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

Ahmad Ali Lotfinia[1], Leila Alizadeh[1], Mahmoud Lotfinia[2], Azadeh Sajadian[1], Amir Ghaemi[3, 1*]

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

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

[3]Department 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*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-15]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.2.27]

مطالعهٔ ایمونوهیستوشیمی 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[۱،۳*]

[۱]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران
[۲]دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳]گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۳ بهمن ۱۳۹۳
تاریخ پذیرش: ۱۵ اردیبهشت ۱۳۹۴

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 ایمونوهیستوشیمی 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 گیرندهٔ GABAA و گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD)، آنزیم بیوسنتز GABA، تکنیک ایمونوهیستوشیمی انجام شد. **یافته‌ها:** میانگین تعداد مهار منتشر شوندهٔ القاء شده در طی ۴ هفته آزمایش از نظر آماری افزایش یافت. میانگین تعداد نورون‌های تیرهٔ 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 گیرندهٔ $GABA\text{-}A_{\alpha}$ و $GABA\text{-}A_{\beta}$ به‌طور معنی‌داری در آن ناحیه پس از مهار منتشر شونده تغییر نکردند. **نتیجه گیری:** 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 شوندهٔ قشری
۲. قشر انتورینال
۳. گاما-آمینو بوتیریک اسید

* **نویسنده مسئول:** امیر قائمی
آدرس الکترونیکی: *ghaem_amir@yahoo.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-15]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.2.27]

مقدمه

مهار منتشر شونده (SD)[1] که یک ویژگی بیوالکتریکی ذاتی در سیستم اعصاب مرکزی است، یک پدیدهٔ پاتوفیزیولوژیک شناخته شده می‌باشد که با تغییرات متابولیک و همودینامیک در سیستم اعصاب مرکزی و بیش از حد فعال شدن نورون‌ها[2] همراه است (۳-۱). این پدیده که اولین بار در سال ۱۹۴۴ توسط آقای لئو، فیزیولوژیست برزیلی توصیف شد، به‌صورت یک موج الکتریکی گذرای برگشت‌پذیر در مادهٔ خاکستری با سرعت حدود ۵-۳ میلی‌متر در دقیقه پخش شده و با دپلاریزاسیون نورونی -گلیالی به آهستگی در دیگر نقاط بافت مغز نیز گسترش می‌یابد. به دنبال پخش این موج در مغز، خاموشی موقتی در فعالیت الکتریکی نورون‌ها در ناحیهٔ قشری مغز اتفاق می‌افتد که نمود آن را می‌توان به‌وضوح با تغییر در دامنه[3] و طول مدت[4] موج مذکور در نوار الکتروآنسفالوگرافی[5] مشاهده کرد (۵-۳).

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[6]، خونریزی‌های زیر عنکبوتیه آنوریسمال[7]، بیماری‌های مغزی -عروقی، خونریزی داخل مغزی خود به خودی[8]، فراموشی گذرا، صرع و همچنین آسیب‌های وارده به سر می‌باشد (۶).

SD از دو جهت حائز اهمیت است، ابتدا همان‌طور که گفته شد آسیب وارده به سلول‌های عصبی توسط بسیاری از بیماری‌های تخریب‌کنندهٔ سیستم عصبی به سبب پخش این موج در مغز اتفاق می‌افتد و دوم آنکه شناخت این پدیده از جهت به دست آوردن تصویری شفاف از فعالیت الکتروفیزیولوژی مغز نیز دارای اهمیت فراوان است (۷). هنوز به‌درستی عامل اصلی بروز این موج مشخص نیست، اما یافته‌های اخیر بر چند عاملی بودن این پدیده دلالت می‌کنند و عوامل متعددی را در ایجاد، پخش و گسترده شدن این موج در مغز دخیل می‌دانند (۸).

