

## تاثیر محرومیت از بینایی طی دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان زیرواحدهای گیرنده AMPA در هیپوکامپ موش صحرایی

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۳۱ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۰ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۲/۲۰

**زمینه و هدف:** طی دوره بحرانی تکامل مغز، پیام‌های محیطی نقش مهمی در بلوغ مدارهای عصبی دارند. نشان داده شده است که تغییر در پیام‌های بینایی در این دوره باعث ایجاد تغییر در ساختمان و عملکرد گیرنده‌های گلوتامات در قشر بینایی می‌شود. بخشی از پیام‌های بینایی پس از پردازش در قشر به هیپوکامپ رسیده و در تولید حافظه نقش دارند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان زیرواحدهای گیرنده  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) در هیپوکامپ موش صحرایی بود.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی در زمستان ۱۳۹۲ در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان بر روی ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار که از بدو تولد یا در سیکل ۱۲-۱۲ روشنایی تاریکی (LR) و یا در تاریکی کامل (DR) پرورش یافته بودند، انجام شد. بیان mRNA مربوط به زیرواحدهای GluR1 و GluR2 در هیپوکامپ با روش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) و بیان پروتئین زیرواحدهای گفته‌شده با روش وسترن‌بلات در سنین دو، چهار و شش هفتگی هر دو گروه از حیوانات بررسی شد. داده‌ها پس از کمی‌سازی با آنالیز واریانس یک‌سویه مورد مقایسه قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** بیان نسبی زیرواحد GluR1 در هیپوکامپ موش‌های گروه 6WLR در مقایسه با گروه 2WLR به میزان ۲۴٪ کاهش داشت ( $P=0/004$ ) و بیان نسبی زیرواحد GluR2 به میزان ۱۹۰٪ افزایش داشت ( $P<0/0001$ ). محرومیت از بینایی باعث افزایش بیان هر دو زیرواحد در هیپوکامپ موش‌های گروه 6WDR نسبت به 2WDR به میزان ۲۰٪ گردید ( $P=0/01$ ).

**نتیجه‌گیری:** محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز طی یک روند وابسته به سن باعث ایجاد تغییر در بیان نسبی و نیز چینش هر دو زیرواحد گیرنده AMPA در هیپوکامپ موش صحرایی می‌شود.

**کلمات کلیدی:** پرورش در تاریکی، دوره بحرانی، هیپوکامپ، گیرنده AMPA، موش صحرایی.

سید علیرضا طلائی<sup>۱</sup>

ابوالفضل اعظمی<sup>۲</sup>

الهام مهدوی<sup>۲</sup>

محمود سلامی<sup>\*۱</sup>

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

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

\* نویسنده مسئول: کاشان، بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

تلفن: ۰۳۱-۵۵۶۲۱۱۵۷

E-mail: salami-m@kaums.ac.ir

### مقدمه

سیگنال‌های محیطی، تکامل سیستم عصبی را موجب می‌شود.<sup>۱</sup> برای مغز موش صحرایی این بازه زمانی در حدود شش هفته در نظر گرفته می‌شود.<sup>۲</sup> بیشترین ارتباط حسی پستانداران با محیط از طریق سیستم بینایی فراهم شده و سیگنال‌های رسیده از آن به‌ویژه در دوران بحرانی تکامل مغز نقش مهمی در بلوغ مدارهای مغزی ایفا می‌کنند.<sup>۳</sup> نقش تکاملی این پیام‌ها در دوره بحرانی در پژوهش‌های مختلف بررسی و

سازماندهی و شکل‌گیری مدارهای سیناپسی سیستم عصبی پستانداران در دوره بحرانی تکامل صورت می‌پذیرد. این دوره یک محدوده زمانی از تولد تا بلوغ مدارهای عصبی است. در این دوران برهمکنش فعالیت ذاتی سلول‌های عصبی - که خود نتیجه‌ای از فعالیت ژن‌ها است - و برقراری ارتباط با محیط از طریق دریافت

که منجر به افزایش ورودی‌های حسی به مغز می‌شود، باعث ایجاد تغییر در عملکرد نورون‌های آن می‌شود.

