بررسی اثر روی خارج سلولی ترانس وکانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ بریادگیری شرطی احترازی غیرفعال در موش های صحرایی نر نژاد ویستار

حمید رضا مهاجرانی[1]، دکتر محمد رضا پالیزوان [2*]، دکتر شهربانو عریان[3]، دکتر وهاب باباپور[4]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی فیزیولوژی واحد علوم وتحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی
۲- استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اراک
۳- استاد گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران
۴- استاد گروه فیزیولوژی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت ۸۵/۱۲/۱۶ ، تاریخ پذیرش ۸۶/۱۰/۵

چکیده

مقدمه: در این مطالعه اثر روی خارج سلولی و کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر جنبه‌های مختلف یادگیری و حافظه شرطی احترازی غیر فعال مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: تحقیق حاضر به صورت تجربی انجام شد و اثر هریک از مسدود کننده‌های کانال‌های کلسیمی و جمع‌آوری کننده روی خارج سلولی به صورت جداگانه و هم‌زمان و در دوزهای مختلف بر یادگیری احترازی غیرفعال با استفاده از دستگاه شاتل باکس و تزریق مرکزی (درون بطنی) این داروها مورد بررسی قرار گرفت. حیوانات قبل و بعد از آموزش و بعد از تست، تحت این تزریق قرار گرفتند. تعداد نمونه‌ها در تمام گروه‌های آموزشی ۸ سر مجموعاً ۱۲۰ سر بود. اطلاعات به دست آمده با استفاده از ازمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: تزریق ماده جمع‌آوری کننده روی (CaEDTA) با دوز متعارف (۱۰۰ میلی مولار) نشان‌گر عدم تأثیر جمع‌آوری روی خارج سلولی ترانس بر اکتساب، تثبیت و به خاطر آوری یادگیری احترازی غیرفعال می‌باشد. نتایج تزریق وراپامیل به عنوان مسدد کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ با دوزهای۱۰۰و۱۵۰ میکروگرم بیان‌گر تأثیر کاهشی آن بر اکتساب و تثبیت یادگیری احترازی غیرفعال می‌باشد. اعمال دوزهای فوق هیچ تأثیری بر به خاطرآوری یادگیری احترازی غیرفعال نداشت. در ادامه اثر هم‌زمان CaEDTA ۱۰۰ میلی مولار از یک طرف و وراپامیل با دور ۱۰۰ میکروگرم نیز از طرف دیگر بر اکتساب و تثبیت یادگیری احترازی غیرفعال نشان داد که تنها تثبیت یادگیری احترازی غیرفعال دچار افت گردیده است.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد مکانیزم‌های مشترکی برای برهم کنش یون‌های کلسیم و روی و ارتباط آنها با اکتساب و تثبیت یادگیری احترازی غیرفعال مورد انتظار می‌باشد و می‌توان احتمال داد که مکانیزم به خاطرآوری حداقل از نظر تعامل یون‌های کلسیم و روی (به صورت وابسته به ولتاژ) متفاوت از اکتساب و تثبیت باشد.

واژگان کلیدی: یادگیری احترازی غیرفعال، روی خارج سلولی ترانس، کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ

***نویسنده مسئول:** اراک، سردشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی
E-mail: palizvan@yahoo.com

مقدمه

حضور نورون‌های گلوتاماترژیک شامل روی که آن را در وزیکل‌های پیش سیناپسی جمع‌آوری کرده و سپس از طریق روشی وابسته به کلسیم و ایمپالس رها می‌کنند، در مغز و به ویژه در تلنسفالون نشان داده شده است. مدارهای عصبی نورون‌های گلوتاماترژیک حاوی روی به عنوان مشارکت کننده در عمل حافظه اپیزودی[1] در نظر گرفته می‌شوند و برای رفتار، بیان انگیزش و اعمال شناختی مهم هستند. روی پس از جذب توسط دستگاه گوارش می‌تواند از سد خونی – مغزی یا مایع مغزی نخاعی عبور کند و نقش خود را به عنوان سیگنال ایفا نماید. سه رده از سیگنال‌های روی در نظر گرفته شده‌اند: روی داخل سلولی یاINT ، روی آزاد شونده از نورون پیش سیناپسی یا Syn، روی موجود در مایع خارج سلولی یا Trans، که آخری از طریق کانال‌های کلسیمی وارد یاخته پس سیناپسی می‌شود که یکی از این کانال‌های کلسیمی از نوع وابسته به ولتاژ هستند. به نظر می‌رسد با توجه به اهمیت کلسیم در بروز رفتار یادگیری احترازی، روی و کلسیم نقش‌های مشترکی را در این رابطه ایفا نمایند(۱).

