

نقش گیرنده‌های ملاتونین در یادگیری فضائی موش‌های صحرائی تیمار شده با روشنائی

محمود سلامی^۱، سید علیرضا طلائی زواره^۲

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

۲- کارشناس ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران. تلفن: ۵۵۵۲۹۹۹-۰۳۶۱ (مؤلف مسؤول) talaei@kaums.ac.ir

خلاصه

زمینه و هدف: بسیاری از رفتارهای پستانداران بالغ محصول برهمکنش فعالیت‌های وابسته به ژنتیک و تجربه حسی در دوره بحرانی تکامل مغز است. هدف از انجام این مطالعه بررسی تقابل اثر ملاتونین، آنتاگونیست آن؛ لوزیندول و تیمار روشنائی بر فرآیندهای یادگیری و حافظه فضایی موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس است.

روش بررسی: با استفاده از ۶۰ رأس موش صحرایی نر ۴۵ روزه که به طور تصادفی در ۲ گروه توزیع شده بودند، این مطالعه تجربی انجام شد. گروه CO (Control) که حیوانات این گروه از بدو تولد تا پایان آزمایشات در شرایط تاریکی-روشنایی ۱۲-۱۲ ساعته قرار داشتند و گروه LR (Light Reared) که در روشنائی کامل رشد یافتند. هر گروه به سه زیر گروه کنترل، دریافت‌کننده ملاتونین و دریافت‌کننده لوزیندول تقسیم شد. با استفاده از ماز آبی موریس روند یادگیری و تثبیت حافظه حیوانات به مدت ۵ شب بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که در مرحله یادگیری حیوانات LR یادگیری کندتری دارند. همچنین، ملاتونین باعث کندتر شدن روند یادگیری موش‌های کنترل می‌گردد. لوزیندول باعث بهبود یادگیری موش‌های LR شد. تیمار روشنائی و ملاتونین بر تثبیت حافظه این حیوانات بی‌تأثیر بود و لوزیندول تنها باعث اختلال در تثبیت حافظه موش‌های کنترل گردید.

نتیجه‌گیری: تیمار روشنائی باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری فضائی موش‌های صحرایی می‌شود و نیز ملاتونین، یادگیری فضائی حیوانات کنترل را با مشکل مواجه می‌کند. هیچ کدام از دو مداخله فوق بر روند تثبیت حافظه مؤثر نیستند.

کلیدواژه‌ها: تیمار روشنائی، یادگیری و حافظه فضایی، ملاتونین، لوزیندول، موش صحرایی

وصول مقاله: ۸۸/۱۱/۲۰ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۲/۱۵ پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۲۲

مقدمه

آنها، باعث ایجاد تغییر در نحوه شکل‌گیری و فعالیت ارتباطات سیناپسی می‌شود (۴). اکثر تحقیقات صورت گرفته در زمینه دوره بحرانی تکامل مغز پستانداران مربوط به بررسی آثار محرومیت از بینائی در این دوره، بر ساختار و عملکرد قشر بینائی است (۵ و ۶). برای مثال، سلامی و همکاران نشان داده‌اند که محرومیت از بینائی باعث ایجاد تغییر در فعالیت کانال‌های NMDA قشر بینائی موش صحرایی شده و پاسخ نورن‌های این ناحیه نیز تغییر می‌یابد (۸ و ۷). در اکثر پستانداران بیشترین

دوره بحرانی تکامل مغز یک محدوده زمانی در اوان زندگی است (۱) که در آن، علاوه بر فرآیندهای وابسته به فعالیت ژن‌ها، تجربیات حاصل از برخورد با محیط نیز نقش مهمی در شکل‌گیری ارتباطات سیناپسی دارند (۳ و ۲). نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهند که ایجاد تغییر در پیام‌های رسیده از محیط اطراف به دستگاه‌های حسی پستاندار در دوره بحرانی تکامل مغز، چه به صورت تقویت این پیام‌ها و چه به صورت حذف

تعامل حسی با محیط از طریق حس بینائی برقرار می‌شود و ثابت گردیده است که بخشی از پیام‌های بینائی پس از پردازش در قشر اولیه بینائی به طور مستقیم (۹) یا غیر مستقیم از طریق قشر انتورینال (۱۰) به تشکیلات هیپوکامپ می‌رسند.

پستانداران با استفاده از سیگنال‌های رسیده از محیط و به ویژه سیگنال‌های بینائی، سعی در یادگیری و به خاطر سپردن یک موقعیت در فضا، یا موقعیت بدن خود در فضای اطراف می‌نمایند (۱۱) و تشکیلات هیپوکامپ که در قشر تمپورال تحتانی واقع شده است، در انجام این فرآیندها نقش به سزائی دارد (۱۲). همانند قشرهای حسی، برای هیپوکامپ نیز یک دوره بحرانی تکامل در نظر گرفته شده (۱۳) و نتایج برخی مطالعات حاکی از این است که تغییر در تجربه حسی در دوران بحرانی تکامل هیپوکامپ بر ساختار و عملکرد آن در دوران بلوغ مؤثر است (۱۴ و ۱۵). Waters و همکارانش نشان داده‌اند که تغییر در سیگنال‌های حسی رسیده از محیط اطراف موش صحرائی در دوره بحرانی تکامل مغز این حیوان، باعث ایجاد تغییر در پاسخ‌های نورن‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌شود (۱۳).

تیمار روشنائی یا نگهداری حیوانات در روشنائی کامل به صورت شبانه روزی باعث ایجاد تغییر در ریتم‌های سیرکادین (شبانه روزی) شده و بالتبع ریتم ترشح هورمونهای سیرکادین مثل ملاتونین (هورمون مترشح از غده پینه آل) دستخوش تغییر می‌گردد (۱۶). بیشترین مقدار ترشح این هورمون در ساعات تاریکی شبانه روز است و ایمپالس‌های نور به سرعت ترشح آن را بلوکه می‌کنند (۱۷). به دلیل اینکه ملاتونین دارای خاصیت چربی دوستی است، به سرعت در سلول‌ها جذب شده و به راحتی از سد خونی مغزی عبور می‌کند

(۱۸) و آثار خود را از طریق دو گیرنده وابسته به خانواده گیرنده‌های متصل شونده به پروتئین‌های G به نام MT1 و MT2 اعمال می‌نماید (۱۹). حضور این دو گیرنده در نواحی درگیر در یادگیری و حافظه؛ به ویژه هیپوکامپ پستانداران با انجام مطالعات زیادی به اثبات رسیده است (۲۰-۲۲). در مورد تأثیر ملاتونین بر فرآیندهای یادگیری و حافظه فضائی، گزارشات ضد و نقیضی در دست است. برخی تأثیرات مثبت این هورمون بر فرآیندهای مذکور را گزارش کرده‌اند (۲۳ و ۲۴) و برخی دیگر اثرات تضعیف‌کننده آن را گزارش کرده‌اند (۲۵ و ۲۷). برای مثال، Sharma و همکارانش با انجام یک مطالعه روی موشهای صحرائی به این نتیجه رسیدند که پیش درمانی با ملاتونین می‌تواند از اختلال ایجاد شده در حافظه فضائی به واسطه تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوسین، جلوگیری کند (۲۸). Ozdemir و همکارانش نیز نشان دادند که ملاتونین می‌تواند از مرگ سلول‌های هیپوکامپ متعاقب ضربه مغزی جلوگیری کرده و حافظه فضائی را بهبود بخشد (۲۴). این در حالی است که Soto-Moyano و همکارانش نشان دادند که ملاتونین می‌تواند باعث ایجاد اختلال در عملکرد فضائی موش‌های صحرائی در ماز شعاعی شود (۲۶). Gonenc و همکارانش نیز بیان می‌دارند که اگرچه ملاتونین به تنهایی باعث بهبود عملکرد موشهای صحرائی در ماز آبی موریس می‌شود، ولی نمی‌تواند از اختلال ایجاد شده در حافظه فضائی توسط اتانول جلوگیری کند (۲۹). تاکنون چندین آنتاگونیست برای گیرنده‌های ملاتونین معرفی شده‌اند و لوزیندول (۲-بنزیل-N-استیل تریپتامین) یکی از آنهاست که به صورت غیر انتخابی هر دو گیرنده ملاتونین را مسدود کرده و تمایل آن برای بلوکه کردن MT2 اندکی بیشتر است (۳۰). پیشنهاد شده

می‌کردند (COL, LRL). شایان ذکر است که حداکثر ۲ فرزند نر حاصل از یک حاملگی انتخاب شده و وارد گروه‌ها می‌شدند. آب و غذا به طور آزاد و به مقدار کافی در اختیار حیوانات قرار داشت. دمای محل نگهداری حیوانات $22 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت هوا $55 \pm 5\%$ بود. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با معاهده هلسینکی و توافقی نامه کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان رعایت گردیدند.

داروها

ملاتونین و لوزیندول از شرکت Sigma-Aldrich کشور آمریکا خریداری گردیدند. برای آماده سازی محلول ملاتونین، ابتدا ۵۰۰ میلی گرم پودر ملاتونین در ۲ میلی لیتر اتانول ۹۹/۱ درصد (Merck, Germany) حل شده و سپس به آن ۹۸ میلی لیتر نرمال سالین اضافه گردید. در نهایت هر میلی لیتر محلول حاوی ۵ میلی گرم ملاتونین بود. محلول لوزیندول نیز با اضافه کردن نرمال سالین به ویال حاوی پودر آن آماده شد. حجم نهایی محلول به گونه‌ای تنظیم شد که هر میلی لیتر آن حاوی ۰/۵ میلی گرم لوزیندول باشد.

ماز آبی موریس

ماز آبی موریس که امروزه به طور گسترده در تحقیقات مربوط به یادگیری و تثبیت حافظه فضایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، یک تانک آب با قطر ۱۵۰ و عمق ۷۰ سانتیمتر است که تا ارتفاع ۵۰ سانتی متری آن از آب پر می‌شود. ماز به طور فرضی به چهار ربع مساوی شمالی، جنوبی، شرقی و غربی تقسیم شده و یک سکوی نجات در وسط یکی از این چهار ربع قرار می‌گیرد؛ به طوری که حدود ۱/۵ سانتی متر زیر سطح آب واقع می‌شود و از بیرون قابل دیدن نیست. حرارت آب در

است که لوزیندول می‌تواند با ایجاد برخی از آثار ملاتونین روی فرآیندهای یادگیری و تثبیت حافظه مخالفت کند. به عنوان مثال، نتایج مطالعه Wang و همکارانش حاکی از این است که لوزیندول می‌تواند اثر مهار ملاتونین بر تشکیل LTP (Long Term Potentiation) در نورون‌های ناحیه هیپوکامپ را بلوک کند (۳۱). با توجه به موارد ذکر شده، هدف اول از انجام این مطالعه بررسی تأثیر تیمار روشنایی در دوران بحرانی تکامل مغز موش صحرایی، بر روند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی این حیوانات است و هدف دوم مطالعه بررسی تقابل اثر تیمار روشنایی، ملاتونین و آنتاگونیست گیرنده‌های آن؛ لوزیندول بر فرآیندهای یادگیری و تثبیت حافظه فضایی موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس است.

