

بررسی اثرات مهار گیرنده‌های اورکسینی واقع در هسته اینسرتوس بر یادگیری اجتنابی غیرفعال در موش‌های صحرایی نر

فاطمه اسلامی ساروی^۱، اسماعیل اکبری^۲، وهاب باباپور^{۳*}، مرتضی زنده‌دل^۳

مقدمه

در سالیان اخیر، یادگیری و حافظه به عنوان فرآیندهای پیچیده‌ی فیزیولوژیک، مورد توجه محققان حوزه‌ی علوم اعصاب قرار گرفته‌اند. در این راستا، آزمایشات متعددی با هدف ارزیابی اختلالات یادگیری و حافظه و دستیابی به درمان‌های مؤثرتر طراحی و اجرا شده‌اند (۱، ۲). این دو فرآیند نه تنها به درک ما از محیط اطراف کمک می‌کنند، بلکه نقشی اساسی در توانایی ما برای تحلیل اطلاعات و به کارگیری دانش در موقعیت‌های جدید ایفا می‌کنند. یادگیری به عنوان فرآیند تغییرات پایدار در رفتار یا توانایی‌های شناختی تعریف می‌گردد که از طریق تجارب حاصل شده و عمدتاً ناشی از تغییرات سیناپسی در مغز می‌باشد (۳). تحقیقات نشان داده‌اند که شکل‌پذیری سیناپسی، که به تغییرات در قدرت ارتباطات سیناپسی اشاره دارد، یکی از مکانیسم‌های کلیدی درگیر در یادگیری و حافظه است (۴). این تغییرات می‌توانند ناشی از تحریک مکرر نورون‌ها باشند که منجر به تقویت یا تضعیف سیناپس‌ها می‌شوند. به عنوان مثال، نظریه «تقویت طولانی‌مدت» (LTP) نشان می‌دهد که تحریک مکرر یک سیناپس می‌تواند منجر به افزایش پایدار در انتقال سیگنال بین نورون‌ها شود، که این امر اساس یادگیری و تشکیل حافظه را تشکیل می‌دهد (۵). ساختارهای مختلفی در یادگیری و تثبیت حافظه نقش دارند که یکی از کلیدی‌ترین آن‌ها هیپوکامپ می‌باشد (۶). در این ناحیه، سلول‌های هرمی خاصی مسئول کدگذاری تجربیات

چکیده

فرآیندهای یادگیری و حافظه تحت تأثیر مناطق متعددی از مغز قرار دارند. هسته اینسرتوس (NI)، که شامل توزیع گسترده‌ای از نوروپپتیدهای اورکسین است، به عنوان یکی از عناصر کلیدی در عملکردهای فیزیولوژیک، به ویژه پردازش حافظه، شناخته می‌شود. مطالعه کنونی با هدف بررسی اثرات غیرفعال‌سازی گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ و ۲ واقع در NI مغز موش‌های صحرایی بر پردازش یادگیری اجتنابی و تقویت طولانی‌مدت (LTP) طراحی شده است. در مراحل مختلف این مطالعه موش‌های صحرایی دی متیل سولفوکسیاید (DMSO، گروه شاهد)، آنتاگونیست گیرنده اورکسینی نوع ۱ (SB-334867-A) و آنتاگونیست گیرنده اورکسینی نوع ۲ (TCS-OX2-29) را از طریق کانول دریافت نمودند. آزمایش‌های رفتاری مربوط به یادگیری احترازی در دو فاز تثبیت و به خاطرآوری انجام شدند. تزریق داروها بلافاصله پس از آموزش یا ۱۵ دقیقه پیش از شروع آزمون بازیابی در NI صورت گرفت. همچنین در آزمایش الکتروفیزیولوژی، تزریق‌ها ۳۰ دقیقه پیش از القای LTP صورت گرفت تا نقش گیرنده‌های اورکسینی در القای LTP مورد بررسی قرار گیرد. نتایج حاصل نشان داد که فاز تثبیت در هر دو آزمایش رفتاری به‌طور معناداری توسط تزریق آنتاگونیست‌ها مختل گردید ($p < 0.05$)، در حالی که فاز به خاطرآوری تحت تأثیر قرار نگرفت ($p \geq 0.05$). علاوه بر این، در آزمایش الکتروفیزیولوژی، دامنه پتانسیل عمل دسته جمعی (PS) دستخوش کاهش معنادار شد ($p < 0.05$)، اما شیب پتانسیل پس‌سیناپسی تحریکی دسته جمعی (EPSP) تغییر پیدا نکرد ($p \geq 0.05$). در نهایت، مطالعه حاضر نشان داد که مهار گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ و ۲ در NI منجر به اختلال در فرآیند یادگیری اجتنابی و القای پتانسیل سیناپسی بلندمدت می‌شود.

واژگان کلیدی: گیرنده‌های اورکسینی، هسته اینسرتوس، یادگیری اجتنابی،

موش صحرایی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۶

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. babapour@ut.ac.ir

مختلفی چون چرخه خواب و بیداری، دریافت غذا، رفتارهای وابسته به انگیزه و پاداش، هوشیاری، حافظه و یادگیری نقش دارند (۱۲). این پدیده‌ها عمدتاً در ناحیه هیپوتالاموس تولید می‌شوند و شامل دو نوع اصلی هستند: اورکسین A و اورکسین B (۱۳). این دو پپتید از یک پیش‌ساز مشترک به نام پره-پرواورکسین ساخته می‌شوند و اثرات خود را از طریق دو نوع گیرنده اورکسینی، یعنی گیرنده نوع ۱ و گیرنده نوع ۲ اعمال می‌کنند (۱۴). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اختلال در سیستم اورکسینرژیک می‌تواند منجر به مشکلاتی نظیر نارکولپسی (حالت خواب آلودگی شدید) شود (۱۵). همچنین به نظر می‌رسد تغییرات در سطح اورکسین‌ها با اختلالات روانی همچون افسردگی و اضطراب نیز مرتبط می‌باشد (۱۶). با اثبات مشارکت NI در شکل‌گیری ریتم تنای هیپوکامپ احتمال مشارکت این هسته در پردازش حافظه و یادگیری وابسته به هیپوکامپ بیش از پیش قوت گرفته است (۱۷). از آنجایی که سیستم اورکسینرژیک نیز در زمان هوشیاری فعال می‌شود و با هیجان و انگیزه‌ی افراد در زمان یادگیری مرتبط است (۱۳، ۱۸)، همچنین با توجه به شناسایی تراکم بالایی از گیرنده‌های اورکسینرژیک در NI (۱۹)، در مطالعه کنونی تلاش شد تا اثرات مهار گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ و ۲ واقع در ناحیه NI بر پردازش یادگیری اجتنابی غیرفعال در موش‌های صحرایی با اجرای آزمایشات رفتاری و الکتروفیزیولوژیک بررسی شود.