مطالعات مربوط به مدل یادگیری احترازی غیرفعال در مورد نقش روی در یادگیری احترازی نتایج متفاوتی داشته است. اثر چلات کردن روی خارج سلولی آمیگدال توسط CaEDTA، بر رهایش گلوتامات از پایانه‌های عصبی با استفاده از روش میکرو دیالیز بررسی شد و گلوتامات حاصل کاهش نشان داد. چهل دقیقه قبل از تست رفتاری احترازی غیرفعال، مشروب سازی[2] آمیگدال با CaEDTA آغاز گردید. این رفتار در طی مشروب سازی دچار افت شد. این نتایج نشان‌گر دخالت روی خارج سلولی آمیگدال در یادگیری احترازی غیرفعال می‌باشد(۲). از طرفی در موش سوری که ژن Z_nT_3 آن غیر فعال شده بود، تست Open field و Elevated plus Maze نتایج مشابهی را با موش‌های غیر دستکاری شده نشان داد. تست‌های یادگیری شرطی احترازی غیرفعال، شامل ماز آبی موریس، و نیز ماز بازویی شعاعی در آنها طبیعی بوده و نتیجه‌گیری شد که روی وزیکلی سیناپسی ضرورتی برای موش سوری جهت انجام موفقیت آمیز این تست‌ها ندارد، علی رغم این که نورون‌های غنی از روی در مناطقی از CNS هستند، بنابراین به نظر می‌رسد که روی تنها اثر تعدیل کنندگی عصبی داشته که به تست‌های فوق مرتبط نبوده و یا این که در موش‌های سوری به سادگی غیاب روی وزیکلی سیناپسی جبران می‌شود(۳). اریکسون و همکاران نشان دادند که از کار انداختن ژن متالوتیونئین[3] به عنوان پروتئینی که روی را به صورت داخل سلولی به خود متصل می‌کند، در ماز آبی موریس هیچ گونه اختلالی در یادگیری فضایی موش صحرایی ایجاد نمی‌کند(۴). تاکدا و همکاران در یک مدل کمبود روی در رژیم غذایی نشان دادند که پاسخ یادگیری احترازی فعال کاهش یافته و هم‌چنین LTP[4] القا شده در مقایسه با گروه کنترل صفر بود(۵).

تحقیق در مورد سیگنال‌های یونی روی خارج سلولی در مغز به طور نسبی از ابتدا با استفاده از عوامل چلات کننده خارج سلولی(به غشا) و داخل سلولی (دارای قابلیت نفوذ به داخل غشای پلاسمایی) صورت گرفته است. از بین چلاتورهای کلاسیک روی، CaEDTA هیچ گونه اثر سمی بر روی سلول‌های عصبی ندارد، فرد ریکسون و همکاران با تزریق CaEDTA به صورت icv و به صورت in vivo نشان داد که میزان روی داخل سلولی هم‌چون روی خارج سلولی(وزیکولی) کاهش می‌یابد. این محققین پیشنهاد دادند که حجم خروجی یون روی و نیز جذب مجدد آن بیشتر از آنچه است که قبلا تصور می‌شد و در عین حال این احتمال که CaEDTA می‌تواند داخل سلول‌ها و وزیکول‌ها شود، نیز مطرح گردید. ضمن این که کاهش یون روی توسط CaEDTA موجود در مایع خارج سلولی صرف نظر از منشاء آن (آزاد یا قابل چلات شدن) صورت

1 - Episodic memory.
2 - Perfusion.
3- Metallothionein.
4 - Long- term potentiation.

می‌گیرد و می‌توان نتیجه گرفت که حرکت روی از عرض غشای سلول مفهوم چلاتورهای داخل و خارج سلولی را نسبی می‌کند(۶).

از آنجا که شکل پذیری ارتباطی براساس مدلی که هب[1] ارائه کرد یک مکانیسم کلیدی را در یادگیری ارتباطی ایفا می‌کند(۷)، براین اساس فعالیت هم زمان یافته‌های پیش و پس سیناپسی باعث تداوم تغییر در کارآیی سیناپسی بین دو سلول می‌گردد که از این طریق باعث ایجاد ارتباط بین آنها می‌گردد.

در برخی وضعیت‌ها ورود کلسیم از طریق گیرنده‌های NMDA[2] و در مواردی توسط کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L کافیست تا بتواند آغازگر آبشار متوالی وقایعی باشد که باعث شکل‌پذیری سیناپسی براساس مدل هب شود. از طرف دیگر مسیرهای پیام رسانی دیگر پس از افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی راه اندازی می‌شوند. نقش شکل پذیری سیناپسی وابسته به کانال‌های کلسیمی نوع L (که مستقل از گیرنده NMDA است) در یادگیری به طور اعجاب آوری تا به حال مورد غفلت قرار گرفته است و محل بحث و مجادله می‌باشد(۱۱-۸).

