فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۸۲

اثر کتامین بر انتقال و شکل‌پذیری سیناپسی در ناحیه CA1 مقاطع زندهٔ هیپوکمپ موش صحرایی

بتول رحمتی ، یعقوب فتح‌الهی ، سعید سمنانیان ، محمدرضا واعظ مهدوی ، مهشید شفیع زاده

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

اثر کتامین (۱-۱۰۰ µM) که دارای خواص آنتاگونیستی نسبت به گیرنده‌های NMDA می‌باشد. بر انتقال سیناپسی و تقویت طولانی مدت (LTP) در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ موش صحرایی به طور in vitro مورد مطالعه قرار گرفته است. پتانسیل‌های میدانی در لایه سلول‌های هرمی متعاقب تحریک الکتریکی فیبرهای آوران جانبی شافر ثبت گردیده است. برای القاء LTP از تحریک تتانیک با ریتم تتا موسوم به PBs استفاده شد. برای اندازه‌گیری LTP، دامنه اسپایک‌های دسته جمعی که معیار خوبی برای سنجش میزان تقویت پاسخ سیناپس می‌باشد، مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج نشان داد که کتامین، القاء LTP را به طور وابسته به غلظت تحت تأثیر قرار داده است. کتامین با غلظت‌های کمتر از ۲۰ میکرومول (۱-۱۰ µM) نه تنها نتوانست از وقوع LTP جلوگیری کند، بلکه LTP القاء شده را نیز افزایش داد. در حالی که غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میکرومول آن، غالبا وقوع LTP را مهار کرد. از طرف دیگر کتامین با غلظت ۲۰ میکرومول، شکل پذیری سیناپسی را به روش‌های متفاوتی متأثر کرد و موجب بروز اشکال مختلف شکل‌پذیری سیناپسی گردید.

نتایج نشان می‌دهد که اثرات کتامین بر انتقال سیناپسی پایه و LTP ایجاد شده توسط تحریک کزازی با فرکانس ۱۰۰ هرتز به غلظت‌های کتامین بستگی دارد.

واژه‌های کلیدی : تقویت طولانی مدت، شکل پذیری سیناپسی، برش‌های زنده هیپوکمپ، کتامین.

مقدمه

Long-term potentiation (LTP) افزایش طولانی مدت در کارایی سیناپسی است که در سیناپس‌های ویژه‌ای ایجاد می‌گردد و به فعالیت هماهنگ جمعیتی از آوران‌ها بستگی دارد [۱۶]. مکانیسم ایجاد LTP به طور وسیعی در ناحیه CA1 هیپوکمپ مطالعه شده است [۱۶ و ۲۶].

سلول‌های هرمی ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ دارای انواع گیرنده‌های گلوتاماتی می‌باشند. از جمله : گیرنده‌های وابسته به لیگاند، به نام‌های AMPA و Kainate که یون‌های سدیم و پتاسیم را هدایت و پتانسیل‌های پس سیناپسی تحریکی (EPSP) ایجاد می‌کنند. همچنین

گیرنده‌های وابسته به لیگاند و ولتاژ به نام NMDA که علاوه بر یون‌های سدیم و پتاسیم، کلسیم نیز از آنها عبور می‌کند. در هیپوکمپ مکانیسم‌های مربوط به LTP به فعالیت رسپتورهای NMDA و فعالیت کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بستگی دارد [۱۶]. اگر چه LTP در هیپوکمپ به عنوان پایه و اساس نوروفیزیولوژیکی حافظه و یادگیری فضایی در نظر گرفته می‌شود [۳]. اما پیشنهاد می‌شود که مکانیسم‌های مشابه LTP به همان میزان که در تغییرات پلاستیک مفید نقش دارند. در تغییرات پاتولوژیک نیز سهیم هستند [۲۶]. اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس بالا به مسیر مورد نظر می‌تواند سبب ایجاد LTP گردد. در میان طرح‌های گوناگون تحریک تتانیک، [Tetha burst stimulation (TBs)] و [Primed burst stimulation (PBs)] مهم هستند. این تحریکات تقلیدی از الگوهای فعالیت هماهنگ نورون‌های هیپوکمپ موش‌های صحرایی در هنگام یادگیری می‌باشد [۳].

کتامین دارویی قابل استفاده در کلینیک است و دارای فعالیت آنتاگونیستی غیر رقابتی گیرنده‌های NMDA می‌باشد [۸، ۱۸، ۲۲، ۲۴ و ۲۵]. تصور می‌شود که عمل مهاری کتامین روی گیرنده‌های NMDA سبب ایجاد بی‌دردی و بیهوشی می‌شود [۲۰ و ۲۵]. اخیراً نشان داده شده است که کتامین توسط دو مکانیسم مجزا، گیرنده‌های NMDA را مهار می‌کند:

۱- کتامین با قرار گرفتن روی محل اتصال خود در داخل کانال گیرنده، کانال باز شده را با کاهش میانگین زمان باز شدن آن، مسدود می‌کند و

۲- کتامین توسط یک مکانیسم آلوستریک فرکانس باز شدن کانال را کاهش می‌دهد [۲۰].

با توجه به این که اطلاعات در باره اثرات کتامین بر انتقال سیناپسی پایه و وقوع LTP در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ بسیار نادر می‌باشد [۷]. بنابراین اثرات کتامین بر انتقال و بازدهی سیناپسی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

حیوانات: برش‌های هیپوکمپ از موش‌های صحرایی نر، نژاد NMRI با وزن ۱۶۰-۱۴۰ گرم تهیه شد. حیوانات در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و حرارت ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و آب و غذا به اندازه کافی در دسترس آنها بود.

داروها: ۲-(۲- کلرفنیل) -۲- متیل آمینو سیکلوهگزانون هیدروکلراید (کتامین هیدروکلراید) (Park Davis) که محلول در مایع مغزی نخاعی مصنوعی (Artificial Cerebrospinal fluid, ACSF) می‌باشد.

تهیه برش از هیپوکمپ: ابتدا حیوان با دی‌اتیل اتر بیهوش می‌شد. سپس سر آن با یک قیچی قطع می‌گردید. پس از آن، مغز به سرعت از جمجمه خارج و به ACSF سرد (۲-۴ درجه سانتی‌گراد) و اکسیژنه با pH = ۷/۴ منتقل می‌شد. ACSF محتوی ۱۲۴ میلی‌مول کلرور سدیم، ۵ میلی‌مول کلرور پتاسیم، ۲ میلی‌مول کلرور کلسیم، ۲/۴ میلی‌مول کلرور منیزیم، ۱/۲۵ میلی‌مول فسفات پتاسیم، ۲۶ میلی‌مول بی‌کربنات سدیم و ۱۰ میلی‌مول گلوکز بود. برش‌های عرضی به ضخامت ۴۵۰ میکرون از ناحیهٔ شکمی (ونترال هیپوکمپ) به وسیله دستگاه ویبروتوم تهیه می‌شد. برش‌ها به حوضچه نگهداری برش منتقل و روی یک توری در محیط حد فاصل مایع - گاز قرار می‌گرفت. در این حالت، برش‌ها از زیر با ACSF اشباع از اکسیژن و از رو با گاز مرطوب محتوی CO_2 (۵٪) و O_2 (۹۵٪) در تماس بود. قبل از شروع ثبت، برش‌ها به مدت ۲ ساعت انکوبه می‌شد. به این ترتیب که پس از یک ساعت مشروب شدن توسط ACSF با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه و در دمای آزمایشگاه، طی یک ساعت دمای محلول به ۳۲ درجهٔ

سانتی گراد افزایش می‌یافت.

