اثر متقابل محرومیت از نور و ملاتونین بر القای LTP در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی

سید علیرضا طلائی زواره[*۱]، وحید شیبانی[۱]، محمود سلامی[۲]

خلاصه

سابقه و هدف: سیگنال‌های حسی محیطی به ویژه در اوان زندگی اثر شگرفی در تکامل و عملکرد مغز دارند. در این تحقیق اثر محرومیت از نور و هورمون ملاتونین روی پدیده‌ی تقویت پاسخ‌های میدانی ثبت شده در ناحیه CA1 هیپوکامپ مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت in vivo روی دو گروه (n=۳۲) در موش‌های صحرایی نر ٤٥ روزه صورت گرفت. یک گروه در دوره‌های روشنایی ـ تاریکی استاندارد (Light Reared-LR) و گروه دیگر از بدو تولد تا لحظه‌ی آزمایش در تاریکی کامل (DarkReared-DR) پرورش یافتند. موش‌های هر گروه به دو زیرگروه کنترل و دریافت‌کننده دارو تقسیم شدند. با تحریک کولترال شافر ناحیه CA3 هیپوکامپ، پاسخ‌های میدانی نورون‌ها در ناحیه‌ی CA1 ثبت شدند. ۳۰ دقیقه پس از پایدار شدن پاسخ‌ها، در گروه‌های کنترل، نمکی و در گروه‌های دارو، ملاتونین با غلظت ۲ میکروگرم تزریق گردید و ۳۰ دقیقه دیگر ثبت ادامه یافت. سپس تحریک تتانیک اعمال شد و آزمایش به مدت ۱۲۰ دقیقه دیگر ادامه یافت.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در هر گروه کنترل LR و DR، LTP القا شد ولی بزرگی و پایداری آن در گروه LR بیشتر بود. ملاتونین در هر دو گروه LTP را کاهش داد. این کاهش در موش‌های LR بسیار محسوس‌تر از موش‌های DR بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که ملاتونین موجب مهار LTP در پاسخ‌های ناحیه CA1 می‌شود که این اثر مهاری در گروه LR بسیار برجسته است. علت اثر ناچیز ملاتونین در گروه DR می‌تواند به حساسیت پایین‌تر گیرنده‌های این هورمون به دلیل افزایش سطح سرمی ملاتونین ناشی از نگهداری حیوانات در تاریکی نسبت داده شود.

واژگان کلیدی: محرومیت از نور، ملاتونین، LTP، هیپوکامپ، موش صحرایی

۱- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان ـ مرکز تحقیقات علوم اعصاب

۲- دانشیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

* نویسنده مسوول: سیدعلیرضا طلائی زواره

آدرس: کرمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی

پست الکترونیک: Talaei@live.com

تلفن: ۰۹۱۳ ۳٦۲ ۳۲٤۰

دورنویس: ۰۳٦۱ ٥٥٥۱۱۱۲

تاریخ دریافت: ۸٦/٤/٤

تاریخ پذیرش نهایی: ۸٦/۹/۲۹

مقدمه

دستگاه بینایی پستانداران یکی از مراکز عمده ورودی حسی به دستگاه عصبی است و بخشی از پیام‌های بینایی رسیده پس از پردازش در قشر مربوطه از طریق قشر انتورینال وارد تشکیلات هیپوکامپ می‌شوند [۱]. ساختمان‌های تشکیل‌دهنده‌ی لوب تمپورال میانی به ویژه هیپوکامپ برای برقراری حافظه درازمدت ضروری می‌باشند. به ویژه این که احتمال دخالت این بخش‌ها در تثبیت اطلاعات در قشرهای ارتباطی وجود دارد [۲]. تقابل عمل قشری ـ هیپوکامپی حافظه‌های پایدار و دائمی را برای حوادث رخ داده، اجزا و ارتباطات آنها بنیان می‌گذارد و در محدوده‌ای وسیع قابلیت انعطاف‌پذیری بالایی را به آنها می‌بخشد [۱]. به دلیل تمایز آناتومیکی و فیزیولوژیکی خوب بین نواحی مختلف هیپوکامپ بررسی القای حافظه در آن به آسانی صورت می‌گیرد [۳]. نقش تجربه‌ی حسی در تشکیل مدارهای عصبی به مقدار زیادی در سیستم بینایی پستانداران مورد مطالعه قرارگرفته است [٤]. وجود سیگنال‌های بینایی برای بلوغ ساختمانی و عملی ارتباطات در سیستم بینایی امری حیاتی است [٥]. تغییرات وابسته به تجربه اغلب محدود به دوره‌های بحرانی مشخصی در اوایل

