

Immunohistochemical Study of Distribution of GAD and GABA in the Entorhinal Cortex after Spreading Depression in Juvenile Rats

Ahmad Ali Lotfinia¹, Leila Alizadeh¹, Mahmoud Lotfinia², Azadeh Sajadian¹, Amir Ghaemi^{3,1*}

¹Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran

²School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Article Info:

Received: 2 Feb 2015

Accepted: 5 May 2015

ABSTRACT

Introduction: Spreading depression (SD), discovered by Leao in 1944, is a pathophysiological depolarization wave that propagates slowly in the brain (3 mm/min) and causes dramatic ionic and hemodynamic changes. SD appears to act through several mechanisms and receptors, which have not completely understood. Here, we studied the effect of inhibitory system in animal model of SD using immunohistochemistry technique. **Materials and Methods:** After implanting recording electrodes and cannula over the brain, repetitive SD was induced by KCl injection (2 M) in juvenile rats for four consecutive weeks. Then all rats' brains removed. The mean number of dark neurons in the entorhinal cortex (EC) were determined using toluidine blue staining. To identify the prevalence and distribution of GABAA subunit receptors as well as glutamic acid decarboxylase (GAD), the GABA biosynthetic enzyme, immunohistochemistry technique was performed. **Results:** The mean number of SD induced was statistically increased during four weeks of experiments. The mean number of dark neurons in EC was significantly increased in SD group compared to sham group. Furthermore, expression of GAD65 in EC significantly increased in SD group compared to sham group. However, both GABA-A_α and GABA-A_β subunit receptors didn't significantly change in that region after SD. **Conclusion:** These data suggest that SD is able to damage the neuronal cells in neural tissues in juvenile rats and parallelly lead to enhancement of GAD65 in the central nervous system.

Key words:

1. Cortical Spreading Depression
2. Entorhinal Cortex
3. gamma-Aminobutyric Acid

* **Corresponding Author:** Amir Ghaemi

E-mail: ghaem_amir@yahoo.com

مطالعه ایمنووهیستوشیمی پراکنش GAD و GABA در قشر انتورینال پس از مهار منتشر شونده در موش‌های صحرایی نوجوان

احمد علی لطفی نیا^۱، لیلا علیزاده^۱، محمود لطفی نیا^۲، آزاده سجادیان^۱، امیر قائمی^{۳*}

^۱مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران

^۲دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

^۳گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۵ اردیبهشت ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳ بهمن ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: مهار منتشر شونده، که در سال ۱۹۴۴ توسط لئو کشف شد، یک موج دپلاریزاسیون پاتوفیزیولوژیکی است که به آرامی در مغز پخش می‌شود (۳ میلی‌متر در دقیقه) و تغییرات یونی و همودینامیک چشمگیری را سبب می‌شود. به نظر می‌رسد مهار منتشر شونده از طریق فعالیت چندین مکانیسم و گیرنده ظاهر می‌شود که به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. اینجا ما اثر سیستم مهاری را در مدل حیوانی مهار منتشر شونده با استفاده از تکنیک ایمنووهیستوشیمی مطالعه کردیم. **مواد و روش‌ها:** پس از کارگذاری الکترودهای ثبت کننده و کانولا بر روی مغز، مهار منتشر شونده مکرر از طریق تزریق کلرید پتاسیم (۲ مولار) در موش‌های صحرایی نوجوان به مدت چهار هفته متوالی القاء شد. سپس تمامی مغزهای موش‌های صحرایی خارج گردیدند. با استفاده از رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو، میانگین تعداد نورون‌های تیره در قشر انتورینال مشخص گردید. به‌منظور مشخص کردن شیوع و توزیع زیر واحدهای گیرنده GABA و گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD)، آنزیم بیوسنتز GABA، تکنیک ایمنووهیستوشیمی انجام شد. **یافته‌ها:** میانگین تعداد مهار منتشر شونده القاء شده در طی ۴ هفته آزمایش از نظر آماری افزایش یافت. میانگین تعداد نورون‌های تیره قشر انتورینال به‌طور معنی‌داری در گروه مهار منتشر شونده در مقایسه با گروه شم افزایش داشت. به‌علاوه بیان GAD 65 در قشر انتورینال به‌طور معنی‌داری در گروه مهار منتشر شونده در مقایسه با گروه شم افزایش پیدا کرد. اگرچه هر دو زیر واحدهای گیرنده GABA-A_α و GABA-A_β به‌طور معنی‌داری در آن ناحیه پس از مهار منتشر شونده تغییر نکردند. **نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که مهار منتشر شونده می‌تواند به سلول‌های عصبی در بافت‌های عصبی در موش‌های صحرایی نوجوان آسیب برساند و به‌طور موازی منجر به افزایش GAD 65 در سیستم عصبی مرکزی شود.