تحریک و ثبت : پس از ۲ ساعت، پالس‌های تحریکی مربعی با جریان ثابت، به طوری که پهنای هر پالس ۲۰۰ میکروثانیه و شدت آن بین ۲۰۰-۲۵ میکروآمپر بود توسط یک استیمولاتور و از طریق یک الکترود دو قطبی از جنس فولاد زنگ نزن اعمال می‌شد. این الکترود در ناحیه استراتوم رادیاتوم جهت تحریک شیفر کولترال قرار می‌گرفت. پتانسیل‌های میدانی از استراتوم پرامیدال ناحیه CA1 هیپوکمپ با استفاده از یک میکروپیپت شیشه‌ای ثبت می‌شد. این میکروپیپت از محلول ۲ مولار کلرور سدیم پر می‌گردید و آمپدانس آن بین ۱۰-۲ مگا اهم بود. سیگنال‌ها توسط یک میکروالکترود آمپلی‌فایر تقویت می‌گردید. آنگاه توسط برد A/D رقمی شده و در مانیتور کامپیوتر به نمایش در می‌آمد و آنگاه در دیسک‌های کامپیوتری جهت پردازش و آنالیز اطلاعات، ذخیره می‌شد. ادیومانیتور حضور محرک را گزارش می‌داد. برش‌هایی که برای بروز پاسخ آستانه‌ای به شدت بیش از ۲۵ میکروآمپر نیاز داشتند و یا دارای فعالیت‌های خودبخودی یا پتانسیل‌های میدانی اضافی (Extra population spikes) بودند، به عنوان برش‌های ناسالم تلقی و از آزمایش‌ها کنار گذاشته می‌شدند.

روش کار

آزمایش‌هایی که بروی برش‌های هیپوکمپی موش‌های صحرایی سالم و دست نخورده انجام می‌شد، خود به دو گروه تقسیم می‌گردید :

۱- **گروه کنترل :** که برش‌ها با ACSF عاری از هر گونه دارو مشروب می‌شدند و پاسخ پایه و پاسخ مربوط به ایجاد تقویت طولانی مدت (LTP) ثبت می‌گردید.

۲- **گروه آزمایشی :** جهت مطالعه اثر کتامین بر پاسخ پایه و LTP، برش‌ها با ACSF شامل غلظت‌های مختلف کتامین ۱، ۷، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومول به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه پرفیوز می‌شدند و ثبت پاسخ‌ها در برابر شدت‌های مختلف تحریک انجام می‌شد. در صورت پایدار بودن پاسخ‌ها تحریکات با فرکانس ۰/۱ Hz و با شدت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکروآمپر اعمال می‌شد. در شرایط کنترل، شدت محرکی که یک اسپایک دسته‌جمعی ارتودرمیک [Orthodromic Population Spike (OPS)] با ۶۰-۵۰٪ ماکزیمم پاسخ پایه ایجاد کند برای اعمال محرکات بعدی انتخاب می‌گردید.

برای القاء LTP از تحریکات تانیک متشکل از هشت PB [Primed-burst] استفاده شد. در این نوع، ابتدا یک پالس اعمال می‌گردد که ۱۷۰ هزارم ثانیه بعد، به وسیله یک قطار ده پالسی با فرکانس ۱۰۰ Hz تعقیب می‌شد، منحنی‌های ورودی ـ خروجی ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تحریک تتانیک ثبت گردید. حداقل ۲۵٪ افزایش در دامنهٔ پاسخ پایه در شدت ۲۵ میکروآمپر که حداقل به مدت ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک تتانیک نیز پایدار باشد، تحت عنوان LTP تعریف گردیده است. به منظور مطالعه زوال (decay) LTP در طی ۶۰ دقیقه، دامنه OPS در پاسخ به شدت تحریک ۲۵ میکروآمپر طی ۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تحریک تتانیک نیز ثبت و اندازه‌گیری گردید.

پردازش داده‌ها : پتانسیل‌های میدانی خارج سلولی در لایه سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکمپ به شکل اسپایک‌های دسته جمعی ارتودرمیک (OPS) قابل ثبت می‌باشد. میانگین دامنه OPS ده پاسخ متوالی اندازه‌گیری می‌شد. دامنه OPS (میلی‌ولت) از قلهٔ اولین موج مثبت تا قعر موج منفی متعاقب اندازه‌گیری شده است. یک برنامه کامپیوتری جهت تعیین دامنه OPS مورد استفاده قرار

گرفت. برش‌هایی که در آنها دامنهٔ OPS پس از تحریک تتانیک نسبت به پاسخ پایه حداقل ۲۵٪ افزایش نشان دادند، به عنوان LTP در نظر قرار می‌گرفت و حداقل ۲۵٪ کاهش در دامنه OPS پس از تحریک تتانیک نیز به عنوان تضعیف طولانی مدت (LTD) تلقی می‌گردید و کمتر از ۲۵٪ افزایش یا کاهش در دامنهٔ OPS، به عنوان عدم تغییر بازدهی سیناپسی (NO change) در نظر گرفته می‌شد. جهت مطالعه زوال LTD، LTP در طی ۶۰ دقیقه پس از تحریک تتانیک تغییر در دامنه OPS به شکل زیر محاسبه گردید:

ناحیه CAI را سبب شد که به طور خارج سلولی قابل اندازه‌گیری بود (شکل ۱ قسمت A). دامنهٔ اسپایک‌های دسته‌جمعی ارتودرومیک (OPS) در هر شدت تحریکی اندازه‌گیری شد و منحنی‌های ورودی - خروجی نیز ترسیم گردید. دامنهٔ اسپایک‌های دسته‌جمعی برانگیخته (OPS) به شدت تحریکات بستگی داشت. یعنی یک افزایش تدریجی در دامنهٔ OPS در شدت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروامپر و یک افزایش نسبتاً بزرگ در شدت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر وجود داشت (شکل ۱ قسمت A).

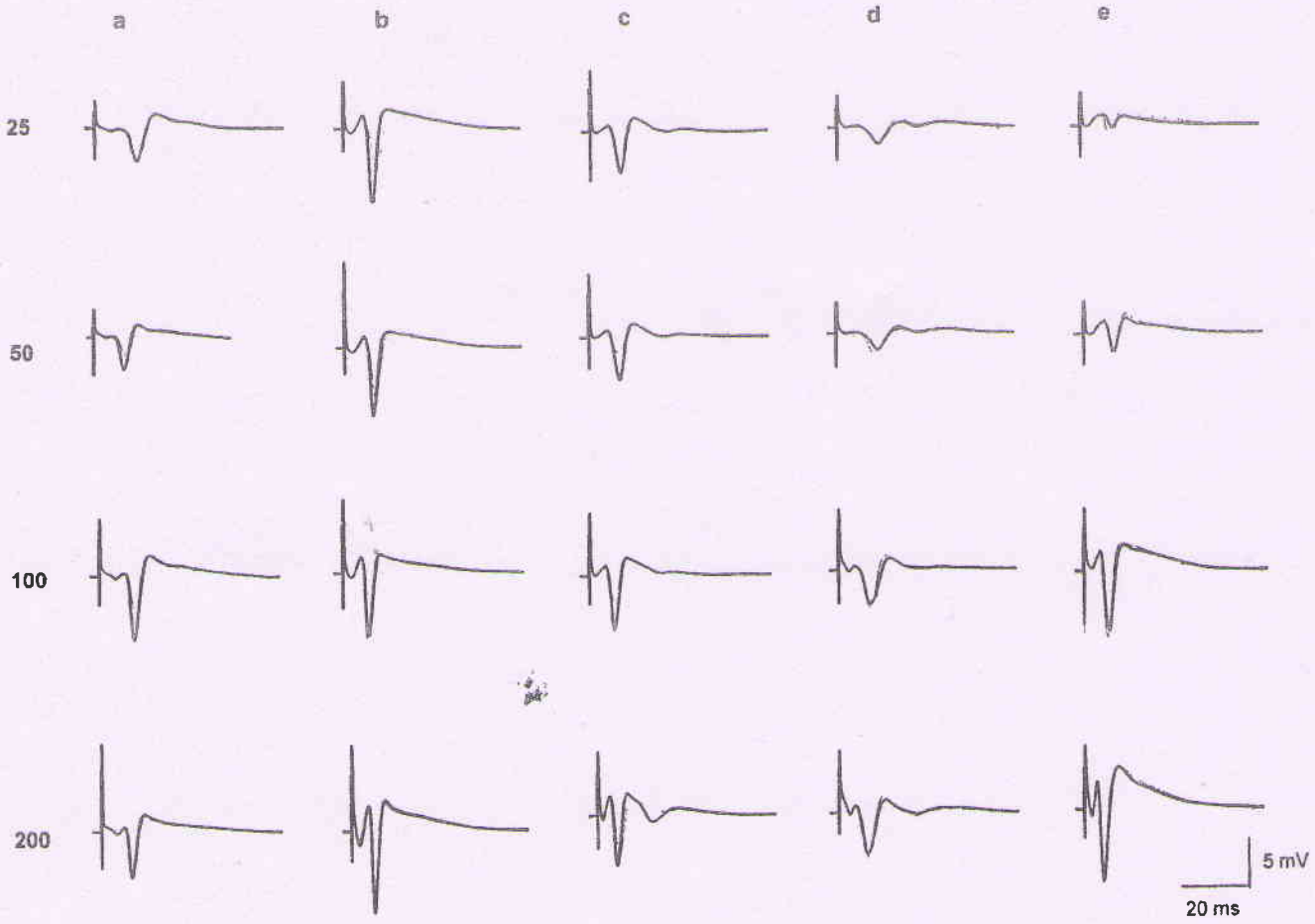
$$\frac{\text{دامنه OPS در ۵، ۱۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از تحریک تتانیک - دامنه OPS قبل از تحریک تتانیک}}{\text{دامنه OPS قبل از تحریک تتانیک}} \times ۱۰۰$$

تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (SEM) بیان گردیدند و برای آنالیز آماری از ANOVA و متعاقب آن Tukey's test برای مقایسه بین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. اختلاف در سطح $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردیده است.

نتایج

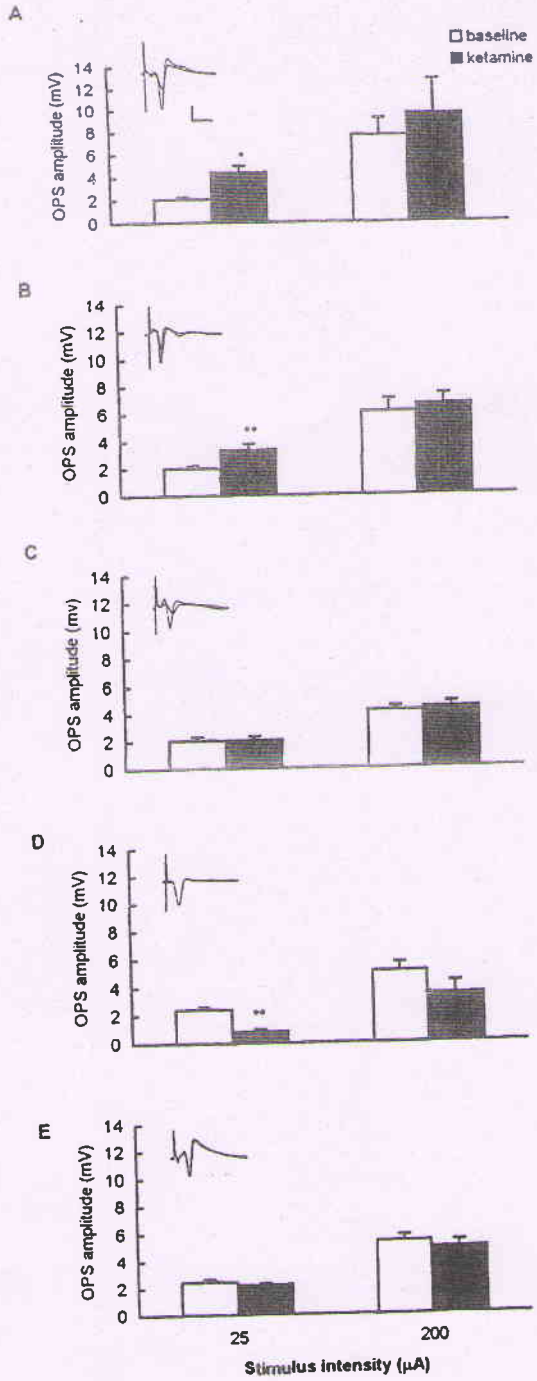
ثبت پاسخ پایه : تحریک الکتریکی فیبرهای آوران در ناحیه استراتوم رادیاتوم، فعالیت هماهنگ سلول‌های هرمی

القاء تقویت طولانی مدت (LTP) در برش‌های کنترل : در برش‌های زندهٔ مغزی که با مایع مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF) مشروب شدند، افزایش معنی‌دار در دامنهٔ OPS، در شدت‌های پایین تا متوسط ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک تتانیک (PBs) مشاهده گردید [($P<0/01$، ۴۹/۷۷ = (۲۳ و F(۱)، شکل ۱ و ۳ قسمت A]. همچنین ۹۰٪ برش‌ها، LTP تعریف شده را نشان دادند؛ به هر حال، عده‌ای از برش‌ها که ویژگی‌های LTP تعریف شده را از خود ظاهر نکردند از داده‌های ما خارج شدند.

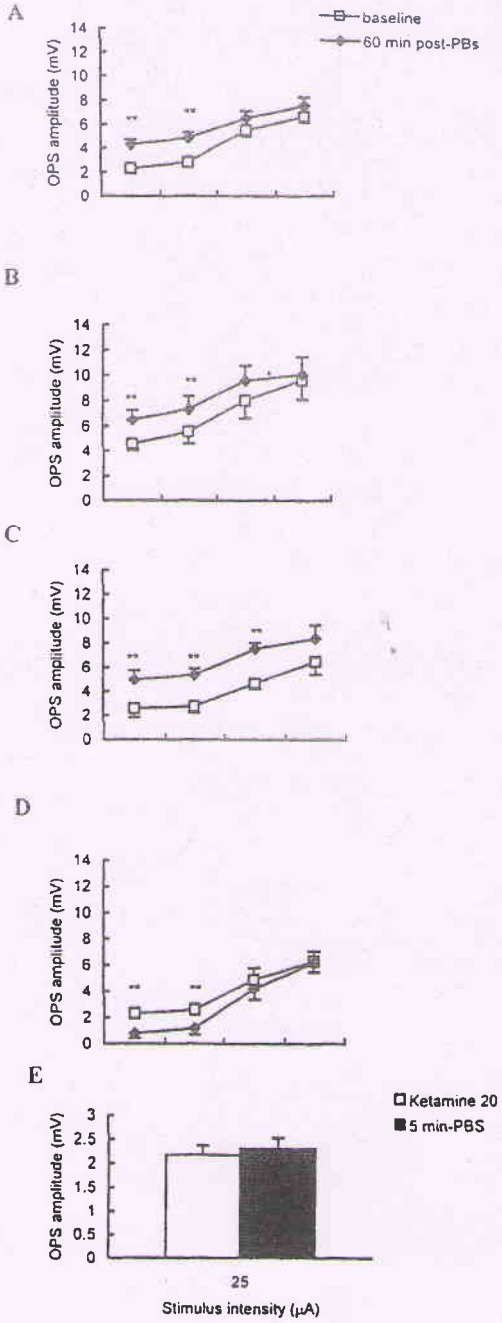


شکل ۱- پاسخ‌های برانگیخته لایه سلول‌های هرمی در شدت‌های مختلف قبل (نقطه چین) و ۶۰ دقیقه بعد (خط پر) از تحریک تتانیک در برش‌های کنترل (a) و مشروب شده توسط غلظت‌های مختلف کتامین (b,c,d,e): کمتر از ۲۰ میکرومول (b) و ۲۰ میکرومول (c.d.e): وقوع LTP(c) مهار LTP(d) و وقوع LTD(e) در حضور ۲۰ میکرومول کتامین. اعداد در طرف چپ شدت‌های تحریک (μA) را نشان می‌دهد.

