محرومیت از بینایی طی دوره بحرانی تکامل مغز مانع از بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در هیپوکامپ موش صحرایی می‌شود

سید علیرضا طلائی [۱](Ph.D Student)، ابوالفضل اعظمی [۲](Ph.D)، محمود سلامی [*۱](Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: محرومیت از بینائی طی دوره بحرانی تکامل مغز مانع از بلوغ سیستم گاباارژیک در قشر بینائی می‌شود. چون بخشی از پیام‌های بینائی از طریق قشر به هیپوکامپ می‌رسند، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در هیپوکامپ موش صحرائی است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی بر روی ۳۶ سر موش صحرائی نر که در دو گروه پرورش‌یافته در سیکل ۱۲-۱۲ روشنائی تاریکی (Light Reared, LR) و تاریکی کامل (Dark Reared, DR) قرار گرفتند، انجام شد. سپس، حیوانات هر گروه به ۳ زیرگروه ۲، ۴ و ۶ هفته تقسیم شدند. با استفاده از تکنیک‌های RT-PCR و وسترن‌بلات بیان هر دو ایزوفرم آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در هیپوکامپ موش‌های صحرائی بررسی شد.

یافته‌ها: بیان نسبی mRNA و پروتئین آنزیم‌های GAD65 و GAD67 در حیوانات LR طی یک روند وابسته به زمان افزایش داشت. در موش‌های DR هم‌زمان با افزایش سن افزایش بیان هر دو آنزیم دیده شد، اما در مقایسه با گروه LR از میزان بیان به شدت کاسته شد.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت که محرومیت از بینایی مانع از بیان آنزیم‌های GAD65 و GAD67 در هیپوکامپ موش‌های صحرائی شده و بلوغ سیستم گاباارژیک در هیپوکامپ را به تاخیر می‌اندازد.

واژه‌های کلیدی: ادراک بصری، محرومیت حسی، دوره بحرانی، هیپوکامپ، گلوتامات دکربوکسیلاز، موش‌های صحرایی

مقدمه

دوره بحرانی تکامل مغز پستانداران یک محدوده زمانی پس از تولد است که در آن بر هم‌کنش فعالیت ذاتی ژن‌ها و پیام‌های حسی محیطی باعث بلوغ مدارهای سیناپسی و سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف می‌شود [۱]. دوره بحرانی تکامل مغز برای موش صحرائی در حدود ۶ هفته در نظر گرفته می‌شود [۲]. سیستم بینائی بیش‌ترین ورودی حسی برای مغز پستانداران را فراهم کرده و بالتبع سیگنال‌های رسیده از آن بالاخص در دوران بحرانی تکامل مغز نقش مهمی در بلوغ مدارهای مغزی ایفا می‌کنند [۳]. نقش تکاملی این پیام‌ها در دوره بحرانی در مطالعات مختلف بررسی و اثبات شده است [۵،۴]. هم‌چنین، در مطالعات مختلف نقش تغییر در نحوه دریافت پیام‌های بینائی در دوره بحرانی تکامل مغز بر ساختار و عمل‌کرد سیستم عصبی و نیز فعالیت نوروترانسمیترهای

