● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۶، ص ۷۰۲-۶۸۹، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر تکاملی ملاتونین بر پلاستیسیته سیناپسی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی محروم از بینائی

سید علیرضا طلائی*[1]، محمود سلامی[2]

خلاصه

مقدمه: تغییر در تجربه بینائی باعث ایجاد اختلال در ریتم‌های شبانه‌روزی می‌شود. در این مطالعه تأثیر محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز و دریافت ملاتونین بر پلاستیسیته سیناپسی در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ مورد بررسی قرار گرفته است.

روش: مطالعه تجربی حاضر بر روی موش‌های صحرائی نر پرورش یافته در سیکل ۱۲-۱۲ ساعته روشنائی تاریکی (Light reared; LR) و تاریکی کامل (Dark reared; DR) انجام شد. حیوانات هر گروه به ۳ زیر گروه ۲، ۴ و ۶ هفته (۱۶ تائی) تقسیم شدند. ابتدا پتانسیل‌های پس‌سیناپسی تحریکی میدانی از دندریت نورون‌های CA1 ثبت شد. سپس، در نیمی از حیوانات هر گروه ملاتونین به درون بطن مغز تزریق گردید و دوباره پاسخ‌های میدانی ثبت شد. در نهایت با اعمال تحریک تتانیک تقویت دراز مدت (Lorg-term potertiation: LTP) القا شد.

یافته‌ها: هم‌زمان با افزایش سن از اندازه دامنه پاسخ‌های پایه حیوانات LR کاسته شد (P<۰/۰۱). محرومیت از بینائی و دریافت ملاتونین باعث افزایش دامنه پاسخ‌های پایه حیوانات گردیده (P<۰/۰۱) و مانع از القای LTP در مدارهای ناحیه CA1 شد. در مقایسه با موش‌های LR، دریافت ملاتونین در موش‌های محروم از بینائی تأثیر مخرب کمتری بر القای LTP در ناحیه CA1 داشت (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: محرومیت از بینائی طی دوره بحرانی تکامل مغز طی یک روند وابسته به زمان باعث افزایش فعالیت پایه سیناپسی در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرائی شده و القای LTP در این نورون‌ها را تضعیف می‌کند. هم‌چنین، محرومیت از بینائی با تأثیر مخرب دریافت ملاتونین بر القای LTP در نورون‌های ناحیه CA1 طی یک روند وابسته به زمان مقابله می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پلاستیسیته سیناپسی، هیپوکامپ، دوره بحرانی، تجربه بینائی، ملاتونین، موش صحرایی

۱- دانشجوی دکتری علوم اعصاب، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران ۲- استاد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: talaei@kaums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۷/۲۶ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۱۰/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۱۷

مقدمه

تأثیر متقابل فعالیت ذاتی نورون‌ها و سیگنال‌های دریافتی از محیط در دوره بحرانی تکامل مغز پستانداران باعث بلوغ دستگاه عصبی آنها می‌شود (۱). هرگونه تغییر در نحوه دریافت سیگنال‌های محیطی (تجربه حسی) طی این دوران باعث ایجاد تغییرات شدید در ساختار و عملکرد دستگاه عصبی می‌شود (۲). نقش سیگنال‌های نوری در تکامل مغز پستانداران در دوره بحرانی تکامل مغز از دیگر انواع سیگنال‌ها پررنگ‌تر است (۳). در مطالعات زیادی تأثیر تغییر در نحوه دریافت سیگنال‌های نوری بر ساختار و عملکرد قشر بینائی نشان داده شده است (۵-۴). برای مثال بیان گردیده است که تغییر در تجربه بینائی به‌صورت محرومیت از دریافت نور باعث ایجاد اختلال در شکل‌پذیری سیناپسی در قشر بینائی موش‌های صحرائی می‌شود (۶). و یا در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که محرومیت از دریافت نور توسط یک چشم نیز باعث کاهش دامنه پتانسیل‌های برانگیخته بینائی در نورون‌های قشر بینائی موش‌های صحرائی می‌گردد (۷).

نقش تشکیلات هیپوکامپ در تشکیل برخی از انواع حافظه و یادگیری در مغز پستانداران کاملا محرز شده و هر دو مکانیسم پشنهادی برای شکل‌پذیری سیناپسی، تقویت دراز مدت (Long-term Potentiation; LTP) و تضعیف دراز مدت (Long-term Depression; LTD) در این ناحیه به‌خوبی مطالعه شده‌اند (۸). بخشی از پیام‌های حسی پس از پردازش در قشر حسی مربوطه به هیپوکامپ منتقل شده و در ایجاد یادگیری و تولید حافظه نقش ایفا می‌کنند (۹). در این میان، نقش قشر بینائی از سایر قشرها مهم‌تر است و نشان داده شده است که عمده ورودی حسی ناحیه هیپوکامپ از قشر بینائی تامین می‌شود (۱۰). همانند قشرهای حسی، برای هیپوکامپ نیز یک دوره بحرانی تکامل در ابتدای زندگی در نظر گرفته می‌شود (۱۱). با این‌حال، تنها مطالعات اندکی به بررسی تغییر در دریافت سیگنال‌های محیطی در دوره بحرانی تکامل مغز چه به‌صورت محرومیت از پیام‌های حسی (۱۲)، و چه به‌صورت تقویت دریافت پیام‌های محیطی (۱۳) بر ساختار و عملکرد این ناحیه پرداخته‌اند.

تغییر در نحوه دریافت پیام‌های بینائی به‌شدت ریتم‌های شبانه روزی ذاتی پستانداران را بر هم زده و در نتیجه باعث ایجاد برخی تغییرات فیزیولوژیک مثل تغییر در ریتم ترشح نوروهورمون ملاتونین می‌گردد (۱۴). بیشترین مقدار ترشح ملاتونین در فاز تاریکی ریتم‌های شبانه روزی اتفاق افتاده و نشان داده شده است که دریافت کوچک‌ترین سیگنال نورانی باعث افت شدید ترشح این نوروهورمون می‌شود (۱۵). بیشترین اعمال ملاتونین از طریق دو گیرنده غشایی به نام‌های MT1 و MT2 واسطه‌گری می‌شود که حضور آنها در مغز پستانداران، بالاخص در ناحیه هیپوکامپ به‌خوبی نشان داده شده است (۱۶). اگرچه تأثیر ملاتونین بر شکل‌پذیری سیناپسی مدارهای نورونی نواحی مختلف مغزی در برخی مطالعات نشان داده شده است، اما این نتایج اغلب متناقض بوده و یکدیگر را تائید نمی‌کنند. برخی مطالعات حاکی از اثر تسهیلی ملاتونین بر شکل‌پذیری سیناپسی بوده (۱۷) و برخی دیگر از اثر مهاری این نورهورمون بر شکل‌پذیری مدارهای نورونی حکایت دارند (۱۸). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تکاملی دریافت ملاتونین بر شکل‌پذیری مدارهای ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرائی رشد یافته در سیکل طبیعی روشنائی تاریکی و نیز موش‌های صحرائی محروم از نور طی دوره بحرانی تکامل مغز بود.