اثر کتامین بر پاسخ پایه : آزمایش‌ها در صورتی انجام می‌گرفت که برش‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه توسط ACSF دارای کتامین با غلظت‌های مختلف (۱۰۰-۱ میکرومول) انکوبه می‌شدند تا بدین وسیله اثر کتامین بر پاسخ پایه به حد تعادل برسد. کتامین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومول و در شدت‌های ۲۵ و ۲۰۰ میکروآمپر، دامنهٔ (OPS) را افزایش داد. این افزایش در شدت ۲۵ میکروآمپر بسیار بارز و بااهمیت بود. به طوری که دامنهٔ پاسخ پایه در این شدت توسط کتامین با غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومول به مقدار ۱۲۷±۵٤٪ نسبت به پاسخ قبل از دارو افزایش یافت. در این غلظت از ۸ برش ۷ برش افزایش پاسخ دادند (شکل ۲ قسمت A، P<۰/۰۵). مشروب ساختن برش‌های مغزی با



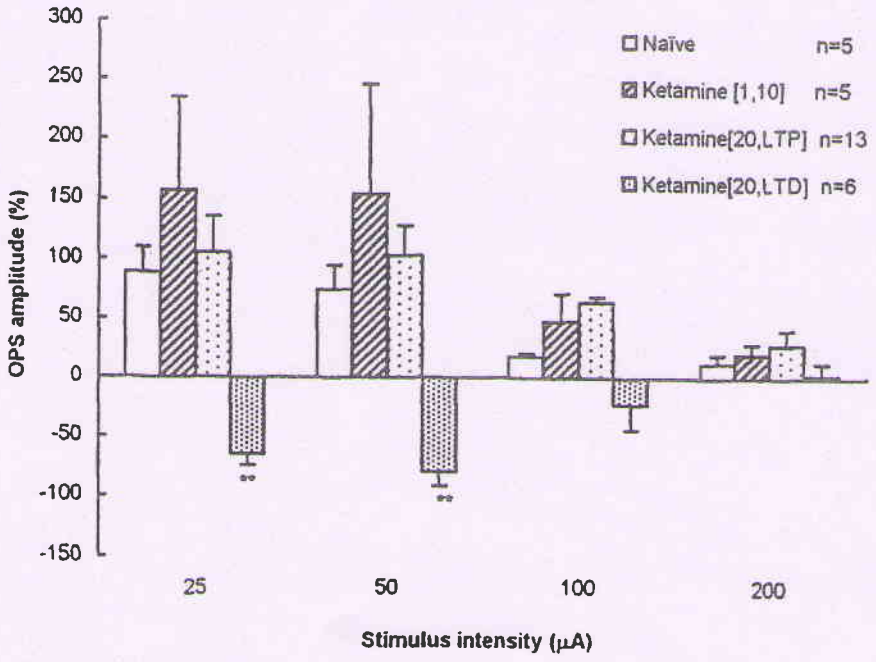
شکل ۲- اثرات غلظت‌های مختلف کتامین بر پاسخ پایه سیناپسی لایه سلول‌های هرمی در شدت‌های تحریکی پایین (۲۵ میکروآمپر) و بالا (۲۰۰ میکروآمپر). غلظت‌های به کار برده شده کتامین: کمتر از ۲۰ میکرومول (A،n = ۸)، ۲۰ میکرومول (D،n = ۷) و ۱۰۰ / C،n = ۱۰ / B،n = ۱۰) و بیشتر از ۲۰ میکرومول (E،n = ۸). کتامین با غلظت ۲۰ میکرومول دارای اثرات افزایشی (B)، بدون تغییر (C) و کاهشی (D) بر پاسخ پایه سیناپسی است. هر نقطه معرف میانگین ± انحراف معیار است.
*P<۰/۰۵ و **P<۰/۰۱



شکل ۳- منحنی‌های تحریک - پاسخ مربوط به دامنه پتانسیل عمل در گروه کنترل (A ، n = ۵) و گروه‌های کتامینی (B تا E) قبل و ۶۰ دقیقه بعد از تحریک تتانیک. غلظت کتامین کمتر از ۲۰ میکرومول که مشابه گروه کنترل در آن LTP به وقوع پیوسته است (B). غلظت کتامین ۲۰ میکرومول: (C، n=۱۳) در آن LTP، (D، n = ۶) LTD و (E، n = ۱۲) مهار LTP به وقوع پیوسته است. در قسمت E فقط اطلاعات مربوط به ۵ دقیقه بعد از تحریک تتانیک و در شدت ۲۵ میکروآمپر نشان داده شده است. هر نقطه معرف میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.
**P<۰/۰۱

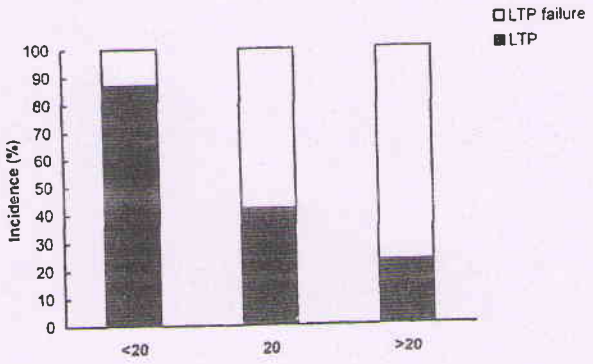
محیطی حاوی ۲۰ میکرومول کتامین، در ۱۰ برش از مجموع ۲۷ برش اثر معنی‌داری روی دامنهٔ پاسخ نداشت (شکل ۲، قسمت C). اما از طرف دیگر ۲۰ میکرومول کتامین در ۱۰ برش از مجموع ۲۷ برش دامنهٔ OPS را افزایش داد. این افزایش به مقدار ۱۷±۷۵٪ نسبت به پاسخ‌های قبل از بکار بردن دارو بود (شکل ۲ قسمت B، P<۰/۰۱). در حضور کتامین ۲۰ میکرومول، پاسخ پایه ۶۵٪ نسبت به پاسخ‌های قبل از دارو کاهش یافت (شکل ۲ قسمت D، P<۰/۰۱). وقتی غلظت کتامین از ۲۰ میکرومول تا ۱۰۰ میکرومول افزایش یافت (۵۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرومول) دامنهٔ پاسخ‌ها به طور معنی‌دار تغییر نکرد (شکل ۲، قسمت E).بنابراین از مجموع ۴۳ برش، کتامین در ۱۸ برش اثر معنی‌داری بر پاسخ پایه نداشت و در ۲۵ برش دامنهٔ پاسخ پایه را به طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد.

القاء LTP در حضور غلظت‌های مختلف کتامین : مشروب ساختن برش‌ها با ACSF دارای کتامین با غلظت‌های کمتر از ۲۰ میکرومول (۱ و ۱۰ میکرومول). قادر نبود تقویت طولانی مدت (LTP) را مهار کند، طوری که ۶۰ دقیقه بعد از تحریک تتانیک، LTP در ۸۷٪ (۷ از ۸) برش‌های مورد آزمایش ظاهر گردید [P<۰/۰۱، ۱۰۰/۱۸ = F(۱،۲۷)، شکل‌های ۱ و ۳]. LTP در حضور کتامین با LTP در برش‌های کنترل، مشابه و اختلاف معنی‌داری در این مورد مشاهده نگردید (شکل ٤). البته ۶۰ دقیقه پس از تحریک تتانیک در برش‌هایی که در معرض کتامین قرار گرفته بودند، درصد پاسخ به طور قابل توجهی بیشتر از برش‌های کنترل بود ولی این تفاوت معنی‌دار نبود (شکل ٤).