با طرح این فرضیه که پیام‌های تغییرشکل‌یافته بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز بتوانند بر نحوه شکل‌گیری و میزان فعالیت سیستم‌های نوروترانسمیتری هیپوکامپ نیز تاثیرگذار باشند، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر دوره‌های مختلف محرومیت از بینایی طی دوره بحرانی تکامل مغز بر بیان ژن و پروتئین‌های مربوط به زیرواحدهای گیرنده AMPA در هیپوکامپ موش صحرایی انجام شد.

### روش بررسی

مطالعه تجربی حاضر در زمستان ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و به‌منظور بررسی بیان ژن و بیان پروتئین زیرواحدهای گیرنده AMPA بر روی ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار که به‌طور تصادفی وارد گروه‌های مطالعه شده بودند، انجام گرفت.

شرایط نگهداری حیوانات و نیز اصول کار آزمایشگاهی با آنها مطابق با قوانین بین‌المللی و نیز دستورکارهای 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 سیکل‌های متوالی ۱۲ ساعته روشنایی و 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 شش‌تابی 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 وارد مطالعه شدند (6WLR, 6WDR).

ابتدا حیوانات با اتر به‌طور عمیق بیهوش شده و به‌وسیله گیوتین سر آنها جدا شد. در مدت زمان کمتر از ۳۰ ثانیه مغز از درون جمجمه خارج شده و در پتری دیش حاوی نرمال سالین  $4^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. سپس، هر دو هیپوکامپ مغز به‌سرعت استخراج شده و با نیتروژن مایع فریز شده، تا زمان انجام آزمایشات در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$ -

اثبات شده است.<sup>۵</sup> Keck و همکارانش نشان داده‌اند که محرومیت از بینایی باعث ایجاد تغییر در شکل‌گیری مدارهای نورونی حاوی پیامبرهای مهاری و تحریکی در قشر بینایی موش سوری می‌شود.<sup>۶</sup> به‌علاوه، بیان شده است که تغییر در تجربه بینایی باعث ایجاد تغییر در ساختار و عملکرد گیرنده پیامبرهای عصبی مختلف می‌شود.<sup>۷،۸</sup> مهم‌ترین پیامبر تحریکی مغز پستانداران گلوتامات است که از طریق چندین گیرنده اعمال خود را انجام می‌دهد.<sup>۹</sup> یکی از گیرنده‌های گلوتامات،  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor است که به‌عنوان یک کانال آیونوتروپیک در نواحی مختلف مغز پستانداران بیان شده و نقش حیاتی آن در تشکیل حافظه و یادگیری مشخص شده است.<sup>۱۰</sup> این گیرنده به‌صورت هتروترامر (دیمِر) از زیرواحد GluR2 و یکی از زیرواحدهای GluR1، GluR3 و یا GluR4 تشکیل می‌شود.<sup>۱۱</sup> مشخص شده است که همزمان با تکامل سیستم عصبی پستاندار، گیرنده AMPA نیز در مدارهای گلوتاماترژیک بیان شده و مدارها بالغ می‌شوند.<sup>۱۲</sup> Durand و همکاران بیان می‌دارند که بیان زیرواحدهای GluR1، 2، 3 در مغز موش صحرایی طی یک روند وابسته به سن تا هنگام بلوغ افزایش می‌یابد.<sup>۱۳</sup> به‌تازگی در یک پژوهش نشان داده شده است که در طول تکامل قشر بینایی گربه‌ها از یک روزگی تا یک‌سالگی اگرچه تغییر محسوسی در بیان زیرواحد GluR1 اتفاق نمی‌افتد، اما در حد فاصل سه تا ۱۲ هفتگی بیان زیرواحد GluR2/3 دچار تغییر می‌شود. از طرف دیگر مشخص شده است که پیام‌های بینایی در تکامل این گیرنده نقش دارند. برای مثال بیان شده است که بیان زیرواحد GluR2/3 در اثر مواجه شدن با پنج هفته محرومیت از بینایی در قشر بینایی افزایش می‌یابد.<sup>۱۴</sup>