زندگی است که مدارهای نورونی در دستگاه‌های مختلف حسی شکل‌پذیری قابل توجهی را نسبت به ورودی‌های حسی به نمایش می‌گذارند [٦، ٧]. به عنوان مثال گزارش شده است هنگامی که قشر بینایی در اوان زندگی دچار محدودیت دریافت تحریکات حسی می‌شود تغییرات غیرقابل برگشتی در آن اتفاق می‌افتد [٨]. همچنین گزارش‌هایی در مورد اثر محرومیت از بینایی روی مکانیسم‌های پیشنهادی حافظه و یادگیری یعنی تقویت درازمدت (Long-term potentiation: LTP) و تضعیف درازمدت (Long-term depression: LTD) موجود می‌باشد [٤، ٩، ١٠، ١١]. به عنوان مثال Berry و همکارانش نشان داده‌اند که در موش‌های صحرایی جوان محروم از بینایی، بر خلاف موش‌های صحرایی طبیعی هم‌سن خود، تمایل به LTP کاهش می‌یابد [١٢]. با توجه به مطالب ذکر شده در بالا، احتمال دارد تغییر در تجربه‌ی حس بینایی در دوره‌ی بحرانی تکامل مغز بر فعالیت نورون‌های ناحیه‌ی هیپوکامپ موثر باشد. بر اساس اطلاعات موجود تاکنون تحقیقی در این مورد صورت نگرفته است و اولین هدف ما از این تحقیق، بررسی اثر محرومیت از بینایی بر پاسخ‌های نورونی این ناحیه است. از طرف دیگر تغییر در تجربه‌ی حس بینایی ناشی از به هم خوردن سیکل‌های تاریکی و روشنایی شبانه‌روزی می‌تواند ریتم سیرکادین ترشح هورمون‌ها را نیز مختل کند. ریتم ترشح ملاتونین (هورمون مترشحه از غده پینه آل) به وضوح تحت تاثیر ریتم‌های سیرکادین است و تغییرات غلظت ملاتونین در گردش در طول شبانه‌روز یک سیگنال هورمونی تابع تغییرات نور در محیط اطراف حیوانات است [١٣]. ملاتونین پس از ترشح وارد مایع مغزی نخاعی و خون شده و اثرات خود را از طریق گیرنده‌های غشایی به انجام می‌رساند [١٣] که حضور آنها در نواحی مختلف مغز پستانداران به ویژه در هیپوکامپ مغز به اثبات رسیده است [١٤]. نتایج تحقیقات دانشمندان حاکی از موثر بودن ملاتونین بر شکل‌پذیری سیناپسی نورون‌های نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی است. به عنوان مثال ملاتونین می‌تواند پتانسیل‌های برانگیخته در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی به واسطه‌ی تحریکات کم‌فرکانس و پرفرکانس را مهار کند [١٥]. علی‌رغم گزارش‌های دیگری مبنی بر اثرات مهاری ملاتونین بر القای LTP در هیپوکامپ [١٦]، هسته سوپراکیاسماتیک [١٧] و قشر نو [١٨]، Argyriou و همکارانش بیان داشتند که تزریق داخل بطنی ملاتونین تشکیل حافظه‌ی کوتاه‌مدت در موش صحرایی را تسهیل می‌کند [١٩]. در این مطالعه ما در صدد بررسی میزان میانکنش تغییر در تجربه‌ی حس بینایی (در اینجا محرومیت از نور) و تغییر در ریتم ترشح هورمون ملاتونین بر فعالیت نورون‌های ناحیه‌ی هیپوکامپ می‌باشیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات: این مطالعه به روش تجربی بر روی ٣٢ راس موش صحرایی نر نژاد Wistar ٤٥ روزه با وزنی حدود ١١٠ تا ١٥٠ گرم استفاده شد. در هر قفس ٤ راس حیوان نگهداری می‌شدند و حیوانات از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی آزاد بودند. درجه‌ی حرارت محل نگهداری حیوانات ١٩ تا ٢٣ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. از نظر شرایط نوری حیوانات به دو گروه اصلی روشنایی (Light Reared-LR) که از بدو تولد تا ٤٥ روزه‌گی در شرایط طبیعی حیوان‌خانه یعنی ١٢ ساعت روشنایی و ١٢ ساعت تاریکی پرورش یافته بودند و گروه اصلی تاریکی (Dark Reared-DR) که از بدو تولد تا ٤٥ روزه‌گی در تاریکی کامل (٢٤ ساعت) قرار داشتند تقسیم شدند. در پایان هر گروه اصلی به دو زیرگروه (n=٨) تقسیم شد. یکی از این زیرگروه‌ها هورمون ملاتونین دریافت می‌کرد (گروه دارو) و به حیوانات گروه دیگر حلال این هورمون یعنی محلول نمکی تزریق می‌شد (گروه شاهد).

بیهوشی و جراحی: ٣٠ دقیقه قبل از انجام آزمایش، موش‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و به واسطه‌ی تزریق داخل بطنی داروی اورتان (١/٥ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش می‌شدند. مزیت این دارو ایجاد یک بیهوشی کامل و پایدار می‌باشد و در حین آزمایش احتیاجی به تزریق دوباره دارو نیست. با استفاده از رفلکس قرنیه و اعمال تحریک دردناک به پنجه‌ی پای حیوان از بیهوشی کامل اطمینان حاصل می‌شد. پس از ثابت نمودن سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting USA)، با تزریق ٠/٥ میلی‌لیتر محلول لیدوکایین ١٪ زیر پوست سر حیوان بی‌حسی موضعی نیز ایجاد می‌گشت. سپس با استفاده از قیچی نوک‌تیز پوست سر از ناحیه پشت گردن تا نزدیک بینی برداشته شده و تمامی بافت‌ها به طور کامل کنار زده می‌شدند تا جمجمه نمایان شود.

تعیین محل کانول و الکترودها: پس از تعیین نواحی برگما، لامبدا و خط وسط روی جمجمه محل قرارگیری کانول و الکترودها به وسیله‌ی اطلس استریوتاکس [٢٠] مشخص می‌شد. محل استقرار کانول ١/٥ میلی‌متر در جهت جانبی برگما بود و الکترود تحریکی ٤/٢ میلی‌متر پشت برگما و ٣/٨ میلی‌متر در جهت جانبی خط وسط قرار می‌گرفت. در نقطه‌ای که ٣/٤ میلی‌متر پشت برگما و ٢/٥ میلی‌متر دورتر از خط وسط بود الکترود ثبات مستقر می‌شد. سپس با دقت و توسط یک مته‌ی دندانپزشکی محل‌های علامت‌گذاری شده سوراخ می‌شد به طوری که در پایان جهت

امکان عبور کانول و الکترودها سخت شامه توسط یک سوزن بسیار ظریف پاره می‌شد.

