مقاله مروری

مجله دانشکده پیراپزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال نهم ● شماره ۱ ● بهار و تابستان ۱۳۹۳ ● شماره مسلسل ۱۵

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 پتانسی‌های 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. ازجمله می‌توان به نحوه جراحی حیوان و کاشت الکترودهای ثبات در روش In vivo و هم چنین نحوه‌ی 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 مهندسین 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، پتانسل میدانی، ثبت خارج سلولی

مقدمه

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 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 کننده‌ی آن منتشر می‌گردند (۲). این حجم برای فعالیت

۱ـ دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲ـ مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
آدرس الکترونیک: Fariba_Karimzade@yahoo.com

[Downloaded from jps.ajaums.ac.ir on 2026-06-10]

سلول‌های عصبی شامل: مغز، عروق خونی و مننژ، استخوان‌های جمجمه و پوست سر می‌باشد. انواع پتانسیل‌های میدانی شامل فعالیت‌های الکتریکی خودبخودی، القایی و برانگیخته می‌باشد که از روی سر، سطح نرم شامه یا حتی از داخل قسمت‌های خاصی از ساختارهای داخل مغزی می‌توان آنها را ثبت نمود (۲). نوار مغزی یا الکتروانسفالوگرافی (EEG) ثبت فعالیت الکتریکی خودبخودی سلول‌های عصبی است که در انسان به طور معمول از روی سر ثبت می‌شود. نوارمغزی حامل اطلاعات مهم تشخیصی در زمینه بیماری‌های عصبی مخصوصا بیماری صرع می‌باشد. پتانسیل‌های برانگیخته در تشخیص اختلالات مسیرهای حسی یا حرکتی بسیار ارزشمندند. نوار مغزی در آشکار ساختن نوسانات و فعالیت‌های هم نوای شبکه عصبی نقش بسزایی را ایفا می‌نماید (۲، ۳).

مواد و روش‌ها

این مطالعه به جستجو در منابع متعدد از جمله: Google Scholar، Science Direct و Scopus، MEDLINE، ISI web of Knowledge با 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 روش‌های الکتروفیزیولوژی رایج در مراکز تحقیقات استفاده شد.

نتایج

در مطالعات حیوانی ثبت پتانسیل‌های میدانی به دو روش In vivo و In vitro انجام می‌شود. ثبت‌های In vivo در حالی که موجود زنده است صورت می‌گیرد در صورتی که ثبت‌های In vitro پس از جدا نمودن سر حیوان و خارج نمودن مغز، از قسمت‌های خاصی از مغز خارج شده انجام می‌شود. از جمله ثبت‌های In vivo می‌توان به ثبت فعالیت نورون‌ها به روش الکتروکورتیکوگرافی و ثبت تک واحدی (Single Unite Recording) اشاره نمود (۴).

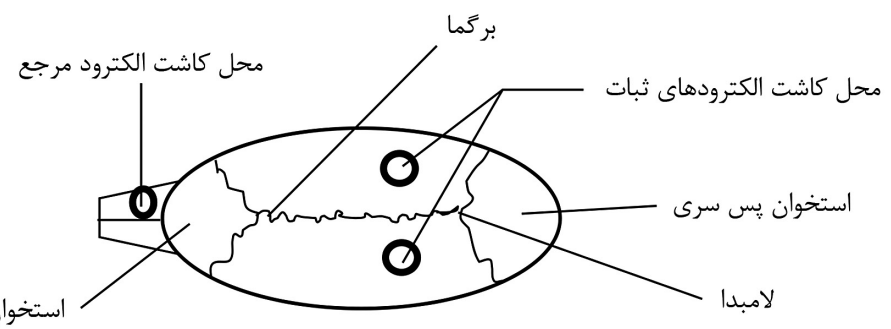
الکتروکورتیکوگرافی

در ثبت‌های الکتروکورتیکوگرافی به منظور دریافت و ثبت بهتر امواج مغزی، الکترودهای ثبات مستقیماً بر روی نرم شامه قشر مغزی قرار داده می‌شود. لذا برای اینکار نیاز به جراحی و کاشت الکترود می‌باشد. حیوان با استفاده از پنتوباربیتال (۶۰ mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکسی قرار داده می‌شود. 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 می‌شود. سپس بافت همبند و پریوست جمجمه در ناحیه مورد نظر برداشته و محل برگما (Bregma) مشخص می‌گردد (۵).