همه قشرهای حسی بخشی از پیام‌های خود را به تشکیلات هیپوکامپ- واقع در لوب گیجگاهی میانی- ارسال کرده و پس از پردازش داده‌ها در آن یادگیری و حافظه اتفاق می‌افتد.<sup>۱۵</sup> به بیان دیگر، ورودی‌های حسی هیپوکامپ از طریق تغییر در میزان و نحوه فعالیت نوروترانسمیترهای مختلف و نیز تغییر در فعالیت گیرنده‌های این نوروترانسمیترها، باعث ایجاد یادگیری و حافظه می‌شوند.<sup>۱۶</sup> همچنین، برای هیپوکامپ نیز همانند قشرهای حسی یک دوره بحرانی تکامل در نظر گرفته می‌شود و نشان داده شده است که برخی تغییرات محیطی مانند محرومیت‌های حسی<sup>۱۷</sup> و یا شلوغ‌سازی محیط زندگی<sup>۱۸</sup>

نگهداری شدند. برای بررسی بیان ژن‌های مربوط به زیرواحدها از روش PCR استفاده شد؛ بدین‌صورت که ابتدا به‌وسیله کیت (peqGOLD RNAPure, Peqlab Co., Germany) تمام RNA نمونه‌ها استخراج شد. سپس، میزان RNA استخراج‌شده به‌روش اسپکتروفتومتری (BioPhotometer plus, Eppendorf Co., Germany) سنجیده شد. در مرحله بعد، با استفاده از کیت (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 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 گردید. مراحل PCR به‌ترتیب زیر بود: مرحله واسرشت اولیه در دمای °C ۹۴ به‌مدت دو دقیقه، سپس سیکل‌های متوالی (به‌ترتیب ۳۳، ۲۸ و ۲۸ سیکل برای HPRT، GluR1 و GluR2) شامل واسرشت در دمای °C ۹۴ به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به‌مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای °C ۷۲ به‌مدت ۴۵ ثانیه و در انتها گسترش نهایی در دمای °C ۷۲ به‌مدت هفت دقیقه.

در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و نیز اندازه ژن هدف آورده شده است. در مرحله بعد محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، باندها در دستگاه UV tech (UV tech, Cambridge, USA) مشاهده شده و از آنها تصویر تهیه شد. تصاویر مربوطه با استفاده از ImageJ software version 1.48 (Wayne Rasband, NIH, USA) آنالیز شده و نسبت بیان هر ژن به ژن HPRT محاسبه گردید. برای بررسی بیان پروتیین زیرواحدهای گیرنده AMPA از تکنیک وسترن‌بلات استفاده شد.

در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مربوط به بیان ژن GluR1 در هیپوکامپ گروه‌های مختلف مورد آزمایش نشان داد که همزمان با افزایش سن از بیان نسبی ژن در گروه‌های روشنایی کاسته شده و بر بیان ژن در گروه‌های تاریکی افزوده شد (نمودار ۱-الف)؛ به‌طوری‌که میزان بیان نسبت بیان هر پروتیین به پروتیین  $\beta$ Actin محاسبه شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 18, IBM Co., USA) ANOVA یک‌سویه به‌همراه پس‌آزمون Tukey آنالیز شده و  $P < 0/05$  معنادار تلقی گردید.

## یافته‌ها

بررسی یافته‌های مربوط به بیان ژن GluR1 در هیپوکامپ گروه‌های مختلف مورد آزمایش نشان داد که همزمان با افزایش سن از بیان نسبی ژن در گروه‌های روشنایی کاسته شده و بر بیان ژن در گروه‌های تاریکی افزوده شد (نمودار ۱-الف)؛ به‌طوری‌که میزان بیان نسبت بیان هر ژن به ژن HPRT محاسبه گردید. برای بررسی بیان پروتیین زیرواحدهای گیرنده AMPA از تکنیک وسترن‌بلات استفاده شد.