نورون‌ها مانند یک باتری در مغز عمل می‌کنند. آن‌ها انرژی الکتروشیمیایی را به‌وسیلهٔ شیب غلظتی یون‌ها و همچنین شارژ الکتریکی در طول غشاء ذخیره می‌کنند. سپس با اجازه دادن به ورود و خروج یون‌هایی نظیر سدیم، پتاسیم و کلر از راه کانال‌های موجود بر روی سطح غشاء، در فضایی به نام سیناپس، پتانسیل عمل را ایجاد کرده و از این طریق پیام‌های عصبی را منتقل می‌کنند (۶).

نتیجهٔ بر هم خوردن توازن یونی و جابه‌جا شدن یون‌ها به‌ویژه تجمع بیش از حد یون پتاسیم در فضای خارج سلولی به هر دلیل، دپلاریزاسیون[9] مجدد سلول است (۱۲-۹) که سلول عصبی را از حالت طبیعی خارج می‌کند. از سوی دیگر برهم خوردن تعادل بین ناقلین عصبی[10] تحریکی و مهاری نیز می‌تواند از طریق بالا رفتن میزان گلوتامات در فضای سیناپسی سبب افزایش تحریک‌پذیری نورون‌ها و دپلاریزاسیون مکرر آن‌ها گردد (۱۳، ۵). به همین ترتیب ما نیز فرض کردیم SD می‌تواند با کاهش ناقلین عصبی یا گیرنده‌های مهاری و یا به‌طور کلی کاهش عملکرد مهاری سیستم گابائرژیک سبب تحریک‌پذیری بیشتر نورون‌ها و در نتیجه انتشار آسان‌تر موج در مغز گردد (۱۴). از این رو هدف از انجام این بررسی، سنجش میزان پراکندگی زیر واحدهای گیرنده‌های GABA[11] و نیز آنزیم گلوتامات دِ-کربوکسیلاز (GAD)[12]، یکی از مهم‌ترین واسطه‌ها در تولید ناقل عصبی GABA، پس از القای SD می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این مطالعه، ۲۰ سر موش صحرایی ویستار نابالغ ۲۰ تا ۳۰ روزه در محدودهٔ وزنی ۱۰۰-۸۰ گرم (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا) انتخاب شد. در طول زمان این مطالعه موش‌ها به‌صورت انفرادی در دمای ۲±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد 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 کمیتهٔ اخلاق مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا اجرا شد. حیوانات به‌طور تصادفی به ۲ گروه شم و SD تقسیم شدند.