آزمایشات رفتاری که مسدود کننده‌های کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L را استفاده کرده‌اند به دلایل فوق نتایج فوق العاده متناقضی را به دست آورده‌اند. در حقیقت تعدادی از محققان حتی پیشنهاد کرده‌اند که انسداد فارماکولوژیکی کانال‌های کلسیم وابسته به ولتاژ در برخی اوقات می‌تواند یادگیری را افزایش دهد نه این که مختل نماید(۹). نفوذ پذیری بالای کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ به پیام رسانی روی، در نورون‌ها قبلا نشان داده شده است(۱۰).

هدف تحقیق حاضر بررسی اثر هریک از مسدود کننده‌های کانال‌های کلسیمی و جمع‌آوری کننده روی خارج سلولی به صورت جداگانه و هم‌زمان و در دوزهای مختلف بر یادگیری احترازی غیرفعال بود.

روش کار

تحقیق حاضر به صورت تجربی انجام شد و اثر هر یک از مسدود کننده‌های کانال‌های کلسیمی و جمع‌آوری کننده روی خارج سلولی به صورت جداگانه و هم‌زمان و در دوزهای مختلف بر یادگیری احترازی غیرفعال با استفاده از دستگاه شاتل باکس و تزریق مرکزی (درون بطنی) این داروها با دستگاه استرئوتاکس(ساخت ناریشیگه ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مجموعاً ۱۲۰ سر موش صحرایی(با در نظر گرفتن ۱۵ گروه آزمایشی و حجم نمونه ۸ سر در هر گروه) مورد آزمون قرار گرفتند. معیار ورود موش‌ها به مطالعه، نر بودن، وزن ۱۵۰ تا ۲۵۰گرم، و نژاد ویستار بود. موش‌هایی که دارای بیماری بوده و مرحله آشنایی را با موفقیت طی نکرده بودنداز مطالعه خارج می‌شدند. موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن بین ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که بعد از جراحی به صورت انفرادی نگهداری می‌شدند و در طی کلیه مراحل آزمایش آب و غذا به مقدار کافی در اختیار آنها قرار داده می‌شد و میزان روشنایی به صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در نظر گرفته شده بود در پنج گروه آزمایشی اصلی و هر گروه اصلی دارای سه گروه فرعی تقسیم‌بندی شدند. در تمام گروه‌ها تزریق به صورت ICVبوده وحجم تزریق در تمام گروه‌ها ۵ میکرو لیتر بود. هم‌چنین سرعت تزریق ۱ میکرو لیتر در دقیقه در نظر گرفته شد.گروه‌های اصلی شامل:۱ -کنترل(فقط تزریق ICV سالین)۲-گروه مربوط به تزریق جمع‌آوری کننده روی خارج سلولی (CaEDTA۰ ۱۰میلی مولار) ۳- وراپامیل ۱۰۰ میلی مولار۴- وراپامیل ۱۵۰ میلی مولار ۵- CaEDTA+ وراپامیل و در هرگروه اصلی اثرات مواد فوق در سه گروه فرعی بر۱- اکتساب ۲-تثبیت و۳- به خاطر آوری یادگیری شرطی احترازی غیر فعال مورد آزمون قرار گرفت.

1 - Hebbian model.
2- N- Metyl – D-Aspartic acid.

برای تزریق وجراحی برطبق واتسون و پاکسینوس (۱۹۸۶) یک سوراخ به قطر یک میلی متر با مختصات قدامی – خلفی: ۰/۴ میلی متر و طرفی: ۱/۲ میلی متر نسبت به برگما جهت تزریق درون بطنی (بطن راست) ایجاد می‌شد. سپس کانول راهنما (برای کانول راهنما از سرسوزن ۲۳ استفاده می‌شد) به اندازه ۷ میلی متر از پایه سرسوزن را نگه داشته و بقیه آن قطع می‌شد و بعد با سوهان ظریف اطراف آن صاف می‌گردید تا هنگام فرورفتن در مغز از ایجاد آسیب جدی جلوگیری شود. کانول تزریق نیز از سوزن ۲۷ ساخته می‌شد. با این وضعیت کانول بالای بطن راست قرار می گرفت. کانول با استفاده از دو پیچ عینک و آکریل دندان پزشکی به استخوان جمجمه ثابت می‌شد. برای جلوگیری از بسته شدن مجرای کانول توسط خون یک سیم فلزی آغشته به روغن معدنی داخل مجرای کانول قرار داده می‌شد. بعد از پایان جراحی حداقل ۷ روز به موش‌ها استراحت داده می‌شد تا بهبود یابند و استرس جراحی از بین برود و سپس آزمایش‌های مربوطه انجام می‌شد. تمامی آزمایش‌ها براساس راهنمای رعایت اخلاق پژوهش در کار کردن با حیوانات NIH[1] ، انجام شد.

