

# اثر مهارى اورکسین A بر انتقالات سیناپسى گابائریک نورون‌های هسته‌ی لوکوس سرولئوس در موش صحرايى

یوسف موسوی<sup>۱</sup>، حسین عزیزی<sup>۲\*</sup>، سیدجواد میرنجفی‌زاده<sup>۳</sup>، محمدجوان<sup>۳</sup>، سعید سمنانیان<sup>۳\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
 ۲. استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
 ۳. استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

## چکیده

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۰۵  
 تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۱۵

**اهداف** هسته لوکوس سرولئوس حاوی دسته‌های بزرگی از نورون‌های نورآدرنریک است که ارتباط گسترده‌ای با دیگر نواحی سیستم عصبی مرکزی از جمله هیپوتالاموس دارد. این هسته در تنظیم فرایندهای شناختی شامل توجه، یادگیری، حافظه و وابستگی به اوبیات نقش ایفا می‌کند. هر چند اثر تحریکی اورکسین A بر نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس نشان داده شده است، اثر آن بر انتقالات مهارى سیناپسى نورون‌های این هسته ناشناخته است. بنابراین، در این مطالعه اثر اورکسین A بر جریان‌های مهارى گابائریک نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها** از ناحیه ساقه مغز در محل حاوی نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس، برش‌های عرضی با ضخامت ۳۰۰ میکرون تهیه شد. جریان‌های مهارى پس‌سیناپسى خودبه‌خودی در حضور آنتاگونیست گیرنده‌های AMPA (CNQX) و NMDA (AP5) در مایع خارج سلولی، همچنین مهارگر کانال‌های سدیمی (QX314) در مایع داخل سلولی به روش whole-cell patch clamp ثبت شد. تأثیر اورکسین بر این جریان‌ها با افزودن اورکسین با غلظت 100 nM به مایع خارج سلولی بررسی شد.

**یافته‌ها** در این مطالعه، نشان داده شد که اورکسین A سبب کاهش فرکانس وقوع جریان‌های مهارى پس‌سیناپسى خودبه‌خودی در نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس می‌شود، ولی بر دامنه این جریان‌ها بی‌تأثیر است. این اثر با کاربرد SB-334867، آنتاگونیست اختصاصی گیرنده نوع یک اورکسین مهار می‌شود. **نتیجه‌گیری** این مورد نخستین مطالعه‌ای است که نشان می‌دهد اورکسین A سبب کاهش فرکانس جریان‌های مهارى پس‌سیناپسى خودبه‌خودی در هسته لوکوس سرولئوس می‌شود و این اثر را از طریق گیرنده نوع یک و به صورت پیش‌سیناپسى انجام می‌دهد. این مطلب، شاهد ارزشمندی برای نقش سیگنالی اورکسین A را در نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس فراهم می‌کند.

## کلیدواژه‌ها:

اورکسین A، ثبت whole-cell patch clamp، لوکوس سرولئوس، نورون‌های گابائریک.

## مقدمه

دسته‌های متراکمی از نورون‌های نورآدرنریک است. این هسته به‌طور گسترده با سایر نواحی سیستم عصبی مرکزی از

هسته لوکوس سرولئوس (LC: Locuscoeruleus) شامل

\* نویسنده مسئول: سعید سمنانیان و حسین عزیزی

نشانی: گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
 تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۲۰، دورنگار: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۲۰

رایانه: ssemnan@modares.ac.ir (S. Semnanian), azizih@modares.ac.ir (H. Azizi)

شناسه ORCID: حسین عزیزی 0000-0001-8489-0861، سعید سمنانیان 0000-0002-8987-3291، یوسف موسوی 0000-0002-1666-3955

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۵، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷، ص ۱۳-۲۰.

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: [journal@medsab.ac.ir](mailto:journal@medsab.ac.ir)

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

اورکسین میانجی عصبی تحریکی است و در تنظیم فعالیت سلول‌های عصبی LC نقش مهمی ایفا می‌کند. نوروپتید اورکسین در تنظیم رفتارهایی مانند غذا خوردن، نوشیدن، هموستاز انرژی، فعالیت عمومی بدن، دمای بدن، برانگیختگی، وابستگی به اویپات‌ها و تنظیم سیکل خواب و بیداری نقش دارد [۲۱، ۲۲]. اورکسین به دو نوع اورکسین A (با ۳۳ اسید آمینه) و اورکسین B (با ۲۸ اسید آمینه) تقسیم می‌شود [۲۳، ۲۴]. تاکنون برای نوروپتیدهای اورکسین، دو نوع گیرنده به‌نام گیرنده نوع ۱ اورکسین (OX1R) و گیرنده نوع ۲ اورکسین (OX2R) شناسایی شده است [۲۵]. این دو گیرنده از نوع گیرنده‌های متصل به پروتئین G است. OX1R از طریق Gq و OX2R به‌واسطه Gi/Go و نیز Gq عمل می‌کند [۲۵، ۲۶]. اورکسین A میل اتصال بیشتری نسبت به اورکسین B در OX1R دارد [۲۷].

