

اثر غیرفعال سازی برگشت پذیر لوکوس سرولئوس بر تقویت طولانی مدت در شکنج

دندان ای هیپوکمپ موش سفید بزرگ آزمایشگاهی

دکتر بهروز خاکپور طالقانی* - دکتر فرشته معتمدی**

* استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

** استاد گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۵/۳۱

تاریخ پذیرش: ۸۴/۸/۲۱

چکیده

مقدمه: هسته لوکوس سرولئوس (Locus Coeruleus, LC) در نزدیکی بطن چهارم مغز قرار گرفته است. مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژی حاکی از اهمیت خروجی های نورآدرنژیک این هسته در روندهای دقت، یادگیری و حافظه می باشند. پدیده تقویت طولانی مدت (Long-Term Potentiation, LTP) در نورون های هیپوکمپ به عنوان پایه و اساس یادگیری و حافظه معرفی شده است. اثر LC بر الکتروفیزیولوژی هیپوکمپ از سال ها پیش مورد بحث و بررسی بوده ولی نتایج متفاوت و متناقضی به همراه داشته است.

هدف: در این مطالعه اثر غیرفعال سازی برگشت پذیر LC بر ایجاد و حفظ LTP در ناحیه شکنج دندان ای (Dentate Gyrus, DG) هیپوکمپ موش های سفید بزرگ آزمایشگاهی نر بی هوش بررسی شد.

مواد و روشها: مطالعه صورت گرفته از نوع تجربی می باشد. غیرفعال سازی LC از طریق تزریق دو طرفه نیم میکرولیتر لیدوکائین (۰.۴٪) صورت گرفت. برای ایجاد LTP، دو بار تحریک با فرکانس بالا با فاصله ۵ دقیقه به نورون های مسیر پر فورانت (Perforant Pathway, PP) اعمال شد. دامنه پتانسیل عمل دسته جمعی (Population Spike, PS) و شیب پتانسیل تحریکی پس سیناپسی دسته جمعی (Population Excitatory Postsynaptic Potential, PEPSP)، قبل و ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تحریکات تنانیک در DG ثبت گردید.

نتایج: یافته های این مطالعه نشان داد که غیرفعال سازی برگشت پذیر LC تأثیری بر فعالیت پایه سلول های گرانولی DG ندارد. همچنین غیرفعال شدن LC، ۵ دقیقه قبل از تحریکات تنانیک بر القای LTP بی تأثیر بود. اما دامنه PS در ۶۰ و ۱۲۰ بعد از تحریکات تنانیک به طور معنی داری (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$) پایین تر از گروه کنترل بود. به دنبال تزریق لیدوکائین، ۵ دقیقه بعد از تحریکات با فرکانس بالا تأثیری بر LTP ایجاد شده، مشاهده نشد. همچنین تزریق لیدوکائین قبل و بعد از تحریکات تنانیک اثر قابل ملاحظه ای بر شیب PEPSP نداشت.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که غیرفعال سازی LC اثری بر ایجاد LTP در ناحیه شکنج دندان ای ندارد ولی احتمالاً نورون های این هسته تنظیم گر بخشی از حوادثی می باشند که در هنگام تحریکات تنانیک در سلول های گرانولی رخ داده و برای حفظ و بقای LTP دامنه پتانسیل عمل لازم می باشند.

کلید واژه ها: تقویت طولانی مدت / لوکوس سرولئوس / لیدوکائین / موش های سفید بزرگ / هیپوکمپ

مقدمه

که عبارتند از: تقویت طولانی مدت (LTP) و تقویت طولانی مدت نوراپی نفرینی (Norepinephrine Long Lasting Potentiation, NELLP) (۵ و ۶). LTP نوعی شکل پذیری سیناپسی است که توسط تحریک های با فرکانس بالا ایجاد می شود و به صورت افزایش طولانی مدت دامنه پتانسیل عمل دسته جمعی (PS) و شیب آغازین پتانسیل تحریکی پس سیناپسی دسته جمعی (PEPSP) بروز

هسته لوکوس سرولئوس (LC) غنی ترین منبع نوراپی نفرین (NE) مغز است (۱). خروجی های نورونی LC منبع مهم انتقال اطلاعات به هیپوکمپ هستند و شکنج دندان ای (DG) هیپوکمپ مقدار زیادی ورودی های نورآدرنژیک از LC دریافت می کند. ورودی های اصلی از طریق مسیر پر فورانت (PP) به DG می رسند (۲، ۳ و ۴). دونوع شکل پذیری سیناپسی در بین PP و DG نشان داده شده

حیوانات بی‌هوش و هشیار در حال حرکت، در مقایسه با حیوانات شاهد دیده نشده است (۱۹ و ۲۰). در خاتمه باید گفت که اثر تحریک LC و کاربرد مستقیم NE بر پتانسیل‌های برانگیخته سیناپسی هیپوکمپ نیز بسیار متناقض است به طوری که افزایش، کاهش مختصر و ثابت ماندن شیب PEPSP در مطالعه‌های مختلف گزارش شده است (۵، ۱۶ و ۲۱). ما در بررسی‌های پیشین اثر غیرفعال سازی برگشت پذیر LC را بر یادگیری و حافظه در آزمون‌های مختلف رفتاری، گزارش کرده‌ایم. نقش هیپوکمپ در یادگیری فضایی و غیرفضایی به اثبات رسیده است (۲۲ و ۲۳) و LTP اساس نوروئی یادگیری و حافظه قلمداد شده است (۸). تضادهای آشکاری در نتایج پژوهشگران در تعیین نقش LC و سیستم نورآدرنژیک مغز در بررسی‌های الکتروفیزیولوژیک هیپوکمپ به صورت *in vivo* دیده می‌شود. علاوه بر آن تاکنون از روش غیرفعال‌سازی برگشت‌پذیر که قادر است برخلاف مطالعه‌های گذشته، به طور همزمان نقش LC را در ایجاد و حفظ LTP بررسی کند، برای بررسی شکل‌پذیری سیناپسی در هیپوکمپ استفاده نشده است. به این دلیل روش مذکور را برای بررسی نقش LC در ایجاد و بقای LTP در شکنج دندان‌های هیپوکمپ بکار بردیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات: ۴۰ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نر از نژاد Wistar با وزن ۲۷۰-۳۳۰ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت. موش‌ها به صورت ۴ تایی در قفس‌های پلکسی گلاس نگهداری می‌شدند و در این مدت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. روش جراحی: در ابتدا حیوان با تزریق داخل صفاقی یورتان به میزان ۱/۵ gr/kg بی‌هوش می‌شد. سپس در دستگاه استرنوتاکس قرار گرفته و دو سوراخ به قطر یک میلی‌متر در دو طرف جمجمه بر اساس اطلس Paxinos-Watson (۲۴) و با مختصات $AP = -12/7mm$ نسبت به برگما و $ML = \pm 1/2$ ایجاد می‌شد. کانول‌های راهنما

