8 برای اپامین و n=7 برای IBTX. داده‌ها نسبت به اندازه‌های به دست آمده در شرایط کنترل (۱۰۰ درصد) نمایش داده شده‌اند. مقیاس‌های اندازه گیری: محور عمودی ۲۰ میلی ولت و محور افقی ۲۰ هزارم ثانیه. $P < 0.05$; * و $P < 0.01$; **.

پتانسیل‌های عمل کلسیمی می‌گردد که بر خلاف نتایج ما می‌باشد که نشان می‌دهد مهار BK با دامنه این پتانسیل‌های عمل را کاهش و مهار SK با اثری بر آن ندارد. تفاوت در اثر مهار BK با نتایج ما و Edgerton و همکاران می‌تواند ناشی از تفاوت در پروتوکل‌های اندازه‌گیری دامنه پتانسیل‌های عمل باشد؛ به این معنی که در این تحقیق دامنه اسپایک از قله تا قعر AHP محاسبه می‌گردید، در حالی که Edgerton و همکاران دامنه پتانسیل عمل را از قله تا سطح پتانسیل استراحت منظور نموده‌اند. از طرف دیگر بر اساس نتایج این تحقیق مهار کانال‌های SK و BK سبب افزایش مدت زمان اسپایک‌های کلسیمی می‌شود. این اثر که تا به حال شرح داده نشده است می‌تواند ناشی از آهسته شدن فاز رپولاریزاسیون در این پتانسیل‌های عمل باشد. تنظیم و تسریع فاز رپولاریزاسیون پتانسیل‌های عمل در سلول‌های تحریک‌پذیر یکی از شناخته شده ترین اثرات کانال‌های پتاسیمی می‌باشد. البته به خوبی مشخص گردیده است که کانال‌های BK در تعیین مدت زمان

این تقویت سبب افزایش دامنه این اسپایک‌ها در جسم سلول می‌گردد که در نتایج ما و نتایج دیگر محققین مشاهده شده است؛ همچنین تسهیل هدایت دندروسوماتیکی باعث می‌شود که اسپایک‌های کلسیمی تولید شده در شاخه‌های مختلف دندریتی در زمان‌های مختلف به جسم سلول رسیده و تولید قله‌های چند گانه در اسپایک‌های شلیک شده در این محل نمایند. این مکانیسم‌ها علت بروز پتانسیل‌های عمل کلسیمی چند قله‌ای را در نتایج ما در حضور 4-AP و TEA شرح می‌دهند. تقویت هدایت دندروسوماتیکی در حضور مهار کننده‌های کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا نیز گزارش شده است [۲۷]. لکن نتایج ما چنین چیزی را نشان نمی‌دهند. در این تحقیق نشان داده شد که مهار کانال‌های BK و نه SK سبب کاهش معنی‌دار در دامنه AHP اسپایک‌های کلسیمی گردید که موید نتایج ارائه شده توسط Edgerton و همکاران [۱] می‌باشد. از سوی دیگر این محققین نشان داده‌اند که مهار این کانال‌ها سبب افزایش دامنه

تقویت هدایت دندروسوماتیکی موجب افزایش دامنه این اسپایک‌ها شده و آن‌ها را به شکل چند قله‌ای تبدیل می‌نماید. کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم به ویژه نوع BK با تنظیم AHP و مدت زمان و نوع SK عمدتاً از طریق تنظیم مدت زمان این اسپایک‌ها، شکل آنها را تنظیم می‌نمایند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت تامین قسمتی از هزینه‌های این طرح تشکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

اسپایک‌های سدیمی نقش قابل ملاحظه‌ای ایفا می‌نمایند [۳۰،۱-۲۸]؛ از طرف دیگر چنین نقشی برای کانال‌های SK شرح داده نشده است. این کانال‌ها در پتانسیل‌های استراحت غشاء در سلول‌های پورکنز فعال می‌باشند [۳۱] و ممکن است که با کاهش شیب فاز بالارونده پتانسیل‌های عمل کلسیمی سبب کاهش مدت زمان آنها گردند. مهار این کانال‌ها موجب طولانی شدن فاز بالارونده و به تبع آن افزایش مدت زمان اسپایک کلسیمی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