مواد و روش کار

حیوانات آزمایشگاهی

تمامی مراحل این مطالعه، اعم از شرایط نگهداری و انتقال حیوانات بر اساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی، مطابق با قوانین دولت ایران در زمینه‌ی مراقبت از حیوانات و تایید شده با کد IR.MAZUMS.REC.1401.086 از دانشگاه علوم

جدید هستند. برای اینکه سایر سلول‌های هرمی بتوانند از فرآیند کدگذاری حافظه خارج شوند، باید تحت تأثیر مهار فعال توسط اینترنورون‌ها قرار گیرند. علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که هسته اینسرتوس (NI)، نقش مهمی در تنظیم فعالیت هیپوکامپ ایفا نموده و با پاسخ به محرک‌های برجسته و تأثیر بر فعالیت سیناپسی هیپوکامپ، به عنوان یک واسطه مرکزی در پردازش حافظه عمل می‌کند (۷). NI، واقع در خط میانی ناحیه پریونتین و نزدیک به بخش پشتی تگمنتوم خلفی، به عنوان یک ناحیه کلیدی در سیستم عصبی شناخته می‌شود. این هسته حاوی نورون‌های ناهمگونی است که نوروترانسمیترها و کوترانسمیترهای مختلفی از جمله گابا و ریلاکسین-۳ را ترشح می‌کنند (۸). به تازگی، فیبرهای گلوتاماترژیک ارسال شده از این هسته به مدار سپتو-هیپوکامپ نیز توسط محققان شناسایی شده‌اند. وجود گیرنده‌های مختلف، از جمله گیرنده کورتیکوتروپینی نوع یک (CRF1)، در این هسته نشان‌دهنده نقش آن در شکل‌گیری پاسخ‌های مرتبط با استرس است (۹). فیبرهای خروجی از NI به نواحی متعددی از جمله هیپوکامپ، هسته دیاگونال باند و آمیگدال ارسال می‌شوند. ورودی‌های اصلی به این هسته نیز از سپتوم میانی، بخش میانی هابنولا، هسته رافه میانی و دیگر نواحی تأمین می‌گردند (۱۰). این ورودی‌ها و خروجی‌های متنوع محققان را به انجام بررسی‌های الکتروفیزیولوژیک و رفتاری در پاسخ به استرس، رفتارهای مرتبط با تغذیه، هیجان و برانگیختگی ترغیب کرده است. علاوه بر این، بر اساس شواهد حاصل از مطالعات اخیر NI فیبرهای اورکسینرژیک را نیز دریافت می‌کند و گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ و ۲ بر روی نورون‌های آن بیان می‌شوند (۱۱).

اورکسین‌ها، که به عنوان هیپوکرتین نیز شناخته می‌شوند، گروهی از نوروترانسمیترها هستند که در عملکردهای

زمان ماندن حیوان در قسمت روشن محفظه (TLC) ثبت می‌گردد و اگر ورود به قسمت تاریک (STL) بیش از ۶۰ ثانیه باشد، حیوان از مطالعه حذف می‌شود.

۲. آموزش یا اکتساب: ۳۰ دقیقه بعد از مرحله سازش، حیوان دوباره در قسمت روشن قرار می‌گیرد. پس از ۱۰ ثانیه، درب باز شده و شوک الکتریکی به مدت ۱.۵ ثانیه با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱ آمپر به کف دستگاه اعمال می‌شود. پس از ۲۰ ثانیه حیوان به قفس برگردانده می‌شود. بعد از ۲ دقیقه حیوان مجدداً در اتاق روشن قرار گرفته و بعد از ده ثانیه درب باز می‌شود. عدم ورود به قسمت تاریک برای ۱۲۰ ثانیه به عنوان یادگیری موفق ثبت می‌شود.

۳. به خاطر آوری: ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش، حیوان دوباره در قسمت روشن قرار داده می‌شود و TLC و STL به مدت ۳۰۰ ثانیه ثبت می‌شود.

جراحی استریوتاکیسی

هفت روز پیش از آغاز آزمایش و اعمال عدم دسترسی به آب و غذا به مدت ۱۲ ساعت، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی (IP) ترکیبی از کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند (۲۱)، سپس در دستگاه استریوتاکیسی قرار گرفته و دو کانول از جنس فولاد ضد زنگ جهت تزریق دارو، با استفاده از سیمان دندانپزشکی روی جمجمه آنها ثابت گشت. مختصات استریوتاکیسی برای ناحیه NI بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون تعیین شد (۲۲). قابل ذکر است که جهت جلوگیری از آسیب به نورون‌های ناحیه ی مورد نظر کانول راهنما یک میلی‌متر بالاتر از ناحیه ی مذکور ثابت شد و سوزن تزریق یک میلی‌متر از کانول راهنما بلندتر بود. پس از یک هفته و طی شدن دوره بهبودی، بلافاصله بعد از آموزش در گروه تثبیت یا ۱۵ دقیقه پیش از شروع آزمون به خاطر آوری، داروها با حجم نهایی ۰/۵ میکرولیتر، از طریق

پزشکی مازندران در ساری انجام شد. به منظور انجام آزمایشات، موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (محدوده وزنی: ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم) از دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شد. به محض ورود، موش‌ها در دسته‌های ۳ تایی درون قفس قرار گرفتند. همچنین در طول مطالعه، شرایط استاندارد محل نگهداری حیوانات (چرخه روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد) حفظ و دسترسی آزادانه به آب و غذا برای حیوانات فراهم گشت. لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات در بازه زمانی ۷ صبح الی ۲ بعد از ظهر انجام شدند.

