

# اثر مهارى اورکسین A بر انتقالات سیناپسى گابائريک نورون‌هاى هسته‌ى لوکوس سرولئوس در موش صحرايى

يوسف موسوى<sup>۱</sup>، حسين عزيزى<sup>۲\*</sup>، سيدجواد ميرنجفى زاده<sup>۳</sup>، محمدجوان<sup>۳</sup>، سعيد سمنانيان<sup>۳\*</sup>

۱. دانشجوى دکترى، گروه فيزيولوژى، دانشکده علوم پزشکى، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران  
 ۲. استاديار، گروه فيزيولوژى، دانشکده علوم پزشکى، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران  
 ۳. استاد، گروه فيزيولوژى، دانشکده علوم پزشکى، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران

## چکیده

تاريخ دريافت: ۹۶/۰۶/۰۵  
 تاريخ پذيرش: ۹۶/۰۸/۱۵

**اهداف** هسته لوکوس سرولئوس حاوى دسته‌هاى بزرگى از نورون‌هاى نورآدرنريک است که ارتباط گسترده‌اى با ديگر نواحى سيستم عصبى مرکزى از جمله هيپوتالاموس دارد. اين هسته در تنظيم فرايندهاى شناختى شامل توجه، يادگيرى، حافظه و وابستگى به اوپيات‌ها نقش ايفا مى‌کند. هر چند اثر تحريکى اورکسین A بر نورون‌هاى هسته لوکوس سرولئوس نشان داده شده است، اثر آن بر انتقالات مهارى سيناپسى نورون‌هاى اين هسته ناشناخته است. بنا بر اين، در اين مطالعه اثر اورکسین A بر جريان‌هاى مهارى گابائريک نورون‌هاى هسته لوکوس سرولئوس بررسى شده است.

**مواد و روش‌ها** از ناحیه ساقه مغز در محل حاوی نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس، برش‌های عرضی با ضخامت ۳۰۰ میکرون تهیه شد. جريان‌هاى مهارى پس‌سيناپسى خودبه‌خودى در حضور آنتاگونيست گيرنده‌هاى AMPA (CNQX) و NMDA (AP5) در مايع خارج سلولى، همچنين مهارگر کانال‌هاى سدیمی (QX314) در مايع داخل سلولى به روش whole-cell patch clamp ثبت شد. تأثير اورکسین بر اين جريان‌ها با افزودن اورکسین با غلظت 100 nM به مايع خارج سلولى بررسى شد.

**يافته‌ها** در اين مطالعه، نشان داده شد که اورکسین A سبب کاهش فرکانس وقوع جريان‌هاى مهارى پس‌سيناپسى خودبه‌خودى در نورون‌هاى هسته لوکوس سرولئوس مى‌شود، ولى بر دامنه اين جريان‌ها بي‌تأثير است. اين اثر با کاربرد SB-334867، آنتاگونيست اختصاصى گيرنده نوع يك اورکسین مهار مى‌شود. **نتيجه‌گيرى** اين مورد نخستين مطالعه‌اى است که نشان مى‌دهد اورکسین A سبب کاهش فرکانس جريان‌هاى مهارى پس‌سيناپسى خودبه‌خودى در هسته لوکوس سرولئوس مى‌شود و اين اثر را از طريق گيرنده نوع يك و به‌صورت پيش‌سيناپسى انجام مى‌دهد. اين مطلب، شاهد ارزشمندی برای نقش سيگنالی اورکسین A را در نورون‌هاى هسته لوکوس سرولئوس فراهم مى‌کند.

## کلیدواژه‌ها:

اورکسین A، ثبت whole-cell patch clamp، لوکوس سرولئوس، نورون‌هاى گابائريک.

