Qom University of Medical Sciences Journal

2024. Volume 18

Research Paper

Effect of Oral Gavage of Fish Oil on the NR1 and NR2 Protein Levels in Hippocampus of Male Rats With Total Sleep Deprivation

Shima Pilechaie[1], *Hamed Zarei[2], Mohammad Nasehi[3]

1. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad university, Pishva, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Cognitive and Neuroscience Research Center (CNRC), Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Pilechaie Sh, Zarei H, Nasehi M. [Effect of Oral Gavage of Fish Oil on the NR1 and NR2 Protein Levels in Hippocampus of Male Rats With Total Sleep Deprivation (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2024; 18:E2762.1. https://doi.org/10.32598/qums.18.2762.1

https://doi.org/10.32598/qums.18.2762.1

Received: 10 Nov 2022

Accepted:16 Aug 2023

Available Online: 22 Jun 2024

Keywords:
Sleep deprivation, NR1, NR2, Fish oil, Western blotting

ABSTRACT

Background and Objectives Sleep deprivation can increase anxiety by impairing hippocampal-dependent memory and emotional memory and cause changes in mood, mental, cognitive, and motor functions. The NR1-NR2 dimer is the main functional organization structure in any NDMA receptor. This study aims to assess the effect of oral gavage of fish oil on the NR1 and NR2 protein levels in hippocampus of male rats with total sleep deprivation.

Methods In this study, 25 male Wistar rats were randomly divided into five groups: Control, Sham, sleep deprivation, sham+fish oil, and sleep deprivation+fish oil. At the end of the treatment, the brain of rats was removed and the amount of NR1 and NR2 proteins in the hippocampus was assessed by the Western blotting method.

Results No significant difference in the level of NR1 and NR2 proteins was observed in the hippocampus of sham group compared to the control group. The expression of these two proteins in the sleep deprivation + fish oil group increased by 62.8% and 83.3%, respectively, compared to the control group, while there was no significant difference in the sleep deprivation group compared to the control group. On the other hand, the levels of these two proteins in the sleep deprivation + fish oil increased by 50 and 116.7%, respectively, compared to the sleep deprivation group.

Conclusion Fish oil can play a protective and therapeutic role in controlling or relieving the effects of sleep deprivation that can reduce the expression of NR1 and NR2 proteins in other areas of the brain.

**** Corresponding Author:***

Hamed Zarei, Assistant Professor.

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Tel: +98 (912) 8599103

E-Mail: h.zarei@iautmu.ac.ir

Copyright © 2024 The Author(s);
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-By-NC: https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Extended Abstract

Introduction

Today, sleep deprivation has become a serious problem, and the number of people who regularly suffer from sleep deprivation due to work pressures and psychosocial stress is increasing. Sleep is important for body recovery, energy conservation, body temperature regulation, and tissue recovery. Sleep deprivation leads to impairment of hippocampus-dependent memory and emotional memory and increases anxiety. Accordingly, the hippocampus is highly sensitive to the effects of sleep deprivation. Therefore, sleep deprivation has a negative effect on learning and long-term potentiation (LTP), which is a type of synaptic plasticity. The negative effects of sleep deprivation on synaptic plasticity occur due to changes in signaling molecules and AMPA and NMDA receptors. NDMA receptors are composed of NR1, NR2 and NR3 subunits. Since the role of omega-3 in cognitive processes and mental health has been confirmed in previous studies, in the present study, we aim to assess the effect of fish oil on the level of NR1 and NR2 proteins in the hippocampus of male rats with total sleep deprivation.

Methods

In this study, 25 male Wistar rats (200±30 g) were used. The rats were randomly divided into five groups including: Control, sham, sleep deprivation (24 hours), sham + fish oil, and sleep deprivation + fish oil. Fish oil was administrated by gavage before and 8 hours after entering into the sleep deprivation device. To investigate the changes in the level of NR1 and NR2 proteins, the hippocampus region of the rats was isolated and homogenized. Western blot technique was used to qualitatively and quantitatively identify NR1 and NR2 proteins in protein solution isolated from brain tissue.

Results

There was no significant difference in the relative expression of NR1 protein in the hippocampus between sham and control groups. Consumption of fish oil increased the expression of NR1 protein by 62.8% compared to the control group. The expression level of this protein in the sleep deprivation group was not significantly different from the control group, but the NR1 protein expression in the hippocampus region of the sleep deprivation + fish oil group increased by 50% compared to the sleep deprivation group.

There was no significant difference in the relative expression of NR2 protein in the hippocampus of sham and control groups. Treatment with fish oil increased the expression of NR2 protein by 83.3% compared to the control group. In addition, the level of NR2 protein in the sleep deprivation group showed no significant difference compared to the control group, but the level of this protein in the hippocampus of the sleep deprivation + fish oil group increased by 116.7% compared to the sleep deprivation group.

Conclusion

Considering the significant increase in the level of NR1 and NR2 proteins after administration of fish oil in male rats, it can be concluded that fish oil can play a protective and therapeutic role in controlling and improving the effects of stress that reduce the expression of these proteins in other areas of the brain.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The present research was carried out in compliance with the ethical standards in biological research.

Funding

The present research is taken from the master's thesis of Shima Pilehchayie, approved by Department of Genetics, Islamic Azad University, Varamin Pishva Branch.