حیوان با داروی کتامین هیدروکلراید مخلوط شده با زایلازین[2] به نسبت ۱۰ به یک با دوز مصرفی ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش می گردید. حیوان در دستگاه استریوتاکسی قرارداده می شد.

دستگاه PAL یک جعبه از جنس پلکسی گراس دو قسمتی است که یک بخش آن روشن و بخش دیگرش تاریک است. ابعاد دو قسمت با هم برابر است(۲۰× ۴۰ × ۲۰ سانتی متر) و با یک دریچه ۸×۸ سانتی متر به هم راه دارند. در کف هردو بخش میله‌هایی از جنس فلز ضد زنگ به فاصله یک سانتی‌متر از هم قرار دارند. یک لامپ ۱۰۰ واتی ۴۰ سانتی متری بالای قسمت روشن دستگاه قرار دارد. کف قسمت تاریک دستگاه به یک مدار الکتریکی وصل است که با روشن شدن کلیه مدار، جریان الکتریکی با مدت، شدت و فرکانس مشخصی از کف آن عبور می‌کند. دستگاه فوق توسط شرکت مهندسی نورسا ساخته شده است.

مرحله اول، سازش یافتن[3]: ابتدا موش‌های تمام گروه‌های آزمایشی به دستگاه عادت داده می‌شدند. ۶۰ ثانیه بعد از قرار دادن حیوان در قسمت روشن دستگاه در بین قسمت تاریک و روشن باز شده بلافاصله بعد از ورود حیوان به قسمت تاریک دربسته شده و حیوان از قسمت تاریک گرفته و به قفس بازگردانده می‌شد. این عمل ۳۰ دقیقه بعد تکرار می‌گردید.

مرحله دوم، آموزش یا اکتساب[4]: ۳۰ دقیقه از بار دوم سازش یافتن تا اکتساب PAL آموزش داده شد. بلافاصله بعد از ورود موش به قسمت تاریک، در بین قسمت روشن و تاریک بسته و شوک الکتریکی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت یک میلی آمپر به مدت ۳ ثانیه به حیوان اعمال می‌شد. بعد از ۵ ثانیه موش از قسمت تاریک گرفته شده و موقتا به قفس بازگردانده می‌شد. دو دقیقه بعد رفتار موش همانند قبل آزمایش شده و عدم ورود به قسمت تاریک در مدت ۳۰۰ ثانیه به عنوان اکتساب موفقیت آمیز PAL در نظر گرفته می‌شد. در غیر این صورت با ورود حیوان به قسمت تاریک برای بار دوم در بسته می‌شد و حیوان برای بار دوم همان شوک بالا را دریافت می‌کرد. این مرحله باید آن قدر تکرار شود تا عدم ورود به مدت ۳۰۰ ثانیه به دست آید(STL=300) [5].

مرحله سوم، امتحان[6]: یک روز بعد از آموزش موش در قسمت روشن قرار داده شده و ۶۰ ثانیه بعد در قسمت روشن و تاریک باز می‌شد. زمانی که طول می‌کشید تا حیوان وارد قسمت تاریک شود(STL) و مدت زمانی که آنجا باقی می‌ماند(TDC[7]) ، به مدت ۱۰ دقیقه یادداشت می‌گردید.

1 - National Institute of Health.
2- Xylazine.

3 - Familiarization.
4 - Training.
5- Step Through Latency.
6 - Test.
7 -Time in Dark Chamber.

در پایان آزمایش‌های رفتاری موش‌ها با دارو بیهوش می‌شدند و مخ از جمجمه آنها خارج و برای چندین روز در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده می‌شد. سپس برش ۲۰ میکرومتری از مغز تهیه و با استفاده از روش هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری برای تعیین محل قرار گرفتن کانول مورد بررسی قرار گرفتند نتایج به دست آمده از حیواناتی که محل قرار گرفتن کانول آنها درست نبود در تجزیه و تحلیل آماری استفاده نمی‌شد.

داده‌های حاصل از STL گروه‌های مختلف در خلال آزمایش به خاطرآوری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شد. داده‌های مربوط به STL قبل از اکتساب PAL بر زمان گذرانده شده در محفظه تاریک هنگام آزمایش به خاطرآوری و تعداد رفت و آمدهای موش در گروه‌های مختلف[1] بین دو محفظه تاریک و روشن براساس آنالیز واریانس یک طرفه معمولی تجزیه و تحلیل می‌شدند. تست Post hoc در تمام آزمایش‌ها باروش آزمون توکی انجام گردید و سطح معنی‌دار $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته می‌شد.