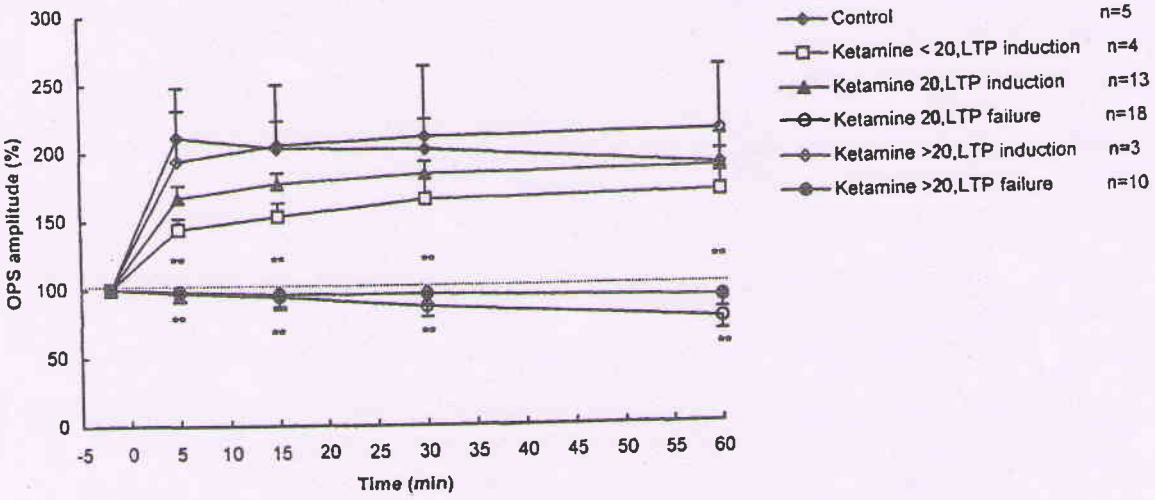
شکل ٤- مقایسه درصد تغییرات دامنه OPS، ۶۰ دقیقه پس از تحریک تتانیک در شدت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروآمپر بین گروه‌های کنترل و کتامینی. p<۰/۰۱**

کتامین با غلظت ۲۰ میکرومول قادر بود القاء LTP را بعد از اعمال تحریک تتانیک در ۱۸ برش (از مجموع ۳۱ برش) به طور کامل بلوک کند (شکل‌های ۱ و ۳ قسمت‌های E و D). جالب توجه است که متذکر شویم در ٦ برش از ۱۸ برش مذکور، ۲۰ میکرومول کتامین تضعیف دامنهٔ (LTD) OPS را سبب گردید [P<۰/۰۱، F(۱ ، ۲۳) = ۳۷/۹۹]، (شکل‌های ۱و ۳و ٤ قسمت D).

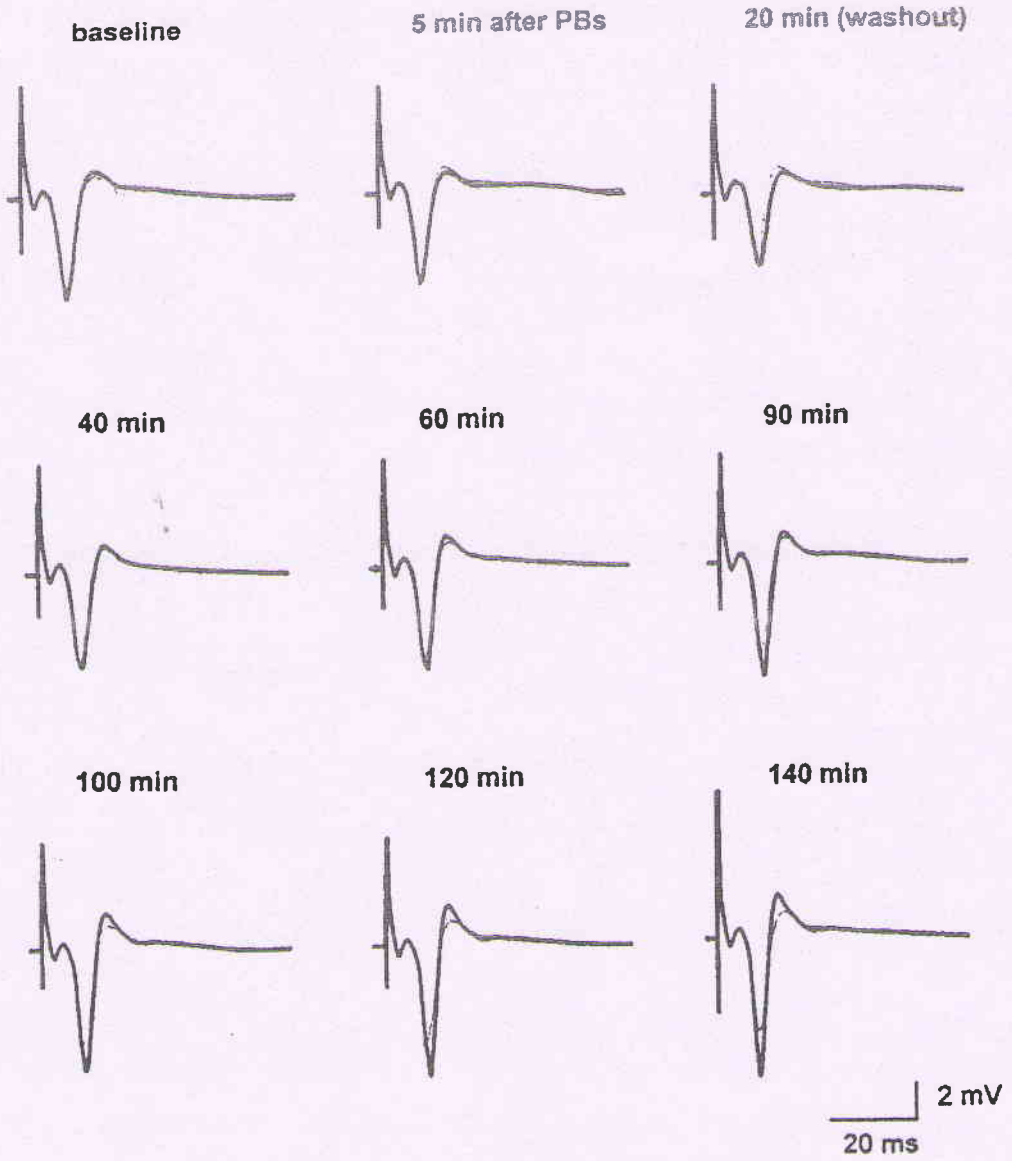


شکل ٥- فراوانی مهار وقوع LTP (٪) توسط کتامین با غلظت‌های کمتر از ۲۰، مساوی ۲۰ و بزرگتر از ۲۰ میکرومول.

این تضعیف پاسخ، حداقل تا ٦۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک تتانیک آشکار بود. میزان کاهش پاسخ در شدت‌های پایین و متوسط بیشتر بود (شکل ٤). علاوه بر این کاهش پاسخ در طی ٦۰ دقیقه پس از اعمال تحریک تتانیک، همچنان بیشتر می‌شد (شکل ٦). به هر حال در حضور کتامین با غلظت ۲۰ میکرومول، در ۱۳ برش (از مجموع ۳۱ برش) LTP القاء گردید [P<۰/۰۱، ۵۲/۰۱ = F(۱ ، ۲۳) و شکل‌های ۱ و ۳ قسمت C]. LTP نیز با LTP نرمال یا کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ٤). از طرف دیگر با LTD و مهار LTP کاملا متفاوت بود [P<۰/۰۱ F(٤،٦۹) = ۸/۲٦۱ شکل ٤]. تغییرات دامنهٔ OPS در طی ۱۰ دقیقه بعد از تحریک تتانیک در برش‌هایی که در حضور کتامین LTP القاء شده است، نه تنها مشابه LTP در برش‌های کنترل، به طور معنی‌داری مثبت بود بلکه این مثبت بودن با گذشت زمان در طی ٦۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک تتانیک افزایش نیز یافته است (شکل ٦).



شکل ٦- تغییرات دامنه پتانسیل‌های میدانی در طول زمان در گروه‌های مختلف کنترل و مشروب شده توسط غلظت‌های کتامین که در آنها LTP به وقوع پیوسته است. هر نقطه معرف میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. P<۰/۰۱**



شکل ۷- نمونه پاسخ‌های برانگیخته لایه سلول‌های هرمی در شدت ۲۵ میکروآمپر قبل (نقطه چین) و ۶۰ دقیقه بعد (خط پر) از تحریک تتانیک در برش‌های که کتامین LTP را مهار کرده و شستشوی آن، برگشت‌پذیری این اثر را نشان داده است.

