

مروری بر روش‌های ثبت پتانسیل‌های میدانی خارج سلولی در حیوانات آزمایشگاهی

فاطمه صفارزاده^۱، *فریبا کریم زاده^۲

چکیده

مقدمه: روش‌های ثبت پتانسیل‌های میدانی خارج سلولی، از معتبرترین تکنیک‌های تشخیصی در حوزه درمان و پژوهش به شمار می‌رود. این روش‌ها با توجه به دقت بالا، به تصویر کشیدن آنی تغییرات در فعالیت سیستم عصبی و ارزان و قابل دسترس بودن از جمله تکنیک‌های رایج در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی محسوب می‌گردند.

مواد و روش‌ها: این مقاله با جستجو و مطالعه مقالات متعدد الکترونیکی و کتب معتبر، در حیطه اساس تکنیک‌های رایج در آزمایشگاه‌ها و مراکز تحقیقات، گردآوری شده و سعی در به تصویر کشیدن انواع روش‌های ثبت پتانسیل‌های میدانی خارج سلولی نموده است. یافته‌ها: در این مطالعه ثبت پتانسیل‌های میدانی خارج سلولی به دو روش ثبت در محیط *In vivo* (موجود زنده) و *In vitro* (محیط آزمایشگاهی) به طور مفصل شرح داده شد. از جمله می‌توان به نحوه جراحی حیوان و کاشت الکترودهای ثابت در روش *In vivo* و هم چنین نحوه ضبط امواج مغزی اشاره نمود. نتایج این مطالعه همچنین نحوه تهیه مقاطع مغزی و چگونگی زنده نگهداشتن آنها به منظور ثبت پتانسیل‌های میدانی خارج سلولی در محیط *In vitro* را با جزئیات کامل شرح داده است.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه تجهیزات این روش‌ها توسط مهندسين ایرانی ساخته و به مراکز درمانی و تحقیقاتی ارائه می‌گردد، آشنا شدن با این تکنیک‌ها موجب می‌شود تا محققان جوان با بکار گرفتن روش‌های قابل اجرا و دقیق بتوانند در امر تحقیق و پژوهش گامی مؤثر بردارند. این مطالعه ضمن معرفی انواع روش‌های ثبت پتانسیل‌های میدانی خارج سلولی، چگونگی و نحوه انجام هر کدام از تکنیک‌ها را به طور مجزا و با جزئیات بررسی خواهد نمود.

کلمات کلیدی: نوار مغزی، پتانسیل میدانی، ثبت خارج سلولی

مقدمه

پاسخ الکتریکی در نورون پس سیناپسی می‌گردد. این سیگنال‌های الکتریکی در طول آکسون نورون پس سیناپسی عبور می‌کنند (۱). جریان‌های الکتریکی که در مغز از جریان‌های سیناپسی یا جریانات فعال در نزدیکی یک مدار (خارج یا داخل سلول) نشأت می‌گیرد موجب تشکیل یک پتانسیل میدانی ثابت یا پویا با یک سازماندهی سه بعدی می‌گردد (۲). همانطور که از عنوان پتانسیل‌های میدانی استنتاج می‌گردد، این پتانسیل‌ها در یک حجم کوچک، محدود نمی‌شوند بلکه در یک حجم وسیع، مانند شبکه عصبی و ارگان‌های محافظت کننده آن منتشر می‌گردند (۲). این حجم برای فعالیت

تمامی اطلاعات رسیده به سلول‌های عصبی (نورون‌ها) موجود در سیستم عصبی مرکزی در قالب یک پالس الکتریکی عبور کرده و از طریق آکسون‌ها به سایر نورون‌ها منتقل می‌شوند. هر نورون به تنهایی می‌تواند با چندین نورون مرتبط شود و از طریق این ارتباطات، اطلاعات به کمک سیناپس‌ها (محل الحاق زوائد نورونی به یکدیگر) منتقل شده و سبب ترشح ناقلین عصبی از پایانه نورون پیش سیناپسی می‌گردد (۱). این ناقلین سبب فعال شدن گیرنده‌های موجود در نورون پس سیناپسی می‌شوند. فعال شدن این گیرنده‌ها سبب ایجاد یک