می‌کند. این فرایند مکانیسمی برای یادگیری و حافظه شناخته شده است (۷ و ۸). NELLP از راه‌های مختلف از جمله تحریک الکتریکی و شیمیایی LC ایجاد می‌شود و موجب افزایش دامنه PS و شیب PEPSP می‌شود (۵، ۹ و ۱۰). بررسی روند تنظیم و تعدیل LTP توسط ورودی‌های نوروئی هیپوکمپ، راهی مهم برای ارزیابی ماهیت این پدیده در درون بدن به‌شمار می‌رود. بررسی تأثیر سیستم LC-NE بر شکل‌پذیری سیناپسی در هیپوکمپ نتایج متناقضی به دست داده است. در حالی که براساس مطالعه‌های اولیه، مهار طولانی مدت سلول‌های گرانولی و هرمی هیپوکمپ گزارش شده است (۱۱)، بسیاری از پژوهش‌های بعدی حاکی از اثر تحریکی این سیستم بر الکتروفیزیولوژی هیپوکمپ است (۱۲، ۱۰، ۹ و ۱۳). پژوهشگران، با بررسی‌های خارج بدن تقریباً اتفاق نظر پیدا کرده‌اند که سیستم نورآدرنژیک با منشأ LC در LTP هیپوکمپ نقش مهمی دارد (۱۴، ۹ و ۱۵). برخلاف یافته‌های خارج بدن (*in vitro*) گزارش‌های بررسی‌های داخل بدن (*in vivo*) متفاوت و متناقض بوده است و اثر سیستم LC-NE بر LTP کمتر مشخص است. در برخی مطالعه‌ها نقش سیستم نورآدرنژیک در ایجاد LTP دامنه پتانسیل عمل در ناحیه DG مثبت و یا منفی ارزیابی شده است، و برخی دیگر این سیستم را در ایجاد LTP در این ناحیه دخیل نمی‌دانند. گزارش می‌شود که تحریک الکتریکی و شیمیایی LC، دامنه پتانسیل عمل را در سلول‌های گرانولی DG افزایش می‌دهد (۱۵ و ۱۶). نشان داده شده است که NE تولید LTP در شکنج دندان‌های موش بی‌هوش و هشیار را تسهیل می‌کند (۱۷). همچنین تحریک الکتریکی LC موجب بازگشت LTP ای می‌شود که قبلاً با تحریک تتانیک وارد شده به PP بوجود آمده و پایان یافته است (۱۳ و ۱۸). از سوی دیگر، تحریک LC و کاربرد سیستمیک داروهای آگونیست β -آدرنژیک، باعث کاهش دامنه PS در حیوانات بی‌هوش می‌شود (۹ و ۱۲). از طرف دیگر به دنبال تخریب سیستم LC-NE هیچ‌گونه تغییری در LTP ایجاد شده با تحریک تتانیک در

مسیر پرفورانت، پتانسیل‌های برانگیخته میدانی از ناحیه شکنج دندان‌های ثابت می‌شدند. فرمان تحریک از رایانه به دستگاه تحریک‌کننده (Stimulator) و از آنجا از راه ایزوله‌کننده و تثبیت‌کننده تحریک، تحریک نهایی با الکتروود دو قطبی به PP منتقل می‌شد. PP با تک موج‌های مربعی تک مرحله‌ای (Monophasic) به مدت ۰/۱ هزارم ثانیه و با فاصله‌های ۱۰ ثانیه‌ای با شدت‌های مختلف تحریک می‌شد تا زمانی که پتانسیل میدانی به حداکثر مقدار خود برسد. شدت ایجاد کننده ۳۰ تا ۵۰ درصد حداکثر پاسخ انتخاب می‌شد. برای ادامه کار فقط از این شدت یا تحریک‌آزمونی (Test Stimulus, TS) استفاده می‌شد. پاسخ برانگیخته شده با TS، تقویت و پالایش شده (باند عبور: یک هرتز تا ده کیلو هرتز) و با سرعت ۱۰ کیلوهرتز نمونه‌برداری و در رایانه ضبط و ذخیره می‌شد. میانگین دامنه PS و شیب PEPSP ۱۰ پاسخ با استفاده از یک برنامه نرم افزاری محاسبه می‌شد.

روش ایجاد LTP: برای ایجاد LTP، به طور متوسط پس از ۱۲۰ دقیقه، یعنی زمانی که فعالیت پایه ثابت و پایداری ثبت می‌شد، دوبار تحریک با فرکانس بالا با فاصله ۵ دقیقه و شدتی برابر با TS به PP اعمال می‌شد. هر تحریک شامل ۱۰ قطار موج بود که با فرکانس ۴۰۰ هرتز، به مدت ۵۰ هزارم ثانیه و در فواصل زمانی ۱۰ ثانیه به بافت وارد می‌شد. ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از دومین تحریک تتانیک، پتانسیل‌های برانگیخته مجدداً با تحریک تک موجی ثبت شده و مقدار تقویت به صورت تغییر دامنه PS و شیب PEPSP در فواصل زمانی مذکور نسبت به مقدار قبل از تحریک‌های با فرکانس بالا اندازه‌گیری و محاسبه می‌شد. افزایش بیش از ۱۵٪، بعد از تحریک کزاز، به عنوان رخداد موفقیت آمیز LTP در نظر گرفته شد.

