[Article in Persian] Physiology and Pharmacology Vol. 10, Fall 2006, 191-200

The modulatory effects of orexin B on the calcium channels activity in neuronal cells of *Helix aspersa* (garden snail)

Ali Rastqar[1,2], Mahyar Janahmadi[1*], Yaghub Fathollahi[2]

[1]Neuroscience Research Center and Dept. Physiology, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti Medical Science University. Tehran, Iran. PO. Box 19835-181. [2]Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: The functional effects of orexin-B on the calcium spikes and excitability of the neuronal soma membrane of garden snail, *Helix aspersa* were studied.

Methods: Conventional intracellular recording, under the current clamp conditions was performed to examine the effects of orexin-B on the configuration and electrophysiological properties of calcium spikes.

Results: Application of orexin-B (300 nM) led to a membrane depolarization and thereby the increase in excitability of neurons. It also decreased the duration and the amplitude of calcium spikes. On the other hand, orexin-B had a dual effect on the amplitude of after-hyper polarization (AHP) in a time dependent manner. The maximum reduction of the amplitude of AHP was recorded within 10 min of orexin-B exposure. However a maximum increase in AHP amplitude was observed later (15 min after exposure to orexin-B). Inactivation of G-proteins by pertussis toxin (100 nM) was used to test the involvement of G_i/G_o in the orexin-B induced modulation of calcium channels. Pre-incubation of ganglia for 3-6 h with PTX blocked the depolarization effect of orexin-B on the resting membrane potential. Orexin-B on pretreated neuronal cells with PTX did not statistically change the calcium spike parameters, unless the peak amplitude of AHP increased remarkably.

Conclusion: In conclusion, these data suggest that orexin-B (300 nM) may affect the membrane excitability and modulates the activity of calcium and calcium activated potassium channels in snail neurons.

Keywords: Orexin-B, Pertussis toxin, Calcium spike, Neuronal excitability, Snail, Electrophysiology.

* Corresponding Author Email: mjanahmadi@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۵

اثرات تعدیلی اورکسین–B بر فعالیت کانال‌های کلسیمی در نورون‌های حلزون باغی (HELIX ASPERSA)

علی راستگار فرج زاده[۱و۲]، مهیار جان احمدی[۱*]، یعقوب فتح اللهی[۲]
۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی
۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

دریافت: مهر ۸۵ بازبینی: آبان ۸۵ پذیرش: آذر ۸۵

چکیده

مقدمه: اثرات عملکردی اورکسین بر روی اسپایک‌های کلسیمی، تحریک پذیری غشای جسم سلولی نورون‌های حلزون باغی گونه *Helix aspersa* مورد بررسی قرار گرفتند.

روش‌ها: ثبت داخل سلولی تحت شرایط کلمپ جریان به منظور بررسی اثرات اورکسین–B بر شکل موج و خصوصیات الکتروفیزیولوزیک اسپایک کلسیمی انجام شد.

نتایج: کاربرد اورکسین–B (۳۰۰ نانو مول) موجب دپلاریزاسیون غشا و از این طریق افزایش تحریک پذیری سلول‌های عصبی گردید. همچنین موجب کاهش دامنه و طول مدت اسپایک‌های کلسیمی شد. ازطرفی، اورکسین–B اثر دوگانه‌ای بر دامنه پتانسیل هیپرپلاریزاسیون متعاقب (AHP) به صورت وابسته به زمان داشت. حداکثر کاهش دامنه AHP، ۱۰ دقیقه پس از پرفیوژن محلول رینگر کلسیمی محتوی اورکسین–B (۳۰۰ نانومول) مشاهده شد ($p<0.05$) و حداکثر افزایش دامنه AHP ($p<0.001$) پانزده دقیقه بعد ثبت شد. غیر فعال نمودن پروتئین‌های G توسط سم سیاه سرفه (Pertussis Toxin, 100nM) به منظور بررسی دخالت G_i/G_o در تعدیل فعالیت کانال‌های کلسیمی توسط گیرنده‌های حساس به اورکسین–B انجام شد. انکوباسیون گانگلیون‌ها به مدت ۳ تا ۶ ساعت توسط سم سیاه سرفه، باعث مهار وقوع دپلاریزاسیون غشا پس از پرفیوژن محیط خارج سلولی توسط محلول رینگر کلسیمی محتوی اورکسین–B شد. هم چنین اورکسین–B بر سلول‌های عصبی که در معرض سم سیاه سرفه قرار گرفته بودند، نتوانست تاثیر معنی داری بر پارامترهای اسپایک کلسیمی ایجاد کند به جز این که دامنه AHP تحت این شرایط به طور معنی داری ($p<0.001$) افزایش یافت.

نتیجه گیری: این داده‌ها نشان می‌دهند که اورکسین–B احتمالاً بر تحریک پذیری غشا سلول‌های عصبی حلزون اثر می‌گذارد و در تعدیل فعالیت کانال‌های کلسیمی و نیز کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم نقش دارد.

واژه‌ها ی کلیدی: اورکسین–B، سم سیاه سرفه، اسپایک کلسیمی، تحریک پذیری نورونی، حلزون، الکتروفیزیولوژیح

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:
mjanahmadi@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

دو نوروپپتید جدید موسوم به اورکسین A و B (که به ترتیب هیپوکرتین ۱ و ۲ نامیده می‌شوند)، اخیراً شناسائی شده‌اند. [۲۷،۹]

اورکسین به عنوان آگونیست دو گیرنده وابسته به پروتیین G موسوم به گیرنده‌های OX1 و OX2 عمل می‌کند. تزریق مرکزی اورکسین موجب افزایش بیداری و کاهش خواب می‌گردد و از بین رفتن پیام رسانی اورکسینرژیک موجب اختلالات نارکولپسی خواب در پستانداران می‌شود.[۳۲،۲۱،۹،۵]

سایر نقشهای فیزیولوژیک اورکسین شامل تنظیم هومئوستاز و نیز انرژی و پاسخ به استرس، احتمالاً از طریق مکانیسم‌های مرکزی و محیطی است[۵،۱۹،۲۱،۲۹،۳۷] همچنین در سیستم اعصاب مرکزی، اورکسین موجب افزایش فعالیت سیناپسی[۵،۲۱] و همچنین دپلاریزاسیون و یا هیپر پلاریزاسیون غشا سلول می‌گردد[۱۴]

بررسی‌های متعددی نشان داده است که سریعترین پاسخ سلولی به فعالیت گیرنده‌های اورکسین در سیستم‌های مختلف، ورود یون کلسیم است.[۱۶،۲۱،۲۵،۳۴،۳۵،۳۶] القا ورود کلسیم توسط تحریک گیرنده‌های اورکسین احتمالاً از طریق کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ فعال شده توسط پروتئین کیناز C صورت.[۳۸،۳۵،۳۴] یون کلسیم نقش مهمی در ایجاد دپلاریزاسیون غشا، فعال نمودن آنزیم‌ها و برخی از کانال‌های یونی، انقباض عضلانی، ترشح نوروترانسمیترها و هورمون ها، مزدوج نمودن تحریک- انقباض، بیان ژن و مرگ سلولی ایفاء می‌کند.