کلید واژه‌ها:

۱. مهار منتشر شونده قشری
۲. قشر انتورینال
۳. گاما-آمینو بوتیریک اسید

* نویسنده مسئول: امیر قائمی

آدرس الکترونیکی: ghaem_amir@yahoo.com

مقدمه

تحریک پذیری نورون ها و دپلاریزاسیون مکرر آن ها گردد (۱۳).^۵، به همین ترتیب ما نیز فرض کردیم SD می تواند با کاهش ناقلین عصبی یا گیرنده های مهاری و یا به طور کلی کاهش عملکرد مهاری سیستم گابائریک سبب تحریک پذیری بیشتر نورون ها و در نتیجه انتشار آسان تر موج در مغز گردد (۱۴). از این رو هدف از انجام این بررسی، سنجش میزان پراکندگی زیر واحدهای گیرنده های GABA^{۱۱} و نیز آنزیم گلوتمات د-کربوکسیلاز (GAD)^{۱۲}، یکی از مهم ترین واسطه ها در تولید ناقل عصبی GABA، پس از القای SD می باشد.

مواد و روش ها

به منظور انجام این مطالعه، ۲۰ سر موش صحرایی ویستار نابالغ ۲۰ تا ۳۰ روزه در محدوده وزنی ۸۰-۱۰۰ گرم (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا) انتخاب شد. در طول زمان این مطالعه موش ها به صورت انفرادی در دمای ۲۲±۲ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۵-۵۰ درصد و در سیکل روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمامی مراحل آزمایش بر اساس پروتکل تأیید شده توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا اجرا شد. حیوانات به طور تصادفی به ۲ گروه شم و SD تقسیم شدند.

جراحی و القای SD

در ابتدا موش ها با استفاده از یک ترازوی حساس وزن شده و سپس با تزریق پنتوباریتال^{۱۳} (Sigma; ۶۰ mg/kg) به صورت درون صفاقی بیهوش شدند. پس از بیهوشی سر حیوان ها در دستگاه استریوتاکس (تجهیزات استولتینگ، آمریکا)^{۱۴} ثابت گردید و موی سر آن ها تراشیده شد. سپس ناحیه تراشیده شده ضد عفونی گردیده و با تیغ بیستوری یک برش طولی روی پوست سر ایجاد شد. به دنبال آن بافت های زیر جلدی کنار زده شد تا استخوان جمجمه در معرض دید قرار گیرد. سپس با استفاده از مته مخصوص، ۴ سوراخ تا سطح سخت شامه بدون ایجاد زخم بر روی آن ایجاد شد. به ترتیب؛ ۲ سوراخ مقابل هم در استخوان آهیانه، ۱ سوراخ در استخوان پیشانی و ۱ سوراخ بر روی استخوان بینی به عنوان مرجع ایجاد شد. در داخل سوراخ استخوان پیشانی کانولی که از سرسوزن های استیل درجه ۲۶ به طول یک سانتی متر به طور دستی درست شده بود، به منظور انجام تزریق های داخل مغزی کلرید پتاسیم و سرم رینگر قرار داده شد.

برای حفاظت کانولا از آلودگی و بسته نشدن، با استفاده از سوزن ویژه دندان پزشکی، سرپوشی برای کانول های کاشته شده، ساخته شد. سپس دو الکتروود نقره در داخل سوراخ های استخوان آهیانه و یکی در سوراخ استخوان بینی به منظور ثبت امواج مغزی قرار داده شد (تصویر ۱). در نهایت ناحیه جراحی توسط سیمان جراحی پر گردید (۱۵). پس از اتمام جراحی

مهار منتشر شونده (SD)^۱ که یک ویژگی بیوالکتریکی ذاتی در سیستم اعصاب مرکزی است، یک پدیده پاتوفیزیولوژیک شناخته شده می باشد که با تغییرات متابولیک و همودینامیک در سیستم اعصاب مرکزی و بیش از حد فعال شدن نورون ها^۲ همراه است (۱-۳). این پدیده که اولین بار در سال ۱۹۴۴ توسط آقای لئو، فیزیولوژیست برزیلی توصیف شد، به صورت یک موج الکتریکی گذرای برگشت پذیر در ماده خاکستری با سرعت حدود ۳-۵ میلی متر در دقیقه پخش شده و با دپلاریزاسیون نورونی - گلیالی به آهستگی در دیگر نقاط بافت مغز نیز گسترش می یابد. به دنبال پخش این موج در مغز، خاموشی موقتی در فعالیت الکتریکی نورون ها در ناحیه قشری مغز اتفاق می افتد که نمود آن را می توان به وضوح با تغییر در دامنه^۳ و طول مدت^۴ موج مذکور در نوار الکتروانسفالوگرافی^۵ مشاهده کرد (۳-۵).

شواهد کلینیکی و آزمایشگاهی بسیاری مؤید این مطلب هستند که موج SD در ارتباط نزدیک با بسیاری از اختلالات مختلف عصبی از جمله میگرن همراه با اورا^۶، خونریزی های زیر عنکبوتیه آنوریسمال^۷، بیماری های مغزی - عروقی، خونریزی داخل مغزی خود به خودی^۸، فراموشی گذرا، صرع و همچنین آسیب های وارده به سر می باشد (۶).

