ORIGINAL ARTICLE

Evaluating Effects of Visual Deprivation during Critical Period of Brain Development on Expression of NMDA Receptor Subunits in Rat's Hippocampus

Sayyed Alireza Talaei,
Abolfazl Azami,
Mahmoud Salami

[1] Ph.D. Student, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[2] Assistant Professor, Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences , Kashan, Iran
[3] Professor, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received July 27, 2014; Accepted December 14, 2014)

Abstract

Background and purpose: Visual deprivation during critical period of brain development impairs structure and function of NMDA receptors in visual cortex. Parts of visual signals go to the hippocampus through the visual cortex. Therefore, this study aimed at investigating the effects of visual deprivation during critical period of brain development on NMDA receptor subunits expression in rats' hippocampus.

Materials and methods: This experimental study was carried out in 36 male rats that were divided into two groups. They were kept in standard 12 hour light/dark condition (Light Reared-LR) or in complete darkness (Dark Reared-DR) from birth to the time of experiments. The animals in each group were divided into 3 groups and studied at the ages of 2, 4 and 6 weeks. Expression of mRNA of NR1, NR2A and NR2B subunits in hippocampus was evaluated by RT-PCR using Western Blot technique. The protein expression of those subunits was also investigated.

Results: Relative expression of mRNA and protein of NR1 and NR2A subunits increased time dependently in LR animals, but the expression of NR2B subunit did not change. Although dark rearing did not prevent increasing of NR1 expression, but reduced the expression of NR2A and NR2B subunits.

Conclusion: Visual deprivation during critical period of brain development time dependently inhibited maturation of NMDA receptor of rat's hippocampus.

Keywords: Critical period, Hippocampus, NMDA receptor, Rat, Visual deprivation

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120):232-241 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۰ دی سال ۱۳۹۳ (۲۴۱-۲۳۲)

بررسی تأثیر محرومیت از بینایی طی دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان زیرواحدهای گیرنده NMDA در هیپوکامپ موش صحرایی

سید علیرضا طلائی[۱]
دکتر ابوالفضل اعظمی[۲]
دکتر محمود سلامی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز باعث ایجاد اختلال در ساختار و عملکرد گیرنده‌های NMDA قشر بینایی می‌شود. به دلیل اینکه بخشی از پیام‌های بینایی از طریق قشر به هیپوکامپ می‌رسند، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان زیرواحدهای گیرنده NMDA در هیپوکامپ موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی بر روی ۳۶ موش صحرایی نر که در دو گروه پرورش یافته در سیکل ۱۲-۱۲ روشنایی تاریکی (LR) و تاریکی کامل (DR) از بدو تولد تا لحظه آزمایش قرار گرفتند، انجام شد. حیوانات هر گروه به سه زیرگروه ۲، ۴ و ۶ هفته‌ای تقسیم شدند. بیان mRNA مربوط به زیرواحدهای NR1، NR2A و NR2B در هیپوکامپ با روش RT-PCR و بیان پروتئین زیرواحدهای مذکور با روش وسترن بلات بررسی شد.

یافته‌ها: بیان نسبی mRNA و پروتئین زیرواحد NR1 و NR2A در حیوانات LR طی روندی وابسته به زمان افزایش داشته و بیان زیرواحد NR2B تغییری نکرد. پرورش در تاریکی اگرچه مانع افزایش بیان NR1 نشد، اما باعث کاهش بیان هر دو زیرواحد NR2A و NR2B شد.

استنتاج: محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز طی یک روند وابسته به زمان مانع بلوغ گیرنده NMDA در هیپوکامپ موش صحرایی می‌شود.

واژه های کلیدی: محرومیت از بینایی، دوره بحرانی، هیپوکامپ، گیرنده NMDA، موش صحرایی.

مقدمه

بلوغ مدارهای سیناپسی در دوره بحرانی تکامل مغز پستانداران تحت‌تأثیر دو فرآیند فیزیولوژیک است: فعالیت ذاتی سلول‌های عصبی که نتیجه فعالیت ژن‌ها است و برقراری ارتباط با محیط از طریق دریافت سیگنال‌های محیطی (۱). برای مغز موش صحرایی این بازه زمانی در حدود شش هفته در نظر گرفته می‌شود (۲). بیشترین ارتباط حسی پستانداران با محیط از طریق سیستم بینایی فراهم شده و بالتبع سیگنال‌های رسیده از آن بالاخص در دوران بحرانی تکامل مغز نقش مهمی در بلوغ مدارهای مغزی ایفا می‌کنند (۳). نقش تکاملی این