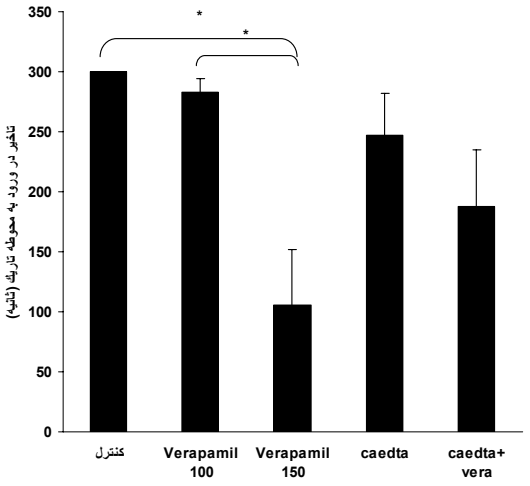
نتایج

۱- اکتساب: نتایج تزریق ماده جمع‌آوری کننده روی (CaEDTA) با دوز متعارف (۱۰۰ میلی مولار) نشان‌گر عدم تاثیر جمع‌آوری روی خارج سلولی ترانس بر اکتساب یادگیری احترازی غیرفعال می‌باشد زیرا اختلاف زمان احتراز ورود به بخش تاریک (STL) بین گروه شاهد(۰±۳۰۰) و تیمار (۳۴±۲۴۷) معنی‌دار نمی‌باشد.اثر تزریق درون بطنی وراپامیل (دوز ۱۰۰و۱۵۰ میکروگرم به ازای رت) بر زمان احتراز ورود به بخش تاریک (STL) در تست اکتساب تنها در دوز۱۵۰میکروگرم(۴۶±۱۰۵) دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد($p<۰/۰۵$). اثر جمع‌آوری روی خارج سلولی ترانس و انسداد کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر تست اکتساب یادگیری شرطی احترازی غیرفعال (۴۷±۱۸۷) دارای اختلاف آماری معنی‌دار با گروه شاهد(۰±۳۰۰) می‌باشد. تمامی نتایج فوق در نمودار ۱ خلاصه شده است.

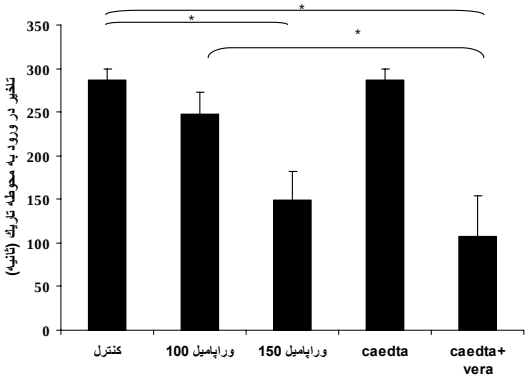
۲-تثبیت: نتایج تزریق ماده جمع‌آوری کننده روی (CaEDTA) با دوز متعارف (۱۰۰ میلی مولار) نشان‌گر عدم تأثیر جمع‌آوری روی خارج سلولی ترانس بر تثبیت یادگیری احترازی غیرفعال می‌باشد زیرا اختلاف زمان احتراز ورود به بخش تاریک (STL) بین گروه شاهد(۰±۳۰۰) و تیمار(۱۲±۲۸۷) معنی‌دار نمی‌باشد. اثر تزریق درون بطنی وراپامیل (دوز ۱۰۰و۱۵۰ میکروگرم به ازای رت) بر زمان احتراز ورود به بخش تاریک (STL) در تست تثبیت تنها در دوز۱۵۰میکروگرم(۳۴±۱۴۸) دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد($p<۰/۰۵$). اثر جمع‌آوری روی خارج سلولی ترانس و انسداد کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر تست تثبیت یادگیری شرطی احترازی غیر فعال (۴۷±۱۰۷) دارای اختلاف آماری معنی‌دار با گروه شاهد(۰±۳۰۰) می‌باشد($p<۰/۰۵$). تمامی نتایج فوق در نمودار ۲ خلاصه شده است.