روش بافت‌شناسی: در پایان هر آزمایش مغز را از جمجمه خارج کرده و چندین روز در فرمالین ۱۰٪ قرار می‌دادند. سپس از آن برش‌های ۴۰ میکرومتری تهیه شده رنگ‌آمیزی نیسل شدند و با میکروسکوپ نوری از نظر

(۲۳G-۱۵mm) از جنس فولاد زنگ نزن با زاویه ۲۵ درجه به عمق $DV = 7/1 \text{ mm}$ از سطح جمجمه وارد شده و ۱ میلیمتر بالای LC قرار می‌گرفتند و پس از آن با سیمان دندانپزشکی بر روی جمجمه ثابت می‌شدند. در ادامه پس از سوراخ کردن جمجمه، یک الکتروود تحریکی دو قطبی از جنس استنلس استیل به قطر ۱۲۵ میکرومتر با پوشش تفلون در مسیر پرفورانت با مختصات $AP = -8/1 \text{ mm}$ نسبت به برگما، $ML = \pm 4/3 \text{ mm}$ و $DV = 3-3/3 \text{ mm}$ از سطح جمجمه (۲۴) و یک میکرو الکتروود ثابت شیشه‌ای با مقاومت ۲-۱/۵ مگا اهم پر شده با محلول کلرید سدیم ۳ مولار در لایه سلول‌های گرانولی شکنج دندان‌های با مختصات $AP = -3/8 \text{ mm}$ نسبت به برگما، $ML = \pm 2/4 \text{ mm}$ و $DV = 2/7-3/2 \text{ mm}$ از سطح جمجمه (۲۴) در یکی از دو نیمکره مغز قرار داده می‌شد. الکتروود مرجع یا غیرفعال برای ثبت، روی ماهیچه‌های گردن حیوان قرار می‌گرفت. الکتروودهای ثابت و مرجع به آمپلی فایر و الکتروود تحریکی به سیستم تحریک کننده وصل می‌شدند. در طول آزمایش دمای بدن حیوان توسط پتوی کنترل‌کننده حرارت در دامنه ۳۷-۳۷/۵ درجه سانتیگراد حفظ می‌شد.

روش غیرفعال‌سازی برگشت پذیر لوکوس سرولئوس: غیرفعال کردن موقت LC با تزریق نیم میکرولیتر محلول لیدوکائین ۰/۴٪ (تهیه شده از پودر لیدوکائین هیدروکلراید کارخانه تولیدارو) انجام شد. لیدوکائین یک بی‌حس‌کننده موضعی است که با کاهش نفوذپذیری غشای پلاسمایی به سدیم، حذف عملی برگشت‌پذیر ایجاد می‌کند (۲۵). این مقدار قادر است تا با توجه به قطر LC، تمام این هسته را غیرفعال کند. زمان حداکثر تاثیر لیدوکائین ۳۰ دقیقه پس از تزریق است و کارکرد هسته در مدت کمتر از یک ساعت به حالت طبیعی برمی‌گردد (۲۶). تزریق، دوطرفه و با سرنگ هامیلتون یک میکرولیتری که با لوله پلی‌اتیلن به سوزن تزریق (۳۰G-۱۶mm) متصل بود، انجام شد.

ثبت پتانسیل‌های برانگیخته میدانی: در پاسخ به تحریک

محل قرار گرفتن کانول‌ها و جایگاه الکترودها مورد بررسی قرار گرفتند. از نتایج حاصل از حیواناتی که محل قرار گرفتن کانول‌ها و الکترودها در آنها درست نبود، در تجزیه و تحلیل آماری استفاده نشد. شکل ۱ نمونه‌ای از محل ورود سوزن تزریق را به صورت دوطرفه در لوکوس سرولئوس نشان می‌دهد.

روش آماری: برای بررسی تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد و برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین دو گروه و در زمان‌های مختلف، آزمون t دانشجویی غیرزوج بکار رفت. تفاوت درون گروهی با آنالیز واریانس مدل Repeated measure بررسی شد.

آزمایش ۱: بررسی اثر تزریق سالیین و لیدوکائین به لوکوس سرولئوس بر ثبت پایه (Baseline recording) از سلول‌های گرانولی شکنج دندان‌های هیپوکمپ. پس از اندازه‌گیری TS، سالیین (n=6) و لیدوکائین (n=6) به داخل LC تزریق شد. ثبت‌های پایه ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق، انجام شد.

آزمایش ۲: بررسی اثر غیرفعال ساختن برگشت پذیر LC، قبل از تحریک‌های تتانیک، بر ایجاد و حفظ LTP در شکنج دندان‌های هیپوکمپ. در گروه‌های سالیین (n=7) و لیدوکائین (n=7) به ترتیب، سالیین و لیدوکائین ۵ دقیقه قبل از تحریک با فرکانس بالا، به داخل LC تزریق شد. اثر تزریق بر مقدار LTP در ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تحریک دوم مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش ۳: بررسی اثر حذف موقتی LC بر بقای LTP در شکنج دندان‌های هیپوکمپ. سالیین (n=7) و لیدوکائین (n=7) ۵ دقیقه بعد از وارد کردن تحریک‌های تتانیک، به LC تزریق شد و اثر تزریق بر LTP ایجاد شده، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از آن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

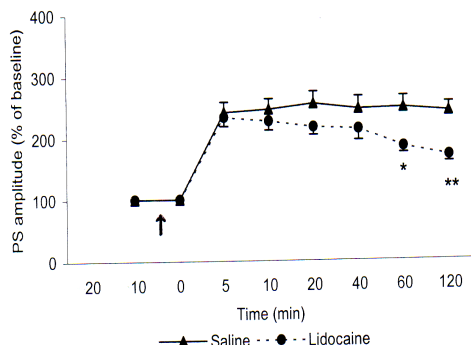
اثر تزریق سالیین و لیدوکائین به لوکوس سرولئوس بر فعالیت پایه سلول‌های گرانولی شکنج دندان‌های هیپوکمپ

نتایج نشان داد که تزریق سالیین و لیدوکائین به LC تا ۲ ساعت پس از تزریق تأثیری بر ثبت پایه سلول‌های گرانولی شکنج دندان‌های نداشته است. بنابراین، اثرهای دیده شده در این مطالعه بر روندهایی که در هنگام تولید LTP به وقوع پیوسته است اعمال شد.

