



## Postnatal developmental alterations in the locus coeruleus neuronal fast excitatory postsynaptic currents mediated by ionotropic glutamate receptors of rat

Masoumeh Kouros Arami<sup>1</sup>, Saeed Semnanian<sup>1\*</sup>, Mohammad Javan<sup>1</sup>, Sohrab Hajizadeh<sup>1</sup>, Abdolrahman Sarihi<sup>2</sup>

1. Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Received: 19 April 2010

Accepted: 31 July 2010

### Abstract

**Introduction:** In the present work, spontaneous postsynaptic currents were assessed to investigate the postnatal development of excitatory postsynaptic currents in locus coeruleus neurons.

**Methods:** In this study, AMPA and NMDA receptor-mediated spontaneous synaptic currents in the neurons of locus coeruleus were assessed using whole cell voltage-clamp recording during the first three weeks.

**Results:** The frequency and amplitude of NMDA sEPSCs and the frequency of AMPA sEPSCs were increased in the second and third postnatal weeks compared with these parameters recorded in the first postnatal week. However, the ratio of the AMPA to NMDA current frequency and amplitude was constant until the 3rd postnatal week.

**Conclusion:** These findings suggest that a vast majority of nascent glutamatergic synapses express both functional AMPA and NMDA receptors in the postnatal locus coeruleus, so that AMPA/NMDA sEPSCs remained constant during this period.

**Key words:** locus coeruleus, AMPA/NMDA sEPSCs, development

\* Corresponding author e-mail: ssemnan@modares.ac.ir  
Available online at: www.phypha.ir/ppj

## تغییرات جریان های پس سیناپسی تحریکی سریع با واسطه گیرنده های یونوتروپیکی در نورون های هسته لوکوس سرولئوس موش صحرائی در طی رشد پس از تولد

معصومه کورش آرامی<sup>۱</sup>، سعید سمنانیان<sup>۱\*</sup>، سهراب حاجی زاده<sup>۱</sup>، محمد جوان<sup>۱</sup>، عبدالرحمن صریحی<sup>۲</sup>

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، تهران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان

پذیرش: ۹ مرداد ۸۹

دریافت: ۳۰ فروردین ۸۹

### چکیده

**مقدمه:** در تحقیق حاضر فعالیت سیناپسی خودبخودی هسته لوکوس سرولئوس نوزاد موش های صحرائی را جهت بررسی سیر تکاملی بعد از تولد سیناپس های گلوتاماترژیک آن مورد مطالعه قرار دادیم.

**روش ها:** به همین منظور جریانات پس سیناپسی خودبخودی تحریکی ناشی از گیرنده های AMPA و NMDA هسته لوکوس سرولئوس را در هفته های اول بعد از تولد توسط تکنیک whole cell voltage clamp ثبت نمودیم.

**یافته ها:** در هفته دوم و سوم بعد از تولد دامنه و فرکانس پتانسیل های پس سیناپسی تحریکی خودبخودی ناشی از فعالیت گیرنده های AMPA و NMDA نسبت به هفته اول افزایش یافت ولی نسبت فرکانس وقوع و دامنه AMPA/NMDA sEPSCs ثابت ماند.

**نتیجه گیری:** در هسته لوکوس سرولئوس، سیناپس های گلوتاماترژیک بلافاصله بعد از تولد، شامل بیان هر دو گیرنده AMPA و NMDA است به طوری که شمار گیرنده های AMPA و NMDA در این نورونها متناسب با هم افزایش می یابند.

**واژه های کلیدی:** لوکوس سرولئوس، جریانات پس سیناپسی خودبخودی تحریکی ناشی از گیرنده های AMPA و NMDA، رشد و نمو

### مقدمه

تحریک سیناپسی مغز پستانداران هستند اساس چندین روند نورونی مثل یادگیری و حافظه است. گلوتامات در بیشتر موارد سیناپس های گلوتاماترژیک سریع از طریق دو نوع اصلی گیرنده یونوتروپیک پس سیناپسی یعنی (N-methyl-D-aspartic acid) NMDA و (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate) عمل می کند.

مطالعات قبلی در مورد رشد سیناپس های گلوتاماترژیک و

چگونگی تبدیل مدارهای نورونی نابالغ به الگوهای با ارتباطات بسیار سازمان بندی شده و بالغ هنوز مشخص نشده است. تغییر سیگنالینگ سیناپس های گلوتاماترژیک که واسطه

ssemnan@modares.ac.ir  
www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله:

اول بعد از تولد صورت می گیرد) در سطح نورون ها بطور عملی بیان می شوند [۹].

هر چند در بعضی نقاط مغز فعالیت نورونی هر دو جریان با واسطه NMDA و AMPA را همزمان تنظیم می کند، این سوال مطرح می شود که آیا این همزمانی تنظیم جریانات در نقاط مختلف مغز با انواع متفاوت سلول و الگو های فعالیت مختلف هم وجود دارد؟ [۲۳ و ۲۷].

از جمله دیگر نواحی مغز که تا به حال بررسی نشده است ساقه مغز می باشد که در این ناحیه هسته لوکوس سرولئوس (LC) با حدود ۱۵۰۰ نورون نزدیک سطح شکمی جانبی بطن چهارم در قسمت سری پل مغزی قرار گرفته است. این هسته جزئی از سیستم تعدیل کننده منتشر (diffuse modulatory system) می باشد که انشعابات نورآدرنژیک را به طور گسترده به بیشتر نواحی مغز شامل قشر، هیپوکامپ، تالاموس و طناب نخاعی می فرستد [۲۷ و ۲۹]. از یک طرف ورودی های گلوتاماترژیک به این هسته که به طور عمده از PGI و نیز قشر مغز می آیند [۲۷ و ۲۹] نقش مهمی در تعدیل فعالیت آن دارند. از طرف دیگر میزان تاثیر ورودی های گلوتاماترژیک بستگی به قدرت سیناپسی و نسبت فعالیت گیرنده های NMDA و AMPA در این سیناپس ها دارد.

بنابراین در این مطالعه تغییرات الکتروفیزیولوژیک رشد و نمو پاسخ های سیناپسی تحریکی خودبخودی با واسطه گیرنده های اینوتروپیک گلوتاماتی (AMPA, NMDA) در نورون های هسته لوکوس سرولئوس مورد بررسی قرار گرفت. با این روش تلاش نمودیم فرکانس و دامنه EPSC خود بخودی NMDA و AMPA و نسبت فعالیت این دو را به هم در هفته های اول تا سوم بعد از تولد بدست آوریم تا تغییر قدرت سیناپس های گلوتاماترژیک و در نتیجه تغییر اثر آن ها را بر فعالیت این هسته بسنجیم.