## مقدمه

هسته به‌طور گسترده با ساير نواحى سيستم عصبى مرکزى از جمله قشر مخ، هيپوکامپ، مخچه و نخاع ارتباط دارد [۱، ۲]. LC در تنظيم فرايندهاى شناختى شامل توجه، يادگيرى،

هسته لوکوس سرولئوس (LC: Locuscoeruleus) شامل دسته‌هاى متراکمى از نورون‌هاى نورآدرنريک است. اين

\* نویسنده مسئول: سعيد سمنانيان و حسين عزيزى

نشانی: گروه فيزيولوژى، دانشکده علوم پزشکى، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران  
 تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۲۰ - دورنگار: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۲۰

رايانه: ssemnan@modares.ac.ir (S. Semnianian), azizih@modares.ac.ir (H. Azizi)

شناسه ORCID: حسين عزيزى 0000-0001-8489-0861 <https://orcid.org/0000-0001-8489-0861>

سعيد سمنانيان 0000-0002-8987-3291 <https://orcid.org/0000-0002-8987-3291>

مجله علمى پژوهشى دانشگاه علوم پزشکى سبزوار، دوره ۲۵، شماره ۱، فروردين و ارديبيشت ۱۳۹۷، ص ۱۳-۲۰.

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

شاپاى چاپى: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

اورکسین در تنظیم رفتارهایی مانند غذاخوردن، 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 نوروپپتیدهای 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 اتصالی 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 نوروپپتید اورکسین از طریق گیرنده‌های نوع ۱ اورکسین در هسته LC به بروز علایم 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 گابائژژیک 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 میانجی گابا را افزایش می‌دهد [۳۷، ۳۸]. با وجود این، درباره سازوکار دقیق اثر اورکسین بر سیستم گابائژژیک و جریان‌های

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 هسته 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 متابوتروپیک 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 نوع 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 هاپیوگلووسی (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 بیکوکولین، 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 نوروپپتید اورکسین میانجی عصبی تحریکی است و در تنظیم فعالیت سلول‌های عصبی LC نقش مهمی ایفا می‌کند. نوروپپتید

### ۳.۲. تهیه الکترود و محلول داخل سلولی

پیپت‌های شیشه‌ای از جنس بوروسیلیکات (O.D: 1.5mm, I.D: 0.86mm, Harvard Apparatus Sutter instrument, P-) کشند. میکروالکتروود قابل برنامه‌ریزی (۹۷ طی ۳-۴ مرحله کشیده و تهیه شد. در اثر کشش، نوک آن به تدریج تنگ شد و مقاومت آن به حدود ۳-۷ MΩ رسید. الکترود ثبت با محلول داخل سلولی پر شد. ترکیب محلول داخل پیپت برای ثبت جریان‌های مهاری پس‌سیناپسی شامل (Mm):  $MgCl_2$  2,  $CaCl_2$  1, HEPES 10,  $CsCl_2$  140,  $ATPMg$  2, EGTA 10, NaGTP 2 و QX-314 بود. در تهیه این محلول‌ها pH محلول داخل سلولی با استفاده از CsOH به ۷/۳ رسید. سپس، اسمولاریته محلول با افزودن تدریجی آب مقطر به محدوده ۲۹۰-۲۸۰ mOsm رسانده شد.

### ۴.۲. ثبت Whole cell patch clamp

به منظور اندازه‌گیری جریان‌های مهاری پس‌سیناپسی نورون‌های هسته LC، از تکنیک کلپ استفاده شد. در مد ولتاژ کلپ، ثبت جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری خودبه‌خودی (sIPSC) از نورون‌های هسته LC، در حضور  $CNQX$  (10  $\mu M$ ) و  $AP5$  (50  $\mu M$ ) به ترتیب آنتاگونیست‌های گیرنده‌های AMPA و NMDA در پتانسیل نگهدارنده -70 mV انجام گرفت. در این مد sIPSC ثبت شد که حاصل رهائش کوانتایی میانجی عصبی گابا A از پایانه‌های پیش‌سیناپسی در شرایط پایه است. جریان‌های غشا با کمک آمپلی‌فایر Multiclamp 700B ثبت شد. این جریان‌ها با آمپلی‌فایر با ۲ kHz فیلتر (Low pass filter) و با ۱۰ kHz نمونه‌برداری و در رایانه ذخیره شد. تمام ثبت‌ها در دمای اتاق (۲۵°C) انجام گرفت. پس از شکل‌گیری وضعیت Whole cell و قبل از اعمال پروتکل‌های ثبت، ۵ دقیقه به سلول فرصت داده شد تا با دیالیز کامل مایع داخل پیپت به شرایط پایدار بازگردد. سپس، پروتکل‌ها اعمال و ثبت‌ها انجام شد. تنها پارامتری که بلافاصله پس از تشکیل Whole cell ارزیابی شد، ثبت فعالیت خودبه‌خودی سلول و ثبت نوسانات جریان سلول بود. این پارامترها فقط برای تأیید الکتروفیزیولوژیکی سلول‌های LC استفاده شد.