Authors contributions

All authors had equal participation in the design, execution and writing of all parts of this research.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Research Vice-Chancellor of Islamic Azad University, Varamin Pishwa Branch for supporting this study.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

بررسی تغییر سطح پروتئین‌های NR1 و NR2 در هیپوکپ به دنبال گاواژ روغن ماهی در رت‌هایی با محرومیت از خواب کامل

شیما پیله چایی[۱]، *حامد زارعی[۲]، محمد ناصحی[۳]

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات علوم اعصاب و شناخت، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Pilechaie Sh, Zarei H, Nasehi M. [Effect of Oral Gavage of Fish Oil on the NR1 and NR2 Protein Levels in Hippocampus of Male Rats With Total Sleep Deprivation (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2024; 18:E2762.1. https://doi.org/10.32598/qums.18.2762.1

doi https://doi.org/10.32598/qums.18.2762.1

تاریخ دریافت: ۱۹ آبان ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۲۵ مرداد ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ۰۲ تیر ۱۴۰۳

چکیده

زمینه و هدف محرومیت از خواب می‌تواند با اختلال در حافظه وابسته به هیپوکمپ و حافظه عاطفی باعث افزایش سطح اضطراب شود و تغییرات خلق‌وخو، اختلال ذهنی و عملکردهای شناختی و حرکتی ایجاد کند. دایمر NR1-NR2 به‌عنوان ساختار اصلی سازماندهی عملکردی در هر گیرنده NDMA محسوب می‌شود. روغن ماهی حاوی اسیدهای چرب امگا-۳، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و اسید دوکوزاهگزانوئیک (DHA) است که دارای عملکردهای بیوشیمیایی مهمی هستند.

روش بررسی ۲۵ موش نر نژاد ویستار به تعداد مساوی و به‌صورت تصادفی در ۵ گروه کنترل، شم، محرومیت از خواب، شم با دریافت روغن ماهی و محرومیت از خواب با دریافت روغن ماهی تقسیم شدند. پس از اتمام دوره تیمار، مغز موش‌ها خارج شده و میزان پروتئین‌های NR1 و NR2 در ناحیه هیپوکمپ به روش وسترن بلات ارزیابی شد.

یافته‌ها اختلافی در سطح پروتئین‌های NR1 و NR2 در ناحیه هیپوکمپ موش‌های گروه شم نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. میزان بیان این ۲ پروتئین در گروه تیمارشده با روغن ماهی به ترتیب ۶۲/۸ و ۸۳/۳ درصد افزایش داشت. گروه بی‌خوابی اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نداشت. سطح این ۲ پروتئین در گروه بی‌خوابی تیمارشده با روغن ماهی نسبت به گروه بی‌خوابی به ترتیب ۵۰ و ۱۱۶/۷ درصد افزایش داشت.

نتیجه‌گیری استفاده از روغن ماهی می‌تواند در کنترل و بهبود اثرات مربوط به بی‌خوابی که موجب کاهش بیان این پروتئین‌ها در سایر نواحی مغز می‌شوند نقش محافظتی و همچنین درمانی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها:
محرومیت از خواب، NR2، NR1، روغن‌های ماهی، وسترن بلات

* **نویسنده مسئول:**
دکتر حامد زارعی
نشانی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.
تلفن: ۸۵۹۹۱۰۳ (۹۱۲) ۹۸+
رایانامه: h.zarei@iautmu.ac.ir

Copyright © 2024 The Author(s);
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-By-NC: https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

مقدمه

خواب رفتاری است که در اکثر موجودات مشاهده شده و برخلاف بیداری است. در هنگام خواب پاسخ به تحریکات محیطی کاهش می‌یابد [۱]. براساس پیشنهاد بنیاد ملی خواب، در بزرگسالان ۷ تا ۸ ساعت خواب در روز برای عملکرد شناختی مناسب ضروری است [۲]. بااین‌حال افراد ازنظر طول، زمان و ساختار خواب متفاوت هستند [۳]. امروزه با گسترش جوامع مدرن و مشاغل خاص، محدودیت و یا محرومیت از خواب یک مشکل جدی محسوب شده و تعداد افرادی که در اثر فشارهای ناشی از کار و استرس‌های روانی‌اجتماعی به‌طور منظم دچار محرومیت از خواب می‌شوند، رو به افزایش است [۴]. خواب برای بازیابی بدن، حفظ انرژی، تنظیم حرارت و بازیابی بافت اهمیت دارد. علاوه‌براین، خواب برای عملکرد شناختی، به‌ویژه تثبیت حافظه ضروری است [۵]. به هم خوردن نظم طبیعی و فیزیولوژیک خواب و محرومیت از آن، بسته به مدت و نوع محرومیت سبب بروز عواقبی چون استرس، اضطراب پاتولوژیک، عدم تعادل بین مواد اکسیداتیو تولیدی و پاک‌سازی آن‌ها توسط سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان شده و درنتیجه موجب آسیب اکسیداتیو می‌شود [۶]. کمبود خواب در حال حاضر یک مشکل بهداشتی شناخته‌شده در عصر مدرن است. شیوع کم‌خوابی که باعث خواب‌آلودگی بیش‌ازحد در طول روز می‌شود، بین ۹ تا ۲۴ درصد است و کمبود خواب یکی از دلایل عمده مراجعه به کلینیک‌های خواب است [۷].