SD از دو جهت حائز اهمیت است، ابتدا همان طور که گفته شد آسیب وارده به سلول های عصبی توسط بسیاری از بیماری های تخریب کننده سیستم عصبی به سبب پخش این موج در مغز اتفاق می افتد و دوم آنکه شناخت این پدیده از جهت به دست آوردن تصویری شفاف از فعالیت الکتروفیزیولوژی مغز نیز دارای اهمیت فراوان است (۷). هنوز به درستی عامل اصلی بروز این موج مشخص نیست، اما یافته های اخیر بر چند عاملی بودن این پدیده دلالت می کنند و عوامل متعددی را در ایجاد، پخش و گسترده شدن این موج در مغز دخیل می دانند (۸).

نورون ها مانند یک باتری در مغز عمل می کنند. آن ها انرژی الکتروشیمیایی را به وسیله شیب غلظتی یون ها و همچنین شارژ الکتریکی در طول غشاء ذخیره می کنند. سپس با اجازه دادن به ورود و خروج یون هایی نظیر سدیم، پتاسیم و کلر از راه کانال های موجود بر روی سطح غشاء، در فضایی به نام سیناپس، پتانسیل عمل را ایجاد کرده و از این طریق پیام های عصبی را منتقل می کنند (۶).

نتیجه بر هم خوردن توازن یونی و جابه جا شدن یون ها به ویژه تجمع بیش از حد یون پتاسیم در فضای خارج سلولی به هر دلیل، دپلاریزاسیون^۹ مجدد سلول است (۹-۱۲) که سلول عصبی را از حالت طبیعی خارج می کند. از سوی دیگر برهم خوردن تعادل بین ناقلین عصبی^{۱۰} تحریکی و مهاری نیز می تواند از طریق بالا رفتن میزان گلوتمات در فضای سیناپسی سبب افزایش

¹ Spreading depression

² Electrophysiological hyperactivity

³ Amplitude

⁴ Duration

⁵ Electroencephalography

⁶ Migraine with aura

⁷ Aneurismal subarachnoid hemorrhage

⁸ Spontaneous intracerebral hemorrhage

⁹ Depolarization

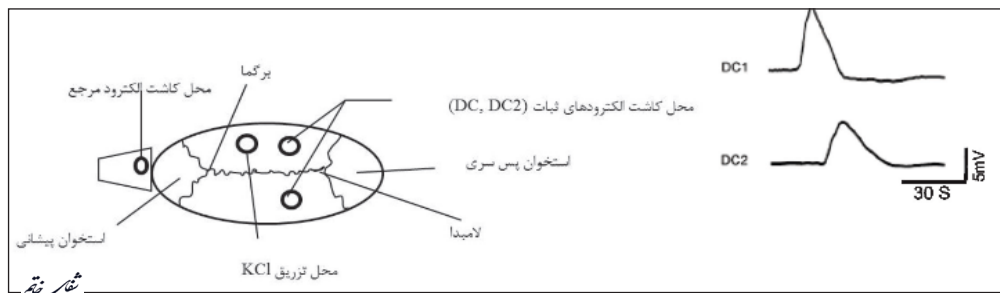
¹⁰ Neurotransmitters

¹¹ gamma-Aminobutyric acid

¹² Glutamic acid decarboxylase

¹³ Pentobarbital

¹⁴ Stereotaxic (Stoelting Instruments, USA)



تصویر ۱- ثبت جریان مستقیم منفی (DC) پس از تزریق کلرید پتاسیم در مغز موش‌های نوجوان. تزریق از راه کانولای شماره ۲۳ و ثبت امواج مغزی به کمک الکترودهایی که بر بالای کورتکس نصب و توسط سیمان دندانپزشکی محکم شده بودند صورت گرفت. مهار منتشر شونده قشری از قشر حسی -پیکری مغز موش‌های نوجوان ثبت گردید (۱۶).

۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. برش‌ها دوباره توسط PBS شستشو داده شدند و لام‌ها در ^{18}BSA ۱ درصد و ^{19}NGS ۵ درصد به‌عنوان بلاکر به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه خرگوشی (RNASEN; Abcam, Cambridge, United Kingdom) بر علیه GABA-A_α ، GABA-A_β ، GAD65 و به‌صورت جداگانه انکوبه شدند. غلظت آنتی‌بادی‌ها به ترتیب ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰ بودند که توسط محلول محتوی BSA ۱٪ در بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار با pH=۷/۴ رقیق شدند.

لام‌ها پس از ۳ بار شستشو در PBS، در مرحله بعدی با آنتی‌بادی ثانویه فلورسنت مونوکلونال (RNASEN; Abcam, Cambridge, United Kingdom) با رقت ۱:۷۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای محیط در شرایط تاریکی انکوبه شدند. بعد از چندین شستشو با PBS، رنگ‌آمیزی هسته با پروپیدیوم دیدید^{۲۰} با رقت ۱:۱۰۰۰ انجام گردید. لام‌ها دوباره با PBS شسته شده و در پایان با ۹۰٪ glycerol mounting buffer پوشانده شدند و سپس توسط میکروسکوپ فلورسنت (BX51WI; Olympus, Tokyo, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