بدون شک، تغییر میزان جریان رو به داخل کلسیمی و رو به خارج پتاسیمی توسط سیستم‌های نوروترانسمیتری و یا نوروپپتیدی می‌تواند اثرات قابل توجهی بر عملکرد سلول‌های تحریک پذیر از جمله سلول‌های عصبی بگذارد.

اگرچه، حضور نوروپپتیدهای اورکسین درمهره داران پست همچون ماهیها گزارش شده است و اعتقاد بر این است که قدمت ژن کد کننده پروتیینهای مذکوربه ۶۵۰ میلیون سال پیش برمیگردد.[۲] ، لاکن هیچ اطلاعاتی در خصوص حضور و عملکرد سیستم اورکسینرژیک در بی مهرگان درددست نمی‌باشد.

در بررسی حاضر، اثرات نوروپپتید اورکسین بر اسپایک‌های کلسیمی در نورون‌های حلزون گونه Helix aspersa مورد استفاده قرار گرفته است و وجود گیرنده‌های حساس به اورکسین در سیستم اعصاب مرکزی بی مهرگان برای اولین بار نشان داده شده است واین نتایج حضور احتمالی سیستم اورکسینرژیک را نشان می‌دهد و بیانگر تداوم عملکرد این سیستم طی تکامل است. اهمیت فیزیولوژیک تغییر و تعدیل فعالیت الکتریکی نورون‌های بی مهرگان توسط اورکسین نیاز به تحقیق بیشتر به ویژه بر روی رفتار حیوان در شرایط in vivo دارد.

مواد وروشها

آماده‌سازی گانگلیون

آزمایشها بر روی نورون‌های مجموعه عقده‌ای تحت مری (Subesophageal) حلزون خاکزی (Helix aspersa) انجام گرفت. با ایجاد شکافی طولی در ناحیه گردن جانور حلقه عقده‌ای دور مری به‌همراه عروق و اعصاب محیطی از بدن خارج شده و به کمک اعصاب عمده وآئورت بطور کشیده در محفظه ثبت با بستر سیلگارد و حاوی رینگر نرمال حلزون تثبیت گردید. لایه‌های بافت پیوندی احاطه کننده گانگلیون‌های تحت مری در بخش پشتی آن که دارای اعصاب کمتری است بطور مکانیکی و بوسیله انبرک‌های بسیار ظریف برداشته شدند. در هر آماده‌سازی جداشده از حلزون تنها یک نورون مورد مطالعه قرار می‌گرفت.

محلولها و داروها

محلول رینگر کلسیمی حلزون (به میلی مولار) شامل: , TEA(80) MgSO4(5) , KCl (4) ,CaCl2 (10) ,Glucose (10) وHEPES (10) بود وpH آن در حد ۷/۶-

Archive of SID

www.SID.ir

۷/۴ تنظیم شد. غلظت 4AP تهیه شده ۵ میلی مول بود. حضور Tetraethylammonium (TEA) و 4-aminopyridine (4-AP) در محیط خارج سلولی باعث مهار جریانات پتاسیمی رو به خارج وابسته به ولتاژ می‌گردد. همچنین اورکسین B با غلظت ۳۰۰ نانومول پس از ثبت کنترل، با رینگر کلسیمی پرفیوز می‌شد. برای بلوک پروتئین‌های G مهاری از سم سیاه سرفه (PTX) با غلظت ۱۰۰ نانومول استفاده می‌شد. اورکسین B و سم سیاه سرفه در رینگر بدون HEPES و Glucose به صورت استوک تهیه می‌شدند. سپس هنگام استفاده، HEPES و Glucose با نسبت‌های ذکر شده به استوک اضافه می‌گردید. اورکسین B و سم سیاه سرفه از شرکت سیگما (آمریکا) و سایر مواد فوق از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردیده بود.

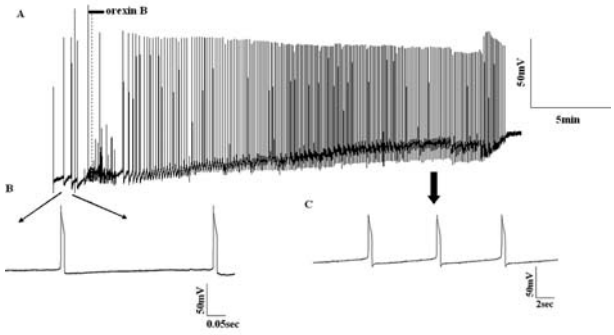
ثبت الکتروفیزیولوژی

جهت ثبت از الکترودهای بروسیلیکات که با محلول ۳ KCl مولار پر شده و مقاومت ۵-۲ MΩ داشتند استفاده می‌شد. با استفاده از یک آمپلی فایر Axoclamp 2B (آمریکا، Axon Instruments) پتانسیل عمل‌های خودبخودی و برانگیخته، پس از ۵ دقیقه ثبت پایه، در شرایط کنترل و متعاقب تیمار با اورکسین با روش current clamp ثبت گردید. در این روش، جریان‌های ۱ الی ۵ نانو آمپر به صورت منفی و سپس مثبت به داخل سلول تزریق می‌شد. مدت زمان تزریق هر جریان، ۵۰۰ میلی ثانیه و فاصله تزریق مابین جریان ها، ۳ ثانیه بود. داده‌های ثبت شده، توسط مبدل آنالوگ-دیجیتال رقمی شده و جهت آنالیز ذخیره گردید. پارامترهای کمی پتاسیل عمل‌های ثبت شده شامل مدت اسپایک، دامنه اسپایک و دامنه AHP با کمک نرم افزارchart اندازه‌گیری شد. دامنه پتانسیل عمل کلسیمی از پتانسیل استراحت تا قله اسپایک و مدت آن در میانه دامنه (AD50)، بین بخشهای بالا رو و پائین رو اسپایک محاسبه گردید و دامنه AHP از قله AHP تا پتانسیل استراحت اندازه‌گیری شد. مقادیر کمی بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده و آزمون مقایسه میانگین‌ها با روش ANOVA یک-طرفه انجام گردید. همچنین برای مقایسه کمیت‌های اندازه‌گیری شده بین دو گروه در شرایط کنترل، از روش Paired t-test استفاده شد. اختلاف‌های با $P<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