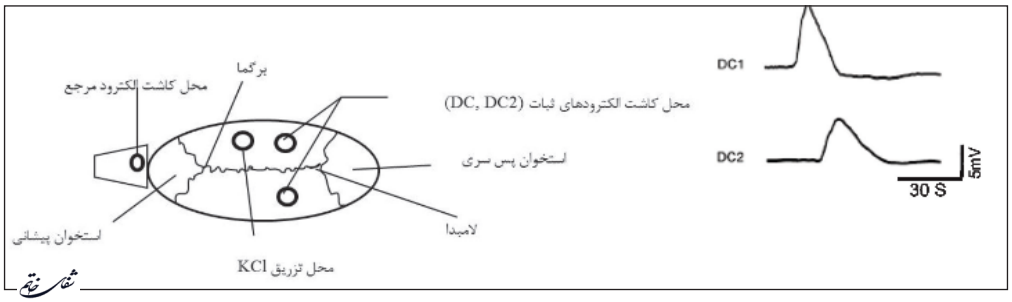
جراحی و القای SD

در ابتدا موش‌ها با استفاده از یک ترازوی حساس وزن شده و سپس با تزریق پنتوباربیتال[13] (Sigma; ۶۰ mg/kg) به‌صورت درون صفاقی بیهوش شدند. پس از بیهوشی سر حیوان‌ها در دستگاه استریوتاکس (تجهیزات استولتینگ، آمریکا)[14] ثابت گردید و موی سر آن‌ها تراشیده شد. سپس ناحیهٔ تراشیده شده ضد عفونی گردیده و با تیغ بیستوری یک برش طولی روی پوست سر ایجاد شد. به دنبال آن بافت‌های زیر جلدی کنار زده شد تا استخوان جمجمه در معرض دید قرار گیرد. سپس با استفاده از متهٔ 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 به‌عنوان مرجع ایجاد شد. در داخل سوراخ استخوان پیشانی کانولی که از سرسوزن‌های استیل درجهٔ ۲۶ به طول یک سانتی‌متر به‌طور دستی درست شده بود؛ به‌منظور انجام تزریق‌های داخل مغزی کلرید پتاسیم و سرم رینگر قرار داده شد.

برای حفاظت کانولا از آلودگی و بسته نشدن، با استفاده از سوزن ویژهٔ دندانپزشکی، سرپوشی برای کانول‌های کاشته شده، ساخته شد. سپس دو الکترود نقره در داخل سوراخ‌های استخوان آهیانه و یکی در سوراخ استخوان بینی به‌منظور ثبت امواج مغزی قرار داده شد (تصویر ۱). در نهایت ناحیهٔ جراحی توسط سیمان جراحی پر گردید (۱۵). پس از اتمام جراحی

[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)

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-15]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.2.27]



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

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

برای القای SD، موش‌ها به‌وسیلهٔ پنتوباربیتال (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 به‌وسیلهٔ سرنگ همیلتون ۱۰ میکرولیتری که توسط یک لولهٔ پلی‌اتیلن به سرنگ تزریق درجهٔ ۲۷ وصل شده بود، انجام شدند. برای اطمینان از القای درست SD، همزمان با تزریق کلرید پتاسیم، امواج الکتریکی مغزی به مدت ۴۵-۳۰ 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; ۳۵۰mg/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 جمجمه 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 تهیهٔ مقاطع میکروسکوپی آماده شوند. پس از طی مراحل ثابت سازی، آبگیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری در پارافین، به‌صورت مقاطع با ضخامت ۸ میکرون و به‌صورت کرونال[15] 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 ناحیهٔ قشری انتورینال[16] در نظر گرفته شدند. برش‌ها با عبور از گزیلل و الکل دپارافینه و آبدهی شدند. در مرحلهٔ بعد به‌وسیلهٔ بافر فسفات سالین (PBS)[17] شستشو داده شده و سپس به‌منظور احیاء آنتی ژنی از آنزیم تریپسین ۰/۰۵٪ در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. برش‌ها در PBS شستشو داده شده و سپس در Triton X-100 ۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. برش‌ها دوباره توسط PBS شستشو داده شدند و لام‌ها در BSA[18] ۱ درصد و NGS[19] ۵ درصد به‌عنوان بلاکر به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند و به مدت یک شب در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیهٔ خرگوشی (RNASEN; Abcam, Cambridge, United Kingdom) بر علیه $GABA\text{-}A_{\alpha}$، $GABA\text{-}A_{\beta}$ و GAD65 به‌صورت جداگانه انکوبه شدند. غلظت آنتی‌بادی‌ها به ترتیب ۱:۱۰۰، ۱:۵۰ 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 مرحلهٔ بعدی با آنتی‌بادی ثانویهٔ فلورسنت مونوکلونال (RNASEN; Abcam, Cambridge, United Kingdom) Goat anti Rabbit 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 یدید[20] 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 ۴۰ X گرفته شده و در رایانه ذخیره گردید. در بررسی میکروسکوپی، پارامترهای بیان گیرندهٔ گابا در قشر انتورینال مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان چگالی فلورسنت در سلول‌های واکنش داده با آنتی‌بادی گیرنده‌های $GABA\text{-}A_{\alpha}$، $GABA\text{-}A_{\beta}$ و GAD65 در گروه‌های مختلف در ناحیهٔ 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 (Mean ± SEM) ارائه شدند. نتایج آزمون KS[21] 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.