سه مقطع عرضی از مغز هر موش برای تجزیه و تحلیل ایمونوفلورسنت در نظر گرفته شد. عکس‌های دیجیتالی از مقاطع با استفاده از دوربین متصل بر روی میکروسکوپ با بزرگنمایی $40\times$ گرفته شده و در رایانه ذخیره گردید. در بررسی میکروسکوپی، پارامترهای بیان گیرنده گابا در قشر انتورینال مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان چگالی فلورسنت در سلول‌های واکنش داده با آنتی‌بادی گیرنده‌های GABA-A_α ، GABA-A_β و GAD65 در گروه‌های مختلف در ناحیه قشر انتورینال توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شدند. اعداد به دست آمده از این نرم‌افزار توسط آزمون‌های آماری آنالیز شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام داده‌ها به‌صورت میانگین و خطای معیار ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) ارائه شدند. نتایج آزمون ^{21}KS جهت بهنجار بودن متغیرها انجام شد. در پایان، نتایج به دست آمده در بررسی ایمونوهیستوشیمی توسط نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 19 و آزمون T-Test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. معیار معنی‌داری برای هر گروه $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

موش‌ها به قفس‌های مجزا منتقل شده و یک هفته دوره بهبودی بعد از عمل را گذراندند.

برای القای SD، موش‌ها به‌وسیله پنتوباریتال (۶۰ mg/kg) بیهوش شدند و تزریق‌های داخل مغزی (به میزان ۱۵-۱۰ میکرولیتر محلول کلرید پتاسیم ۲ مولار در طول مدت ۶۰ ثانیه) از راه کانولا به‌وسیله سرنگ همپلتون ۱۰ میکرولیتری که توسط یک لوله پلی‌اتیلن به سرنگ تزریق درجه ۲۷ وصل شده بود، انجام شدند. برای اطمینان از القای درست SD، همزمان با تزریق کلرید پتاسیم، امواج الکتریکی مغزی به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه ثبت شدند. القای SD، ۴ مرتبه به‌صورت مکرر و با فواصل زمانی یک هفته، در گروه SD صورت گرفت. همچنین تزریق سرم رینگر در گروه شم از راه کانولای کار گذاشته شده انجام شد.

مطالعات بافت‌شناسی

پس از پایان چهار هفته القای SD، موش‌ها با دوز بالای کلرات هیدرات (Sigma; ۳۵۰ mg/kg) بیهوش شده و سپس مغز آن‌ها ابتدا توسط ۲۰۰ میلی‌لیتر سالین و سپس ۶۰۰ میلی‌لیتر پارافرمالدئید ۱ درصد از راه قلب و سرخرگ آئورت بالارو شسته شده و در پایان به کمک ست جراحی استخوان‌های مجامه شکسته و مغز بدون آسیب و تروما درآورده شد و در محلول فیکساتیو قرار داده شد. مغزها حداقل ۱ هفته در محلول فیکساتیو پارافرمالدئید قرار گرفتند تا برای تهیه مقاطع میکروسکوپی آماده شوند. پس از طی مراحل ثابت سازی، آبگیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری در پارافین، به‌صورت مقاطع با ضخامت ۸ میکرون و به‌صورت کرومال^{۱۵} برش زده شده و با رنگ تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شدند.

ایمونوهیستوشیمی

سه عدد برش عرضی از مغز هر موش که بر روی لام‌های شیشه‌ای مونته شده بودند، به‌منظور بررسی ناحیه قشری انتورینال^{۱۶} در نظر گرفته شدند. برش‌ها با عبور از گزبل و الکل دیپارافینه و آبدهی شدند. در مرحله بعد به‌وسیله بافر فسفات سالین (PBS)^{۱۷} شستشو داده شده و سپس به‌منظور احیاء آنتی ژنی از آنزیم تریپسین ۰/۰۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. برش‌ها در PBS شستشو داده شده و سپس در Triton X-100 ۰/۲٪ به مدت

¹⁵ Coronal

¹⁶ Entorhinal cortex

¹⁷ Phosphate-buffered saline (PBS)

¹⁸ Bovine serum albumin

¹⁹ Normal goat serum

²⁰ Propidium iodide (PI)

²¹ Kolmogorov-Smirnov test

یافته‌ها

تغییرات نوار مغزی به دنبال القای مکرر SD

GABA-A α و آنزیم GAD65 در ناحیه قشری انتورینال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین چگالی فلورسنت نورون‌های واکنش داده در واحد میلی‌متر مربع با آنتی‌بادی GAD65 در گروه SD، 0.0008 ± 0.0024 و در گروه شم 0.0026 ± 0.011 در ناحیه قشری انتورینال بود. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار بیان GAD65 در ناحیه قشر انتورینال در موش‌های گروه SD در مقایسه با گروه شم بود ($P < 0.05$) - (تصویر ۳).

دو زیرگروه برای گیرنده GABA-A به صورت GABA-A α و GABA-A β وجود دارد. به منظور بررسی تغییرات گیرنده GABA-A پس از القای مکرر SD، در این مطالعه توزیع و بیان GABA-A α و GABA-A β مورد بررسی قرار گرفت.

میانگین چگالی فلورسنت نورون‌های واکنش داده در واحد میلی‌متر مربع در گیرنده GABA-A α ؛ 0.003 ± 0.013 در گروه SD و 0.003 ± 0.019 در گروه شم در ناحیه قشر انتورینال بود (تصویر ۴). نتایج تغییر معنی‌داری را در بیان گیرنده GABA-A α در ناحیه قشر انتورینال در گروه SD در مقایسه با گروه شم نشان نداد.