جریان رو به داخل کلسیمی در طی پتانسیل عمل، عامل اساسی در دپلاریزاسیون اسپایک، ایجاد پتانسیل هیپرپلاریزاسیون متعاقب (AHP) و تطابق فرکانس فعالیت بسیاری از سلول‌های عصبی است. بنابراین تغییر جریان رو به داخل کلسیمی در طی پتانسیل عمل تحت شرایط خاص بعنوان مثال در حضور نوروترانسمیترها و یا نوروپپتید ها، می‌تواند منجر به تغییر تحریک پذیری سلول‌های عصبی شود. به منظور آزمون این فرضیه که آیا نوروپپتید جدید اورکسین می‌تواند با تغییر عملکرد کانالهای کلسیمی بر ویژگیهای رفتارالکتریکی سلولهای عصبی حلزون تاثیر بگذارد، اثر اورکسین-B بر خصوصیات کمی و الگوی شلیک اسپایک‌های کلسیمی ثبت شده در رینگر کلسیمی مورد بررسی قرار گرفت. در این رینگر، جریان‌های رو به داخل سدیمی و رو به خارج پتاسیمی از طریق کانال‌های وابسته به ولتاژ مهار گردید. به منظور مهار این دسته از کانال ها، یون‌های سدیمی خارج سلولی توسط TEA جایگزین گردید و جریان پتاسیمی رو به خارج توسط 4-AP مهار شد. TEA نه تنها به این طریق باعث مهار کانال‌های سدیمی می‌گردد، بلکه مهار کننده قوی و شناخته شده‌ای برای کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ تاخیری نیز می‌باشد. افزودن 4-AP به محیط خارج سلولی سبب مهار دسته دیگری از کانال‌های پتاسیمی موسوم به سریع یا A می‌گردد. به این ترتیب تحت این شرایط، تنها یونی که وارد سلول می‌شود، یون کلسیم است و افزایش یون کلسیم به نوبه خود می‌تواند باعث فعالیت کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم شود که گروهی از آنها به 4-AP و یا TEA حساس نیستند.

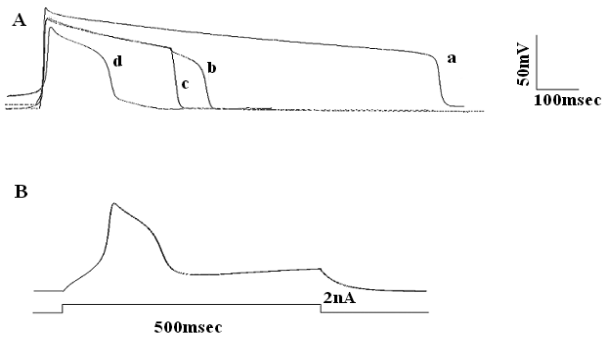
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- تاثیر اورکسین-B (۳۰۰ نانومول) بر الگوی شلیک اسپایکهای خودبخودی کلسیمی(A) اسپایکهای کلسیمی ثبت شده در رینگر کلسیمی قبل(B) و بعد (C) از افزودن اورکسین-B.اورکسین-B موجب دپلاریزاسیون پتانسیل غشا و افزایش فرکانس شلیک پتانسیل عمل کلسیمی خودبخودی گردید.

مهار قسمت اعظم کانال‌های پتاسیمی رو به خارج به این شکل، باعث ایجاد اسپایک کلسیمی با طول مدت (Duration) طولانی می‌گردد (شکل A ۱).

در رینگر کلسیمی محتوی مهار کننده‌های کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ(TEA و 4-AP به ترتیب با غلظت‌های ۸۰ و ۵ میلی مول، جایگزین یونهای سدیمی خارج سلولی گردیده بود) نورونها دارای پتانسیل استراحت(۷/۲±۴۷/۶- میلی ولت) و فعالیت خودبخودی به شکل اسپایکهای کلسیمی با طول مدت طولانی بودند (شکل۱ و ۲a). اسپایکهای کلسیمی دارای طول مدتی حدود ۸۰ ± ۷۸۴/۲۵ میلی ثانیه و دامنه‌ای برابر ۲/۵۷+-۸۳/۵ میلی ولت و دامنه AHP برابر ۴۷/ ± ۵/۱۲۵- میلی ولت بودند (n = ۵). کاربرد اورکسین B (۳۰۰ نانو مولار) دامنه اسپایک کلسیمی را به صورت وابسته به زمان به طور معنی داری به ترتیب ۱۰ و ۱۵ دقیقه پس از پروفیوژن کاهش داد (p<۰/۰۵ و p<۰/۰۱، شکل‌های A ۶ و c- a ۲). همچنین طول مدت پتانسیل عمل کلسیمی تحت تاثیر اورکسین به طور معنی داری کاهش یافت به طوریکه حداکثر کاهش ۱۰ و ۱۵ دقیقه پس از پرفیوژن مشاهده گردید (p <۰/۰۱، شکل B ۶). در حالی که اورکسین دارای اثر دوگانه‌ای بر دامنه AHP بود به طوریکه به طور وابسته به زمان ابتدا باعث کاهش معنی دار(۱۰ دقیقه پس از افزودن اورکسین-B، p<۰/۰۵) و سپس افزایش (۱۵ دقیقه پس