کانول و الکترودگذاری: کانول به طول ۱۰ میلی‌متر از سرسرنگ شماره ۲٤ تهیه شده بود و با یک پنس ظریف به آرامی و کاملا عمود بر جمجمه ٤ میلی‌متر پایین می‌رفت تا به بطن جانبی برسد. پس از آن کانول با سیمان دندانپزشکی در محل ثابت می‌شد. الکترودها هر دو دوقطبی و از جنس استیل زنگ‌نزن با پوشش تفلون و قطر ۰/۰۰۵ اینچ (A-M Systems USA) بودند. الکترود تحریکی ۲/٤ میلی‌متر از سطح سخت شامه پایین برده می‌شد تا به کولترال‌های شافر نورون‌های ناحیه CA3 هیپوکامپ برسد. الکترود ثبات نیز با فواصل ۱۰ میکرونی و با دقت حدود ۲/۵ میلی‌متر زیر شخت شامه برده می‌شد تا به دندریت نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ برسد. محل صحیح الکترودها با روش الکتروفیزیولوژیکی ردیابی می‌شد. پس از قرار گرفتن الکترودها در محل اختصاصی و برای اطمینان بیشتر با اعمال پالس‌های تحریکی زوج (Paired Pulse) صحت محل الکترود مورد بررسی قرار می‌گرفت. بلندتر بودن دامنه‌ی دومین پاسخ نسبت به دامنه‌ی پاسخ اول نشان از درستی محل قرارگیری الکترودهای پایداری و تحریکی داشت.

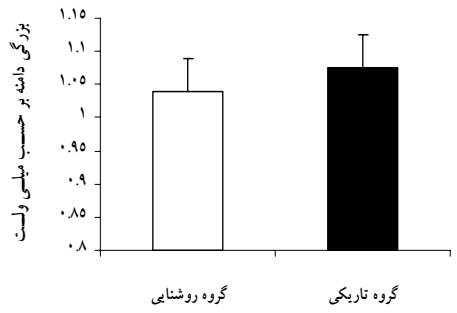
تحریک و ثبت: در پاسخ به تحریک کولترال‌های شافر، پتانسیل‌های پس‌سیناپسی تحریکی (Excitatory Post Synaptic Potential: EPSP) ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ ابتدا توسط آمپلی فایر (WSI, A3308, I.R.Iran) تقویت شده و سپس با ورود به Data Acquisition Board (AD Instruments, Australia) تبدیل به داده‌های رقومی شده و در پایان ثبت می‌شدند. پس از حدود ۳۰ دقیقه ثبت اولیه‌ی پاسخ‌ها و زمانی که دامنه‌ی پاسخ با شدت تحریک ثابت بدون تغییر می‌ماند منحنی Input/Output رسم می‌شد. شدتی از تحریک الکتریکی که در آن ۷۰ درصد حداکثر دامنه پاسخ به دست می‌آمد به عنوان شدت تحریک برای ادامه روند آزمایش و نیز برای اعمال تحریک تتانیک انتخاب می‌شد. تحریکات با فرکانس ۰/۱ هرتز، مدت ۱۰۰ میلیونیم ثانیه و با تاخیر ۲ هزارم ثانیه اعمال می‌گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه EPSP ثبت می‌شد. به دنبال آن در گروه‌های کنترل ۵ میکرولیتر محلول نمکی و در گروه‌های دارو ۵ میکرولیتر محلول محلول نمکی حاوی ۲ میکروگرم ملاتونین (Sigma-Aldrich) به مدت ۵ دقیقه داخل بطن تزریق می‌شد و ثبت به مدت ۳۰ دقیقه دیگر ادامه می‌یافت. سپس برای القای LTP در مدار نورونی مورد آزمایش تحریک تتانیک با فرکانس بالا (High Frequency Stimulation: HFS) اعمال می‌شد. الگوی این تحریک شامل ۱۰ قطار با فرکانس ۲۰۰ هرتز و فاصله‌ی ۲ هزارم ثانیه بود [۲۱]. مدت زمان هر پالس تحریکی نیز ۰/۱ هزارم ثانیه بود. پس از تحریک تتانیک روند تحریک و ثبت به مدت ۲ ساعت ادامه می‌یافت. از نرم‌افزار Scope for Windows ساخت شرکت PowerLab برای پدیده‌های تحریک و ثبت و نیز تجزیه و تحلیل پاسخ‌ها استفاده شد. در تجزیه و تحلیل نتایج، درصد تغییر دامنه‌ی پاسخ‌ها بر حسب میلی‌ولت قبل و بعد از دریافت دارو و بعد از اعمال تحریک تتانیک مورد ارزیابی قرار گرفت. معیار وقوع LTP و LTD به ترتیب حداقل ۲۰ درصد افزایش و کاهش در دامنه‌ی پاسخ‌ها پس از تحریک تتانیک بود. داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA دو سویه به همراه آزمون Tukey آنالیز شد و $p<0/05$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

دراین مطالعه اثر متقابل محرومیت از بینایی و هورمون ملاتونین بر پاسخ‌های پایه نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و نیز القای LTP در این پاسخ‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۱) خصوصیت پاسخ‌های پایه ناحیه CA1 هیپوکامپ

الف) اثر محرومیت از بینایی بر پاسخ‌های پایه: بررسی fEPSP های ثبت شده در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در پاسخ به تحریک کولترال‌های شافر نشان داد که میانگین دامنه‌ی پاسخ‌ها در گروه کنترل LR، ۱/۰٤±۰/۰٤٦ میلی‌ولت و در گروه کنترل DR، ۱/۰۷±۰/۰۵۹میلی‌ولت بود. آزمون ANOVA دوسویه بیانگر آن است که اختلاف دامنه بین دو گروه معنی‌دار نیست (نمودار شماره‌ی ۱).



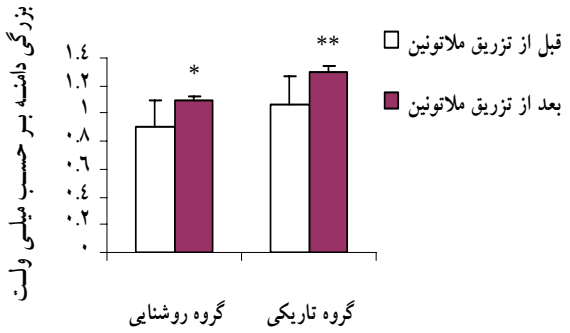
نمودار ۱- مقایسه میانگین دامنه در گروه‌های تاریکی و روشنایی. اختلاف دامنه بین دو گروه معنی‌دار نبود.