اثر غیرفعال ساختن لوکوس سرولئوس، قبل از تحریک‌های تتانیک، بر ایجاد و حفظ LTP. شکل ۲ نمونه‌ای از تأثیر تزریق سالیین و لیدوکائین به درون LC، ۵ دقیقه پیش از تحریک تتانیک را بر مقدار LTP در دقیقه‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۲۰ بعد از تحریک دوم با فرکانس بالا نشان می‌دهد. آنالیز واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌دار از نظر دامنه PS بین دو گروه وجود دارد [F(۱,۷۲)=۲/۷۱, P<۰/۰۱]. در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه، اما نه در دقیقه‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ پس از تحریک با فرکانس بالا، درصد تقویت در گروه لیدوکائین کمتر از گروه کنترل است (به ترتیب P<۰/۰۵، P<۰/۰۱) (شکل ۳). همچنین آنالیز واریانس درون گروهی حاکی از نبودن تفاوت معنی‌دار از نظر درصد تقویت در زمان‌های مختلف در گروه سالیین [F(۵,۳۰)=۰/۶۷, P=۰/۶] ولی تفاوت قابل ملاحظه در گروه لیدوکائین است. [P<۰/۰۰۰۱]. [F(۵,۳۰)=۲۲/۱۱] و درصد تقویت در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ از سایر دقایق کمتر است. آنالیز آماری شیب PEPSP نشان داد که نه تنها تفاوت درون گروهی، در گروه‌های سالیین [F(۵,۳۰)=۰/۴۳, P=۰/۸] و لیدوکائین [P=۰/۹, F(۵,۳۰)=۰/۲۵] وجود ندارد، تفاوت معنی‌دار از نظر درصد تقویت شیب PEPSP نیز در گروه‌های فوق موجود نیست. [F(۱,۷۲)=۰/۲۶, P=۰/۹] (شکل ۴). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که حذف لوکوس سرولئوس تأثیری بر ایجاد LTP در DG ندارد اما حفظ LTP، در پی غیرفعال شدن LC پیش از کاربرد تحریکات با فرکانس بالا مختل می‌شود.

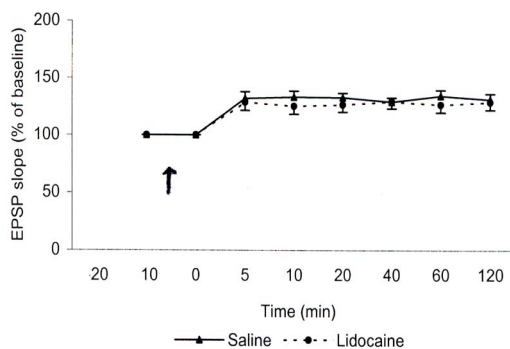
اثر غیرفعال شدن موقتی LC، بعد از تحریک تتانیک، بر بقای LTP. شکل ۵ نمونه‌ای از تأثیر غیرفعال‌سازی لوکوس سرولئوس بعد از تحریک‌های با فرکانس بالا را بر

بر نشان دهنده پاسخ پیش از تحریک های تانیک و خطوط نقطه چین نشان دهنده پاسخ پس از کاربرد آن ها می باشند.



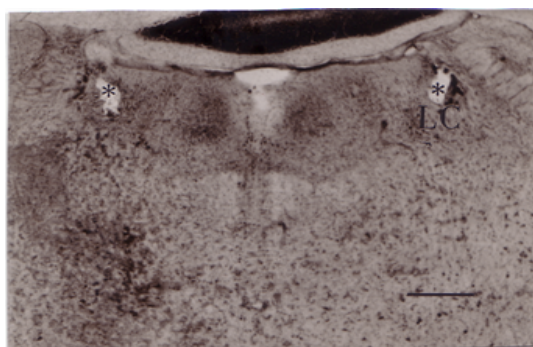
شکل ۳: اثر غیرفعال سازی برگشت پذیری لوکوس سرولئوس، قبل از تحریک تانیک، بر ایجاد تقویت طولانی مدت در پتانسیل عمل دسته جمعی ناحیه شکنج دندانهای هیپوکمپ. منحنی ها بر حسب میانگین درصد تغییرات نسبت به ثبت پایه رسم شده اند. تحریک تانیک در زمان صفر اعمال شده است. زمان تزریق سالین و لیدوکائین توسط پیکان نشان داده شده است.

($P < 0.05$ ، * $P < 0.01$ ، ** نسبت به گروه کنترل مربوط)

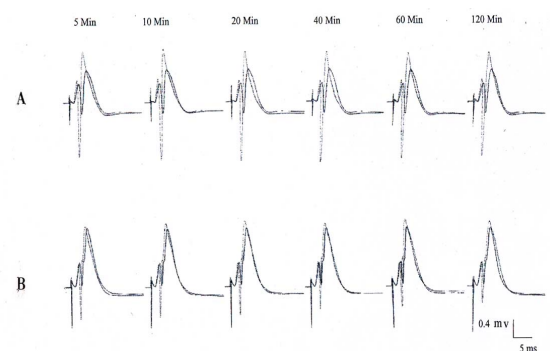


شکل ۴: اثر حذف موقتی لوکوس سرولئوس، پیش از تحریک های تانیک، بر ایجاد تقویت طولانی مدت در شیب پتانسیل تحریکی پس سیناپسی دسته جمعی ناحیه جسم سلولی سلول های گرانولی شکنج دندانهای هیپوکمپ. منحنی ها بر حسب میانگین درصد تغییرات نسبت به ثبت پایه رسم شده اند. تحریک تانیک در زمان صفر اعمال شده است. زمان تزریق سالین و لیدوکائین به وسیله پیکان نشان داده شده است.