۱- دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

آدرس الکترونیک: Fariba_Karimzade@yahoo.com

است صورت می گیرد در صورتی که ثبت های *In vitro* پس از جدا نمودن سر حیوان و خارج نمودن مغز، از قسمت های خاصی از مغز خارج شده انجام می شود. از جمله ثبت های *In vivo* می توان به ثبت فعالیت نورون ها به روش الکتروکورتیکوگرافی و ثبت تک واحدی (Single Unite Recording) اشاره نمود (۴).

الکتروکورتیکوگرافی

در ثبت های الکتروکورتیکوگرافی به منظور دریافت و ثبت بهتر امواج مغزی، الکترودهای ثابت مستقیماً بر روی نرم شامه قشر مغزی قرار داده می شود. لذا برای اینکار نیاز به جراحی و کاشت الکتروده می باشد. حیوان با استفاده از پنتوباریتال (60 mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکسی قرار داده می شود. پس از کوتاه کردن موهای ناحیه سر، از ناحیه بین دو چشم تا ناحیه بین دو گوش، برشی به طول تقریبی ۳-۲ سانتی متر روی پوست سر در خط وسط از مهاذات پشت دو چشم تا مهاذات جلوی دو گوش داده می شود. سپس بافت همبند و پریوست جمجمه در ناحیه مورد نظر برداشته و محل برگما (Bregma) مشخص می گردد (۵). دو سوراخ بر روی استخوان های آهیانه طرفین و یک سوراخ بر روی استخوان بینی تعبیه شده و دو الکتروده با روکش نقره بر روی نرم شامه به منظور ثبت امواج مغزی و یک الکتروده بر روی پیاز بویایی به عنوان الکتروده مرجع کاشته می شود (۶). الکترودها به کمک سیمان دندان پزشکی ثابت خواهند شد (شکل ۱).

ثبت تک واحدی

هنگامی که نورونی پتانسیل عمل تولید می کند در نواحی تحریک پذیر

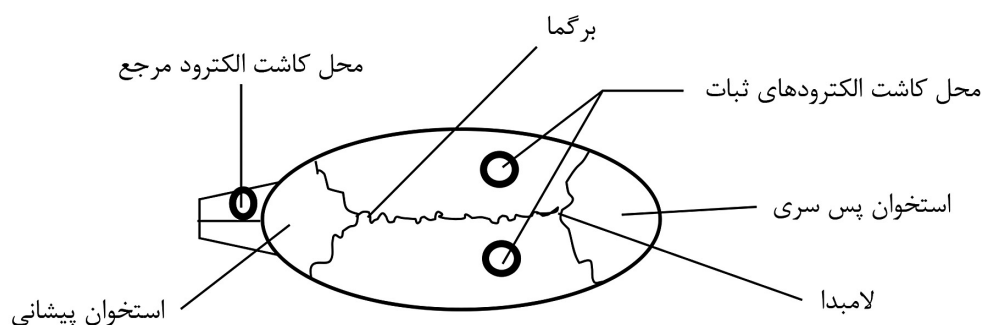
سلول های عصبی شامل: مغز، عروق خونی و منز، استخوان های جمجمه و پوست سر می باشد. انواع پتانسیل های میدانی شامل فعالیت های الکتریکی خودبخودی، القایی و برانگیخته می باشد که از روی سر، سطح نرم شامه یا حتی از داخل قسمت های خاصی از ساختارهای داخل مغزی می توان آنها را ثبت نمود (۲). نوار مغزی یا الکتروانسفالوگرافی (EEG) ثبت فعالیت الکتریکی خودبخودی سلول های عصبی است که در انسان به طور معمول از روی سر ثبت می شود. نوار مغزی حامل اطلاعات مهم تشخیصی در زمینه بیماری های عصبی مخصوصاً بیماری صرع می باشد. پتانسیل های برانگیخته در تشخیص اختلالات مسیرهای حسی یا حرکتی بسیار ارزشمندند. نوار مغزی در آشکار ساختن نوسانات و فعالیت های هم نوای شبکه عصبی نقش بسزایی را ایفا می نماید (۲، ۳).