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱-۵۵۶۲۱۱۵۷

Email: salami-m@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۸

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

مختلف بررسی شده است [۶-۸]. Jaffer و همکارانش نشان داده‌اند که محرومیت از بینائی در دوره بحرانی باعث ایجاد تغییر در الگوی بیان گیرنده‌های NMDA، AMPA و GABA در قشر بینائی می‌شود [۹]. گابا – گاما آمینو بوتیریک اسید – نوروترانسمیتر مهاری اصلی در مغز پستانداران است و نقش مهمی در تنظیم تحریک‌پذیری نورون‌ها در سیستم عصبی مرکزی پستانداران دارد [۱۰]. در نورون‌های گاباارژیک، گابا از پیش‌ساز گلوتامات و به‌واسطه فعالیت آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD) ساخته می‌شود. تاکنون دو ایزوفرم از این آنزیم به نام‌های GAD65 و GAD67 شناخته شده است [۱۱]. ایزوفرم GAD67 به وفور در سیتوپلاسم سلول‌های عصبی وجود داشته [۱۲] و بالعکس ایزوفرم GAD65 در غشا نورون‌ها و بالاخص در پایانه‌های سیناپسی موجود است [۱۳]. در مطالعات متعدد نشان داده شده است که ساختار و عملکرد نورون‌های گاباارژیک و گیرنده‌های گابا در طول تکامل سیستم عصبی پستانداران دست‌خوش تغییرات بسیار زیادی می‌شود [۱۵،۱۴]. هم‌چنین، بیان شده است تغییر در تجربه بینائی باعث ایجاد تغییر در ساختار و عملکرد نورون‌های گاباارژیک قشر بینائی موش صحرائی می‌شود [۱۷،۱۶]. ثابت شده است که 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 [۱۸]. به بیان دیگر، ورودی‌های حسی هیپوکامپ از طریق تغییر در میزان و نحوه فعالیت نوروترانسمیترهای مختلف باعث ایجاد یادگیری و حافظه می‌شوند [۱۹]. هیپوکامپ نیز همانند قشرهای حسی مغز دارای یک دوره بحرانی تکامل بوده و نشان داده شده است که برخی تغییرات محیطی اعم از محرومیت‌های حسی [۲۰] و یا شلوغ‌سازی محیط زندگی– افزایش ورودی‌های حسی به مغز– [۲۱] باعث ایجاد تغییر در عملکرد نورون‌های آن می‌شود. با در نظر گرفتن این نکته که بخشی از پیام‌های بینائی وارد تشکیلات هیپوکامپ شده و مشخص شده است که پیام تغییر شکل یافته بینائی باعث ایجاد تغییر در ساختار و عملکرد سیستم‌های نوروترانسمیتری قشر بینائی می‌شود، مطالعه حاضر بر اساس این فرض استوار شده است که احتمالاً محرومیت از پیام‌های بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز بتوانند بر نحوه شکل‌گیری و میزان فعالیت سیستم‌های نوروترانسمیتری هیپوکامپ نیز تاثیرگذار باشند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر دوره‌های مختلف محرومیت از بینائی طی دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان ژن و پروتئین‌های مربوط به آنزیم‌های تولیدکننده GABA در هیپوکامپ موش صحرائی است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی با هدف بررسی بیان ژن و بیان پروتئین زیرواحدهای گیرنده GABA بر روی۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار انجام گرفت. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگه‌داری آن‌ها مطابق با معاهده تهران و نیز دستورالعمل‌های کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان بود. 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 می‌گرفتند. هر گروه اصلی به ۳ زیرگروه (n=۶) تقسیم شد. 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 بودند (6WLR, 6WDR). لازم به ذکر است که دوره بحرانی تکامل مغز برای موش صحرائی در حدود ۶ هفته در نظر گرفته می‌شود [۲]. ابتدا حیوانات با اتر به‌طور عمیق بی‌هوش شده و به‌وسیله 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،

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

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 آنزیم‌ها از روش PCR استفاده شد. بدین صورت که ابتدا به‌وسیله کیت (peqGOLDRNAPure, Peqlab Co., Germany) تمام RNA نمونه‌ها استخراج شد. سپس، میزان RNA استخراج شده به‌روش اسپکتروفتومتری (BioPhotometer plus, Eppendorf Co., Germany) سنجیده شد. در مرحله بعد، با استفاده از کیت (Rosche, Germany) از نمونه‌ها cDNA تهیه شد. پس از آن با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (peqSTAR 96X, Peqlab Co., Germany) واکنش PCR برای ژن‌های هدف و نیز ژن HPRT انجام شد. مراحل PCR به ترتیب زیر بود: مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، سپس سیکل‌های متوالی (به‌ترتیب ۳۳، ۲۹ و ۲۶ سیکل برای HPRT، GAD65 و GAD67) 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 انتها گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و نیز اندازه ژن هدف آورده شده است.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن آنزیم‌های تولید کننده GABA

نام ژن	توالی پرایمر		دمای اتصال (°C)	اندازه ژن هدف (kb)
HPRT	F	ggtccattcctatgactgtagatttt	۶۰	۱۷۲
	R	caatcaagacgttctttccagtt		
GAD65	F	ctgtgtacggggcttttgat	۵۹/۵	۲۳۱
	R	tgcatcagtccctcctctct		
GAD67	F	cacaaactcagcggcataga	۵۹/۵	۱۴۹
	R	ctggaagaggtagcctgcac		

در مرحله بعد محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد 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.