LTP تولید شده، نشان می دهد. آنالیز واریانس حاکی از نبود تفاوت معنی دار از نظر دامنه PS $[F(1,972) = 0.45, P = 0.9]$ و شیب PEPSP $[F(1,972) = 0.16, P = 0.9]$ بین دو گروه است (شکل های ۶ و ۷). همچنین آنالیز واریانس به روش Repeated measure تفاوت معنی دار درون گروهی را از نظر دامنه PS در گروه های سالین $[F(5,30) = 1.28, P = 0.3]$ و لیدوکائین $[F(5,30) = 1.98, P = 0.1]$ و همچنین شیب PEPSP در گروه های سالین $[F(5,30) = 0.32, P = 0.8]$ و لیدوکائین $[F(5,30) = 1.1, P = 0.3]$ در زمان های مختلف پس از تحریک تانیک نشان نمی دهد. نتایج فوق بیانگر آن است که فعالیت طبیعی لوکوس سرولئوس که بعد از غیرفعال سازی حذف می شود برای حفظ LTP ایجاد شده با تحریک تانیک ضروری نیست.



شکل ۱: مقطع بافتی (Coronal) از محل تزریق دو طرفه لوکوس سرولئوس (ستاره ها). LC: لوکوس سرولئوس مقیاس: ۵۰۰ میکرومتر



شکل ۲: یک نمونه از پتانسیل های میدانی ثبت شده به دنبال تزریق سالین (A) یا لیدوکائین (B) به لوکوس سرولئوس، قبل از تحریک های تانیک، بر ایجاد و حفظ تقویت طولانی مدت در ناحیه شکنج دندانهای هیپوکمپ، ۵ تا ۱۲۰ دقیقه پس از این تحریک ها. خطوط

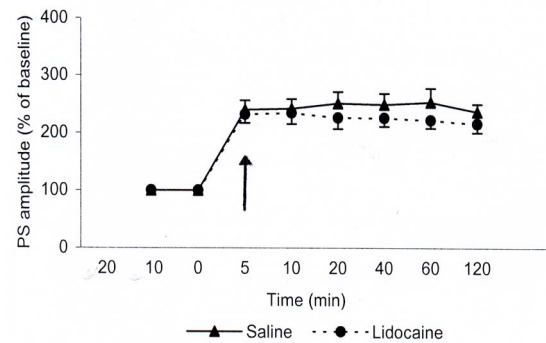
ناحیه جسم سلولی سلولهای گرانولی شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ. منحنی‌ها برحسب میانگین درصد تغییرات نسبت به ثبت پایه رسم شده‌اند. تحریک تتانیک در لحظه صفر اعمال شده است. سالین و لیدوکائین، ۵ دقیقه پس از تحریک‌های تتانیک (پیکان) تزریق شده‌اند.

بحث و نتیجه گیری

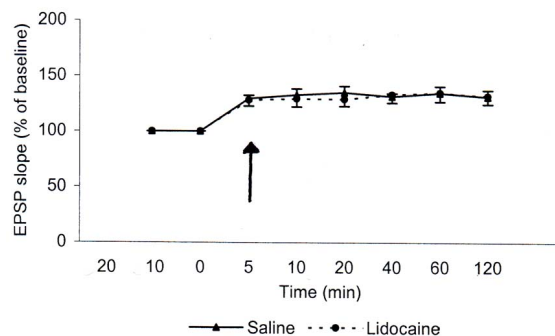
بنابراین یافته‌های اصلی در این مطالعه عبارتند از: ۱- غیرفعال کردن LC بر پاسخ پایه ثبت شده از شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ بی‌تأثیر است. ۲- غیرفعال کردن برگشت پذیر LC، قبل از تحریکات تتانیک، تأثیری بر میزان LTP ایجاد شده ندارد. ۳- حذف موقت LC، قبل از تحریک با فرکانس بالا، تنها موجب کاهش دامنه پتانسیل عمل و فقط در دقایق ۶۰ و ۱۲۰ پس از آن می‌شود. ۴- غیرفعال کردن LC، پس از تحریک کزاز، تأثیری بر LTP ایجاد شده ندارد. نتایج آزمایش ۱ نشان داد که غیرفعال کردن LC تأثیری بر فعالیت پایه سیناپس‌های فیبرهای مسیر پرفورانت و سلولهای گرانولی شکنج دندانه‌ای ندارد. از این رو، اثرهای مشاهده شده به دنبال حذف LC بر روندهایی اعمال شد که در هنگام تولید LTP به وقوع پیوسته بود. در تأیید این یافته باید گفت که بررسی‌های گذشته نشان داده که تحریک الکتریکی LC، کاربرد مستقیم NE در هیپوکمپ و تهی کردن مغز از نوراپی نفرین تأثیری بر پتانسیل‌های برانگیخته DG ناشی از تحریک PP ندارد (۱۲، ۱۳، ۱۸). نتایج آزمایش ۲ نشان داد که حتی پس از حذف ورودی‌های لوکوس سرولئوس به هیپوکمپ، سیناپس‌های ناحیه DG هنوز قادرند تا در پاسخ به تحریک تتانیک وارد شده به PP، تقویت شوند. ولی نتایج برخی پژوهش‌های قبلی متفاوت بوده است. گفته می‌شود تحریک LC سبب تسهیل تولید LTP در شکنج دندانه‌ای موش صحرائی بی‌هوش می‌شود (۱۰). همچنین گزارش شده که کاربرد NE در حیوانات بی‌هوش می‌تواند با تحریک کزاز زیرآستانه‌ای جمع شود و موجب القای LTP شود (۵). بعلاوه طبق مطالعه‌ای دیگر، تحریک LC باعث تقویت درازمدت پاسخ‌های



شکل ۵: یک نمونه از پتانسیل‌های میدانی ثبت شده به دنبال تزریق سالین (A) یا لیدوکائین (B) به لوکوس سرولئوس، پس از تحریک‌های تتانیک، بر حفظ تقویت طولانی مدت در ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ، ۵ تا ۱۲۰ دقیقه پس از این تحریک‌ها. خطوط پر نشان‌دهنده پاسخ قبل از تحریک‌های تتانیک و خطوط نقطه‌چین نشان‌دهنده پاسخ پس از کاربرد این تحریک‌ها می‌باشند.