مواد و روش ها

این مطالعه به جستجو در منابع متعدد از جمله: Google Scholar، Science Direct و Scopus، MEDLINE، ISI web of Knowledge کلمات کلیدی EEG، Extra cellular recording و Field potential پرداخته است. این مطالعه بر مقالات متمرکز در حوزه حیوانات آزمایشگاهی متمرکز گردید. در این مطالعه علاوه بر مقالات متعدد از کتب معتبر و انحصاری در زمینه روش های الکتروفیزیولوژی رایج در مراکز تحقیقات استفاده شد.

نتایج

در مطالعات حیوانی ثبت پتانسیل های میدانی به دو روش *In vivo* و *In vitro* انجام می شود. ثبت های *In vivo* در حالی که موجود زنده



شکل ۱- نمای شماتیک از محل کاشت الکترودها. شکل بالا نمادی از استخوان های جمجمه موش صحرایی می باشد که پس از کنار زدن پوست نمایان می گردد. دو الکتروده ثابت برای ثبت نوار مغزی بر روی نرم شامه قشر پاریتال و الکتروده مرجع بر روی پیاز بویایی کاشته می شود.

بوسیله میکروالکترودها و به صورت ثبت خارج سلولی تک واحدی بوده است. از این فن برای شناسایی فعالیت نورون‌ها و نیز کشف مدارهای سیناپسی استفاده می‌شود. در این تکنیک با بیهوشی طولانی مدت، از الکترودهای فلزی با روکش تنگستن استفاده می‌شود. در پایان کار به منظور تعیین محل الکتروود از القا جریان شدید تخریب کننده‌ی بافت به الکتروود استفاده می‌گردد (۸).

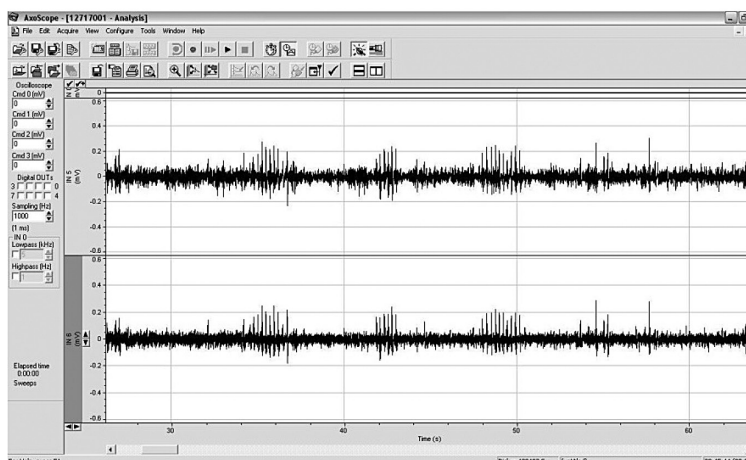
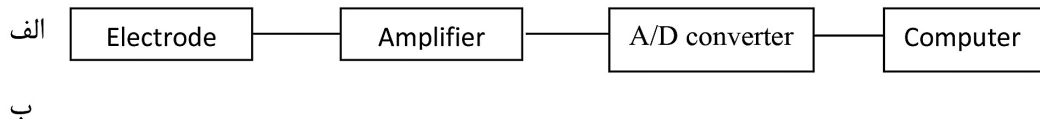
چگونگی ثبت امواج دریافت شده

هر یک از الکترودهای نقره کاشته شده بر روی نرم شامه، به آمپلی فایرها و تقویت کننده‌های امواج متصل می‌شوند. امواج تقویت شده به سیستم تبدیل کننده اطلاعات آنالوگ به دیجیتال، منتقل و روی صفحه نمایشگر به تصویر کشیده می‌شوند (شکل ۲ الف و ب).