نورون‌های سازنده اورکسین در نواحی محدودی در هیپوتالاموس قرار دارد. این نواحی شامل هیپوتالاموس جانبی (LH)، ناحیه پری‌فورنیکال (PFA) و هیپوتالاموس پشتی-میانی (DMH) است [۲۵، ۲۸]. استتاله‌های نورون‌های سازنده اورکسین به‌طور وسیعی مغز را عصبدهی می‌کند؛ از جمله، نواحی پیاز بویایی، قشر مغز، تالاموس، هیپوتالاموس، هسته اکومبنس، VTA و LC [۲۸]. در توزیع استتاله‌های نورون‌های سازنده اورکسین، در بسیاری از گونه‌ها هسته LC متراکم‌ترین فیبرهای اورکسینرژیک را دریافت می‌کند [۲۱]. گیرنده‌های اورکسین در بسیاری از نواحی مغزی مثل تالاموس، هیپوتالاموس، هسته‌های رافه، هسته اکومبنس، VTA و لوکوس سرولئوس وجود دارد [۲۸].

عزیزی و همکارانش نشان دادند که نوروپتید اورکسین از طریق گیرنده‌های نوع ۱ اورکسین در هسته LC به بروز علائم رفتاری نشانگان محرومیت از مرفین کمک می‌کند [۲۹]. تعامل بین گاما آمینوبوتیریک اسید و سیستم اورکسین به‌طور گسترده‌ای در هسته‌های مختلف مغز مطالعه شده است. گزارش شده است که اورکسین شلیک نورون‌های بینابینی گابائژژی را در هسته رافه [۳۰] و جسم سیاه افزایش می‌دهد [۳۱]. از طرفی، تزریق موسیمول در ناحیه پریفورنیکال و هسته اکومبنس بیان c-Fos را در نورون‌های اورکسینرژیک زیاد می‌کند [۳۲، ۳۳]. سیستم گابائژژیک به شدت رفتارهای تغذیه‌ای و داروهای شبه‌بنزودیازپین را متأثر می‌سازد و موسیمول که انتقالات سیستم عصبی گابائژژیک را تسهیل می‌کند، موجب پراشتهایی می‌شود [۳۴-۳۶]. مطالعات نشان داده است که اورکسین در مدولا به‌صورت موضعی رهایش

جمله قشر مخ، هیپوکامپ، مخچه و نخاع ارتباط دارد [۱، ۲]. LC در تنظیم فرایندهای شناختی شامل توجه، یادگیری، حافظه و وابستگی به اویپات‌ها نقش ایفا می‌کند [۲، ۳، ۴]. عملکرد نورون‌های هسته LC همانند سایر هسته‌های مغزی تحت تأثیر سیستم‌های تحریکی و مهارتی است. تعامل بین سیستم‌های تحریک و مهار نقش مهمی در فیزیولوژی مغز ایفا می‌کند. تعادل و تعامل بین فرایند تحریک و مهار به‌حدی اهمیت دارد که کوچک‌ترین اختلال در این مورد به بروز شرایط پاتولوژیکی در سیستم عصبی مرکزی می‌انجامد و اختلالات مغزی نظیر بیماری صرع را در پی دارد [۵-۱۱].

شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد گابا مهم‌ترین و فراوان‌ترین میانجی عصبی مهارتی در مغز است و در تنظیم فعالیت سلول‌های عصبی LC نقش مهمی دارد. با تکنیک اتورادیوگرافی و لیگاند-گیرنده، وجود دو نوع A و B گیرنده‌های این میانجی هم در جسم سلولی و هم در پایانه‌های عصبی گزارش شده است [۱۲، ۱۳]. به‌طور کلی، گابا دارای سه نوع گیرنده است، شامل گیرنده‌های گابا A، گابا B و گابا C. گیرنده گابا B از نوع متابوتروپیکی و گیرنده‌های گابا A و C به شکل کانال یونی دریچه‌دار وابسته به لیگاند عمل می‌کند [۱۴]. اتصال گابا به گیرنده نوع A موجب باز شدن این کانال یونی کلری می‌شود که با توجه به شیب غلظت یون کلر در خارج یا داخل نورون، تحریک‌پذیری نورون دچار تغییر می‌شود.