مولف مسئول: سید علیرضا طلائی- کاشان، بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی Email: talaei@kaums.ac.ir
۱. دانشجو دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲. استادیار دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۳. استاد دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۵/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۶/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۹/۲۳

پیام‌ها در دوره بحرانی در مطالعات مختلف بررسی و اثبات شده است (۴، ۵). به‌علاوه مطالعات مختلف نشان داده‌اند، تغییر در نحوه دریافت این پیام‌ها تأثیرات شگرفی بر تکامل قشر مغز دارد (۶، ۷، ۸). Keck و همکارانش نشان داده‌اند، محرومیت از بینایی باعث ایجاد تغییر در شکل‌گیری مدارهای نورونی حاوی پیام‌برهای مهاری و تحریکی در قشر بینایی موش سوری می‌شود (۹). یکی از پیام‌برهای تحریکی مغز پستانداران گلوتامات است که از طریق چندین گیرنده اعمال خود را انجام می‌دهد (۱۰). از مهم‌ترین این گیرنده‌ها، NMDA (N-methyl-D-aspartate) است که از زیرواحدهای مختلفی تشکیل شده و نقش سه زیرواحد NR1، NR2A و NR2B در ساختمان و عملکرد گیرنده مذکور نسبت به دیگر زیرگروه‌ها پر رنگ‌تر است (۱۱). ترکیب و چینش این زیرواحدها در قشر بینایی در طول دوره بحرانی تکامل مغز دستخوش تغییر می‌شود. برای مثال بیان شده، میزان بیان NR2B بلافاصله بعد از تولد در قشر بینایی موش صحرایی بالاست و تا بلوغ قشر بینایی میزان بیان آن روند نزولی دارد یا وضعیت برای NR2A نیز همین‌گونه بوده با این تفاوت که روند نزولی آن دیرتر اتفاق می‌افتد (۱۲). نکته جالب توجه نتایج تحقیقات Philpot و همکارانش است که نشان داده‌اند، محرومیت از بینایی باعث افزایش بیان زیرواحد NR2B شده و از بیان زیرواحد NR2A می‌کاهد (۱۳). ثابت شده است، همه قشرهای حسی بخشی از پیام‌های خود را به تشکیلات هیپوکامپ، واقع در لوب گیجگاهی میانی، ارسال کرده و پس از پردازش اطلاعات در آن یادگیری و حافظه اتفاق می‌افتد (۱۴). به بیان دیگر، ورودی‌های حسی هیپوکامپ از طریق تغییر در میزان و نحوه فعالیت نوروترانسمیترهای مختلف، بالاخص NMDA، باعث یادگیری و ایجاد حافظه می‌شوند (۱۵). همچنین، برای هیپوکامپ نیز همانند قشرهای حسی، یک دوره بحرانی تکامل در نظر گرفته می‌شود و نشان داده شده است که برخی تغییرات محیطی اعم از محرومیت‌های حسی (۱۶) یا شلوغ‌سازی محیط زندگی، افزایش ورودی‌های حسی به مغز، (۱۷) باعث ایجاد تغییر در عملکرد نورون‌های آن می‌شود. با توجه به اینکه بخشی از پیام‌های بینایی وارد تشکیلات هیپوکامپ شده و مشخص شده است که پیام تغییر شکل یافته بینایی باعث ایجاد تغییر در ساختار و عملکرد سیستم‌های نوروترانسمیتری قشر بینایی می‌شود.

فرضیه مطالعه حاضر این است که احتمالاً پیام‌های تغییر شکل یافته بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز بتوانند بر نحوه شکل‌گیری و میزان فعالیت سیستم‌های نوروترانسمیتری هیپوکامپ نیز تأثیرگذار باشند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر دوره‌های مختلف محرومیت از بینایی طی دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان ژن و پروتئین‌های مربوط به زیرواحدهای گیرنده NMDA در هیپوکامپ موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها

برای بررسی بیان ژن و بیان پروتئین زیرواحدهای گیرنده NMDA این مطالعه تجربی بر روی ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار انجام گرفت. حیوانات مورد استفاده در حیوان‌خانه‌ای با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت محیط ۵±۵۵ درصد و نیز دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق معاهده تهران و نیز دستورالعمل‌های کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان رعایت شدند. حیوانات وارد شده در مطالعه از نظر نگهداری در شرایط نوری به دو گروه اصلی روشنایی[1] (LR) و تاریکی[2] (DR) تقسیم شدند. حیوانات LR از بدو تولد تا لحظه آزمایش در شرایط