[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

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-15]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.2.27]

یافته‌ها

تغییرات نوار مغزی به دنبال القای مکرر SD

تزریق کلرید پتاسیم از راه کانولا به درون مغز موش‌های صحرایی نوجوان به مدت چهار هفته منجر به ایجاد نوسانات DC منفی[22] و به دنبال آن ایجاد امواج مثبت گردید. میانگین تعداد دامنه و طول مدت اولین موج نئوکورتیکال[23] شبه SD، ۲/۱ ± ۱۰/۸ میلی ولت و ۹ ± ۱۱۲ ثانیه و سرعت پخش[24] این جابه‌جایی منفی ۰/۲ ± ۳ میلی‌متر در دقیقه بود. دامنه، طول مدت و همچنین سرعت پخش امواج SD قشری القاء شده در طول ۳ هفتهٔ بعدی در مقایسه با هفتهٔ 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 هفتهٔ اول ۰/۲ ± ۱/۴، در هفتهٔ دوم ۰/۳ ± ۱/۸، در هفتهٔ سوم ۰/۲ ± ۲/۱ و در هفتهٔ چهارم ۰/۳ ± ۲/۵ بود ($P<0/05$).

تأثیر القای مکرر SD بر ایجاد نورون‌های تیره

میانگین تعداد نورون‌های تیره در ناحیهٔ قشر انتورینال بعد از القاء مکرر SD در مقایسه با گروه شم (۷/۳ ± ۴۶/۳) افزایش یافته است ($P<0/001$؛ ۱۰/۶ ± ۱۳۵/۸)-(تصویر ۲).