ب) اثر ملاتونین بر پاسخ‌های پایه: تزریق داخل بطنی ملاتونین تاثیر عمیقی بر دامنه‌ی fEPSPها در هر دو گروه LR و DR داشت. در گروه LR ملاتونین، دامنه‌ی پاسخ‌های پایه را از

۰/۹۳۸±۰/۰۰٤ میلی‌ولت به ۱/۰۵۲±۰/۰۲٦ میلی‌ولت (۱۲/۲٤±۲/۱۲ درصد) افزایش داد که بر اساس آزمون آماری این اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۰۱). در گروه DR نیز دامنه‌ی fEPSP ها قبل و بعد از تزریق ملاتونین به ترتیب ۱/۰۲۹±۰/۰۱۰ میلی‌ولت و ۱/۱۷۷±۰/۰۳۲ میلی‌ولت بود (۱٤/۲۷±۲/۰۸ درصد افزایش) که این اختلاف نیز معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۰۰۱). به علاوه آزمون ANOVA دو سویه نشان داد که اختلاف قابل توجهی بین دامنه‌ی fEPSP ها در هر دو گروه مورد آزمایش وجود ندارد (F 11 , 1151 = 116.459). آزمون Tukey بیانگر آن است که این اختلاف معنی‌دار نیست (p=۰/۹) (نمودار شماره‌ی ۲). ویژگی دامنه‌ی fEPSP های ثبت شده از گروه‌های مختلف در جدول شماره‌ی ۱ آورده شده است.

۲) القایLTP در fEPSP های ثبت شده از ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ

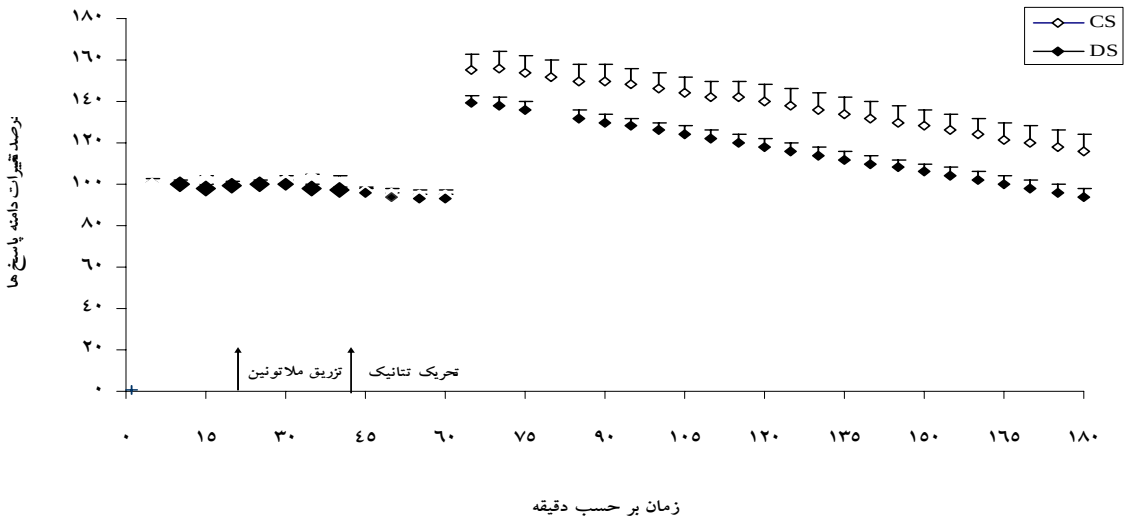
الف) LTP در گروه‌های شاهد: تحریک تتانیک کولترال‌های شافر در هیپوکامپ موش‌های صحرایی حاضر در گروه LR منجر به افزایش قابل توجهی در دامنه‌ی fEPSPها گردید (قبل از القای تحریک تتانیک؛ ۰/۰۰۹± ۱/۱٤۸ میلی‌ولت و بعد از آن؛ ۰/۱٤۷±۱/٤۸۸ میلی‌ولت؛ حداکثر ۱۰/۹۹±۵۰/٤٦ درصد افزایش) که این اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱). اثر اعمال تحریک تتانیک در گروه DR نیز افزایش دامنه fEPSPها بود (قبل از القای تحریک تتانیک؛ ۰/۰۰۷±۱/۰۹۸ میلی‌ولت و بعد از آن؛ ۰/۱۳٤±۱/۲٦۵ میلی‌ولت؛ حداکثر ٤/۰۷±٤۱/۲٤ درصد افزایش). بر اساس آزمون آماری این اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۰۱). به علاوه آزمون ANOVA نشان داد که اختلاف قابل توجهی بین افزایش دامنه fEPSP ها در هر دو گروه مورد آزمایش وجود دارد (F 11, 1151 = 116.459). آزمون Tukey بیانگر آن است که این اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۰۰۱). شکل شماره‌ی ۳ القای LTP در fEPSPهای ثبت شده از هیپوکامپ موش‌های گروه‌های شاهد را نشان می‌دهد.