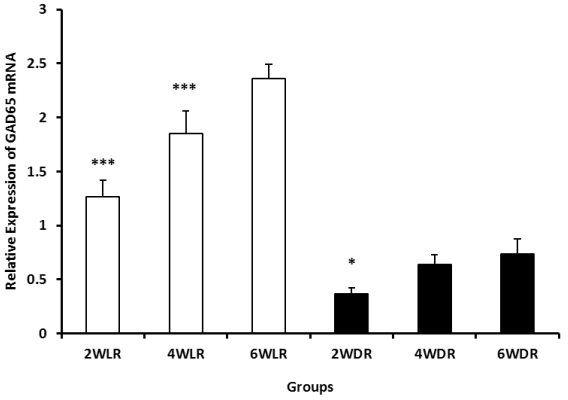
برای بررسی بیان پروتئین آنزیم‌های تولیدکننده GABA از تکنیک وسترن‌بلات استفاده شد. به‌طور خلاصه ابتدا پروتئین تام هیپوکامپ‌ها با استفاده از محلول RIPA که حاوی کوکتل آنتی‌پروتئاز بود، استخراج شد. سپس، میزان پروتئین استخراج شده با روش برادفورد سنجیده شد. در مرحله بعد به تناسب Laemmli به نمونه‌ها اضافه شده و با تکنیک SDS-PAGE در ۱۲۰ ولت و برای مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. برای انتقال پروتئین‌ها به کاغذ PVDF از تکنیک Semi dry transfer در ۱۰ ولت برای مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد. سپس، بلات‌ها با Skimmed milk ۵٪ تهیه شده در TBST برای مدت ۱ ساعت بلاک شدند. در مرحله بعد بلات‌ها با آنتی‌بادی اولیه (Abcam, USA) با رقت‌های ۱:۵۰۰۰، ۱:۱۰۰۰، و ۱:۲۰۰۰ (به ترتیب برای βActin، GAD65 و GAD67) در ۴ 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 ۱ 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 شده 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 گردید.

نتایج

در این پژوهش تاثیر دوره‌های مختلف محرومیت از بینایی در محدوده بحرانی تکامل مغز بر بیان ژن و پروتئین آنزیم‌های تولیدکننده GABA در هیپوکامپ موش صحرائی نر مورد بررسی قرار گرفت.

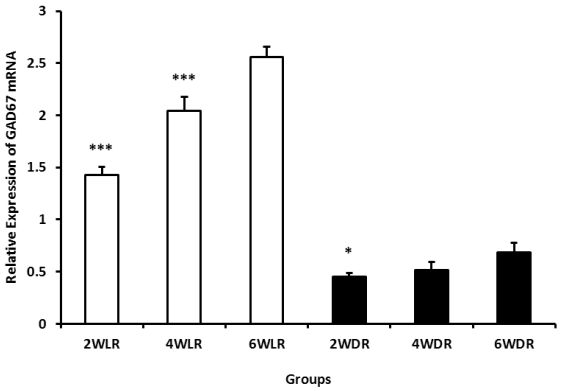
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

بیان نسبی ژن: آنزیم GAD65. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بیان نسبی این ژن هم‌زمان با افزایش سن در هر دو گروه LR و DR افزایش می‌یابد (شکل ۱). با مقایسه آماری داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن GAD65 در هیپوکامپ گروه‌های مختلف مورد آزمایش می‌توان دریافت که اختلاف بین میانگین بیان نسبی ژن آنزیم مذکور در گروه‌های مختلف معنی‌دار است ($F_{5,30}$=۳۱/۱۱۵ ;P<۰/۰۰۰۱). پس آزمون Tukey نشان می‌دهد که اختلاف بین گروه 2WLR و گروه‌های 4WLR و 6WLR P<۰/۰۰۱ (برای هر دو مقایسه) و نیز بین گروه‌های 4WLR و 6WLR (P<۰/۰۰۱) معنی‌دار است و هم‌زمان با افزایش سن از ۲ هفتگی تا ۶ هفتگی به میزان ۸۶ درصد بر بیان ژن این آنزیم در گروه‌های روشنایی افزوده شده است. هم‌چنین پس آزمون نشان می‌دهد که اختلاف بین گروه 2WDR و گروه‌های 4WDR و 6WDR P<۰/۰۵ (برای هر دو مقایسه) معنی‌دار است (P<۰/۰۵). اختلاف بین گروه‌های 4WDR و 6WDR معنی‌دار نبود. در حیوانات پرورش یافته در تاریکی از سن ۲ تا ۶ هفتگی بیان ژن GAD65 تا حدود دو برابر شده است. به‌علاوه، با مقایسه بین گروهی می‌توان دریافت که میزان بیان نسبی ژن GAD65 در گروه‌های هم‌سن تا حدود یک سوم کاهش یافته و اختلاف بین گروه‌های هم‌سن معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).