روش

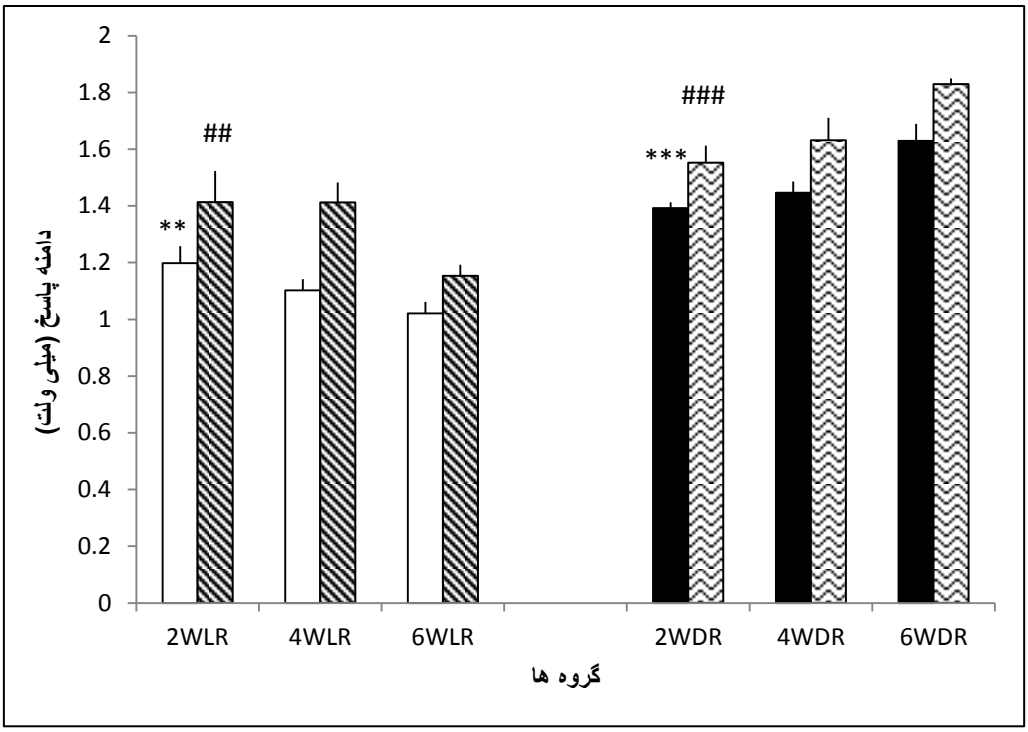
این پژوهش تجربی بر روی ۹۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار انجام گرفت. حیوانات در یک محیط استاندارد از نظر دما (۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت محیط (۵±۵۵ درصد) نگهداری می‌شدند و دسترسی آزادانه به آب و مواد غذایی داشتند. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با دستورالعمل‌های کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان رعایت گردیدند. حیوانات وارد شده در مطالعه از نظر نگهداری در شرایط نوری به دو گروه اصلی روشنایی (Light Reared-LR) و تاریکی (Dark Reared- DR) تقسیم شدند. حیوانات LR از بدو تولد تا لحظه آزمایش در شرایط طبیعی حیوان‌خانه یعنی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی پرورش یافته بودند و موش‌های صحرائی گروه DR از لحظه تولد تا پایان آزمایش در تاریکی کامل (۲۴ ساعت) قرار داشتند. هر گروه اصلی به ۳ زیرگروه ۱۶ تائی تقسیم شد. با توجه به اینکه دوره بحرانی تکامل مغز موش‌های صحرائی در حدود ۶ هفتگی به پایان می‌رسد (۱۹)، حیوانات یکی از این زیرگروه‌ها در سن ۲ هفتگی (2WLR, 2WDR)، گروه دوم در سن ۴ هفتگی (4WLR, 4WDR) و گروه سوم در سن ۶ هفتگی وارد مطالعه شدند (6WLR, 6WDR). نیمی از حیوانات هر زیرگروه (n=۸) به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده و نیمی دیگر طی آزمایشات الکتروفیزیولوژی ملاتونین دریافت می‌کردند. نیم ساعت قبل از انجام آزمایش، موش‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و به‌واسطه‌ی تزریق داخل صفاقی داروی اورتان (۱/۵ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش می‌شدند. حیوانات گروه تاریکی ابتدا با داروی مذکور در تاریکخانه بیهوش شده، سپس چشم آنها با چسب بسته شده و بعد به آزمایشگاه وارد می‌شدند. پس از ثابت نمودن سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA)، با تزریق ۰/۵ میلی-لیتر محلول لیدوکایین ۱٪ زیر پوست سر حیوان علاوه بر ایجاد بی‌حسی موضعی پوست سر نیز از جمجمه جدا می‌شد تا بریدن آن به آسانی صورت پذیرد. سپس، پوست سر از ناحیه پشت گردن تا نزدیک بینی برداشته شده و تمامی بافت‌ها به‌طور کامل کنار زده می‌شدند تا جمجمه نمایان شود. پس از تعیین نواحی برگما، لامبدا و خط وسط روی جمجمه محل قرارگیری الکترودها به‌وسیله اطلس استریوتاکسیک پاکسینوس و واتسون (۲۰) مشخص می‌شد. به‌منظور تزریق داخل بطن مغزی ملاتونین (۲ میکروگرم در ۵ میکرولیتر سرم فیزیولوژی) یک سوراخ با مختصات (AP= 0 mm, LR= 1.5 mm) در جمجمه ایجاد می‌شد و داروی مذکور از طریق کانول دست‌ساز متصل به سرنگ هامیلتون به آرامی و در مدت ۵ دقیقه با دست به درون بطن مغزی گروه‌های دریافت کننده ملاتونین تزریق می‌شد (۲۱). موش‌های گروه‌های کنترل ۵ میکرولیتر نرمال سالین دریافت می‌کردند. الکترود تحریکی در مختصات (AP= -4.2 mm, LR= 3.8 mm, D= 2.4 mm) در محل اکسون نورون‌های ناحیه انتورینال کورتکس میانی و الکترود ثبات نیز در مختصات (AP= -3.4 mm, LR= 2.5 mm, D= 2.5 mm) روی دندریت نورون‌های ناحیه CA1 قرار می‌گرفت. الکترودها هر دو دوقطبی و از جنس استیل زنگ‌نزن با پوشش تفلون و قطر ۰/۰۰۵ اینچ (A-M Systems USA) بودند. 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 حداقل ۲۰ درصدی دامنه‌ی دومین پاسخ نسبت به دامنه‌ی پاسخ اول نشان از درستی محل قرارگیری الکترودهای پایداری و تحریکی داشت. در پاسخ به تحریک نورون‌های انتورینال کورتکس، پتانسیل‌های پس‌سیناپسی تحریکی (Excitatory Post Synaptic Potential: EPSP) ابتدا توسط آمپلی