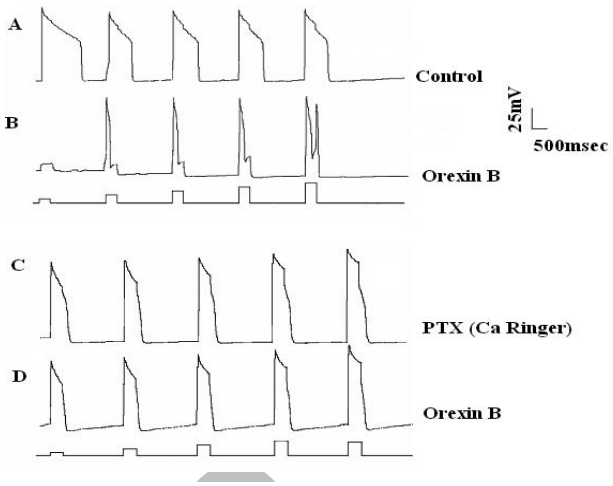


شکل۲- تاثیر اورکسین-B بر روی اسپایکهای کلسیمی. A ـ اسپایکهای کلسیمی خودبخودی ثبت شده در شرایط کنترل (a)، ۱۰ دقیقه (b) و ۱۵ دقیقه (c) پس از افزودن اورکسین-B. انکوباسیون گانگلیون در محلول رینگر کلسیمی محتوی سم سیاه سرفه(PTX) موجب کاهش طول مدت و دامنه اسپایک کلسیمی نسبت به شرایط کنترل گردید(d). B ـ دو اسپایک کلسیمی برانگیخته توسط تزریق جریان دپلاریزه کننده(بمدت ۵۰۰ میلی ثانیه) قبل (پس از انکوباسیون گانگلیون در محلول رینگر کلسیمی محتوی) و بعد از افزودن اورکسین-B روی هم قرار داده شده است. تفاوت قابل توجهی از خصوصیات اسپایک کلسیمی ثبت شده تحت این شرایط دیده نمی شود.

از پرفیوژن رینگر کلسیمی محتوی اورکسین-B، (p <۰/۰۰۱ در دامنه AHP گردید (شکل ۶C). افزودن اورکسین-B موجب دپلازیراسیون پتانسیل غشا سلولهای عصبی حلزون در اکثر موارد و نیز افزایش تحریک پذیری گردید (شکل A ۱).

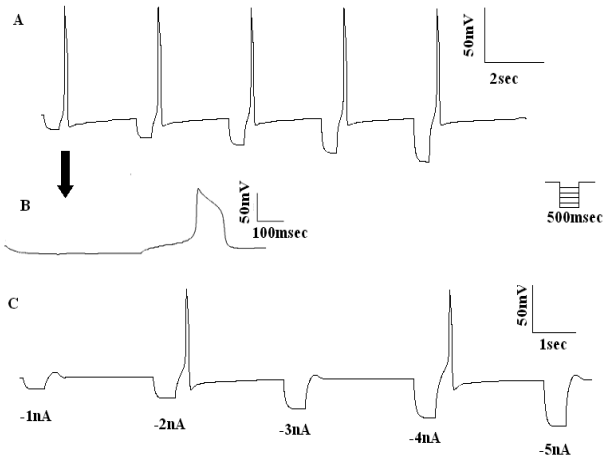
در نورونهایی که از نظر الکتریکی دارای یا فاقد فعالیت خودبخودی بودند، تزریق جریانهای دپلازیره کننده(۵ ــ ۱ نانوآمپر به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه) باعث برانگیختن اسپایکهای کلسیمی گردید (شکل ۳A). کاربرد اورکسین-B موجب کاهش طول مدت اسپایکهای کلسیمی برانگیخته و نیز تسریع مرحله رپلازیراسیون پتانسیل عمل کلسیمی گردید به طوریکه با تزریق جریان دپلاریزان ۵ نانو آمپری، تعداد اسپایکهای کلسیمی برانگیخته افزایش یافت (شکل B ۳). تزریق جریانهای هیپرپلاریزه کننده (۵ ـ ۱ نانوآمپر به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه) موجب بروز اسپایکهای کلسیمی یاrebound spike پس از خاتمه جریان هیپرپلاریزه کننده گردید (B ـ A ۴). در حضور اورکسین-B نیز اغلب سلولهای عصبی حلزون دارای فعالیت rebound بودند (c ۴).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳- تاثیر اورکسین-B بر اسپایک های کلسیمی برانگیخته. تزریق جریانهای دپلاریزه کننده(۱ تا ۵ نانوآمپر به مدت ۵۰۰ میلی ثانیه) موجب شلیک پتانسیل عمل کلسیمی با دامنه طولانی و کفه گردید(A). افزودن اورکسین-B (۳۰۰ نانومول) موجب شلیک پتانسیلهای عمل برانگیخته با طول مدت کوتاه تر و در موارد تزریق جریانهای دپلاریزه کننده قویتر(۵ نانوآمپر) تعداد اسپاکهای کلسیمی برانگیخته افزایش یافت(B). انکوباسیون گانگلیون با محلول رینگر محتوی PTX موجب حذف پتانسیل های عمل کلسیمی برانگیخته نگردید. لکن تا حدودی دامنه و طول مدت پتانسیل عمل برانگیخته کوتاهتر شد(C). افزودن اورکسنین-B، تاثیر چندانی در شکل موج پتانسیل عمل کلسیمی برانگیخته ثبت شده پس از انکوباسیون با PTX نگردید(C).

بمنظور بررسی دخالت احتمالی پروتیین G مهاری، گانگلیون‌های حلزون بمدت ۶ ـ ۳ ساعت در درجه حرارت اتاق در محلول رینگر کلسیمی محتوی سم سیاه سرفه (۱۰۰ نانومول) انکوبه شدند. پس از انکوباسیون ثبت از سلولهای عصبی حلزون در محلول رینگر کلسیمی صورت گرفت. در این شرایط سلولهای عصبی، هم چنان فعالیت خودبخودی (شکل ۵) و برانگیخته (شکل ۳) نشان می‌دادند لکن طول مدت و دامنه پتانسیل عمل نسبت به گروه کنترل (قبل از انکوباسیون) کمتربود (شکلA-D ۲ و B ۲). پرفیوژن محیط خارج سلولی توسط محلول رینگر کلسیمی محتوی اورکسین-B در شرایطی که سلولها به مدت ۶ ــ ۳ ساعت در محلول محتویPTX انکوبه شده بودند موجب عدم بروز قابل توجه دپلازیراسیون پتانسیل غشا و نیز وقوع فعالیت خودبخودی سلولها گردید در



شکل۴- شلیک اسپایک کلسیمی rebound. تزریق جریان های هیپرپلاریزه کننده(۱تا۵ نانوآمپر بمدت ۵۰۰) موجب شلیک اسپایک کلسیمی rebound در شرایط کنترل (رینگر کلسیمی) گردید(A و B). افزودن اورکسین-B به رینگر کلسیمی همچنان با تزریق جریانهای هیپرپلاریزه کننده اسپایک های کلسیمی ظاهر می گردند(C).

