

## بیان گیرنده 2A سوماتواستاتین و mRNA پرپروتاکی کینین A در نرون‌های بولبواسپینال C1 موش صحرایی

اکبر پژهان<sup>۱</sup>، چون لی<sup>۲</sup>، پال پیلوسکی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استادیار فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

<sup>۲</sup> گروه فیزیولوژی دانشگاه سیدنی، گروه جراحی اعصاب بیمارستان رویال، سیدنی، استرالیا

نشانی نویسنده مسؤول: سبزوار، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دکتر اکبر پژهان

E-mail: pejhan\_a@yahoo.com

وصول: ۸۷/۲/۱، اصلاح: ۸۷/۳/۲۲، پذیرش: ۸۷/۶/۱۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** نرون‌های تحریک‌کننده سمپاتیکی که از قسمت سری ناحیه شکمی - جانبی بصل‌النخاع (RVLM) منشأ گرفته و به نخاع منشعب می‌شوند، برای حفظ تون سمپاتیکی پایه و جمع‌بندی رفلکس‌های قلبی - عروقی ضروری است. از طرفی کاتکولامین‌ها، ماده P و سوماتواستاتین در تعدیل فشارخون در ساقه مغز نقش دارند. هدف از مطالعه حاضر این بود که در نرون‌های C1 بصل‌النخاع که حاوی mRNA پرپروتاکی کینین A (PPT-A) بوده و به نخاع منشعب می‌شوند، آیا گیرنده 2A سوماتواستاتین (SST2A) هم بیان می‌شود یا خیر.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی که بر روی ۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد Sprague-dawley انجام شد، بیان ژن PPT-A و حضور گیرنده SST2A در نرون‌های C1 ناحیه RVLM به کمک مخلوطی از تکنیک‌های نشانه‌گذاری رو به عقب توسط تزریق زیر واحد بتای کلراتوکسین (CTB)، هیبریدسازی درجا (ISH) و ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. برای توصیف داده‌ها نیز از درصد و میانگین استفاده شد.

**یافته‌ها:** بیشتر نرون‌های RVLM که وارد نخاع می‌شوند (نرون‌های CTB+) از نوع C1 هستند، یعنی حاوی آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز (TH+) می‌باشند. این نرون‌ها همچنین حاوی mRNA PPT-A یا گیرنده SST2A هستند. اما هیچ نرونی که هم دارای mRNA مربوط به PPT-A بوده و هم گیرنده SST2A داشته باشد، مشاهده نگردید.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که نرون‌های ناحیه C1 بصل‌النخاع که به داخل نخاع منشعب می‌شوند، از نظر بیان mRNA PPT-A یا گیرنده SST2A به صورت دو گروه نرونی متفاوت بوده و ممکن است اثرات تعدیلی متفاوتی بر رفلکس‌های قلبی - عروقی داشته باشند. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۵/ شماره ۲/ صص ۹۷-۸۸).

**واژه‌های کلیدی:** قسمت سری ناحیه شکمی - جانبی بصل‌النخاع، پرپروتاکی کینین A، گیرنده 2A سوماتواستاتین.

### مقدمه

قسمت سری ناحیه شکمی - جانبی بصل‌النخاع (RVLM)

شروع شده و به نرون‌های پیش عقده‌ای سمپاتیک نخاع

نرون‌های تحریک‌کننده سیستم سمپاتیک که از

منشعب می‌شوند، برای حفظ تون فعالیت سمپاتیکی ضروری هستند (۱). همچنین RVLM برای هماهنگی و جمع‌بندی رفلکس‌های قلبی - عروقی از قبیل بارورفلکس، کمورفلکس و رفلکس‌های پیکری - سوماتیکی و نیز تعدیل مرکز تنفس از طریق اثر بر خروجی سیستم سمپاتیک ضروری است (۲). باتوجه به اهمیت این رفلکس‌ها در تنظیم اعمال قلبی - عروقی، مطالعه اثر تعدیلی نرون‌های تحریک‌کننده سمپاتیکی در ناحیه RVLM یکی از زمینه‌های جذاب پژوهشی است.

ماده P حاصل از mRNA پرپروتاکی کینین (PPT-mRNA) (PPT-A) و گیرنده آن یعنی گیرنده نروکینین ۱ (NK-1) در تنظیم مرکزی سیستم قلبی - عروقی دخیل هستند. تزریق ماده P به داخل هسته راه منزوی (NTS) باعث تعدیل رفلکس بارورسپتوری می‌شود (۳،۴). همچنین دیده شده است که تزریق ماده P به این هسته از طریق فعال کردن گیرنده NK-1 یا اعمال محرک دردزا به حیوان از طریق کاهش فعالیت اعصاب پاراسمپاتیک باعث افزایش فشارخون و ضربان قلب می‌شود (۵،۶). پپتیدهای تاکی کینین در نواحی خاصی از ساقه مغز مثل NTS، ناحیه پیرامیدال و ناحیه میانی قسمت شکمی ساقه مغز که در دریافت محرک‌های شیمیایی نقش دارند، دیده می‌شوند. نرون‌های این نواحی ژن پرپروتاکی کینین را بیان می‌کنند و دارای ماده P و نروکینین A هستند که ممکن است یک نقش تعدیلی در بروز پاسخ‌های قلبی - عروقی نسبت به تغییرات غلظت  $H^+$  و  $CO_2$  مایع خارج سلولی داشته باشد (۷). ناحیه RVLM نیز دارای پایانه‌های عصبی و گیرنده‌های NK-1 می‌باشد که به طریق ایمونوسیتوشیمی به اثبات رسیده است (۸،۹).