دو سوراخ بر روی استخوان‌های آهیانه طرفین و یک سوراخ بر روی استخوان بینی تعبیه شده و دو الکترود با روکش نقره بر روی نرم شامه به منظور ثبت امواج مغزی و یک الکترود بر روی پیاز بویایی به عنوان الکترود مرجع کاشته می‌شود (۶). الکترودها به کمک سیمان دندان پزشکی ثابت خواهند شد (شکل ۱).

ثبت تک واحدی

هنگامی که نورونی پتانسیل عمل تولید می‌کند در نواحی تحریک‌پذیر



شکل ۱- نمای شماتیک از محل کاشت الکترودها. شکل بالا نمادی از استخوان‌های جمجمه موش صحرایی می‌باشد که پس از کنار زدن پوست نمایان می‌گردد. دو الکترود ثبات برای ثبت نوار مغزی بر روی نرم شامه قشر پاریتال و الکترود مرجع بر روی پیاز بویایی کاشته می‌شود.

[Downloaded from jps.ajaums.ac.ir on 2026-06-10]

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 نیزه (Spike potential field) می‌گویند (۱). نیزه‌ی 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 نیزه، باید الکترود تا حد امکان به غشاء نورون نزدیک باشد (۷). شکل، دامنه و قطبیت نیزه‌های خارج سلولی وابسته به شکل فضایی نورون و نیز موقعیت الکترود الکترود نسبت به سلول است. گاهی اوقات می‌توان از شکل نیزه اطلاعاتی راجع به شکل فضایی نورون و موقعیت الکترود نسبت به سلول به دست آورد. اگر الکترود ثبات به ناحیه‌ای که جریان القایی در سلول رو به خارج است نزدیک باشد، قطبیت نیزه در فاز شروع مثبت یا به سمت بالا خواهد بود. اگر الکترود ثبات به ناحیه‌ای که جریان القایی در سلول رو به داخل است نزدیک باشد، قطبیت نیزه در فاز شروع منفی یا به سمت پائین خواهد بود (۸). بیشتر تحقیقات اولیه روی فعالیت تک نورون‌ها 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 الکترود از القا جریان شدید تخریب کننده‌ی بافت به الکترود استفاده می‌گردد (۸)

.

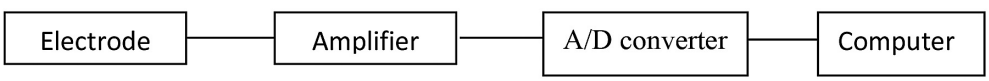
چگونگی ثبت امواج دریافت شده

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).