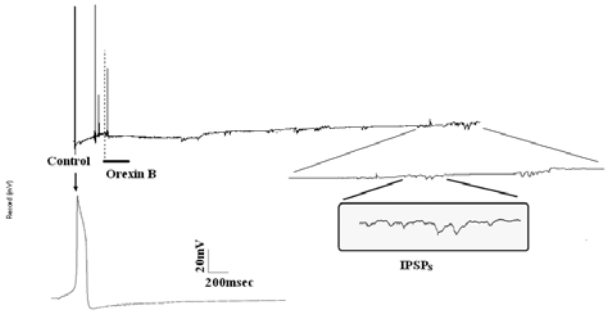
حالیکه پتانسیلهای پس سیناپسی مهاری (IPSPs) قابل ثبت بودند (شکل ۵).

سلولهای عصبی انکوبه شده باPTX پس ازاینکه در معرض اورکسین- B قرار گرفتند اسپایکهای کلسیمی با دامنه(شکل A ۶) و طول مدت (شکل B ۶) کمتری نشان میدادند. در حالیکه اثر اورکسین-B در این شرایط بر دامنه AHP اثری افزایشی وابسته به زمان معنی داربود(شکل C ۶، $p<0/001$).

بحث

بررسی حاضر به منظور مطالعه اثرات عملکرد اورکسین-B بر پتانسیل‌های عمل کلسیمی ثبت شده از نورون‌های حلزون در رینگر کلسیمی تحت شرایط current clamp صورت گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که اورکسین-B مدت اسپایک‌های کلسیمی را کاهش داده و دامنه AHP را ابتدا کاهش و سپس افزایش می‌دهد. از طرفی در اکثر موارد اورکسین-B موجب افزایش تحریک پذیری سلول‌های عصبی حلزون شد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵- ثبت فعالیت الکتریکی خودبخودی نورون حلزون باغی قبل و بعد از انکوباسیون در محلول رینگر محتوی PTX. پس از انکوباسیون شلیک خودبخودی اسپایک کلسیمی خودبخودی متوقف و پتانسیلهای سیناپسی مهاری (IPSPs) ظاهر گردید.

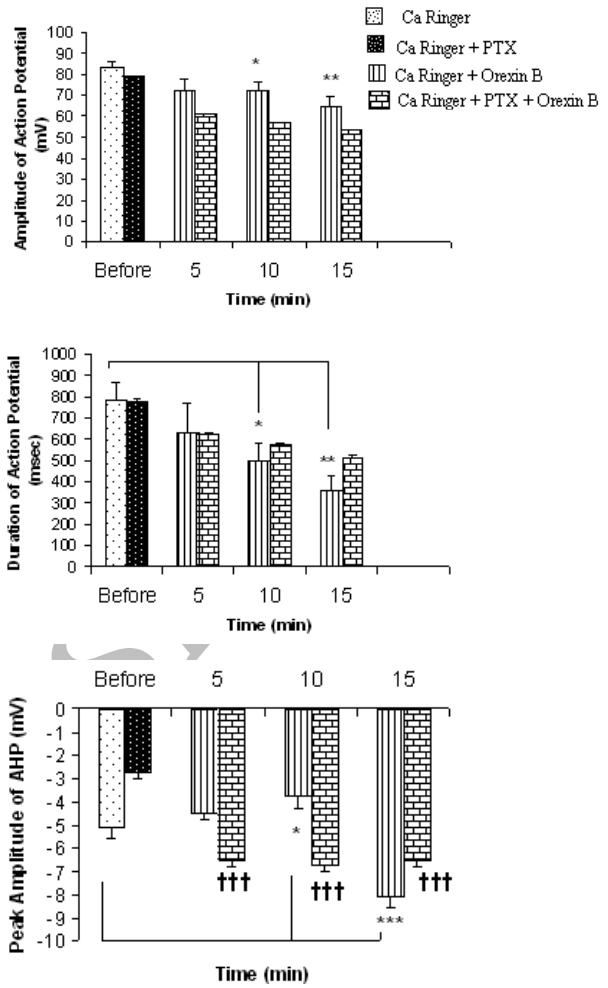
همانطور که در بافتهای تحریک پذیر نشان داده شده[۱۷]، پتانسیل‌های عمل حاصل جریان عبوری از کانال‌های یونی وابسته به ولتاژ هستند. مرحله دپلاریزاسیون پتانسیل عمل حاصل فعالیت کانال‌های وابسته به ولتاژ سدیمی و / یا کلسیمی است[۲۳]، در حالیکه طول مدت و سرعت مرحله رپلاریزاسیون پتانسیل عمل توسط غیر فعال شدن کانال‌های سدیمی / کلسیمی و فعال شدن گروهی از جریانات پتاسیمی رو به خارج تعیین می‌گردد[۳۱].