[1] Light Reared
[2] Dark Reared

طبیعی حیوان‌خانه، یعنی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، پرورش یافته بودند و موش‌های صحرایی گروه DR از لحظه تولد تا پایان آزمایش در تاریکی کامل (۲۴ ساعت) قرار گرفتند. هر گروه اصلی به سه زیرگروه (n=۶) تقسیم شد. حیوانات یکی از این زیرگروه‌ها در سن دو هفتگی (2WLR, 2WDR)، گروه دوم در سن چهار هفتگی (4WLR, 4WDR) و گروه سوم در سن شش هفتگی (6WLR, WDR) تحت شرایط مذکور قرار داشتند. ابتدا حیوانات با اتر کاملاً بیهوش شده و با گیوتین سر آنها جدا می‌شد. در مدت زمان کمتر از ۳۰ ثانیه مغز از درون جمجمه خارج شده و در پتری دیش حاوی نرمال سالین ۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت. سپس، هر دو هیپوکامپ مغز به سرعت استخراج شده و با نیتروژن مایع فریز شده، تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. برای بررسی بیان ژن‌های مربوط به زیرواحدها از روش PCR استفاده شد. بدین صورت که ابتدا به‌وسیله کیت[1] تمام RNA نمونه‌ها استخراج شد. سپس، میزان RNA استخراج شده به‌روش اسپکتروفتومتری[2] سنجیده شد. در مرحله بعد، با استفاده از کیت[3] از نمونه‌ها cDNA تهیه شد. پس از آن با استفاده از دستگاه ترموسایکلر[4] واکنش PCR برای ژن‌های هدف و نیز ژن HPRT[5]) انجام شد. مراحل PCR به ترتیب زیر بود: مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه؛ سپس سیکل‌های متوالی (به‌ترتیب ۳۳، ۲۶، ۳۱ و ۲۸ سیکل برای HPRT، NR1، NR2A و NR2B) شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه؛ اتصال پرایمر به‌مدت ۴۵ ثانیه؛ گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در

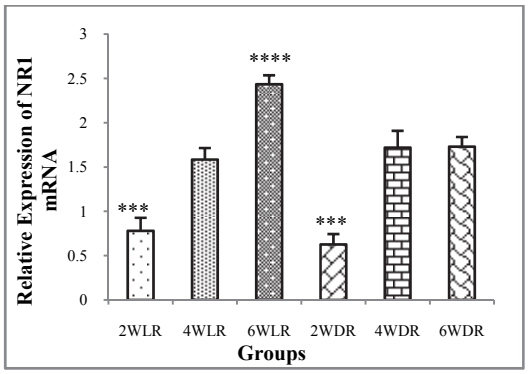
جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن زیرواحدهای گیرنده NMDA

نام ژن		توالی پرایمر	دمای اتصال (°C)	اندازه ژن هدف (kb)
HPRT	F	ggtccattcctatgactgtagatttt	۶۰	۱۷۲
	R	caatcaagacgttctttccagtt		
NR1	F	agtggaacggaatgatgggcga	۵۷	۲۶۲
	R	Actgaagcggtccagcaggta		
NR2A	F	Gagccagatgacaaccacct	۵۸	۲۰۰
	R	Tcttgaggatgtcgatgcag		
NR2B	F	Ccaagaggaggaaacagcag	۵۶	۱۸۴
	R	Tgaggcgagttctcctttgt		

انتها گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. در جدول شماره ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و نیز اندازه ژن هدف آورده شده است. در مرحله بعد محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، باندها در دستگاه UV tech مشاهده شده و از آنها تصویر تهیه شد. تصاویر مربوطه با استفاده از نرم‌افزار IamgeJ (ویرایش ۱/۴۸) آنالیز شده و نسبت بیان هر ژن به ژن HPRT محاسبه شد.

برای بررسی بیان پروتئین زیرواحدهای گیرنده NMDA از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. به‌طور خلاصه ابتدا پروتئین تام هیپوکامپ‌ها با استفاده از محلول RIPA که حاوی کوکتل آنتی پروتئاز بود، استخراج شد. سپس، میزان پروتئین استخراج شده با روش برادفورد سنجیده شد. در مرحله بعد به تناسب Laemmli به نمونه‌ها اضافه شده و با تکنیک SDS-PAGE در ۱۲۰ ولت و مدت دو ساعت الکتروفورز شدند. برای انتقال پروتئین‌های βActin و NR1 به کاغذ PVDF از تکنیک Semi dry transfer در ۱۰ ولت برای مدت ۳۵ و ۶۰ دقیقه (به‌ترتیب) استفاده شد. با در نظر گرفتن وزن مولکولی بالای پروتئین‌های NR2A و NR2B برای انتقال از تکنیک Wet transfer در ۱۲ ولت برای مدت ۱۸ ساعت استفاده شد. سپس، بلات‌ها با Skimmed milk پنج درصد تهیه شده در TBST برای مدت یک ساعت بلاک شدند. در مرحله بعد بلات‌ها با