در دهه گذشته، طیف گسترده‌ای از سیناپس‌های گابائژژیک شناخته شده است. این تنوع به چندین شاخص از جمله عامل پیش‌سیناپسی، پس‌سیناپسی، شکاف سیناپسی یا اطراف آن وابسته است [۱۵]. مطالعات نوروشیمیایی نشان می‌دهد که تقریباً نیمی از پایانه‌های سیناپسی در هسته LC قادر به جذب گابای نشان‌دار است [۱۶]. آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز دارای نقش در ساختن گابا، در هسته LC حضور دارد [۱۷، ۱۸]. استتاله‌های تحریکی و مهارتی زیادی با هسته LC ارتباط دارد. هسته پره‌پوزیتوس هاپیوگلوسی (Prh) یکی از منابع اصلی در تأمین سیستم مهارتی گابائژژیک به هسته LC شمرده می‌شود. تحریک این هسته موجب می‌شود که شلیک سلول‌های عصبی LC مهار شود. در این حالت استفاده از بیوکولین، آنتاگونیست گابا سبب بازگشت شلیک نورون‌های LC می‌شود [۱۹]. همچنین، حین ثبت خارج سلولی به‌صورت *in vivo* نشان داده شده است که آیونتوفورز گابا سبب مهار شلیک نورون‌های LC می‌شود [۲۰]. از طرفی دیگر، شواهد نشان می‌دهد نوروپتید

سرعت ۱-۲ ميلي ليتر در دقيقه پرفيوز شد

### ۳.۲. تهیه الكتروود و محلول داخل سلولى

پيپت‌هاى شيشه‌اى از جنس بوروسيليكات (O.D: 1.5mm, I.D: 0.86mm, Harvard Apparatus Sutter instrument, P-) كشنده ميكروالكترود قابل برنامه ريزى (97 طی ۳-۴ مرحله كشيده و تهيه شد. در اثر كشش، نوک آن به تدريج تنگ شد و مقاومت آن به حدود ۷-۳ MΩ رسيد. الكتروود ثبت با محلول داخل سلولپير شد. تركيب محلول داخل پيپت برای ثبت جريان‌هاى مهارى پس سيناپسى شامل (Mm): 140 CsCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATPMg, 10 EGTA, 2 NaGTP و QX-314 بود. در تهیه اين محلول‌ها pH محلول داخل سلولى با استفاده از CsOH به ۷/۳ رسيد. سپس، اسمولاريتۀ محلول با افزودن تدريجى آب مقطر به محدوده ۲۹۰-۲۸۰ mOsm رسانده شد.

### ۴.۲. ثبت Whole cell patch clamp

به منظور اندازه گيرى جريان‌هاى مهارى پس سيناپسى نورون‌هاى هستۀ LC، از تكنيک چك كلمپ استفاده شد. در مد ولتاژ كلمپ، ثبت جريان‌هاى پس سيناپسى مهارى خودبه خودى (sIPSC) از نورون‌هاى هستۀ LC، در حضور (10 μM) CNQX و (50 μM) AP5 به ترتيب آنتاگونيست‌هاى گيرنده‌هاى AMPA و NMDA در پتانسيل نگهدارندۀ -70 mV انجام گرفت. در اين مد sIPSC ثبت شد كه حاصل رهايش كوانتايى ميانجى عصبى گابا A از پاينه‌هاى پيش سيناپسى در شرايط پايه است. جريان‌هاى غشا با كمك آمپلى فاير Multiclamp 700B ثبت شد. اين جريان‌ها با آمپلى فاير با ۲ kHz فيلتر (Low pass filter) و با ۱۰ kHz نمونه بردارى و در رايانه ذخيره شد. تمام ثبت‌ها در دماى اتاق (۲۵°C) انجام گرفت. پس از شكل گيرى وضعيت Whole cell و قبل از اعمال پروتكل‌هاى ثبت، ۵ دقيقه به سلول فرصت داده شد تا با دياليز كامل مایع داخل پيپت به شرايط پايدار بازگردد. سپس، پروتكل‌ها اعمال و ثبت‌ها انجام شد. تنها پارامترى كه بلافاصله پس از تشكيل Whole cell ارزيايى شد، ثبت فعاليت خودبه خودى سلول و ثبت نوسانات جريان سلول بود. اين پارامترها فقط برای تأييد الكتروفيزيولوژيكي سلول‌هاى LC استفاده شد.

### ۵.۲. آناليز داده‌ها

برای آناليز اين داده‌ها، از نرم افزارهاى Mini analysis و P-clamp استفاده شد. در آناليز داده‌ها از آزمون آمارى واريانس يك طرفه (One Way ANOVA) و آزمون paired Student's t-test two-tailed استفاده شد.  $P < 0.05$  ملاک

ميانجى گابا را افزايش مى دهد [۳۷، ۳۸]. با وجود اين، درباره سازوکار دقيق اثر اوركسين بر سيستم گابائريژيك و جريان‌هاى مهارى پس سيناپسى خودبه خودى (sIPSCs) و نشان دهنده رهايش كوانتايى ميانجى گابا در بين نورون‌هاى هستۀ LC، كارى انجام نشده است. در اين مطالعه، برای نخستين بار جريان‌هاى مهارى پس سيناپسى و اثر اوركسين بر آن بررسى شده است.