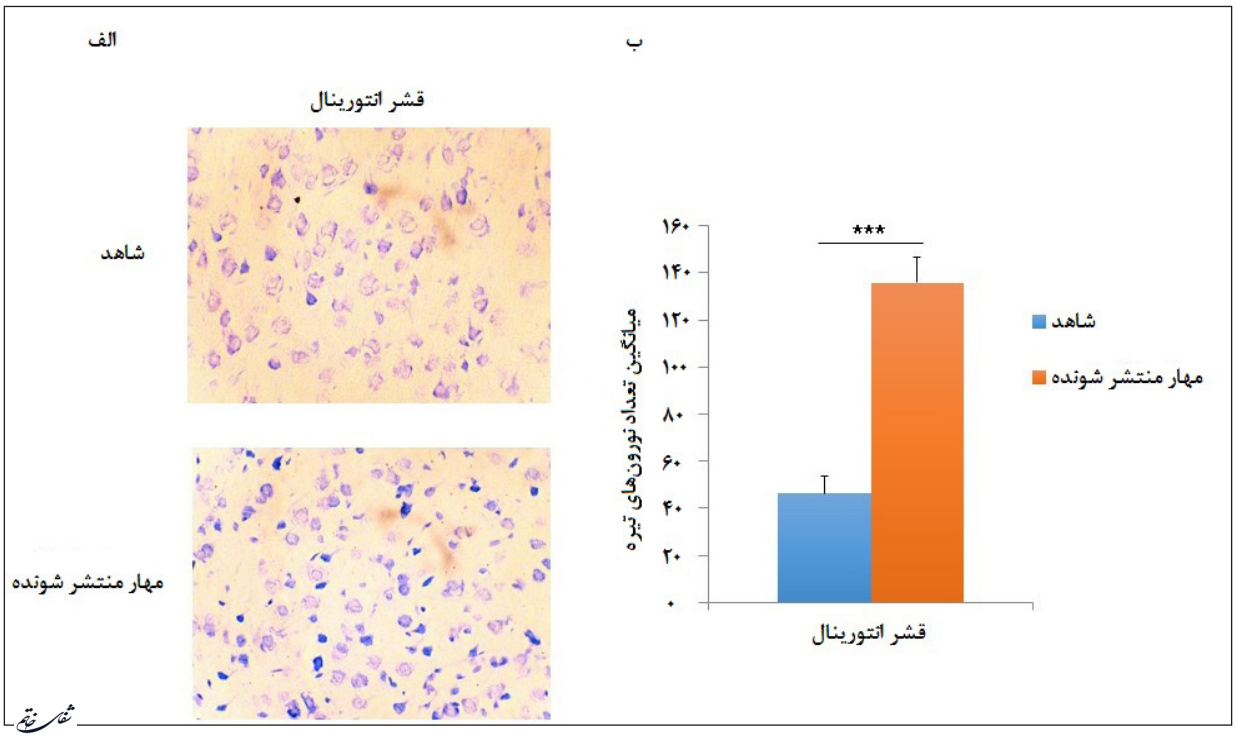
یافته‌های ایمونوهیستوشیمی

پس از القای مکرر SD، توزیع گیرنده‌های $GABA\text{-}A_\alpha$ و $GABA\text{-}A_\beta$ و آنزیم GAD65 در ناحیهٔ قشری انتورینال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین چگالی فلورسنت نورون‌های واکنش داده در واحد میلی‌متر مربع با آنتی‌بادی GAD65 در گروه SD، ۰/۰۰۰۸ ± ۰/۰۲۴ و در گروه شم ۰/۰۰۲۶ ± ۰/۰۱۱ در ناحیهٔ قشری انتورینال بود. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار بیان GAD65 در ناحیهٔ قشر انتورینال در موش‌های گروه SD در مقایسه با گروه شم بود ($P<0/05$)-(تصویر ۳).

دو زیرگروه برای گیرندهٔ GABA-A به‌صورت $GABA\text{-}A_\alpha$ و $GABA\text{-}A_\beta$ وجود دارد. به‌منظور بررسی تغییرات گیرندهٔ GABA-A پس از القای مکرر SD، در این مطالعه توزیع و بیان $GABA\text{-}A_\alpha$ و $GABA\text{-}A_\beta$ مورد بررسی قرار گرفت.

میانگین چگالی فلورسنت نورون‌های واکنش داده در واحد میلی‌متر مربع در گیرندهٔ $GABA\text{-}A_\alpha$؛ ۰/۰۰۳ ± ۰/۰۱۳ در گروه SD و ۰/۰۰۳ ± ۰/۰۱۹ در گروه شم در ناحیهٔ قشر انتورینال بود (تصویر ۴). نتایج تغییر معنی‌داری را در بیان گیرندهٔ $GABA\text{-}A_\alpha$ در ناحیهٔ قشر انتورینال در گروه SD در مقایسه با گروه شم نشان نداد.

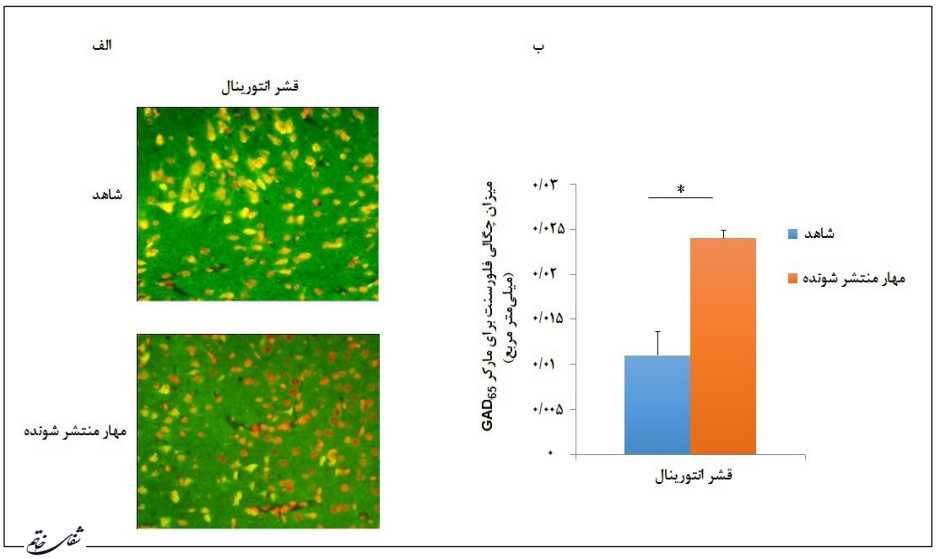
میانگین چگالی فلورسنت سلول‌های واکنش داده در واحد میلی‌متر مربع در گیرندهٔ $GABA\text{-}A_\beta$ در گروه SD ۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۸ و در گروه شم ۰/۰۰۲ ± ۰/۰۱۲ در ناحیهٔ مذکور بود. نتایج تغییر معنی‌داری را در بیان گیرندهٔ $GABA\text{-}A_\beta$ در ناحیهٔ قشر انتورینال در گروه SD در مقایسه با گروه شم نشان نداد (تصویر ۵).