روش بررسی

حیوانات

این مطالعه تجربی روی ۶۰ سر موش صحرایی نر ۴۵ روزه نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۶۰ تا ۱۸۰ گرم انجام شد. حیوانات به طور تصادفی به ۲ گروه آزمایشی تقسیم شدند: گروه کنترل (CO)؛ موش‌هایی که از بدو تولد تا زمان آزمایش در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی پرورش یافتند. گروه تیمار شده با روشنایی (Light Reared; LR)؛ موش‌هایی که از بدو تولد تا پایان دوره آزمایش در طول شبانه‌روز در روشنایی کامل پرورش یافتند و حیوانات هر گروه به نوبه خود در ۳ زیر گروه ($n=10$) وارد شدند: حیواناتی که هیچگونه دارویی دریافت نمی‌کردند (CO, LR)، حیواناتی که ملاتونین دریافت کرده (COM, LRM) و حیواناتی که لوزیندول دریافت

حدود ۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد تنظیم می‌شود. ماز در اتاقی قرار می‌گیرد که در آن علائم فضایی مختلفی وجود دارد که در طول آزمایشات ثابت بوده و برای حیوان در ماز قابل دید است. این مجموعه از طریق یک دوربین ردیاب که در ارتفاع ۱۸۰ سانتیمتری و در بالای مرکز ماز آبی قرار گرفته است، مونیتور شده و از طریق اتصال به کامپیوتر اطلاعات مربوط به آزمایش در حال انجام، ذخیره می‌گردد. جهت انجام، ثبت و آنالیز بعدی داده‌های حاصل از آزمایش از نرم افزار اختصاصی "ردیاب ۱، ویرایش ۷" که توانایی پذیرش تنظیمات مختلف برای آزمایشات مختلف در ماز آبی را دارد، استفاده شد.

مراحل انجام آزمایش

الف- مرحله یادگیری یا آموزش:

طی این مرحله، حیوان از یکی از سمت‌های چهارگانه ماز در حالی که روی آن به طرف دیواره ماز بود، در آب، رها می‌شود. (لازم به ذکر است که انتخاب ناحیه شروع آزمایش به طور تصادفی بوده و به وسیله برنامه نرم افزاری پیشنهاد می‌گردد.) با توجه به اندازه ماز و نوع حیوان (موش صحرایی) حداکثر زمان آزمایش ۹۰ ثانیه در نظر گرفته شد. حیوان پس از رها شدن در آب شروع به شنا می‌کند. به طور معمول در جلسات اولیه آزمایش، حیوان برای فرار از آب در کناره دیواره ماز به شنا می‌پردازد اما، به مرور در جلسات بعدی به بخش‌های میانی تر نیز وارد می‌شود. به هر حال اگر حیوان به طور اتفاقی سکوی پنهان مخفی در زیر آب را پیدا می‌کند روی آن قرار می‌گرفت. در این صورت به حیوان اجازه داده می‌شد تا به مدت ۱۵ ثانیه روی سکوی پنهان و با جستجوی اطراف و دیدن علائم موجود در آزمایشگاه موقعیت خود را شناسایی کند. این موضوع

به حیوان کمک می‌کند تا در جلسات بعدی آزمایش با استفاده از علائم بینایی موجود در اتاق محل آزمایش، جایگاه سکوی را پیدا نماید. لازم به ذکر است که هم علائم فضایی موجود در محل آزمایش و هم موقعیت سکوی در یکی از چهار قسمت ماز، در طول آزمایشات ثابت بود. در هر صورت اگر در مدت ۹۰ ثانیه موش نمی‌توانست سکوی را پیدا کند، آزمایش کننده حیوان را به آرامی به سوی سکوی هدایت می‌کرد تا اینکه موش سکوی را یافته و برای ۱۵ ثانیه روی آن قرار گیرد؛ این پدیده معمولاً در اولین جلسات آزمایش اتفاق می‌افتد. پس از گذشت این زمان، حیوان از سکوی برداشته شده و بعد از خشک شدن با یک حوله به قفس خود برگردانده می‌شد. پس از ۱۰ دقیقه آزمایش مجدداً تکرار می‌گردید؛ با این تفاوت که محل رها شدن موش در ماز نسبت به مرحله قبل متفاوت بود. هر موش ۴ جلسه روزانه با فاصله ۱۰ دقیقه‌ای را تجربه می‌کرد. در مجموع این مرحله از آزمایش به مدت ۵ روز طول کشید که طی آن ۲۰ جلسه آزمایش روی حیوانات انجام گردید. داده‌های مربوط به مدت زمان سپری شده در ماز توسط حیوان به منظور یافتن سکوی پنهان استخراج شده و آنالیز شدند. لازم به ذکر است که حیوانات دریافت کننده دارو، ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایشات روزانه، مقدار ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ملاتونین یا ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن لوزیندول به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند.

ب- مرحله باز خوانی یا پروب (Probe trial):

بلافاصله پس از تکمیل مرحله اول، مرحله بعد انجام گردید. در این مرحله (با توجه به اینکه حیوان محل سکوی پنهان را می‌داند) سکوی ماز برداشته شده و آزمایش انجام می‌شد. در این مرحله از آزمایش این

پس آزمون Bonferroni مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقدار P کوچکتر از 0.05 معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