محرومیت از خواب به اختلال در حافظه وابسته به هیپوکمپ و حافظه عاطفی منجر شده و باعث افزایش سطح اضطراب می‌شود [۸، ۹]. بر همین اساس هیپوکمپ به‌شدت به اثرات محرومیت از خواب حساس است [۱۰]. بنابراین محرومیت از خواب تأثیر منفی بر یادگیری و حافظه وابسته به هیپوکمپ و تقویت طولانی‌مدت[1] که نوعی از شکل‌پذیری سیناپسی است دارد. علاوه‌براین، محرومیت از خواب، یادگیری و حافظه فضایی و القای تقویت طولانی‌مدت را مختل می‌کند و باعث کاهش سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز[2] در هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر و ماده می‌شود [۱۱]. اثرات منفی محرومیت از خواب در شکل‌پذیری سیناپسی به دلیل تغییر در مولکول‌های سیگنالینگ و گیرنده‌های آلفا، آمینو، ۳ هیدروکسی، ۵ متیل و ۴ ایزوکسازول‌پروپیونیک‌اسید[3] و ان، متیل، دی، آسپارتیک اسید[4] اتفاق می‌افتد. گیرنده‌های ان، متیل، دی و آسپارتیک اسید که برای القای تقویت طولانی‌مدت ضروری هستند، در اثر محرومیت از خواب دچار تنظیم کاهشی می‌شوند [۱۲]. گیرنده‌های ان، متیل، دی و آسپارتیک اسید (NDMAR) دارای ساختارهای تترامری یا پنتامری متشکل از زیرواحدهای NMDAR1 (NR1)، NMDAR2 (NR2)، و NMDAR3 (NR3) هستند. ساختار کلی آن‌ها، یک کانال یونی نفوذپذیر نسبت به Ca2+ را تشکیل می‌دهد. NR1 توسط یک ژن کدگذاری می‌شود، اما رونوشت آن ممکن است حداقل ۸ واریانت مختلف را ایجاد کند. در مقابل، زیرواحدهای NR2 به‌صورت ۴ ایزوفرم کدگذاری‌شده توسط ژن‌های مختلف به‌صورت: NR2A، NR2B، NR2C و NR2D یافت می‌شوند [۱۳]. زیرواحد NR1 در اوایل روز ۱۴ بارداری، در مغز جنین موش بیان می‌شود و سطح آن به‌تدریج تا ۳ هفته پس از تولد افزایش می‌یابد [۱۴]. الگوهای بیانی برای NR2 ازنظر زمان و مکان متفاوت است. آن‌ها به هسته‌های خاصی در CNS محدود هستند که در طول رشد آن تغییر می‌کنند. این زیرواحد تنوع عملکردی گیرنده NMDA، و همچنین حساسیت، هدایت، سینتیک غیرفعال‌سازی و سینتیک حساس‌سازی گیرنده را تعیین می‌کند که تأثیر مستقیمی بر طول مدت جریان‌های پس‌سیناپسی تحریکی دارند [۱۵].

روغن ماهی از بافت‌های چرب ماهی‌ها به دست می‌آید. ازآنجاکه روغن ماهی حاوی اسیدهای چرب امگا-۳، ایکوزاپنتانوئیک اسید[5] و اسید دوکوزاهگزانوئیک[6] است. از همین رو روغن ماهی برای بهبود سلامت، متابولیسم سلولی و عملکردهای فیزیولوژیکی طبیعی باید در مقادیر کم توصیه شود [۱۶].

ازآنجایی‌که در تحقیقات گذشته نقش امگا-۳ در فرایندهای شناختی و سلامت روان تأیید شده است، در مطالعه حاضر تأثیر روغن ماهی بر تغییر سطح پروتئین‌های NR1 و NR2 در هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر محروم از کل خواب نسبت به موش‌های صحرایی نر طبیعی ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی و تیمار حیوانات

در مطالعه حاضر از ۲۵ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار (وزن تقریبی ۲۰۰±۳۰ گرم) استفاده شد. کلیه مراحل آزمایش‌های حیوانی با رعایت موازین جهانی حمایت از حیوانات انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته) نگهداری شدند. در تمام مدت نگهداری به‌جز زمان آزمایش، رت‌ها به‌صورت آزادانه به غذای فشرده‌شده مخصوص و آب دسترسی داشتند. رت‌ها به‌صورت تصادفی در ۵ گروه تقسیم شدند (جدول شماره ۱). تیمار با روغن ماهی (Alfa vitamins Co., USA) به میزان ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت گاواژ انجام شد [۱۷]. روغن ماهی در ۲ نوبت، ۱ بار قبل از ورود موش‌ها به دستگاه محرومیت از خواب کامل و بار دیگر ۸ ساعت پس از قرارگیری در دستگاه گاواژ شد.

1. Long-term potentiati (LTP)
2. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)
3. α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)
4. N-methyl-D-aspartate (NMDA)
5. Eicosapentaenoic acid (EPA)
6. Docosahexaenoic acid (DHA)

جدول ۱. گروه‌بندی و تیمار موش‌های مورداستفاده

نام گروه	دستگاه محرومیت از خواب	روغن ماهی	محلول سالین
کنترل	–	–	–
شم	خاموش	–	+
محرومیت از خواب	روشن به مدت ۲۴ ساعت	–	–
شم با دریافت روغن ماهی	خاموش	+	–
محرومیت از خواب با دریافت روغن ماهی	روشن به مدت ۲۴ ساعت	+	–

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

جداسازی ناحیه هیپوکمپ مغز

پس از اتمام دوره تیمار، برای بررسی تغییرات سطح پروتئین‌های NR1 و NR2، ناحیه هیپوکامپ موش‌های مورد آزمایش طبق مراحل زیر جداسازی شد:

ابتدا حیوان قطع نخاعی شده و سر حیوان با استفاده از دستگاه گیوتین جدا شد. سپس با استفاده از قیچی، یک برش طولی در پوست سر موش ایجاد شد. سپس جمجمه از شکاف نخاعی برش داده شد و کل مغز استخراج شد. مغز موش‌ها به‌صورت جداگانه روی کاغذ صافی و سپس روی شیشه ساعت قرار داده شد. هر شیشه ساعت روی یخ قرار داده شده و محل شیار بین ۲ نیمکره با استفاده از تیغ جراحی برش داده شد. هیپوکامپ نیمکره راست، جدا شد و به میکروتیوب‌هایی که از قبل درون یخ قرار گرفته بودند منتقل شد. نمونه‌ها فوراً به تانک نیتروژن مایع انتقال داده شدند. ناحیه هیپوکامپ نیمکره چپ نیز به همین روش جدا شد. نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت از نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- منتقل شدند.