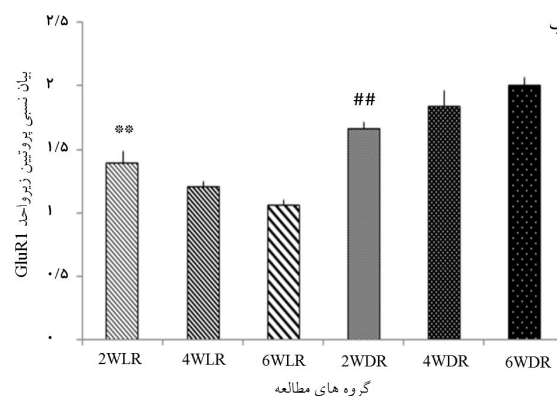
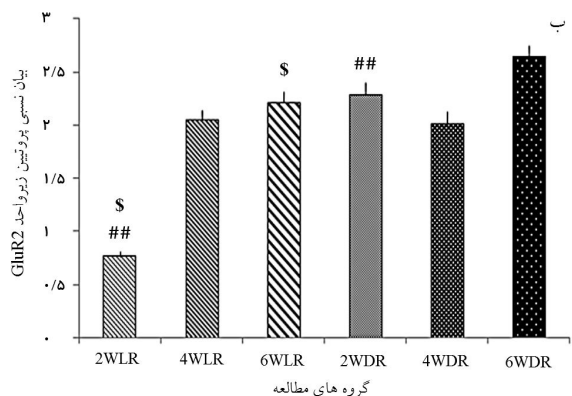
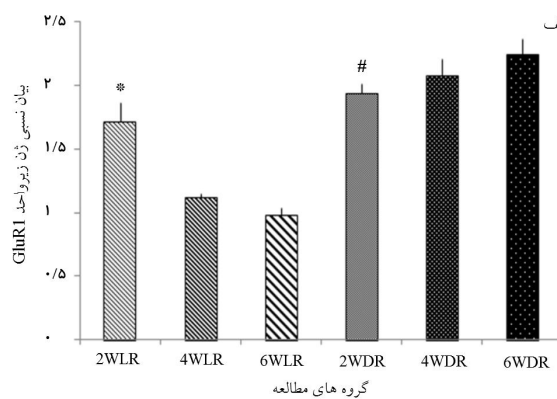
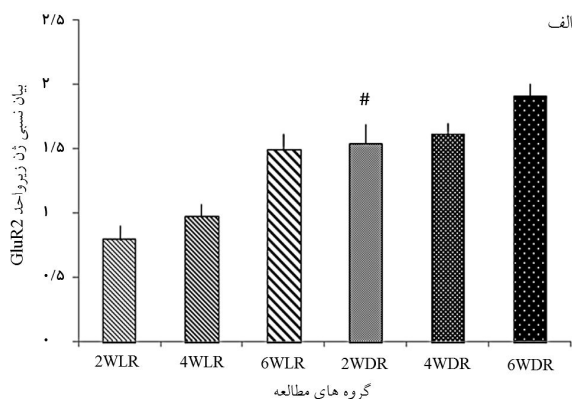
به‌طور خلاصه، ابتدا پروتیین تام هیپوکامپ‌ها با استفاده از محلول RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) که حاوی کوکتل آنتی‌پروتئاز بود، استخراج شد. سپس، میزان پروتیین استخراج‌شده با روش برادفورد سنجیده شد. در مرحله بعد به تناسب Laemmli به نمونه‌ها اضافه شده و با تکنیک Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) در ۱۲۰ ولت و برای مدت دو ساعت الکتروفورز شدند. برای انتقال پروتیین‌ها به کاغذ PVDF (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) از تکنیک Semi dry transfer در ۱۰ ولت برای مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد. سپس، بلات‌ها با 5% Skimmed milk تهیه شده در

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن زیرواحدهای گیرنده AMPA

نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال (°C)	اندازه ژن هدف (kb)
HPRT	gtgccattctctatgactgtagattt	۶۰	۱۷۲
	caatcaagactgtctttccagtt		
GluR1	tccacgtgatcgaaatgaaa	۵۹/۵	۲۰۲
	gtcattgcctcaaaactggt		
GluR2	ggcgtgtaactctggactgt	۵۹/۵	۱۹۷
	acaccgggaatcgtcgtag		

ژن ساختمانی در فرایند PCR Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) GluR1: زیرواحد شماره ۱ گیرنده‌های AMPA، GluR2: زیرواحد شماره ۲ گیرنده‌های AMPA

مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، خرداد ۱۳۹۴، دوره ۷۳، شماره ۳، ۱۶۸ تا ۱۷۵



نمودار ۲: میزان بیان نسبی ژن (الف) و پروتئین (ب) مربوط به زیرواحد GluR2 در گروه‌های مختلف مطالعه (n=6 در هر گروه).

\* اختلاف بیان نسبی ژن بین گروه‌های 2WLR و گروه 6WLR معنادار بود (P<0/0001)، # اختلاف بیان نسبی ژن گروه‌های 2WDR و گروه 6WDR معنادار است (P=0/024). مقایسه بین گروهی نشان می‌دهد که بیان ژن زیرواحد GluR2 در گروه‌های روشنایی در مقایسه با گروه‌های تاریکی همسن خود کمتر است (P<0/0001) برای هر سه مقایسه.