## يافته ها

### ۱.۲. حيوانات

در اين پژوهش، از ۲۰ سرموش صحرايى نژاد ويستار، در محدوده سنى ۲-۳ هفته استفاده شد. موش‌هاى مورد استفاده از مؤسسۀ انستيتو پاستور ايران تهيه شد. موش‌ها در شرايط ۱۲ ساعت روشنايى و در دماى ۲۵ درجه سانتى گراد نگهدارى شدند. همه آزمایش‌ها مطابق با دستورالعمل كميتۀ اخلاق دانشكده علوم پزشكى دانشگاه تربيت مدرس انجام شد.

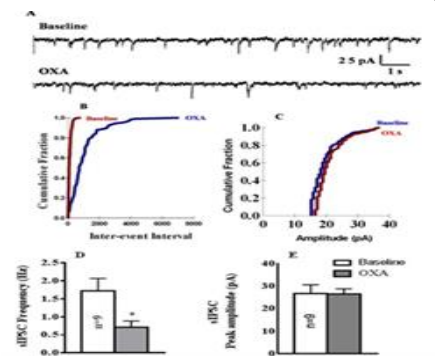
### ۲.۲. تهیه برش مغزى

موش‌ها نخست، با اثر بيهوش شدند. پس از بيهوشى، بلافاصله سر حيوان با قيچى جدا شد. در اين لحظه با سرعت، سر حيوان داخل محلول برش گيرى سرد (۴°C-) و كربوژنه (۹۵٪ O<sub>2</sub> و ۵٪ CO<sub>2</sub>) به مدت يك دقيقه غوطه ور گرديد. محلول برش گيرى از تركيبات زير فراهم شد (mM): Sucrose 213, 2.6 KCl, 1.23 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, L-Ascorbic Acid 0.4, 2 D-Glucose, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub> (pH=۷.۴) و (۳۱۰-۲۹۰ mOsm/L). سپس، بادقت و سرعت، پوست سر و استخوان جمجمه از محل مناسب برش داده و قطعۀ مغزى حاوى هستۀ LC جدا شد.

با ويبروتوم (Vibratome 1000 plus ساخت آمريكا) دو يا سه برش مغزى افقى ۳۰۰ ميكرونى حاوى نورون‌هاى هستۀ LC در محلول برش گيرى سرد و كربوژنه از ساقۀ مغز تهيه شد. سپس، برش‌هاى مغزى به محفظۀ گيبس منتقل و به مدت ۳۰-۴۵ دقيقه در aCSF استاندارد كربوژنه و هم‌دما با حمام آب گرم ۳۲-۳۵°C انكوبه شد. محلول خارج سلولى يا aCSF استاندارد حاوى (mM): 3 KCl, 125 NaCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, D- L-Ascorbic Acid 0.4, 10 Glucose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub> بود [۳۹] (pH=۷.۴) و اسمولاريتۀ آن (۳۱۰-۲۹۰ mOsm). سپس، محفظۀ گيبس حاوى برش‌ها از حمام آب گرم خارج و تا حين ثبت در دماى اتاق نگهدارى شد. به منظور ثبت از نورون‌هاى هستۀ لوكوس سرولئوس، برش مغزى به محفظۀ ثبت منتقل و به كمك پمپ پريستالتيك با محلول خارج سلولى كربوژنه با

## نتایج

کاهش فرکانس وقوع و عدم تغییر معنادار در دامنه sIPSC ناشی از اثر اورکسین A بر گیرنده‌های نوع ۱ اورکسین (OX1R) بوده است، اثر اورکسین A در حضور SB-334867 ( $3 \mu\text{M}$ )، مهارکننده اختصاصی گیرنده‌های نوع ۱ اورکسین نسبت به ثبت پایه بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که دامنه sIPSC در نورون‌های هسته LC، در حالت پایه  $23/90 \pm 2/52$  پیکوآمپر، پس از اعمال SB-334867  $24/96 \pm 2/52$  پیکوآمپر و پس از اعمال اورکسین A در حضور SB-334867  $20/18 \pm 2/24$  پیکوآمپر شد. از نظر آماری تفاوت معناداری در میزان دامنه sIPSC نورون‌های این موش‌ها مشاهده نشد (شکل ۳). همچنین، در این گروه، اثر اورکسین A در حضور SB-334867 بر فرکانس وقوع sIPSC نورون‌های هسته LC نسبت به ثبت پایه بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که فرکانس sIPSC در نورون‌های هسته LC، در حالت پایه  $1/09 \pm 0/21$  هرتز، پس از اعمال SB-334867  $0/99 \pm 0/21$  هرتز و پس از اعمال اورکسین A در حضور SB-334867  $1/02 \pm 0/30$  هرتز شد. از نظر آماری تفاوت معناداری در میزان فرکانس sIPSC نورون‌های این موش‌ها مشاهده نشد (شکل ۳).