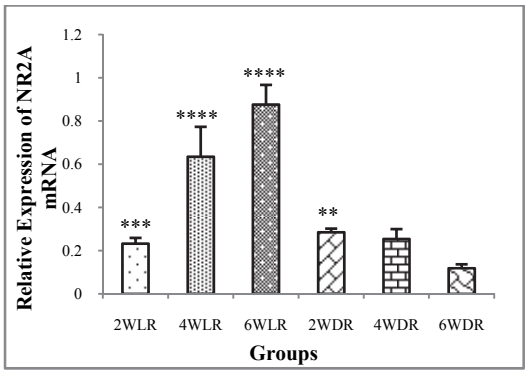
[1] peqGOLD RNAPure, Peqlab Co., Germany
[2] BioPhotometer plus, Eppendorf Co., Germany
[3] Rosche, Germany
[4] peqSTAR 96X, Peqlab Co., Germany
[5] Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase



نمودار ۱: میزان بیان نسبی ژن مربوط به زیرواحد NR1 در گروه‌های مختلف آزمایش.

*** اختلاف بیان ژن بین گروه‌های 2WLR و دو گروه دیگر LR و نیز اختلاف بین گروه‌های 2WDR و دو گروه دیگر DR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

**** اختلاف بیان ژن بین گروه‌های 6WLR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۲: میزان بیان نسبی ژن مربوط به زیرواحد NR2A در گروه‌های مختلف آزمایش.

** اختلاف بیان ژن بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

*** اختلاف بیان ژن بین گروه‌های 2WLR و دو گروه دیگر LR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

**** اختلاف بیان ژن بین گروه‌های 4WLR و 4WDR و نیز بین گروه‌های 6WLR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

آنتی‌بادی اولیه (Abcam, USA) با رقت‌های ۱:۵۰۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۱۰۰۰ و ۱:۵۰۰ (به ترتیب برای βActin، NR1، NR2A و NR2B) در چهار درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند. پس از آن بلات‌ها در TBST شسته شده و با آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱:۳۰۰۰ به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. دوباره بلات‌ها در TBST و PBS شسته شده و با محلول کمی لومینسانس آغشته شده، در تاریک‌خانه در مجاورت فیلم عکاسی قرار گرفته و سپس فیلم‌ها ظاهر شدند. فیلم‌ها اسکن شده و تصاویر مربوطه با استفاده از نرم‌افزار IamgeJ (ویرایش ۱/۴۸) آنالیز و نسبت بیان هر ژن به ژن βActin محاسبه شد. داده‌های حاصل با استفاده از آزمون ANOVA یک سویه به همراه پس آزمون Tukey آنالیز شده و P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

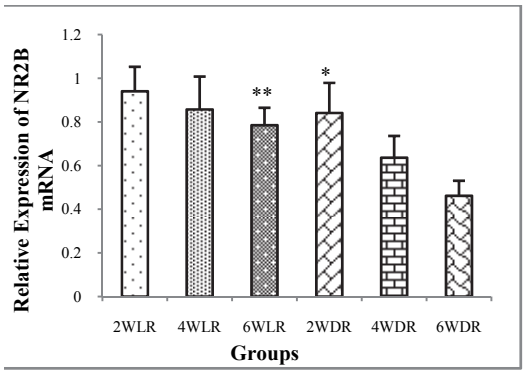
یافته ها

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر دوره‌های مختلف محرومیت از بینایی در محدوده بحرانی تکامل مغز بر بیان ژن و پروتئین زیرواحدهای گیرنده NMDA در هیپوکامپ موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