آزمون‌های رفتاری

دستگاه شاتل باکس

این مرحله از مطالعه بر اساس تحقیقات پیشین در این زمینه انجام و از دستگاه شاتل باکس برای ارزیابی یادگیری اجتنابی در دو فاز تثبیت و به خاطر آوری استفاده شد (۲۰). این دستگاه شامل دو محفظه تاریک و روشن از جنس پلکسی گلاس با ابعاد $20 \times 40 \times 20$ سانتیمتر بوده که با یک درب گیوتینی از یکدیگر مجزا می‌شوند. در زیر هر دو محفظه میله‌های ضد زنگ به فاصله یک سانتی‌متر قرار دارند و یک لامپ ۱۰۰ واتن در بالای قسمت روشن نصب شده است. کف قسمت تاریک دستگاه به یک مدار الکتریکی وصل است که با روشن شدن کلید مدار، جریان الکتریکی (با مدت، شدت و فرکانس مشخص) از کف آن عبور و به دست و پاهای حیوان وارد می‌شود. حیوان در طی سه مرحله به شرح زیر آموزش می‌بیند تا برخلاف غریزه از رفتن به قسمت تاریک دستگاه اجتناب کند:

۱. سازش یافتن: حیوان به مدت ۱۰ ثانیه در قسمت روشن قرار می‌گیرد و سپس درب گیوتینی باز می‌شود. پس از ورود پاهای عقبی به قسمت تاریک، درب بسته شده و ۳۰ ثانیه بعد حیوان به قفس بازگردانده می‌شود. مجدداً این عمل نیم ساعت بعد تکرار می‌شود. در این حالت مدت

بعد از اعمال بیهوشی با تزریق IP داروی یورتان (۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم)، موش‌ها در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند (۲۴). دو الکتروود دو قطبی از جنس فولاد زنگ نزن (با قطر ۱۲۵ میکرومتر) با پوشش تفلونی یکی (تحریکی) در مسیر پرفورانت و دیگری (ثبات) در لایه سلول‌های گرانولی شکنج دندانهای در یک نیمکره مغز قرار داده شدند. در سراسر آزمایش حرارت بدن حیوانات با استفاده از پتوی کنترل کننده حرارت در دامنه ۳۶-۳۷ درجه سانتی گراد حفظ شد. الکتروودهای ثبات و مرجع به دستگاه Data Acquisition ScienceBeam - D3111 (شرکت پرتو دانش، ایران) متصل شدند. به علاوه کانولی جهت تزریق داروها در ناحیه NI با توجه به مختصات استریوتاکسی مشخص بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون قرار گرفت (۲۲). جهت جلوگیری از خونریزی بیش از حد در حیوان کانول گذاری با زاویه ۱۶ درجه صورت گرفت.

ثبت پتانسیل‌های برانگیخته میدانی

با تحریک مسیر پرفورانت، پتانسیل‌های برانگیخته میدانی از ناحیه شکنج دندانهای ثبت شد. در آغاز آزمایش، مسیر پرفورانت با تک موج‌های مربعی تک فازی با پهنای ۰/۲ میلی ثانیه و با فواصل ۱۰ ثانیه ای (۰/۱ هرتز) تحریک گشت. پس از پایدار شدن پاسخ سیناپسی، جهت محاسبه شدت جریان مورد نیاز برای تحریک آزمونی (TS) و تحریک تتانیک یا با فرکانس بالا (HFS)، ابتدا رابطه شدت جریان / ولتاژ (I/O) برای هر حیوان بدست آمد. به این ترتیب که: مسیر پرفورانت با شدت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروآمپر تحریک و پاسخ برانگیخته میدانی ثبت گردید. حداقل شدتی که در آن حداکثر دامنه پتانسیل عمل دسته جمعی (PS) رخ می‌دهد، به عنوان شدت حداکثر در نظر گرفته شد. بعد از تعیین شدت حد اکثری، ۴۰ درصد

کانول‌ها طی ۳ تا ۴ دقیقه به درون ناحیه آکومبس تزریق شدند. عمل تزریق از طریق یک سر سوزن شماره‌ی ۲۷ و سرنگ هاملتون ۵ میکرولیتری، صورت گرفت. جهت اطمینان از ورود کامل دارو به محل مورد نظر سوزن تزریق، یک دقیقه بعد از اتمام تزریق از درون کانول خارج گردید.

داروهای تجویزی و ترتیب آزمایشات

به منظور ارزیابی یادگیری اجتنابی غیرفعال، مجموعاً چهار آزمایش هر یک شامل دو گروه آزمایشی (n= ۱۰) انجام شد. در تمامی آزمایشات، دی متیل سولفوکساید (DMSO، ۰/۵ میکرولیتر) به عنوان محلول کنترل به همراه SB334867-A (۱۲ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر حلال) به عنوان آنتاگونیست گیرنده اورکسینی نوع ۱ و یا TCS- OX2-29 (۱۲ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر حلال) به عنوان آنتاگونیست گیرنده اورکسینی نوع ۲ تجویز شدند که دوزهای آن‌ها بر اساس مطالعات پیشین تعیین گشت (۲۳). لازم به ذکر است که تمامی داروهای مصرفی در این قسمت از مطالعه از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شدند. در نهایت، آزمایشات به ترتیب با هدف ارزیابی تأثیر تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ و ۲ بر یادگیری اجتنابی غیرفعال در فاز تثبیت و به خاطرآوری انجام شدند. در پایان آزمایشات رفتاری، به منظور کسب اطمینان از صحت تزریق متیلن بلو به ناحیه NI تزریق گشت، سپس کانول به آرامی برداشته شد و پس از جداسازی، مغز به مدت یک هفته در فرمالدهید ده درصد قرار گرفت. سپس نقاط تزریق در برش مغزی در مقایسه با اطلس پاکسینوس و واتسون بررسی شدند.

آزمون‌های الکتروفیزیولوژی

جراحی استریوتاکسی

هفت روز پیش از آغاز آزمایش، ابتدا موش‌ها به مدت ۱۲ ساعت پیش از جراحی از آب و غذا محروم شدند. سپس

با مختصات استریوتاکسی موجود در اطلس پاکسینوس و واتسون بررسی‌های لازم صورت گرفت (۲۲).