همچنین دیده شده است که سوماتواستاتین و گیرنده‌های آن در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی و محیطی حیوانات بالغ و همچنین حیوانات در حال رشد پخش شده‌اند. توزیع گسترده سوماتواستاتین و گیرنده‌های آن حکایت از آن دارد که سوماتواستاتین در بسیاری از

اعمال بیولوژیک نقش دارد (۱۰). محل و مقدار سوماتواستاتین به کار رفته برای اثرات قلبی - عروقی آن بسیار مهم است. سوماتواستاتین یک اثر مهاری نیز دارد (۱۱). تعدادی از نرون‌های C1 در RVLM که به نرون‌های پیش عقده‌ای سمپاتیکی قلب و بخش مرکزی غده آدرنال منشعب می‌شوند، دارای واکنش ایمونولوژیکی مثبت نسبت به ماده P و سوماتواستاتین هستند (۱۲،۱۳). همچنین نرون‌های حاوی سوماتواستاتین در کمپلکس Pre-Botzinger دیده می‌شود که محل اصلی ایجادکننده ریتم تنفس در بصل‌النخاع می‌باشد (۱۴). گیرنده  $SST_2$  در چندین ناحیه سیستم عصبی مرکزی موش صحرایی مثل کورتکس، شبکیه چشم، هیپوتالاموس، ماده خاکستری دور قنات سیلویوس، هسته کمانی و همچنین هسته مبهم شناسایی شده است (۱۵). در تحقیقات قلبی نشان داده شده است که PPT-mRNA همراه با آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز (TH) در نرون‌های C1 ناحیه RVLM هم وجود دارد و بسیاری از این نرون‌ها به داخل نخاع منشعب می‌شوند (۱۶). همچنین یافته‌های اولیه آزمایشگاهی نشان داده است که بخشی از نرون‌های بولواسپینال و همچنین نرون‌های C1 بولواسپینال دارای گیرنده  $SST_2A$  می‌باشند. با توجه به این که سوماتواستاتین و ماده P دارای اثرات آنتاگونیستی فیزیولوژیک مستقیم روی پاسخ‌های بدن هستند (۱۷،۱۸). هدف از مطالعه حاضر پاسخ به این سؤال بود که آیا گیرنده‌های  $SST_2A$  در نرون‌های C1 بولواسپینال حاوی PPT-mRNA به‌طور همزمان بیان می‌شود یا خیر.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت توصیفی بر روی ۱۲ سر موش صحرایی نژاد Sprague-Dawely با وزن ۵۰۰-۳۵۰ گرم و با موافقت انجمن حمایت از حیوانات و کمیته اخلاق بیمارستان رویال سیدنی و مطابق با قوانین مربوط به مراقبت و استفاده از حیوانات برای اهداف علمی در

استرالیا انجام شد. در این مطالعه، در هر گروه حداقل سه موش بررسی گردید.

### روش نشانه‌گذاری رو به عقب نرون‌های

**منشعب شده به نخاع توسط CTB:** تزریقات CTB (واحد بتای کلراتوکسین) به داخل طناب نخاعی سینه‌ای ( $T_1-T_2$ ) سه روز قبل از کشتن حیوانات و قبل از آن که مغز حیوانات برای آزمایشات هیبریداسیون درجا (ISH) و ایمونوهیستوشیمی جمع‌آوری شود، انجام می‌شد. موش - های صحرایی در ابتدا توسط پتوباریتال سدیم (i.p)  $60\text{ mg/kg}$  بیهوش شده و ستون نخاعی در سطح  $T_1-T_2$  آشکار می‌شد. CTB ( $200$  نانولیترا  $1\%$  درصد، List, Campbell, CA, USA) به طور دو طرفه به داخل طناب نخاعی قطعات  $T_1-T_2$  در ناحیه ستون سلولی میانی - جانبی نخاع (IML) یعنی  $0.5$  میلی‌متر جانبی نسبت به خط میانی و  $0.9$  میلی‌متر شکمی نسبت به سطح پشتی تزریق می‌شد. محل‌های تزریق CTB در نخاع به روش ایمونوهیستوشیمی برای CTB مشخص می‌شد و برش - های نخاعی توسط نیکل - دی آمینوبنزدین رنگ‌آمیزی می‌شد (۱۶).

### آماده‌سازی بافت مغز: سه روز پس از تزریق

CTB که حیوانات دوره ریکاوری را طی کردند، توسط پتوبیتال سدیم ( $70\text{ mg/kg}$  i.p) عمیقاً بیهوش شده و توسط  $250$  میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم  $0.9\%$  درصد به طریق داخل قلبی پرفیوز می‌شدند و سپس توسط  $250$  میلی‌لیتر محلول پارافرمالدئید در بافر فسفات ( $0.1\text{M}$ ) و  $\text{pH}=7.4$  فیکس می‌شدند. ساقه مغز جدا شده و توسط همان محلول فیکساتور در دمای  $4^\circ\text{C}$  فیکس می‌شد و فردای آن روز به کمک میکروتوم برش‌های کرونال  $40\text{ }\mu\text{m}$  تهیه می‌شد (۱۶).

### آماده‌سازی ریبوپروب‌های نشاندار شده با

**دیگوکسی ژنین:** هم پروب‌های آنتی سنس و هم پروب - های سنس هدف  $673\text{ bp}$  برای PPT-A mRNA موش صحرایی به روش زیر ساخته شد: یک قطعه DNA PPT-

A در ابتدا به روش PCR از cDNA مغز موش صحرایی به کمک پرایمرهای رو به جلو و معکوس و توسط پروموتورهای SP6 و T7 متصل شده به انتهای  $5'$  به ترتیب تکثیر شد. سپس ریبوپروب‌های سنس و آنتی سنس در *in vitro* با به‌کار بردن دیگوکسی 11-UTP (Roche Applied sciences, Mannheim, Germany) و T7 یا سیستم تولید RNA با قطعات بزرگ SP6 (Promega) Ribomax نسخه‌برداری شد (۱۶).

### ترکیب روش‌های هیبریداسیون درجا و

**ایمونوهیستوشیمی:** یک روش ترکیبی برای هیبریداسیون درجا و ایمونوهیستوشیمی به کار رفت تا نرون‌های دارای PPT-A mRNA نشاندار شده با دیگوکسی ژنین را آشکار نماید یا فعالیت ایمونولوژیکی برای آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز (TH)، گیرنده  $2A$  سوماتواستاتین (SST2A) و CTB را نشان دهد (۱۶). برش‌های مغز موش صحرایی به مدت  $2$  ساعت در دمای  $58^\circ\text{C}$  در بافر بدون پروب هیبرید می‌شدند. سپس پروب بافر اضافه می‌شد تا به یک غلظت نهایی  $250-100\text{ mg/ml}$  برسیم و برش‌های مغز در طول شب در دمای  $58^\circ\text{C}$  در این محلول غوطه‌ور بود.