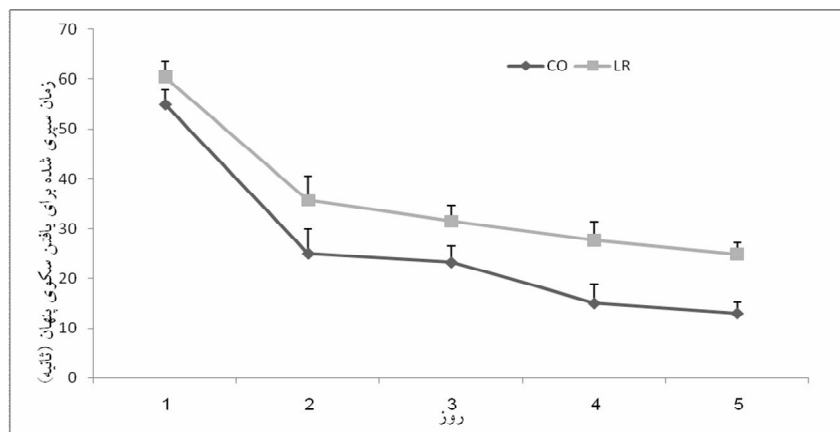
۱- مرحله یادگیری

الف- تأثیر تیمار روشنایی بر یادگیری

با مطالعه داده‌های جمع‌آوری شده از مجموع ۵ روز آموزش حیوانات در ماز آبی موریس و با توجه به معنی‌دار بودن ($P < 0.001$) آزمون کرویت موخلی (Mauchly's test of sphericity)، نتایج آزمون Greenhouse-Geisser نشان داد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو در روزهای مختلف در همه گروه‌ها وجود دارد ($F_{17, 800} = 5.607$; $P < 0.001$)؛ یعنی، همانگونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است، همزمان با پیشرفت روزانه مراحل یادگیری، حیوانات هر دو گروه محل سکوی پنهان را آموخته و مدت زمان کمتری را صرف یافتن سکو می‌کردند. نتایج مقایسه بین گروهی نیز نشان می‌دهد که اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار است ($F_{5, 234} = 17.377$; $P < 0.001$). با توجه به نمودار می‌توان دریافت که موش‌های گروه کنترل یادگیری به مراتب بهتری را نسبت به موش‌های تیمار شده با روشنایی از خود نشان دادند و نتایج آزمون تعقیبی Bonferroni نیز بیانگر آن است که اختلاف بین دو گروه معنی‌دار است ($P = 0.045$).

نکته مورد توجه قرار گرفت که موش در حین آزمایش (که قاعدتاً قادر به یافتن سکو نیست) بیشترین وقت خود را در کدامیک از قسمتهای چهارگانه ماز گذرانده است. به عنوان مثال، اگر بیشترین زمان مربوط به قسمتی بود که قبلاً سکو در آن بوده است، روشن می‌شد که حیوان بر اساس علائم بینایی-فضایی خارج از ماز سکو را پیدا می‌کرده است و نه به طور اتفاقی و یا به دلیل دیدن سکو در زیر آب. لازم به ذکر است که در این مرحله از آزمایش هر جلسه الزاماً ۹۰ ثانیه طول کشید و به دلیل عدم وجود سکو پس از پایان مدت، موش از ماز برداشته می‌شد. این مرحله از آزمایش برای هر موش یک بار انجام گردید و مدت زمان سپری شده در ربع صحیح ماز (که در مرحله قبل واجد سکو بود) معیار میزان یادگیری و یادآوری قرار گرفت.

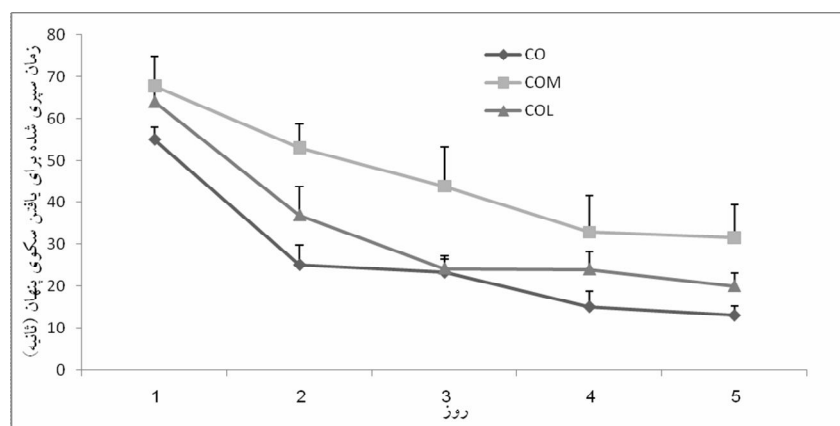
نتایج به دست آمده از آزمایشات مرحله یادگیری با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۷ و با روش آماری Repeated measure ANOVA مقایسه گردیدند. برای نشان دادن ساده‌تر و درک بهتر رفتار حیوانات در دو گروه مورد آزمایش، میانگین رفتار حیوانات طی ۴ جلسه روزانه در شکل‌ها به صورت یک نقطه نمایش داده شده است. همچنین داده‌های مربوط به مرحله پروب با استفاده از آماره One-way ANOVA و



نمودار ۱: مدت زمان لازم جهت یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات هر دو گروه مورد مطالعه در روزهای مختلف آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف میانگین استاندارد حاصل از مجموع جلسات انجام شده برای حیوانات هر گروه طی یک روز نمایش داده شده‌اند. روند بهبود یادگیری در هر دو گروه به خوبی نمایان است و همچنین اختلاف بین دو گروه در مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو معنی‌دار است.

زمان بیشتری را صرف یافتن سکوی پنهان می‌نمایند ($P=0/001$). همچنین، با توجه به نمودار ۲ می‌توان دریافت که تجویز لوزیندول بر روند یادگیری حیوانات بی‌تأثیر است ($P=0/562$).