آنالیز آماری

در مطالعه حاضر، نرمال بودن داده‌های حاصل از آزمایشات رفتاری با آزمون Kolmogorov-Smirnov سنجیده شد و پس از آن داده‌ها با استفاده از آزمون غیرپارامتری Kruskal Wallis و به دنبال آن Mann-Whitney Utest مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در آزمایشات الکتروفیزیولوژی نیز پاسخ سیناپسی پایه قبل و بعد از تزریق داروها با آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شد. در هر نمودار، وقوع LTP به صورت درصد افزایش نسبت به سطح پایه نمایش داده شد و در هر نقطه زمان منحصر به فرد بررسی تفاوت‌های معنی دار و مقایسه بیشتر با آزمون Sidak صورت گرفت. در کلیه آزمایشات نتایج بصورت (میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار) محاسبه گشت و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری تغییرات در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمون‌های رفتاری

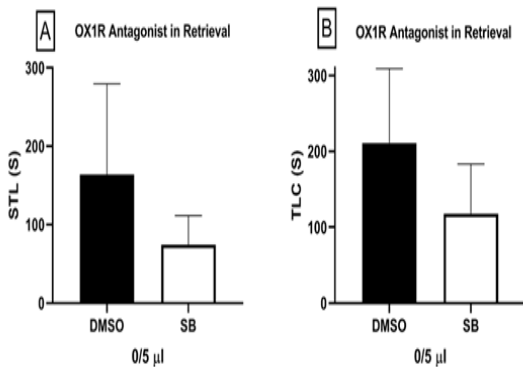
اثر مهار گیرنده اورکسینی نوع ۱ بر یادگیری اجتنابی غیرفعال در مرحله تثبیت با توجه به نتایج ارائه شده در نمودار ۱، تزریق آنتاگونیست گیرنده اورکسینی نوع ۱ (SB334867-A) به ناحیه NI روند تثبیت یادگیری اجتنابی را دچار اختلال نموده و مقادیر STL و TLC را به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل (DMSO) کاهش داد ($p < 0.05$).

آن به عنوان شدت جریان TS و ۸۰ درصد آن به عنوان شدت جریان HFS در نظر گرفته شد. پاسخ برانگیخته شده در کامپیوتر ذخیره گردید. تجزیه و تحلیل به صورت آفلاین بر روی پاسخ‌های ذخیره شده انجام شد. شایان ذکر است که افزایش بیشتر از ۲۵ درصد در دامنه PS یا ۱۰ درصد در شیب پتانسیل پس‌سیناپسی تحریکی دسته جمعی (EPSP) پس از HFS، به عنوان وقوع موفقیت آمیز LTP در نظر گرفته شد (۲۴).

داروهای تجویزی و ترتیب آزمایشات

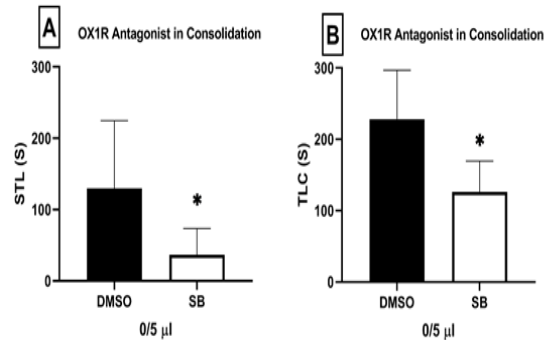
به منظور انجام ارزیابی‌های الکتروفیزیولوژی، مجموعاً دو آزمایش هر یک شامل دو گروه آزمایشی (۶ = n) انجام شد. به ترتیب در آزمایش اول DMSO (۰/۵ میکرولیتر) و SB334867-A (۱۲ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر حلال) و در آزمایش دوم DMSO (۰/۵ میکرولیتر) و TCS-OX2-29 (۱۲ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر حلال) از طریق کانول به ناحیه NI تزریق شدند. دوزهای تجویزی بر اساس مطالعات پیشین تعیین گشت و تمامی داروها از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شدند (۲۳). در هر دو آزمایش، پس از پایدار شدن پاسخ سیناپسی و تعیین رابطه I/O، به مدت ۳۰ دقیقه ثبت پایه به دست آمد. سپس دارو یا حلال به ناحیه NI تزریق شد تا تاثیر احتمالی آن‌ها بر روی انتقال سیناپسی مورد بررسی قرار گیرد و به مدت ۳۰ دقیقه ثبت پایه ادامه یافت، سپس LTP با فرکانس ۲۰۰ هرتز اعمال و ثبت پاسخ پتانسیل برانگیخته میدانی هر ۵ دقیقه به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. در پایان آزمایشات و به منظور کسب اطمینان از محل قرارگیری کانول‌ها و الکترودها، برش‌هایی از بافت مغز موش‌ها تهیه و در فرمالدهید ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری و در قیاس

اثر مهار گیرنده اورکسینی نوع ۱ بر یادگیری اجتنابی غیرفعال در مرحله به خاطرآوری
با توجه به نتایج ارائه شده در نمودار ۳، تزریق آنتاگونیست گیرنده اورکسینی نوع ۱ (SB334867-A) به ناحیه NI تغییر محسوسی در روند به خاطرآوری یادگیری اجتنابی ایجاد نکرده و کاهش مقادیر STL و TLC در مقایسه با گروه کنترل (DMSO) نیز از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($p \geq 0.05$).



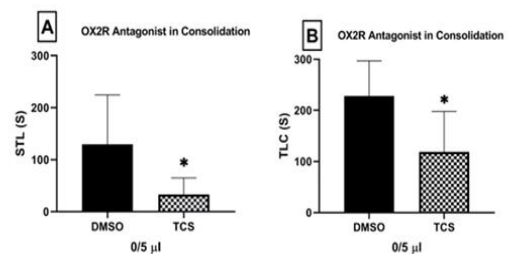
نمودار ۳- اثر تزریق DMSO و SB334867-A (SB) به ناحیه NI بر A. اولین زمان ورود به قسمت تاریک محفظه (STL) و B. مدت زمان ماندن در قسمت روشن محفظه (TLC) در فاز به خاطرآوری. تمامی داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار نمایش داده شده است.