فایر (WSI, A3308, I.R.Iran) تا ۱۰۰۰ برابر تقویت شده و سپس با ورود به Data Acquisition Board (AD Instruments, Australia) تبدیل به داده‌های رقمی 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 ۶۰ درصد حداکثر دامنه پاسخ به دست می‌آمد به‌عنوان 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 ۵ هزارم ثانیه اعمال می‌گردید. سپس، به‌مدت ۳۰ دقیقه EPSP ثبت می‌شد. سپس، ملاتونین و یا حامل آن، نرمال سالین، تزریق می‌شد و ثبت به‌مدت ۳۰ دقیقه دیگر ادامه می‌یافت. 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 شامل ۱۰ تحریک با فرکانس ۲۰۰ هرتز و فاصله‌ی ۲ هزارم ثانیه بود. مدت زمان هر پالس تحریکی نیز ۰/۱ هزارم ثانیه بود. پس از تحریک تتانیک، روند تحریک و ثبت به‌مدت ۲ ساعت ادامه می‌یافت (۱۲). از نرم‌افزار Scope for Windows ساخت شرکت (Australia) PowerLab برای پدیده‌های تحریک و ثبت و نیز تجزیه و تحلیل پاسخ‌ها استفاده شد. به‌منظور مقایسه گروه‌ها، درصد تغییر دامنه‌ی پاسخ‌ها بر حسب میلی‌ولت قبل و بعد از دریافت دارو و نیز بعد از اعمال تحریک تتانیک مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش حداقل ۲۰ درصد در دامنه‌ی پاسخ‌ها پس از تحریک تتانیک به‌عنوان معیار وقوع LTP درنظر گرفته شد (۲۱). داده‌های حاصل با استفاده از آزمون ANOVA دو سویه به همراه پس آزمون Tukey آنالیز شده و $P<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

در این پژوهش تأثیر برهمکنش محرومیت از بینائی طی دوره بحرانی تکامل مغز و دریافت داخل بطن مغزی نوروهورمون ملاتونین بر شکل پذیری سیناپسی نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ موش صحرائی نر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون آنالیز واریانس دو سویه نشان داد که اختلاف بین دامنه همه گروه‌ها در حالت پایه، بعد از دریافت ملاتونین و بعد از القای LTP معنی‌دار است ($F_{۱۷ ،۵۷۴۸}=۲۱/۴۱۹$ ،$P<۰/۰۰۰۱$). آنالیز داده‌های مربوط به پاسخ‌های ثبت شده در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی که در سیکل روشنائی تاریکی طبیعی پرورش یافته بودند، نشان می‌دهد که میانگین دامنه‌ی پاسخ‌های پایه در گروه 2WLR، ۱/۱۲±۰/۰۶ میلی‌ولت بوده و با داشتن یک سیر نزولی به ۱/۰۲±۰/۰۴ میلی‌ولت در گروه 6WLR رسید. نتایج پس‌آزمون Tukey بیان‌گر آن است که اختلاف دامنه پاسخ پایه بین گروه‌های 2WLR و 6WLR معنی‌دار بوده ($P<۰/۰۱$، نمودار شماره‌ی ۱) و اختلاف بین گروه‌های 2WLR و 4WLR و نیز بین گروه‌های 4WLR و 6WLR معنی‌دار نبود. بالعکس، آنالیز داده‌های مربوط به اندازه دامنه پاسخ‌های پایه در حیوانات پرورش یافته در تاریکی ۲۴ ساعته نشان داد که هم‌زمان با پیشرفت سن، دامنه پاسخ‌ها یک روند افزایشی دارد. میانگین دامنه‌ی پاسخ‌ها در گروه 2WDR، ۱/۳۹±۰/۰۲ میلی‌ولت بود و به ۱/۶۳±۰/۰۶ میلی‌ولت در گروه 6WDR رسید. نتایج پس‌آزمون Tukey نشان داد اختلاف دامنه پاسخ پایه بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنی دار است ($P<۰/۰۰۱$). اگرچه تزریق داخل بطن مغزی حلال هیچ تأثیری بر اندازه دامنه پاسخ‌های پایه نداشت، اما تزریق ملاتونین اندازه دامنه پاسخ‌های پایه در گروه‌های LR را در حدود ۱۲ درصد و اندازه دامنه گروه‌های DR را در حدود ۲۰ درصد افزایش داد؛ اختلاف دامنه در همه گروه‌های تاریکی و روشنائی قبل و بعد از