ثبت پتانسیل‌های میدانی به روش In Vitro

همانطور که ذکر شد در ثبت پتانسیل‌های میدانی به روش In vitro یا محیط آزمایشگاهی، ابتدا حیوان (به طور متداول موش صحرایی) بیهوش شده و با گیوتین سر حیوان جدا می‌گردد. پوست و استخوان‌های جمجمه را از روی سطح مغز برداشته و مغز با قاشقک مخصوص بدون آسیب رساندن به بافت و ساختار مغز خارج

غشاء آن (معمولاً در بخش آغازین آکسون و جسم سلولی نورون) قدرت هدایت یونی افزایش می‌یابد. افزایش هدایت یونی موجب تحریک نواحی مجاور در اطراف نورون و انتشار موج الکتریکی شده می‌گردد. این حالت باعث ایجاد پتانسیل میدانی در خارج سلول می‌شود که به آن پتانسیل میدانی خارج سلولی یا میدان نيزه (Spike potential field) می‌گویند (۱). نيزه‌ی خارج سلولی یک پتانسیل متغیر و سریع است که در خارج سلول متعاقب پتانسیل عمل ایجاد و منتشر می‌شود. این پتانسیل عمل به سرعت در فواصل دورتر از نورون از بین می‌رود. بنابراین برای ثبت پتانسیل نيزه، باید الکتروود تا حد امکان به غشاء نورون نزدیک باشد (۷). شکل، دامنه و قطبیت نيزه‌های خارج سلولی وابسته به شکل فضایی نورون و نیز موقعیت الکتروود الکتروود نسبت به سلول است. گاهی اوقات می‌توان از شکل نيزه اطلاعاتی راجع به شکل فضایی نورون و موقعیت الکتروود نسبت به سلول به دست آورد. اگر الکتروود ثبات به ناحیه‌ای که جریان القایی در سلول رو به خارج است نزدیک باشد، قطبیت نيزه در فاز شروع مثبت یا به سمت بالا خواهد بود. اگر الکتروود ثبات به ناحیه‌ای که جریان القایی در سلول رو به داخل است نزدیک باشد، قطبیت نيزه در فاز شروع منفی یا به سمت پائین خواهد بود (۸). بیشتر تحقیقات اولیه روی فعالیت تک نورون‌ها

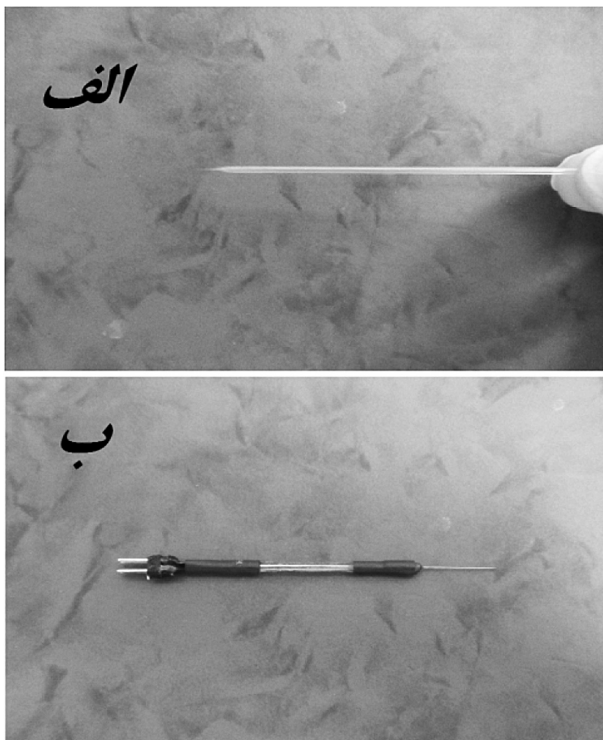


شکل ۲- نمایی از اجزای سیستم ثبت و ضبط امواج مغزی. الف) سیگنال‌های دریافت شده توسط الکترودها به کمک آمپلی فایرها تقویت و به سیستم مبدل اطلاعات منتقل می‌شوند. اطلاعات از آنالوگ (A) به حالت دیجیتال (D) درآمده و به رایانه منتقل و ضبط می‌گردد. ب) نمونه‌ای از امواج الکتروکورتیکوگرافی که بر روی نمایشگر به تصویر کشیده شده است.