۳-به خاطر آوری: نتایج تزریق ماده جمع‌آوری کننده روی (CaEDTA) با دوز متعارف (۱۰۰ میلی مولار) نشانگر عدم تأثیر جمع‌آوری روی خارج سلولی ترانس بر به خاطر آوری یادگیری احترازی غیرفعال می‌باشد زیرا اختلاف زمان احتراز ورود به بخش تاریک (STL) بین گروه شاهد(۰±۳۰۰) و تیمار(۱۳±۲۸۷) معنی‌دار نمی‌باشد. اثر تزریق درون بطنی وراپامیل (دوز ۱۰۰ و۱۵۰ میکروگرم به ازای رت) بر زمان احتراز ورود به بخش تاریک (STL) در تست به خاطر آوری(۲۹±۲۴۶ و۵۲ ±۲۰۲) در هیچ یک از دوزها دارای اختلاف آماری معنی‌دار با گروه شاهد(۳۰±۲۴۶) نیست. اثر جمع‌آوری روی خارج سلولی ترانس و انسداد کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر تست به خاطر آوری یادگیری شرطی احترازی غیر فعال(۵۴±۲۷۱) دارای اختلاف آماری معنی‌دار با گروه شاهد(۳۰±۲۴۶) نمی‌باشد. تمامی نتایج فوق در نمودار ۳ خلاصه شده است.

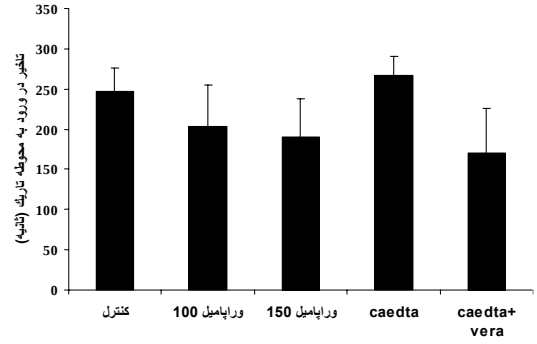
1- Crossing.



نمودار ۱. اثر تزریق درون بطنی وراپامیل وCaEDTA برتست اکتساب زمان احتراز ورود به بخش تاریک



نمودار۲. اثر تزریق درون بطنی وراپامیل وCaEDTA برتست تثبیت زمان احتراز ورود به بخش تاریک



نمودار ۳. اثر تزریق درون بطنی وراپامیل وCaEDTA بر تست به خاطرآوری زمان احتراز ورود به بخش تاریک

بحث

پیامدهای ناشی از تزریق مرکزی عامل چلات کننده روی(Ca-EDTA) از یک طرف و مسدودکننده کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ(وراپامیل) از طرف دیگر در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است.

هدف از تزریق مرکزی Ca-EDTA بررسی یادگیری شرطی احترازی غیر فعال در غیاب روی خارج سلولی ترانس بود. تزریق این ماده در دوزی که امکان چلات کردن تمامی روی خارج سلولی را داشته باشد نشان داد که روی خارج سلولی ترانس به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر مراحل مختلف یادگیری و حافظه ندارد (در این تحقیق اکتساب، تثبیت و به خاطرآوری مورد بررسی قرار گرفت).

در این رابطه یافته‌های متناقضی در مورد نقش روی گزارش شده است. از جمله نتایج موافق با یافته‌های مطالعه ما این بودکه در مطالعات ژنتیکی که ناقل روی حذف شده است تأثیری در یادگیری و حافظه مشاهده نگردیده است. هم‌چنین کول و همکاران نشان دادند که موش سوری فاقد ژن ترانسپورتر روی (ZnT3) که وزیکول‌های سیناپسی‌اش از روی تخلیه شده است، تفاوتی از نظر یادگیری و حافظه (با استفاده از مدل احترازی غیرفعال، ماز آبی موریس، شرطی شدن ترس، حافظه کاری و مرجع در فرم آبی و ماز بازویی شعایی) با موش‌های طبیعی نداشتند(۹).

اریکسون و همکاران نشان دادند که از کار انداختن ژن متالوتیونئین به عنوان پروتئینی که روی را به صورت داخل سلولی به خود متصل می‌کند، در ماز آبی موریس هیچ گونه اختلالی در یادگیری فضایی موش صحرایی ایجاد نمی‌کند(۴). یافته‌های ما با مطالعات ژنتیکی هم‌خوانی داشت وسایر مطالعات که مدلی از سوء تغذیه را باز سازی کرده‌اند بالطبع نقش خالص روی خارج سلولی را نتوانسته‌اند از روی داخل سلولی تفکیک کنند(۱۲). از جمله یافته‌هایی که با مطالعه ما هم‌خوانی نداشت تحقیقی بود که در آن موش‌های صحرایی بالغ ماده که در طی دوران

بارداری و شیردهی به مقدار کافی روی در رژیم غذایی خود دریافت نکرده‌اند، در مقایسه با رژیم دارای روی، دچار اختلال عملکرد در مازهای شعاعی ۱۷ بازویی(حافظه فضایی) شدند. البته اختلالی در حافظه مرجع بر خلاف حافظه کاری (کوتاه مدت) مشاهده نشد(۱۳). هم‌چنین تاکدا و همکاران در یک مدل کمبود روی در رژیم غذایی نشان دادند که پاسخ یادگیری احترازی فعال کاهش یافته و هم‌چنین LTP القا شده در مقایسه با گروه کنترل صفر بود(۵).