شکل ۱. اثر اورکسین A بر دامنه و فرکانس sIPSC نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس موش‌های صحرائی. (A). اثر اورکسین (100 nm, 5 min) بر نمونه ثبت sIPSC (B) منحنی فراوانی تجمعی فرکانس sIPSC قبل و پس از اعمال اورکسین (C). منحنی فراوانی تجمعی دامنه sIPSC قبل و پس از اعمال اورکسین (D). اثر اورکسین (E) بر فرکانس sIPSC و (E) اثر اورکسین A بر دامنه sIPSC. تغییر معناداری در دامنه مشاهده نمی‌شود ولی به B و D کاهش معناداری در فرکانس sIPSC ایجاد شده است. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده شده است. در مقایسه گروه‌ها از آزمون

معنادار بودن اختلاف بین گروه‌های آزمایش در نظر گرفته شد. مقادیر به دست آمده به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است.

داده‌های این بخش حاصل رهایش کوانتایی میانجی عصبی گابا A از پایانه‌های پیش‌سیناپسی در شرایط پایه نورون LC است. تمامی ثبت‌ها در حضور CNQX ( $10 \mu\text{M}$ ) و AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) آنتاگونیست گیرنده‌های AMPA و NMDA در پتانسیل نگهدارنده  $-70 \text{ mV}$  انجام شد. در این بخش دو پارامتر ارزیابی شده است: یکی دامنه sIPSC که عمدتاً بیانگر میزان عبور یون‌های کلر از گیرنده‌های گابا A می‌باشد و نورون پس‌سیناپسی است؛ و دوم فرکانس وقوع sIPSC هاست که حاصل رهایش کوانتایی میانجی عصبی گابا A از پایانه‌های پیش‌سیناپسی نورون‌های LC است. هر چه میزان وقوع رهایش افزایش یابد، اندازه فرکانس بیشتر می‌شود.

## ۱.۳. اثر اورکسین A بر دامنه و فرکانس sIPSC در

## نورون‌های LC موش‌های صحرائی

اثر اورکسین A ( $100 \text{ nM}$ ) [۴۰] بر دامنه sIPSC نورون‌های هسته LC نسبت به ثبت پایه بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که دامنه sIPSC در نورون‌های هسته LC، قبل از اعمال اورکسین A  $26/71 \pm 3/87$  پیکوآمپر بود که پس از اعمال اورکسین A نسبت به ثبت پایه  $26/45 \pm 2/31$  پیکوآمپر شد که از نظر آماری تفاوت معناداری در میزان دامنه sIPSC نورون‌های این موش‌ها مشاهده نشد (شکل ۱).

همچنین، در این گروه، اثر اورکسین A بر فرکانس وقوع sIPSC نورون‌های هسته LC نسبت به ثبت پایه بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که فرکانس sIPSC در نورون‌های موش‌های هسته LC، قبل از اعمال اورکسین A  $1/72 \pm 0/34$  هرتز بود که پس از اعمال اورکسین A نسبت به ثبت پایه  $0/71 \pm 0/17$  هرتز کاهش یافت که از نظر آماری تفاوت معناداری در میزان فرکانس وقوع sIPSC نورون‌های این موش‌ها مشاهده شد (شکل ۱). در گروهی از نورون‌های LC برای اینکه نشان دهیم sIPSC ناشی از گیرنده‌های گابا A را ثبت گرفته‌ایم، از بیکوکولین ( $20 \mu\text{M}$ )، مهارکننده گیرنده‌های گابا A استفاده کردیم. اعمال بیکوکولین آنتاگونیست گیرنده گابا A سبب حذف این جریان می‌شد (شکل ۲).

## ۲.۳. اثر اورکسین A در حضور SB-334867 بر دامنه و

## فرکانس sIPSC در نورون‌های LC

در گروهی از نورون‌های LC برای اینکه نشان دهیم

(ANOVA) استفاده شد.