شکل ۶: اثر غیرفعال سازی برگشت پذیر لوکوس سرولئوس بر بقای تقویت طولانی مدت ایجاد شده در پتانسیل عمل دسته جمعی سلولهای گرانولی شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ. منحنی‌ها بر حسب میانگین درصد تغییرات نسبت به ثبت پایه رسم شده‌اند. تحریک تتانیک در لحظه صفر اعمال شده است. سالین و لیدوکائین ۵ دقیقه بعد از تحریک‌های تتانیک (پیکان) تزریق شده‌اند.



شکل ۷: اثر حذف موقت لوکوس سرولئوس بر بقای تقویت طولانی مدت ایجاد شده در شیب پتانسیل تحریکی پس سیناپسی دسته جمعی

برانگیخته DG در پی تحریک مسیر پرفورانت می شود (۱۶). یافته این بخش مطابق نتایج بررسی برخی دیگر از پژوهشگران است که نشان داده اند به دنبال تهي کردن هیپوکمپ از NE و یا تخریب مسیر نورآدرنژیک پشتی هیچ گونه تغییری در LTP ایجاد شده با تحریک تتانیک، در حیوانات بی هوش (۱۹) و هشیار در حال حرکت (۲۰) مشاهده نمی شود. به علاوه Frizzel و همکاران بر این عقیده اند که NE برای ایجاد LTP در DG به صورت *in vivo* لازم نیست (۶). در توجیه این یافته می توان گفت که LTP و NELLP تشابه زیاد و مکانیسم های سیناپسی مشترکی برای القاء در DG دارند و به این ترتیب به صورت سینرژیک و به موازات هم عمل می کنند (۹ و ۲۷). بنابراین، دور از انتظار نیست که یک تحریک تتانیک قدرتمند مانند تحریک در این پژوهش، بتواند در غیاب LC، از راه ساز و کار مشترک ذکر شده و به تنهایی LTP را ایجاد کند. در تأیید این فرضیه، Frey و Straube توانسته اند در حضور مهارگر گیرنده β -آدرنژیک، با یک تحریک تتانیک قوی، LTP را در DG موش صحرائی هشیار در حال حرکت ایجاد کنند (۲۸). البته نباید به سادگی انتظار داشت که پس از حذف فعالیت طبیعی LC، با غیرفعال کردن آن، عکس نتایج حاصل از تحریک این هسته بدست آید. گفته می شود برخلاف تحریک شدید و حاد LC، حتی افزایش تونیک فعالیت این هسته اهمیت چندانی در القای افزایش درازمدت پاسخ سلول های DG در حیوانات بیدار ندارد (۱۲). به علاوه Harley و همکاران گزارش کرده اند که غلظت های تا ۳۰ برابر NE در DG قادر به تقویت سیناپس های این ناحیه است و حتی مقادیر ۳ تا ۶ برابر پایه بی تأثیر بوده است (۲۹). بخشی دیگر از نتایج آزمایش ۲ نشان داد که به دنبال غیرفعال کردن LC، پیش از تحریکات تتانیک، کاهش در LTP فقط در دقایق ۶۰ و ۱۲۰ پس از تحریک و تنها در دامنه پتانسیل عمل و بدون تغییر در شیب پتانسیل تحریکی پس سیناپسی مشاهده می شود. نتایج به دست آمده در این بخش از مطالعه کاملاً مطابق با یافته های برخی پژوهشگران است که

با تهي کردن هیپوکمپ از NE، هیچ گونه تفاوتی از نظر میزان LTP بین این حیوانات و گروه شاهد وجود ندارد، ولی کاهش آن در حیوانات تهي شده بسیار سریع تر است و سرانجام حذف می شود (۱۹، ۹ و ۲۰). ممکن است کارکرد طبیعی لوکوس سرولئوس، فعالیت نورون های DG را در پاسخ به تحریک PP افزایش دهد و یا آن که سلول های گرانولی شکنج دندانهای در حضور ورودی های دریافتی از LC در وضعیتی قرار گیرند که شکل پذیری سیناپسی فزاینده و پایداری در آنها بوجود آید. با توجه به حداکثر زمان اثر لیدوکائین به مدت ۶۰ دقیقه (۲۶)، کاهش تقویت سیناپسی هنگامی صورت گرفته که فعالیت LC به حالت طبیعی بازگشته است. بنابراین، احتمالاً در حضور اثر مهاري لیدوکائین، حوادثی در هیپوکمپ رخ داده است که نتیجه آن کاهش تحریک پذیری سلول های گرانولی با گذشت زمان بوده است و این فرایند خود موجب فروافت سریع دامنه PS در گروه لیدوکائین شده است. ساز و کارهای پیشنهادی که توسط NE در سیناپس های هیپوکمپ به کار گرفته می شوند (از جمله دپلاریزاسیون متوسط و طولانی مدت از طریق گیرنده β و همچنین عمل رفع مهار NE بر نورون های پس سیناپسی) (۶ و ۳۰) می توانند ما را در توجیه این یافته ها یاری کنند. نکته دیگر آن است که کاهش LTP در این مطالعه تنها در دامنه PS دیده شد و شیب PEPSP به دنبال تقویت ابتدایی دچار هیچ تغییری نشده است. این یافته با نتایج برخی پژوهش ها مبنی بر تغییر نکردن دامنه PS و شیب PEPSP به همراه یکدیگر و پس از دستکاری سیستم نورآدرنژیک منطبق است. گزارش شده که پس از القای LTP با تحریک LC، آیونتوفورز NE در شکنج دندانهای و یا با کاربرد NE و آگونیست های β -آدرنژیک در حمام بافتی حاوی برش های هیپوکمپ، LTP تنها در دامنه پتانسیل عمل ایجاد می شود (۹، ۳۰ و ۳۱). همچنین Robinson و Racine مشاهده کرده اند که با تهي کردن DG از نوراپی نفرین، کاهش زود هنگام LTP تنها در دامنه PS ایجاد می شود (۲۰). این احتمال وجود دارد که NE در