تزریق مرکزی وراپامیل با دوز ۱۰۰ میکروگرم تأثیری بر اکتساب و تثبیت یادگیری احترازی غیرفعال نداشت، در حالی که دوز ۱۵۰میکروگرم باعث کاهش معنی‌دار اکتساب در مقایسه با گروه شاهد گردید. اما در مورد تست به خاطر آوری، هیچ کدام از این دوزها باعث کاهش معنی‌دار یادگیری احترازی غیرفعال نشدند. تا به حال مطالعه مشابهی درزمینه تزریق مرکزی وراپامیل و اثر آن بر یادگیری وحافظه انجام نشده است. اما مطالعات مشابه اثرات متناقضی را در مورد اثر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر یادگیری احترازی نشان داده‌اند(۱۴).

نتایج ما نشان‌گر اثر کاهش دهندگی تثبیت یادگیری احترازی توسط مسدود کننده‌های کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ به همراه CaEDTA می‌باشد. زیرا STL در دوز ۱۰۰میکروگرم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت در حالی که این اختلالات برای گروهی که دوز ۱۵۰ میکروگرم وراپامیل را دریافت کرده بودند معنی‌دار بود.

از طرفی نشان داده شده است که غلظت کلسیم داخل سلولی در نورون پس سیناپسی و نیز فعالیت کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L در هنگام پیری در نورون‌های هیپوکمپ افزایش می‌یابد و هم‌زمان با آن شکل پذیری سیناپسی دچار اختلال می‌گردد(۱۵). با توجه به این که رها شدن گلوتامات به عنوان کاهنده رفتار و بیان انگیزش در نظر گرفته می‌شود و عمل CaEDTA بین آمیگدال و هیپوکمپ در این رابطه متفاوت می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که نحوه تعدیل پیام رسانی گلوتامات توسط روی بین این دو تا چه حد متفاوت است. البته تا به حال اثر روی وزیکولی هیپوکمپ بر رفتار احترازی غیرفعال، و نیز اثر CaEDTA مشروب کننده هیپوکمپ بر این رفتار بررسی نشده است(۱۶).

با توجه به اهمیت کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ در جنبه‌های مختلف یادگیری و حافظه که براساس مطالعات انجام شده پیشین و نیز یافته‌های ما مورد تائید قرار گرفته است، بررسی برهم کنش این کانال‌ها با یون روی ضروری به نظر می‌رسید و نتایج ما در مورد برهم کنش این کانال‌ها با روی، نشان‌گر اهمیت آن در تثبیت یادگیری احترازی غیر فعال می‌باشد. از آنجا که بسیاری از رفتارهای یادگیری نیز بر این اساس قابل بررسی هستند می‌توان احتمال داد که مکانیسم مشترکی موجب تقویت اثر مشترک کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ و روی خارج سلولی در سایر ویژگی‌های شناختی گردد.

نتیجه گیری

همان طور که در مورد نقش تعدیل کنندگی روی انتظار می‌رفت جمع‌آوری این یون به تنهایی تأثیری بر مراحل مختلف یادگیری احترازی نداشت و این درحالی است که یکی از مهم‌ترین ورودی‌های روی خارج سلولی کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ هستند. این کانال‌ها اثر خود را در فرآیند اکتساب و تثبیت به یادگیری احترازی غیرفعال نشان دادند، ولی انسداد آنها تأثیری بر فرآیند به خاطرآوری یادگیری احترازی نداشت. بنابراین مکانیزم‌های مشترکی به صورت برهم کنش این یون‌ها و ارتباط آنها با اکتساب و تثبیت یادگیری احترازی غیرفعال مورد انتظار می‌باشد.

نمونه‌هایی از تحقیقات پیشنهادی قابل انجام در این رابطه شامل موارد زیر می‌باشد: بررسی نقش روی خارج سلولی ترانس در یادگیری فضایی و سایر مدل‌های

مختلف یادگیری، تحقیق در مورد تعامل روی خارج سلولی ترانس و کانال‌های کلسیمی وابسته بـه ولتـاژ در سـاختارهای هیپوکمپ، استریاتوم و مغزپیشین و نیز به صورت In vitro در مـــدل‌هـــای مختلـــف یـــادگیری فـــضایی، بررســـی الکتروفیزیولوژیک تعامل کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتـاژ بـا روی خـارج سـلولی در هـر یـک از مـدل‌هـای یـادگیری فضایی و شرطی کلاسیک، بررسی نقش کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ وروی خارج سلولی به طور هم‌زمـان بـا روش Gene knockout در یادگیری‌های احترازی غیر فعـال و فضایی.