شکل ۱. میزان بیان نسبی ژن مربوط آنزیم GAD65 در گروه‌های مختلف آزمایش. *** اختلاف بین گروه 2WLR و گروه‌های 4WLR و 6WLR و نیز بین گروه‌های 4WLR و 6WLR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). * اختلاف بین گروه 2WDR و گروه‌های 4WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۵). به‌علاوه، اختلاف بین گروه‌های هم‌سن تاریکی و روشنائی نیز معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

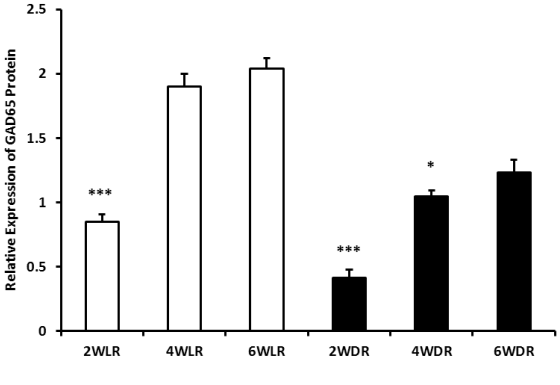
آنزیم GAD67. بررسی یافته‌های مربوط به بیان ژن GAD67 در هیپوکامپ گروه‌های مختلف مورد آزمایش نشان می‌دهد که هم‌زمان با افزایش سن بر روند بیان نسبی این ژن نیز در گروه‌های روشنائی و تاریکی افزوده می‌شود (شکل ۲). آنالیز آماری داده‌ها حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین بیان نسبی ژن آنزیم مذکور در گروه‌های مختلف آزمایش است ($F_{5,30}$=۹۵/۱۷۷ ;P<۰/۰۰۰۱). میانگین بیان ژن GAD67 از ۱/۴۳±۰/۰۸ در گروه 2WLR به ۲/۰۵±۰/۱۳ و ۲/۵۶±۰/۰۹ در گروه‌های 4WLR و 6WLR افزایش یافته و نتایج پس‌آزمون Tukey حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه 2WLR و گروه‌های 4WLR و 6WLR و نیز بین گروه‌های 4WLR و 6WLR است (P<۰/۰۰۱ برای هر سه مقایسه). بیان ژن این آنزیم در حیوانات گروه 2WDR ۰/۴۵±۰/۰۳ بود و به ۰/۶۸±۰/۰۳ در حیوانات 6WDR رسید (۵۰ درصد افزایش، P<۰/۰۵). اختلاف بین گروه‌های 2WDR و 4WDR و نیز بین 4WDR و 6WDR معنی‌دار نبود. به‌علاوه، با مقایسه بین گروهی می‌توان دریافت که میزان بیان نسبی ژن GAD65 در گروه‌های تاریکی تا بیش از یک سوم گروه‌های هم‌سن روشنائی کاهش یافته و اختلاف بین گروه‌های هم‌سن معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).



شکل ۲. میزان بیان نسبی ژن مربوط به آنزیم GAD67 در گروه‌های مختلف آزمایش. *** اختلاف بین گروه 2WLR و گروه‌های 4WLR و 6WLR و نیز بین گروه‌های 4WLR و 6WLR معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). * اختلاف بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنی‌دار است (P<۰/۰۵). به‌علاوه، اختلاف بین گروه‌های هم‌سن تاریکی و روشنائی نیز معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱).