استخراج پروتئین و وسترن بلات

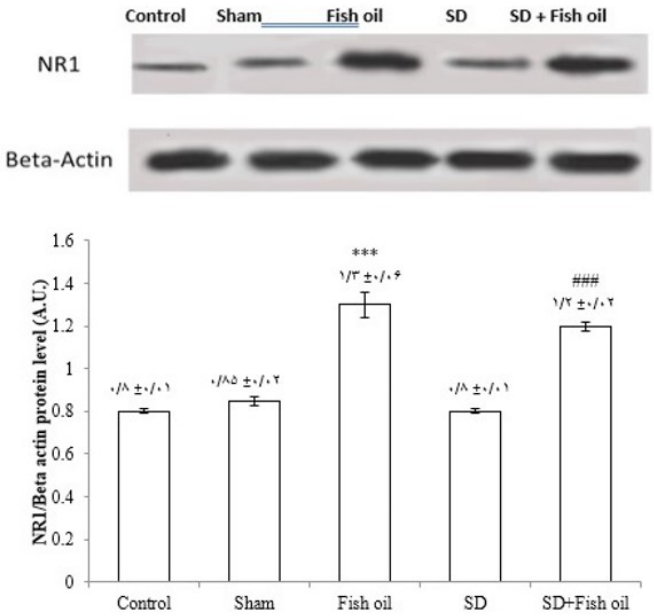
ابتدا درون ویال‌های مخصوص به اندازه ۴ برابر وزن نمونه‌های بافتی موجود بافر لیزکننده (جدول شماره ۲) ریخته شد. ویال‌های حاوی نمونه بافتی و بافر لیزکننده در هموژنایزر قرار داده شدند و با دور ۳۰۰۰ (دور در دقیقه) به مدت ۱ دقیقه هموژن شدند. بافت هموژن‌شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۳۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. مایع شفاف رویی حاوی پروتئین‌های جداشده بود و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- نگهداری شد. با استفاده از دستگاه پیکودراپ غلظت پروتئین موجود در هر نمونه ۶۰ میکروگرم تعیین شد. در ادامه از تکنیک وسترن بلات برای شناسایی کیفی و کمی پروتئین‌های NR1, NR2 در محلول پروتئینی جداشده از بافت مغزی استفاده شد. از پروتئین بتا-اکتین[7] به‌عنوان کنترل داخلی در تکنیک وسترن بلات استفاده شد. به‌طور خلاصه، محلول دارای نمونه‌های پروتئینی با روش SDS-PAGE الکتروفورز شد. سپس برای انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشا، از روش ساندویچ استفاده شد. در این روش کاغذ واتمن، غشای نیتروسلولزی و ژل به‌دست‌آمده

7. β-actin

جدول ۲. ترکیبات تشکیل‌دهنده بافر لیزکننده و مقادیر آن‌ها

مقدار	نام ماده
۵۰۰ میکرولیتر	Tris-HCl (pH 8)
۲۵ میلی‌گرم	Sodium deoxycolate
۸۰ میلی‌گرم	NaCl
۱۰ میلی‌گرم	SDS
۲ میلی‌گرم	EDTA
۱ قرص	Protease inhibitor
۱۰ میکرولیتر	Triton X-100

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم



تصویر ۱. میزان بیان نسبی ژن NR1 در سطح پروتئین در ناحیه هیپوکمپ. نماد * و ### به ترتیب نشان‌دهنده اختلافات معنی‌دار نسبت به گروه کنترل و محرومیت از خواب است (P<۰/۰۵)