تزریق ملاتونین معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). مقایسه درون‌گروهی داده‌های مربوط به دامنه پاسخ‌های پس از تزریق ملاتونین نیز نشان می‌دهد که اندازه دامنه در گروه‌های LR روند کاهش داشت و از ۱/۴۱±۰/۱۱ میلی‌ولت در گروه 2WLR به ۱/۱۵±۰/۰۴ میلی‌ولت در گروه 6WLR رسید (P<۰/۰۱). یک روند افزایشی نیز در اندازه دامنه پاسخ‌های حیوانات گروه DR همزمان با افزایش سن مشاهده شد؛ به‌نحوی که بزرگی دامنه از ۱/۵۵±۰/۰۶ میلی‌ولت در گروه 2WDR به ۱/۸۳±۰/۰۲ میلی‌ولت در گروه 6WDR رسید (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۱. *مقایسه میانگین دامنه پاسخ‌ها در گروه‌های مختلف حیوانات پرورش یافته در سیکل روشنائی طبیعی ۱۲ ساعته (LR، ستون‌های سفید) و تاریکی کامل (DR، ستون‌های سیاه) در سنین مختلف و نیز تأثیر دریافت ملاتونین داخل بطن مغزی بر آنها (ستون‌های هاشور خورده).*

** اختلاف دامنه بین گروه‌های 2WLR و 6WLR معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

*** اختلاف دامنه بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

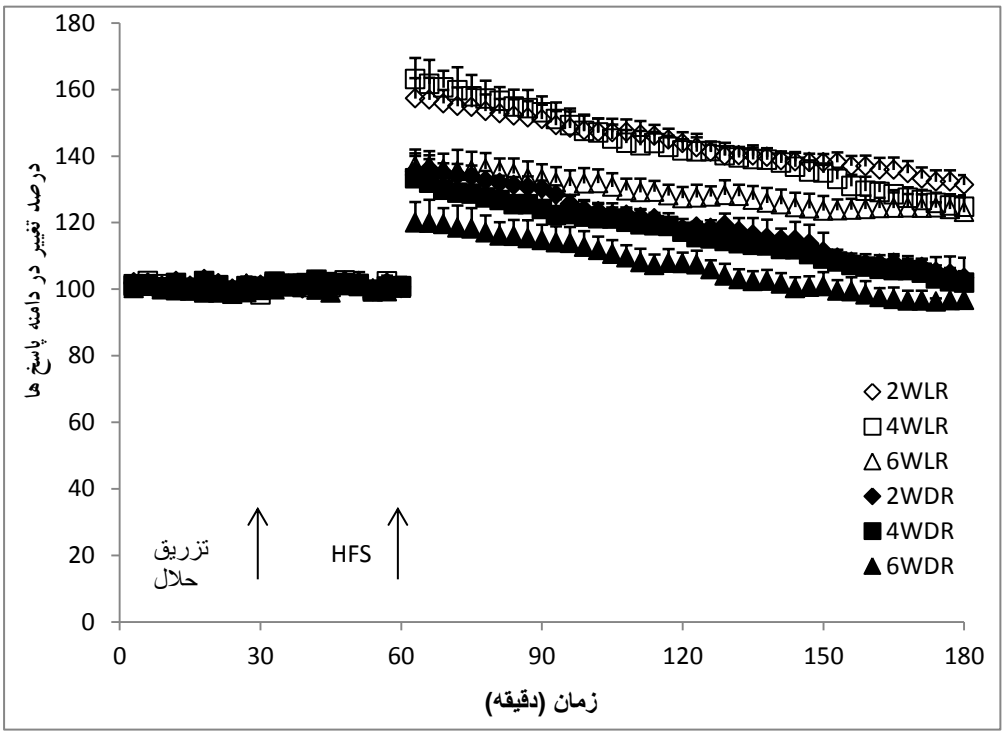
اختلاف دامنه در همه گروه‌های تاریکی و روشنائی قبل و بعد از تزریق ملاتونین معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

اختلاف دامنه بین گروه‌های 2WLR و 6WLR بعد از تزریق ملاتونین معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

اختلاف دامنه بین گروه‌های 2WDR و 6WDR بعد از تزریق ملاتونین معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

بعد از ثبت پاسخ‌های پایه به مدت ۳۰ دقیقه، تزریق حلال و ادامه دادن ثبت پاسخ‌های پایه برای مدت ۳۰ دقیقه دیگر، با اعمال تحریک تتانیک با فرکانس ۱۰۰ هرتز، LTP در مدار مسیر پرفورنت به ناحیه CA1 القا شده و سپس ثبت به‌مدت ۲ ساعت ادامه یافت. بررسی نتایج نشان می‌دهد که القای LTP منجر به افزایش قابل توجهی در دامنه‌ی fEPSPها گردیده و اختلاف بین قبل و بعد از القای LTP در همه گروه‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). همان‌گونه که در نمودار شماره‌ی ۲ نیز مشخص گردیده است، همزمان با افزایش سن و نزدیک شدن به بلوغ نهایی مدارهای مغزی از میزان