بعد از هیبریداسیون، برش‌ها شسته می‌شد. سپس برش‌ها در محلول آنتی‌بادی اولیه آلکالین فسفاتازکونژوگه شده توسط آنتی دیگوکسی ژنین خرگوش، آنتی TH موش، آنتی SST2A خوکچه هندی و آنتی CTB گوسفند که به محلول بافر اضافه می‌شد، به مدت  $48$  ساعت در دمای  $4^\circ\text{C}$  اینکوبه می‌شدند. پس از شستن برش‌ها در بافر  $\text{pH}=7.4$ ، TPBS، TH توسط اینکوبه کردن برش‌ها در طول شب توسط رنگ Amca کونژوگه شده با IgG الاغ بر ضد موش، SST2A با رنگ  $\text{Cy}^3$  کونژوگه شده با IgG الاغ بر ضد خوکچه هندی و CTB با FITC کونژوگه شده با IgG الاغ بر ضد گوسفند مشخص می‌شدند. نرون‌های نشاندار شده درجا توسط دیگوکسی ژنین، توسط واکنش‌های کالری‌متری با استفاده از نمک‌های نیترو بلوترا زولیوم

سه ماده نشاندار مثبت در نظر گرفته شدند که تصاویر کلاً با هم در همان سطح کانونی هم پوشانی کامل داشته باشند. تصاویر گرفته شده توسط یک دوربین دیجیتال و یک نرم افزار پردازش شد. نرون های نشاندار شده در یک طرف لام، جایی که نرون های نشانه گذاری شده با CTB خوب و واضح بوده از قسمت دمی به طرف قسمت سری ناحیه شکمی - جانبی بصل النخاع (VLM) مشخص شد. برای توصیف داده ها از روش های آمار توصیفی استفاده شد و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (SEM) و درصد گزارش شده است.

### یافته ها

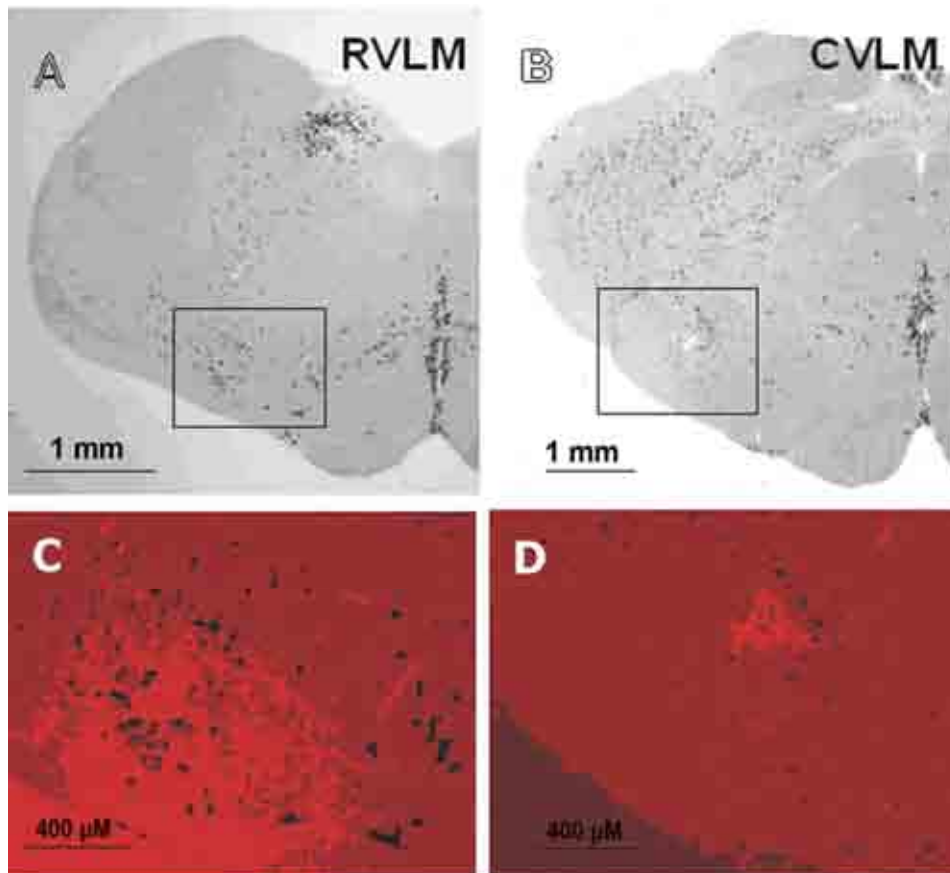
مکان یابی نرون های PPT-A+ در VLM: نرون-

های PPT-A+ نشاندار شده توسط دیگوکسی ژنین فقط

(NBT) و ۵- برومو- ۴- کلو- ۳- ایندول فسفات (BCIP) مشخص می شدند.

### تصویربرداری از نمونه ها: برش ها به طور متوالی

روی لام های شیشه ای قرار داده می شد و توسط یک لایه ضد چروک پوشیده می شد. برش ها از جایی تهیه می شد که برای اولین بار در قسمت دمی هسته زیتونی دیده شود که به عنوان نقطه رفرانس برای مطالعه لام ها بود، یعنی ۱۴/۸ میلی متر در قسمت دمی نسبت به برگما. برش ها توسط یک میکروسکوپ فلئورسنت Leica DML مشاهده شدند. نرون های دارای TH، SST2A، CTB تحت شرایط زمینه تاریک و با یک فیلتر مناسب تنظیم شده نسبت به فلئورسنت های مختلف دیده شدند، در حالی که نرون های هیبرید شده درجا با استفاده از شرایط زمینه روشن مشاهده شدند. فقط زمانی نرون ها نسبت به دو یا