ب- تأثیر ملاتونین و لوزیندول بر یادگیری موش‌های گروه کنترل یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهند که تجویز ملاتونین ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایشات روزانه موجب ایجاد اختلال در روند یادگیری حیوانات گروه کنترل می‌گردد؛ بدین نحو که موش‌های این گروه مدت

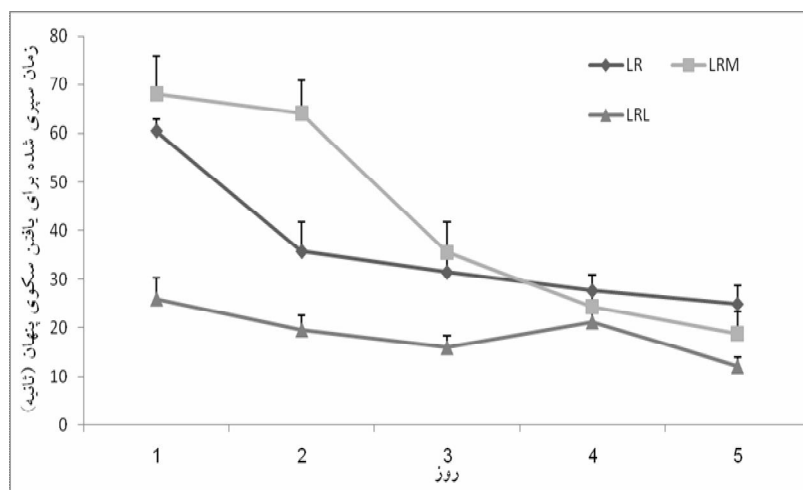


نمودار ۲: تأثیر ملاتونین و لوزیندول بر روند یادگیری موش‌های گروه کنترل در روزهای مختلف آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف میانگین استاندارد حاصل از مجموع جلسات انجام شده برای حیوانات هر گروه طی یک روز نمایش داده شده‌اند. اختلاف بین گروه‌های CO و COM معنی‌دار است ($P=0/001$).

موش‌های تیمار شده با روشنائی بی‌تأثیر است (نمودار ۳). همچنین تزریق داخل صفاقی لوزیندول در این حیوانات باعث بهبود یادگیری این حیوانات شده است ($P < 0.001$).

ج- تأثیر ملاتونین و لوزیندول بر یادگیری موش‌های تیمار شده با روشنائی

آنالیز آماری داده‌های مربوط به حیوانات تیمار شده با روشنائی حاکی از این است که تجویز ملاتونین ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایشات روزانه بر روند یادگیری

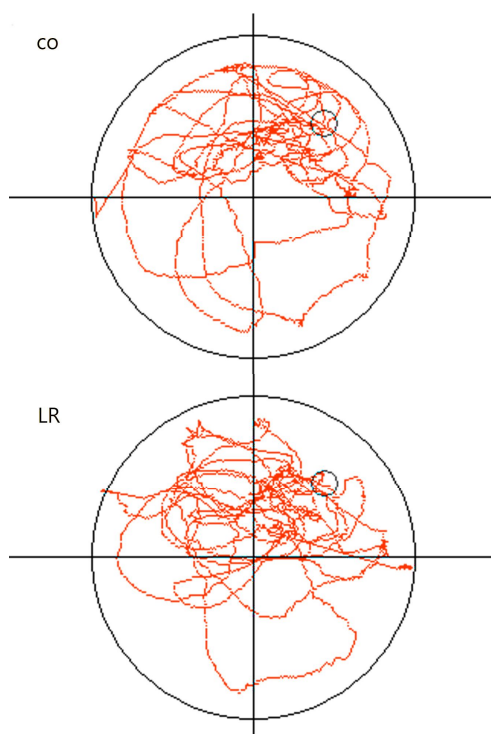


نمودار ۳: تأثیر ملاتونین و لوزیندول بر روند یادگیری موشهای گروه تیمار شده با روشنائی در روزهای مختلف آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف میانگین استاندارد حاصل از مجموع جلسات انجام شده برای حیوانات هر گروه طی یک روز نمایش داده شده‌اند. تجویز لوزیندول باعث بهبود یادگیری حیوانات تیمار شده با روشنائی شد و اختلاف بین گروه‌های LR و LRL معنی‌دار است ($P < 0.001$).

۲- مرحله بازخوانی (پروپ)

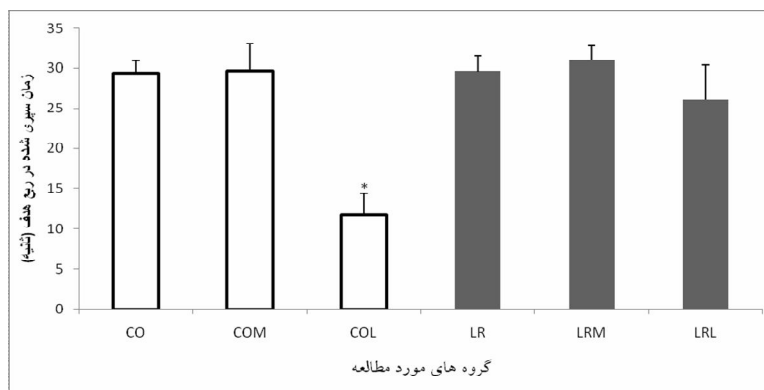
در این مرحله مدت زمانی که حیوان در ربع دارای سکو در مرحله قبل گذراند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌ها با آزمون آنالیز واریانس بیانگر این مطلب است که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایش شده وجود دارد.

($F_{5, 59} = 7.337$; $P < 0.001$). با توجه به نتایج آزمون تعقیبی Bonferroni می‌توان دریافت که تفاوت بین دو گروه LR و CO از نظر مدت زمان یافتن محل سکو پنهان معنی‌دار نیست. شکل ۱ نمای شماتیک ترسیم شده از مسیر حرکت حیوانات دو گروه CO و LR در مرحله پروپ توسط نرم افزار "ردیاب" را نشان می‌دهد.



شکل ۱: نمای شماتیک مسیر حرکت حیوانات در ماز آبی مورس در مرحله پروب که توسط نرم افزار "ردیاب" ترسیم شده است. دایره بزرگ محدوده تانک ماز، دایره کوچک محل قرارگیری سکوی پنهان در مراحل قبل و دو خط عمود بر هم در هر دایره بزرگ نحوه تقسیم بندی ماز به ۴ ربع فرضی را نشان می دهند.