## مواد و روشها

این مطالعه بر روی نوزاد موش های بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار با سن ۷،۱۴ و ۲۱ روزه صورت گرفت. موش ها ابتدا با اتر بیهوش گردیده و با استفاده از قیچی سر آن ها سریع جدا شد و در محلول مایع مغزی-نخاعی مصنوعی (artificial

سهم گیرنده های NMDA و AMPA در نقاط مختلف مغز متفاوت است. در هسته اکومبیس در طی ۴ روز اول بعد از تولد دامنه EPSC (excitatory postsynaptic current) ناشی از NMDA پایین است و سپس تا آخر هفته دوم بعد از تولد شروع به افزایش می کند [۳۰]. در شاخ خلفی نخاع موش های ۷-۲ روزه EPSC ناشی از تحریک گیرنده های NMDA ایجاد می شود ولی در موش های بالغ ۱۲-۱۰ هفته ای هیچگونه EPSC با دخالت صرفاً گیرنده های NMDA متعاقب تحریک ایجاد نمی شود [۱]. در هسته سالیتریوس نیز سیناپس های AMPA وجود دارند ولی کارا نیستند. در مطالعه ای دیگر Groc و همکارانش نشان دادند که سیناپس های گلوتاماترژیک هیپوکامپ به طور بالغ زاده می شوند و گیرنده های AMPA و NMDA هر دو دارای عملکرد فیزیولوژیک هستند [۲].

همچنین در مطالعه ای دیگر معلوم شده که سلول های پیش ساز عصبی گیرنده های AMPA را بیان می کنند و ممکن است گلوتامات را حتی قبل از تشکیل سیناپس ها حس کنند. این موضوع نقش مهم این گیرنده ها را در رشد مراحل بسیار اولیه مغز نشان می دهد [۴].

در سیناپس های گلوتاماترژیک در بلافاصله بعد از تولد سیگنال لینگ AMPA ثابت نیست و می تواند به راحتی مستقل از گیرنده های NMDA و متابوتروپیک بین دو حالت زیر تغییر کند:

یک حالت این که گیرنده های AMPA وجود دارند ولی ناپایداراند (AMPA-labile state) و دیگری اینکه گیرنده های AMPA خاموش اند (AMPA silent state) [۸].

فعالیت همزمان پیش و پس سیناپسی (فعال شدن گیرنده AMPA) این سیناپس را از این شرایط تغییر بین دو حالت به حالت سومی در می آورد که حالت با AMPA بالغ (AMPA mature state) نامیده می شود که در واقع فقط در مراحل مختلف پلاستیسیته تغییر می کند. در مطالعه دیگری مشخص شده این گیرنده ها مستقیماً در تنظیم حرکت هر دو پاهای کاذب و زوائد آکسونی و دندریتی یعنی ساختمان های پیش ساز سیناپسی طی رشد و نمو دخالت دارند. بنابراین هر دو گیرنده های AMPA و NMDA از همان دوره تمایز جنینی اولیه تا دوره سیناپتوژنز (که عمدتاً در جوندگان در هفته های

با مایع داخلی دارای پتاسیم گلوکونات برای ثبت جریانات غشایی پس سیناپسی پر شدند که شامل (mM):

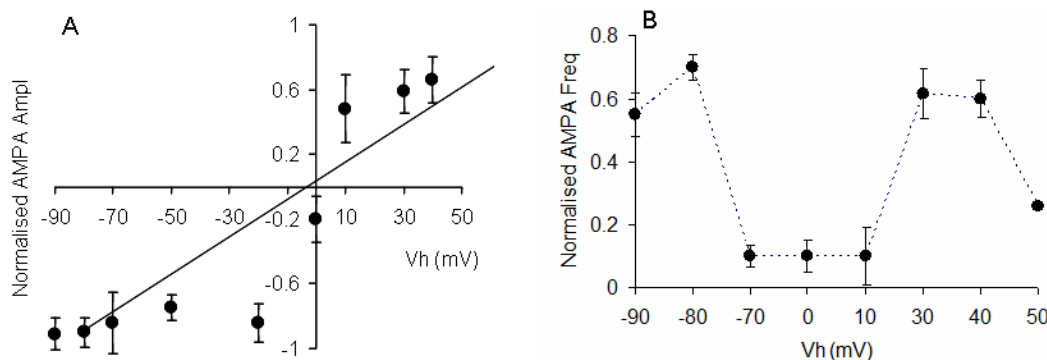
K- gluconate 120, NaCl 6, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, MgATP 2, NaGTP 0.5, EGTA 5, HEPES 10, Phosphocreatine Na<sub>2</sub> 12 با pH=7/4 و اسمولالیت ۲۸۰ میلی اسمول بود [۱۹]. ثبت sEPSC در ACSF بدون Mg<sup>2+</sup> انجام شد تا Mg<sup>2+</sup> موجب بلوک گیرنده های NMDA نشود. بایکوکولین (۵۰ μm) به مایع خارجی اضافه شد تا IPSCها (inhibitory postsynaptic current) را مهار کند و فقط EPSC ها ثبت شوند [۱۴]. همچنین گلایسین (۵۰ μm) که کوفاکتور فعال شدن گیرنده NMDA است به مایع خارجی افزوده شد. ثبت حدود >25 دقیقه پس از انتقال برش ها به محفظه ثبت (recording chamber) صورت گرفت تا منیزیمی که توسط برش از محلول ACSF قبلی (دارای منیزیم) برداشت شده بود از برش ها شسته شود [۲۱]. ACSF بدون Mg<sup>2+</sup> که برای ثبت sEPSCs استفاده می شد ترکیبی مشابه ACSF که در بالا ذکر شد دارد با این تفاوت که فاقد MgCl<sub>2</sub> است. برای ارزیابی این دو sEPSCs مختلف در شرایط ثبت مطلوب ابتدا NMDA sEPSC را در حضور CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) آنتاگونیست گیرنده AMPA) و سپس AMPA sEPSC را در حضور AP5 ((2R)-amino-5-phosphonovaleric acid) آنتاگونیست گیرنده NMDA) در پتانسیل های نگهدارنده مختلف ثبت کردیم [۹].

چون EPSC های ثبت شده در +40 mv ممکن است شامل هر دو جزء AMPA (early component) و NMDA (late component) باشند (شکل ۲). سهم نسبی NMDA در پیک دامنه EPSC مرکب (در +40 mv) را می توان از تفاضل sEPSC های ثبت شده در این ولتاژ با و بدون آنتاگونیست گیرنده NMDA یعنی AP5 به دست آورد [۱۰]. بدین ترتیب دخالت احتمالی کانال های وابسته به ولتاژ هم از نتایج حذف خواهد شد.