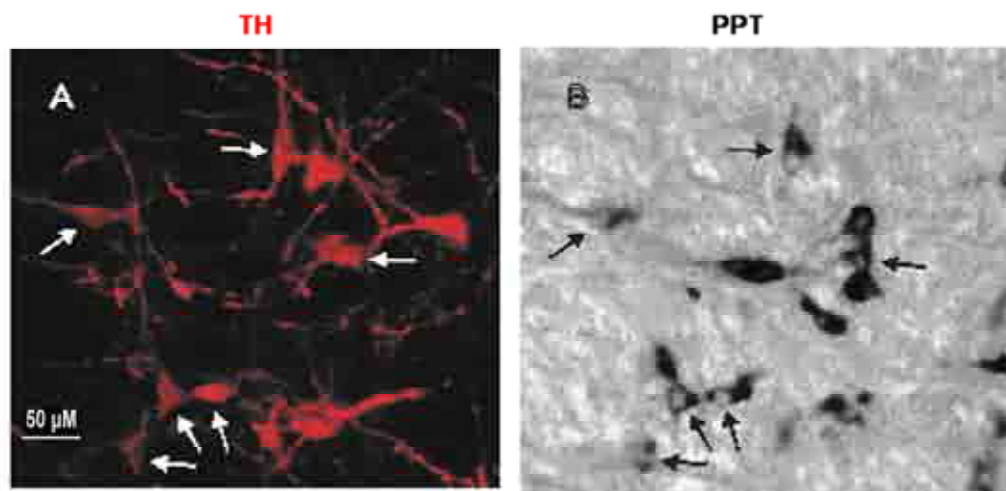
شکل ۱: توزیع نرون های بیان کننده mRNA پرپروتاکی کینین در ناحیه شکمی - جانبی بصل النخاع که به روش هیبریداسیون درجا مشخص شده است. A: نرون های PPT-A+ در سطح I (۱۲ میلی متر عقب تر از برگما). B: نرون های PPT-A+ در سطح II (۱۳ میلی متر عقب تر از برگما). C، D: تصاویر بزرگ شده مربع های قسمت A و B است که همراه با تصاویر سلول های TH-ir در همان ناحیه روی هم افتاده است. سلول های قرمز رنگ نرون های TH-ir و سلول های تیره رنگ نرون های PPT-A+ هستند.

بصل النخاع (RVLM) (شکل ۱)، بیش از ۱۰۰ نرون  $PPT-A^+$  در هر طرف برش مشاهده شد. در برش ۱۳ میلی‌متر عقب‌تر از برگما (مربوط به ناحیه C1 دمی بصل-النخاع (CVLM) (شکل ۱)، حدود ۵۰ نرون  $PPT-A^+$  در هر طرف برش مشاهده گردید.

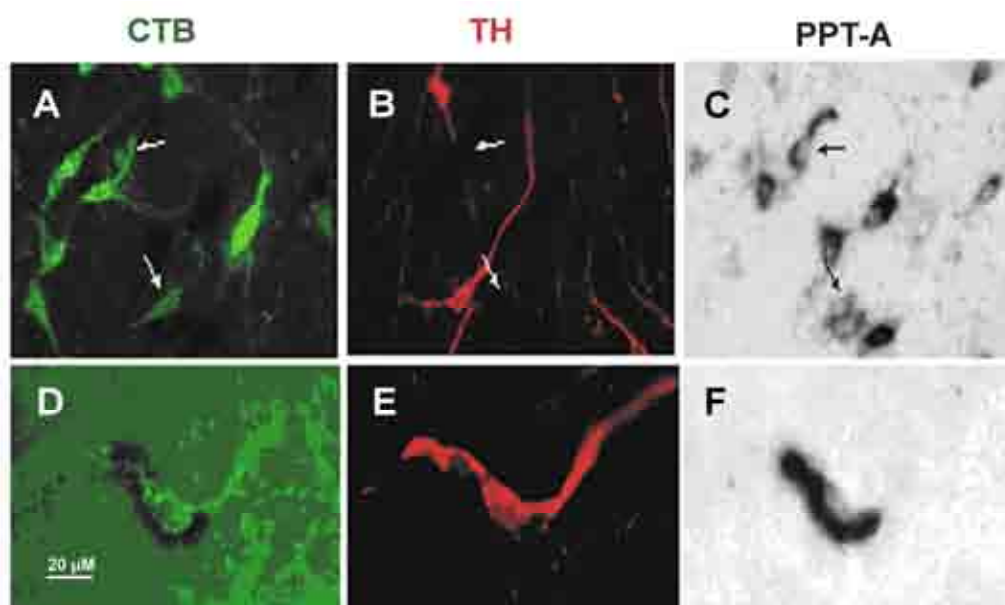
#### توزیع نرون‌های $PPT-A^+$ / TH-ir در VLM:

نرون‌های نشاندار شده دوگانه برای  $PPT-A^+$  و TH-ir در

زمانی مشاهده شد که پروب آنتی سنس به‌کار می‌رفت (شکل ۱). وقتی که پروب کنترل (سنس) به‌کار رفت، هیچ نرونی مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). در هر سه موش صحرائی که مورد بررسی قرار گرفت، تعداد نرون‌های  $PPT-A^+$  از بخش سری شکمی - جانبی بصل-النخاع به طرف بخش دمی کاهش یافت. در برش ۱۲ میلی‌متر عقب‌تر از برگما (مربوط به ناحیه C1 سری



شکل ۲: مکان‌یابی همزمان  $PPT-mRNA$  با TH-ir در ناحیه RVLM. A و B: نشان‌دار شدن دو گانه نرون‌های TH (A) و  $PPT-A$  (B) توسط پیکان‌ها نشان داده شده است.