میانگین چگالی فلورسنت سلول‌های واکنش داده در واحد میلی‌متر مربع در گیرنده GABA-A β در گروه SD 0.002 ± 0.008 و در گروه شم 0.002 ± 0.012 در ناحیه مذکور بود. نتایج تغییر معنی‌داری را در بیان گیرنده GABA-A β در ناحیه قشر انتورینال در گروه SD در مقایسه با گروه شم نشان نداد (تصویر ۵).

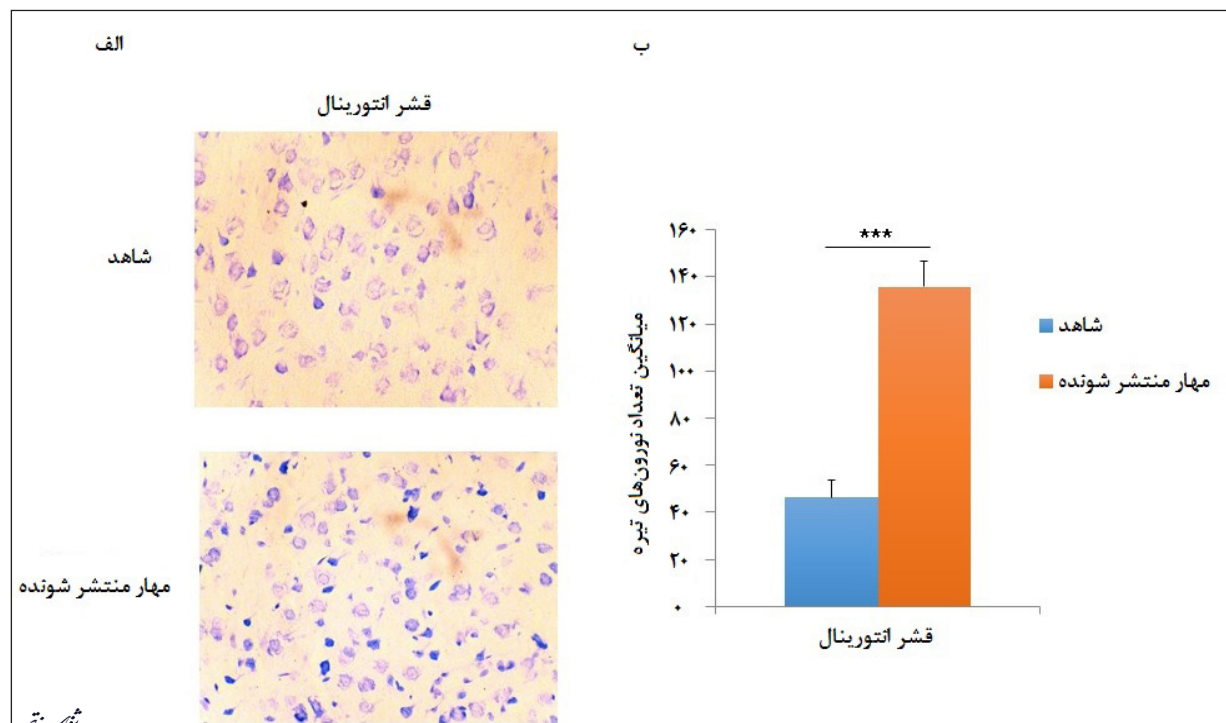
تزریق کلرید پتاسیم از راه کانولا به درون مغز موش‌های صحرایی نوجوان به مدت چهار هفته منجر به ایجاد نوسانات DC منفی^{۲۲} و به دنبال آن ایجاد امواج مثبت گردید. میانگین تعداد دامنه و طول مدت اولین موج نئوکورتیکال^{۲۳} شبه SD، $2/1 \pm 10/8$ میلی‌ولت و 9 ± 112 ثانیه و سرعت پخش^{۲۴} این جابه‌جایی منفی $0/2 \pm 3$ میلی‌متر در دقیقه بود. دامنه، طول مدت و همچنین سرعت پخش امواج SD قشری القاء شده در طول ۳ هفته بعدی در مقایسه با هفته اول تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. با این حال نتایج آماری بیانگر افزایش میانگین تعداد امواج SD ناشی از تزریق محلول کلرید پتاسیم در طول ۴ هفته القای آن بود. تعداد امواج SD ثبت شده در طول مدت ۶۰ دقیقه پس از تزریق محلول کلرید پتاسیم در هفته اول $0/2 \pm 1/4$ ، در هفته دوم $0/3 \pm 1/8$ ، در هفته سوم $0/2 \pm 2/1$ و در هفته چهارم $0/3 \pm 2/5$ بود ($P < 0.05$).

تأثیر القای مکرر SD بر ایجاد نورون‌های تیره

میانگین تعداد نورون‌های تیره در ناحیه قشر انتورینال بعد از القاء مکرر SD در مقایسه با گروه شم $7/3 \pm 46/3$ افزایش یافته است ($P < 0.001$)؛ $10/6 \pm 135/8$ - (تصویر ۲).