### ۵.۲. آنالیز داده‌ها

برای آنالیز این داده‌ها، از نرم‌افزارهای Mini analysis و P-clamp استفاده شد. در آنالیز داده‌ها از آزمون آماری واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و آزمون ملاک two-tailed Student's t-test استفاده شد.  $P < 0.05$  ملاک معنادار بودن اختلاف بین گروه‌های آزمایش در نظر گرفته

مهاری پس‌سیناپسی خودبه‌خودی (sIPSCs) و نشان‌دهنده رهائش کوانتایی میانجی گابا در بین نورون‌های هسته LC، کاری انجام نشده است. در این مطالعه، برای نخستین بار جریان‌های مهاری پس‌سیناپسی و اثر اورکسین بر آن بررسی شده است.

### یافته‌ها

#### ۱.۲. حیوانات

در این پژوهش، از ۲۰ سرموش صحرایی نژاد ویستار، در محدوده سنی ۲-۳ هفته استفاده شد. موش‌های مورد استفاده از مؤسسه انستیتوپاستور ایران تهیه شد. موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همه آزمایش‌ها مطابق با دستورالعمل کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

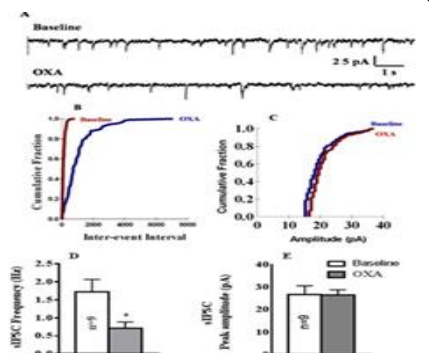
#### ۲.۲. تهیه برش مغزی

موش‌ها نخست، با اثر بیهوش شدند. پس از بیهوشی، بلافاصله سر حیوان با قیچی جدا شد. در این لحظه با سرعت، سر حیوان داخل محلول برش‌گیری سرد (۴°C-۰) و کربوژنه (۹۵٪  $O_2$  و ۵٪  $CO_2$ ) به مدت یک دقیقه غوطه‌ور گردید. محلول برش‌گیری از ترکیبات زیر فراهم شد (mM): Sucrose 213,  $NaHCO_3$  26,  $NaH_2PO_4$  1.23,  $KCl$  2.6,  $D-Glucose$  2,  $CaCl_2$  0.1,  $MgCl_2$  2,  $pH=7.4$  و 0.4 Acid,  $mOsm/L$  ۲۹۰-۳۱۰. سپس، بادقت و سرعت، پوست سر و استخوان جمجمه از محل مناسب برش داده و قطعه مغزی حاوی هسته LC جدا شد.