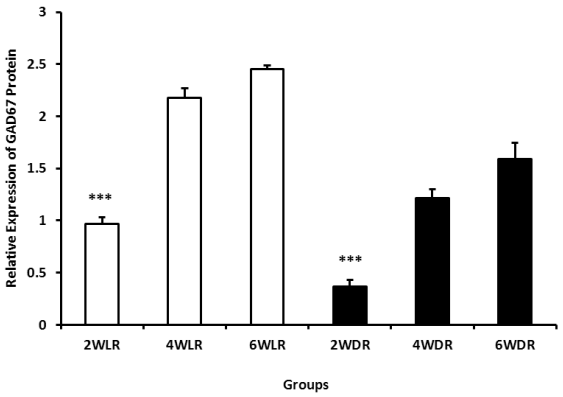
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

بیان نسبی پروتئین: آنزیم GAD65. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان می‌دهد که اختلاف بین میانگین بیان نسبی پروتئین GAD65 در هیپوکامپ گروه‌های مختلف معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۰۱$; $F_{5,30}=۶۵/۳۴۸$) شکل۳ نشان می‌دهد که بیان نسبی این پروتئین همزمان با افزایش سن در هر دو گروه LR و DR افزایش می‌یابد (به‌ترتیب در حدود ۱۴۰ و ۲۰۰ درصد). نتایج مقایسه درون‌گروهی حاکی وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه 2WLR و دو گروه دیگر LR است ($P<۰/۰۰۱$ برای هر دو مقایسه) و این در حالی است که اختلاف بین گروه‌های 4WLR و 6WLR معنی‌دار نیست. به‌علاوه، اختلاف بین گروه 2WDR و دو گروه دیگر DR ($P<۰/۰۰۱$) برای هر دو مقایسه) و نیز اختلاف بین گروه‌های 4WDR و 6WDR معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین، با مقایسه بین گروهی می‌توان دریافت که بیان نسبی پروتئین GAD65 در گروه‌های تاریکی در مقایسه با گروه‌های هم‌سن روشنائی تا حدود نصف کاهش یافته و این اختلافات نیز معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$).



شکل ۳. میزان بیان نسبی پروتئین مربوط به آنزیم GAD65 در گروه‌های مختلف آزمایش. *** اختلاف بین گروه 2WLR و گروه‌های 4WLR و 6WLR و نیز بین گروه 2WDR و گروه‌های 4WDR و 6WDR معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$). * اختلاف بین گروه‌های 4WDR و 6WDR معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین، اختلاف بین گروه‌های هم‌سن تاریکی و روشنائی نیز معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$).

آنزیم GAD67. بررسی یافته‌های مربوط به بیان نسبی پروتئین GAD67 در هیپوکامپ حیوانات مورد آزمایش (شکل۴) نیز نشان می‌دهد که بیان نسبی این پروتئین هم‌زمان با افزایش سن در هر دو گروه LR و DR افزایش می‌یابد و اختلاف بین میانگین بیان نسبی این پروتئین در هیپوکامپ گروه‌های مختلف معنی‌دار است (۷۱/۷۲۲= ; $P<۰/۰۰۰۱F_{5,30}$). میانگین بیان پروتئین GAD67 از ۰/۰۶±۰/۹۷ در گروه 2WLR به ۰/۰۹±۲/۱۷ و ۰/۰۴±۲/۴۵ در گروه‌های 4WLR و 6WLR افزایش یافته و نتایج پس آزمون Tukey حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه 2WLR و گروه‌های 4WLR و 6WLR و نیز بین گروه‌های 4WLR و 6WLR است ($P<۰/۰۰۱$ برای هر سه مقایسه). بیان پروتئین این آنزیم در حیوانات گروه 2WDR ۰/۰۶±۰/۳۷ بود و به ۰/۰۹±۱/۲۱ و ۰/۱۶±۱/۵۱ در حیوانات گروه‌های 4WDR و 6WDR رسید. پس آزمون Tukey نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین گروه 2WDR و گروه‌های 4WDR و 6WDR و نیز بین گروه‌های 4WDR و 6WDR وجود دارد ($P<۰/۰۰۱$ برای هر سه مقایسه). در مورد این پروتئین نیز با مقایسه بین گروهی می‌توان دریافت که بیان نسبی آن در گروه‌های تاریکی در مقایسه با گروه‌های هم‌سن روشنائی تا حدود نصف کاهش یافته و این اختلافات نیز معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$).