نمودار ۲- مقایسه اثر تزریق داخل بطنی ملاتونین بر دامنه‌ی پاسخ گروه‌های روشنایی و تاریکی
*؛ اختلاف بین مراحل قبل و بعد از تزریق ملاتونین در گروه روشنایی (p<۰/۰۰۰۱)
**؛ اختلاف بین مراحل قبل و بعد از تزریق ملاتونین در گروه تاریکی (p<۰/۰۰۰۱)

جدول ۱- خصوصیات دامنه گروه‌های روشنایی و تاریکی قبل و بعد از تزریق ملاتونین و نیز بعد از القای LTP را نشان می‌دهد

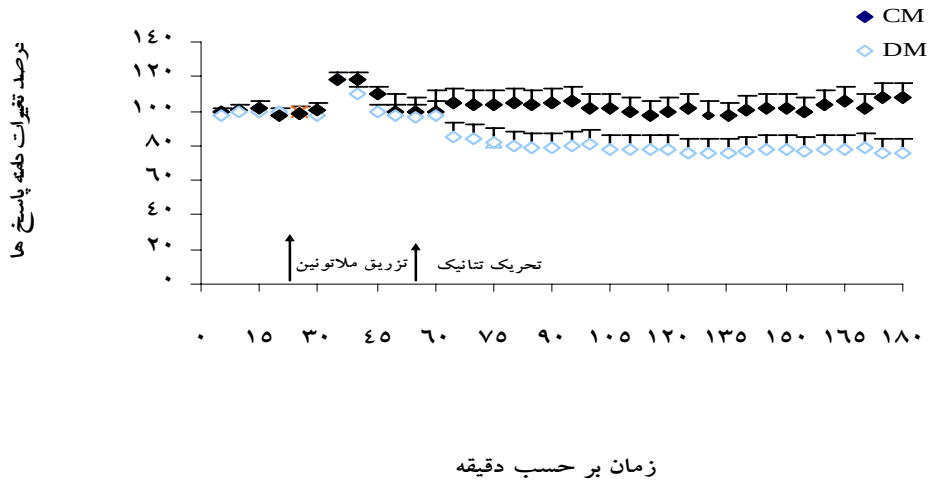
گروه ها	اندازه دامنه		
	قبل از تزریق ملاتونین	بعد از تزریق ملاتونین	بعد از القاء LTP
موش‌های پرورش یافته در روشنائی	۰/۹۳۸±۰/۰۰٤ میلی‌ولت	۱/۰۵۲±۰/۰۲٦ میلی‌ولت	۰/۸۰۱±۰/۰۳۹ میلی‌ولت
		p<۰/۰۰۰۱ (قبل و بعد از تزریق دارو)	
		p<۰/۰۰۰۱ (قبل و بعد از اعمال تحریک تتانیک)	
موش های پرورش یافته در تاریکی	۱/۰۲۹±۰/۰۱۰ میلی‌ولت	۱/۱۷۷±۰/۰۳۲ میلی‌ولت	۱/۰۹۵±۰/۰۵۸میلی‌ولت
		p<۰/۰۰۰۱ (قبل و بعد از تزریق دارو)	
		p<۰/۰۰۰۱ (قبل و بعد از اعمال تحریک تتانیک)	



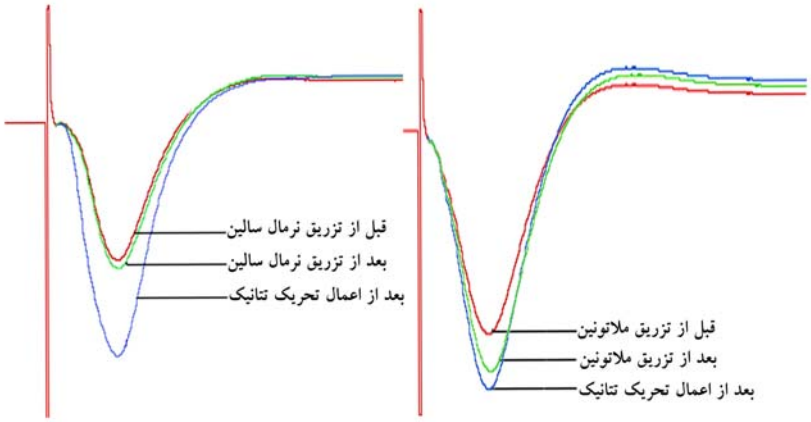
نمودار ۳- القای LTP در fEPSP های ثبت شده از هیپوکامپ موش‌های گروه‌های دریافت‌کننده محلول نمکی (CS؛ گروه کنترل روشنایی دریافت-کننده محلول نمکی، DS؛ گروه کنترل تاریکی دریافت‌کننده محلول نمکی)

ب) LTP در گروه‌های دریافت‌کننده ملاتونین:

تحریک تتانیک کولترال‌های شافر در هیپوکامپ موش‌های صحرایی حاضر در گروه LR دریافت‌کننده ملاتونین منجر به کاهش قابل توجهی در دامنه‌ی fEPSPها گردید (قبل از القای تحریک تتانیک؛ ۱/۰۵۲±۰/۰۲٦ میلی‌ولت و بعد از آن؛ ۰/۸۰۱ ±۰/۰۳۹ میلی‌ولت؛ حداکثر ٤۱/۰۹±۱/۷۸ درصد کاهش). بر اساس آزمون آنالیز واریانس این اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۰۱). اثر اعمال تحریک تتانیک در گروه DR نیز کاهش دامنه‌ی fEPSPها بود (قبل از القای تحریک تتانیک؛ ۱/۱۷۷±۰/۰۳۲ میلی‌ولت و بعد از آن؛ ۱/۰۹۵±۰/۰۵۸ میلی‌ولت؛ حداکثر ۱۸/۰۰۵±۳/۱۵ درصد کاهش). بر اساس آزمون آماری این اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۰۱). به علاوه اختلاف قابل توجهی بین کاهش دامنه fEPSPها در هر دو گروه مورد آزمایش وجود دارد (F 11 , 1151 = 116.459) آزمون Tukey بیانگر آن است که این اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۰۰۱) (شکل شماره‌ی ٤). شکل شماره‌ی ۵ دو نمونه از ثبت‌های واقعی گروه‌های شاهد و ملاتونین را نشان می‌دهد.