با ویبروتوم (Vibratome 1000 plus ساخت آمریکا) دو یا سه برش مغزی افقی ۳۰۰ میکرونی حاوی نورون‌های هسته LC در محلول برش‌گیری سرد و کربوژنه از ساقه مغز تهیه شد. سپس، برش‌های مغزی به محفظه گیبس منتقل و به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در aCSF استاندارد کربوژنه و هم‌دما با حمام آب گرم ۳۲-۳۵°C انکوبه شد. محلول خارج سلولی یا aCSF استاندارد حاوی (mM):  $NaCl$  125,  $KCl$  3,  $D-L-Ascorbic$  Acid 0.4,  $NaHCO_3$  25,  $NaH_2PO_4$  1.25,  $Glucose$  10,  $CaCl_2$  2,  $MgCl_2$  1.3 بود [۳۹]  $pH=7.4$  و اسمولاریته آن ۲۹۰-۳۱۰ mOsm. سپس، محفظه گیبس حاوی برش‌ها از حمام آب گرم خارج و تا حین ثبت در دمای اتاق نگهداری شد. به منظور ثبت از نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس، برش مغزی به محفظه ثبت منتقل و به کمک پمپ پرستالیتیک با محلول خارج سلولی کربوژنه با سرعت ۱-۲ میلی‌لیتر در دقیقه پرفیوز شد.

## نتایج

ناشی از اثر اورکسین A بر گیرنده‌های نوع ۱ اورکسین SB-334867 (OX1R) بوده است، اثر اورکسین A در حضور SB-334867 (3 μM)، 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 ۲۳/۹۰±۲/۵۲ پیکوآمپر، پس از اعمال SB-334867 ۲۴/۹۶±۲/۵۲ پیکوآمپر و پس از اعمال اورکسین A در حضور SB-334867 ۲۰/۱۸±۲/۲۴ 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 ۱/۰۹±۰/۲۱ هرتز، پس از اعمال SB-334867 ۱/۰۹±۰/۲۱ هرتز و پس از اعمال اورکسین A در حضور SB-334867 ۱/۰۲±۰/۳۰ 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 سرولوئوس موش‌های صحرائی. (A) اثر اورکسین A (100 nm, 5 min) بر نمونه ثبت sIPSC منحنی فراوانی تجمعی فرکانس sIPSC قبل و پس از اعمال اورکسین A. (C) منحنی فراوانی تجمعی دامنه sIPSC قبل و پس از اعمال اورکسین A. (D) اثر اورکسین A 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 ± خطای معیار نشان داده شده است. در مقایسه گروه‌ها از آزمون آماری (paired two-tailed Student's t-test \*P<0.05) استفاده شد.

شد. مقادیر به دست آمده به صورت میانگین ± 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 μM) و AP5 (50 μM) آنتاگونیست گیرنده‌های AMPA و NMDA در پتانسیل نگهدارنده -70 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 موجود در 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 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 ۲۶/۷۱±۳/۸۷ پیکوآمپر بود که پس از اعمال اورکسین A نسبت به ثبت پایه ۲۶/۴۵±۲/۳۱ 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 ۱/۰۹±۰/۲۱ هرتز بود که پس از اعمال اورکسین A نسبت به ثبت پایه ۰/۷۱±۰/۱۷ 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 (۲۰ μM)، مهارکننده گیرنده‌های گابا A استفاده کردیم. اعمال بیکوکولین آنتاگونیست گیرنده گابا A سبب حذف این جریان می‌شد (شکل ۲).

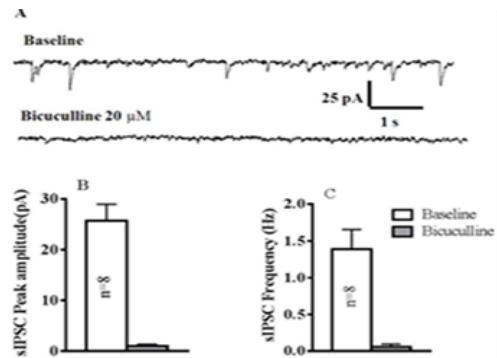
### ۲.۳. اثر اورکسین A در حضور SB-334867 بر دامنه و فرکانس sIPSC در نورون‌های LC

در گروهی از نورون‌های LC برای اینکه نشان دهیم کاهش فرکانس وقوع و عدم تغییر معنادار در دامنه sIPSC