اثر مهار گیرنده اورکسینی نوع ۲ بر یادگیری اجتنابی غیرفعال در مرحله به خاطرآوری
همانطور که در نمودار ۴ نشان داده شده است، تزریق آنتاگونیست گیرنده اورکسینی نوع ۲ (TCS-OX2-29) به ناحیه NI سبب ایجاد اختلال در روند به خاطرآوری یادگیری اجتنابی نگشته و کاهش مقادیر STL و TLC در این گروه‌ها، در قیاس با گروه کنترل (DMSO)، از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($p \geq 0.05$).

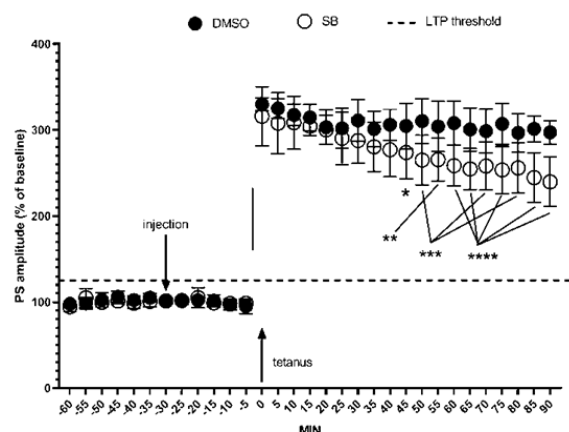


نمودار ۱- اثر تزریق DMSO و SB334867-A (SB) به ناحیه NI بر A. اولین زمان ورود به قسمت تاریک محفظه (STL) و B. مدت زمان ماندن در قسمت روشن محفظه (TLC) در فاز تثبیت. تمامی داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار نمایش داده شده است. علامت (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل است ($p < 0.05$).

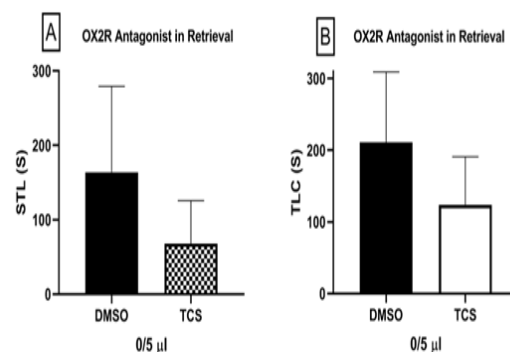
اثر مهار گیرنده اورکسینی نوع ۲ بر یادگیری اجتنابی غیرفعال در مرحله تثبیت
همانطور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، تزریق آنتاگونیست گیرنده اورکسینی نوع ۲ (TCS-OX2-29) به ناحیه NI سبب ایجاد اختلال در روند تثبیت یادگیری اجتنابی را گشته و در قیاس با گروه کنترل (DMSO)، مقادیر STL و TLC در این گروه‌ها کاهش معنی‌داری یافته است ($p < 0.05$).



نمودار ۲- اثر تزریق DMSO و TCS-OX2-29 (TCS) به ناحیه NI بر A. اولین زمان ورود به قسمت تاریک محفظه (STL) و B. مدت زمان ماندن در قسمت روشن محفظه (TLC) در فاز تثبیت. تمامی داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار نمایش داده شده است. علامت (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل است ($p < 0.05$).



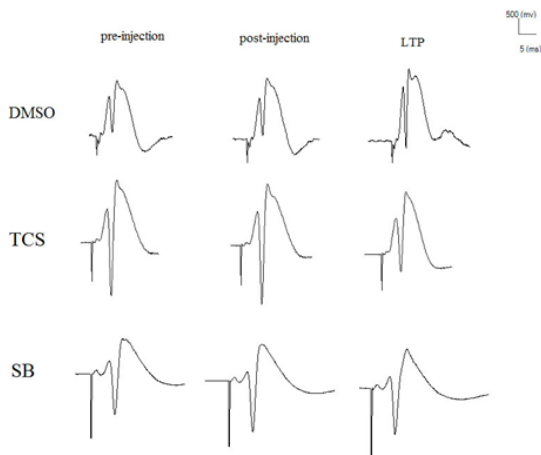
نمودار ۵- اثرات تجویز DMSO و SB-334867-A (SB) به ناحیه NI بر دامنه پتانسیل عمل دسته جمعی (PS). پیش از القای LTP فعالیت پایه به مدت ۳۰ دقیقه پیش و پس از تزریق در همه موش‌ها ثبت شد. تمامی داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار نمایش داده شده است. مقادیر ($p < 0.0001$ ، $***p < 0.001$ ، $**p < 0.01$) معنی‌دار در نظر گرفته شدند.



نمودار ۶- اثر تزریق DMSO و TCS-OX2-29 (TCS) به ناحیه NI بر A. اولین زمان ورود به قسمت تاریک محفظه (STL) و B. مدت زمان ماندن در قسمت روشن محفظه (TLC) در فاز به خاطرآوری. تمامی داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار نمایش داده شده است.

آزمون‌های الکتروفیزیولوژی

آنالیز نتایج حاصل از القای LTP نشان داد که بعد از اعمال HFS دامنه PS در گروه‌های SB-334867-A ($p < 0.0001$) و TCS ($p = 0.0001$) ($F(30, 150) = 4.754$) معنی‌داری کاهش یافت اما تفاوت معنی‌داری در شیب EPSP بین گروه‌های SB ($p = 0.9141$) و TCS-OX2-29 ($p = 0.1077$) ($F(30, 150) = 0.3716$) در مقایسه با گروه DMSO مشاهده نشد. در مقابل، آزمون Sidak تفاوت قابل توجهی را در گروه SB-334867-A در دامنه PS در ۴۵ دقیقه ($p = 0.0407$)، ۵۰ دقیقه ($p = 0.0001$)، ۶۰ دقیقه ($p = 0.0023$)، ۷۰ دقیقه ($p < 0.0001$)، ۷۵ دقیقه ($p < 0.0001$)، ۸۰ دقیقه ($p < 0.0009$)، ۸۵ دقیقه ($p < 0.0001$) و ۹۰ دقیقه ($p < 0.0001$) تا پایان ۹۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری ($p < 0.0001$) را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (نمودارهای ۵-۹).