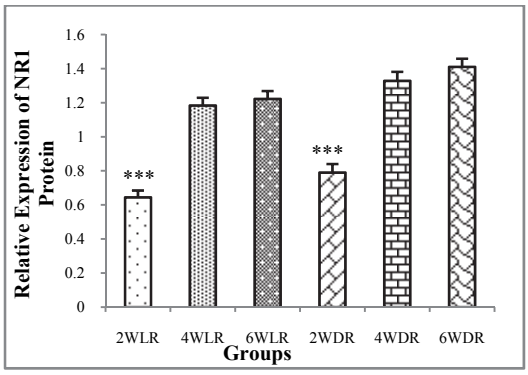
بیان نسبی ژن

زیرواحد NR1

آنالیز داده‌های مربوط به بیان ژن NR1 در هیپوکامپ گروه‌های مختلف آزمایشی نشان می‌دهد، اختلاف بین میانگین بیان نسبی ژن زیرواحد مذکور در گروه‌های مختلف معنی‌دار است ($F_{5, 30}=24.763$; $P<0.0001$). با بررسی نمودار شماره ۱ می‌توان دریافت، بیان نسبی این ژن هم‌زمان با افزایش سن در هر دو گروه LR و DR افزایش می‌یابد؛ به بیان دیگر اختلاف بین گروه 2WLR و دو گروه دیگر LR و نیز اختلاف بین گروه 2WDR و دو گروه دیگر DR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). به‌علاوه با مقایسه بین گروهی می‌توان دریافت، میزان بیان نسبی ژن NR1 از ۰/۱۱±۲/۴۳ در گروه 6WLR به ۰/۱۱±۱/۷۳ در گروه 6WDR کاهش یافته و اختلاف بین دو گروه نیز معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). این در حالی است که مقایسه داده‌ها نشان می‌دهد اختلاف بیان ژن مذکور در بین گروه‌های 2WLR و 2WDR و نیز 4WLR و 4WDR (P>۰/۵) معنی‌دار نیست.



نمودار ۳: میزان بیان نسبی ژن مربوط به زیرواحد NR2B در گروه‌های مختلف آزمایش.
* اختلاف بیان ژن بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۵).
** اختلاف بیان ژن بین گروه‌های 6WLR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۵).



نمودار ٤: میزان بیان نسبی پروتئین مربوط به زیرواحد NR1 در گروه‌های مختلف آزمایش.
*** اختلاف بیان پروتئین بین گروه‌های 2WLR و دو گروه دیگر LR و نیز اختلاف بین گروه‌های 2WDR و دو گروه دیگر DR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).
به‌علاوه، میزان افزایش بیان نسبی پروتئین NR1 بین گروه‌های هم‌سن روشنایی و تاریکی نیز معنی‌دار است.

زیرواحد NR2A

بررسی یافته‌های مربوط به بیان ژن NR2A در هیپوکامپ گروه‌های مختلف آزمایشی نشان می‌دهد، هم‌زمان با افزایش سن بر روند بیان نسبی ژن در گروه‌های روشنایی افزوده شده و از بیان ژن در گروه‌های تاریکی کاسته می‌شود (نمودار شماره ۲). به‌علاوه، آنالیز آماری داده‌ها حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین بیان نسبی ژن زیرواحد مذکور در گروه‌های مختلف آزمایش است (F5, 30=16.404; P<0.0001). نتایج پس آزمون Tukey نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه 2WLR و دو گروه دیگر LR (P<۰/۰۰۱) و نیز بین گروه 2WDR و گروه 6WDR است (P<۰/۰۱). مقایسه بین گروهی داده‌ها نیز نشان می‌دهد، اگرچه اختلاف بیان این ژن در بین گروه‌های 2WLR و 2WDR معنی‌دار نیست (P>۰/۵) اما اختلاف بیان ژن در بین گروه‌های 4WLR و 4WDR و نیز 6WLR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱ برای هر دو مقایسه).

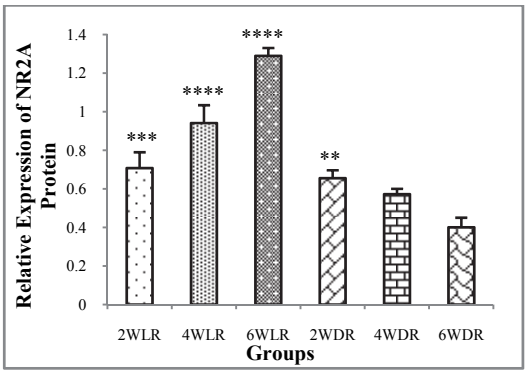
زیرواحد NR2B

نتایج مربوط به بیان نسبی ژن NR2B در هیپوکامپ گروه‌های مختلف مورد آزمایش نشان می‌دهد، هم‌زمان با افزایش سن تغییری روند بیان نسبی ژن مذکور در گروه‌های روشنایی ایجاد نشده ولی از بیان این ژن در گروه‌های تاریکی کاسته می‌شود (نمودار شماره ۳). آنالیز آماری داده‌ها حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین بیان نسبی ژن زیرواحد مذکور در گروه‌های مختلف آزمایش است (F5, 30=2.437; P=0.05). نتایج پس آزمون Tukey نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های 2WDR و 6WDR است (P<۰/۰۵). با مقایسه بین گروهی نیز مشخص می‌شود، تنها اختلاف بیان ژن NR2B بین گروه‌های 6WLR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بیان نسبی پروتئین