تجویز لوزیندول باعث ایجاد اختلال در روند تثبیت حافظه فضائی موشهای گروه کنترل می گردد؛ به نحوی که این موشها مدت زمان کمتری را در ربع هدف می گذرانند ($P=0/001$) و این در حالی است که تجویز ملاتونین بر این روند بی تأثیر است ($P=1$). همچنین، با مراجعه به نمودار ۴ می توان دریافت که تزریق داخل صفاقی ملاتونین و لوزیندول بر روند تثبیت حافظه فضائی موشهای تیمار شده با روشنائی بی تأثیر است (اختلاف بین گروه LR با LRM و LRL به ترتیب $P=0/132$ و $P=0/473$).



نمودار ۴: مدت زمانی که موشهای گروههای آزمایش در مرحله بازخوانی اطلاعات آموخته شده برای یافتن سکوی پنهان (برداشته شده) صرف کردند. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف میانگین استاندارد نمایش داده شده است. * اختلاف بین گروههای CO و COL؛ $P=0/001$

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار روشنایی، منجر به ایجاد اختلال در روند یادگیری فضایی موش‌های صحرایی می‌شود؛ بدین معنی که موش‌های این گروه به منظور یافتن سکوی پنهان زمان بیشتری را در ماز سپری کردند. همان طور که در بخش نتایج آمده است، تجویز ملاتونین باعث کند شدن روند یادگیری موش‌های گروه کنترل می‌شود و بر عملکرد موش‌های تیمار شده بی‌تأثیر است. از طرف دیگر، لوزیندول بر روند یادگیری حیوانات گروه کنترل بی‌تأثیر است و باعث بهبود عملکرد موش‌های نگهداری شده در روشنایی می‌شود. به علاوه، تیمار روشنایی در روند تثبیت حافظه موش‌های صحرایی تأثیری ندارد و لوزیندول باعث ایجاد اختلال در تشکیل حافظه موش‌های گروه کنترل می‌شود.

تغییر در سیکل‌های شبانه روزی می‌تواند باعث ایجاد اختلال در ریتم ترشح هورمون‌های سیرکادین مثل ملاتونین شود (۱۶). گزارش شده است که طولانی‌تر شدن دوره‌های روشنایی در طول شبانه روز منجر به کاهش ترشح ملاتونین می‌شود (۲۶). نتایج حاصل از مطالعه ما حاکی از این بود که تیمار کردن حیوانات با روشنایی کامل از بدو تولد تا ۴۵ روزه‌گی؛ یعنی زمانی که سیستم عصبی موش‌های صحرایی به بلوغ کامل می‌رسد (۳۲) و نیز تجویز ملاتونین برای حیوانات گروه کنترل باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری فضایی این حیوانات می‌شود. برخی مطالعات آثار تضعیف‌کننده ملاتونین بر عملکردهای یادگیرانه و تثبیت حافظه را گزارش می‌کنند (۲۵-۲۷). Soto-Moyano و همکارانش بیان می‌دارند که تجویز درون صفاقی ملاتونین با دوزهای ۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن

بدن به صورت روزانه باعث ایجاد اختلال در یادگیری بینایی- فضایی موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس می‌شود (۲۶). نتایج یک مطالعه دیگر حاکی از این است که تجویز ملاتونین باعث ایجاد اختلال در یادگیری موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس می‌شود. به علاوه، این دانشمندان نشان داده‌اند که ملاتونین می‌تواند مانع از القای LTP در ناحیه CA1 هیپوکامپ شود (۳۳). همچنین، Gonenc و همکارانش نشان دادند که تجویز درون صفاقی دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ملاتونین نمی‌تواند از اختلال ایجاد شده در حافظه فضایی موش‌های صحرایی توسط اتانول جلوگیری کند (۲۹). Tang و همکارانش نیز مشاهده کردند که تجویز خوارکی ملاتونین نمی‌تواند مانع از ایجاد اختلال در حافظه فضایی توسط بیماری آلزایمر شود (۳۴). یک نتیجه غیر قابل پیش‌بینی حاصل از مطالعه ما این بود که ملاتونین نتوانست بر روند یادگیری موش‌های LR تأثیر بگذارد؛ چرا که انتظار این بود که با توجه به اینکه نگهداری حیوانات در روشنایی باعث افت کردن غلظت ملاتونین سرم می‌شود (۱۶) و در نتیجه گیرنده‌های ملاتونین افزایش می‌یابند، ملاتونین برونزاد بر روند یادگیری و حافظه این حیوانات تأثیرگذار باشد، اما اینچنین نشد. نکته جالب دیگر اینکه لوزیندول بر یادگیری حیوانات گروه کنترل بی‌تأثیر بود، اما، باعث بهبود عملکرد حیوانات LR شد. این یافته می‌تواند تأکیدی بر این موضوع باشد که در نتیجه کاهش غلظت ملاتونین در سرم به طور پیوسته و به مدت ۴۵ روز، بر تعداد و حساسیت گیرنده‌های ملاتونین افزوده می‌شود. از طرف دیگر با توجه به آثار مخربی که برای ملاتونین بر یادگیری حیوانات ذکر شد، انتظار می‌رفت حیوانات تیمار شده با روشنایی عملکرد بهتری نسبت به گروه

کنترل داشته باشند، که این نتیجه نیز حاصل نشد. نشان داده شده است که تغییر در تجربه بینایی به صورت کاهش ساعات دریافت نور باعث ایجاد اختلال در ساختار گیرنده‌های NMDA که امروزه نقش آنها در فرآیندهای حافظه و یادگیری کاملاً محرز است (۳۶ و ۳۵) می‌گردد (۳۸ و ۳۷). شاید تغییر در تجربه حس بینایی به صورت افزایش ساعات دریافت نور نیز باعث ایجاد اختلال در ساختار و عملکرد این گیرنده‌ها و گیرنده‌های ملاتونین شده باشد.