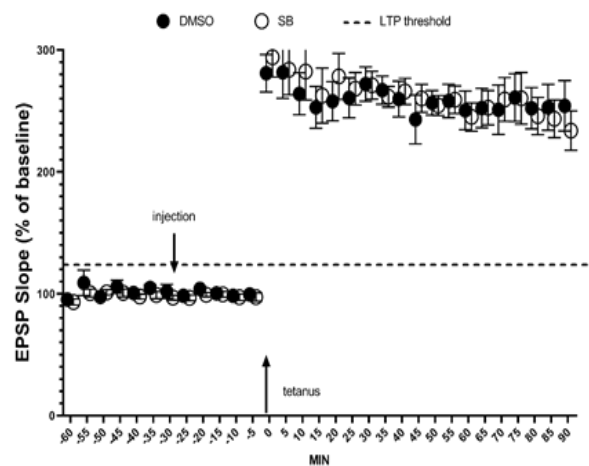


نمودار ۹- یک نمونه از پتانسیل‌های میدانی ثبت شده به دنبال تجویز DMSO, SB-334867-A (SB) و TCS-OX2-29 (TCS) به ناحیه NI در سه بازه زمانی نمایش داده شده است: پیش و پس از تزریق داروها به ناحیه NI و پس از اعمال HFS در طول ثبت فعالیت پایه و LTP.

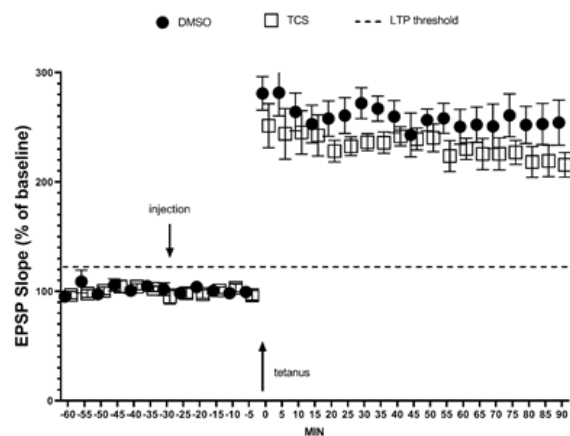
بحث

مطالعه حاضر به بررسی اثرات مهار گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ و ۲ واقع در NI بر یادگیری اجتنابی غیرفعال در موش‌های صحرایی نر پرداخته است. نتایج نشان می‌دهند که مهار این گیرنده‌ها به‌طور معناداری فرآیند تثبیت حافظه را مختل می‌کند، در حالی که فاز به خاطرآوری را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. این یافته‌ها اهمیت سیستم اورکسینرژیک و نقش کلیدی NI در فرآیندهای یادگیری و حافظه را برجسته می‌کنند.

یافته‌های حاصل از مطالعه کنونی با نتایج چندین مطالعه قبلی که حاکی از تأثیرات مخرب دستکاری NI بر انواع یادگیری و فرآیندهای دخیل در پردازش حافظه بوده‌اند، مطابقت دارد (۲۵، ۲۶). با توجه به تفسیرهای مطالعات قبلی، NI نقشی محوری در کنترل مدار سیتو-هیپوکامپ و ریتم تتا هیپوکامپ ایفا می‌کند (۱۷). بنابراین می‌توان چنین تصور نمود که غیرفعال شدن گیرنده‌های اورکسینی نیز



نمودار ۷- اثرات تجویز DMSO و SB-334867-A (SB) به ناحیه NI بر شیب پتانسیل پس‌سیناپسی تحریکی دسته جمعی (EPSP). پیش از القای LTP فعالیت پایه به مدت ۳۰ دقیقه پیش و پس از تزریق در همه موش‌ها ثبت شد. تمامی داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار نمایش داده شده است.



نمودار ۸- اثرات تجویز DMSO و TCS-OX2-29 (TCS) به ناحیه NI بر شیب پتانسیل پس‌سیناپسی تحریکی دسته جمعی (EPSP). پیش از القای LTP فعالیت پایه به مدت ۳۰ دقیقه پیش و پس از تزریق در همه موش‌ها ثبت شد. تمامی داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار نمایش داده شده است.

ممکن است از طریق مکانیسمی مشابه بر این مسیر تأثیر بگذارد.

مطالعات صورت گرفته با محوریت سیستم اورکسینرژیک نشان داده است که گیرنده‌های این سیستم (نوع ۱ و نوع ۲) که جزو گیرنده‌های متصل با پروتئین G (GPRs) هستند، مسیرهای مختلف سیگنال‌دهی داخل سلولی را پس از فعال‌سازی توسط اورکسین A و B میانجی‌گری می‌کنند (۲۷). تحقیقات نشان می‌دهد که اورکسین A در درجه اول سبب تحریک نورون‌های حاضر در ناحیه NI می‌گردد (۱۱). لازم به ذکر است که سطح بیان قابل‌توجهی از گیرنده‌های اورکسینی نوع دو نیز در این هسته شناسایی شده است (۱۹). مهار این گیرنده‌ها می‌تواند مسیرهای سیگنالینگ طبیعی را مختل کند و ممکن است پیامدهایی برای فرآیندهای دخیل در پردازش حافظه به دنبال داشته باشد. مطالعات پیشین نشان داده است که اورکسین A یادگیری و تثبیت یادگیری اجتنابی غیرفعال را افزایش می‌دهد. به عنوان مثال، مشخص شده است که تجویز اورکسین A در بطن جانبی موش‌های صحرایی، فرآیندهای یادگیری و به خاطرآوری را در یک الگوی اجتنابی غیرفعال تسهیل می‌کند (۲۸). در مقابل، به نظر می‌رسد مهار گیرنده‌های اورکسینی با ایجاد اختلال در پردازش حافظه مرتبط باشد. در این راستا، گزارش شده است که تجویز آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌ی اورکسینی نوع ۱ به آمیگدال قاعده‌ای جانبی (BLA)، به طور قابل‌توجهی بر نتایج یادگیری اجتنابی غیرفعال در فاز تثبیت و به خاطرآوری تأثیر می‌گذارد، درحالی‌که تجویز آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌ی اورکسینی نوع ۲ تنها سبب اختلال در فاز بازیابی حافظه می‌گردد (۲۹). همچنین در آزمایشات صورت گرفته توسط زکایی و همکاران (۲۰۲۴)، تجویز SB-334867-A در ناحیه آکومبوس مغز موش‌های صحرایی روند تثبیت یادگیری اجتنابی غیرفعال را با اختلال مواجه نمود، در