شکل ۴. میزان بیان نسبی پروتئین مربوط به آنزیم GAD67 در گروه‌های مختلف آزمایش. *** اختلاف بین گروه 2WLR و گروه‌های 4WLR و 6WLR و نیز بین گروه 2WDR و گروه‌های 4WDR و 6WDR معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$). هم‌چنین، اختلاف بین گروه‌های هم‌سن تاریکی و روشنائی نیز معنی‌دار است ($P<۰/۰۰۱$).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تاثیر محرومیت از بینائی در دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان آنزیم‌های تولیدکننده GABA در هیپوکامپ موش صحرائی نر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که در موش‌های صحرائی که در شرایط طبیعی حیوان‌خانه نگه‌داری شده بودند، بر میزان بیان ژن و پروتئین هر دو آنزیم GAD65 و GAD67 طی یک روند وابسته به زمان افزوده شده، و این در حالی بود که اگر چه در موش‌های نگه‌داری شده در تاریکی نیز طی یک روند وابسته به زمان بر بیان هر دو آنزیم افزوده شد، اما در مقایسه با موش‌های هم‌سن که در شرایط طبیعی حیوان‌خانه نگه‌داری شده بودند، این میزان بسیار کم‌تر بود؛ به بیان دیگر محرومیت از بینائی مانع از بیان هر دو آنزیم مذکور در هیپوکامپ موش‌های صحرائی شده و بلوغ سیستم گاباارژیک در هیپوکامپ را به تاخیر می‌اندازد. بر اساس بررسی‌های انجام شده توسط ما تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی تاثیر تغییر در تجربه بینائی بر روند تکاملی سیستم گاباارژیک در هیپوکامپ نپرداخته است. فقط در برخی مطالعات دیگر روند تکاملی سیستم گاباارژیک در هیپوکامپ حیوانات پرورش یافته در شرایط نوری استاندارد حیوان‌خانه بررسی شده است. بیان شده است نورون‌های گاباارژیک هیپوکامپ موش صحرائی در دوران نوزادی فعالیت تحریکی داشته و همزمان با بلوغ سیستم عصبی دارای فعالیت مهاری می‌شوند [۲۲]. Wong و همکارانش نشان داده‌اند که فعالیت ریتم‌های گاباارژیک از حدود سن ۱۰ روزه‌گی در هیپوکامپ موش سوری شروع شده، تا سن ۱۵ روزه‌گی افزایش یافته و از آن به بعد تا هنگام بلوغ مدارهای هیپوکامپ تغییری نمی‌کند [۲۳]. هم‌چنین، Xu و همکاران نشان داده‌اند که فرکانس و شدت پتانسیل‌های پس سیناپسی ثبت شده از مدارهای گاباارژیک ناحیه CA1 هیپوکامپ همزمان با پیشرفت سن افزایش می‌یابند [۲۴،۲۵]. به‌علاوه، بیان شده است که فعالیت GAD65 در محیط کشت حاوی نورون‌های جدا شده از هیپوکامپ از روز ۸ بعد از تولد شروع شده و همزمان با افزایش سن، افزایش می‌یابد [۲۶].

می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که با افزایش سن و بلوغ مدارهای مغزی به‌دلیل افزایش فعالیت مهاری سیستم گاباارژیک از بزرگی پتانسیل‌های پس سیناپسی تحریکی در مدارهای هیپوکامپ کاسته می‌شود. ما نیز با انجام آزمایشات الکتروفیزیولوژیک نشان داده بودیم که همزمان با افزایش سن از بزرگی دامنه پاسخ‌های پایه ثبت شده از نواحی CA1 و شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ کاسته می‌شود [۲۰]. جالب این‌جاست که علاوه بر مطالعه مذکور، در یک مطالعه الکتروفیزیولوژیک دیگر صورت گرفته توسط ما [۲۷] نیز محرومیت از بینائی باعث افزایش دامنه پاسخ‌های پایه شده بود. شاید بتوان عدم بلوغ سیستم گاباارژیک در هیپوکامپ که متعاقب محرومیت از بینائی صورت می‌گیرد را به‌عنوان یکی از دلایل یافته مذکور بیان کرد. تاثیر محرومیت از بینائی بر بلوغ سیستم گاباارژیک در قشر بینائی مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال نشان داده شده است محرومیت از بینائی در دوره بحرانی مانع از شکل‌گیری صحیح مدارهای گاباارژیک در قشر بینائی موش می‌شود [۲۸]. و یا Morales و همکارانش نشان داده‌اند که محرومیت از بینائی از بدو تولد از ورودی‌های گاباارژیک رسیده به لایه II/III قشر بینائی می‌کاهد [۲۹]. در یک مطالعه دیگر نیز نشان داده شده است که محرومیت از بینائی از بدو تولد به مدت سه ماه مانع از بلوغ نورون‌های گاباارژیک در قشر بینائی موش صحرائی می‌شود [۳۰]. اگرچه همه این یافته‌ها مربوط به قشر بینائی هستند ولی می‌توان گفت به نحوی در تائید نتایج مشاهده شده در این مطالعه‌اند. از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که محرومیت از بینائی مانع از بیان هر دو آنزیم تولیدکننده نوروترانسمیتر GABA- یعنی GAD65 و GAD67- در هیپوکامپ موش‌های صحرائی شده و بلوغ سیستم گاباارژیک در هیپوکامپ را به تاخیر می‌اندازد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مربوط به بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری پژوهشی است که هزینه انجام آن از طریق طرح تحقیقاتی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