زیرواحد NR1

آنالیز داده‌های مربوط به بیان نسبی پروتئین NR1 در هیپوکامپ گروه‌های مختلف آزمایشی نشان می‌دهد، اختلاف بین میانگین بیان نسبی پروتئین زیرواحد مذکور در گروه‌های مختلف معنی‌دار است (F5, 30=41.474; P<0.0001). نمودار شماره ۴ نشان می‌دهد، بیان نسبی این پروتئین هم‌زمان با افزایش سن

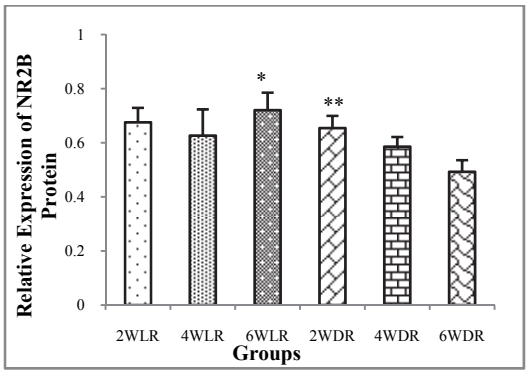


نمودار ۵: میزان بیان نسبی پروتئین مربوط به زیرواحد NR2A در گروه‌های مختلف آزمایش.

** اختلاف بیان پروتئین بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

*** اختلاف بیان پروتئین بین گروه‌های 2WLR و 6WLR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

**** اختلاف بیان پروتئین بین گروه‌های 4WLR و 4WDR و نیز 6WLR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).



نمودار ٦: میزان بیان نسبی پروتئین مربوط به زیرواحد NR2B در گروه‌های مختلف آزمایش.

* اختلاف بیان پروتئین بین گروه‌های 6WLR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

** اختلاف بیان پروتئین بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

در هردو گروه LR و DR افزایش می‌یابد. به بیان دیگر اختلاف بین گروه 2WLR و دو گروه دیگر LR و نیز اختلاف بین گروه 2WDR و دو گروه دیگر DR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). به‌علاوه با مقایسه بین گروهی می‌توان دریافت، میزان افزایش بیان نسبی پروتئین NR1 بین گروه‌های هم‌سن روشنایی و تاریکی نیز معنی‌دار است (P<۰/۰۵ برای تمام مقایسه‌ها).

زیرواحد NR2A

آنالیز داده‌های مربوط به بیان پروتئین NR2A در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نشان می‌دهد، بیان نسبی پروتئین مذکور در گروه‌های روشنایی به‌صورت وابسته به زمان افزایش داشته و از بیان آن در گروه‌های تاریکی کم می‌شود (نمودار شماره ۵). آنالیز آماری داده‌ها نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین بیان نسبی ژن زیرواحد مذکور در گروه‌های مختلف آزمایش است (F5, 30=26.870; P<0.0001). نتایج پس آزمون Tukey نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه 2WLR و گروه 6WLR (P<۰/۰۰۱) و نیز بین گروه 2WDR و گروه 6WDR است (P<۰/۰۱). با مقایسه بین گروهی نیز می‌توان دریافت، اگرچه اختلاف بیان پروتئین NR2A بین گروه‌های 2WLR و 2WDR معنی‌دار نیست (P>۰/۵)، اما اختلاف بیان پروتئین مذکور در بین گروه‌های 4WLR و 4WDR و نیز 6WLR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

زیرواحد NR2B

بررسی یافته‌های مربوط به بیان نسبی پروتئین NR2B در هیپوکامپ حیوانات مورد آزمایش نشان می‌دهد، اگرچه تغییری در روند بیان نسبی پروتئین مذکور در گروه‌های روشنایی ایجاد نشده، ولی از بیان این پروتئین در گروه‌های تاریکی کم می‌شود (نمودار شماره ۶). آنالیز آماری داده‌ها نیز اختلاف معنی‌دار بین میانگین بیان نسبی پروتئین زیرواحد مذکور در گروه‌های مختلف آزمایش را نشان می‌دهد (F5, 30=4.203; P=0.03). نتایج پس آزمون Tukey نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های 2WDR و 6WDR است (P<۰/۰۱). مقایسه بین گروهی داده‌ها نیز نشان می‌دهد، اختلاف بیان پروتئین تنها بین گروه‌های 6WLR و