کانال‌های پتاسیمی نقش مهمی در تنظیم اسپایک‌های کلسیمی در سلول‌های پورکنز ایفا می‌نمایند. مهار این کانال‌ها با

References:

- [1] Edgerton JR, Reinhart PH. Distinct contributions of small and large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol* 2003; 548: 53-69.
- [2] Womack MD, Khodakhah K. Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 2004; 24: 3511-21.
- [3] Higley MJ, Bernardo L, Sabatini BL. Calcium Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations. *Neuron* 2008; 59: 902-13.
- [4] Kano M, Schneggenburger R, Vekhratsky A, Konnerth A. Depolarization-induced calcium signals in the somata of cerebellar Purkinje neurons. *Neurosci Res* 1995; 24: 87-95.
- [5] Lang EJ, Sugihara I, Welsh JP, Llinas R. Patterns of spontaneous Purkinje cell complex spike activity in the awake rat. *J Neurosci* 1999; 19: 2728-39.
- [6] Mougnot D, Bossu JL, Gähwiler BH. Low-threshold Ca^{2+} currents in dendritic recordings from Purkinje cells in rat cerebellar slice cultures. *J Neurosci* 1997; 17: 160-70.
- [7] Cingolani LA, Gymnopoulos M, Boccaccio A, Stocker M, Pedarzani P. Developmental regulation of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel expression and function in rat Purkinje neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 4456-67.
- [8] Womack M, Khodakhah K. Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 10603-12.
- [9] McKay BE, Turner RW. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol* 2005; 567: 829-50.
- [10] Hockberger PE, Tseng HY, Connor JA. Development of rat cerebellar Purkinje cells: electrophysiological properties following acute isolation and in long-term culture. *J neurosci* 1989; 9: 2258-71.
- [11] Llinas R, Sugimori M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J Physiol* 1980; 305: 171-95.
- [12] Llinas R, Sugimori M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J Physiol* 1980; 305: 197-213.
- [13] Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Molecular diversity of K^+ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 233-85.
- [14] Mathie A, Woollorton JR, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 13-24.
- [15] Martina M, Yao GL, Bean BP. Properties and functional role of voltage-dependent potassium channels in dendrites of rat cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 5698-707.
- [16] Lesage F. Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 2003; 44(1): 1-7.
- [17] McKay BE, Turner W. $Kv3$ channels enable burst output in rat cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 2004; 20:729-39.
- [18] Womack MD, Khodakhah K. Somatic and small-conductance calcium-activated potassium channels regulate the output of cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 2600-7.
- [19] Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 557-94.
- [20] Sacco T, Tempia F. A-type potassium currents active at subthreshold potentials in mouse cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 2002; 543(2): 505-20.
- [21] Etzion Y, Grossman Y. Potassium currents modulation of calcium spike firing in dendrites of

- cerebellar Purkinje cells. *Exp Brain Res* 1998; 122: 283-94.
- [22] Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 309-79.
- [23] Yoon KW, Covey DF, Rothman SM. Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 1993; 464: 423-39.
- [24] Seo WS, Shin JH, Suh CK. 4-Aminopyridine (4-AP) augments Ca^{2+} -dependent action potential and changes oscillatory firing patterns in rat cerebellar Purkinje cells. *Yonsei Med J* 1999; 40: 112-7.
- [25] Gavelier 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: 167-71.
- [26] Etzion Y, Grossman Y. Highly 4-aminopyridine sensitive delayed rectifier current modulates the excitability of guinea pig cerebellar Purkinje cells. *Exp Brain Res* 2001; 139: 419-25.
- [27] Cavelier 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.
- [28] Pouille F, Cavelier P, Desplantez T, Beekenkamp H, Craig PJ, Beattie RE, et al. Dendro-somatic distribution of calcium-mediated electrogenesis in Purkinje cells from rat cerebellar slice cultures. *J Physiol* 2000; 527(2): 265-82.
- [29] Shao LR, Halvorsrud R, Graham LB, Storm JF. The role of BK-type Ca^{2+} -dependent K^+ channels in spike broadening during firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 1999; 521: 135-46.
- [30] Haghdoost-Yazdi H, Janahmadi M, Behzadi G. Iberitoxin-sensitive large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ (BK) channels regulate the spike configuration in the burst firing of cerebellar Purkinje neurons. *Brain Res* 2008; 1212: 1-8.
- [31] Yazdi HH, 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.