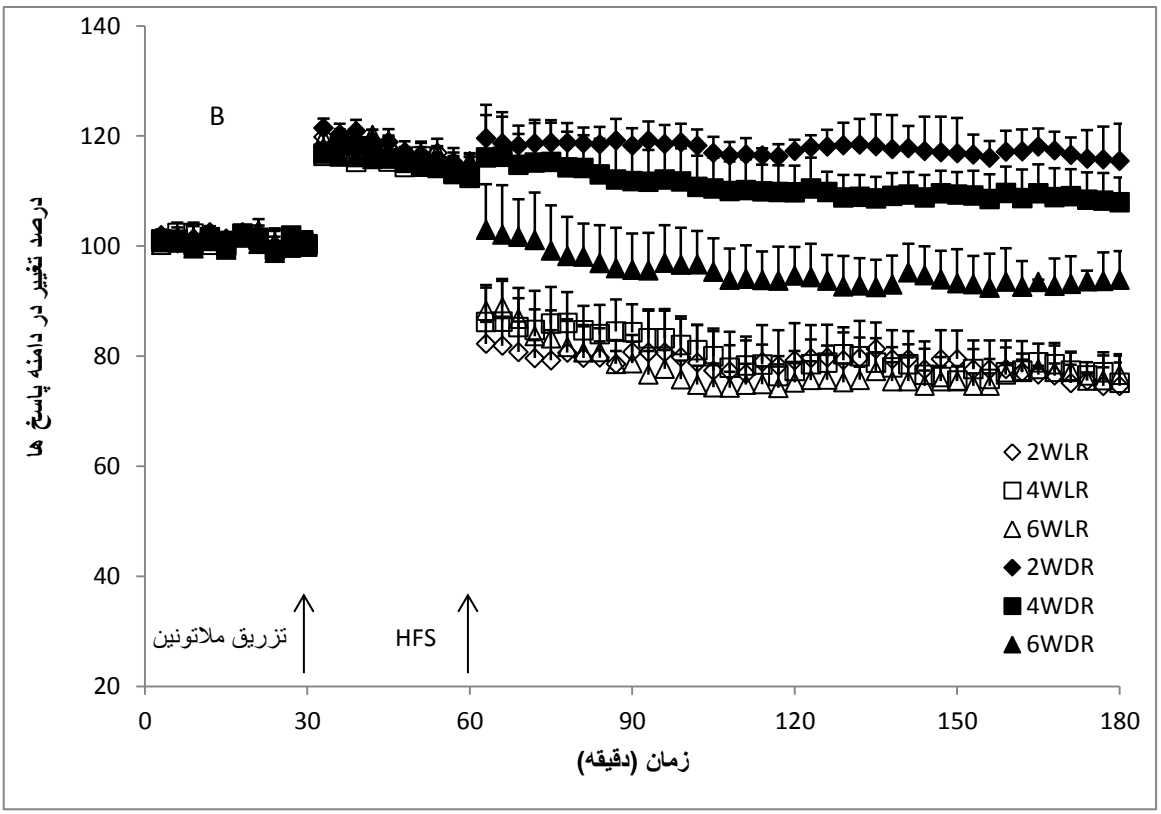
افزایش دامنه بعد از اعمال تحریک تتانیک در گروه‌ها کاسته می‌شود؛ به‌طوری که بیشترین میزان افزایش در حیوانات گروه 2WLR (۶/۱۶±۵۷/۳۱ درصد) و کمترین افزایش در حیوانات 6WLR (۴/۹۸±۳۶/۹۹ درصد) دیده می‌شود. نتایج پس آزمون نشان می‌دهد که اختلاف بین دامنه پاسخ‌ها بعد از القای LTP در گروه‌های 2WLR و 6WLR معنی دار است (P<۰/۰۰۱). اگرچه اعمال تحریک پرفرکانس در مسیر پرفورنت به CA1 هیپوکامپ حیوانات پرورش یافته در تاریکی ۲۴ ساعته نیز افزایش قابل توجهی در دامنه‌ی fEPSPها شد، اما لازم به ذکر است که میزان افزایش در دامنه همه پاسخ‌ها در مقایسه با حیوانات هم‌سن که در روشنائی پرورش یافته بودند، کمتر بود (P<۰/۰۰۱). روند کاهش دامنه پاسخ‌های بعد از اعمال تحریک تتانیک هم‌زمان با افزایش سن در حیوانات DR دیده می‌شود. نتایج آنالیز آماری نیز نشان داد که اختلاف بین دامنه پاسخ‌ها بعد از القای LTP در گروه‌های 2WDR (۵/۳۹±۳۵/۴۲ درصد افزایش) و 6WDR (۶/۲۸±۱۹/۹۵ درصد افزایش) معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۲. *اعمال تحریک تتانیک در fEPSPهای ثبت شده از ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرائی باعث القای LTP شد. اختلاف بین دامنه پاسخ‌ها قبل و بعد از القای LTP در همه گروه‌ها معنی‌دار است (P<۰/۰۰۰۱). هم‌چنین، اختلاف بین دامنه پاسخ‌ها بعد از القای LTP در گروه‌های 2WLR و 6WLR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). میزان افزایش در دامنه پاسخ‌های حیوانات DR در مقایسه با حیوانات هم‌سن که در روشنائی پرورش یافته بودند (LR)، کمتر بود (P<۰/۰۰۱). به‌علاوه، اختلاف بین دامنه پاسخ‌ها بعد از القای LTP در گروه‌های 2WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).*

تزریق داخل بطن مغزی ملاتونین نه‌تنها مانع از القای LTP در همه گروه‌های LR شد که باعث گردید به‌وضوح دامنه پاسخ‌ها پس از اعمال تحریک تتانیک نسبت به قبل از اعمال آن کاهش یابد (P<۰/۰۰۱). آنالیز آماری داده‌ها

نشان می‌دهد که اختلاف دامنه بعد از اعمال تحریک تتانیک بین گروه‌های سنی LR معنی‌دار نیست (نمودار شماره ۳). تزریق ملاتونین در بطن جانبی مغز حیوانات گروه DR نیز مانع از القای LTP در دامنه پاسخ‌ها شد، اما در مقایسه با حیوانات هم‌سن پرورش یافته در سیکل طبیعی حیوانخانه تغییرات ایجاد شده در دامنه پاسخ‌ها در همه گروه‌ها کمتر بود (P<۰/۰۱). لازم به ذکر است که ممانعت ایجاد شده توسط ملاتونین برای القای LTP در گروه‌های تاریکی از یک روند کاهشی وابسته به سن برخوردار بود؛ به‌طوری که میزان افزایش در گروه 2WDR برابر ۱۹/۵۸±۶/۰۸ درصد بود و به ۱۶/۰۹±۷/۷۱ و ۲/۹۸±۴/۹۳ درصد در گروه‌های 4WDR و 6WDR رسید. آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف دامنه پس از اعمال تحریک تتانیک بین گروه‌های 2WDR و 6WDR و نیز بین گروه‌های 4WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۱ برای هر دو مقایسه).



نمودار ۳. *تزریق داخل بطن مغزی ملاتونین مانع از القای LTP متعاقب اعمال تحریک تتانیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرائی همه گروه‌ها شد و این ممانعت در گروه‌های پرورش یافته در سیکل طبیعی حیوانخانه واضح‌تر بود (P<۰/۰۱). اختلاف دامنه پس از اعمال تحریک تتانیک بین گروه‌های 2WDR و 6WDR و نیز بین گروه‌های 4WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۱ برای هر دو مقایسه).*

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه تأثیر دریافت ملاتونین و تغییر در تجربه بینائی در دوره بحرانی تکامل مغز بر شکل‌پذیری سیناپسی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هم‌زمان با افزایش سن از میزان دامنه پتانسیل‌های پس