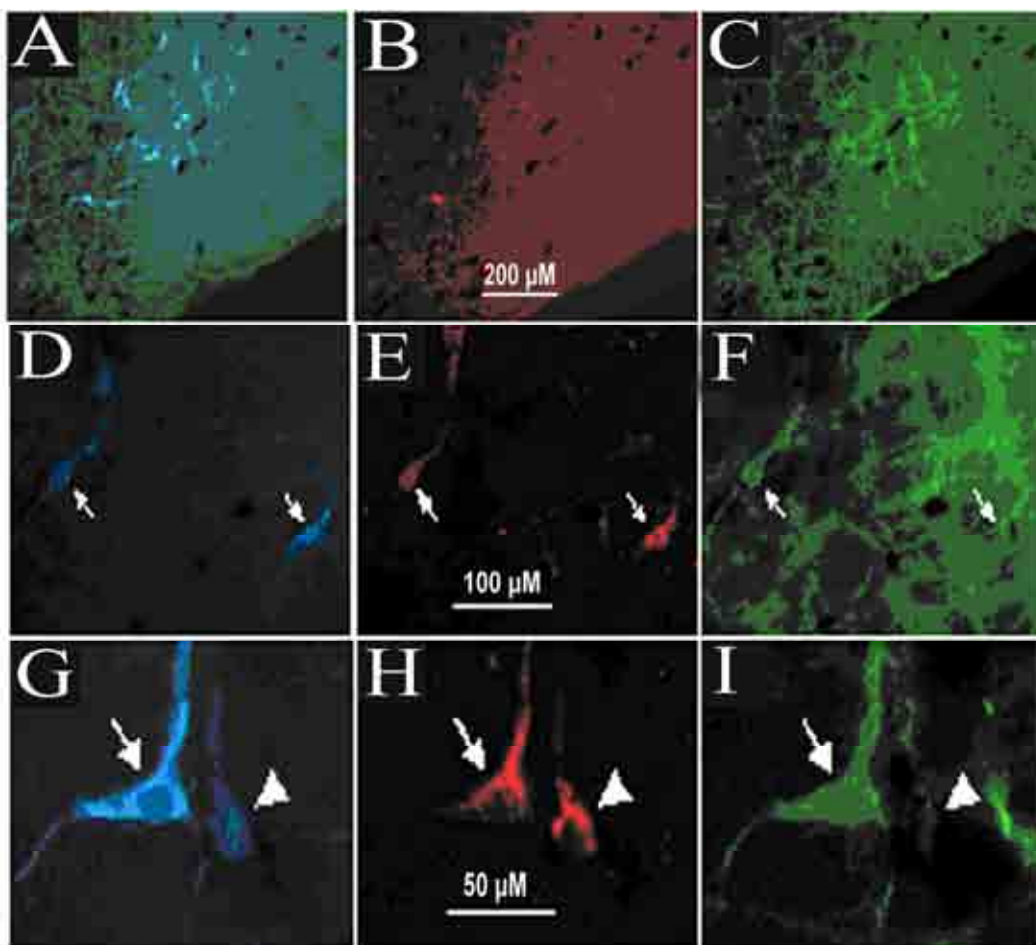


شکل ۳: مکان‌یابی همزمان  $PPT-mRNA$  با CTB-ir یا TH-ir در ناحیه RVLM: پیکان‌ها نشان‌دهنده نرون‌های دارای  $PPT-A$  mRNA (C) همراه با واکنش ایمنی مثبت به CTB (A) است ولی به TH واکنش نشان نمی‌دهد (B). شکل‌های D و E و F بیانگر نشان‌دار شدن سه گانه یک نرون برای واکنش ایمنی به CTB (D)، TH+ (E) و  $PPT-A$  mRNA (F) است.

**PPT- mRNA در نرون‌های VLM منشعب به**

**نخاع:** نرون‌های منشعب شده به نخاع در VLM به روش تزریق ماده CTB به داخل ستون سلولی میانی جانبی نخاع (IML) در نخاع سینه‌ای فوقانی (T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>) مشخص شدند. ماده CTB بطور رتروگراد به طرف بالا یعنی ناحیه VLM حرکت می‌کند. مطالعه فقط بر روی موش‌های صحرائی صورت گرفت که محل تزریق آن‌ها حتماً IML باشد. به‌طور متوسط، ۷۱ ± ۶۳۶ نرون CTB-ir در VLM شمارش شد (n=۳). به عبارت دیگر، بر طبق محاسبات انجام شده

سرتا سر قسمت سری ناحیه C1 تا قسمت دمی ناحیه C1 قسمت شکمی - جانبی بصل‌النخاع مشاهده شد (شکل ۲). تعداد این نرون‌های دوگانه از قسمت سری به طرف قسمت دمی کاهش را نشان می‌دهد. در قسمت سری ناحیه C1 (RVLM)، تعداد این نرون‌ها از مجموع شش برش شمارش شده که در موقعیت ۱۲/۴ - ۱۱/۴ عقب‌تر از برگما بود، ۰/۹ ± ۲۰/۹ درصد کل نرون‌های TH-ir ناحیه VLM بود. در قسمت دمی ناحیه C1 (CVLM)، از مجموع ۵ برش شمارش شده در موقعیت ۱۲/۶ - ۱۳/۴



شکل ۴: A, B, C نمایانگر تصاویر گروهی از نرون‌های واکنش‌گر به TH, CTB, SST2A در RVLM است. D, E, F: پیکان‌ها به نرون‌های نشان‌دار شده سه گانه برای TH (D), CTB (E), SST2A (F) اشاره می‌کند. G, H, I: پیکان‌ها به یک نرون نشان‌دار شده سه گانه برای TH (G), CTB (H), SST2A (I) اشاره می‌کند. سر پیکان به یک نرون نشان‌دار شده دو گانه برای TH-ir (G), CTB (H) اشاره دارد اما به SST2A (I) اشاره نمی‌کند.