در حالی که نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عملکرد موش‌های LR در ماز نسبت به گروه کنترل به مراتب ضعیف‌تر بود، برخی مطالعات نشان می‌دهند که غنی‌سازی محیط زندگی (Environmental Enrichment) حیوانات آزمایشگاهی (فراهم کردن شرایطی که منجر به افزایش تحریک سیستم‌های حسی، شناختی و حرکتی حیوان شود) باعث بهبود روند یادگیری فضایی در ماز آبی موریس می‌شود (۴۱-۳۹). برای مثال، Workman و همکارانش بیان می‌دارند که کوتاه شدن ساعات مواجهه با نور باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری فضایی موش‌ها می‌شود و با غنی‌سازی محیط اطراف این حیوانات می‌توان این اختلال را درمان کرد. آنها همچنین نشان داده‌اند که افزایش سیگنال‌های حسی رسیده از محیط، باعث افزایش تعداد خا‌رهای دندرتی در این حیوانات می‌شود (۴۱). اگرچه افزایش ساعات دریافت نور در طول شبانه روز را می‌توان نوعی از غنی‌سازی محیط تلقی کرد، با این حال شاید مکانیسم تأثیرگذاری پیام‌های بینایی بر نحوه پردازش اطلاعات در هیپوکامپ متفاوت از پیام‌های لمسی، شنیداری و ... باشد که این موضوع نیز مطالعات بیشتری را می‌طلبد.

در مورد عملکرد ملاتونین در حافظه و القای آن، گزارشات ضد و نقیضی موجود است. در حالی که برخی مطالعات از اثر تسهیل‌کننده ملاتونین بر القای حافظه در مغز سخن گفته‌اند (۴۲)، برخی دیگر نشان می‌دهند که ملاتونین، مانع از القای LTP در برش‌های تهیه شده از مغز می‌شود (۴۳ و ۳۱ و ۲۶). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که ملاتونین بر روند تثبیت حافظه هر دو گروه بی‌تأثیر است.

مطالعات اندکی در زمینه اثر لوزیندول بر یادگیری و حافظه صورت پذیرفته است. برای مثال Argyriou و همکارانش نشان دادند که لوزیندول می‌تواند اثر تسهیل‌کننده ملاتونین بر حافظه کوتاه مدت را بلوکه کند (۴۴). Han و همکارانش نیز نشان داده‌اند که تجویز درون صفاقی ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن لوزیندول با اثر معکوس‌کنندگی ملاتونین بر ترجیح مکان شرطی در موش‌های معتاد به مورفین جلوگیری می‌کند (۴۵). این در حالی است که نتایج یک مطالعه دیگر نشان می‌دهد که تجویز درون صفاقی ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن لوزیندول می‌تواند اضطراب موش‌های صحرایی را کاهش دهد (۴۶). اگرچه برخی مطالعات مثل مطالعه Song و همکاران تجویز ۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن لوزیندول به صورت صفاقی را در معکوس کردن اعمال ملاتونین مؤثر دانسته‌اند (۴۷)، در مطالعه ما، لوزیندول بر عملکرد یادگیرانه و تثبیت حافظه موش‌های تیمار شده با روشنائی مؤثر واقع نشد و تنها تثبیت حافظه در موش‌های گروه کنترل را مختل کرد. اینکه علت دقیق این مشاهدات در زمینه عملکرد لوزیندول در این مطالعه چیست، نیازمند تحقیقات گسترده‌تری است که توسط مجریان طرح حاضر در دست اقدام است.

نتیجه‌گیری

با جمع‌بندی مطالب حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تغییر در تجربه حس بینایی به صورت افزایش ساعات دریافت نور از محیط در دوره بحران تکامل مغز، در روند یادگیری موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس ایجاد اختلال می‌کند، اما، در روند بازخوانی اطلاعات و حافظه فضایی تأثیری ندارد. به علاوه ملاتونین باعث ایجاد اختلال در یادگیری فضایی موش‌های صحرایی شده و بر روند تثبیت حافظه آنها در ماز آبی موریس بی‌تأثیر است. لوزیندول نیز نمی‌تواند با عملکرد ملاتونین

در موش‌های تیمار شده با تاریکی مخالفت کرده و تنها باعث ایجاد اختلال در تثبیت حافظه فضایی موش‌های گروه کنترل می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان به خاطر تأمین هزینه انجام این طرح تحقیقاتی و از خانم‌ها ریحانه اسلامیان و مریم غلامی و نیز جناب آقای مرتضی ضیائی به خاطر کمک‌های ایشان در انجام پروژه، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 877-888.
2. Hensch TK, Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr Topics Develop Biol* 2005; 69: 215.
3. Morishita H, Hensch TK. Critical period revisited: impact on vision. *Current Opinion in Neurobiology* 2008; 18: 101-107.
4. Yang C B, Kiser PJ, Zheng YT, Varoqueaux F, and 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.
5. Crews F, He J and Hodge C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 86: 189-199.
6. Hooks BM, Chen C. Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity. *Neuron* 2007; 56: 312-326.
7. Fathollahi Y, Salami M. The role of N-methyl-aspartate receptors in synaptic plasticity of rat visual cortex in vitro: effect of sensory experience. *Neurosci Lett* 2001; 306: 149-152.
8. Salami M, Fathollahi Y, Semnanian S and 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: 349-356.
9. Yukie M. Connections between the medial temporal cortex and the CA1 subfield of the hippocampal formation in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *J Comp Neurol* 2000; 423: 282-298.
10. Lavenex P, Amaral DG. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus* 2000; 10: 420-430.
11. Paul CM, Magda G and Abel S. Spatial memory: theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 2009; 203: 151-164.
12. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 1971; 34: 171-175.
13. Waters N S, Klintsova AY and Foster TC. Insensitivity of the hippocampus to environmental stimulation during postnatal development. *J Neurosci* 1997; 17: 7967-7973.
14. Dhanushkodi A, Shetty AK. Is exposure to enriched environment beneficial for functional post-lesional recovery in temporal lobe epilepsy? *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32: 657-674.
15. Mora F, Segovia G and del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev* 2007; 55: 78-88.

16. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78: 687-721.
17. Gerstner JR, Lyons LC, Wright KP, Loh DH, Rawashdeh O, Eckel-Mahan KL and et al. Cycling behavior and memory formation. *J Neurosci* 2009; 29: 12824-12830.
18. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M and Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 2000; 9: 160-171.
19. Dubocovich ML. Melatonin receptors: Role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med* 2007; 8: 34-42.
20. Musshoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD and Speckmann EJ. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus* 2002; 12: 165-173.
21. Savaskan E, Ayoub MA, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Meier F and et al. Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res* 2005; 38: 10-16.
22. Stewart LS, Leung LS. Hippocampal melatonin receptors modulate seizure threshold. *Epilepsia* 2005; 46: 473-480.
23. Huang LT, Tiao MM, Tain YL, Chen CC and Hsieh CS. Melatonin ameliorates bile duct ligation-induced systemic oxidative stress and spatial memory deficits in developing rats. *Pediatr Res* 2009; 65: 176-180.
24. Ozdemir D, Tugyan K, Uysal N, Sonmez U, Sonmez A, Acikgoz O, and et al. Protective effect of melatonin against head trauma-induced hippocampal damage and spatial memory deficits in immature rats. *Neurosci Lett* 2005; 385: 234-239.
25. Rogers NL, Kennaway DJ and Dawson D. Neurobehavioural performance effects of daytime melatonin and temazepam administration. *J Sleep Res* 2003; 12: 207-212.
26. Soto-Moyano R, Burgos H, Flores F, Valladares L, Sierralta W, Fernandez V and et al. Melatonin administration impairs visuo-spatial performance and inhibits neocortical Long-term potentiation in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 85: 408-414.
27. Uysal N, Ozdemir D, Dayi A, Yalaz G, Baltaci AK and Bediz CS. Effects of maternal deprivation on melatonin production and cognition in adolescent male and female rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26: 555-560.
28. Sharma M, Briyal S and Gupta YK. Effect of alpha lipoic acid, melatonin and trans resveratrol on intracerebroventricular streptozotocin induced spatial memory deficit in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2005; 49: 395-402.
29. Gonenc S, Uysal N, Acikgoz O, Kayatekin BM, Sonmez A, Kiray M, and et al. Effects of melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats. *Physiol Res* 2005; 54: 341-348.
30. Dubocovich ML, Luzindole N. A novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246: 902-910.
31. Wang LM, Suthana NA, Chaudhury D, Weaver DR and Colwell CS. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 2231-2237.
32. Yang L, Pan Z, Zhou L, Lin S and Wu K. Continuously changed genes during postnatal periods in rat visual cortex. *Neurosci Lett* 2009; 462: 162-165.
33. Feng Y, Zhang LX and Chao DM. Role of melatonin in spatial learning and memory in rats and its mechanism. *Sheng Li Xue Bao* 2002; 54: 65-70.
34. Tang F, Nag S, Shiu SYW and Pang SF. The effects of melatonin and Ginkgo biloba extract on memory loss and choline acetyltransferase activities in the brain of rats infused intracerebroventricularly with [beta]-amyloid 1-40. *Life Sci* 2002; 71: 2625-2631.
35. Kohr G, NMDA. Receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Research* 2006; 326: 439-446.
36. Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA and Tonegawa S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 361-372.
37. Kopp C, Longardo F and Luthi L. Experience-dependent changes in NMDA receptor composition at mature central synapses. *Neuropharmacology* 2007; 53: 1-9.

38. Lebel D, Sidhu N, Barkai E and Quinlan EM. Learning in the absence of experience-dependent regulation of NMDAR composition. *Learn Mem* 2006; 13: 566-570.
39. Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 615-626.
40. Loukavenko EA, Ottley MC, Moran JP, Wolff M and Dalrymple-Alford JC. Towards therapy to relieve memory impairment after anterior thalamic lesions: improved spatial working memory after immediate and delayed postoperative enrichment. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 3267-3276.
41. Workman JL, Bowers SL and 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.
42. Wan Q, Man HY, Liu F, Braunton J, Niznik HB, Pang SF, and et al. Differential modulation of GABAA receptor function by Mella and Mellb receptors. *Nat Neurosci* 1999; 2: 401-403.
43. Podda MV, Deriu F, Giaconi E, Milia M and Tolu E. Melatonin inhibits rat medial vestibular nucleus neuron activity in vitro. *Neurosci Lett* 2003; 341: 209-212.
44. Argyriou A, Prast H and Philippu A. Melatonin facilitates short-term memory. *Eur J Pharmacol* 1998; 349: 159-162.
45. Han J, Xu Y, Yu CX, Shen J and Wei YM. Melatonin reverses the expression of morphine-induced conditioned place preference through its receptors within central nervous system in mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 594: 125-131.
46. Nava F, Carta G. Melatonin reduces anxiety induced by lipopolysaccharide in the rat. *Neurosci Lett* 2001; 307: 57-60.
47. Song GH, Gwee KA, Moochhala SM and Ho KY Melatonin attenuates stress-induced defecation: lesson from a rat model of stress-induced gut dysfunction. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 744-750.