در خاتمه و با توجه به یافته‌های بررسی اخیر به نظر می‌رسد که فعالیت طبیعی لوکوس سرولوئوس که در پی غیرفعال‌سازی آن حذف می‌شود بر فعالیت پایه سیناپس‌های مسیر پرفورانت با شکنج دندان‌های بی‌تأثیری است. به علاوه ورودی‌های نورآدرنژیک LC به هیپوکمپ برای القای LTP در این سیناپس‌ها ضروری نیستند و تنها از کاهش زودهنگام آن جلوگیری می‌کنند. با توجه به این که غیرفعال‌سازی LC، پس از ایجاد LTP نیز تأثیری بر بقای آن ندارد، بنظر می‌رسد که ورودی‌های نورونی LC به هیپوکمپ احتمالاً تنظیم‌کننده حوادثی باشند که هنگام کاربرد تحریک تتانیک رخ می‌دهند و به این ترتیب، تنها شرایطی را فراهم می‌کنند تا LTP القاشده به مدت طولانی پس از ایجاد، حفظ شود.

تشکر و قدردانی: از همکاری صمیمانه دکتر وحید شیبانی و دکتر حسین استکی در کمک به انجام آزمایش‌های الکتروفیزیولوژی و نیز دکتر ژیلای بهزادی و دکتر فرزانه گنجی برای مساعدت در انجام آزمایش‌های بافت‌شناسی سپاسگزاریم.

ناحیه DG بیشتر بر جنبه‌های پس سیناپسی شکل‌پذیری تأثیر داشته باشد. در تأیید این نظریه گفته شده، NE عمدتاً باعث افزایش پاسخدهی سلول به ورودی‌های سیناپسی می‌شود (۱۵). همچنین با توجه به این یافته که NE مزدوج شدن PEPSP و تولید پتانسیل عمل را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به این ترتیب تعداد بیشتری از سلول‌ها را به آستانه تحریک می‌رساند (۳۰)، احتمالاً حذف LC علاوه بر کاهش زودهنگام تحریک‌پذیری، هماهنگی میان PEPSP و تولید پتانسیل عمل را برهم زده و در نتیجه سبب کاهش پاسخدهی سلول‌های گرانولی به ورودی‌های سیناپسی می‌شود. نتایج آزمایش ۳ نشان داد که غیرفعال‌سازی LC پس از کاربرد تحریک‌های با فرکانس بالا بر فیبرهای PP، تأثیری بر LTP ایجاد شده در ناحیه DG نداشته است. این یافته بیانگر آن است که ظاهراً نورون‌های نورآدرنژیک LC نقش احتمالی خود را در تنظیم و تعدیل LTP تنها هنگام کاربرد تحریک تتانیک ایفا می‌کنند. بنابراین، به نظر می‌رسد فعالیت نورونی این هسته پس از القای LTP، برای حفظ و بقای آن ضروری نباشد.

منابع

1. Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna R. The Locus Coeruleus, A5 and A7 Noradrenergic Cell Group. In: Paxinos G. The Rat Nervous System. New York; Academic Press, 1995: 183-213.
2. Amaral DG, Witter MP. Hippocampal Formation. In: Paxinos G. The Rat Nervous System. New York; Academic Press, 1995: 443-493.
3. Clayton EC, Williams CL. Posttraining Inactivation of Excitatory Afferent Input to the Locus Coeruleus Impairs Retention in an Inhibitory Avoidance Learning Task. *Neurobiol Learn Mem* 2000; 73: 127-140.
4. Patton PE, Mc Naughton B. Connection Matrix of the Hippocampal Formation: I. The Dentate Gyrus. *Hippocampus* 1995; 5: 245-286.
5. Harley CW, Milway JS, Lacaille J-C. Locus Coeruleus Potentiation of Dentate Gyrus Responses: Evidence for two Systems. *Brain Res Bull* 1989; 22: 643-650.
6. Frizzel LM, Harley CW. The N-methyl-D-Aspartate Channel Blocker Ketamine Does not Attenuate, but Enhances, Locus Coeruleus-Induced Potentiation in Rat Dentate Gyrus. *Brain Res* 1994; 663: 173-180.
7. Sarihi A, Fathollahi Y, Motamedi F, et al. Effects of Lidocaine Reversible Inactivation of the Median Raphe Nucleus on Long-Term Potentiation and Recurrent Inhibition in the Dentate Gyrus of Rat Hippocampus. *Brain Res* 2003; 962: 159-168.
8. Straube T, Korz V, Balscham D, Frey JU. Requirement of Beta-Adrenergic Receptor Activation and Protein Synthesis for LTP - Reinforcement by Novelty in Rat Dentate Gyrus. *J Physiol* 2003; 552: 953-960.
9. Harley CW. Noradrenergic and Locus Coeruleus Modulation of the Perforant Path- Evoked Potential in Rat Dentate Gyrus Supports a Role for the Locus Coeruleus in Attentional and Memorial Processes. *Prog Brain Res* 1991; 88: 307-321.