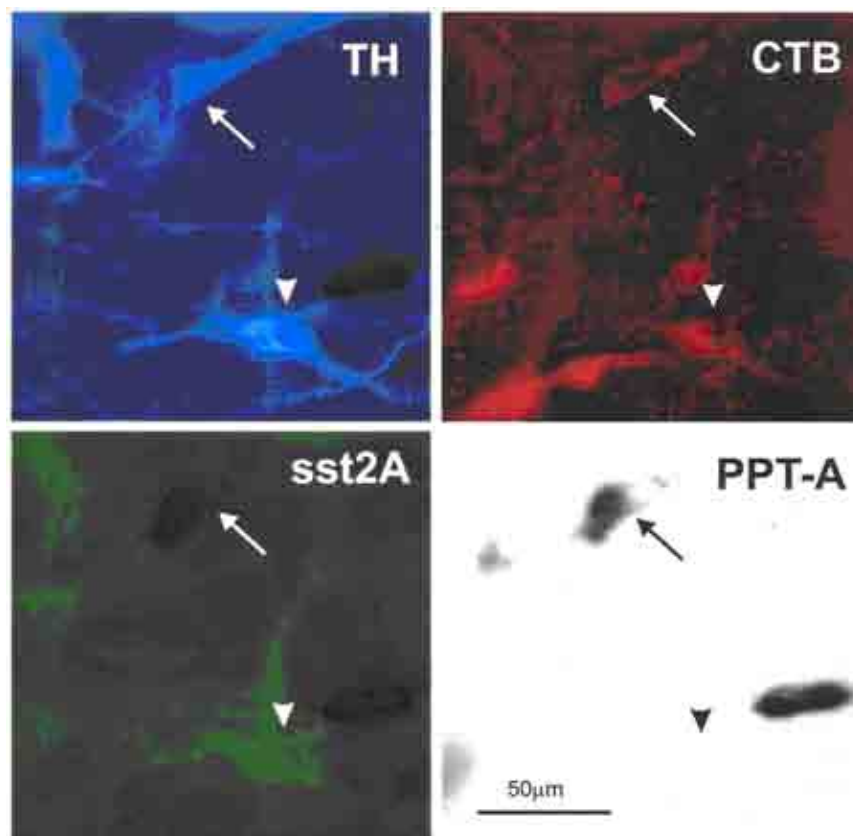
۲۸/۱ ± ۱/۸ درصد نرون‌های CTB-ir شمارش شده در RVLM از نوع TH-ir بودند. همچنین دارای

عقب‌تر از برگما، ۲/۵ ± ۶/۹ درصد کل نرون‌های TH-ir از نوع PPT-A+ بود.

بولبواسپینال در RVLN: در ناحیه RVLN، واکنش ایمنی مثبت نسبت به گیرنده SST2A گسترده بوده و به خصوص در نرون‌های ناحیه C1 واضح بود. این گیرنده‌ها در جسم سلولی و دندریت نرون‌ها متراکم هستند. نشانه‌گذاری جسم سلولی عملاً در لبه‌های جسم سلولی بوده و به صورت یک ساختمان حلقوی بود. تعداد نرون‌ها با ترکیب نشاندار شدن ترکیبی مختلف در یک طرف برش‌های مغز که موقعیت ۱۲/۲-۱۱/۶ میلی‌متر عقب برگما داشتند، انجام شد.  $55 \pm 4$  درصد نرون‌های TH-ir، گیرنده SST2A را بیان می‌کنند. بیان گیرنده SST2A در نرون‌های منشعب شده به نخاع نیز بررسی شد. در این مطالعه،  $58 \pm 9/4$  درصد نرون‌های TH-ir از نوع CTB-ir بود. تعداد  $39 \pm 5/8$  درصد نرون‌های CTB-ir دارای گیرنده

بیشترین تعداد نرون‌های PPT-A<sup>+</sup> بولبواسپینال است (نمونه‌هایی از این سلول‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است). بخش مهمی ( $9/1 \pm 1/4$  درصد) از نرون‌های بولبواسپینال PPT-A<sup>+</sup> بود که از مجموع این نرون‌های PPT-A<sup>+</sup> بولبواسپینال، حدود  $55/7 \pm 4/7$  درصد از نوع TH-ir بودند و حدود  $17/9 \pm 2/7$  درصد نرون‌های بولبواسپینال دارای TH-ir را در این سطح تشکیل می‌دهند. حدود نصف نرون‌های PPT-A<sup>+</sup> بولبواسپینال فاقد TH-ir بودند که کمتر از ۵ درصد کل نرون‌های بولبواسپینال را تشکیل می‌دهد. در ناحیه دمی C1 (CVLM)، تعدادی نرون PPT-A<sup>+</sup> قابل مشاهده است که TH-ir نبودند.

#### توزیع گیرنده SST2A در نرون‌های C1



شکل ۵: این تصویر نشان‌دهنده بیان گیرنده PPT-A mRNA در نرون‌های بولبواسپینال ناحیه C1 در RVLN است. پیکان نشان‌دهنده یک نرون است که از C1 (TH<sup>+</sup>) به طرف نخاع منشعب شده و (CTB<sup>+</sup>) و PPT-A<sup>+</sup> mRNA ولی گیرنده SST2A ندارد. نوک پیکان نشان‌دهنده یک نرون C1 (TH<sup>+</sup>) منشعب شده به تمام (CTB<sup>+</sup>) است که گیرنده SST2A دارد ولی فاقد PPT-A mRNA است.

SST2A بود. قسمت اعظم این نرون‌های بولبواسپینال دارای SST2A، نرون‌های C1 هستند (۳/۴±۸۲ درصد). حدود ۵۷±۷/۹ درصد نرون‌های C1 بولبواسپینال گیرنده SST2A را بیان می‌کنند (شکل ۴) ولی در هیچ کدام از نمونه‌ها نرون C1 بولبواسپینال که هم PPT-A<sup>+</sup> و هم دارای گیرنده SST2A باشد، مشاهده نگردید (شکل ۵).

## بحث

در این مطالعه دیده می‌شود که در قسمت سری ناحیه C1 (ناحیه RVLM) تعداد زیادی نرون دارای mRNA پرپروتاکی کینین (PPT-mRNA) (PPT-A<sup>+</sup>) وجود دارد ولی در قسمت دمی ناحیه (CVLM) تعداد این نرون‌ها کمتر است. یعنی هرچه از قسمت سری به طرف ناحیه دمی C1 حرکت کنیم، تعداد این نرون‌های PPT-A<sup>+</sup> کاهش می‌یابد. PPT-mRNA در اثر الگوهای متفاوت تغییرات پس از ترجمه، پپتیدهایی مثل ماده P، نروکینین A و نروپپتید K را ایجاد می‌کند (۲۱). ماده P و گیرنده آن (NK-1) در تنظیم مرکزی سیستم قلب و عروق دخیل است. تزریق مقادیر اندک ماده P به هسته راه منزوی (NTS)، بارورفلکس را تعدیل نموده و باعث افزایش فشارخون و ضربان قلب می‌شود و این تغییرات ۲۰ تا ۳۰ دقیقه طول می‌کشد (۶). RVLM دارای پایانه‌های فعال ایمونولوژیک نسبت به ماده P و گیرنده NK-1 است.