6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بحث

در پژوهش حاضر تأثیر محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان زیرواحدهای گیرنده NMDA هیپوکامپ موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد، موش‌های صحرایی که در شرایط طبیعی حیوان‌خانه نگهداری شده بودند، طی یک روند وابسته به زمان بر میزان بیان ژن و پروتئین زیرواحدهای NR1 و NR2A افزوده شده، اما در میزان بیان ژن و پروتئین زیرواحد NR2B تغییری حاصل نمی‌شود. این در حالی است که در موش‌های نگهداری شده در تاریکی نیز طی یک روند وابسته به زمان بر بیان زیرواحد NR1 افزوده شده و از بیان هردو زیرواحد NR2A و NR2B کاسته می‌شود. جالب اینجاست، میزان بیان ژن و پروتئین زیرواحد NR1 در موش‌های پرورش یافته در تاریکی در مقایسه با موش‌های هم‌سن خود، در شرایط طبیعی حیوان‌خانه نگهداری، نیز بیشتر است. براساس آنچه تاکنون به آن دست یافتیم، هیچ مطالعه‌ای به بررسی تأثیر محرومیت از بینایی بر روند تکاملی زیرواحدهای گیرنده NMDA در هیپوکامپ نپرداخته است؛ فقط در برخی مطالعات دیگر روند تکاملی برخی زیرواحدهای گیرنده NMDA در هیپوکامپ حیوانات پرورش‌یافته در شرایط استاندارد حیوان‌خانه بررسی شده است. برای مثال و در راستای نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر، Liu و همکارانش نشان داده‌اند، بیان زیرواحد NR2B از ۱۴ تا ۶۰ روز پس از تولد در هیپوکامپ موش صحرایی تغییری نمی‌کند (۱۸). به‌علاوه، در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده شد، بیان mRNA زیرواحد NR2A از ۲ تا ۳۵ روز پس از تولد در هیپوکامپ افزایش می‌یابد (۱۹). Luo و همکارانش نیز با استفاده از تکنیک ایمنوبلاتینگ نشان داده‌اند، بیان پروتئین زیرواحد NR1 در ابتدای تولد در هیپوکامپ اندک است و در طول سه هفته بعد افزایش می‌یابد (۲۰). همچنین، Wenzel و همکارانش نشان داده‌اند، اگرچه پروتئین مربوط به هر دو زیرواحد NR2A و NR2B در ابتدای تولد در هیپوکامپ موش صحرایی بیان می‌شود، ولی بیان پروتئین زیرواحد NR2B بسیار بیشتر است (۲۱) که این نتیجه نیز در مطالعه ما دیده شد. با استفاده از هر دو تکنیک RT-PCR و وسترن بلاتینگ مشخص شده است، در ابتدای زندگی بیان NR2B - یکی از زیر واحدهای گیرنده NMDA– در قشر مغز پستانداران بیشتر بوده و هم‌زمان با تکامل مغز به‌تدریج بر بیان mRNA و پروتئین زیر واحد دیگر یعنی NR2A افزوده شده تا در بلوغ میزان بیان آن از میزان بیان NR2B پیشی می‌گیرد (۲۲). این سوئیچ بین دو ایزوفرم زیرواحد NR2 مشخصاً احتیاج به فعالیت مدارهای نورونی و کسب تجربه حسی دارد. Philpot و همکاران نشان داده‌اند، پیام‌های بینایی برای ایجاد این تغییر تکاملی در زیرواحدهای گیرنده NMDA در قشر بینایی لازم (۱۳) و مشخص شده است، در حیوانات محروم از بینایی این فرآیند سوئیچینگ اتفاق نیفتاده و مواجه کردن این حیوانات با نور تنها برای مدت یک ساعت منجر به روشن شدن این فرآیند می‌شود (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر، Philpot و همکاران نشان داده‌اند، محرومیت از نور در دوره بحرانی تکامل مغز باعث کاهش بسیار زیاد بیان زیرواحد NR2A می‌شود (۲۴) که همانند یافته‌های مطالعه حاضر است. همچنین، در مطالعه‌ای دیگر نیز بیان شده است، محرومیت از بینایی حتی به صورت بستن یک چشم در دوره بحرانی تکامل مغز گربه باعث می‌شود، بیان پروتئین زیرواحد NR1 در قشر بینایی افزایش یافته و بیان زیرواحدهای NR2A و NR2B بسیار کمتر شود (۲۵).