شکل ٤- القای LTP در fEPSPهای ثبت شده از هیپوکامپ موش‌های گروه‌های دریافت‌کننده ملاتونین (CM؛ گروه کنترل روشنایی دریافت‌کننده ملاتونین، DM؛ گروه کنترل تاریکی دریافت‌کننده ملاتونین)



شکل ۵- ثبت‌های واقعی از گروه‌های دریافت‌کننده محلول نمکی (چپ) و ملاتونین (راست)

بحث

در این تحقیق، اثر هم‌زمان ایجاد اختلال در ساعت زیستی بدن ناشی از تغییر در تجربه حس بینایی و استفاده از ملاتونین برون‌زاد روی شکل‌پذیری سیناپسی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است.

الف) اثر محرومیت از بینایی بر پاسخ های پایه: نتایج حاکی از آن بودند که اختلاف دامنه بین دو گروه معنی‌دار نبود. بر اساس اطلاعات موجود تاکنون تحقیقی در مورد اثر محرومیت از بینایی روی شکل‌پذیری مدارهای هیپوکامپ صورت نگرفته است اما اثر تجربه‌ی حسی روی شکل‌پذیری قشر بینایی بررسی شده است. مثلا در نتایج تحقیقی آمده است که دامنه‌ی پتانسیل‌های پس‌سیناپسی تحریکی در گروه روشنایی کوچکتر از گروه تاریکی است [۹]. چنین نتیجه‌ای از مطالعه Atapour و همکارانش نیز حاصل شده است [۲۲]. ضمن دوره‌ی بحرانی پس از تولد، فعالیت سیناپس‌های تحریکی بر سیناپس‌های مهاری برتری دارد. به علاوه مدارهای مهاری به علت کمبود تولید BDNF که موثر بودن آن در شکل‌پذیری سیناپسی امروزه محرز شده است [۲۳] دیرتر تکامل می‌یابند [۲٤]. محرومیت از بینایی در دوره‌ی بحرانی نیز فعالیت مدارهای تحریکی در قشر بینایی را بیشتر کرده و مدارهای مهاری گاباارژیک را مهار می‌کند [۱]. ممکن است فعالیت مدارهای تحریکی و مهاری در دوره‌ی بحرانی در هیپوکامپ با توجه به این واقعیت که تشکیل و سازمان‌یابی اکثر سیناپس‌های هیپوکامپ مربوط به دوره‌ی بعد از تولد می‌باشد [۲۵] متفاوت از قشر نو باشد و اثر محرومیت از بینایی روی فعالیت این مدارها متفاوت از قشر نو باشد. به طور مثال Pollok و همکارانش بیان می‌دارند که نگهداری موش‌ها در تاریکی مطلق اگرچه اثری بر میزان تراکم BDNF mRNA ندارد ولی باعث افزایش میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ آنها می‌شود [۲٦]. Duffy و همکارانش بیان می‌دارند که هم‌زمان با افزایش تحریکات محیطی پاسخ مدارهای ناحیه CA1 هیپوکامپ افزایش می‌یابند [۲۷]. با این همه Kim و همکارانش تغییر در تجربه‌ی حسی را بر پاسخ‌های پایه ناحیه‌ی CA1 موثر نمی‌دانند [۲۸]. همان‌گونه که ذکر شد ما نیز در تحقیق خود نشان دادیم که تغییر در تجربه‌ی حس بینایی در دوره‌ی بحرانی تکامل مغز موش صحرایی بر پاسخ‌های پایه‌ی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ موثر نمی‌باشد. به هر ترتیب بررسی فعالیت مدارهای تحریکی و مهاری هیپوکامپ در دوره‌ی بحرانی و نیز اثر محرومیت از بینایی روی فعالیت آنها، تحقیقات بعدی را می‌طلبد.

ب) اثر ملاتونین بر پاسخ‌های پایه: اثر ملاتونین روی پاسخ‌های پایه در هر دو گروه روشنایی و تاریکی، افزایش معنی‌دار دامنه بود (به ترتیب ۲/۱۲±۱۲/۲٤ درصد افزایش و ۲/۰۸±۱٤/۲۷ درصد افزایش). در تایید نتایج حاصل از مطالعه ما می‌توان گفت؛ Musshoff و همکارانش گزارش کرده‌اند که ملاتونین، باعث افزایش واضح دامنه پاسخ پتانسیل‌های پس‌سیناپسی در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ می‌شود [۱٤]. گزارش Baydas و همکارانش نیز بیان می‌دارد که اثر ملاتونین بر پاسخ‌های پایه نورون‌ها، تسهیلی است [۲۹]. Escames و همکارانش در گزارش خود آورده‌اند که اثر مهاری وابسته به NMDA ملاتونین بر فعالیت پایه نورون‌ها شامل مهار آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز عصبی (nNOS) و مهار زیرواحد redox گیرنده NMDA می‌باشد [۳۰]. در تحقیق Wang و همکارانش که روی برش‌های مغزی تهیه شده از هیپوکامپ موش انجام شده بود، استفاده از ملاتونین اثری روی پاسخ‌های پایه در مقایسه با گروه کنترل نداشت [۳۱]. شاید علل اختلاف نتایج ما با نتایج متفاوت بالا این

باشد که اولا مطالعه ما به صورت in vivo بود و تمامی مطالعات ذکر شده به صورت in vitro انجام گرفته است. ثانیا دوز استفاده شده برای ملاتونین در مطالعات مختلف متفاوت هستند و ممکن است ملاتونین در دوزهای مختلف بر دستگاه‌های مختلف میانجی-های شیمیایی مغزی عمل کند.