مطالعات قبلی آزمایشگاه ما نشان داد که گیرنده NK-1 در تعدادی از نرون‌های آدرنرژیک ناحیه C1 در RVLM وجود دارد (۲۲). به علاوه، مشخص شده است که پایانه‌های دارای ماده P در تماس با نرون‌های C1 هستند. تزریق یک آنالوگ پایدار ماده P به داخل RVLM باعث ایجاد پاسخ‌های قوی افزایش فشارخون در شرایط *in vivo* می‌شود. هم ماده P و هم آگونیست انتخابی گیرنده NK-1 باعث تحریک نرون‌های C1 بولبواسپینال می‌شود که به کمک الکترودهای قطعه‌ای این تحریک در

شرایط *in vitro* ثبت شده است (۲۳). فعال‌شدن گیرنده NK-1 در RVLM موجب افزایش فشارخون، تاکیکاردی و افزایش فعالیت سمپاتیکی اسپلانکتیک و کاهش رفلکس سوماتوسمپاتیک می‌شود ولی روی بارورفلکس اثری ندارد (۲۴).

مطالعه فعلی نشان داد که حدود نیمی از نرون‌های TH<sup>+</sup> در RVLM دارای گیرنده SST2A بوده و حدود نیمی از این نرون‌های TH<sup>+</sup> به نخاع منشعب می‌شوند. ولی در مطالعه فعلی که جدیدترین مطالعه تاکنون است، در ناحیه RVLM نرونی که به طور همزمان هم دارای گیرنده SST2A بوده و هم دارای PPT-A<sup>+</sup> باشد، مشاهده نگردید (شکل ۵). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که سوماتواستاتین فعالیت نرون‌های بصل‌النخاع را که مسؤول تنظیم اعمال اتونومیک هستند، تعدیل می‌کند و این تعدیل به واسطه پنج نوع گیرنده متصل به پروتئین G به نام‌های SST1 تا SST5 انجام می‌شود. گیرنده‌هایی که در نرون‌های ناحیه RVLM وجود دارند، عملاً از نوع SST2A هستند و این نرون‌ها اساملاً فنوتیپ کاتکولامینرژیک دارند و همان‌گونه که مطالعات قبلی نشان داد، این نرون‌ها TH<sup>+</sup>/PNMT<sup>+</sup> هستند (۲۳، ۱۶). این نرون‌ها در کنترل فشارخون نقش دارند. تعدادی از این نرون‌ها به نظر می‌رسد که روی تنظیم خروجی پیش حرکتی سمپاتیک در IML نقش داشته باشند. در عین حال تزریق داخل بطنی - مغزی سوماتواستاتین باعث مهار فعالیت سمپاتیک می‌شود و وقتی که به طور موضعی روی سطح شکمی بصل‌النخاع ریخته شود، باعث کاهش فشارخون می‌شود (۲۷-۲۵). انواع گیرنده‌های چند گانه سوماتواستاتین در میانجی‌گری اعمال تعدیلی سوماتواستاتین روی اعمال اتونومیک مثل فعالیت قلب و عروق، تنفس و رفلکس‌های گوارشی نقش دارند (۲۸).

سوماتواستاتین و ماده P اثرات آنتاگونیستی فیزیولوژیک مستقیم روی تنظیم تنفس در VLM موش صحرائی دارند. ماده P دارای اثرات تحریکی و



گیرنده‌های SST2A می‌تواند موجب مهار رهایش نروترانسمیترها و کاهش جریان کلسیم در این نرون‌ها شود (۲۹) و یک اثر مهاری را اعمال کند. ولی تاکنون هیچ مطالعه‌ای که مستقیماً اثرات سوماتواستاتین را روی نرون‌های RVLN منشعب شونده به نخاع نشان دهد انجام نشده است.

در این مطالعه، هیچ نرون  $TH^+$  منشعب به نخاع که در جسم سلولی خود دارای PPT-mRNA باشد و دارای گیرنده SST2A در سطح خود باشد، مشاهده نگردد. بنابراین به نظر می‌رسد که نرون‌های C1 بصل-النخاع که به داخل نخاع منشعب می‌شوند از نظر بیان PPT-mRNA یا بیان گیرنده SST2A، به صورت دو گروه نرونی متفاوت هستند که در کنترل گروه‌های ویژه SPN در نخاع نقش دارند (۱۹،۲۰) و ممکن است اثرات تعدیلی متفاوتی بر رفلکس‌های قلبی-عروقی داشته باشند. تحریک نرون‌های دارای گیرنده SST2A در RVLN توسط ورودی‌های سوماتواستاتینریک احتمالاً باعث کاهش فعالیت تون سمپاتیکی و به تبع آن موجب کاهش فشار خون و ضربان قلب می‌گردد. در حالی که فعال‌شدن نرون‌های حاوی PPT-mRNA در RVLN موجب افزایش تون سمپاتیکی و به تبع آن، موجب افزایش فشار خون و ضربان قلب می‌گردد.

سوماتواستاتین دارای اثرات مهاری است (۱۷). ماده P و سوماتواستاتین به‌عنوان نروترانسمیترها و تعدیل‌کننده‌های مسیر حسی نخاع هستند که به ترتیب اثرات تحریکی و مهاری در نرون‌های شاخ پشتی نخاع و روی پاسخ‌های درد دارند (۱۸).