پس برای ثبت AMPA sEPSC و NMDA غشا را به ترتیب در پتانسیل های نگهدارنده -۸۰ و +۴۰ میلی ولت قرار دادیم. در پتانسیل نگهدارنده -80mv EPSC های ثبت شده دارای یک شیب صعودی و نزولی سریعتر بودند نسبت به

cerebrospinal fluid:ACSF) سرد حاوی (Mm): NaCl 125, KCl 3, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, CaCl<sub>2</sub> 0.1, D-Glucose 10, Ascorbic Acid 0.4, MgCl<sub>2</sub> 5 [۱۹]. pH برابر ۷/۴ و اسمولالیت ۳۰۰ mOsm) به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفت و با برداشتن استخوان روی سر، بخش جلویی مغز نمایان شده و برداشته می شد حوضچه ای که بر جا می ماند توسط محلول ACSF سرد مشروب می شد. سپس با بریدن قسمت قدامی مغز این بخش با استفاده از اسکالپل در محلول ACSF سرد شده قرار می گرفت. این محلول بطور مداوم با ترکیب اکسیژن ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ (کربوژن) اکسیژنه می گردد. سپس مخچه جدا شده و قطعه ساقه مغز حاوی هسته LC بریده شده و روی صفحه ویبروتوم طوری چسبانده می شد که بخش دمی آن به سمت بالا قرار گیرد. و برش های کروئال با ضخامت ۳۰۰ μm با استفاده از یک ویبریتوم (Vibratome 1000 plus) تهیه گردید برش ها در محلول کربوژنه شده ACSF به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در درجه حرارت ۳۴ تا ۳۶ درجه سانتیگراد انکوبه شده و پس از آن تا هنگام آزمایش در محلول ذکر شده در درجه حرارت اتاق (۲۷-۲۳) °C نگهداری شدند.

سپس نوروئ های LC با استفاده از میکروسکوپ (Zeiss) fixed-stage phase contrast و توسط لنز غوطه ور در آب (water immersion) و نمایش تصویر روی یک مانیتور با استفاده از دوربین مشاهده شدند. ثبت sEPSCs با روش voltage clamp با استفاده از آمپلی فایر 700 B انجام شد. سیگنال ها در ۲ KHz فیلتر شده و در یک کامپیوتر مجهز به برنامه Pclamp ۱۰ ذخیره شدند و ثبت تا بیشتر از ۸ ساعت بعد از برش گیری هم ادامه داشت. برای تهیه میکروالکترودهای شیشه ای جهت ثبت patch clamp از دستگاه کشنده الکتروود افقی (microelectrode puller) شرکت ساتر مدل P-97 استفاده شد. الکترودهای لازم از الکترودهای شیشه ای فیلامنت دار شرکت Clark Electromedical Instruments, USA تهیه می شدند. امپدانس الکترودهای ثبت حدود ۳-۵ MΩ جهت ثبت patch clamp بود. مقاومت سری که بطور مداوم در طی آزمایش چک می شد (هنگام ثبت در صفحه Pclamp مشاهده می شد) بین ۲۰-۶ MΩ بود. داده های ثبت های با مقاومت سری بالاتر از ۲۰ MΩ حذف شدند. پیت ها

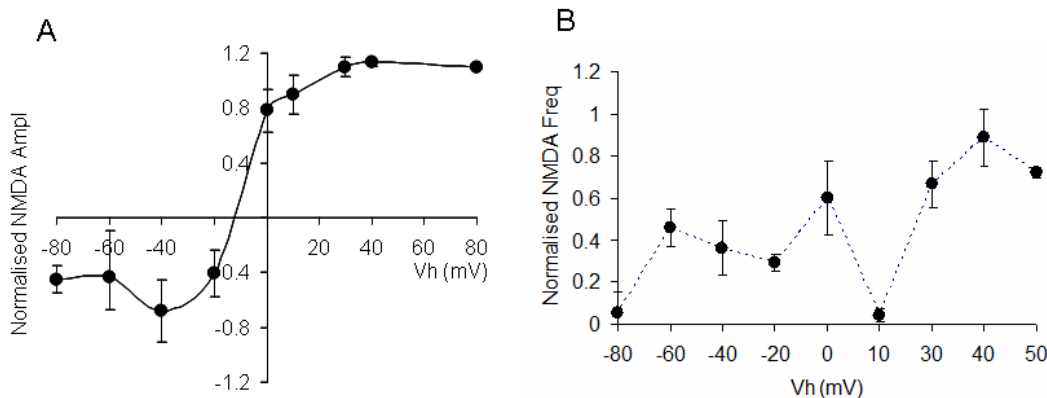


**شکل ۱-** رابطه جریان - ولتاژ و فرکانس - ولتاژ برای AMPA sEPSCs در نورون های هسته لوکوس سرولئوس موش ۷ روزه. A، رابطه جریان - ولتاژ برای AMPA sEPSCs (در حضور ۷۵ میکرومول AP5) در پتانسیل های نگهدارنده از -۹۰ تا +۵۰ میلی ولت. دامنه مثبت نشان دهنده جریان رو به خارج و دامنه منفی نشان دهنده جریان رو به داخل می باشد (n=۶). B، رابطه فرکانس - ولتاژ برای AMPA sEPSCs در پتانسیل های نگهدارنده از -۹۰ تا +۵۰ میلی ولت. فرکانس ها نسبت به فرکانس در ولتاژ -۸۰mV نرمالیزه شده اند (n=۶).