سیناپسی ثبت شده از ناحیه CA1 هیپوکامپ کاسته شده و محرومیت از بینائی طی یک روند وابسته به زمان بر اندازه دامنه می‌افزاید. به‌علاوه، اگرچه اعمال تحریک پرفرکانس بر مدارهای این ناحیه باعث القای LTP گردید، اما محرومیت از سیگنال‌های بینائی به‌شدت از اندازه و پایداری تقویت پاسخ‌های سیناپسی در مقایسه با حیوانات LR کاست. هم‌چنین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دریافت داخل بطن مغزی ملاتونین اگرچه باعث افزایش دامنه پاسخ‌های پایه در هر دو گروه LR و DR می‌شود اما به‌شدت القای LTP را مهار کرده و این مهار در حیوانات LR کاملا بارزتر است؛ به‌نحوی که در هر سه گروه حیوانات LR دریافت ملاتونین منجر به القای LTD پس از اعمال تحریک تتانیک شد. همان‌گونه که قبلا نیز توضیح داده شد، تنها مطالعات اندکی به بررسی تأثیر تغییر در تجربه حسی بالاخص تغییر در تجربه حس بینائی بر ساختار و عملکرد هیپوکامپ پرداخته‌اند. قشر بینائی منبع اصلی تامین کننده ورودی‌های حسی به ناحیه هیپوکامپ پستانداران است و نشان داده شده است که تحریک تتانیک هسته زانوئی خارجی منجر به افزایش دامنه پتانسیل‌های تجمعی ثبت شده از ناحیه شکنج دندانه‌ای می‌شود (۱۰). ما در مطالعه قبلی خود نشان دادیم که محرومیت از بینائی مانع از القای LTP در هردو ناحیه شکنج دندانه‌ای و CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرائی می‌شود (۱۲). میزان و نوع فعالیت سیناپسی در مدارهای نورونی مغز پستانداران حاصل ایجاد تعادل بین فعالیت نوروترانسمیترهای تحریکی و مهاری منتهی شده به سیناپس است. فعالیت تحریکی در ناحیه هیپوکامپ به‌طور عمده از طریق نوروترانسمیتر گلوتامات و گیرنده‌های آن AMPA و NMDA واسطه‌گری می‌شود. اگرچه هم‌زمان با بلوغ مغز بیان گیرنده‌های AMPA افزایش می‌یابد (۲۲)، اما تغییر در نحوه چینش زیرواحدهای این گیرنده باعث می‌شود که پتانسیل‌های تحریکی وابسته به AMPA کاهش یابند (۲۳). هم‌چنین، در طول دوره بحرانی تکامل مغز، چینش زیرواحدهای گیرنده NMDA نیز دستخوش تغییر شده و در نتیجه میزان فعالیت این گیرنده تغییر می‌کند (۲۴). برای مثال در ابتدای تولد بیان زیرواحد NR2B در بسیاری از نواحی مغز به‌ویژه هیپوکامپ بسیار بیشتر از زیرواحد NR2A بوده و همزمان با بلوغ مغز بیان NR2A از NR2B پیشی می‌گیرد (۲۵). افزایش نسبت NR2A/NR2B باعث می‌شود که کینتیک گیرنده‌های NMDA کاهش یابد (۲۴). به‌علاوه، نشان داده شده است که ساختار و عملکرد مدارهای GABAergic مغز نیز طی تکامل مغز تغییر می‌کند (۲۶)؛ به‌نحوی که این مدارها در ابتدای تولد دارای فعالیت تحریکی در ناحیه هیپوکامپ بوده و وقتی مغز بالغ می‌شود فعالیت مهاری پیدا می‌کنند (۲۷). در مجموع می‌توان گفت کاهش جریان‌های تحریکی وابسته به NMDA و AMPA همزمان با بلوغ مغز و نیز افزایش فعالیت مهاری وابسته به GABA علت کاهش دامنه پاسخ مدارهای CA1 قبل و بعد از اعمال تحریک تتانیک هم‌زمان با افزایش طی دوره بحرانی تکامل مغز است. نشان داده شده است که تغییر در تجربه بینائی تعادل پیام‌های تحریکی و مهاری را در مدارهای نورونی قشر بینائی به هم می‌ریزد. محرومیت از بینائی هر دو زیرواحد گیرنده AMPA یعنی GluR1 (۲۳) و GluR2 (۵) را افزایش داده و در نتیجه باعث افزایش پتانسیل‌های پس سیناپسی تحریکی در قشر بینائی موش سوری می‌شود (۲۳). هم‌چنین، چینش زیرواحدهای گیرنده NMDA در قشر بینائی نیز در موش‌های صحرائی محروم از نور دستخوش تغییر شده و نسبت NR2A/NR2B کاهش می‌یابد (۲۸). Morales و همکاران نشان داده‌اند که