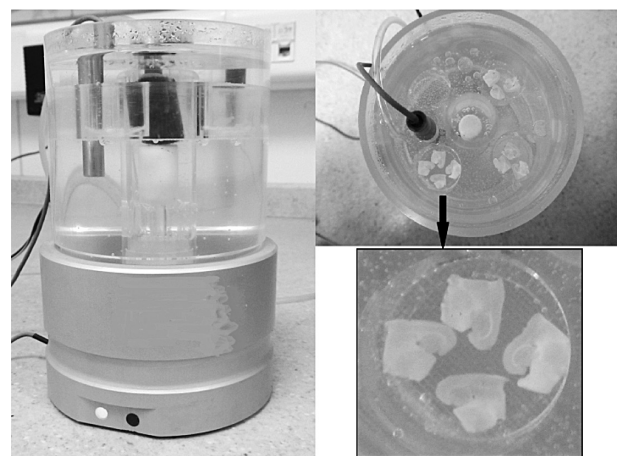
۱- الکتروثبات؛ این الکتروثبات از جنس شیشه با قطر خارجی ۱/۵ میلی متر می باشد و با محلول نمکی NaCl با غلظت ۲ مولار پر می شود (شکل ۴، الف) ۲- الکتروثبات تحریک که از جنس تنگستن یا پلاتین یا نقره می باشد (شکل ۴، ب). ۳- ریز بازوی مکانیکی (Micromanipulator) که در شکل ۵ نشان داده شده است بازویی است که الکترودها بر روی آن ثابت شده و امکان حرکت و تنظیم محل قرارگیری الکترودها را بر روی بافت فراهم می کند. ۴- اتاقک ثبت که اتاقکی شبیه به اتاقک نگهداری است و در آن یکی از برش های مغزی تهیه شده قرار گرفته و دائماً در معرض ACSF کربوژنه با سرعت ۲-۳ میلی لیتر در دقیقه قرار می گیرد. ۵- میکروسکوپ که به منظور مشاهده نمونه و اطمینان از صحت محل قرار دادن الکترودها در محل مورد نظر بر روی بافت بکار می رود (شکل ۵). ۶- دستگاه تحریک (Stimulator): این دستگاه یک جریان الکتریکی با شدت، فرکانس و مدت مشخص به الکتروثبات تحریک که بر روی بافت مغزی قرار گرفته منتقل می نماید. ۷- آمپلی فایر یا تقویت کننده امواج: این دستگاه سیگنال های ارسالی از الکترودهای ثبات را تقویت کرده و به کامپیوتر ارسال می نماید. ۸- رایانه که در آن

می گردد (۹). مغز خارج شده در محلول مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF: Artificial cerebrospinal fluid) با دمای 4°C قرار داده می شود. تمامی این مراحل به منظور زنده ماندن بافت عصبی باید در مدت ۳۰-۳۵ ثانیه انجام شود. لذا برای انجام ثبت در محیط آزمایشگاهی باید محلول ACSF قبل از شروع کار آماده گردد. این محلول شامل املاح و نمک هایی مشابه ترکیبات یونی مایع مغزی-نخاعی است و حاوی آب مقطر، NaCl، KCl، MgSO_4 ، NaH_2PO_4 ، NaHCO_3 ، CaCl_2 و گلوکز می باشد و دائماً با مخلوط گازی اکسیژن و دی اکسید کربن کربوژنه می شود تا اسیدیته محلول در سطح ۷/۴ حفظ گردد (۱۰). به منظور کم شدن متابولیسم بافت مغز، نمونه خارج شده ۱۰ دقیقه در محلول ACSF سرد شده باقی می ماند. سپس ناحیه انتخاب شده برای آزمایش، با دقت از بقیه نواحی مغز جدا شده و بر روی صفحه مخصوص ویبراتوم (دستگاه برش) چسبانده می شود. در صفحه مخصوص ویبراتوم نیز ACSF جریان دارد. از نمونه ای استخراج شده، برش های ۳۵۰-۴۰۰ میکرومتری تهیه شده و به اتاقک نگهداری منتقل می شود (شکل ۳). این اتاقک از ACSF پر شده و دمای محلول را به 37°C درجه سانتی گراد می رساند. برش ها به مدت ۱-۱/۵ ساعت در این اتاقک شناور شده و سپس به منظور ثبت پتانسیل های میدانی به اتاقک مخصوص ثبت منتقل می شود (۱۰).