حالی‌که اثری بر فاز بازیابی حافظه نداشت (۲۱). علاوه بر این، تزریق TCS-OX2-29 به همان ناحیه نیز هیچ تغییر معنی‌داری در روند تثبیت و بازیابی یادگیری اجتنابی غیرفعال ایجاد ننمود (۲۱). با این حال، در مطالعه حاضر تزریق بلافاصله بعد از آموزش هر دو آنتاگونیست (TCS-OX2-29 یا SB-334867-A) به ناحیه NI در فاز تثبیت، عملکرد حیوانات و حافظه اجتنابی را در طول آزمایش تحت تأثیر قرار داد و به طور قابل توجهی سبب کاهش مدت زمان اولین ورود به اتاق تاریک (STL) و مدت زمان ماندن در اتاق روشن (TLC) گشت؛ اما تزریق ۱۵ دقیقه پیش از آزمایش TCS-OX2-29 یا SB-334867-A به ناحیه NI هیچ تأثیر معنی‌داری در مرحله بازیابی یادگیری اجتنابی بر جای نگذاشت. این تفاوت مشاهده شده تا حدی می‌تواند ناشی از دخالت برخی مدارهای جانبی موجود در ناحیه NI باشند که بر پردازش حافظه اثر می‌گذارند. مشخص شده است که نورون‌های اورکسینرژیک عصب‌های همگرایی را به سمت ناحیه NI روانه می‌کنند و تماس‌های سیناپسی میان این نورون‌ها و نورون‌های حاوی ریلاکسین-۳ در این ناحیه شکل می‌گیرد (۳۰، ۳۱). از آنجایی که بسیاری از نورون‌های اورکسینرژیکی که نورون‌های حاوی ریلاکسین-۳ را تحریک می‌کنند، بیشتر mRNA گیرنده‌های اورکسینی نوع ۲ را در قیاس با گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ بیان می‌کنند (۱۹)، می‌توان نتیجه گرفت که غیرفعال سازی گیرنده‌های نوع ۲ در این مطالعه ممکن است از طریق تعامل با مسیر سیگنالینگ ریلاکسین-۳ عمل کند. لازم به ذکر است که ریلاکسین-۳ می‌تواند تحریک، پاسخ به استرس، تغذیه و حافظه را تعدیل کند و ممکن است در تولید ریتم تتا هیپوکامپ نیز نقش داشته باشد (۳۲). با وجود همپوشانی توزیع آناتومیک و نقش‌های مشترک نوروپپتیدهای ریلاکسین-۳ و اورکسین، همچنان مکانیسم دقیق این برهمکنش با نتایج

اختلال در مسیرهای درگیر در مراحل کلیدی شکل‌گیری حافظه، بینش قابل توجهی در مورد ارتباط عملکردی آنها به دست آمده است، اما همچنان تحقیقات برای کشف پیچیدگی‌های مدارهای عصبی درگیر در یادگیری و حافظه ادامه دارد. درک چگونگی مسیرهای سیگنال‌دهی اورکسین و ادغام آن با فرایندهای عصبی فیزیولوژیکی گسترده‌تر، می‌تواند به دستیابی به درمان‌های مؤثر برای اختلالات عصبی و شناختی کمک شایانی نماید.

فهرست منابع

1. Qian ZJ, Ricci AJ. Effects of cochlear hair cell ablation on spatial learning/memory. *Scientific Reports*. 2020;10(1):20687.
2. Okano H, Hirano T, Balaban E. Learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(23):12403-4.
3. Suarez AMS, Martinez MEM, Mendoza LRM. Brain and learning. *International Journal of Social Sciences and Humanities*. 2019;3(2):128-35.
4. Hölscher C. Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *Journal of neuroscience research*. 1999;58(1):62-75.
5. Harris KM. Structural LTP: from synaptogenesis to regulated synapse enlargement and clustering. *Current opinion in neurobiology*. 2020;63:189-97.
6. Bird CM, Burgess N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature reviews neuroscience*. 2008;9(3):182-94.
7. Szőnyi A, Sos KE, Nyilas R, Schlingloff D, Domonkos A, Takács VT, et al. Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation. *Science*. 2019;364(6442):eaaw0445.
8. Ryan PJ, Ma S, Olucha-Bordonau FE, Gundlach AL. Nucleus incertus—an emerging modulatory role in arousal, stress and memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2011;35(6):1326-41.

مطالعه حاضر روشن نمی‌شود و بایستی در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر این، امکان اثرگذاری تعاملات میان سیستم اورکسینرژیک با سیستم گلوتاماترژیک یا آدرنرژیک بر فرایندهای یادگیری و پردازش حافظه را نیز نباید از خاطر برد (۳۳، ۳۴).

از آنجایی که پدیده LTP به‌عنوان یکی از فرایندهای پایه و اساس درگیر در پردازش حافظه و یادگیری شناخته شده است (۳۵)، در مطالعه حاضر اثرات تجویز آنتاگونیست‌های گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ و ۲ بر دامنه PS و شیب EPSP پس از القای LTP در موش‌های صحرایی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخص شد که تزریق TCS-OX2-29 یا SB-334867-A به ناحیه NI و سپس القا LTP بعد از اعمال HFS سبب کاهش قابل توجه دامنه PS گردید، در حالیکه اثر معناداری بر شیب EPSP بر جای نگذاشت. اگرچه مطالعات محدودی در این زمینه صورت گرفته اما مشخص شده است که غیرفعال سازی کامل این منطقه توسط لیدوکائین (مسدود کننده کانال سدیم) بر تمام عملکردهای ناشی از NI، همراه با ایجاد مشکلات شناختی جدی در یادگیری فضایی، تأثیر می‌گذارد (۲۵). همچنین نشان داده شده است که غیرفعال سازی NI توسط لیدوکائین پس از اعمال HFS، تأثیری معنی‌داری بر شیب EPSP و دامنه PS نداشته است (۲۶). با توجه به وجود برخی ابهامات و تناقضات در ترسیم نقش دقیق سیستم اورکسینرژیک، به‌ویژه در ناحیه NI، در القای پتانسیل‌های سیناپسی و متعاقب آن شکل‌گیری انواع اشکال یادگیری و حافظه، انجام مطالعات آتی ضرورت می‌یابد.