ج) اثر القای LTP در fEPSPهای ثبت شده از ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ: در بخش بعدی مطالعه ما، به دنبال القای تحریک تتانیک در مدارهای نورونی ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی هر دو گروه کنترل روشنایی و کنترل تاریکی افزایش در اندازه‌ی دامنه‌ی پاسخ‌ها مشاهده گردید (به ترتیب حداکثر ۱۰/۹۹±۵۰/٤٦ درصد و حداکثر ٤/۰۷±٤۱/۲٤ درصد افزایش). LTP نیز در هر دو گروه القا گردید اما مدت زمان پایداری LTP در دو گروه LR و DR به ترتیب ۷۵ و۲۵ دقیقه بود (شکل شماره‌ی ۳). نقش گیرنده‌های NMDA در الگوهای مختلف یادگیری و القای LTP بالاخص در ناحیه‌ی هیپوکامپ به اثبات رسیده است [۳۲] و نشان داده شده است که آنتاگونیست‌های این گیرنده‌ها LTP را مهار می‌کنند [۳۳]. Duffy و همکارانش گفته‌اند که افزایش تحریکات حسی رسیده از محیط باعث افزایش LTP القا شده در نورون‌های ناحیه CA1 می‌شود [۲۷]. هرچند علت این تناقضات هنوز روشن نشده است؛ Kim و همکارانش در گزارش خود آورده‌اند که علت کاهش LTP در مدارهای ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در پاسخ به تغییر تجربه‌ی حسی، فعال شدن کانال‌های NMDA به دنبال تغییر در تجربه‌ی حسی است و این اثر را می‌توان با آنتاگونیست رقابتی کانال‌های NMDA یعنی CGP39551 مهار کرد [۲۸]. بر اساس اطلاعات موجود تا کنون تحقیقی در مورد اثر تغییر در تجربه‌ی حس بینایی بر تغییر کینتیک یا تعداد گیرنده‌های NMDA در ناحیه‌ی هیپوکامپ صورت نگرفته است و احتمال اینکه محرومیت از بینایی در دوره‌ی بحرانی تکامل مغز باعث تغییر در ساختار مولکولی گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ شود نیز وجود دارد که این مطلب خود بررسی بیشتری را می‌طلبد.

د) اثر ملاتونین بر القای LTP در fEPSP های ثبت شده از ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ: با اعمال تحریک تتانیک در گروه‌های دارو، ملاتونین مانع از افزایش اندازه‌ی دامنه‌ی پاسخ‌های ناشی از اعمال تحریک تتانیک در هر دو گروه شد و حتی این ممانعت در گروه روشنایی به حدی بود که ۲۰ دقیقه پس از اعمال تحریک تتانیک در پاسخ‌های این گروه LTD القا شد. Ozcan و همکارانش در گزارشی آورده‌اند که ملاتونین القای LTP در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ برش‌های مغزی موش صحرایی را مهار می‌کند [۱٦]. نتایج تحقیق Chaudhury و همکارانش نیز مبنی بر کاهش LTP القا شده در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ موش در حضور ملاتونین است [۳٤]. بیان شده است که اثر مهاری ملاتونین روی LTP در هیپوکامپ از طریق فعال شدن آنزیم پروتئین کیناز وابسته به آدنیلیل سیکلاز با واسطه‌ی گیرنده‌ی MT2 ملاتونین صورت می‌گیرد [۳۱]. بر خلاف نتایج حاصل از مطالعه‌ی ما، El-Sherif و همکارانش اعلام کرده‌اند که ملاتونین اثر تقویتی بر القای LTP در مدارهای ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ برش‌های مغزی موش دارد [۱۵]. علل تفاوت نتایج ما با نتایج این محققین می‌تواند موارد ذیل باشد: ۱- تحقیق ما به صورت in vivo و روی موش صحرایی انجام شد و این در حالی است که تحقیق فوق‌الذکر به صورت in vitro و روی موش انجام گرفته است. ۲- ما در تحقیق خود از دوز ۲ میکروگرم یا ۱۰ نانومول ملاتونین استفاده کردیم ولی El-Sherif و همکارانش از دوز ۱۰۰ میکرومول ملاتونین استفاده کردند. ۳- پروتوکل القای LTP ما، ۱۰۰ هرتز، ۱۰ بار با حد فاصل ۲ ثانیه بود ولی El-Sherif و همکارانش از پروتکل ۲۰۰ هرتز، ۳ بار با حد فاصل ۱۰ ثانیه استفاده کردند. ٤- حیوانات ما ٤۵ روزه و همگی از جنس نر بودند ولی حیوانات مورد استفاده در مطالعه فوق از هر دو جنس وکاملا بالغ بودند. اما چرا بین میزان مهار LTP در گروه روشنایی و تاریکی مطالعه ما تفاوت معنی‌دار وجود داشت؟ علت می‌تواند این باشد که محرومیت از نور باعث افزایش سطح سرمی ملاتونین و بنابراین تنظیم کاهشی گیرنده‌های ملاتونین می‌شود [۱۳، ۳۵]. در مجموع می‌توان گفت که ملاتونین باعث تقویت fEPSP های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ موش صحرایی می‌شود و این در حالی است که نگهداری موش‌ها در تاریکی مطلق به مدت ٤۵ روز باعث ایجاد تغییر در عمل تقویت fEPSP ها توسط ملاتونین نمی‌شود. بالعکس ملاتونین از القای LTP در این مدارهای نورونی جلوگیری می‌کند و نگهداری حیوانات در تاریکی مطلق برای ٤۵ روز با این عمل مهاری ملاتونین مقابله می‌کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود اولا نقش گیرنده-های ملاتونین در این بین مشخص گردیده و ثانیا تقابل عمل گیرنده‌های ملاتونین با گیرنده‌های NMDA در القای LTP در ناحیه‌ی هیپوکامپ بررسی شود. ثالثا نقش پرورش حیوانات در روشنایی مطلق (نوع دیگری از تغییر در تجربه حس بینایی) بر القای LTP در نورن‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ بررسی شود.