شکل موج پتانسیل عمل و نیز فرکانس اسپایک را می‌توان با تغییر ویژگی‌های جریانات کلسیمی وابسته به ولتاژ و یا از طریق جریانات پتاسیمی وابسته به کلسیم تغییر داد[۱۱]. به نظر می‌رسد که برای حفظ و ایجاد فعالیت خودبخودی و مکرر نورون، جریانات کلسیمی وابسته به ولتاژ ضروری می‌باشند. در اکثر نورون ها، پتانسیل‌های عمل همراه با افزایش غلظت داخل سلولی یون کلسیم می‌باشند که از طریق ورود Ca^{2+}از کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ صورت می‌گیرد. بنابراین، ورود یون کلسیم در خلال وقوع پتانسیل عمل به عنوان یک فاکتور کلیدی در تعیین طول مدت پتانسیل عمل اهمیت دارد. افزایش در غلظت یون کلسیم داخل سلولی، مسؤل شروع طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی از جمله فعال نمودن کانال‌های یونی (نظیر کانال‌های پتاسیمی روبه خارج وابسته به کلسیم) است که نقش مهمی را در تعیین فرکانس شلیک پتانسیل عمل و دامنه AHP ایفاء می‌نماید[۱۲]. خروج یون پتاسیم در نتیجهٔ فعالیت کانال‌های پتاسیمی روبه خارج منجر به رپلاریزاسیون و یا هیپرپلاریزاسیون پتانسیل غشای سلول‌های عصبی می‌شود. در نورون ها، کانال‌های پتاسیمی دارای نقش مهمی در تثبیت پتانسیل استراحت غشاء، طول مدت پتانسیل عمل، تنظیم تحریک پذیری و نیز کنترل شدت و قدرت ارتباط سیناپتیک بین نورون‌ها است. در بی مهرگان از جمله حلزون نیز طیف وسیعی از کانال‌های یونی وجود [۴،۱۸،۲۶،۳۹]. از جمله کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ که در ایجاد AHP و تطابق فرکانس شلیک نقش مهمی ایفاء می‌کند [۸].

دربسیاری از نورونها از جمله سلولهای عصبی حلزون در صورتی که جریانات پتاسیمی روبه خارج وابسته به ولتاژ که باعث رپلاریزاسیون پتانسیل عمل می‌شوند توسط مهار کننده‌های پتاسیمی مهار گردند، حتی در غیاب یون سدیم در محلول خارج سلولی، ورود یون کلسیم به تنهایی می‌تواند منجر به شلیک اسپایک کلسیمی گردد که وجه مشخصه آن وجود کفه و نیز شانه (shoulder) در شکل موج پتانسیل عمل نورون می‌باشد. تترا ایتل آمونیوم با مهار جریان پتاسیمی یکسوساز تاخیری (delayed rectifier) وجریان عبوری از کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم از نوعBK باعث مهار AHP و از این طریق منجر به افزایش تحریک پذیری سلول می‌گردد. در حالیکه 4-AP مهار کننده انتخابی کانال پتاسیمی نوع سریع، نقش اصلی را در افزایش کنداکتانس کلسیم و ایجاد کفه بر عهده دارد[۸،۲۰،۲۳] بدین ترتیب، با حضور مهار کننده‌های کانال‌های پتاسیمی و سدیمی، اسپایکهای کلسیمی قابل ثبت است. در این شرایط هر عاملی که باعث تغییر شکل موج اسپایک گردد به عبارتی باعث افزایش یا کاهش دامنه، طول مدت و یا تغییر خصوصیات AHP گردد موجب تاثیر بر کانال‌های کلسیمی یا پتاسیمی وابسته به کلسیم می‌گردد.

در تحقیق حاضر برای اولین بار تاثیر اورکسین-B بررفتار الکتریکی نورنهای حلزون در یک مدل کلسیمی نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۶- اثر اورکسین-B و سم سیاه سرفه بر خصوصیات الکتروفیزیولوژیک اسپایک های کلسیمی خودبخودی. A) مقایسه اثر اورکسین-B بر روی دامنه اسپایک کلسیمی ثبت شده در رینگر کلسیمی و پس از انکوباسیون گانگلیون در محلول رینگر محتوی PTX (۱۰۰ نانو مول) تحت هر شرایط، دامنه پتانسیل عمل کلسیمی به طور وابسته به زمان کاهش یافت لکن این کاهش در شرایط رینگر کلسیمی فاقد PTX از نظر آمار معنی دار بود. ($p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۱$). B) مقایسه اثر اورکسین-B بر طول مدت اسپایک کلسیمی ثبت شده در محلول رینگر کلسیمی و پس از انکوباسیون توسط PTX. اورکسین-B بویژه در محلول رینگر کلسیمی فاقد PTX موجب تغییر وابسته به زمان و معنی دار طول مدت اسپایک کلسیمی، ۱۰ و ۱۵ دقیقه پس از پروفیوژن سلول توسط رینگر کلسیمی محتوی اورکسین-B گردید. لکن افزودن اورکسین-B پس از انکوباسیون سلولها در محلول رینگر محتوی PTX تاثیر معنی داری بر روی طول مدت پتانسیل عمل نداشت. C ـ مقایسه اثر اورکسین-B بر دامنه AHP اسپایک کلسیمی در شرایط کنترل و پس از انکوباسیون با محلول رینگر محتوی PTX. افزودن اورکسین-B موجب کاهش ($p<۰/۰۵$) و سپس افزایش معنی دار ($p<۰/۰۰۱$) دامنه AHP گردید. در حالیکه AHP ثبت شده پس از انکوباسیون با محلول محتوی PTX افزایش معنی داری($p<۰/۰۰۱$) یافت.

در سلولهای عصبی دامنه پتانسیل عمل توسط دو جریان روبه داخل سدیمی و کلسیمی کنترل می‌شود که در بررسی حاضر بدلیل عدم حضور Na^+ در محلول خارج سلولی نقش اصلی را Ca^{2+}ایفا می‌نماید. بنابر این، کاهش دامنه پتانسیل عمل در حضور اورکسین- B میتواند ناشی از مهار کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ باشد. از طرف دیگر در این تحقیق پس از کاربرد اورکسین- B طول مدت پتانسیل عمل که توسط بالانس بین جریانات دپلاریزان (در اینجا جریان روبه داخل کلسیمی) و رپلاریزان (در اینجا عمدتا" جریانات روبه خارج پتاسیمی وابسته به کلسیم) تعیین می‌شود ؛ کاهش یافت. این اثر میتواند ناشی از مهار فعالیت کانالهای روبه داخل کلسیمی و یا افزایش فعالیت کانالهای روبه پتاسیمی وابسته به کلسیم باشد. همچنین تغییر الگوی شلیک ازتونیک به شلیکهای منظم با فرکانس بالاتر در حضور اورکسین- B، بیانگر تاثیر نوروپپتید مذکور بر فعالیت کانالهای کلسیمی و پتاسیمی وابسته به کلسیم است. بطوریکه کاهش جریان روبه داخل کلسیمی میتواند موجب کاهش فواصل بین اسپایکها (Interspike interval) گردد و متعاقب آن افزایش شلیک اسپایک کلسیمی شود. همچنین در این بررسی در اکثر موارد اورکسین-B موجب بروز دپلازیراسیون غشا نورنها گردید و این اثرشاید خود بتواند باعث افزایش فرکانس شلیک اسپایک گردد. از طرف دیگر نقش افزایش فعالیت کانالهای روبه خارج پتاسیمی وابسته به کلسیم و متعاقب آن وقوع رپلازیراسیون سریعتر اسپایکهای کلسیمی را نیز نمیتوان رد کرد.