یافته‌های ایمنو هیستوشیمی

پس از القای مکرر SD، توزیع گیرنده‌های GABA-A α و

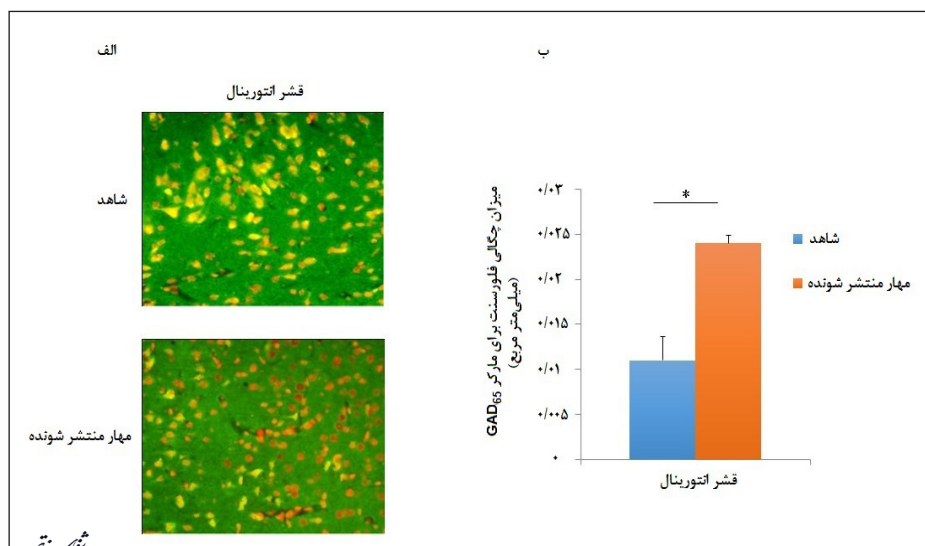


تصویر ۲- اثر القای مکرر SD بر تعداد نورون‌های تیره در قشر انتورینال در دو گروه شم ($n=10$) و SD ($n=10$) پس از چهار هفته القای مکرر آن در موش‌های نوجوان. (الف) نمای میکروسکوپ نوری (با بزرگنمایی $40\times$) از مقطع عرضی مغز موش در دو گروه شم و SD با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو. (ب) میانگین تعداد نورون‌های تیره در ناحیه انتورینال مغز موش در گروه شم و SD که تعداد نورون‌های تیره در گروه SD در مقایسه با گروه شم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. *** نشان‌دهنده معنی‌داری است. ($P < 0.001$)