تشکر و قدردانی

هزینه انجام تحقیق ارایه شده از طریق طرح تحقیقاتی شماره ۸٦۲۸ به طور مشترک به وسیله معاونت پژوهشی دانشگاه

علوم پزشکی کاشان و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان تامین گردیده است. نویسندگان مقاله، از اعضای محترم گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، به دلیل همکاری‌های بی‌دریغ ایشان، و نیز از سرکار خانم سعیده داوری، به خاطر کمک‌های ایشان در انجام طرح تحقیقاتی، کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

References:

[1] Eichenbaum H. Otto T. Cohen NJ. Two functional components of the hippocampal memory system. ***Behav Brain Sci*** 1994; 17: 449-518.
[2] Lavenex P. Amaral DG. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. ***Hippocampus*** 2000; 10: 420-430.
[3] O'Keefe J. Nadel L. Hippocampus as a cognitive map London: Oxford University Press: 1987.
[4] Kirkwood A. Rioult MC. Bear MF. Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. ***Nature*** 1996; 381: 526-528.
[5] Crowley JC. Katz LC. Development of ocular dominance columns in the absence of retinal input. ***Nat Neurosci*** 1999; 2: 1125-1130.
[6] Fagiolini M. Hensch TK. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. ***Nature*** 2000; 404: 183-186.
[7] Lee WC. Nedivi E. Extended plasticity of visual cortex in dark-reared animals may result from prolonged expression of cpg15-like genes. ***J Neurosci*** 2002; 22: 1807-1815.
[8] Wiesel TN. Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. ***Nature*** 1982; 299: 583-691.
[9] Fathollahi Y. Salami M. The role of N-methyl-D-aspartate receptors in synaptic plasticity of rat visual cortex in vitro: effect of sensory experience. ***Neurosci Lett*** 2001; 306: 149-152.
[10] Maffei A. Nataraj K. Nelson SB. Turrigiano GG. Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation. ***Nature*** 2006; 1038: 81-84.
[11] Sermasi E. Tropea D. Dominici L. Long term depression is expressed during postnatal development in rat visual cortex: a role for visual experience. ***Dev Brain Res*** 1999; 113: 61-65.
[12] Berry RL. Perkins AT. Teyler TJ. Visual deprivation decreases long-term potentiation in rat visual cortical slices. ***Brain Res*** 1993; 628: 99-104.
[13] Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. ***Physiol Rev*** 1998; 78: 687-721.
[14] Musshoff U. Riewenherm D. Berger E. Fauteek JD. Speckmann EJ. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. ***Hippocampus*** 2002; 12: 165-173.
[15] El-sherif Y. Tesoriero J. Hagan MV. Wieroszko A. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. ***J Neurosci Res*** 2003; 72: 454-460.
[16] Ozcan M. Yilmaz B. Carpenter DO. Effects of melatonin on synaptic transmission and long-term potentiation in two areas of mouse hippocampus. ***Brain Res*** 2006; 1111: 90-94.
[17] Soto-moyano R. Burgos H. Flores F. Valladares L. Sierralta W. Fernandez V. et al. Melatonin administration impairs visuo-spatial performance and inhibits neocortical long-term potentiation in rats. ***Pharmacol Biochem Behav*** 2006; 85: 408-414.
[18] Fukunaga K. Horikawa K. Shibata S. TakeuchiY. Miyamoto E. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. ***J Neurosci Res*** 2002; 70: 799-807 .
[19] Argyriou A. Prast H. Philippu A. Melatonin facilitates short-term memory. ***Euro J Pharmacol*** 1998; 349: 159-162.
[20] Paxinos G. Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates New York: Academic press: 5 th ed. 2004.
[21] Li S. Cullen WK. Anwyl R. Rowan MJ. Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. ***Nat Neurosci*** 2003; 6: 526-531.
[22] Atapour N. Esteky H. Fathollahi Y. Alizadeh F. Primed-burst induced long-term potentiation in rat visual cortex: effects of dark-rearing. ***Brain Res*** 1999; 851: 148-153.
[23] Alonso M. Bekinschtein P. Cammarota M. Nianna MR. Izquierdo I. Medina JH. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. ***Learn Mem*** 2005; 12: 504-510.
[24] Lucas RJ. Freedman MS. Munoz M. Gorcia-Fernandez JM. Foster RG. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. ***Science*** 1999; 284: 505-507.
[25] Amaral DG. Kurz J. The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat. ***Neurosci Lett*** 1985; 59: 33-39.
[26] Pollock GS. Vernon E. Forbes ME. Yan Q. Ma YT. Hsieh T. et al. Effects of early visual experience and diurnal rhythms on BDNF mRNA and protein levels in the visual system, hippocampus, and cerebellum. ***J Neurosci*** 2001; 21: 3923-3931.
[27] Duffy JF. Dijk DJ. Hall EF. Czeisler CA. Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature

rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. ***J Investig Med*** 1999; 47: 141-150.
[28] Kim JJ. Foy MR. Thompson RF. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 1996; 93: 4750-4753.
[29] Baydas G. Yasar A. Tuzcu M. Comparison of the impact of melatonin on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young and aged rats. ***J Pineal Res*** 2005; 39: 346-352.
[30] Escames G. Leon L. Lopez LC. Acuna-Castroviejo D. Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. ***J Neurobiol*** 2004; 16: 929-935.
[31] Wang LM. Suthana NA. Chaudhury D. Weaver DR. Colwell CS. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. ***Euro J Neurosci*** 2005; 22: 2231-2237.
[32] Asztely F. Gustafsson B. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. ***Mol Neurobiol*** 1996; 12: 1-11.
[33] Kleinschmidt A. Bear MF. Winger W. Blockage of NMDA receptors disrupts experience-dependent plasticity of kitten striate cortex. ***Science*** 1987; 238: 355-358.
[34] Chaudhury D. Wang LM. Colwell CS. Circadian regulation of hippocampal long-term potentiation. ***J Biol Rhythms*** 2005; 20: 225- 236.
[35] Faillace MP. Delas Heres MA. Keller-Samineto MI. Rosentin RE. Daily variation in [125I]-melatonin specific binding in the golden hamster retina. ***Neuroreport*** 1996; 7: 141-144.