منابع

1. Crawford IL, Connor DG. Zinc in maturing rat brain: hippocampal concentration and localization. J Neurochem 1992; 19(1):1451–1458.
2. Larson, AA, Kitto KF. Manipulations of zinc in the amygdale by perfusion with zinc chloride, disodium-calcium-EDTA, or picolinic acid, alter passive avoidance learning in mice. J Pharmacol Exp Thers 1997; 282(3): 1319–1325.
3. Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA. Palmiter RD. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. Proc Natl Acad Sci 1999; 96(3): 1716–1721.
4. Erickson SM, Danscher G, Schroder HD, Won MH, Removing TB. Zinc from synaptic vesicles does not impair spatial learning, memory.or sensorimotor functions in the mouse. Brain Res 2000; 9891(5):253-65.
5. Takeda TSM, Won MH, Cole TB, Jensen MS, Palmiter RD, Danscher G. Zinc enriched (ZEN) terminals in mouse olfactory bulb. Brain Res 2000; 865(4): 227–236.
6. FredericksonCJ, Kasarskis EJ, Ringo D, Frederickson RE, quinoline A, fluorescence method for visualizing assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. J Neurosci Methods 1996; 20 (2): 91–103.
7. Kandel E. Principles of neuroscience. New York:Mc Graw hill; 2000.p. 850-895.
8. Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap K, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, DevorM. Heritability of nocice, option 1 responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. Pain1999; 80(5): 67–82.
9. Cole TB, Martyanova A, Palmiter RD. Zinc-enriched (ZEN) terminals in mouse spinal cord: immunohistochemistry autometallography. Brain Res 2000; 870(3): 163–169.
10. Kay AR, Neyton J, Paoletti P. A startling role for synaptic zinc.Neuron 2006;52(4):679-90.
11. Sodikdjon A, Kodirov, Takizawa Sh, Joseph J, Kandel RE, Shumyatsky GP, Vadim Y, Bolshakov. Synaptically released zinc gates long-term potentiation in fear conditioning pathways. PNAS 2006;103(3): 15218-15223.
12. Halas GA, Welch MG, Frederickson CJ. Stimulation-induced uptake release of zinc in hippocampaus. Nature1994; 308(2): 736–738.
13. Takeda A, Yamada K, Tamano H, Fuke S, Kawamura M, Oku N. Hipocampal calcium dyshomostasis and long-term potentiation in 2-week zinc deficiency. Neurochem Int 2008; 52: 241-246.
14.Legendre P, Westbrook GL. Noncompetetive inhibition of γ–aminobutiric acidA channels by Zn. Mol Pharmacol 1999; 39: 267-274.

Study of the extracellular trans zinc effect on the passive avoidance learning in male Vistar rats

Mohajerani HR[1], Palizvan MR[2]*, Oryan S[3], Babapour V[4]

Abstract

Introduction: In this study the effect of extra cellular trans zinc and voltage sensitive calcium channels on different aspects of learning and memory has been investigated.

Materials and Methods: This is an experimental study in which the effect of calcium channel antagonists and zinc chelator, Ca-EDTA, on passive avoidance learning (shuttle box apparatus) has been examined by intraperitoneal administration of defferent doses of these drugs. Data was analyzed using one way ANOVA.

Results: Result of intraperitoneal injection of 100 milimolar Ca-EDTA, indicated that it has no effect on the acquisition, consolidation, and retrieval of passive avoidance learning. Verapamil(100 and 150 micrograms) as a L-type voltage gated calcium channel antagonist, decreased acquisition and consolidation but not retrieval of the passive avoidance behaviour. These effects were dose dependent. The simltaneous effect of Ca-EDTA and verapamil was also studied. Ca-EDTA (100milimolar) and verapamil (100 micrograms) have negative effects on consolidation of the passive avoidance learning.

Conclusion: Probably, common mechanisms are involved in acquisition and consolidation of passive avoidance learning, and zinc and calium ions play interactive roles in this aspect.

Key words: Passive avoidance learning, trans extracellular zinc, voltage gated calcium channels

*Corresponding author; E-mail: palizvan@yahoo.com

1 - Student of PhD of physiology, Sciences & Researches Branch of Islamic Azad University.
2 - Assistant professor, department of physiology, Arak University of medical sciences.
3 - Professor, department of biology, Tarbiat Moalem University, Tehran.
4 - Professor, department of physiology, Tehran University.