وقتی غلظت کتامین از ۲۰ میکرومول به ۱۰۰ میکرومول افزایش یافت LTP در ۷۷٪ برش‌ها (۱۰ برش از مجموع ۱۳ برش) بلوک گردید (شکل ۵). هنگامی که برش‌ها به مدت بیش از ۸۰ دقیقه توسط ACSF بدون دارو شستشو می‌شدند، مهار LTP توسط کتامین برگشت‌پذیر بود. برگشت‌پذیر بودن اثر مهاری کتامین بر LTP، به شکل ایجاد LTP توسط اعمال تحریک تتانیک پس از شستشوی کافی برش‌ها، تعریف شده است (شکل ۷).

بحث

این مطالعه خواص کتامین را برای انتقال سیناپسی و القاء LTP: در ناحیهٔ CA1 برش‌های زنده هیپوکمپ موش صحرایی مورد ارزیابی قرار داده است. نتایج بیان می‌کند که اثر کتامین بر دامنهٔ پاسخ پایه و به طور وابسته به غلظت می‌باشد. کتامین در غلظت‌های کمتر از ۲۰ میکرومول (۱ و ۱۰ میکرومول) دامنهٔ پاسخ پایه را در صددرصد برش‌ها تحت تأثیر قرار داد که در ۸۷/۵٪ برش‌ها اثرات افزایشی بوده است. از طرف دیگر کتامین با غلظت ۲۰ میکرومول دامنه پاسخ پایه را در ۶۳٪ از برش‌ها به طور معنی‌دار تحت تأثیر قرار داد که این اثرات شامل اثرات تحریکی یا مهاری بوده است. اثر کتامین در این غلظت، بر دامنه پاسخ پایه در ۳۷٪ برش‌ها به طور معنی‌دار بارز نبود. کتامین با غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میکرومول (۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومول) اثر قابل ملاحظه‌ای بر پاسخ پایه آشکار نساخت. بنابراین با توجه به اینکه اسپایک‌های دسته جمعی برانگیخته در مطالعه حاضر با بسامد تحریک ۰/۱ Hz، در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ به گیرنده‌های non-NMDA [۵، ۱۲ و ۲۸] نسبت داده می‌شود. به نظر می‌رسد که کتامین انتقال سیناپسی با واسطه گیرنده‌های non-NMDA را تحت تأثیر قرار داده است. از طرف دیگر در شرایط فیزیولوژیک، کتامین به طور وابسته به غلظت و برگشت‌پذیر LTP را تحت تأثیر قرار داد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که یک غلظت واحد از کتامین (۲۰ میکرومول)، نیز توانسته است القاء LTP را به طور متفاوتی تحت تأثیر قرار دهد. برای القاء LTP از تحریکات تتانیک با طرح تتا (PBs) استفاده شده است [۳ و ۱۵]. به نظر می‌رسد این نوع تحریک، مشابه طرح فعالیت طبیعی نرون‌ها و در هیپوکمپ حیوان در حال یادگیری باشد که با امواج تتای هیپوکمپ همراه است. گزارش شده است که تعداد گوناگونی از آنتاگونیست‌های گیرنده NMDA، القاء LTP توسط PBs را مهار می‌کنند. بنابراین برای القاء LTP فعالیت این گیرنده‌ها ضروری می‌باشد [۳].

برای مطالعه LTP عمدتا پاسخ‌های دسته‌جمعی خارج سلولی (Extracellular population responses) ترجیح داده می‌شوند. دامنه اسپایک‌های دسته جمعی حاکی از فعالیت هماهنگ تعدادی از نرون‌ها می‌باشد [۱۶]. تقویت پاسخ طی ۱۰ ثانیه الی ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک تتانیک تحت عنوان LTP تعریف می‌شود [۱۵]. بنابراین در این مطالعه، مقدار LTP میزان تقویت پاسخ پس از ۶۰ دقیقه شروع اعمال تحریک تتانیک می‌باشد.

گلوتامات نوروترانسمیتر تحریکی مهم در هیپوکمپ می‌باشد. گیرنده‌های گلوتامات توسط آنتاگونیست‌های اختصاصی آنها به دو گروه NMDA و non-NMDA تقسیم می‌شوند. گلوتامات رها شده به داخل شکاف سیناپسی، گیرنده‌های پس سیناپسی NMDA و non-NMDA را فعال می‌کند و یک جریان تحریکی پس سیناپسی ایجاد می‌کند. بخش سریع جریان پس سیناپسی تحریکی به گیرنده‌های NMDA نسبت داده می‌شود [۲۷]. کتامین که خواص فارماکولوژیکی آن مشابه MK-801 می‌باشد، گیرنده‌های NMDA را به طور وابسته به فعالیت مسدود می‌کند و این مهار با حضور آگونیست افزایش می‌یابد [۸]. کتامین گیرنده‌های NMDA را در حالات کانال باز و بسته ان غیرفعال می‌سازد [۲۰]. تصور می‌شود که این عمل در ایجاد خواص بیهوشی و بی‌دردی قوی کتامین نقش داشته باشد [۱۰]. کتامین بر بسیاری از سیستم‌های نروترانسمیتری عمل می‌کند. مطالعات جدیدتر پیشنهاد می‌کند که مکان بسیاری از این اثرات رفتاری مشترک، گیرنده‌های NMDA می‌باشد و کتامین به عنوان آنتاگونیست غیر رقابتی گیرنده NMDA عمل می‌کند [۲۴]. غلظت‌های کتامین که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است، با غلظت‌های پلاسمایی موش‌های صحرایی و

انسان‌ها در هنگامی که اثرات بی‌دردی و بیهوشی کنندگی کتامین را آشکار می‌سازند، قابل مقایسه می‌باشد. قدرت (Potency) کتامین در انسان‌ها نسبت به موش‌های صحرایی بیشتر است [۸]. در موش‌های صحرایی، هنگام بیهوشی، حداکثر غلظت پلاسمایی کمتر از ۳۶ میکرومول است. در حالی که در انسان‌ها تقریبا ۹/۵-۸/۵ میکرومول می‌باشد. به هر حال در انسان‌ها، بی‌دردی با غلظت پلاسمایی تقریبا ۰/۵۵ میکرومول کتامین همراه می‌شود [۸]. کتامین بسیار محلول در چربی است و نسبت غلظت مغز به پلاسما ۶/۵ تخمین زده می‌شود. لذا پیشنهاد می‌گردد که کتامین ترجیحا در مغز تجمع می‌یابد [۲۰].

در این مطالعه تأیید شد همان طور که قبلا توسط Leung و Amborse [۱۴] گزارش شده بود، توسط اعمال تحریکات تتانیک نوع PBs،در برش‌های کنترل LTP به طور واقعی به وجود آمد. مقدار LTP در برش‌های زنده مغزی کنترل ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریکات تتانیک، در همه شدت‌های تحریک اعمال شده، به طور معنی‌دار با پاسخ پایه متفاوت بود. بیشترین افزایش در دامنه OPS، همان طور که قبلا گزارش شده بود [۳، ۱۴ و ۱۵] در شدت‌های تحریکی پایین مشاهده گردید.