محرومیت از بینائی مانع از بلوغ مدارهای GABAergic در قشر بینائی شده و در نتیجه از مهار در قشر بینائی کاسته می‌شود (۲۹). در تائید نتایج مطالعه حاضر، نتایج برخی مطالعات انجام گرفته در قشر بینائی نیز حاکی از تأثیر مهاری محرومیت از بینائی بر شکل‌پذیری سیناپسی در مدارهای نورونی این ناحیه است (۳۰). برخی از انواع LTP همانند LTP القا شده در ناحیه CA1 هیپوکامپ وابسته به NMDA هستند (۳۱). در این نوع LTP پس از تجمع کلسیم در پایانه پس سیناپسی و افزایش پتانسیل پایانه بلوک منیزیمی دهانه NMDA برداشته شده و LTP القا می‌شود (۳۲). نشان داده شده است که حضور هر دو زیرواحد NR2A و NR2B برای القای LTP در مسیر شافر کولترال به CA1 ضروری است (۳۳). بیان گردیده است که کاهش تکاملی القای LTP در لایه IV قشر بینائی موش در ارتباط مستقیم با کاهش بیان زیرواحد NR2B همزمان با بلوغ مغز در این ناحیه از قشر بینائی است (۳۴). ترشح هورمون غده پینه‌آل، ملاتونین، از یک ریتم شبانه‌روزی پیروی کرده و بیشترین میزان ترشح آن در فاز تاریکی اتفاق می‌فتد. کمترین مواجهه با سیگنال نور در فاز تاریکی به‌شدت ترشح آن را سرکوب می‌کند. عمده فعالیت ملاتونین از طریق دو گیرنده غشائی وابسته به خانواده G پروتئین‌ها یعنی MT1 و MT2 صورت گرفته (۱۴) و حضور آنها در اکثر نواحی مغز پستانداران به‌ویژه ناحیه هیپوکامپ به اثبات رسیده است (۳۵). اگرچه تاکنون مطالعه‌ای به‌منظور بررسی تغییرات بیان گیرنده‌های ملاتونین در ناحیه هیپوکامپ هم‌زمان با تغییرات سن انجام نشده است، اما در برخی مطالعات دیگر تغییرات بیان گیرنده‌های مذکور در سایر نواحی مغز نشان داده شده است. برای مثال، Zitouni و همکاران نشان داده‌اند که پس از تولد تا یک ماهگی بیان هر دو گیرنده ملاتونین در هسته سوپراکیاسماتیک کاهش یافته و بعد از آن تا هنگام بلوغ مغز روبه افزایش گذاشته و پس از بلوغ تغییر چندانی نمی‌کند (۳۶). ملاتونین از طریق تنظیم ریتم‌های شبانه‌روزی فعالیت پیامبرهای عصبی و گیرنده‌های آنها فعالیت مدارهای نورونی مغز پستانداران را تنظیم و تعدیل می‌کند (۳۷). نشان داده شده است که ملاتونین ریتم‌های شبانه‌روزی ترشح GABA و گلوتامات (۳۸) و نیز دوپامین (۳۹) را در جسم مخطط موش سوری تنظیم می‌کند. هم‌چنین، ملاتونین از طریق تنظیم فعالیت برخی پیامبرهای درون سلولی مثل BDNF (۴۰)، نیتریک اکساید (۴۱)، کالمودولین (۴۲)، و کالرتینین (۴۳) نیز فعالیت نورون‌ها را تنظیم می‌کند. اخیرا در یک مطالعه نشان داده شده است که ملاتونین از طریق افزایش فعالیت گلوتاماترژیگ در ناحیه هیپوکامپ موش‌های مدل سندروم داون باعث افزایش فعالیت پایه نورون‌های ناحیه CA1 می‌شود (۴۴). هم‌چنین، بیان شده است که ملاتونین سرعت تولید پتانسیل عمل در نورون‌های ناحیه CA1 را افزایش می‌دهد (۳۵). نشان داده شده است که ملاتونین پتانسیل‌های تحریکی وابسته به NMDA را در جسم مخطط موش مهار می‌کند (۴۵). چون LTP القا شده در ناحیه هیپوکامپ وابسته به NMDA است (۳۱)، می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که شاید ملاتونین از طریق مهار فعالیت تحریکی وابسته به NMDA در ناحیه هیپوکامپ نیز مانع از القای LTP در این ناحیه می‌شود. در مجموع می‌توان گفت محرومیت از بینائی طی دوره بحرانی تکامل مغز طی یک روند وابسته به زمان باعث افزایش فعالیت پایه سیناپسی در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرائی شده و القای LTP در این نورون‌ها را تضعیف می‌کند. هم‌چنین، محرومیت از بینائی با تأثیر مخرب دریافت ملاتونین بر القای LTP در

نورون‌های ناحیه CA1 طی یک روند وابسته به زمان مقابله می کند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر در قالب بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری علوم اعصاب در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان به انجام رسیده و هزینه انجام آن از طریق طرح تحقیقاتی شماره ۹۱۵٤ به‌وسیله معاونت پژوهشی این دانشگاه تامین گردیده است. نویسندگان مقاله، از همکاری‌های بی‌دریغ این معاونت کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آورند.

References

1. Voss P. Sensitive and critical periods in visual sensory deprivation. *Front Psychol* 2013; 4: 664.
2. Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(11): 877-88.
3. Morishita H, Hensch TK. Critical period revisited: impact on vision. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18(1): 101-7.
4. Tropea D, Van Wart A, Sur M. Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2009; 364(1515): 341-55.
5. Beston BR, Jones DG, Murphy KM. Experience-Dependent Changes in Excitatory & Inhibitory Receptor Subunit Expression in Visual Cortex. *Front Synaptic Neurosci* 2010; 2: 138
6. Salami M, Fathollahi Y, Semnanian S, Atapour N. Differential effect of dark rearing on long-term potentiation induced by layer IV and white matter stimulation in rat visual cortex. *Neurosci Res* 2000; 38(4): 349-56.
7. Montey KL, Quinlan EM. Recovery from chronic monocular deprivation following reactivation of thalamocortical plasticity by dark exposure. *Nat Commun* 2011; 2: 317.
8. Sloviter RS, Lomo T. Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization. *Front Neural Circuits* 2012; 6: 102.
9. Wang SH, Morris RG. Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol* 2010; 61: 49-79.
10. Tsanov M, Manahan-Vaughan D. Synaptic plasticity from visual cortex to hippocampus: systems integration in spatial information processing. *Neuroscientist* 2008; 14(6): 584-97.
11. Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 2007; 54(4): 559-66.
12. Talaei SA, Salami M. Sensory experience differentially underlies developmental alterations of LTP in CA1 area and dentate gyrus. *Brain Res* 2013; 1537: 1-8.
13. Novkovic T, Mittmann T, Manahan-Vaughan D. BDNF contributes to the

facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment. *Hippocampus* 2015; 25(1): 1-15.

14. Hardeland Rd, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin-a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 2011; 93(3): 350-84.
15. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 2006; 273(13): 2813-38.
16. Stewart LS, Leung LS. Hippocampal melatonin receptors modulate seizure threshold. *Epilepsia* 2005; 46(4): 473-80.
17. Wan Q, Man HY, Liu F, Braunton J, Niznik HB, Pang SF, et al. Differential modulation of GABAA receptor function by Mel1a and Mel1b receptors. *Nat Neurosci* 1999; 2(5): 401-3.
18. 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(1): 90-4.
19. Yang L, Pan Z, Zhou L, Lin S, Wu K. Continuously changed genes during postnatal periods in rat visual cortex. *Neurosci Lett* 2009; 462(2): 162-5.
20. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press,
21. Talaei SA, Sheibani V, Salami M. Light deprivation improves melatonin related suppression of hippocampal plasticity. *Hippocampus* 2010; 20(3): 447-55.
22. Kerchner GA, Nicoll RA. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9(11): 813-25.
23. Goel A, Jiang B, Xu LW, Song L, Kirkwood A, Lee HK. Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience. *Nat Neurosci* 2006; 9(8): 1001-3.
24. Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 2008; 55(7): 1081-94.
25. Liu X-B, Murray KD, Jones EG. Switching of NMDA Receptor 2A and 2B Subunits at Thalamic and Cortical Synapses during Early Postnatal Development. *J Neurosci* 2004; 24(40): 8885-95.
26. Koyanagi Y, Yamamoto K, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Presynaptic Interneuron Subtype- and Age-Dependent Modulation of GABAergic Synaptic Transmission by α-Adrenoceptors in Rat Insular Cortex. *J Neurophysiol* 2010; 103(5): 2876-88.
27. Tyzio R, Minlebaev M, Rheims S, Ivanov A, Jorquera I, Holmes GL, et al. Postnatal changes in somatic γ-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 2008; 27(10): 2515-28.
28. Quinlan EM, Philpot BD, Huganir RL, Bear MF. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat Neurosci* 1999; 2(4): 352-7.