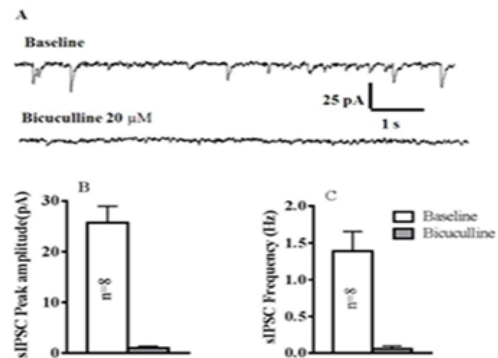
### بحث

یافته‌های مطالعه نشان می‌دهد اورکسین A سبب کاهش معنادار در فرکانس sIPSC در نورون‌های هسته LC موش‌های صحرائی می‌شود، ولی روی دامنه sIPSC در این نورون‌ها اثری ندارد (شکل ۲ و ۳). عدم تأثیر نوروپپتید اورکسین بر دامنه جریان‌های مهارى خودبه‌خودی و کاهش معنادار در فرکانس وقوع sIPSC بیانگر آن است که احتمالاً رهايش میانجی گابا از پایانه‌های پیش‌سیناپسی تغییر کرده است و نشان می‌دهد که اثر اورکسین بر جریان‌های مهارى به‌صورت پیش‌سیناپسی اتفاق می‌افتد. در مجموع، در مطالعه حاضر می‌توان نقش پیش‌سیناپسی را در تقویت کارایی سیناپس کاملاً منطقی دانست، چون یکی از دلایل احتمالی افزایش فرکانس sIPSC ممکن است افزایش رهايش میانجی گابا باشد (یا به دلیل افزایش محتوای کوانتایی هر وزیکول و/یا به دلیل افزایش تعداد وزیکول‌ها). هر چند تأیید یا رد قطعی این پدیده نیازمند مطالعات بیشتری است، آنچه واضح است نقش نورون پیش‌سیناپسی در میانجی‌کردن اثر اورکسین A در کاهش انتقالات سیناپسی مهارى است که در موش‌های صحرائی قابل مشاهده است.

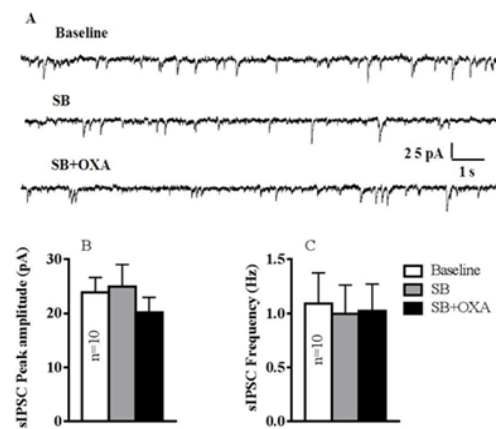
از آنجا که این مطالعه روی موش‌های صحرائی نژاد ویستار، در محدوده سنی ۲-۳ هفته انجام شده است، به این مسئله توجه شد که محدوده سنی نمونه‌ها، طوری مد نظر قرارگیرد که ثبت جریان‌های مهارى از نورون‌های هسته LC در فاز تحریکی سیستم گابائریک صورت نگیرد که در دوره نوزادی وجود دارد. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد گابا مهم‌ترین و فراوان‌ترین میانجی عصبی مهارى در مغز است و در تنظیم فعالیت سلول‌های عصبی هسته LC نقش مهمی دارد. ایجاد تعادل بین سیناپس‌های تحریکی و مهارى اساسی‌ترین فرایند در شکل‌گیری و بروز مدارهای عملی شبکه نورونی است. شواهد نشان می‌دهد که در دستیابی به این تعادل، فعالیت عصبی نقش مهمی دارد. در فرایند تکامل شبکه نورونی در دوره نوزادی، انتقالات سیناپسی سیستم گابائریک در نتیجه بیان زیاد کو-ترانسپورتر Na-K- $(NKCC1)2Cl$  حالت تحریکی دارد. در محدوده سنی ۱۲ روز انتقالات سیناپسی سیستم گابائریک از حالت تحریکی به حالت مهارى شیفت پیدا می‌کند [۴۱].

با توجه به این یافته که احتمالاً اثر اورکسین بر جریان‌های مهارى به‌صورت پیش‌سیناپسی اتفاق می‌افتد، برای اینکه بتوانیم با اطمینان بیشتر بگوییم اثر اورکسین بر

آمارى (paired two-tailed Student's t-test \* $P < 0.05$ ) استفاده شد.



شکل ۲. اثر کاربرد بیکوکولین ( $20 \mu M$ )، مهارکننده گیرنده‌های گابا A بر فرکانس و دامنه sIPSC ناشی از گیرنده‌های گابا A در نورون‌های هسته LC موش‌های صحرائی. (A) اثر بیکوکولین ( $20 \mu M$ ) بر نمونه ثبت sIPSC(B-C) اثر بیکوکولین بر دامنه و فرکانس وقوع sIPSC نسبت به حالت پایه. کاربرد بیکوکولین سبب حذف فرکانس و دامنه sIPSC ناشی از گیرنده‌های گابا A نورون‌های هسته LC در ولتاژ نگهدارنده  $-70$  میلی‌ولت شد. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده شده است.