از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری

کرد که محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز طی یک روند وابسته به زمان اگرچه مانع از افزایش بیان ژن و پروتئین مربوط به زیرواحد NR1 در هیپوکامپ موش صحرایی نمی‌شود، اما باعث کاهش بیان هر دو زیرواحد حیاتی دیگر یعنی NR2A و NR2B شده و به عبارتی مانع بلوغ این گیرنده می‌شود.

سپاسگزاری

هزینه انجام این مطالعه از طریق طرح تحقیقاتی شماره ۹۱۳۳ به‌وسیله معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تأمین شده است. نویسندگان مقاله از همکاری‌های بی‌دریغ این معاونت کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. Nat Rev Neurosci. 2005; 6(11): 877-888.
2. Rozas C, Frank H, Heynen AJ, Morales B, Bear MF, Kirkwood A. Developmental inhibitory gate controls the relay of activity to the superficial layers of the visual cortex. J Neurosci. 2001; 21(17): 6791-801.
3. Vetencourt JFM, Tiraboschi E, Spolidoro M, et al. Serotonin triggers a transient epigenetic mechanism that reinstates adult visual cortex plasticity in rats. Eur J Neurosci. 2011; 33(1): 49-57.
4. Fagiolini M, Hensch TK. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. Nature. 2000; 404(6774): 183-186.
5. Hooks BM, Chen C. Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity. Neuron. 2007; 56(2): 312-326.
6. Heynen AJ, Yoon BJ, Liu CH, Chung HJ, Huganir RL, Bear MF.. Molecular mechanism for loss of visual cortical responsiveness following brief monocular deprivation. Nat. Neurosci. 2003; 6(8): 854-862.
7. He HY, Hodos W, Quinlan EM. Visual deprivation reactivates rapid ocular dominance plasticity in adult visual cortex. The Journal of Neurosci. 2006; 26: 2951-2955.
8. Baroncelli L, Sale A, Viegi A, et al. Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. Exp Neurol. 2010; 226(1): 100-109.
9. Keck T, Scheuss V, Jacobsen R I, Wierenga CJ, Eysel UT, Bonhoeffer T, Hübener M. Loss of Sensory Input Causes Rapid Structural Changes of Inhibitory Neurons in Adult Mouse Visual Cortex. Neuron 2011; 71(5): 869-882.
10. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol. Rev. 2010; 62(3): 405-496.
11. Salussolia CL, Prodromou ML, Borker P, Wollmuth LP. Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. J Neurosci. 2011; 31(31): 11295-1304.

12. Durand GM, Zukin RS. Developmental Regulation of mRMAs Encoding Rat Brain Kainate/AMPA Receptors: A Northern Analysis Study. J. Neurochem. 1993; 61(6): 2239-2246.
13. Philpot BD, Sekhar AK, Shouval HZ, Shouval HZ, Bear MF. Visual Experience and Deprivation Bidirectionally Modify the Composition and Function of NMDA Receptors in Visual Cortex. Neuron 2001; 29(1): 157-169.
14. Neves G, Cooke SF, Bliss TVP. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. Nat Rev Neurosci. 2008; 9(1): 65-75.
15. Rebola N, Srikumar BN, Mulle C. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. The Journal of Physiology. 2010; 588(1): 93-99.
16. Talaei SA, Salami M. Sensory experience differentially underlies developmental alterations of LTP in CA1 area and dentate gyrus. Brain Res. 2013; 1537: 1-8.
17. Eckert MJ, Bilkey DK, Abraham WC. Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. J Neurophysiol. 2010; 103(6): 3320-3329.
18. Liu W, Wang X, Zhang R, Zhou Y. Effects of postnatal exposure to methylmercury on spatial learning and memory and brain NMDA receptor mRNA expression in rats. Toxicol. Lett. 2009; 188(3): 230-235.
19. Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. Brain Res Dev Brain Res. 2002; 139(2): 227-236.
20. Luo J, Bosy TZ, Wang Y, Yasuda RP, Wolfe BB. Ontogeny of NMDA R1 subunit protein expression in five regions of rat brain. Brain Res Dev Brain Res. 1996; 92(1): 10-17.
21. Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. J Neurochem. 1997; 68(2): 469-478.
22. 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 oNeurosci. 2004; 24(40): 8885-8895.
23. Quinlan EM, Olstein DH, Bear MF. Bidirectional, experiencedependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition in the rat visual cortex during postnatal development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 12876-12880.
24. Philpot BD, Cho KKA, Bear MF. Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex. Neuron. 2007; 53(4): 495-502.
25. Beston BR, Jones DG, Murphy KM. Experience-Dependent Changes in Excitatory & Inhibitory Receptor Subunit Expression in Visual Cortex. Front Synaptic Neurosci. 2010; 2:138.