\*\* اختلاف بیان نسبی پروتئین بین گروه‌های 2WLR و 6WLR معنادار است (P<0/0001)، ## اختلاف بیان نسبی پروتئین بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنادار است (P=0/011)، \$ اختلاف بیان نسبی پروتئین بین گروه‌های 2WDR و 2WDR نیز بین گروه‌های 6WDR و 6WLR معنادار است (P<0/0001).

معنادار بین گروه 2WLR و گروه 6WLR (P<0/0001) و نیز بین گروه 2WDR و گروه 6WDR بود (P=0/044). مقایسه بین گروهی داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که بیان زیرواحد GluR1 در گروه‌های روشنایی در مقایسه با گروه‌های تاریکی همسن خود کمتر بود (P<0/0001) برای هر سه مقایسه.

آنالیز داده‌های مربوط به بیان نسبی پروتئین GluR1 در هیپوکامپ

نمودار ۱: میزان بیان نسبی ژن (الف) و پروتئین (ب) مربوط به زیرواحد GluR1 در گروه‌های مختلف مطالعه (n=6 در هر گروه).

\* اختلاف بیان نسبی ژن بین گروه‌های 2WLR و گروه 6WLR معنادار بود (P<0/0001)، # اختلاف بیان نسبی ژن گروه‌های 2WDR و گروه 6WDR معنادار بود (P=0/044). مقایسه بین گروهی نشان داد که بیان ژن زیرواحد GluR1 در گروه‌های روشنایی در مقایسه با گروه‌های تاریکی همسن خود کمتر بود (P<0/0001) برای هر سه مقایسه.

\*\* اختلاف بیان نسبی پروتئین بین گروه‌های 2WLR و 6WLR معنادار بود (P=0/004)، ## اختلاف بیان نسبی پروتئین بین گروه‌های 2WDR و 6WDR معنادار بود (P=0/003). مقایسه بین گروهی نشان داد که بیان پروتئین زیرواحد GluR1 در گروه‌های روشنایی در مقایسه با گروه‌های تاریکی همسن خود کمتر بود (P<0/0001) برای هر سه مقایسه.

نسبی این ژن از 1/71±0/15 در گروه 2WLR به 0/98±0/06 در گروه 6WLR رسیده (۴۳٪ کاهش) و از 1/93±0/08 در گروه 2WDR به 2/25±0/12 در گروه 6WDR رسید (۱۶٪ افزایش). به‌علاوه، آنالیز آماری داده‌ها حاکی از وجود اختلاف معنادار بین میانگین بیان نسبی ژن زیرواحد گفته‌شده در گروه‌های مختلف آزمایش بود (P<0/0001). نتایج پس‌آزمون Tukey نیز حاکی از وجود اختلاف

(در حدود ۱۶٪ افزایش). نتایج پس‌آزمون Tukey حاکی از وجود اختلاف معنادار بین دو گروه 2WLR و 6WLR ( $P < 0/0001$ ) و نیز بین گروه‌های 2WDR و 6WDR بود ( $P = 0/011$ ). همچنین، بررسی داده‌ها نشان داد محرومیت از بینایی باعث شده است که بیان نسبی پروتیین GluR2 در گروه‌های 2WDR و 6WDR نسبت به گروه‌های روشنایی همسن خود افزایش چشم‌گیری داشت ( $P < 0/0001$ ) برای هر دو مقایسه).

## بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد در موش‌های صحرائی که در شرایط طبیعی حیوان‌خانه نگهداری شده بودند، همراه با افزایش سن از دو تا شش هفتگی از میزان بیان ژن و پروتیین زیرواحد GluR1 کاسته شده و این در حالی است که بیان ژن و پروتیین زیرواحد GluR2 در حدود دو برابر افزایش می‌یابد. جالب اینجاست که بیان نسبی پروتیین زیرواحد GluR2 در پایان دوره بحرانی بیش از دو برابر بیان نسبی پروتیین GluR1 است. به علاوه، پرورش حیوانات در تاریکی از ابتدای تولد تا پایان دوره بحرانی تکامل مغز باعث می‌شود بیان ژن و پروتیین هر دو زیرواحد یک روند صعودی طی کند. براساس بررسی‌های انجام‌شده تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی تاثیر تغییر در تجربه بینایی بر روند تکاملی زیرواحدهای گیرنده AMPA در هیپوکامپ نپرداخته است.