در تحقیقات انجام شده بر روی نورنهای پستانداران نشان داده شده که اورکسین اغلب موجب بروز دپولاریزاسیون غشا و افزایش تحریک پذیری و تنها در موارد خاص موجب هیپرپلاریزسیون غشا و کاهش تحریک پذیری می‌گردد. اخیراً تاثیر هیپرپلاریزه کننده اورکسین بر روی نورونهای پیاز بویایی در موش صحرایی نشان داده شده است[۳،۱۴]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اورکسین-B دارای اثر دوگانه بر دامنه AHP است. کاهش اولیه AHP و افزایش ثانویه آن میتواند به ترتیب ناشی از افزایش گرادیان الکتروشیمیایی در جهت ورود

Archive of SID
www.SID.ir

Ca^{2+} بداخل سلول و ماسک جریانات روبه خارج پتاسیمی باشد و آنگاه افزایش کنداکتانس کانالهای روبه خارج پتاسیمی وابسته به کلسیم باشد.

در سلولهای عصبی حلزون، اورکسین-B احتمالاً از طریق تاثیر بر گیرنده‌های OX-2 (اورکسین-B تمایل اتصال به گیرنده‌های OX-2 را حدود ۱۰ برابر بیشتر از OX-۱ نشان می‌دهند) باعث تغییر تحریک پذیری و شکل موج اسپایک کلسیمی میگردد و حداقل بخشی از اثرات اورکسین-B از طریق مسیرسیگنالینگ وابسته به گیرنده‌های کوپل به پروتئینهای G مهاری (Gi/Go) صورت می‌گیرد چرا که انکوباسیون سلولهای عصبی درمحلول رینگرکلسیمی محتوی PTX موجب جلوگیری از تاثیرافزایشی اورکسین بر تحرک پذیری پایه سلول عصبی و مهار اثر کاهشی اورکسین- B بر دامنهAHP حلزون گردید در حالیکه بر اثر افزایشی آن تغییری دیده نشد. بااینحال هنوز تاثیر مهاری اورکسین- B بر دامنه و طول مدت اسپایک کلسیمی دیده میشود؛ هرچند این اثرات از نظر آماری معنی دار نبود. بنابر این به نظر می‌رسد که بخشی از اثرات اورکسین- B از طریق پروتئینهای G مهاری واسطه میگردد در حالیکه بخشی از آن غیر حساس به پروتئینهای G مهاری می‌باشد. در تحقیقاتی که بر روی نقش پروتئینهای G مهاری در سلولهای عصبی حلزون انجام شده است؛ افزایش کنداکتانس روبه خارج پتاسیمی پس از انکوباسیون نورونها با PTX گزارش گردیده است[۲۰]. از طرفی مهار فعالیت خودبخودی سلولهای تیمار شده با PTX قبل از اینکه در معرض اورکسین قرار گیرند نشان دهنده حساسیت جریانات یونی دخیل در ایجاد پتانسیلهای عمل خودبخودی است و اورکسین-B نتوانست فعالیت خودبخودی را القا نماید.

با توجه به تغییر طول مدت و دامنه اسپایک کلسیمی و نیز دامنه AHP توسط اورکسین-B، نتایج بررسی حاضر برای اولین بار، حضور گیرنده‌های اورکسین را در نورون‌های حلزون و نقش تعدیلی آن بر پتانسیل استراحت غشا و نیز ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک اسپایک کلسیمی که مرتبط با کانالهای کلسیمی رو به داخل و پتاسیمی بویژه پتاسیمی وابسته به کلسیم را نشان می‌دهد. این امر اهمیت حضور گیرنده‌های اورکسین را در طول تکامل یاد آور می‌شود. لکن اهمیت فیزیولوژیک حضور سیستم اورکسینرژیک در بی مهرگان نیاز به تحقیق بیشتر بویژه با بکارگیری ثبت در شرایط in vivo دارد. چرا که بررسی‌ها بر روی مهره داران نشان داده است که سیستم اورکسینرژیک در دستگاه گوارش[۲۴]، سیستم قلبی ـ عروقی[۲۸]، در تولیدمثل[۳۰]، تغذیه، خواب و بیداری[۱۵،۷،۱۰] حافظه و یادگیری[۱] و در درد [۳۶،۶] نقش مهمی ایفا می‌نماید لکن نقش آن در بی مهرگان هنوز مشخص نیست.

منابع

[1] Akbari E, Naghdi N, Motamedi F. Functional inactivation of orexin 1 receptors in CA1 region impairs acquisition, consolidation and retrieval in Morris water maze task. ***Behav Brain Res*** 173(1), (2006) 47-52.

[2] Alvarez C. E. and Sutcliffe J.G. Hypocretin ias an early member of the incretin gene family. ***Neurosci Lett*** 324(3), (2002) 169-72.

[3] Apelbaum, A.F., A. Perrut, M. Chaput, Orexin A effects on the olfactory bulb spontaneous activity and odor responsiveness in freely breathing rats. ***Regulatory Peptides*** 129 (2005) 49– 61.

[4] Bal, R., Janahmadi, M., Green, G.G., Sanders, D.J. Two kinds of transient outward currents, IA and IAdepol, in F76 and D1 soma membranes of the subesophageal ganglia of Helix aspersa**.** ***J. Membr.Biol.*** 179, (2001) 71–78.

[5] Beuckmann CT and Yanagisawa M Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation. ***J Mol Med*** 80 (2002) 329–342.