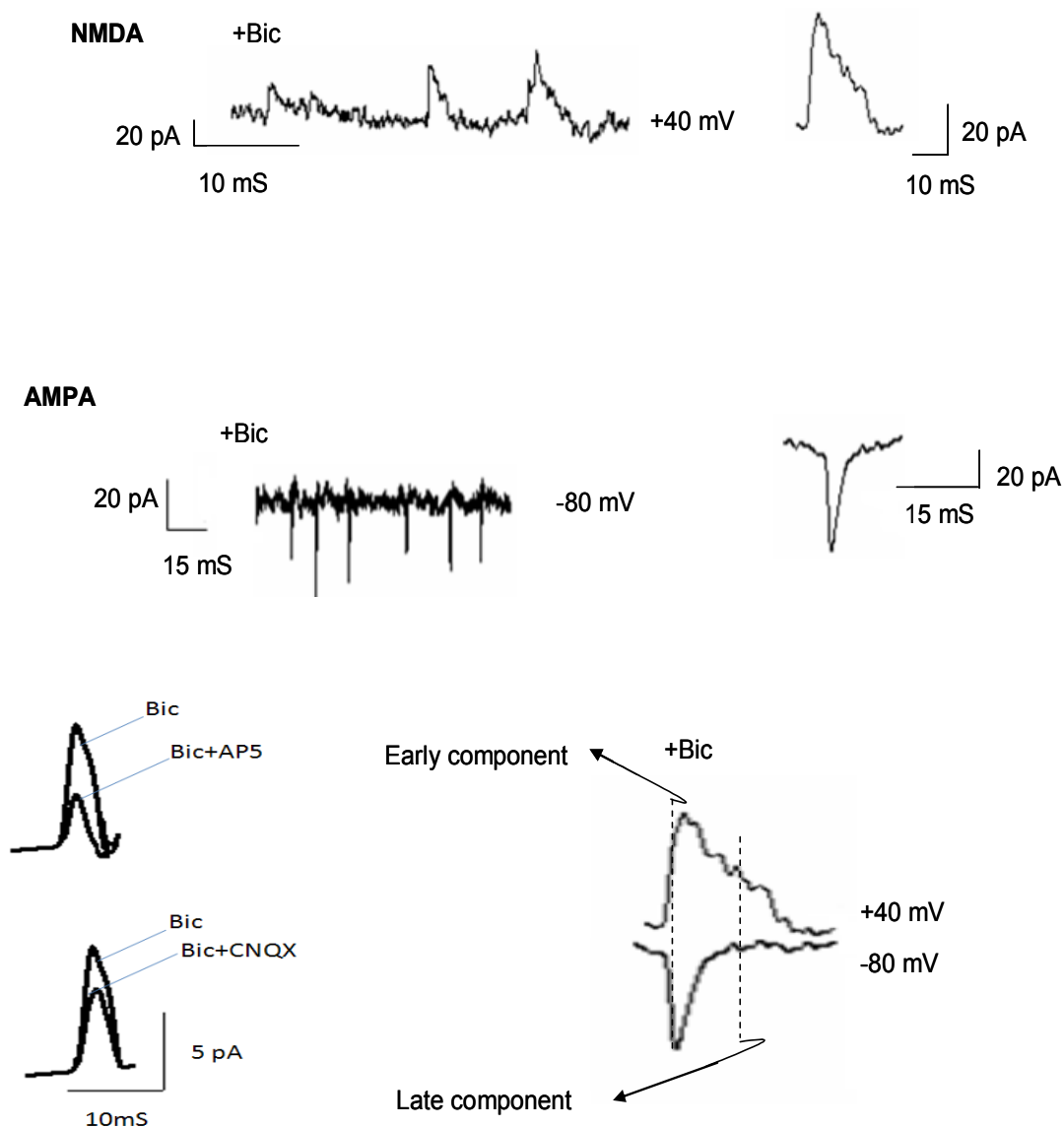
### یافته ها

هدف از این مطالعه مقایسه فرکانس و دامنه و کسر AMPA sEPSC و NMDA در سلول های هسته لوکوس سرولئوس می باشد. در ابتدا AMPA sEPSC و NMDA در پتانسیل های نگهدارنده منفی در شرایط کاهش یا فقدان منیزیم خارج سلولی ثبت شد. تحت این شرایط، تمیز جزء AMPA در sEPSC مشکل است، بنابراین برای تمیز بهتر دو جزء ما سعی کردیم تا AMPA sEPSC و NMDA

EPSC های ثبت شده در پتانسیل +40mV که دارای مرحله نزول آهسته هستند [۲۸و۱۸۵]. این مرحله نزول ناشی از جدا شدن آهسته گلوتامات از گیرنده های مربوطه می باشد. mixed AMPA/NMDA sEPSC مخلوطی از وقایع miniature و چند کوانتایی (multiquantal) است [۷]. برای مقایسه میانگین ها از آزمون one way ANOVA و تست Tukey استفاده شد. در همه محاسبات آماری  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت  $mean \pm SEM$  نشان داده شده است.



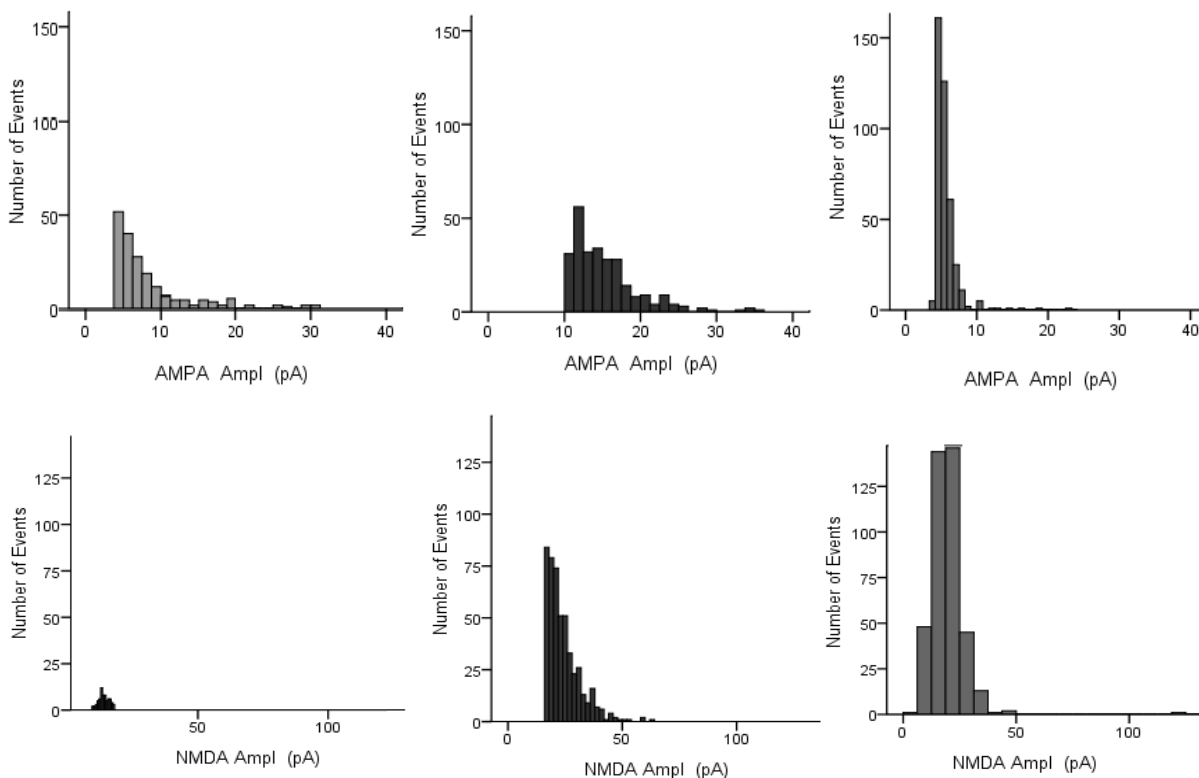
**شکل ۲-** رابطه جریان - ولتاژ و فرکانس - ولتاژ برای NMDA sEPSCs در نورون های هسته لوکوس سرولئوس موش ۷ روزه. A، رابطه جریان - ولتاژ برای NMDA sEPSCs (در حضور ۵۰ میکرومول CNQX). دامنه مثبت نشان دهنده جریان رو به خارج و دامنه منفی نشان دهنده جریان رو به داخل می باشد (n=۶). B، رابطه فرکانس - ولتاژ برای NMDA sEPSCs که نشان می دهد افزایش پلاریزاسیون غشا ورای +۴۰ میلی ولت برای NMDA فرکانس مشاهده شده را افزایش نمی دهد. فرکانس ها نسبت به فرکانس در ولتاژ +۴۰mV نرمالیزه شده اند (n=۶). این منحنی با وجود فقدان  $Mg^{2+}$  خارج سلولی ز شکل است که نشان دهنده بلوک پارشال گیرنده های NMDA توسط منیزیم باقیمانده یا داخل سلولی است.