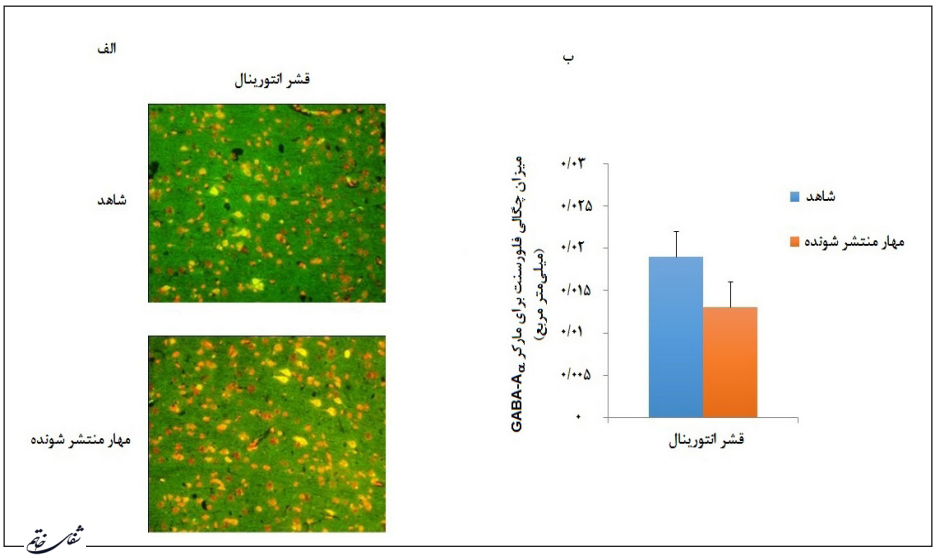
تصویر ۲- اثر القای مکرر SD بر تعداد نورون‌های تیره در قشر انتورینال در دو گروه شم (n=۱۰) و SD (n=۱۰) پس از چهار هفته القای مکرر آن در موش‌های نوجوان. الف) نمای میکروسکوپ نوری (با بزرگنمایی X ۴۰) از مقطع عرضی مغز موش در دو گروه شم و SD با رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو. ب) میانگین تعداد نورون‌های تیره در ناحیهٔ 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. *** نشان‌دهندهٔ معنی‌داری $P<0/001$ است.