شکل ۳. اثر اورکسین A در حضور SB-334867 بر دامنه sIPSC نورون‌های هسته لوكوس سرولئوس در موش‌های صحرائی. (A) نمونه ثبت اثر SB-334867 ( $3 \mu M$ ) اورکسین A ( $100 \text{ nm}$ ,  $5 \text{ min}$ ) در حضور SB-334867 در نمونه ثبت sIPSC(B-C)، اثر اورکسین A در حضور SB-334867 بر فرکانس و دامنه sIPSC نسبت به حالت پایه. از نظر آماری تغییر معناداری در فرکانس و دامنه sIPSC مشاهده نمی‌شود. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده شده است. در مقایسه گروه‌ها از آزمون آماری واریانس یک‌طرفه (One Way

## تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و ستاد توسعه علوم و فناوری‌های شناختی صورت پذیرفته است. بدین‌وسیله مجریان از حمایت این مراکز کمال تشکر را ابراز می‌دارند.

جریان‌های مهاری به‌صورت پیش‌سیناپسی در نورون‌های هسته LC عمل می‌کند، بهتر است اثر آن بر پتانسیل‌های برانگیخته دوتایی بررسی شود. وقوع تسهیل در پتانسیل‌های برانگیخته دوتایی (PPF)، خود نوعی شکل‌پذیری سیناپسی گذرا و وابسته به عملکرد نورون پیش‌سیناپسی است. این پدیده عمدتاً حاصل تجمع کلسیم ناشی از نخستین تحریک در پایانه نورون پیش‌سیناپسی است [۴۲].

## References

- Ungerstedt U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1971; 367: 1-48.
- Coull JT1, Büchel C, Friston KJ, Frith CD. Noradrenergically mediated plasticity in a human attentional neuronal network. *Neuroima.* 1999; 10(6): 705-15.
- Berridge CW1, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev.* 2003; 42(1): 33-84.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G. Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev.* 1983; 63(3): 844-914.
- Andersen P, Eccles JC, Loyning Y. Pathway of postsynaptic inhibition in the hippocampus. *J Neurophys.* 1964; 27: 608-19.
- Eccles JC. The ionic mechanisms of excitatory and inhibitory synaptic action. *Ann N Y Acad Sci.* 1966; 137(2): 473-94.
- Eccles JC. The development of the cerebellum of vertebrates in relation to the control of movement. *Natu.* 1969; 56(11): 525-34.
- Eccles JC, Llinas R, Sasaki K. The inhibitory interneurons within the cerebellar cortex. *Exp Brain Res.* 1966; 1: 1-16.
- Ito M. The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3: 896-902.
- Roberts E. Disinhibition as an organizing principle in the nervous system. The role of gamma-aminobutyric acid. *Adv Neurol.* 1974; 5: 127-143.
- Roberts E. What do GABA neurons really do? They make possible variability generation in relation to demand. *Exp Neurol.* 1986; 93: 279-290.
- Palacios JM, Wamsley JK, Kuhar MJ. High affinity GABA receptors autoradiographic localization. *Brain Res.* 1981; 222: 285-307.
- Suzdak PD, Gianutsos G. GABA-noradrenergic interaction: evidence for differential sites of action for GABA-A and GABA-B receptors. *J of Neural Trans.* 1985; 64: 163-172.
- Breuker E, Dingledine R, Iversen LL. Evidence for naloxone and opiates as GABA antagonists. *Br J Pharmacol.* 1976; 58(3): 458P.
- Mody I, Pearce RA. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci.* 2004; 27(9): 569-575.
- Iversen LL, Schon FE. The use of autoradiographic techniques for the identification and mapping of transmitter-specific neurones in CNS. In: Mandll AJ. *New Concepts in Neurotransmitter Regulation.* ed. New York: Plenum Press; 1973; 153-193.
- Belin MF, Aguera M, Tppaz M, McRae-Degueurec A, BoBillier P, Pujol JF. GABA-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal grey in the rat: A biochemical and radioautographic study. *Brain Res.* 1979; 170: 279-297.
- Perez e la, mora M, Possani LD, Tapia R, Teran L, Palacios R, Fuxe K, Hokfelt T, Ljungdahl A. Demonstration of central gama-aminobutyrate-containing nerve terminals by means of antibodies against glutamate decarboxylase. *Neurosci.* 1981; 6: 875-895.
- Ennis M, Aston-Jones G. GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. *J of Neurosci.* 1989; 9(8): 2973-2981.
- Guyeneta PG, Aghajanian GK. ACh, substance P and met-enkephalin in the locus coeruleus: Pharmacological evidence for independent sites of action. *Eur J of Pharmacol.* 1979; 53(4): 319-328.
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron.* 2000; 27(3): 469-74.
- Aston-Jones G. Locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Aston-Jones G, editor. *The Rat Nervous System.* Elsevier; 2004; 259-294.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik T, Bartlett FS, Frankel WN, van Den Pol AN, Bloom FE, Sutcliffe KM, Gautvik JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95(1): 322-327.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Haynes RE, Buckingham AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 1998; 92(4): 573-585.
- Hervieu JG, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neurosci.* 2001; 103(3): 777-797.
- Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol.* 1954; 47(6): 419-27.
- Velley L, Chaminade C, Roy MT, Kempf E, Cardo B. Intrinsic neurons are involved in lateral hypothalamic self-stimulation. *Brain Res.* 1983; 268(1): 79-86.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron.* 2003; 38(5): 701-13.
- Azizi H, Mirnajafi-Zadeh J, Rohampour K, Semnani S. Antagonism of orexin type 1 receptors in the locus coeruleus attenuates signs of naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. *Neurosci Lett.* 2010; 482: 255-9.
- Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J of Neurosci.* 2002; 22(21): 9453-9464.
- Korotkova TM, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin in vitro. *Regula Pepti.* 2002; 104(1-3): 83-89.
- Zheng H, Corkern M, Stoyanova I, Patterson LM, Tian R, Berthoud HR. Peptides that regulate food intake: appetite-inducing accumbens manipulation activates hypothalamic