ما همچنین دریافتیم که کتامین می‌تواند القاء LTP را مهار کند. فراوانی این مهار، با افزایش غلظت کتامین افزایش می‌یابد. فراوانی مهار LTP توسط غلظت‌های ۱ الی ۱۰۰ میکرومول کتامین در طی ۳۰-۲۰ دقیقه مشروب شدن برش‌های زنده مغزی توسط ACSF دارای کتامین، به طور وابسته به غلظت، بین ۱۲/۵٪ تا ۷۷٪ بود و این فراوانی برای غلظت نسبتا پایین کتامین (۲۰ میکرومول)، ۵۸٪ بود که بسیار جالب و قابل توجه می‌باشد. فرمول کتامین که به عنوان یک آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA است، به صورت نمک هیدروکلراید می‌باشد و بسیار محلول در آب است اما تحت شرایط فیزیولوژیکی کسر بزرگی از دارو به شکل محلول در چربی وجود دارد [۲۰] و بنابراین می‌تواند متعاقب مشروب شدن برش‌های مغزی، به سرعت توزیع مجدد گردد. لذا کتامین برای اعمال مؤثرش یک محدوده غلظتی کوچکی دارد [۲۱]. تراکم بالای گیرنده‌های NMDA در هیپوکمپ نیز [۶ و ۱۷]، ممکن است کارآیی بالای غلظت نسبتا پایین کتامین (۲۰ میکرومول) در مهار LTP را توجیه کند. علاوه بر این اثر ممانتین آنتاگونیست NMDA (۱۰ الی ۱۰۰ میکرومول)بر القاء LTP با اثرات کتامین در این مورد قابل مقایسه می‌باشد. گزارش شده است که ممانتین متعاقب ۳۰ دقیقه مشروب شدن برش‌های زنده مغزی با دارو، نمی‌تواند از ایجاد LTP جلوگیری کند. ناتوانی ممانتین در مهار LTP به موارد زیر نسبت داده می‌شود :

- نفوذ این ترکیبات بسیار چربی دوست به داخل برش‌های زنده و با توجه به چگونگی اعمال خاصیت آنتاگونیستی آن مبنی بر انسداد کانال‌های باز (Open channel blocker)، باید در مکان خود در داخل کانال گیرنده‌های NMDA قرار بگیرد.

این خواص مانع از این می‌شود. که ممانتین بتواند در طی ۳۰ دقیقه مشروب ساختن برش‌های زنده در داخل و خارج کانال گیرنده NMDA به تعادل برسد و با توجه به کینتیک سریع رفع مهار ممانتین که مانند منیزیم می‌باشد، این آنتاگونیست در طی فعالیت فیزیولوژیک می‌تواند کانال گیرنده NMDA را ترک نماید. بنابراین در باره کتامین، به نظر می‌رسد که اولا کتامین می‌تواند به داخل برش‌های مغزی نفوذ کند و طی ۲۰ الی ۳۰ دقیقه در داخل و خارج کانال گیرنده NMDA به تعادل برسد و با توجه به کینتیک رفع مهار سریع‌تر منیزیم نسبت به کتامین، پس منیزیم می‌تواند کانال گیرنده NMDA را در طی فعالیت فیزیولوژیکی زودگذر و در طی ایجاد LTP ترک کند اما کتامین نمی‌تواند. توانایی بالای کتامین در مهار LTP در غلظت‌های نسبتا پایین آن (۲۰ میکرومول)، ممکن است

وقوع اثرات جانبی توسط آن را در شرایط درمانی توجیه کند. زیرا که کتامین در این غلظت می‌تواند فعالیت فیزیولوژیک گیرنده‌های NMDA را به طور وسیع مهار کند [۷].

در تعدادی از برش‌های تحت اثر کتامین که PBs نتوانست سبب القاء LTP شود، LTD به وقوع پیوست. میزان کاهش پاسخ ناشی از PBs در حضور کتامین، در طی ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک تتانیک به آهستگی بیشتر شد. بنابراین این احتمال به نظر می‌رسد که برای مهار کانال، کتامین نسبت به APV یا منیزیم در زمان طولانی‌تری به تعادل می‌رسد [۷]. همچنین یافته‌های قبلی حاکی از این است که پاسخ‌های ناشی از مهار گیرنده‌های NMDA توسط کتامین و فن سیکلیدین، با حضور آگونیست افزایش می‌یابد [۹ و ۲۰]. بنابراین کاهش بیشتر پاسخ توسط کتامین می‌تواند به گلوتامات آزاد شده در طی هر تحریک ساده برای ایجاد OPS برانگیخته، در طی ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک تتانیک، نسبت داده شود. همچنین محتمل است که کاهش پاسخ ناشی از کتامین در ۶۰ دقیقه بعد از اعمال PBs ناشی از فرآیندهای وابسته به کلسیم باشد که توسط کتامین بلوک می‌شود. زیرا نشان داده شده است که مهار فعالیت گیرنده‌های Quisqualate و Kainate و نیز مهار کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، سبب کاهش مقادیر کلسیم داخل سلولی می‌شود [۲۶]. از طرف دیگر یافته‌های ما حاکی از ایجاد LTP در حضور کتامین، در تعدادی از برش‌های مغزی می‌باشد. دامنه این اسپایک‌های تقویت شده مشابه LTP نرمال است اما این LTP در طی ۶۰ دقیقه بعد از اعمال تحریک تتانیک (به جای زوال در LTP های کنترل) به آهستگی توسعه می‌یابد. بنابراین به نظر می‌رسد که کتامین علاوه بر القاء LTP، حفظ و بقاء آن را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد.

همچنین متفاوت بودن اثر یک غلظت معین از کتامین بر القاء LTP نیز ممکن است ناشی از تفاوت پراکندگی زیرگونه‌های مختلف و متنوع گیرنده‌های NMDA در هیپوکمپ باشد. زیرا نشان داده شده است که اولا: فراوانی گیرنده‌های NMDA در نواحی مختلف CNS متفاوت می‌باشد [۱]. ثانیا: مجموعه زیرواحدهای کانال گیرنده NMDA در چندین شکل وجود دارد که احتمالا خواص فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی متفاوتی داشته باشند [٤]. چندین محقق [۱۳ و ۳۰] شرح داده‌اند که چندین زیرواحد از گیرنده‌های NMDA وجود دارد که پاسخ‌ها و حساسیت‌های گیرنده‌های NMDA هم به آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌ها [۱۳ و ۲۹] بر اساس نحوهٔ قرار گرفتن زیرواحدها کنار هم، می‌تواند متفاوت باشد. علاوه بر این، تفاوت‌هایی در توزیع زیرواحدهای گوناگون در ساختمان‌های CNS پیشنهاد شده است. متدهای Functional analysis و Ligand binding پراکندگی نقشه‌های توزیع خاص زمانی ـ مکانی (Spatiotemporal) گیرنده‌های NMDA و زیرواحدهای آنها را در CNS مشخص کرده‌اند [۲۱]. این گوناگونی و تنوع گیرنده‌ها و ترتیب‌های متنوع قرار گرفتن زیرواحدهای آنها ممکن است در هیپوکمپ نیز وجود داشته باشد و اثرات مختلف کتامین را در برش‌های زنده مغزی هیپوکمپ که در مطالعه حاضر مشاهده شده است را توجیه کند. از طرف دیگر مشخص شده است که کتامین حداقل توسط دو مکانیسم عمل می‌کند:

۱- مهار کانال باز و فعال شده گیرنده NMDA

۲- مهار این گیرنده در حالی که کانال آن بسته است [۲۰].

قبلا پیشنهاد شده بود که کتامین درون حفره‌ای واقع در کانال گیرنده NMDA قرار می‌گیرد [۲۰ و ۲۳] اما اخیرا پیشنهاد شده است که کتامین همچنین از طریق یک مسیر غشایی که باز و بسته شدن کانال را تعدیل نمی‌کند نیز عمل می‌کند [۲۰]. حقیقتا حضور یک مسیر آب گریز