شکل ۳- نمونه‌های ثبت NMDA & AMPA sEPSCs به ترتیب در  $+40$  mV و  $-80$  mV در نورون‌های هسته لوكوس سرولئوس در طی هفته‌های اول بعد از تولد. ثبت‌های نمونه که نشان دهنده NMDA sEPSCs ثبت شده در  $+40$  mV و AMPA sEPSCs ثبت شده در  $-80$  mV هستند. EPSC‌های ثبت شده در  $+40$  mV شامل هر دو جزء AMPA (early component) و NMDA (late component) مشاهده می‌شود. AMPA EPSC‌های ثبت شده در پتانسیل نگهدارنده  $-80$  mV دارای یک صعودی و نزولی سریعتر هستند ( $n=7$ ). نمونه sEPSCs ها بعد از افزودن Bicuculline, CNQX و AP5 به مایع خارجی.

سطح معکوس تقریباً متقارن است. این امر نشان می‌دهد که فرکانس واقعی AMPA sEPSC بستگی به مثبت یا منفی بودن پتانسیل نگهدارنده سلول پس سیناپسی ندارد [۱۶]. سپس NMDA sEPSC را در حضور  $10 \mu\text{M}$  CNQX در پتانسیل‌های نگهدارنده مختلف ثبت کردیم (شکل ۲). رابطه دامنه-ولتاژ و فرکانس-ولتاژ NMDA sEPSCs در این شکل نشان داده شده است. این روابط نشان می‌دهد که ماکزیمم فرکانس NMDA sEPSC در  $+40$  میلی‌ولت دیده

را در پتانسیل‌های نگهدارنده مختلف ثبت کنیم [۶]. برای ارزیابی شرایط ثبت مطلوب برای تشخیص این دو sEPSCs مختلف در ابتدا AMPA sEPSC را در حضور AP5 ( $75 \mu\text{M}$ ) در پتانسیل‌های نگهدارنده مختلف ثبت کردیم، سپس رابطه دامنه-ولتاژ و فرکانس-ولتاژ AMPA sEPSCs را رسم نمودیم [۱۰]. این روابط نشان می‌دهد که ماکزیمم فرکانس AMPA sEPSC در  $-80$  میلی‌ولت دیده می‌شود (شکل ۱). منحنی فرکانس-ولتاژ AMPA sEPSC اطراف



شکل ۴- هیستوگرام های دامنه NMDA & AMPA sEPSCs ثبت شده از نورون های هسته لوکوس سرولئوس. هیستوگرام های دامنه NMDA & AMPA sEPSCs در پتانسیل نگهدارنده  $-80\text{ mV}$  و  $+40\text{ mV}$  شکل توزیع و دامنه تغییرات AMPA sEPSCs تقریباً تغییری نکرده است. شکل توزیع NMDA sEPSCs تغییر کرده و دامنه تغییرات در طی رشد افزایش یافته است.

نکرده است ولی شکل توزیع NMDA sEPSCs تغییر کرده و

دامنه تغییرات در طی رشد افزایش یافته است (شکل ۴).

برای محاسبه تغییرات فرکانس و دامنه EPSP خودبخودی ناشی از AMPA و NMDA در طی رشد، هر کدام از آن ها را بطور جداگانه در پتانسیل های نگهدارنده  $-80$  و  $+40$  بدست آوردیم. همان طوری که در شکل های ۶ و ۵ مشاهده می شود، فرکانس هر دو EPSC در طی رشد افزایش معنی دار یافته ولی دامنه فقط NMDA افزایش یافته و دامنه AMPA تقریباً ثابت مانده است. با وجود افزایش معنی دار فرکانس جریان های ناشی از هر دو گیرنده، نسبت فرکانس AMPA/NMDA sEPSCs (A/N) در طی رشد افزایش پیدا نکرد. همچنین نسبت دامنه A/N هم در طی رشد تغییر معنی داری از نظر آماری نکرد. همان طوری که در شکل های ۶ و ۵ مشاهده می شود، نسبت فرکانس در سلول های مختلف متفاوت است چرا که در بعضی سلول ها انتقال سیناپسی ناشی از AMPA غالب است و در بعضی انتقال سیناپسی ناشی از

می شود ( شکل ۲).

دامنه های AMPA sEPSC و NMDA طبق فرمول

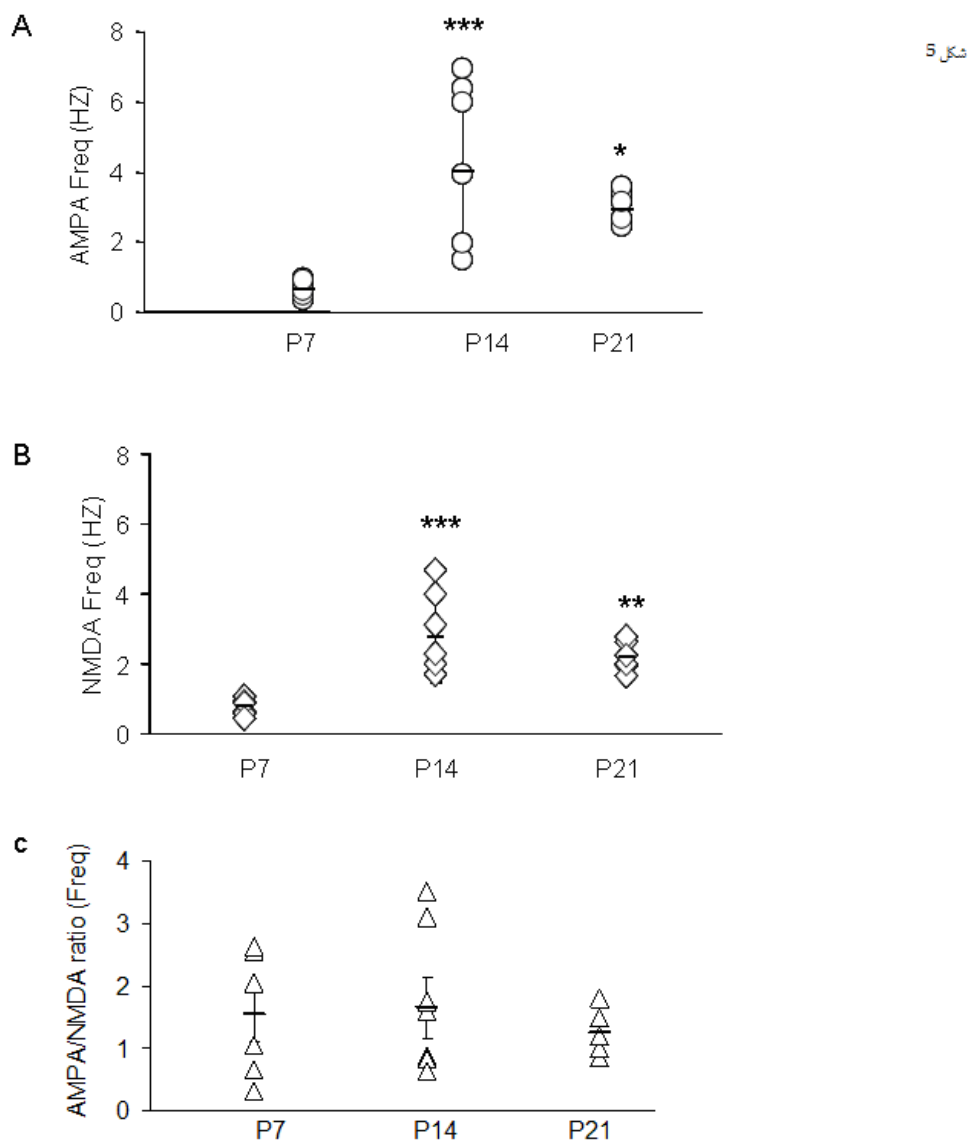
زیر نرمالیزه شده اند:

انحراف معیار/متوسط دامنه سلول ها در همان ولتاژ -

دامنه در ولتاژ خاص)

چون EPSC های ثبت شده در  $+40\text{ mV}$  ممکن است شامل هر دو جزء AMPA و NMDA باشند سهم نسبی NMDA در پیک دامنه EPSC مرکب (در  $+40\text{ mV}$ ) را می توان از تفاضل sEPSC های ثبت شده در این ولتاژ با و بدون آنتاگونیست گیرنده NMDA یعنی AP5 به دست آورد (شکل ۳) [۱۰].

در شکل ۳ نمونه EPSC خود بخودی ناشی از AMPA و NMDA نشان داده شده است که به ترتیب در پتانسیل های نگهدارنده  $-80$  و  $+40$  صورت گرفته است. هیستوگرام های دامنه AMPA sEPSC و NMDA در شکل ۴ دیده می شود. شکل توزیع و دامنه تغییرات AMPA sEPSCs تقریباً تغییری



شکل ۵- فرکانس های AMPA & NMDA sEPSCs در طی هفته های اول بعد از تولد.

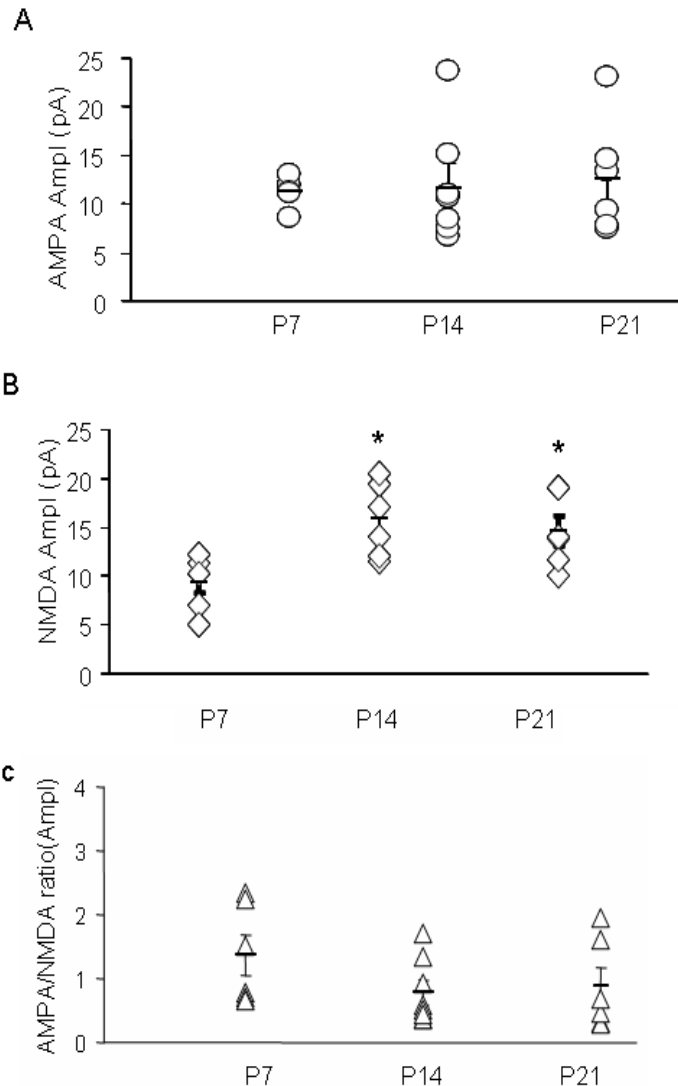
الف- فرکانس AMPA sEPSCs در هفته اول، دوم و سوم بعد از تولد. فرکانس در هفته دوم ( $p < 0.001$ ) و سوم نسبت به هفته اول ( $p < 0.05$ ) افزایش معنی دار یافته است  
 ب- فرکانس NMDA sEPSCs در طی این مدت. فرکانس در هفته دوم ( $p < 0.001$ ) و سوم نسبت به هفته اول ( $p < 0.01$ ) افزایش معنی دار یافته است ج- نسبت A/N برای فرکانس در طی رشد. این نسبت در طی رشد ثابت مانده است.

اول بعد از تولد sEPSC که ناشی از هر دو گیرنده AMPA و NMDA بود مشاهده شد. گیرنده های AMPA و NMDA در محل های پس سیناپسی در خارهای دندریتی و Shaft تغلیظ شده اند [۳ و ۲۳]. بلافاصله بعد از تولد، سیناپس های گلوتاماترژیک عمدتاً سیناپس های shaft یا filopodial هستند. در طی هفته دوم سیناپس های spine که بزرگتر از قبلی ها هستند ظاهر شده و سیناپس های shaft شروع به

NMDA

## بحث

وجود وقایع سیناپسی خودبخودی شاهدهی بر آزادسازی خودبخودی ناقل عصبی و اسپایک های خودبخودی در سیناپس های آوران به LC می باشد [۱۲]. و از همان هفته



شکل ۶- دامنه های NMDA & AMPA sEPSCs در طی هفته های اول بعد از تولد.

الف- دامنه AMPA sEPSCs در طی هفته اول، دوم و سوم بعد از تولد. ب- دامنه NMDA sEPSCs در طی این مدت. دامنه در هفته دوم ( $p < 0.05$ ) و سوم نسبت به هفته اول ( $p < 0.05$ ) افزایش معنی دار یافته است ج- نسبت AMPA/NMDA برای دامنه در طی رشد. این نسبت در طی رشد ثابت مانده است.