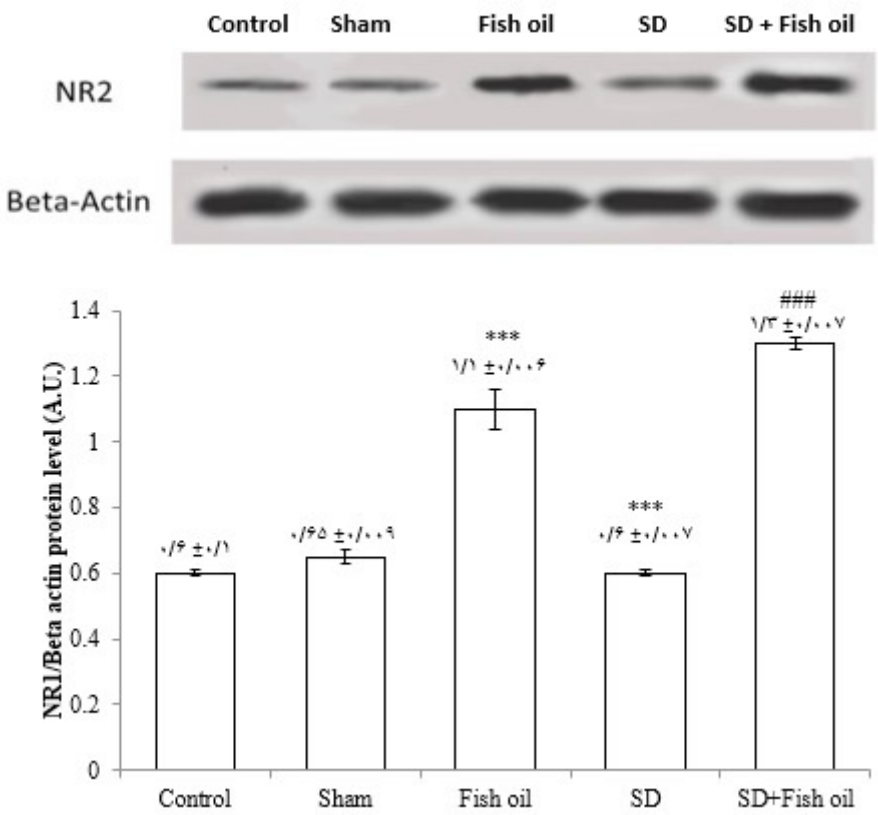
از الکتروفوری در تانک انتقال دارای بافر انتقال، قرار داده شد. برای بلوکه کردن از ۵ میلی‌لیتر محلول آلبومین سرم گاوی[8] (۳ درصد) و برای شست‌وشو از محلول بافر تریس نمکی دارای توین[9] استفاده شد. سپس غشا به مدت ۱ ساعت با ۲ میلی‌لیتر آنتی‌بادی اولیه پروتئین NR1 و NR2 (Abcam, mouse anti NR1 and NR2) رقیق‌شده در آلبومین سرم گاوی (۳ درصد) به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ قرار گرفت. سپس، غشا به مدت ۳۰ دقیقه در محلول آنتی‌بادی ثانویه بیوتینه (ABC staining kits) با غلظت ۱ به ۱۰۰۰ در PBS/BSA انکوبه شد. سپس فیلتر ۳۰ دقیقه در محلول ABC-AP reagent قرار داده شد. در انتها، محلول سوبسترای Vector Blue-alkaline phosphatase روی فیلتر ریخته شد. پس از ظهور باندهای پروتئینی آبی‌رنگ، فیلتر شست‌وشو و خشک شد. آنالیز و دانسیتومتری عکس‌های وسترن بلات و باندهای پروتئینی با استفاده از برنامه کامپیوتری Im-ageJ انجام شد. اختلافات بین سطوح پروتئین‌های موردنظر در نمونه‌ها براساس آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (آنووا) و آزمون آماری تی مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. معنی‌دار بودن اختلافات در سطوح P<۰/۰۵، P<۰/۰۱، P<۰/۰۰۱ بررسی شد.

یافته‌ها

میزان بیان نسبی پروتئین NR1 در ناحیه هیپوکمپ گروه‌های موردبررسی در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. باتوجه‌به این تصویر اختلاف معنی‌داری بین گروه شم و کنترل وجود ندارد (P< ۰/۰۵). بنابراین قرارگیری در دستگاه بی‌خوابی تأثیری در میزان بیان پروتئین NR1 ندارد. بااین‌حال مصرف روغن ماهی موجب افزایش ۶۲/۸ درصدی بیان پروتئین NR1 نسبت به گروه کنترل شده است (P<۰/۰۵). میزان بیان این پروتئین در گروه بی‌خوابی اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ندارد، اما میزان بیان پروتئین NR1 در ناحیه هیپوکمپ گروه بی‌خوابی تیمارشده با روغن ماهی نسبت به گروه بی‌خوابی افزایش ۵۰ درصدی داشته است (P<۰/۰۵).

نتایج بررسی میزان بیان نسبی پروتئین NR2 در ناحیه هیپوکامپ گروه‌ها نشان می‌دهد (تصویر شماره ۲) اختلاف معنی‌داری بین گروه شم و کنترل وجود ندارد (P<۰/۰۵). بنابراین قرارگیری در دستگاه بی‌خوابی تأثیری در میزان بیان پروتئین NR2 ندارد. این در حالی است که تیمار با روغن ماهی موجب افزایش ۸۳/۳ درصدی بیان پروتئین NR2 نسبت به گروه کنترل شده است (P<۰/۰۵). علاوه‌براین سطح پروتئین NR2 در گروه بی‌خوابی اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ندارد، اما میزان این پروتئین در ناحیه هیپوکامپ گروه بی‌خوابی تیمارشده با روغن ماهی نسبت به گروه بی‌خوابی افزایش ۱۱۶/۷ درصدی داشته است (P<۰/۰۵).

8. Bovine Serum Albumin (BSA)
9. Tween



تصویر ۲. میزان بیان نسبی ژن NR2 در سطح پروتئین در ناحیه هیپوکامپ. نماد * و ### به ترتیب نشان‌دهنده اختلافات معنی‌دار نسبت به گروه کنترل و محرومیت از خواب است (P<۰/۰۵)

بحث

اختلالات خواب بر جنبه‌های مختلف زندگی انسان اثر گذاشته و تغییراتی را در عملکرد فیزیولوژیکی آن ایجاد می‌کند [۱۸]. عواقب کم‌خوابی بسیار زیاد است. ایجاد خطرات متعدد سلامتی مرتبط با محرومیت از خواب به کاهش کیفیت زندگی و افزایش مرگ‌ومیر منجر می‌شود [۱۹]. علاوه‌براین، خواب منقطع و یا محرومیت از آن در دوره زمانی طولانی می‌تواند با اختلال در حافظه وابسته به هیپوکمپ و حافظه عاطفی، باعث افزایش سطح اضطراب شود و تغییرات خلق‌وخو و اختلال ذهنی و عملکردهای شناختی و حرکتی ایجاد کند [۸، ۹، ۱۸]. بر همین اساس هیپوکمپ به‌شدت به اثرات محرومیت از خواب حساس است [۱۰].