10. Walling SG, Harley CW. Locus Coeruleus Activation Initiates Delayed Synaptic Potentiation of Perforant Path Input to the Dentate Gyrus in Awake Rats: Novel Beta-adrenergic and Protein Synthesis-dependent Mammalian Plasticity Mechanism. *J Neurosci* 2004; 24: 598-604.
11. Segal M, Bloom FE. The Action of Norepinephrine in the Rat Hippocampus. IV. The Effects of Locus Coeruleus Stimulation on Evoked Hippocampal Unit Activity. *Brain Res* 1976; 107: 513-525.
12. Klukowski G, Harley CW. Locus Coeruleus Activation Induces Perforant Path- Evoked Population Spike Potentiation in the Dentate Gyrus of Awake Rat. *Exp Brain Res* 1994; 102 : 165-170.
13. Markevich VA, Zosimovski VA, Korshunov VA, et al. Identification of a Latent State Arising in the Hippocampus Following the Cessation of Long-Term Potentiation. *Neurosci Behav Physiol* 1994; 24: 394- 399.
14. Katsuki H, Izumi Y, zorumski CF. Noradrenergic Regulation of Synaptic Plasticity in the Hippocampal CA1 Region. *J Neurophysiol* 1997; 77 : 3013- 3020.
15. Lacaille JC, Harley CW. The Action of Norepinephrine in the Dentate Gyrus: Beta-Mediated Facilitation of Evoked Potentials In Vitro. *Brain Res* 1985; 358 : 210- 220.
16. Brown RAM, Harley CW. Synaptic Release of Norepinephrine by Unilateral Stimulation of Locus Coeruleus Increases Preforant Path Evoked Potentials Bilaterally. *Soc Neurosci Abstr* 1999; 25: 1210.
17. Chaulk PC, Harley CW. Intracerebroventricular Norepinephrine Potentiation of the Perforant Path - Evoked Potential in Dentate Gyrus of Anesthetized and Awake Rats: a Role for Both α - and β -Adrenoceptor Activation. *Brain Res* 1998; 787: 59-70.
18. Ezrokhi VL, Zosimovski VA, Kurshunov VA, Markevich VA. Restoration of Decaying Long-term Potentiation in the Hippocampal Formation by Stimulation of Neuromodulatory Nuclei in Freely Moving Rats. *Neuroscience* 1999; 88 :741-753.
19. Bliss TVP, Goddard GV, Riives M. Reduction of Long- Term Potentiation in the Dentate Gyrus of the Rat Following Selective Depletion of Monoamines. *J Physiol* 1983; 334 :475-491.
20. Robinson GB, Racine RJ. Long-Term Potentiation in the Dentate Gyrus: Effects of Noradrenaline Depletion in the Awake Rat. *Brain Res* 1985; 325 : 71-78.
21. Harley CW, Milway JS. Glutamate Injection in the Locus Coeruleus Enhances the Perforant Path-Evoked Population Spike in the Dentate Gyrus. *Exp Brain Res* 1986; 63 : 143-150.
22. Eyre MD, Richter - Levin G, Avital A, Stewart MG. Morphological Changes in Hippocampal Dentate Gyrus Synapses Following Spatial Learning in Rats are Transient. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 1973-1980.
23. Roberts M, Shapiro M. NMDA Receptor Antagonists Impair Memory for Nonspatial Socially Transmitted Food Preference. *Behav Neurosci* 2002; 116 : 1059-1069.
24. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York; Academic Press, 1986 .
25. Poyraz D, Brau ME, Wotka F, et al. Lidocaine and Octanol have Different Modes of Action at Tetrodotoxin-resistant Na(+) Channels of Peripheral Nerves. *Anesth Analog* 2003; 97: 1317-1324.
26. Martin JH. Autoradiographic Estimation of the Extent of Reversible Inactivation Produced by Microinjection of Lidocaine and Muscimol in the Rat. *Neurosci Lett* 1991; 127 : 160-164.
27. Munro CA, Walling SG, Evans JH, Harley CW. Beta- adrenergic Blockade in the Dentate Gyrus in Vivo Prevents High Frequency – Induced Long-Term Potentiation of EPSP Slope, but not Long-Term Potentiation of Population Spike Amplitude. *Hippocampus* 2001; 11: 322-328.
28. Straube T, Frey JU. Involvement of Beta-Adrenergic Receptors in Protein Synthesis Dependent Late Long-term Potentiation (LTP) in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats: the Critical Role of the LTP Induction Strength. *Neuroscience* 2003; 119: 473-479.
29. Harley CW, Lales M.D, Nutt DJ. Estimating the Synaptic Concentration of Norepinephrine in Dentate Gyrus Which Produces β - Receptor Mediated Long-Lasting Potentiation in Vivo Using Microdialysis and Intracerebroventricular Norepinephrine. *Brain Res* 1996; 710 : 293-298.
30. Sara SJ, Bergis O. Enhancement of Excitability and Inhibitory Processes in Hippocampal Dentate Gyrus by Noradrenaline: a Pharmacological Study in Awake, Freely Moving Rats. *Neurosci Lett* 1991; 126 : 1-5.
31. Babstock DM, Harley CW. Paragigantocellularis Stimulation Induces Beta- Adrenergic Hippocampal Potentiation. *Brain Res Bull* 1992; 28 : 709-714.

The Effect of Reversible Inactivation of Locus Coeruleus on Long-term Potentiation in the Dentate Ggyrus of Rat Hippocampus

Khakpour B. Ph.D, Motamedi F. Ph.D

Abstract

Introduction: The nucleus locus coeruleus (LC) is located next to the fourth ventricle of the brain . Behavioral and electrophysiological studies have revealed the importance of LC noradrenergic projections in processes such as attention, learning and memory. Long-term potentiation (LTP) in hippocampal neurons is believed to be neural basis of learning and memory. The effects of LC on hippocampal electrophysiology have been investigated since many years ago, but have had different and conflicted results.

Objective: In this study the effect of reversible inactivation of LC on induction and maintenance of LTP in hippocampal dentate gyrus (DG) of male anesthetized rats was investigated.

Materials and Methods: This is an expelmental study. Inactivation of LC was conducted through bilateral injection of 0.5 μ l lidocaine (4%). For producing LTP, two high frequency stimulations (HFS), 5 minutes apart were given to perforant pathway (PP) neurons. The amplitude of population spikes (PS) and the slope of population excitatory post synaptic potentials (PEPSP) were recorded before and 5, 10, 20, 40, 60 and 120 minutes after tetanic stimulations in DG .

Results: The findings of this study showed that inactivation of LC had no effect on DG granule cells baseline activity. Also, LC inactivation 5 minutes before HFS had no effect on LTP induction. However, PS amplitude was decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$ respectively) in comparison with control group, 60 and 120 minutes after tetanization. Lidocaine injection after HFS had no effect on induced LTP.

Conclusion: According to results, we can conclude that, LC inactivation has no effect on LTP production in DG area, but probably LC neurons regulate part of events that occurs during tetanic stimulations in granular cells and are necessary for maintenance of LTP in PS amplitude.

Key words: Hippocampus/ Lidocaine/ Locus Seruleus/ Long-term potentiation/ Mice