شماره ۹۱۳۳ به‌وسیله معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تامین گردیده است. نویسندگان مقاله، از همکاری‌های بی‌دریغ این معاونت کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آورند.

منابع

[1] Yang CB, Kiser PJ, Zheng YT, Varoqueaux F, Mower GD. Bidirectional regulation of Munc13-3 protein expression by age and dark rearing during the critical period in mouse visual cortex. Neuroscience 2007; 150: 603-608.

[2] Yang L, Pan Z, Zhou L, Lin S, Wu K. Continuously changed genes during postnatal periods in rat visual cortex. Neurosci Lett 2009; 462: 162-165.

[3] McCoy PA, Huang HS, Philpot BD. Advances in understanding visual cortex plasticity. Curr Opin Neurobiol 2009; 19: 298-304.

[4] Beston BR, Jones DG, Murphy KM. Experience-dependent changes in excitatory & inhibitory receptor subunit expression in visual cortex. Front Synaptic Neurosci 2010; 2: 138.

[5] Abidin I, Eysel UT, Lessmann V, Mittmann T. Impaired GABAergic inhibition in the visual cortex of brain-derived neurotrophic factor heterozygous knockout mice. J Physiol 2008; 586: 1885-1901.

[6] Miraucourt LsS, da Silva JS, Burgos K, Li J, Abe H, Ruthazer ES, Cline HT. GABA Expression and regulation by sensory experience in the developing visual system. PLoS ONE 2012; 7: e29086.

[7] de Marchena J, Roberts AC, Middlebrooks PG, Valakh V, Yashiro K, Wilfley LR, Philpot BD. NMDA receptor antagonists reveal age-dependent differences in the properties of visual cortical plasticity. J Neurophysiol 2008; 100: 1936-1948.

[8] Tang AH, Chai Z, Wang SQ. Dark rearing alters the short-term synaptic plasticity in visual cortex. Neurosci Lett 2007; 422: 49-53.

[9] Jaffer S, Vorobyov V, Kind PC, Sengpiel F. Experience-dependent regulation of functional maps and synaptic protein expression in the cat visual cortex. Eur J Neurosci 2012; 35: 1281-1294.

[10] Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H, Kwang WJ. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. Int Rev Cytol Academic Press 2002; p: 1-47.

[11] Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. Neuron 1991; 7: 91-100.

[12] Kanaani J, Lissin D, Kash SF, Baekkeskov S. The hydrophilic isoform of glutamate decarboxylase, GAD67, is targeted to membranes and nerve terminals independent of dimerization with the hydrophobic membrane-anchored isoform, GAD65. J Biol Chem 1999; 274: 37200-37209.

[13] Martin KC. Local protein synthesis during axon guidance and synaptic plasticity. Curr Opin Neurobiol 2004; 14: 305-310.

[14] Kalanjati VP, Miller SM, Ireland Z, Colditz PB, Bjorkman ST. Developmental expression and distribution of GABAA receptor α1-, α3- and β2-subunits in pig brain. Dev Neurosci 2011; 33: 99-109.