براساس نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر اختلافی در سطح پروتئین‌های NR1 و NR2 در ناحیه هیپوکمپ موش‌های گروه شم نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که قرارگیری در دستگاه اعمال بی‌خوابی در حالت خاموش تأثیری در بیان این پروتئین‌ها در ناحیه هیپوکمپ ندارد. بنابراین هرگونه اختلاف مشاهده‌شده در گروه‌های محرومیت از خواب صرفاً به دلیل استرس محرومیت از خواب است. بررسی میزان بیان این ۲ پروتئین در گروه تیمارشده با روغن ماهی نیز نشان داد میزان بیان پروتئین‌های NR1 و NR2 در ناحیه هیپوکمپ موش‌های این گروه به ترتیب ۶۲/۸ و ۸۳/۳ درصد افزایش داشته است. بنابراین روغن ماهی می‌تواند موجب القای بیان پروتئین‌های NR1 و NR2 در ناحیه هیپوکمپ موش‌های تیمارشده شود. از طرفی میزان بیان این پروتئین‌ها در گروه بی‌خوابی اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نداشته است. بنابراین، اثرات رفتاری و شناختی و حافظه ناشی از بی‌خوابی به‌واسطه مکانیسم‌های مستقل از تأثیر بر بیان پروتئین‌های NR1 و NR2 ایجاد می‌شود. درعین‌حال، محرومیت از خواب[۱۰] می‌تواند ازطریق تغییر در سطح بیان یا ترکیب زیرواحدی به‌ویژه NR2A، NR1 و NR2B گیرنده‌های ان ـ متیل ـ دی ـ آسپارتیک اسید را تحت تأثیر قرار دهد [۲۰]. نتایج مطالعه دیگر نشان می‌دهد در هیپوکمپ موش، ۴ ساعت محرومیت از خواب موجب افزایش نسبت NR2A / NR2B و همچنین کل NR2A می‌شود، در حالی که ۵ ساعت محرومیت از خواب این تغییرات را القا نمی‌کند. از طرف دیگر، محرومیت از خواب طولانی‌مدت (۷۲ ساعت)، باعث کاهش بیان

10. Sleep Deprivation (SD)

سطح زیرواحدهای NR1 و NR2A گیرنده‌های ان ـ متیل ـ دی ـ آسپارتیک اسید می‌شود. محرومیت از خواب موجب کاهش بیان NR2B در هیپوکمپ نیز می‌شود [۲۱]. نتایج مطالعه‌ای که توسط کریستوفیکووا و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد نشان داد تغییرات سن و محرومیت از خواب در میزان گیرنده‌های ان ـ متیل ـ دی ـ آسپارتیک اسید و سیگنال‌دهی اکسید نیتریک[۱۱] می‌تواند در کاهش شناختی در افراد مسن و همچنین در پاتوبیولوژی محرومیت حاد از خواب[۱۲] و روند تخریب عصبی نقش داشته باشد [۲۲]. در مطالعه‌ای که توسط مک‌درموت و همکاران انجام شد تأثیر محرومیت از خواب بر نواحی‌ای از هیپوکامپ ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد پس از ۷۲ ساعت محرومیت از خواب، نسبت ان، متیل، دی، آسپارتیک اسید/آلفا، آمینو، ۳ هیدروکسی، ۵، متیل و ۴ ایزوکسازول‌پروپیونیک‌اسید در سلول‌های هرمی CA1 کاهش می‌یابد. این اختلال مختص محرومیت از خواب بود، زیرا موش‌هایی که روی یک سکوی بزرگ یکنواخت قرار می‌گرفتند و می‌خوابیدند دارای یک نسبت طبیعی ان، متیل،دی، آسپارتیک اسید/آلفا، آمینو، ۳ هیدروکسی، ۵ متیل و ۴ ایزوکسازول‌پروپیونیک‌اسید بودند [۲۳]. بنابراین مهم‌ترین دلیل اختلاف موجود در نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند در مدت‌زمان اعمال بی‌خوابی در گروه موش‌های موردمطالعه باشد.

نتایج مطالعه دیگری که توسط چن و همکاران درزمینه تأثیر محرومیت از خواب بر عملکرد هیپوکامپ انجام شد نشان داد ۲۴ ساعت محرومیت از خواب در موش‌ها به اختلال وابسته به هیپوکامپ در حافظه متنی و تقویت طولانی‌مدت و به‌طور غیرمنتظره کاهش در بیان زیرواحد NR1 گیرنده ان ـ متیل ـ دی ـ آسپارتیک اسید(NMDAR) و جریان‌های پس‌سیناپسی تحریکی NMDAR منجر می‌شود [۲۴]. نتایج مطالعه دیگر نشان می‌دهد که محرومیت از خواب موجب تغییر در ترکیب مولکولی گیرنده‌های ان ـ متیل ـ دی ـ آسپارتیک اسید سیناپسی فعال و افزایش نسبت NR2A / NR2B می‌شود. این تغییر بعد از رفع محرومیت از خواب بهبود می‌یابد [۲۵]. این در حالی است که در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری در سطح پروتئین NR1 موش‌های تحت بی‌خوابی و گروه کنترل مشاهده نشد. از طرفی در مطالعه حاضر میزان بیان پروتئین‌های NR1 و NR2 در ناحیه هیپوکامپ گروه بی‌خوابی تیمارشده با روغن ماهی نسبت به گروه بی‌خوابی به ترتیب ۵۰ و ۱۱۶/۷ درصد افزایش داشته است. با وجود افزایش بسیار قابل‌توجه در سطح این پروتئین‌ها به دنبال تیمار با روغن ماهی، باتوجه‌به اینکه سطح این پروتئین‌ها در گروه بی‌خوابی اختلافی با گروه کنترل ندارد، نمی‌توان گفت روغن ماهی در بهبود اثرات ناشی از بی‌خوابی در ارتباط با پروتئین‌های NR1 و NR2 مؤثر بوده است.