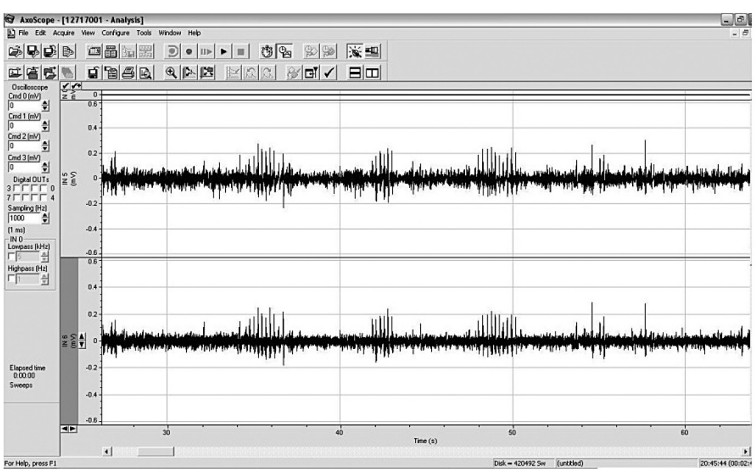
ثبت پتانسیل‌های میدانی به روش In Vitro

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

الف



ب

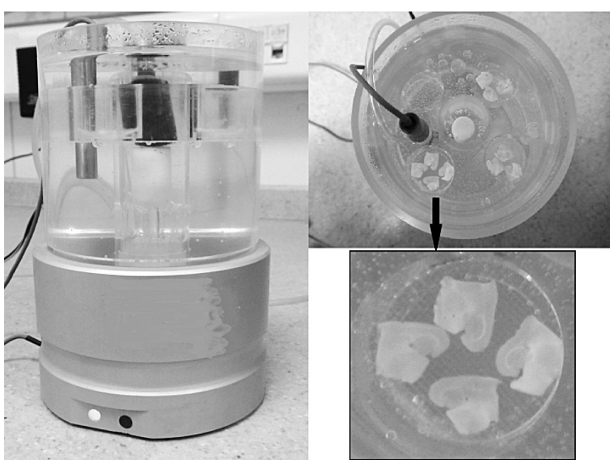


شکل ۲- نمایی از اجزای سیستم ثبت و ضبط امواج مغزی. الف) سیگنال‌های دریافت شده توسط الکترودها به کمک آمپلی فایرها تقویت و به سیستم مبدل اطلاعات منتقل می‌شوند. اطلاعات از آنالوگ (A) به حالت دیجیتال (D) درآمده و به رایانه منتقل و ضبط می‌گردد. ب) نمونه‌ای از امواج الکتروکورتیکوگرافی که بر روی نمایشگر به تصویر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

[Downloaded from jps.ajaums.ac.ir on 2026-06-10]

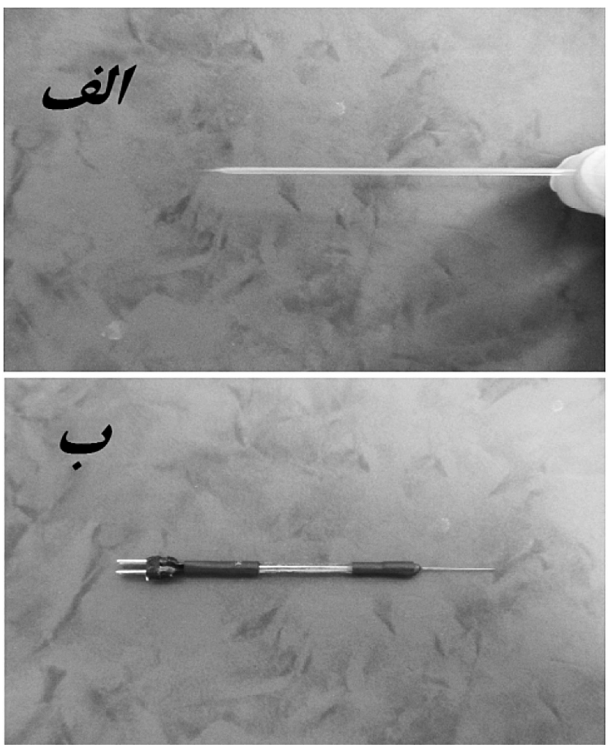
می‌گردد (۹). مغز خارج شده در محلول مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF: Artificial cerebrospinal fluid) با دمای $4^{o}C$ قرار داده می‌شود. تمامی این مراحل به منظور زنده ماندن بافت عصبی باید در مدت ۳۵-۳۰ ثانیه انجام شود. لذا برای انجام ثبت در محیط آزمایشگاهی باید محلول ACSF قبل از شروع کار آماده گردد. این محلول شامل املاح و نمک‌هایی مشابه ترکیبات یونی مایع مغزی-نخاعی است و حاوی آب مقطر، $NaCl$، KCl، $MgSo_4$، NaH_4PO_4، $NaHCO_3$، $CaCl_4$ و گلوکز می‌باشد و دائماً با مخلوط گازی اکسیژن و دی اکسید کربن کربوژنه می‌شود 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 می‌ماند. سپس ناحیه انتخاب شده برای آزمایش، با دقت از بقیه نواحی مغز جدا شده و بر روی صفحه مخصوص ویبراتوم (دستگاه برش) چسبانده می‌شود. در صفحه مخصوص ویبراتوم نیز ACSF جریان دارد. از نمونه‌ی استخراج شده، برش‌های ۴۰۰-۳۵۰ میکرومتری تهیه شده و به اتاقک نگهداری منتقل می‌شود (شکل ۳). این اتاقک از ACSF پر شده و دمای محلول را به ۳۷ درجه سانتی گراد می‌رساند. برش‌ها به مدت ۱/۵-۱ ساعت در این اتاقک شناور شده و سپس به منظور ثبت پتانسیل‌های میدانی به اتاقک مخصوص ثبت منتقل می‌شود (۱۰).