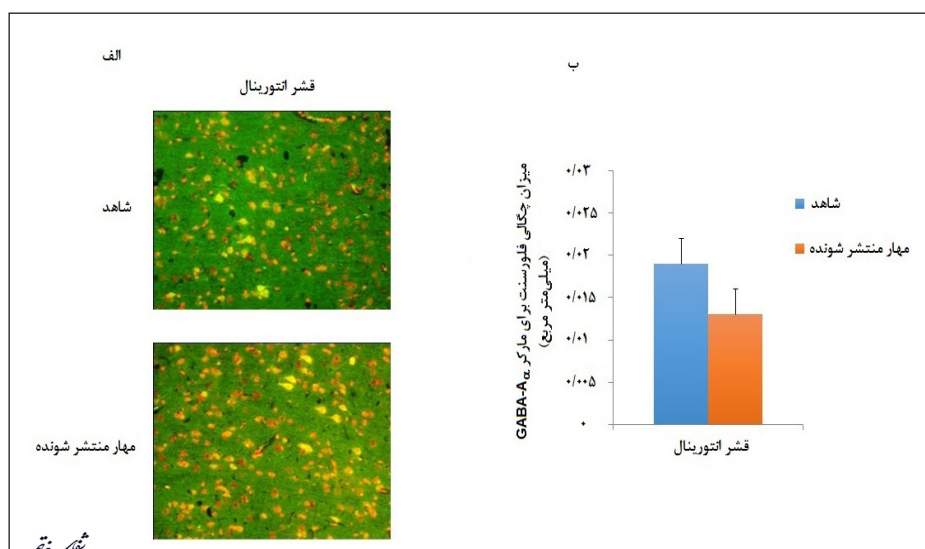
²² Direct current fluctuations

²³ Neocortical wave

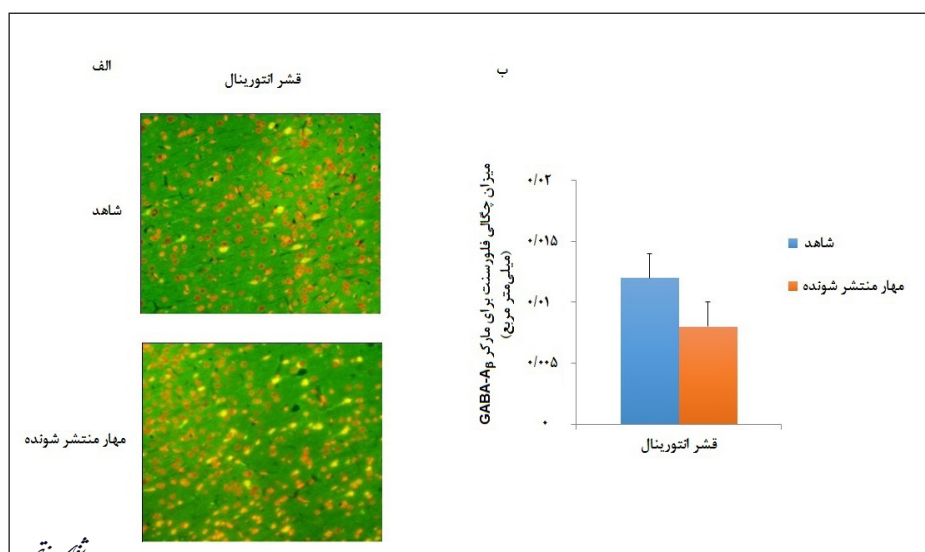
²⁴ Velocity



تصویر ۳- توزیع گیرنده GAD65. الف) تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسنت از منطقه قشر انتورینال. ب) توزیع GAD65 به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شده است. بیان این گیرنده به دنبال القای SD در منطقه قشر انتورینال نسبت به گروه شم (n=10) افزایش معنی داری را نشان می دهد. * نشان دهنده معنی داری $P < 0.05$ است.



تصویر ۴- توزیع گیرنده GABA-A_α. الف) تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسنت از منطقه قشر انتورینال. ب) توزیع گیرنده GABA-A_α به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شده است. بیان این گیرنده به دنبال القای SD در منطقه قشر انتورینال نسبت به گروه شم (n=10) تغییر معنی داری را نشان نداد.



تصویر ۵- توزیع گیرنده GABA-A_β. الف) تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسنت از منطقه قشر انتورینال. ب) توزیع گیرنده GABA-A_β به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شده است. بیان این گیرنده به دنبال القای SD در منطقه قشر انتورینال نسبت به گروه شم (n=10) تغییر معنی داری را نشان نداد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج ما حاکی از آن است که SD مکرر تنها می‌تواند آسیب نورونی در مغز ایجاد کند و نمی‌تواند مهار سیناپسی را به‌طور معنی‌داری تغییر دهد.

پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد ۱۰ تا ۲۰ درصد کاهش در عملکرد گابائریک برای بروز فعالیت‌های پاتوفیزیولوژیکی در مغز کافی است (۲۴). این در حالی است که در مطالعه حاضر نیز در گروهی که در آن‌ها القای SD صورت گرفت، از میزان بیان گیرنده‌های GABA-A اندکی کاسته شد که البته این کاهش معنی‌دار نبود. تغییر در سطوح ناقل عصبی گابا در مغز موش‌های ایسکمیک پس از القای تحریکاتی که منجر به ظهور امواج SD در نوار مغزی می‌شد، تغییرات محسوسی را نشان داد (۲۵).

همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت، تزریق GABA-A و GABA-B منجر به کاهش SD در موش صحرایی و گربه شد (۲۶)؛ این خود بیانگر نقش محافظتی گیرنده‌های مهاری در مغز در مقابل آسیب‌های وارده است. افزایش بیان پروتئین GAD65 در پاسخ به التهاب ایجاد شده ناشی از موج SD در تحقیق حاضر می‌تواند ناشی از تلاش جبرانی مغز برای تبدیل هر چه بیشتر این پروتئین پیش ساز به گابا و در نتیجه کاهش آسیب وارده به مغز باشد.

اطلاعات به دست آمده از تحقیق حاضر نشان‌دهنده نقش مؤثر پدیده SD و پدیده‌های مشابه SD^{۲۵} در آسیب‌های وارده به مغز است. موج SD نمی‌تواند در موش‌های صحرایی و یستار جوان منجر به افزایش بیان گیرنده‌های مهاری شود اما از سوی دیگر سبب افزایش بیان پروتئین پیش ساز این گیرنده‌ها در مغز می‌شود.

این مطالعه در درجه اول نشان داد که القای مکرر SD در موش‌های نوجوان منجر به آسیب از نظر ساختاری و عملکردی در سلول‌های عصبی خواهد شد. در پژوهشی که در سال ۱۹۸۸ صورت گرفت، تزریق مکرر کلرید پتاسیم در موش‌های بالغ نتوانست منجر به آسیب برگشت ناپذیر نورونی پس از ۴ روز شود (۱۸). این در حالی است که نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد القای چهار هفته‌ای SD در موش‌های نوجوان به‌طور معنی‌داری منجر به ایجاد سلول‌های تیره در نواحی قشر انتورینال در گروه SD در مقایسه با گروه شم می‌شود. همچنین پژوهش‌های متعدد دیگری که در این راستا صورت گرفت نشان داد که این موج اثرات تخریبی برگشت‌ناپذیری در بخش‌های قشری^{۲۵} و زیر قشری^{۲۶} مغز در شرایط هایپوکسیک^{۲۷} دارد (۲۱-۱۹، ۱۴، ۷، ۴، ۲).

امروزه به‌خوبی مشخص شده است که مغز پستانداران علاوه بر سیستم تحریکی از یک سیستم مهاری پیشرفته نیز بهره‌مند است که عملکرد ناقلین عصبی تحریکی گلوتاماتی را متعادل می‌کند (۲۳، ۲۲). انتقال‌دهنده عصبی GABA مهم‌ترین انتقال‌دهنده عصبی مهاری در مغز مهره‌داران به شمار می‌آید (۲۲).