[22] Direct current fluctuations
[23] Neocortical wave
[24] Velocity

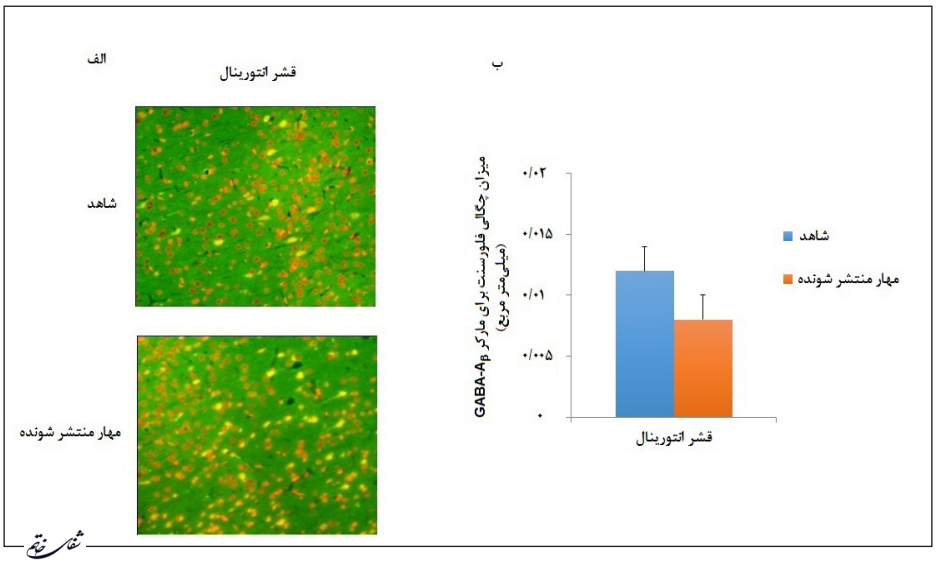
[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-15]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.2.27]



تصویر ۳- توزیع گیرندهٔ GAD65. الف) تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسنت از منطقهٔ قشر انتورینال. ب) توزیع GAD65 به‌صورت Mean ± SEM نمایش داده شده است. بیان این آنزیم به دنبال القای SD در منطقهٔ قشر انتورینال نسبت به گروه شم (n=۱۰) افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. * نشان‌دهندهٔ معنی‌داری $P<۰/۰۵$ است.



تصویر ۴- توزیع گیرندهٔ $GABA\text{-}A_{\alpha}$. الف) تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسنت از منطقهٔ قشر انتورینال. ب) توزیع گیرندهٔ GABA-Aα به‌صورت Mean ± SEM نمایش داده شده است. بیان این گیرنده به دنبال القای SD در منطقهٔ قشر انتورینال نسبت به گروه شم (n=۱۰) تغییر معنی‌داری را نشان نداد.



تصویر ۵- توزیع گیرندهٔ $GABA\text{-}A_{\beta}$. الف) تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسنت از منطقهٔ قشر انتورینال. ب) توزیع گیرندهٔ $GABA\text{-}A_{\beta}$ به‌صورت Mean ± SEM نمایش داده شده است. بیان این گیرنده به دنبال القای SD در منطقهٔ قشر انتورینال نسبت به گروه شم (n=۱۰) تغییر معنی‌داری را نشان نداد.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-15]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.2.27]

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه در درجهٔ 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). انتقال‌دهندهٔ عصبی GABA مهم‌ترین انتقال‌دهندهٔ عصبی مهاری در مغز مهره‌داران به شمار می‌آید (۲۲).

در بررسی حاضر میزان بیان زیر واحد آلفای گیرندهٔ مهاری GABA-A پس از القای مکرر SD در ناحیهٔ 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 فاصلهٔ زمانی ۳۰ دقیقه در موش‌های بالغ، با اینکه بر روی انتقال سیناپسی تحریکی بی‌تأثیر بود اما مهار سیناپسی قشر را کاهش داد (۱۴).

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 گابائرژیک برای بروز فعالیت‌های پاتوفیزیولوژیکی در مغز کافی است (۲۴). این در حالی است که در مطالعهٔ 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 نشان‌دهندهٔ نقش مؤثر پدیدهٔ SD و پدیده‌های مشابه SD[۲۸] در آسیب‌های وارده به مغز است. موج SD نمی‌تواند در موش‌های صحرایی ویستار جوان منجر به افزایش بیان گیرنده‌های مهاری شود اما از سوی دیگر سبب افزایش بیان پروتئین پیش ساز این گیرنده‌ها در مغز می‌شود.

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

[25] Cortical
[26] Sub cortical
[27] Hypoxic
[28] SD-like events

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-15]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.2.27]

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.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-06-15]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.3.2.27]