مطالعه حاضر نشان داد که حدود ۵ درصد کل نرون‌های C1 بولبواسپینال RVLN را تشکیل می‌دهند. رهایش ماده P از این نرون‌ها در IML می‌تواند موجب تحریک نرون‌های SPN گردد. SPN به صورت مسیره‌ای مجزای عملی در نخاع سازماندهی شده است و بر طبق اهدافی که آن‌ها فعالیت آن را تنظیم می‌کنند، به طور متفاوتی کنترل می‌شوند. فرض شده است که این اجتماعات ویژه SPN، به طور شیمیایی کدبندی شده‌اند؛ به این معنی که SPN یک رده عملی خاص ممکن است بر اساس یک پروفایل منحصر به فرد از یک ماده شیمیایی خاص که نرون موردنظر آن‌را بیان می‌کند، از رده‌های دیگر تمایز داده می‌شود (۲۰). از طرف دیگر، مطالعه فعلی نشان داد که حدود نیمی از نرون‌های بولبواسپینال C1 دارای گیرنده SST2A می‌باشند. این موضوع نشان می‌دهد که گیرنده SST2A که بر روی ۵۵ درصد نرون‌های RVLN قرار دارد، نقش مهمی در تعدیل فعالیت نرون‌های C1 در RVLN دارد. احتمالاً فعال‌شدن

## References

1. Lipski J, Kanjhan R, Kruszezwska B, Smith M. Barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vivo: morphological properties and relationship to C1 adrenergic neurons. *Neuroscience*. 1995; 69(2): 601-18.
2. Pilowsky PM, Goodchild AK. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. *J Hypertens*. 2002; 20(9): 1675-88.
3. Cowan AR, Dean C, Bago M, Seagard JL. Potentiation of non-N-methyl-D-aspartate receptor-induced changes in blood pressure by substance P in rats. *Neurosci Lett*. 2000; 278(3):161-4.
4. Seagard JL, Dean C, Hopp FA. Neurochemical transmission of baroreceptor input in the nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull*. 2000; 51(2): 111-8.
5. Pickering AE, Boscan P, Paton JF. Nociception attenuates parasympathetic but not sympathetic baroreflex via NK1 receptors in the rat nucleus tractus solitarii. *J Physiol*. 2003; 551(Pt 2): 589-99.
6. Abdala AP, Haibara AS, Colombari E. Cardiovascular responses to substance P in the nucleus tractus solitarii: microinjection study in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(2): H891-8.
7. Pete G, Mack SO, Haxhiu MA, Walbaum S, Gauda EB. CO(2)-induced c-Fos expression in brainstem preprotachykinin mRNA containing neurons. *Respir Physiol Neurobiol*. 2002; 130(3): 265-74.

8. Helke CJ, Shults CW, Chase TN, O'Donohue TL. Autoradiographic localization of substance P receptors in rat medulla: effect of vagotomy and nodose ganglionectomy. *Neuroscience*. 1984; 12(1): 215-23.
9. Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol*. 1994; 347(2): 249-74.
10. Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1616(1): 1-84.
11. Unger N, Serdiuk I, Sheu SY, Walz MK, Schulz S, Saeger W, et al. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes in benign and malignant adrenal tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 68(6): 850-7.
12. Jansen AS, Wessendorf MW, Loewy AD. Transneuronal labeling of CNS neuropeptide and monoamine neurons after pseudorabies virus injections into the stellate ganglion. *Brain Res*. 1995; 683(1): 1-24.
13. Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res*. 1989; 491(1): 156-62.
14. Stornetta RL, Rosin DL, Wang H, Sevigny CP, Weston MC, Guyenet PG. A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Botzinger complex. *J Comp Neurol*. 2003; 455(4): 499-512.
15. Stepanyan Z, Kocharyan A, Pyrski M, Hubschle T, Watson AM, Schulz S, et al. Leptin-target neurones of the rat hypothalamus express somatostatin receptors. *J Neuroendocrinol*. 2003; 15(9): 822-30.
16. Li Q, Goodchild AK, Seyedabadi M, Pilowsky PM. Pre-protachykinin A mRNA is colocalized with tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in bulbospinal neurons. *Neuroscience*. 2005; 136(1): 205-16.
17. Chen ZB, Engberg G, Hedner T, Hedner J. Antagonistic effects of somatostatin and substance P on respiratory regulation in the rat ventrolateral medulla oblongata. *Brain Res*. 1991; 556(1): 13-21.
18. Murase K, Nedeljkov V, Randic M. The actions of neuropeptides on dorsal horn neurons in the rat spinal cord slice preparation: an intracellular study. *Brain Res*. 1982; 234(1): 170-6.
19. Strack AM, Sawyer WB, Marubio LM, Loewy AD. Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Res*. 1988; 455(1): 187-91.
20. Chanthaphavong RS, Murphy SM, Anderson CR. Chemical coding of sympathetic neurons controlling the tarsal muscle of the rat. *Auton Neurosci*. 2003; 105(2): 77-89.
21. Siegel GJ. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*: Academic Press; 2006.
22. Makeham JM, Goodchild AK, Pilowsky PM. NK1 receptor and the ventral medulla of the rat: bulbospinal and catecholaminergic neurons. *Neuroreport*. 2001; 12(17): 3663-7.
23. Li YW, Guyenet PG. Effect of substance P on C1 and other bulbospinal cells of the RVLM in neonatal rats. *Am J Physiol*. 1997; 273(2 Pt 2): R805-13.
24. Makeham JM, Goodchild AK, Pilowsky PM. NK1 receptor activation in rat rostral ventrolateral medulla selectively attenuates somato-sympathetic reflex while antagonism attenuates sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 ; 288(6): R1707-15.
25. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006 ; 7(5): 335-46.
26. Phillips JK, Goodchild AK, Dubey R, Sesiashvili E, Takeda M, Chalmers J, et al. Differential expression of catecholamine biosynthetic enzymes in the rat ventrolateral medulla. *J Comp Neurol*. 2001; 432(1): 20-34.
27. Rettig R, Geist R, Sauer U, Rohmeiss P, Unger T. Central effects of somatostatin: pressor response, AVP release, and sympathoinhibition. *Am J Physiol*. 1989; 257(3 Pt 2): R588-94.
28. Spary EJ, Maqbool A, Batten TF. Expression and localisation of somatostatin receptor subtypes sst1-sst5 in areas of the rat medulla oblongata involved in autonomic regulation. *J Chem Neuroanat*. 2008; 35(1): 49-66.
29. Johnson J, Caravelli ML, Brecha NC. Somatostatin inhibits calcium influx into rat rod bipolar cell axonal terminals. *Vis Neurosci*. 2001; 18(1): 101-8.