در بررسی حاضر میزان بیان زیر واحد آلفای گیرنده مهاری GABA-A پس از القای مکرر SD در ناحیه قشر انتورینال افزایش معنی‌داری را نشان نداد. درحالی‌که بیان GAD65 افزایش معنی‌داری را در این ناحیه در مقایسه با گروه شم نشان داد. القای مکرر SD به‌صورت چهار مرتبه در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه در موش‌های بالغ، با اینکه بر روی انتقال سیناپسی تحریکی بی‌تأثیر بود اما مهار سیناپسی قشر را کاهش داد (۱۴).

منابع

1. Dodick DW, Gargus JJ. Why migraines strike. *Sci Am*. 2008; 299(2): 56-63.
2. Sadeghian H, Jafarian M, Karimzadeh F, Kafami L, Kazemi H, Coulon P, et al. Neuronal death by repetitive cortical spreading depression in juvenile rat brain. *Exp Neurol*. 2012; 233(1): 438-46.
3. Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Rev*. 2001; 38(1): 33-60.
4. Lotfinia AA, Lotfinia M, Ahmadi M, Khodaie B, Jafarian M. Assessment of AMPA receptor antagonist administration on spatial memory of juvenile rats induced repetitive spreading depression. *Shefaye Khatam*. 2014; 2(1): 56-62.
5. Lotfinia AA, Khodaie B, Lotfinia M, Ahmadi M, Jafarian M. Roles of excitatory and inhibitory receptors in

- spreading depression. *Shefaye Khatam*. 2013; 1(3): 38-48.
6. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*. 2011; 17(4): 439-47.
7. Khodaie B, Lotfinia AA, Lotfinia M. The effect of spreading depression on memory consolidation in juvenile Wistar rats. *Shefaye Khatam*. 2013; 1(3): 27-32.
8. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*. 2001; 81(3): 1065-96.
9. Hansen AJ, Zeuthen T. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand*. 1981; 113(4): 437-45.
10. Strong AJ. Dr. Bernice Grafstein's paper on the

^{۲۵} Cortical

^{۲۶} Sub cortical

^{۲۷} Hypoxic

^{۲۸} SD-like events

mechanism of spreading depression. *J Neurophysiol.* 2005; 94(1): 5-7.

11. Kraio R, Nicholson C. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience.* 1978; 3(11): 1045-59.

12. Gardner-Medwin A. Possible roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine. *J Exp Biol.* 1981; 95(1): 111-27.

13. Magistretti PJ, Pellerin L. Astrocytes couple synaptic activity to glucose utilization in the brain. *News Physiol Sci.* 1999; 14(5): 177-82.

14. Krüger H, Luhmann HJ, Heinemann U. Repetitive spreading depression causes selective suppression of GABAergic function. *Neuroreport.* 1996; 7(15-17): 2733-6.

15. Costa-Cruz RR, Amâncio-dos-Santos A, Guedes RC. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosci Lett.* 2006; 401(3): 271-5.

16. Ahmadi M, Banazadeh Dardashti M, Modarres Mousavi M, Karimzadeh F. Long-term potentiation enhanced in juvenile rat by repetitive cortical spreading depression. *Shefaye Khatam.* 2013; 1(3) : 33-7.

17. Khodaie B, Lotfinia AA, Ahmadi M, Lotfinia M, Jafarian M, Karimzadeh F, et al. Structural and functional effects of social isolation on the hippocampus of rats with traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* 2015; 278: 55-65.

18. Nedergaard M, Hansen AJ. Spreading depression is

not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res.* 1988; 449(1): 395-8.

19. Khodaie B, Moayer F. Role of dexamethasone on repetitive spreading depression in juvenile Wistar rat. *Shefaye Khatam.* 2013; 1(2): 27-34.

20. Khodaie B, Lotfinia AA, Lotfinia M, Ahmadi M, Jafarian M. The effect of MK-801 on memory after induction of repetitive spreading depression in the juvenile rat. *Shefaye Khatam.* 2013; 1(4): 22-8.

21. Lotfinia M, Lotfinia AA, Khodaie B, Ahmadi M, Jafarian M. Effect of nifedipine on memory impairment induced by repetitive spreading depression. *Shefaye Khatam.* 2014; 2(1): 17-23.

22. Foster AC, Kemp JA. Glutamate-and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2006; 6(1): 7-17.

23. Dutar P, Nicoll R. A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. *Nature.* 1988; 332(6160): 156-8.

24. Chagnac-Amitai Y, Connors B. Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol.* 1989; 61(4): 747-58.

25. Ruscak M. Changes in the level of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the ischaemic brain of rats following application of some stimuli evoking spreading EEG depression. *Physiol Bohemoslov.* 1961; 11: 192-8.

26. Holland P, Akerman S, Goadsby P. Cortical spreading depression-associated cerebral blood flow changes induced by mechanical stimulation are modulated by AMPA and GABA receptors. *Cephalalgia.* 2010; 30(5): 519-27.