برای ثبت امواج از برش‌های مغزی، نمونه‌های شناور در اتاقک نگهداری، را به سیستم ثبت امواج منتقل می‌گردد. این سیستم شامل بخش‌های ذیل می‌باشد:



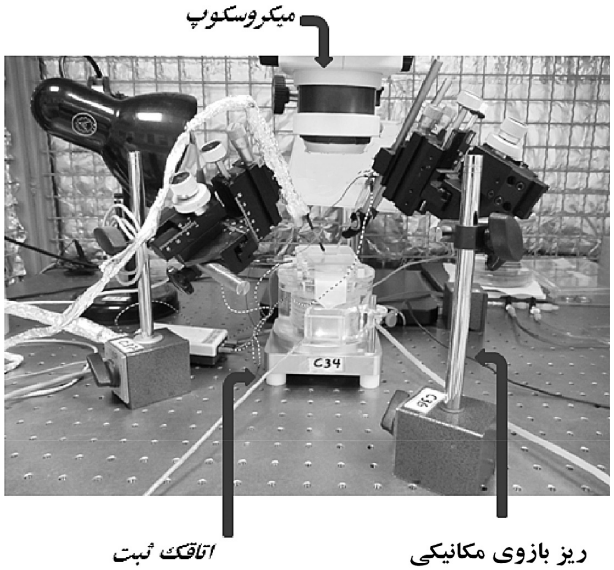
شکل ۳- اتاقک نگهداری برش‌های تهیه شده از مغز موش. این اتاقک حاوی ACSF می‌باشد که دائماً کربوژنه می‌شود. علامت فلش برش‌های تهیه شده را نشان می‌دهد.

۱- الکترود ثبات؛ این الکترود از جنس شیشه با قطر خارجی ۱/۵ میلی متر می‌باشد و با محلول نمکی NaCl با غلظت ۲ مولار پر می‌شود (شکل ۴، الف) ۲- الکترود تحریک که از جنس تنگستن یا پلاتین یا نقره می‌باشد (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 می‌کند. ۴- اتاقک ثبت که اتاقکی شبیه به اتاقک نگهداری است و در آن یکی از برش‌های مغزی تهیه شده قرار گرفته و دائماً در معرض ACSF کربوژنه با سرعت ۳-۲ میلی لیتر در دقیقه قرار می‌گیرد. ۵- میکروسکوپ که به منظور مشاهده نمونه و اطمینان از صحت محل قرار دادن الکترودها در محل مورد نظر بر روی بافت بکار می‌رود (شکل ۵). ۶- دستگاه تحریک (Stimulator): این دستگاه یک جریان الکتریکی با شدت، فرکانس و مدت مشخص به الکترود تحریک که بر روی بافت مغزی قرار گرفته منتقل می‌نماید. ۷- آمپلی فایر یا تقویت کننده امواج: این دستگاه سیگنال‌های ارسالی از الکترودهای ثبات را تقویت کرده و به کامپیوتر ارسال می‌نماید. ۸- رایانه که در آن



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

[Downloaded from jps.ajaums.ac.ir on 2026-06-10]



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 ثبات 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 ×۴۰ 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 الکترود ثبات 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 الکترود می‌تواند یک پتانسیل برانگیخته شده را در بافت مورد آزمایش ایجاد نماید. این پتانسیل میدانی برانگیخته را می‌توان به کمک الکترود شیشه‌ای ثبات دریافت نمود. امواج دریافت شده به کمک آمپلی فایرها تقویت می‌گردند. تا این مرحله اطلاعات دریافت شده به 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- تاثیراتی 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).

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, Mohamadzadeh E, Khallaghi B, et al. Behavioural and histopathological assessment of the effects of periodic fasting on pentylenetetrazol-induced seizures in rats. Nutritional neuroscience. 2013;16 (4): 147-52.
7- Nordhausen CT, Maynard EM, Normann RA. Single unit

[Downloaded from jps.ajaums.ac.ir on 2026-06-10]

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.

[Downloaded from jps.ajaums.ac.ir on 2026-06-10]