- orexin neurons and inhibits POMC neurons. *Am J of Physiol Reguland Integ of Compa Physiol.* 2003; 284: R1436-R1444.
33. Baldo BA, Gual-Bonilla L, Sijapati K, Daniel RA, Landry CF, Kelley AE. Activation of a subpopulation of orexin/hypocretin-containing hypothalamic neurons by GABAA receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but not by exposure to a novel environment. *European J of Neurosci.* 2004; 19(2): 376-386.
  34. Soderpalm AH, Berridge KC. Food intake after diazepam, morphine or muscimol: microinjections in the nucleus accumbens shell. *Pharmacol Biochem and Behavi.* 2000; 66(2): 429-434.
  35. Rao TL, Kokare DM, Sarkar S, Khisti RT, Chopde CT, Subhedar N. GABAergic agents prevent alpha-melanocyte stimulating hormone induced anxiety and anorexia in rats. *Pharmacology, Biochem and Behavi.* 2003; 76(3-4): 417-423.
  36. Khaimova E, Kandov Y, Israel Y, Cataldo G, Hadjimarkou MM, Bodnar RJ. Opioid receptor subtype antagonists differentially alter GABA agonist-induced feeding elicited from either the nucleus accumbens shell or ventral tegmental area regions in rats. *Brain Res.* 2004; 1026(2): 284-294.
  37. van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB. Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J of Neurosc.* 1998; 18(19): 7962-7971.
  38. Lu L, Liu D, Ceng X, Ma L. Differential roles of corticotropin-releasing factor receptor subtypes 1 and 2 in opiate withdrawal and in relapse to opiate dependence. *European J of Neurosci.* 2000; 12(12): 4398-4404.
  39. Yasui Y, Masaki E, Kato F. Sevoflurane directly excites locus coeruleus neurons of rats. *Anesthesiol.* 2007; 107(6): 992-1002.
  40. Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron.* 2006; 49: 589-601.
  41. Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev.* 2007; 87(4): 1215-84.
  42. Foster TC, McNaughton BL. Long-term enhancement of CA1 synaptic transmission is due to increased quantal size, not quantal content. *Hippocampus.* 1991; 19(1): 79-91.
  43. Yu-Cheng Ho, et al. Activation of orexin 1 receptors in the periaqueductal gray of male rats leads to antinociception via retrograde endocannabinoid (2-Arachidonoylglycerol)-induced disinhibition. *Jurnal of Neurosc.* 2011; 31(41): 14600-14610.

## Inhibitory effect of orexin-A on GABAergic synaptic transmission in rat locus coeruleus neurons

Yousof Mousavi<sup>1</sup>, Hossein Azizi<sup>2\*</sup>, Javad Mirnajafi-Zadeh<sup>3</sup>, Mohammad Javan<sup>3</sup>, Saeed Semnanian<sup>3\*</sup>

1. PhD Student, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** The locus coeruleus (LC) contains large clusters of noradrenergic neurons which project widely throughout the central nervous system including hypothalamus. The LC is involved in cognitive processes, including attention, learning, memory and drug addiction. Orexin neuropeptides excite the noradrenergic LC neurons; however, its effects on inhibitory synaptic transmission to the LC neurons are unknown.

**Materials and Methods:** Here, we investigated the effect of orexin-A (100 nM) on sIPSCs in LC neurons. We used whole-cell patch clamp recording in rat horizontal slices containing the LC nucleus.

**Results:** Our electrophysiological data indicate that orexin-A application only decreased sIPSCs frequency of LC neurons that was blocked by SB-334867, selective orexin type-1 receptors.

**Conclusion:** In this study, our findings suggest that orexin-A depresses sIPSCs frequency through orexin type-1 receptors. It can be deduced that these changes in inhibitory synaptic transmission may be elicited by presynaptic mechanism. These results provide *in vitro* evidence for a critical role of orexin signaling in LC neurons.

**Received:** 2017/07/12

**Accepted:** 2017/09/06

**Keywords:** Orexin-A, whole-cell patch clamp recording, locus coeruleus, GABA.