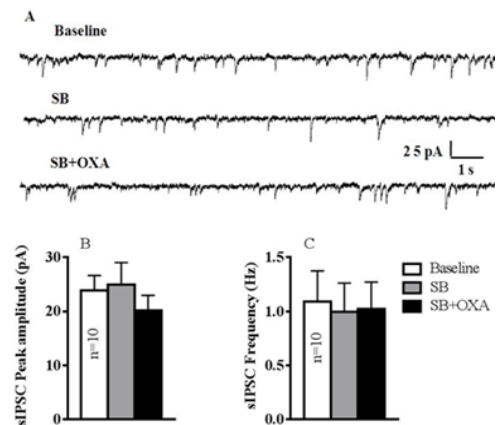
یافته‌های مطالعه نشان می‌دهد اورکسین A سبب کاهش معنادار در فرکانس sIPSC در نورون‌های هسته LC موش‌های صحرایی می‌شود، ولی روی دامنه sIPSC در این نورون‌ها اثری ندارد (شکل ۲ و ۳). عدم تأثیر نوروپپتید اورکسین بر دامنه جریان‌های مهارى خودبه‌خودی و کاهش معنادار در فرکانس وقوع sIPSC بیانگر آن است که احتمالاً رهایش میانجی گابا از پایانه‌های پیش‌سیناپسى تغییر کرده است و نشان می‌دهد که اثر اورکسین بر جریان‌های مهارى به‌صورت پیش‌سیناپسى اتفاق می‌افتد. در مجموع، در مطالعه حاضر می‌توان نقش پیش‌سیناپسى را در تقویت کارایی سیناپس کاملاً منطقی دانست، چون یکی از دلایل احتمالی افزایش فرکانس sIPSC ممکن است افزایش رهایش 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 پیش‌سیناپسى در میانجی‌کردن اثر اورکسین A در کاهش انتقالات سیناپسى مهارى است که در موش‌های صحرایی قابل مشاهده است.

از آنجا که این مطالعه روی موش‌های صحرایی 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 سیناپسى سیستم گابائریک در نتیجه بیان زیاد کو-ترانسپورتر Na-K-2Cl (NKCC1) حالت تحریکی دارد. در محدوده سنی ۱۲ روز انتقالات سیناپسى 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 پیش‌سیناپسى اتفاق می‌افتد، برای اینکه بتوانیم با اطمینان بیشتر بگوییم اثر اورکسین بر جریان‌های مهارى به‌صورت پیش‌سیناپسى در نورون‌های هسته LC عمل می‌کند، بهتر است اثر آن بر پتانسیل‌های برانگیخته دوتایی بررسی شود. وقوع تسهیل در پتانسیل‌های



شکل ۲. اثر کاربرد بیکوکولین ( $20 \mu\text{M}$ )، مهارکننده گیرنده‌های گابا A بر فرکانس و دامنه sIPSC ناشی از گیرنده‌های گابا A در نورون‌های هسته LC موش‌های صحرایی. (A) اثر بیکوکولین ( $20 \mu\text{M}$ ) 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 لوکوس سرولئوس در موش‌های صحرایی. (A) نمونه ثبت اثر SB-334867 ( $3 \mu\text{M}$ )، اورکسین A ( $100 \text{ nm}$ ,  $5 \text{ min}$ ) در حضور SB-334867 در نمونه ثبت sIPSC(B-C)، اثر SB-334867 و 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 ANOVA) استفاده شد.

## بحث



تربیت مدرس و ستاد توسعه علوم و فناوری‌های شناختی صورت پذیرفته است. بدین‌وسیله مجریان از حمایت این مراکز کمال تشکر را ابراز می‌دارند.

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].

#### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه

#### References

- Ungerstedt U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1971; 367: 1-48.
- Coull JT, Büchel C, Friston KJ, Frith CD. Noradrenergically mediated plasticity in a human attentional neuronal network. *Neuroima.* 1999; 10(6): 705-15.
- Berridge CW, 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 ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev.* 1983; 63(3): 844-914.
- Andersen P, Eccles JC, Loynning 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, Dingleline 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 gamma-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, Aghajani 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.
- 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 Neurosci.* 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 Neurosci.* 2011; 31(41): 14600-14610.

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

Yusof 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.