نتیجه‌گیری

در نهایت، مطالعه حاضر شواهد قانع‌کننده‌ای در خصوص نقش گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ و ۲ واقع در ناحیه NI در تثبیت یادگیری اجتنابی غیرفعال و نیز القای پتانسیل سیناپسی بلندمدت ارائه می‌کند. اگرچه تا به امروز با ایجاد

9. Banerjee A, Shen P-J, Ma S, Bathgate RA, Gundlach AL. Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of relaxin-3 expression via CRF1 activation. *Neuropharmacology*. 2010;58(1):145-55.
10. Goto M, Swanson LW, Canteras NS. Connections of the nucleus incertus. *Journal of Comparative Neurology*. 2001;438(1):86-122.
11. Blasiak A, Siwiec M, Grabowiecka A, Blasiak T, Czerw A, Blasiak E, et al. Excitatory orexinergic innervation of rat nucleus incertus—Implications for ascending arousal, motivation and feeding control. *Neuropharmacology*. 2015;99:432-47.
12. Chieffi S, Carotenuto M, Monda V, Valenzano A, Villano I, Precenzano F, et al. Orexin system: the key for a healthy life. *Frontiers in physiology*. 2017;8:357.
13. Sakurai T. The role of orexin in motivated behaviours. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15(11):719-31.
14. Sakurai T. Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regulatory peptides*. 1999;85(1):25-30.
15. Sakurai T, Mieda M, Tsujino N. The orexin system: roles in sleep/wake regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1200(1):149-61.
16. Nollet M, Leman S. Role of orexin in the pathophysiology of depression: potential for pharmacological intervention. *CNS drugs*. 2013;27:411-22.
17. Nunez A, Cervera-Ferri A, Olucha-Bordonau F, Ruiz-Torner A, Teruel V. Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *European Journal of Neuroscience*. 2006;23(10):2731-8.
18. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8(3):171-81.
19. Kastman HE, Blasiak A, Walker L, Siwiec M, Krstew EV, Gundlach AL, et al. Nucleus incertus Orexin2 receptors mediate alcohol seeking in rats. *Neuropharmacology*. 2016;110:82-91.
20. Akbari E, Motamedi F, Naghdi N, Noorbakhshnia M. The effect of antagonization of orexin 1 receptors in CA1 and dentate gyrus regions on memory processing in passive avoidance task. *Behavioural brain research*. 2008;187(1):172-7.
21. Zokaei L, Akbari E, Zende del M, Babapour V. The role of orexin 1 and 2 receptors in the accumbens area on passive avoidance memory processing in rats. *Journal of Comparative Pathobiology*. 2024;20(83):4247-54.
22. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition: Elsevier; 2006.
23. Zokaei L, Akbari E, Babapour V, Zende del M. The Modulatory Role of Orexin 1 Receptor in Nucleus Accumbens (NAc) on Spatial Memory in Rats. *Archives of Razi Institute*. 2023;78(4):1285.
24. Lashgari R, Khakpour-Taleghani B, Motamedi F, Shahidi S. Effects of reversible inactivation of locus coeruleus on long-term potentiation in perforant path-DG synapses in rats. *Neurobiology of learning and memory*. 2008;90(2):309-16.
25. Nategh M, Nikseresht S, Khodagholi F, Motamedi F. Nucleus incertus inactivation impairs spatial learning and memory in rats. *Physiology & Behavior*. 2015;139:112-20.
26. Nategh M, Nikseresht S, Khodagholi F, Motamedi F. Inactivation of nucleus incertus impairs passive avoidance learning and long term potentiation of the population spike in the perforant path-dentate gyrus evoked field potentials in rats. *Neurobiology of learning and memory*. 2016;130:185-93.
27. Scammell TE, Winrow CJ. Orexin receptors: pharmacology and therapeutic opportunities. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2011;51(1):243-66.

28. Telegdy G, Adamik A. The action of orexin A on passive avoidance learning. Involvement of transmitters. Regulatory peptides. 2002;104(1-3):105-10.
29. Ardeshiri MR, Hosseinmardi N, Akbari E. The effect of orexin 1 and orexin 2 receptors antagonisms in the basolateral amygdala on memory processing in a passive avoidance task. Physiology & behavior. 2017;174:42-8.
30. Gil-Miravet I, Mañas-Ojeda A, Ros-Bernal F, Castillo-Gómez E, Albert-Gascó H, Gundlach AL, et al. Involvement of the nucleus incertus and relaxin-3/RXFP3 signaling system in explicit and implicit memory. Frontiers in Neuroanatomy. 2021;15:637922.
31. Olucha-Bordonau FE, Albert-Gascó H, Ros-Bernal F, Rytova V, Ong-Pålsson EK, Ma S, et al. Modulation of forebrain function by nucleus incertus and relaxin-3/RXFP 3 signaling. CNS Neuroscience & Therapeutics. 2018;24(8):694-702.
32. Smith CM, Ryan PJ, Hosken IT, Ma S, Gundlach AL. Relaxin-3 systems in the brain—the first 10 years. Journal of chemical neuroanatomy. 2011;42(4):262-75.
33. Noorani SK, Hojati V, Akbari E, Ehsani S, Sakurai T, Ardeshiri MR. The role of interaction between orexin receptors and $\beta 2$ adrenergic receptors in basolateral amygdala in dentate gyrus synaptic plasticity in male rats. Brain Research Bulletin. 2021;177:164-71.
34. Abounoori M, Maddah MM, Ardeshiri MR. Orexin neuropeptides modulate the hippocampal-dependent memory through basolateral amygdala interconnections. Cerebral Circulation-Cognition and Behavior. 2022;3:100035.
35. Muller D, Nikonenko I, Jourdain P, Alberi S. LTP, memory and structural plasticity. Current molecular medicine. 2002;2(7):605-11.