برای ثبت امواج از برش های مغزی، نمونه های شناور در اتاقک نگهداری، را به سیستم ثبت امواج منتقل می گردد. این سیستم شامل بخش های ذیل می باشد:



شکل ۴- نمایی از الکترودهای مورد استفاده در ثبت پتانسیل میدانی در محیط آزمایشگاهی. الف: یک نمونه الکتروثبات شیشه ای. ب: یک نمونه الکتروثبات تحریک از جنس تنگستن.



شکل ۳- اتاقک نگهداری برش های تهیه شده از مغز موش. این اتاقک حاوی ACSF می باشد که دائماً کربوژنه می شود. علامت فلش برش های تهیه شده را نشان می دهد.

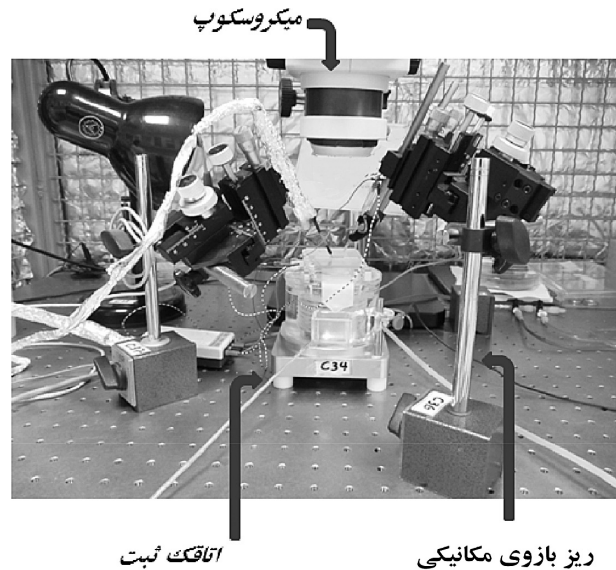
شکل آنالوگ هستند لذا اطلاعات قبل از انتقال به رایانه به کمک دستگاه دیجیتالایزر (Digitalizer) از حالت آنالوگ به حالت دیجیتال تبدیل می‌شوند. سپس امواج بر روی نمایشگر رایانه به تصویر کشیده شده و ضبط می‌شوند (۱۱).

بحث و نتیجه‌گیری

ثبت از برش‌های مغزی در محیط آزمایشگاهی دارای فواید و قابلیت‌هایی است که در موجود زنده به علت محدودیت‌های موجود امکان‌پذیر نیست از جمله این فواید می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ۱- آماده سازی سریع برش‌های مغزی ۲- کنترل ساده و راحت شرایط آزمایشگاهی و آماده سازی مراحل انجام کار ۳- مشاهده مستقیم ساختار برش تهیه شده و امکان قرارگیری صحیح الکترودها در جایگاه مورد نظر و مطلوب ۴- از بین رفتن سد خونی-مغزی و در نتیجه در دسترس بودن فضای خارج سلولی برای انتشار مواد و داروها ۵- حفظ یکپارچگی و ساختار بافت مورد نظر برخلاف محیط کشت سلولی (۱۰).