[6] Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter RA, Upton N, Hunter AJ, and Parsons AA. Orexin-A, an hypothalamic peptide with

Archive of SID
www.SID.ir

analgesic properties. ***Pain*** 92 (2001) 81–90.

[7] Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, and de lecea L. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. ***J Neurosci,*** 20, (2000) 7760–7765.

[8] Crest, M., Gola, M., Large conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels are involved in both spike shaping and firing regulation in ***Helix*** neurones. ***J. Physiol*** 465 (1993) 265-287.

[9] De lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, and Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. ***Proc Natl Acad Sci USA,*** 95 (1998), 322–327.

[10] Espana RA, Baldo BA, Kelley AE, and Berridge CW. Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. ***Neuroscience,*** 106 (2001) 699–715.

[11] Faizi, M. Janahmadi M., Mahmoudian M. The effect of mebudipine and dibudipine, two Ca^{2+} channel blockers, in comparison with nifedipine on Ca^{2+} spikes of F_1 neuronal soma membrane in ***Helix aspersa***. ***Acta Physiol Hung*** 90, (2003) 243-254.

[12] Ghosh, A., Greenberg, M.E Calcium signalling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. ***Science*** 268 (1995) 239–246.

[13] Gola, M.C, Ducreux, C., Chagneux, H. Ca^{2+} activated K^+ current involvement in neuronal function revealed by in situ single channel analysis in Helix neurons. ***J Physiol*** 420 (1990) 73-109

[14] Hardy A B, Aïoun J, Baly C, Julliard, K.A., Caillol, M., Salesse, R. and Duchamp-Viret, P. Orexin A modulates mitral cell activity in the rat olfactory bulb: Patch-clamp study on slices, immunocytochemical localization of orexin receptors. ***Endocrinol,*** 149 (2005) 4042-53.

[15] Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, JohnsA, Porter RA, and Arch JR. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. ***Regul Pept*** 96, (2000) 45–51.

[16] Hirota K, Kushikata T, Kudo M, Kudo T, Lambert DG,and Matsuki A. Orexin A and B evoke noradrenaline releasefrom rat cerebrocortical slices. ***Br J Pharmacol*** 134, (2001) 1461–1466.

[17] Hodgkin, A.L. Chance and Design in Electrophysiology: an Informal Account of Certain Experiments on Nerve Carried Out Between 1934 and 1952. The Pursuit of Nature. Informal Essays on the History of Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 1976pp. 1–22

[18] Jeziorski, M.C., Greenberg, R.M., Anderson, P.A.V. The molecular biology of invertebrate voltage-gated Ca^{2+} channels. ***J Exp Biol*** 203 (2000) 841–856.

[19] Kirchgessner AL Orexins in the brain-gut axis***. Endocr Rev*** 23 (2002) 1–15.

[20] Kiss, T. G-protein coupled activation of potassium channels by endogenous neuropeptides in snail neurons. ***Eur J Neurosci***. 21, (2005) 2177–2185.

[21] Kukkonen, Jyrki P., Tomas Holmqvist, Sylwia Ammoun, and Karl E. O. Åkerman, Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. ***Am J Physiol Cell Physiol*** 283 (2002) 1567–1591.

[22] Lang, E.J., Sugihara, I., Llinás, R. Differential Roles of Apamin-and Charybdotoxin-Sensitive K+ Conductances in the Generation of Inferio Olive Rhythmicity ***In Vivo***. ***J. Neurosci***. 17, (1997) 2825–2838.

[23] Llinás, R., Steinberg, I.Z., Walton, K. Presynaptic calcium currents in squid

Archive of SID

www.SID.ir

giant synapse. ***Biophys. J***. 33, (1981) 289–321.

[24] Lubkin M and Stricker-Krongrad A. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. ***Biochem Biophys Res Commun*** 253, (1998) 241–245.

[25] Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, Detheux M, Parmentier M, Kukkonen JP, and Åkerman KEO. The orexin OX1 receptor activates a novel Ca2_influx pathway necessaryfor coupling to phospholipase C. ***J Biol Chem*** 275, (2000) 30806–30812.

[26] Pelzer, S., Barhanin, J., Pauron, D., Trautwein, W., Lazdunski, M., Pelzer, D. Diversity and novel pharmacological properties of Ca2+ channels in Drosophila brain membranes. ***EMBO J***. 8, (1989) 2365–2371.

[27] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC,Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, and Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. ***Cell*** 92, (1998) 573–585.

[28] Samson WK, Gosnell B, Chang JK, et al. Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. ***Brain Res,*** 831, (1999) 248–53

[29] Smart D and Jerman J. The physiology and pharmacology of the orexins. ***Pharmacol Ther*** 94, (2002) 51–61.

[30] Small CJ, Goubillon ML, Murray JF, et al. Central orexin A has site-specific effects on luteinizing hormone release in female rats. ***Endocrinology***, 144 (2003), 3225–36

[31] Storm, J.F. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. ***Prog. Brain Res***. 83, (1990) 161–187.

[32] Sutcliffe JG and de lecea L. The hypocretins: setting the arousal threshold. ***Nat Rev Neurosci*** 3, (2002) 339–349. Thompson, S.H. Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones***. J. Physiol***. 265, (1977) 465–488.

[33] Uramura K, Funahashi H, Muroya S, Shioda S, Takigawa M, and Yada T. Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca2_ signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. ***Neuroreport*** 12, (2001) 1885–1889.

[34] Van den Pol AN. Hypothalamic hypocretin (orexin): robustinnervation of the spinal cord. ***J Neurosci,*** 19, (1999), 3171–3182.

[35] Van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, and Belousov AB. Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. ***J Neurosci*** 18, (1998) 7962–7971.

[36] Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, and Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. ***Annu Rev Neurosci*** 24, (2001) 429–458.

[37] Xu R, Wang Q, Yan M, Hernandez M, Gong C, Boon WC, Murata Y, Ueta Y, and Chen C. Orexin-A augments voltage-gated Ca^{2+} currents and synergistically increases growth hormone (GH) secretion with GH-releasing hormone in primary cultured ovine somatotropes. ***Endocrinology*** 143, (2002) 4609–4619.

[38] Yamoah, E.N., Crow, T. Two components of calcium currents in the soma of photoreceptors of Hermissenda. ***J. Neurophysiol.*** 72, (1994) 1327–1336

Archive of SID

www.SID.ir