(Hydrophobic pathway) برای بیهوش کننده‌های جدا کننده از محیط (Dissociated anesthetics) مانند MK-801 و کتامین پیش‌بینی شده است [۱۱]. گزارش شده است که در غلظت‌های پایین کتامین، روش مهار از طریق مسیر غشایی غلبه پیدا می‌کند [۲۰]. همچنین پاره‌ای از گزارشات حاکی از آن است که منیزیم توسط اتصال به محل اتصال کتامین در درون کانال، گیرنده NMDA را مهار می‌کند. مطالعات الکتروفیزیولوژیکی پیشنهاد می‌کند که منیزیم از اتصال کتامین به گیرنده NMDA جلوگیری می‌کند و لذا مانع از انسداد گیرنده‌های NMDA از طریق مهار کانال باز آن توسط کتامین می‌شود [۱۹]. با توجه به این که کاهش فعالیت گیرنده‌های NMDA از طریق مهار فعالیت آن توسط مسیر غشایی گیرنده (و نه انسداد کانال آن) سبب افزایش اهمیت کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ در ایجاد LTP می‌شود [۲]، به نظر می‌رسد بتوان پیشنهاد کرد که خواص کتامین در غلظت‌های پایین (۱ و ۱۰ میکرومول) و ایجاد LTP توسط آن ممکن است ناشی از مهار گیرنده NMDA با کانال بسته (Closed-channel) و افزایش فعالیت کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ باشد که البته باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد. در این رابطه قابل توجه است که داروهای ضد پارکینسون مانند ممانتین و آمانتادین که خواص هوش‌بر و بی‌دردی ندارند، گیرنده NMDA را از طریق مهار کانال باز (Open-channel blockade) مسدود می‌کنند [۲۰] جالب خواهد بود که مشخص گردد آیا دو نوع روش مهار گیرنده NMDA توسط کتامین و به وسیله روش‌های فارماکولوژیکی قابل تمیز و تفکیک هستند یا خیر؟

منابع

[1] Aida, S., Fujiwara, N., Shimoji, K. Differential regional effects of ketamine on spontaneous and glutamate-induced activities of single CNS neurons in rats, ***Br. J. Anesth.,*** 73 (1994) 388-394.

[2] Aroniadou, V.A., Maillis, A., Stefanis, C.C., Dihydropyridine-sensitive calcium channels are involved in the induction of N-methyl-D-aspartate receptor-independent long-term potentiation in visual crotex of adult rats, ***Neurosci. Lett.,*** 151 (1993) 77-80.

[3] Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, ***Nature,*** 361 (1993) 31-39.

[4] Bresink, I., Danysz, W., Parsons, C.G., Mutschler, E. Different binding affinities of NMDA receptor channel blockers in varius brain regions-indication of NMDA receptor heterogeneity, ***Neuropharmacol.,*** 34 (1995) 553-540.

[5] Collingride, G.L., Kehl, S.L., McLennan, H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus, ***J. Physiol.,*** 334 (1983) 32-33.

[6] Cotman, C.W., Monaghan, D.T., Ottersen, O.P., Strom-Mathisen, J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors, ***Trends in Neurosci.,*** 10 (1987) 273-279.

[7] Frankiewiez, T., Potier, B., Bashir, Z.I., Collingridge, G.L., Parsons, C.G. Effects of memantine and MK-801 on NMDA-induced currents in cultured neurons and on synaptic transmission and LTP in area CAI of rat hippocampal slices, ***Br. J. Pharmacol.,*** 117 (1996) 689-697.

[8] Gonzales, J.M., Loeb, A.L., Reichard, P.S., Irvine, S. Ketamine inhibits glutamate-, N-methyl-D-aspartate and quisqualate-

stimulated cGMP production in cultured cerebral neurons, ***Anesthesiology,*** 82 (1996) 205-213.

[9] Honey, C.R., Miljkovic, Z., McDonald, J.F. Ketamine and phencyclidine cause a voltage-dependent block of response to L-aspartate acid, ***Neurosci. Lett.,*** 61 (1985) 135-139.

[10] Irifune, M., Shimuzu, T., Nomoto, M., Fukuda, T. Ketamine-induced anesthezia involves the N-methyl-D-aspartate channel complex in mice, ***Brain Res.,*** 596 (1992) 1-9.

[11] Javitt, D.C., Zukin, S.R. Biexponential kinetics of [^{3}H] MK-801 binding: Evidence for access to closed and open N-methyl-D-aspartate receptor channels, ***Mol. Pharmacol.,*** 35 (1989) 387-393.

[12] Koerner, J.F., Cotman, C.W. Response to schaffer collateral CA1 pyramidal neurons to analogues of acidic amino acids, ***Brain Res.,*** 251 (1982) 105-115.

[13] Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E. et al. Molecular diversity of the NMDA receptor channel, ***Nature,*** (London), 358 (1992) 36-41.

[14] Leung, L.S., Ambrose, S.A.U. Long-term potentiation as a function of test pulse intensity: A study using input/output profiles, ***Brain Res. Bull.,*** 33 (1994) 450-460.

[15] Mansouri, F.A., Motamedi, F., Fathollahi, Y., Atapour, N., Semnanian, S. Augmentation of LTP induced by primed-bursts tetanic stimulation in hippocampal CA1 area of morphine dependent rats, ***Brain Res.,*** 769 (1997) 119-124.

[16] McEachern, J.C., Shaw, C.A. An alternative to the LTP orthodoxy: a plasticity-pathology, Continuum model, ***Brain Res. Rev.,*** 22 (1996) 51-92.

[17] Monaghan, D.T., Holets, V.R., Toy, D.W., Cotman, C.W. Anatomical distribution of four pharmacologically distinct ^{3}H-L-glutamate binding sites, ***Nature,*** 306 (1983) 176-179.

[18] Nakao, S.I., Adachi, T., Murakawa, M., Shinomura, T., Kurata, J. et al. Halothane and diazepam inhibit ketamine-induced c-fos expression in the rat cingulate cortex, ***Anesthesiology,*** 58 (1996) 874-882.

[19] orser, B.A., Smith, D., Henderson, S., Gelb, A. Magnesium deficiency increased ketamine sensitivity in rats, ***Can. J. Anaesth.,*** 44 (1997) 883-890.

[20] Orser, B.A., Pennefather, P.S., McDonald, J.F. Multiple mechanisms of ketamine blocked of N-methyl-D-aspartate receptors, ***Anesthesiology,*** 86 (1997) 903-917.

[21] Quan, J., Brown, S.D., Carlton, S.M. Systemic ketamine attenuates nociceptive behaviors in a rat model of peripheral neuropathy, ***Brain Res.,*** 715 (1996) 51-62.

[22] Salami, M., Fathollahi, Y., Esteky, H., Motamedi, F., Atapour, N., Effects of ketamine on synaptic transmission and long-term potentiation in layer II/III of rat visual cortex in vitro, ***Eup. J. Pharmacol.,*** 390 (2000) 287-293.

[23] Sharp, F.R., Butman, M., Koistinaho, J., Ardalen, K., Nakki, R., et al. Phencyclidine induction of the hsp 70 stress gene in injured pyramidal neurons is mediated via multiple receptor and voltage gated calcium channels, ***Neurosci.,*** 4 (1994) 1079-1092.

[24] Shimoyama, N., Shimoyama, M., Inturrisi, C.E., Elliott, K.J. Ketamine attenuates and reverses morphine tolerance in rodents, ***Anesthesiology,*** 85 (1996) 1357-1366.

[25] Shimoyama, M., Shimoyama, N., Gorman, A.L., Elliott, K.J., Inturrisi, C.E. Oral ketamine is antinociceptive in the rat formalin test: role of the metabolite, norketamine, ***Pain,*** 81 (1999) 85-93.

[26] Teyler, T., Aroniadou, V., Berry, R.L., Borroni, A., Discennas, P. et al. LTP in neocortex, ***Seminars in the Neurosci.,*** 2 (1990) 365-379.

[27] Wakasugi, M., Hirota, K., Roth, S.H., Ito, Y. The effects of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus in vitro, ***Anesth. Analg.,*** 88 (1999) 676-680.

[28] Williamson, R., Wheal, H.V. The contribution of AMPA and NMDA receptors to graded bursting activity in the hippocampal CA1 region in an acute in vitro model of epilepsy, ***Epilepsy Res.***, 12 (1992) 179-188.

[29] Yamakura, T., Haradh, K., Okamura, A., Kemmostsu, O. Is the site of action of ketamine anesthesia is the N-methyl-D-aspartate receptors? ***Anesthesiology***, 72 (1990) 704-710.

[30] Yamazsaki, M., Mori, H., Araki, K.,, Mori, K.J.,Mishina, M. Cloning of expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit, ***FEBS Lett.***, 300 (1992) 39-45.