البته ثبت از برش‌های مغزی دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد که عبارتند از: ۱- از بین رفتن ورودی‌ها و خروجی‌های نورون‌ها همانند آنچه در مغز دست نخورده وجود دارد ۲- آسیب به قسمت‌هایی از برش مخصوصاً بالا و پایین سطوح برش به علت عملیات تهیه برش ۳- محدود بودن مدت زمان زنده نگه داشتن بافت مغزی ۴- تأثیراتی که ممکن است کمبود اکسیژن در زمان کشتن حیوان بر روی برش‌های تهیه شده بگذارد ۵- عدم وجود مواد و فاکتورهایی که در بدن وجود دارد و ممکن است عدم حضور آن‌ها بر روی برش تهیه شده در محیط مصنوعی تأثیر نامطلوبی داشته باشد (۸).



شکل ۵- نمایی از اجزای تشکیل دهنده سیستم ثبت. اجزای این سیستم شامل ریز بازوی مکانیکی، میکروسکوپ و اتاقک ثبت می‌باشد. اتاقک ثبت محل نگهداشتن برش به منظور انجام ثبت است. برش در تمام مدت در معرض ACSF است که کربوژنه می‌شود و دمای آن ۳۰-۳۲ درجه سانتی گراد می‌باشد. الکترودهای ثابت و تحریک بر روی بازوی مکانیکی نصب شده و با دقت بالا بر روی سطح برش قرار داده می‌شود. میکروسکوپ در بالای اتاقک ثبت قرار گرفته و با بزرگنمایی $40\times$ امکان مشاهده برش و قرار دادن الکترودها در مکان صحیح را فراهم می‌کند.

نرم افزار مخصوص ثبت پتانسیل میدانی به منظور دریافت اطلاعات ثبت از الکترودهای ثابت و آنالیز موج‌های ثبت شده تعبیه شده است. پس از انتقال برش مغزی مورد نظر به اتاقک ثبت الکترودها بر اساس مطالعه محقق بر روی محل مورد نظر قرار می‌گیرند. دستگاه تحریک با القا جریان الکتریکی با ویژگی‌های مشخص به الکترودها می‌تواند یک پتانسیل برانگیخته شده را در بافت مورد آزمایش ایجاد نماید. این پتانسیل میدانی برانگیخته را می‌توان به کمک الکترودهای شیشه‌ای ثابت دریافت نمود. امواج دریافت شده به کمک آمپلی فایرها تقویت می‌گردند. تا این مرحله اطلاعات دریافت شده به

References

- 1- Castelaz PF, Mills DE. Neural network signal processor. Google Patents; 1991.
- 2- Olejniczak P. Neurophysiologic basis of EEG. Journal of clinical neurophysiology. 2006;23 (3): 186-9.
- 3- Klass DW, Daly DD. Current practice of clinical electroencephalography: Raven Press; 1979.
- 4- Petsche H, Pockberger H, Rappelsberger P. On the search for the sources of the electroencephalogram. Neuroscience. 1984;11 (1): 1-27.
- 5- Rieke F, Warland D, Bialek W. Coding efficiency and information rates in sensory neurons. EPL (Europhysics Letters). 1993;22 (2): 151.
- 6- Karimzadeh F, Jafarian M, Gharakhani M, Razeghi Jahromi S, Mohamadizadeh E, Khallaghi B, et al. Behavioural and histopathological assessment of the effects of periodic fasting on pentylene tetrazol-induced seizures in rats. Nutritional neuroscience. 2013;16 (4): 147-52.
- 7- Nordhausen CT, Maynard EM, Normann RA. Single unit

- recording capabilities of a 100 microelectrode array. Brain research. 1996;726 (1): 129-40.
- 8- Humphrey DR, Schmidt EM. Extracellular single-unit recording methods. Neurophysiological Techniques: Springer; 1991: 1-64.
- 9- Hämmerle H, Egert U, Mohr A, Nisch W. Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays. Biosensors and Bioelectronics. 1994;9 (9): 691-6.
- 10- Breckenridge L, Wilson R, Connolly P, Curtis A, Dow J, Blackshaw S, et al. Advantages of using microfabricated extracellular electrodes for in vitro neuronal recording. Journal of neuroscience research. 1995;42 (2): 266-76.
- 11- 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; 438-446.