در مورد روند تکاملی زیرواحدهای گیرنده یادشده گفته می‌شود که در ابتدای زندگی، در نورون‌های پس‌سیناپسی مدارهای گلوتاماترژیک تنها گیرنده‌های NMDA بیان شده و سایر گیرنده‌های گلوتامات بیان نمی‌شوند. به این مدارها به اصطلاح AMPA Silent گفته می‌شود.<sup>۱۹</sup> طی دو تا سه هفته پس از تولد به‌طور تقریبی نیمی از مدارهای گلوتاماترژیک هیپوکامپ موش صحرائی از حالت AMPA Silent خارج می‌شوند.<sup>۱۲</sup> Durand و همکارانش نشان دادند که بیان زیرواحدهای GluR1,2,3 در مغز موش صحرائی طی یک روند وابسته به سن تا هنگام بلوغ افزایش می‌یابند.<sup>۱۳</sup> در همین مطالعه نشان داده شده است که بیان زیرواحد GluR1 در ابتدای تولد در هیپوکامپ موش صحرائی بسیار بیشتر GluR2 است که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت.<sup>۱۳</sup>

گروه‌های مختلف مورد آزمایش نشان داد که اختلاف بین میانگین بیان نسبی پروتیین زیرواحد گفته‌شده در گروه‌های مختلف معنادار بود ( $P < 0/0001$ ). نمودار ۱-ب نشان داد که بیان نسبی این پروتیین همزمان با افزایش سن در هر دو گروه LR در حدود ۲۵٪ کاهش یافته و در گروه DR در حدود ۲۱٪ افزایش یافت؛ به بیان دیگر اختلاف بین گروه‌های 2WLR و 6WLR ( $P = 0/004$ ) و نیز اختلاف بین دو گروه 2WDR و 6WDR معنادار بود ( $P = 0/003$ ). به علاوه، مقایسه بین‌گروهی داده‌ها نیز نشان داد که بیان پروتیین زیرواحد GluR1 در هیپوکامپ موش‌های صحرائی گروه‌های تاریکی در مقایسه با حیوانات همسن خود در گروه‌های روشنایی اختلاف معنادار بود ( $P < 0/0001$ ) برای هر سه مقایسه).

نتایج مربوط به بیان نسبی ژن GluR2 در هیپوکامپ گروه‌های مختلف مورد آزمایش نشان داد که همزمان با افزایش سن در هر دو گروه روشنایی و تاریکی بر بیان این ژن افزوده شد (نمودار ۲-الف). آنالیز آماری داده‌ها حاکی از وجود اختلاف معنادار بین میانگین بیان نسبی ژن زیرواحد گفته‌شده در گروه‌های مختلف آزمایش بود ( $P = 0/05$ ). با مقایسه داده‌ها می‌توان دریافت که بیان ژن این زیرواحد در هیپوکامپ حیوانات گروه 6WLR در مقایسه با گروه 2WLR در حدود ۸۸٪ افزایش داشته ( $P < 0/0001$ ) و نیز بیان ژن آن در هیپوکامپ حیوانات گروه 6WDR در مقایسه با گروه 2WDR در حدود ۲۸٪ افزایش داشت ( $P = 0/024$ ). همچنین، با مراجعه به نمودار می‌توان مشاهده کرد که در مقایسه بین‌گروهی، اختلاف بین گروه‌های همسن تاریکی و روشنایی معنادار بود و محرومیت از بینایی باعث شد که در هر سه سن بر بیان نسبی ژن GluR2 افزوده شد ( $P < 0/0001$ ) برای هر سه مقایسه).