سلول موجب یک بلوک پارشال گیرنده های NMDA شده و منحنی را در پتانسیل های هیپرپلاریزه غشایی دچار تصحیح (rectification) می کند. در سلول های مختلف حساسیت گیرنده های NMDA به  $Mg^{2+}$  متفاوت است مثلاً در سلول- های گرانول مخچه پایین بودن این حساسیت موجب خطی شدن منحنی I/V شده است [۱۱].

نتایج حاصل از ثبت EPSC خودبخودی در هسته لوکوس سرولئوس نشان می دهد که فرکانس هر دو AMPA sEPSC و NMDA در طی هفته های اول بعد از تولد افزایش نشان

کاهش می کنند [۱۵ و ۳۰].

وجود هر دو گیرنده AMPA و NMDA بلافاصله بعد از تولد در غشا پس سیناپسی سیناپس های گلوتاماترژیک قشر و هیپوکامپ نیز دیده شده است. منحنی I/V برای NMDA در پتانسیل های منفی در نتیجه بلوک ناشی از منیزیم یک مقاومت ساده (simple resistor) با شیب منفی را نشان می دهد. چون ثبت های sEPSC در ACSF بدون  $Mg^{2+}$  صورت می گیرد این منحنی تمایل به خطی بودن دارد ولی  $Mg^{2+}$  اندوژن خود slice یا مایع اینترنال یا داخل خود

هستند و یک تعداد از کلاسترهای سیناپسی (NMDA ۶۷٪) به خصوص آن‌هایی که در قسمت‌های انتهایی دندریت‌ها هستند فاقد گیرنده‌های AMPA می‌باشند [۲۵].

از طرف دیگر در مطالعه‌ای که Groc و همکارانش در مورد سیناپس‌های گلوتاماترژیک در هیپوکامپ انجام دادند معلوم شد که هر دو نوع گیرنده از غشاء پلاسمایی از طریق اندوسیتوز با واسطه کلاترین به داخل ذخایر داخل سلولی می‌روند. اندوسیتوز گیرنده گلوتامات در طی رشد کاهش می‌یابد که در این میان سرعت اندوسیتوز AMPAR بیشتر از NMDAR می‌باشد [۹]. همچنین تعداد گیرنده‌های باز در سیناپس‌ها از یک آزمایش به آزمایش دیگر متفاوت است که می‌تواند در اثر عواملی چون کلیرنس متفاوت گلوتامات از شکاف سیناپسی یا غیر فعال شدن متفاوت AMPA و NMDA باشد [۲۰ و ۲۸].

بنابر شواهد و دلایل مذکور احتمال دارد از یک طرف افزایش تعداد سیناپس‌ها و از طرفی عواملی چون بالاتر بودن سرعت اندوسیتوز AMPA نسبت به NMDA، فیلتر شدن بیشتر AMPA نسبت به NMDA در طول دندریت، تفاوت احتمال باز بودن آن‌ها و تفاوت نسبت توزیع آن‌ها در سیناپس‌ها موجب افزایش معنی‌دار دامنه NMDA sEPSC و عدم افزایش معنی‌دار دامنه AMPA sEPSC در طی رشد شده باشد [۲۶].

هیستوگرام‌های دامنه AMPA sEPSC و NMDA نیز شاهده‌ی بر این قضیه هستند. به این ترتیب که هیستوگرام دامنه AMPA sEPSC نشان می‌دهد که دامنه‌های پایین وقوع بالاتری دارند که این می‌تواند به موازات نتیجه قبلی مبنی بر عدم افزایش معنی‌دار دامنه AMPA در طی رشد باشد. از طرفی هیستوگرام دامنه NMDA sEPSC بیانگر این است که در طی رشد وقوع sEPSC‌ها بخصوص sEPSC‌های با دامنه‌های بالا بیشتر می‌شود. این قضیه موافق نتیجه قبلی مبنی بر فزونی یافتن معنی‌دار دامنه NMDA در طی رشد می‌باشد.

با وجود نتایج مذکور نسبت دامنه‌های A/N در P7, P14, P21 ثابت بود و با وجود ثبات A/N به نظر نمی‌آید که گیرنده‌های NMDA بطور معنی‌دارتر از گیرنده‌های AMPA در انتقال سیناپسی خودبخودی نقش داشته باشند. ثبات نسبت

داده‌اند. افزایش فرکانس می‌تواند ناشی از افزایش درخت دندریتی (dendritic tree) و در نتیجه افزایش تعداد سیناپس‌های هر سلول باشد. خصوصیت حساس به ولتاژی علاوه بر خصوصیت دریچه لیگاندی گیرنده‌های NMDA باعث شده که آن‌ها هم زمانی دپلاریزاسیون پس سیناپسی و آزادسازی گلوتامات را در سیناپس تشخیص داده و پیک ثانویه کلسیم را به داخل سلول پس سیناپسی تزریق کنند. افزایش کلسیم حاصله می‌تواند تغییرات سیناپسی شامل افزایش تعداد و اندازه سیناپس‌ها را ایجاد کند [۱ و ۱۳]. بنابر این ممکن است افزایش فرکانس sEPSCs در نتایج حاضر در اثر افزایش فعالیت سیناپسی در طی رشد و در نتیجه افزایش انشعابات دندریتی و تعداد سیناپس‌ها بوده باشد [۱۷ و ۲۴].

طبق نتایج حاصله در این مطالعه دامنه NMDA sEPSCs در طی هفته‌های دوم و سوم نسبت به هفته اول افزایش معنی‌دار یافته ولی این تغییر در دامنه AMPA sEPSCs مشاهده نشد. پیک دامنه EPSC نسبت مستقیم با تعداد گیرنده‌های گلوتاماتی دارد، همچنین می‌تواند منعکس‌کننده احتمال باز بودن (open probability) باشد. از مطالعات قبلی مشخص شده که این دو گیرنده در طی دوره‌های کوتاه زمانی می‌توانند تا حدودی مستقل از هم تنظیم شوند و جریانات گیرنده AMPA در غیاب جریانات گیرنده NMDA می‌توانند رشد کنند [۲۸ و ۵]. همچنین افزایش انشعابات دندریتی موجب افزایش فیلتر شدن sEPSCs در طول دندریت‌ها (cable filtering) می‌شود و چون ثبت از جسم سلولی صورت می‌گیرد sEPSCs در طول دندریت‌ها کاهش می‌یابند. در این میان دامنه AMPAR sEPSCs سریعتر، بیشتر از NMDA sEPSCs که آهسته‌تر است کاهش می‌یابد. شاید این امر دلیلی بر عدم افزایش دامنه sEPSCs AMPA در طی رشد بوده باشد و همچنین موجب شود که نسبت دامنه A/N زیر حد واقعی تخمین زده شود. تعداد گیرنده‌های AMPA و NMDA سیناپسی بستگی به تعادل دینامیکی بین ذخایر گیرنده‌های سیناپسی و غیر سیناپسی (داخل سلولی و غشاء خارج سیناپسی) دارد [۹]. در مطالعه‌ای که توزیع گیرنده‌های AMPA و NMDA را در سطح سلول بررسی کردند مشخص شده که ۲۲٪ کلاسترهای گیرنده NMDA غیر سیناپسی هستند که فاقد گیرنده‌های AMPA

تقویت و حفظ سیناپس های قوی و تضعیف سیناپس های ضعیف تر است، چون یک سطح مشابه ارتباط پیش و پس سیناپسی موجب ورود  $Ca^{2+}$  بیشتر در سیناپس با گیرنده های A و N بیشتر می شود (نسبت به سیناپسی که A و N کمتر دارد یعنی ضعیف است) [۲۸].