29. Morales B, Choi SY, Kirkwood A. Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex. *J Neurosci* 2002; 22(18): 8084-90.

30. Berry RL, Perkins AT, Teyler TJ. Visual deprivation decreases long-term potentiation in rat visual cortical slices. *Brain Res* 1993; 628(1-2): 99-104.

31. Ireland DR, Abraham WC. Mechanisms of group I mGluR-Dependent long-term depression of NMDA receptor-mediated transmission at schaffer collateral-CA1 synapses. *J Neurophysiol* 2009; 101: 1375-85.

32. Molnár E. Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Deve Biol* 2011; 22(5): 506-13.

33. Jin SX, Feig LA. Long-term potentiation in the CA1 hippocampus induced by NR2A Subunit-Containing NMDA glutamate receptors Is mediated by Ras-GRF2/Erk map kinase signaling. *PLoS ONE* 2010; 5(7): e11732.

34. Erisir A, Harris JL. Decline of the critical period of visual plasticity is concurrent with the reduction of NR2B subunit of the synaptic NMDA receptor in layer 4. *J Neurosci* 2003; 23(12): 5208-18.

35. Musshoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus* 2002; 12(2): 165-73.

36. Zitouni M, Pevet P, Masson-Pevet M. Brain and pituitary melatonin receptors in male rat during post-natal and pubertal development and the effect of pinealectomy and testosterone manipulation. *J Neuroendocrinol* 1996; 8(8): 571-7.

37. Chaudhury D, Wang LM, Colwell CS. Circadian regulation of hippocampal long-term potentiation. *J Biol Rhythms* 2005; 20(3): 225-36.

38. Marquez de Prado B, Castaneda TR, Galindo A, del Arco A, Segovia G, Reiter RJ, et al. Melatonin disrupts circadian rhythms of glutamate and GABA in the neostriatum of the aware rat: a microdialysis study. *J Pineal Res* 2000; 29(4): 209-16.

39. Khaldy H, Leon J, Escames G, Bikjdaouene L, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Circadian rhythms of dopamine and dihydroxyphenyl acetic acid in the mouse striatum: effects of pinealectomy and of melatonin treatment. *Neuroendocrinology* 2002; 75(3): 201-8.

40. Iuvone PM, Boatright JH, Tosini G, Ye K. N-acetylserotonin: circadian activation of the BDNF receptor and neuroprotection in the retina and brain. *Adv Exp Med Biol* 2014; 801: 765-71.

41. Miller E, Morel A, Saso L, Saluk J. Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Application in Neurodegenerative Disorders. *Curr Top Med Chem* 2015; 15(2): 163-9.

42. Dominguez-Alonso A, Valdes-Tovar M, Solis-Chagoyan H, Benitez-King G. Melatonin stimulates dendrite formation and complexity in the hilar zone of the rat hippocampus: participation of the ca++/calmodulin complex. *Int J Mol Sci* 2015; 16(1): 1907-27.

43. Ramirez-Rodriguez G, Gomez-Sanchez

A, Ortiz-Lopez L. Melatonin maintains calcium-binding calretinin-positive neurons in the dentate gyrus during aging of Balb/C mice. *Exp Gerontol* 2014; 60: 147-52.

44. Corrales A, Vidal R, Garcia S, Vidal V, Martinez P, Garcia E, et al. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J Pineal Res* 2014; 56(1): 51-61.

45. Escames G, Leon J, Lopez LC, Acuna-Castroviejo D. Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J Neuroendocrinol* 2004; 16(11): 929-35.

Developmental Effects of Melatonin on Synaptic Plasticity of Hippocampal CA1 Neurons in Visual Deprived Rats

Sayyed Alireza Talaei, M.Sc. [1*], Mahmoud Salami, Ph.D. [2]

1. Ph.D. Candidate of Neuroscience, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

2. Professor of Physiology, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

* Corresponding author; e-mail: talaei@kaums.ac.ir

(Received: 17 Oct. 2015 Accepted: 26 Jan 2016)

Abstract

Background & Aims: Change in visual experience impairs circadian rhythms. In this study, The effects of visual deprivation during critical period of brain development and melatonin intake on synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons were evaluated.

Methods: This experimental study was done on male rats kept in standard 12 hour light/dark condition (Light Reared-LR) or in complete darkness (Dark Reared-DR). Each group, was divided into 3 sub groups of 2, 4 and 6 week old rats (n=16). Excitatory post synaptic field potentials were recorded from dendrite of CA1 area neurons. Then, half of animals in each group received melatonin via ICV and field potentials recording was repeated. Finally, using tetanic stimulation, Long-term potentiation (LTP) was induced.

Results: The amplitude of basic responses of the LR animals decreased with age incaease ($P<0.01$). Visual deprivation and also melatonin increased the amplitude of basic responses of the DR group ($P<0.01$), and inhibited LTP induction in CA1 circuits. In comparison to the LR group, melatonin injection had less destructive effect on the LTP induction in the DR group ($P<0.001$).

Conclusion: Visual deprivation during critical period of brain development increases basic responses of rat's CA1 neurons and inhibits LTP induction in these neurons, time dependently. Also, the visual deprivation opposes the destructive effects of melatonin on LTP induction in CA1 neurons in a time-dependent manner.

Keywords: Neuronal Plasticity, Hippocampus, Critical Period, Visual perception, Melatonin, Rat

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(6): 689-702