همانند نتایج مربوط به ژن GluR2 آنالیز داده‌های مربوط به بیان پروتیین GluR2 در هیپوکامپ موش‌های صحرائی نیز نشان داد که بیان نسبی پروتیین یاد شده در هر دو گروه روشنایی و تاریکی به‌صورت وابسته به زمان افزایش یافت (نمودار ۲-ب). آنالیز آماری داده‌ها حاکی از وجود اختلاف معنادار بین میانگین بیان نسبی پروتیین زیرواحد گفته‌شده در گروه‌های مختلف آزمایش بود ( $P < 0/0001$ ). بیان نسبی این پروتیین از  $0/77 \pm 0/05$  در گروه 2WLR به  $2/21 \pm 0/10$  در گروه 6WLR رسیده (در حدود ۱۹۰٪ افزایش) و از  $2/29 \pm 0/11$  در گروه 2WDR به  $2/75 \pm 0/09$  در گروه 6WDR رسید

مطالب بالا، Heynen و همکارانش بیان کردند که محرومیت از بینایی باعث کاهش ۲۰ درصدی بیان هر دو زیرواحد GluR1 و GluR2 در قشر بینایی می‌شود.<sup>۲۳</sup>

از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که محرومیت از بینایی در دوره بحرانی تکامل مغز طی یک روند وابسته به سن باعث افزایش بیان هر دو زیرواحد گیرنده AMPA در هیپوکامپ موش صحرایی می‌شود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل (بخشی از) پایان‌نامه تحت عنوان "تاثیر پیام‌های بینایی بر روند تکامل گیرنده‌های گلوتاماتی درگیر در القای تقویت درازمدت (LTP) در هیپوکامپ" دوره دکتری تخصصی است در سال ۱۳۹۱ و کد ۹۱۳۳۳ می‌باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان اجرا شده است. نویسندگان مقاله، از همکاری بی‌دریغ این معاونت کمال تشکر را به‌عمل می‌آورند.

تاثیر محرومیت از بینایی چه به‌صورت محرومیت کامل و چه به‌صورت محرومیت از بینایی یک چشم بر روند تکاملی زیرواحدهای گیرنده AMPA در قشر بینایی بررسی شده است. برای مثال در مطالعه Jaffer و همکاران نشان داده شده است که در فاصله سه تا ۱۲ هفتگی پس از تولد بیان زیرواحد GluR2/3 در قشر بینایی گربه کاهش یافته و محرومیت از بینایی بیان زیرواحد گفته‌شده را افزایش می‌دهد.<sup>۱۴</sup>

Beston و همکاران نیز نشان دادند که بیان زیرواحد GluR2 در اثر محرومیت از یک چشم از ابتدای زندگی در قشر بینایی گربه افزایش می‌یابد.<sup>۲۰</sup> به‌علاوه، بیان گردیده است که محرومیت از بینایی باعث افزایش بیان زیرواحدهای GluR1 و GluR2 در قشر بینایی موش می‌شود.<sup>۲۱،۲۷</sup> Goel و همکارانش نیز بیان نمودند که محرومیت از بینایی باعث افزایش بیان GluR1 در قشر بینایی می‌شود.<sup>۲۲</sup> نتایج بیان‌شده مشابه با نتایج مشاهده‌شده در مطالعه حاضر است. برخلاف

## References

- Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci* 2014;8:166.
- Roza 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.
- Bengoetxea H, Ortuzar N, Bulnes S, Rico-Barrio I, Lafuente JV, Argandona EG. Enriched and deprived sensory experience induces structural changes and rewires connectivity during the postnatal development of the brain. *Neural Plast* 2012;2012:305693.
- Frenkel MY, Sawtell NB, Diogo ACM, Yoon BJ, Neve RL, Bear MF. Instructive effect of visual experience in mouse visual cortex. *Neuron* 2006;51(3):339-49.
- Yazaki-Sugiyama Y, Kang S, Cateau H, Fukai T, Hensch TK. Bidirectional plasticity in fast-spiking GABA circuits by visual experience. *Nature* 2009; 462(7270):218-21.
- Keck T, Scheuss V, Jacobsen RI, Wierenga CJ, Eysel UT, Bonhoeffer T, et al. Loss of sensory input causes rapid structural changes of inhibitory neurons in adult mouse visual cortex. *Neuron* 2011;71(5):869-82.
- 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.
- Philpot BD, Sekhar AK, Shouval HZ, Bear MF. Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron* 2001;29(1):157-69.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 2010;62(3):405-96.
- Lee HK, Kirkwood A. AMPA receptor regulation during synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. *Semin Cell Dev Biol* 2011;22(5):514-20.
- Greger IH, Ziff EB, Penn AC. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends Neurosci* 2007;30(8):407-16.
- Liao D, Hessler NA, Malinow R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 1995;375(6530):400-4.
- Durand GM, Zukin RS. Developmental regulation of mRNAs encoding rat brain Kainate/AMPA receptors: A northern analysis study. *J Neurochem* 1993;61(6):2239-46.
- 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(8):1281-94.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(1):65-75.
- Packard MG, Goodman J. Factors that influence the relative use of multiple memory systems. *Hippocampus* 2012;23(11):1044-52.
- Talaei SA, Salami M. Sensory experience differentially underlies developmental alterations of LTP in CA1 area and dentate gyrus. *Brain Res* 2013;1537:1-8.
- Malik R, Chattarji S. Enhanced intrinsic excitability and EPSP-spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2012;107(5):1366-78.
- Kerchner GA, Nicoll RA. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(11):813-25.