نتایج مطالعات دیگر نشان داده است که امگا-۳ عملکردهای شناختی را بهبود بخشیده و نوروپلاستی و محافظت در برابر ضایعات عصبی را تقویت می‌کند. تزریق داخل وریدی امگا-۳ حافظه وابسته به شنوایی یا شنوایی را بهبود می‌بخشد و اثرات ضداضطرابی، ضدافسردگی و ضدحساسیت، ۲۴ ساعت بعد از محرومیت از خواب حرکت سریع چشم[۱۳] را در موش‌ها القا می‌کند. تحقیقات دیگر گزارش کرده است که مکمل DHA مادران، از فرزندان موش در مقابل اختلال در یادگیری و حافظه به دنبال قرار گرفتن در معرض اسید والپروئیک اسید، قبل از تولد، محافظت می‌کند. همچنین، امگا-۳ سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز را افزایش می‌دهد که نقش مهمی در بقای عصبی و نوروپلاستیسیته در هیپوکامپ دارد [۲۶]. در تحقیقی که توسط الزوبی و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد، اثر محافظتی احتمالی اسیدهای چرب امگا-۳ بر اختلال حافظه ناشی از کم‌خوابی مزمن در موش صحرایی بررسی شد. براساس نتایج کم‌خوابی مزمن، حافظه کوتاه‌مدت و بلندمدت را مختل می‌کند، اما تجویز مزمن اسیدهای چرب امگا-۳ از این اثرات جلوگیری می‌کند. علاوه‌براین، اسیدهای چرب امگا-۳ از کاهش گلوتاتیون پراکسیداز[۱۴]، کاتالاز و نسبت GSH/GSSG هیپوکامپ جلوگیری می‌کند و افزایش سطح GSSG را که با مدل محرومیت از خواب مختل شده بود، به سطح طبیعی می‌رساند [۲۷]. درنتیجه، اثر محافظتی تجویز اسیدهای چرب امگا-۳ در برابر اختلال مزمن حافظه ناشی از محرومیت از خواب احتمالاً ازطریق بهبود اثرات آنتی‌اکسیدانی هیپوکامپ است.

نتیجه‌گیری

باتوجه‌به افزایش قابل‌توجه در سطح پروتئین‌های NR1 و NR2 می‌توان گفت استفاده از روغن ماهی می‌تواند در کنترل و بهبود اثرات مربوط به استرس‌هایی که موجب کاهش بیان این پروتئین‌ها در سایر نواحی مغز می‌شوند نقش محافظتی و همچنین درمانی داشته باشد

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تحقیق حاضر برگرفته از پایان‌نامه شیما پیله چایی در مقطع کارشناسی ارشد رشته ژنتیک در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین (پیشوا) است و با رعایت موازین اخلاق در پژوهش‌های زیستی انجام شده است.

11. Nitric Oxide Signalling (NOS)
12. Acute Sleep Deprivation (ASD)
13. Rapid eye movement (REM)
14. Glutathione Peroxidase

حامی مالی

این تحقیق هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش تمام بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت یکسان داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا به سبب حمایت‌هایشان از این مطالعه اعلام دارند.

References

[1] Walker MP, Stickgold R. Sleep-dependent learning and memory consolidation. Neuron. 2004; 44(1):121-33. [DOI:10.1016/j.neuron.2004.08.031] [PMID]

[2] Luyster FS, Strollo PJ Jr, Zee PC, Walsh JK; Boards of Directors of the American Academy of Sleep Medicine and the Sleep Research Society. Sleep: A health imperative. Sleep. 2012; 35(6):727-34. [DOI:10.5665/sleep.1846] [PMID] [PMCID]

[3] Van Dongen HP, Rogers NL, Dinges DF. Sleep debt: Theoretical and empirical issues. Sleep Biol Rhythms. 2003; 1:5-13. [DOI:10.1046/j.1446-9235.2003.00006.x]

[4] Moudi S, Saleh Ahangar M, Hosseini S, Khafri S. [Prevalence of sleep disorders among medical students of Babol University of Medical Sciences, Iran, 2013 (Persian)]. J Babol Univ Med Sci. 2014; 16(8):69-74. [DOI:10.18869/acadpub.jbums.16.8.69]

[5] Maquet P. The role of sleep in learning and memory. Science. 2001; 294(5544):1048-52. [DOI:10.1126/science.1062856] [PMID]

[6] Hakimeh S, Vahid S. Effects of exercise and/or sleep deprivation on anxiety-Like behavior and body weight of female rats. Asian J Psychiatr. 2017; 28:26-7. [DOI:10.1016/j.ajp.2017.02.028] [PMID]

[7] Kolla BP, He JP, Mansukhani MP, Frye MA, Merikangas K. Excessive sleepiness and associated symptoms in the U.S. adult population: Prevalence, correlates, and comorbidity. Sleep Health. 2020; 6(1):79-87. [DOI:10.1016/j.sleh.2019.09.004] [PMID] [PMCID]