[15] Koyanagi Y, Yamamoto K, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Presynaptic interneuron subtype- and age-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission by beta-adrenoceptors in rat insular cortex. J Neurophysiol 2010; 103: 2876-2888.

[16] Keck T, Scheuss V, Jacobsen RI, 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: 869-882.

[17] Yazaki-Sugiyama Y, Kang S, Cateau H, Fukai T, Hensch TK. Bidirectional plasticity in fast-spiking GABA circuits by visual experience. Nature 2009; 462: 218-221.

[18] Sloviter RS, Lomo T. Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization. Front Neural Circuits 2012; 6: 102.

[19] Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. Brain Res Bull 2006; 70: 8-14.

[20] Talaei SA, Salami M. Sensory experience differentially underlies developmental alterations of LTP in CA1 area and dentate gyrus. Brain Res 2013; 1537: 1-8.

[21] Workman JL, Bowers SL, Nelson RJ. Enrichment and photoperiod interact to affect spatial learning and hippocampal dendritic morphology in white-footed mice (Peromyscus leucopus). Eur J Neurosci 2009; 29: 161-170.

[22] 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: 2515-2528.

[23] Wong T, Zhang XL, Asl MN, Wu CP, Carlen PL, Zhang L. Postnatal development of intrinsic GABAergic rhythms in mouse hippocampus. Neuroscience 2005; 134: 107-120.

[24] Xu C, Cui C, Alkon DL. Age-dependent enhancement of inhibitory synaptic transmission in CA1 pyramidal neurons via GluR5 kainate receptors. Hippocampus 2009; 19: 706-717.

[25] Potier B, Jouvenceau A, Epelbaum J, Dutar P. Age-related alterations of GABAergic input to CA1 Pyramidal neurons and its control by nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampus. Neuroscience 2006; 142: 187-201.

[26] Swanwick CC, Murthy NR, Mtchedlishvili Z, Sieghart W, Kapur J. Development of gamma-aminobutyric acidergic synapses in cultured hippocampal neurons. J Comp Neurol 2006; 495: 497-510.

[27] Talaei SA, Sheibani V, Salami M. Light deprivation improves melatonin related suppression of hippocampal plasticity. Hippocampus 2010; 20: 447-455.

[28] Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, Huang ZJ. Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. J Neurosci 2004; 24: 9598-9611.

[29] Morales B, Choi SY, Kirkwood A. Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex. J Neurosci 2002; 22: 8084-8090.

[30] Benevento LA, Bakkum BW, Cohen RS. Gamma-Aminobutyric acid and somatostatin immunoreactivity in the visual cortex of normal and dark-reared rats. Brain Res 1995; 689: 172-182.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

Visual deprivation during critical period of brain development inhibits expression of glutamic acid decarboxylase enzyme in rat hippocampus

Sayyed Alireza Talaei (Ph.D Student)[1], Abolfazl Azami (Ph.D)[2], Mahmoud Salami (Ph.D)[*1]
1 - Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
2 - Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received: 8/11/1393; Accepted: 28 Jan 2015)

Introduction: Visual deprivation during critical period of brain development inhibits the GABAergic system growth and completion in visual cortex. Because parts of visual signals are transferred to hippocampus through the visual cortex, the aim of this experiment was to study the effects of visual deprivation during critical period of brain development on expression of Glutamic Acid Decarboxylase enzyme in rats' hippocampus.

Materials and methods: This study was carried on 2 groups (n=36) of male rats kept in standard 12 hour light/dark cycle (Light reared, LR) or in complete darkness (Dark reared, DR). Each group, in turn, was divided into 3 aged-based subgroups of 2, 4 and 6 weeks old rats. Using RT-PCR and Western Blot techniques, expression of both isoforms of Glutamic Acid Decarboxylase enzyme were investigated in hippocampus.

Results: Relative expression of mRNA and protein of GAD65 and GAD67 enzymes increased in the LR animals, time dependently. However, although the expression of both enzymes increased in the DR animals by aging, but, the expression was much lower in compare to the LR rats.

Conclusion: Visual deprivation during critical period of brain development inhibits the expression of GAD65 and GAD67 enzymes in rat hippocampus and delays GABAergic system development.

Keywords: Visual Perception, Sensory Deprivation, Critical Period, Hippocampus, Glutamate Decarboxylase, Rats

* Corresponding author. Tel: +98 31 5562 1157
salami-m@kaums.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]