20. Beston BR, Jones DG, Murphy KM. Experience-dependent changes in excitatory and inhibitory receptor subunit expression in visual cortex. *Front Synaptic Neurosc* 2010;2:138.
21. Goel A, Lee HK. Persistence of experience-induced homeostatic synaptic plasticity through adulthood in superficial layers of mouse visual cortex. *J Neurosci* 2007;27(25):6692-700.
22. Goel A, Xu LW, Snyder KP, Song L, Goenaga-Vazquez Y, Megill A, et al. Phosphorylation of AMPA receptors is required for sensory deprivation-induced homeostatic synaptic plasticity. *PLoS ONE* 2011;6(3):e18264.
23. 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):854-62.

## Effects of visual deprivation during brain development on expression of AMPA receptor subunits in rat's hippocampus

Sayyed Alireza Talaei Ph.D.  
Student<sup>1</sup>  
Abolfazl Azami Ph.D.<sup>2</sup>  
Elham Mahdavi M.Sc.<sup>2</sup>  
Mahmoud Salami Ph.D.<sup>1\*</sup>

1- Physiology Research Center,  
Kashan University of Medical  
Sciences, Kashan, Iran.  
2- Anatomical Sciences Research  
Center, Kashan University of  
Medical Sciences, Kashan, Iran.

\* Corresponding author: Physiology  
Research Center, Kashan University of  
Medical Sciences, Qotbe Ravandi Blvd.,  
Kashan, Iran.  
Tel: +98-31-55621157  
E-mail: salami-m@kaums.ac.ir

### Abstract

Received: 22 Sep. 2014 Accepted: 11 Mar. 2015 Available online: 10 May 2015

**Background:** Environmental signals have an essential role in the maturation of neural circuits during critical period of brain development. It has been shown that, change in visual signals during critical period of brain development changes structure and function of glutamate receptors in the visual cortex. After processing in visual cortex, part of visual signals goes to the hippocampus and makes memories. The aim of this study was evaluating effects of visual deprivation during critical period of brain development on AMPA receptor subunits expression in rats' hippocampus.

**Methods:** This experimental study was done in Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences at winter 2014 on male Wistar rats. Animals were divided to 2 groups (n= 36 for each) were kept in standard 12 hours light/12 hours dark condition (light reared, LR) or in complete darkness (dark reared, DR) from birth to the end of the experiments. Using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting techniques respectively, expression of mRNA and protein of GluR1 and GluR2 subunits was evaluated in rats' hippocampus at ages 2, 4 and 6 weeks in both groups. After quantification of the expressions, the data were compared by two way analysis of variance.

**Results:** The relative expression of GluR1 subunit decreased about 24% (P=0.004) in the hippocampus of 6 WLR rats in comparison to 2 WLR ones. The relative expression of the other AMPA receptor subunit, GluR2, also increased about 190% in the hippocampus of the 6WLR animals when compared to the 2 WLR rats (P< 0.0001). Dark rearing increased the relative expression of both subunits of AMPA receptors, GluR1 and GluR2, about 20 percent (P= 0.01) in the hippocampus of 6 WDR rats in comparison to 2 WLR animals.

**Conclusion:** Dark rearing of rats during critical period of brain development changes the relative expression and also arrangement of both AMPA receptor subunits, GluR1 and GluR2 in the hippocampus, age dependently.

**Keywords:** AMPA receptors, critical period, dark rearing, hippocampus, rat.