[8] Fernandes-Santos L, Patti CL, Zanin KA, Fernandes HA, Tufik S, Andersen ML, et al. Sleep deprivation impairs emotional memory retrieval in mice: Influence of sex. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2012; 38(2):216-22. [DOI:10.1016/j.pnpbp.2012.03.014] [PMID]

[9] Vecsey CG, Baillie GS, Jaganath D, Havekes R, Daniels A, Wimmer M, et al. Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus. Nature. 2009; 461(7267):1122-5. [DOI:10.1038/nature08488] [PMID] [PMCID]

[10] Havekes R, Abel T. The tired hippocampus: The molecular impact of sleep deprivation on hippocampal function. Curr Opin Neurobiol. 2017; 44:13-9. [DOI:10.1016/j.conb.2017.02.005] [PMID] [PMCID]

[11] Saadati H, Esmaeili-Mahani S, Esmaeilpour K, Nazeri M, Mazhari S, Sheibani V. Exercise improves learning and memory impairments in sleep deprived female rats. Physiol Behav. 2015; 138:285-91. [DOI:10.1016/j.physbeh.2014.10.006] [PMID]

[12] Alkadhi KA, Alhaider IA. Caffeine and REM sleep deprivation: Effect on basal levels of signaling molecules in area CA1. Mol Cell Neurosci. 2016; 71:125-31. [DOI:10.1016/j.mcn.2015.12.015] [PMID]

[13] Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, González-Castañeda RE, Beas-Zarate C. [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits (Spanish)]. Neurologia. 2012; 27(5):301-10. [PMID]

[14] Holmes KD, Mattar PA, Marsh DR, Weaver LC, Dekaban GA. The N-methyl-D-aspartate receptor splice variant NR1-4 C-terminal domain. Deletion analysis and role in subcellular distribution. J Biol Chem. 2002; 277(2):1457-68. [DOI:10.1074/jbc.M107809200] [PMID]

[15] Erreger K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJ, Traynelis SF. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. J Physiol. 2005; 563(Pt 2):345-58. [DOI:10.1113/jphysiol.2004.080028] [PMID] [PMCID]

[16] Sau S, Paul BN, Mohanta KN, Mohanty SN. Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (Labeo rohita) fry. Aquaculture. 2004; 240(1-4):359-68. [DOI:10.1016/j.aquaculture.2004.02.008]

[17] Almaspour MB, Nasehi M, Khalifeh S, Zarrindast MR. The effect of fish oil on social interaction memory in total sleep-deprived rats with respect to the hippocampal level of stathmin, TFEB, synaptophysin and LAMP-1 proteins. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2020; 157:102097. [DOI:10.1016/j.plefa.2020.102097] [PMID]

[18] van Enkhuizen J, Acheson D, Risbrough V, Drummond S, Geyer MA, Young JW. Sleep deprivation impairs performance in the 5-choice continuous performance test: Similarities between humans and mice. Behav Brain Res. 2014; 261:40-8. [DOI:10.1016/j.bbr.2013.12.003] [PMID] [PMCID]

[19] Liew SC, Aung T. Sleep deprivation and its association with diseases- A review. Sleep Med. 2021; 77:192-204. [DOI:10.1016/j.sleep.2020.07.048] [PMID]

[20] Prince TM, Abel T. The impact of sleep loss on hippocampal function. Learn Mem. 2013; 20(10):558-69. [DOI:10.1101/lm.031674.113] [PMID] [PMCID]

[21] Xie X, Liu H, Zhang J, Chen W, Zhuang D, Duan S, et al. Association between genetic variations of NMDA receptor NR3 subfamily genes and heroin addiction in male Han Chinese. Neurosci Lett. 2016; 631:122-5. [DOI:10.1016/j.neulet.2016.08.025] [PMID]

[22] Kristofikova Z, Sirova J, Klaschka J, Ovsepian SV. Acute and chronic sleep deprivation-related changes in N-methyl-D-aspartate receptor-nitric oxide signalling in the rat cerebral cortex with reference to aging and brain lateralization. Int J Mol Sci. 2019; 20(13):3273. [DOI:10.3390/ijms20133273] [PMID] [PMCID]

[23] McDermott CM, Hardy MN, Bazan NG, Magee JC. Sleep deprivation-induced alterations in excitatory synaptic transmission in the CA1 region of the rat hippocampus. J Physiol. 2006; 570(Pt 3):553-65. [DOI:10.1113/jphysiol.2005.093781] [PMID] [PMCID]

[24] Chen C, Hardy M, Zhang J, LaHoste GJ, Bazan NG. Altered NMDA receptor trafficking contributes to sleep deprivation-induced hippocampal synaptic and cognitive impairments. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 340(2):435-40. [DOI:10.1016/j.bbrc.2005.12.021] [PMID]

[25] Kopp C, Longordo F, Nicholson JR, Lüthi A. Insufficient sleep reversibly alters bidirectional synaptic plasticity and NMDA receptor function. J Neurosci. 2006; 26(48):12456-65. [DOI:10.1523/JNEUROSCI.2702-06.2006] [PMID] [PMCID]

[26] de Mattos AB, Pinto MJ, Oliveira C, Biz C, Ribeiro EB, do Nascimento CM, et al. Dietary fish oil did not prevent sleep deprived rats from a reduction in adipose tissue adiponectin gene expression. Lipids Health Dis. 2008; 7:43. [DOI:10.1186/1476-511X-7-43] [PMID] [PMCID]

[27] Alzoubi KH, Mayyas F, Abu Zamzam HI. Omega-3 fatty acids protects against chronic sleep-deprivation induced memory impairment. Life Sci. 2019; 227:1-7. [DOI:10.1016/j.lfs.2019.04.028] [PMID]