نتیجه نهایی اینکه در سیناپس های گلوتاماترژیک هسته لوکوس سروئوس هر دوگیرنده NMDA و AMPA همزمان از همان هفته اول پس از تولد فانکشنال بوده و سیگنالینگ با واسطه هر دوگیرنده صورت می گیرد. بنابراین سیگنالینگ در سیناپس های گلوتاماترژیک هسته لوکوس سروئوس دوگانه است.

### سپاسگزاری

این مقاله قسمتی از پایان نامه مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس می باشد و با حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران صورت پذیرفته که محققان بدین وسیله از حمایت مالی آن دانشگاه و موسسه کمال تشکر را دارند.

## References

- [1] Baba H, Doubell TP, Moore KA, and Woolf CJ, Silent NMDA receptor-mediated synapses are developmentally regulated in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neuro Physiol* 83 (2000) 955-962.
- [2] Balland B, Lachamp P, Kessler JP, Tell F, Silent synapses in developing rat nucleus tractus solitarii have AMPA receptors. *J Neurosci* 28 (2008) 4624-34.
- [3] Baude A, Nusser Z, Molnar E, McIlhinney RA, Somogyi P: High resolution immunogold localization of AMPA type receptor subunits at synaptic and non-synaptic sites in rat hippocampus. *Neurosci* 69 (1995) 1031-1055.
- [4] Bottjer SW, Silent synapses in a thalamo-cortical circuit necessary for song learning in zebra finches. *J Neurophysiol* 94 (2005) 3698-707.
- [5] Carnignoto G and Vicini S, Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. *Science* 258(2000) 1007-1011.
- [6] Colonnese MT, Shi J, and Constantine-Paton M, Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation of NMDA currents, but does not affect AMPA/Kainate currents. *J Neurophysiol* 89(2003) 57-68.
- [7] Corlew R, Wang Y, Ghermazien H, Erisir A, and Philpot BD, Developmental Switch in the Contribution of Presynaptic and Postsynaptic NMDA Receptors to Long-Term Depression. *J Neurosci* 27(2007) 9835-9845.
- [8] Durand GM, Kovalchuk Y, and Konnerth A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381(1996) 71-75.
- [9] Groc L, Gustafsson B, and Hanse E, Spontaneous Unitary Synaptic Activity in CA1 Pyramidal Neurons during Early Postnatal Development: Constant

- Contribution of AMPA and NMDA Receptors. *J Neurosci* 22 (2002) 5552-5562.
- [10] Groc L, Gustafsson B, and Hanse E, AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there. *TINS* 29(2006) 132-139.
- [11] Hestrin S, Nicoll RA, Perkel DJ, Sah P, Analysis of excitatory synaptic action in the rat hippocampus using whole cell recording from thin slices. *J Physiol (Lond)* 422(1990) 203–225.
- [12] Hickmott PW and Constantine-Paton M, The Contributions of NMDA, Non-NMDA, and GABA Receptors to Postsynaptic Responses in Neurons of the Optic Tectum. *J Neurosci* 13 (1993) 4339-4353.
- [13] Hsia AY, Malenka RC, and Nicoll RA, Development of Excitatory Circuitry in the Hippocampus. *J Neurophysiol* 79 (1998) 2013-2024.
- [14] Kogaa H, Ishibashia H, Shimadaa H, Jangb S, Nakamura TY, Nabekura J, Activation of presynaptic GABAA receptors increases spontaneous glutamate release onto noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Brain Res* 1046 (2005) 24 –31.
- [15] Koji Y, Rebekah C, Benjamin D, Visual deprivation modifies both presynaptic glutamate release and the composition of perisynaptic/extrasynaptic NMDA receptors in adult visual cortex. *J Neurosci* 25(2005) 11684-11692.
- [16] Liao D, Hessler NA, Malinow R, Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375(1995) 400-404.
- [17] Lopez de Armentia M and Sah P, Development and Subunit Composition of Synaptic NMDA Receptors in the Amygdala: NR2B Synapses in the Adult Central Amygdala. *J Neurosci* 23(2003) 6876-6883.
- [18] Lopez-Gallardo M, Prada C, Spatial and temporal patterns of morphogenesis of hippocampal pyramidal cells: study in the early postnatal rat. *Hippocampus* 11 (2001) 118–131.
- [19] Marinelli S, Vaughan C.W, Christie M. and Connor M, Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus In vitro. *J Physiol* 543(2002) 531-540.
- [20] Min MY, Rusakov DA, and Kullmann DM, Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 21(1998) 561-570.
- [21] Myme C I O, Sugino K, Gina G, Turrigiano and Sacha BN, the NMDA-to-AMPA Ratio at Synapses onto Layer 2/3 Pyramidal Neurons Is Conserved Across Prefrontal and Visual Cortices. *J Neurophysiol* 90 (2003) 771-779.
- [22] O'Brien RJ, Lao LF, Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 8(1998) 364-9.
- [23] Petralia RS, Wenthold RJ: Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comput Neural* 318(1992) 329-354.
- [24] Pokorny J, Yamamoto T, Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. *Brain Res Bull* 7(1981) 113–120.
- [25] Rao A and Craig AM, Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* 19 (1997) 801-12.
- [26] Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinvik E, Ottersen OP, Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2(1999) 618–624.
- [27] Van Bockstaele EJ, Garcia-Hernandez F, Foxa K, Alvarez VA, Williams JT, Expression of connexins during development and following manipulation of afferent input in the rat locus coeruleus. *Neurochem Int* 45(2004) 421–428.
- [28] Watt AJ, van Rossum MC, MacLeod KM, Nelson SB, Turrigiano GG, Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron* 26(2000) 659-70.
- [29] Williams JT, North RA, Shefner SA, Nishi S, Egan TM. Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience* 13(1984) 137- 156.
- [30] Zhang L, Warren RA, Postnatal development of excitatory postsynaptic currents in nucleus accumbens medium spiny neurons. *Neuroscience* 154(2008) 1440-9.