Physiology and Pharmacology, 17 (4), 449-460
Winter 2014 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of Vitamin D3 on Improvement of Learning and Spatial Memory Following Demyelination induction in hippocampal CA1 Area of rat

Sepideh Tarbali, Shiva Khezri*, Reza Heidari

Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia.

Received: 8 Aug 2013 **Accepted: 21 Dec 2013**

Abstract

Introduction: Consumption of vitamin D3 is effective to reduce intensity of autoimmune diseases such as multiple sclerosis. Neurons of the central nervous system are constantly exposed to reactive oxygen species and these factors play a key role in the destruction of myelin and damage of axons. The hippocampus is a vital center for learning and memory in central nervous system. This area is extremely vulnerable to neurodegenerative diseases and oxidative damage. In the present study the effects of vitamin D3 on learning, spatial memory and lipid peroxidation following demyelination of rat hippocampal CA1 neurons was investigated.

Methods: For demyelination induction, 2µl lysolecithin was injected into the CA1 area of rat brain using stereotaxic surgery. After induction of demyelination, animals received 5 µg/kg vitamin D3 for 7 days. The learning and spatial memory of rats were investigated by radial maze. The extent of demyelination in hippocampus was studied using myelin specific Luxol fast blue staining. On day 7, lipid peroxidation was evaluated by Esterbauer and cheeseman methods.

Results: The results of this study showed that administration of vitamin D3 caused significant improvement of spatial learning and memory compared to the group receiving lysolecithin alone ($p<0.001$). Levels of lipid peroxidation in group treated with vitamin D3 showed significant reduction compared to the group receiving lysolecithin alone ($p<0.01$).

Conclusion: Vitamin D3 acts as an antioxidant agent and caused improvement in learning and spatial memory through reduction of demyelination and lipids peroxidation products.

Key words: Lysolecithin, Vitamin D3, learning, spatial memory, Lipids peroxidation

* Corresponding author e-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (٤)، ٤٤٩ – ٤٦٠
زمستان ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثر ویتامین D3 بر بهبود یادگیری و حافظه فضایی به دنبال دمیلیناسیون ناحیه CA1 هیپوکمپ موش صحرایی

سپیده تربالی، شیوا خضری*، رضا حیدری
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه

دریافت: ۱۷ مرداد ۹۲ پذیرش: ۳۰ آذر ۹۲

چکیده

مقدمه: مصرف ویتامین D3 در کاهش شدت بیماریهای خود ایمن از جمله مالتیپل اسکلروزیس موثر است. نورون‌های سیستم عصبی مرکزی به طور دائمی در معرض گونه های فعال اکسیژن قرار دارند. به طوری که این عوامل نقش کلیدی را در تخریب میلین و آسیب آکسون ها ایفا می‌کنند. هیپوکمپ مرکز اصلی یادگیری و حافظه در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. این ساختار به بیماری‌های نورودژنراتیو و صدمات اکسیداتیو بسیار حساس و آسیب پذیر است. در بررسی حاضر اثرات ویتامین D3 بر یادگیری، حافظه فضایی و سطوح پراکسیداسیون لیپیدها در ناحیه هیپوکمپ موش‌های صحرایی پس از القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: برای ایجاد دمیلیناسیون، ۲ میکرولیتر لیزولسیتین به کمک استرئوتاکس در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش صحرایی تزریق شد. حیوانات تحت درمان به مدت ۷ روز ۵μg/kg ویتامین D3 را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. یادگیری و حافظه فضایی توسط دستگاه ماز شعاعی بررسی شد. میزان دمیلیناسیون با کمک رنگ آمیزی اختصاصی میلین (Loxul fast blue) بررسی گردید. در روز هفتم سطوح پراکسیداسیون لیپیدها توسط روش Esterbauer و cheeseman مطالعه شد.

یافته ها: نتایج این بررسی نشان داد که تجویز ویتامین D3 در گروه تحت درمان، یادگیری و حافظه فضایی را به طور معناداری نسبت به گروه دریافت کننده لیزولسیتین بهبود بخشید (P<۰/۰۰۱) و سطوح پراکسیداسیون لیپیدها در گروه تحت درمان نسبت به گروه لیزولسیتین کاهش معناداری را نشان داد (P<۰/۰۱).

نتیجه گیری: ویتامین D3 به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانت عمل نموده و از طریق کاهش دمیلیناسیون و محصولات پراکسیداسیون لیپیدی، موجب بهبود یادگیری و حافظه فضایی در طی ۷ روز شد.

واژه‌های کلیدی: لیزولسیتین، ویتامین D3، یادگیری، حافظه فضایی، پراکسیداسیون لیپیدها

مقدمه

دمیلیناسیون موضعی ناشی از مواد شیمیایی مدل مناسبی برای بررسی عوامل موثر بر میلیناسیون و دمیلیناسیون است که در بیماری‌های دمیلینه کننده مانند مالتیپل اسکلروزیس[1] اتفاق می افتد[۳-۱۹]. لیزولسیتین یک توکسین خاص برای سلول‌های میلین ساز می‌باشد که روی سلول‌های عصبی دیگر اثرات کمتری را دارد. به طوری که تزریق لیزولسیتین منجر به القای دمیلیناسیون در محل تزریق می‌شود، از این رو برای ایجاد دمیلیناسیون موضعی در سیستم عصبی مرکزی مناسب می‌باشد [۴۵].

ناحیه هیپوکمپ بخشی از سیستم لیمبیک است که نقش فیزیولوژیک آن در بروز رفتارهای هیجانی و دخالت آن در پردازش اطلاعات فضایی و برخی از انواع حافظه و یادگیری مشخص شده است [۴]. یادگیری فضایی نوعی یادگیری لحظه‌ای است که در این نوع یادگیری، هیپوکمپ و لوب گیجگاهی میانی و نواحی از قشر جلوی پیشانی دخالت دارد.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: sh.khezri@urmia.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj
1. Multiple sclerosis

آسیب هیپوکمپ منجر به اختلالاتی در یادگیری فضایی می‌شود [۲۱]. هیپوکمپ به بیماری‌های نورودژنراتیو بسیار حساس و آسیب پذیر می‌باشد [۲۸]. در تعدادی از مطالعات دمیلیناسیون بافت هیپوکمپ در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مشخص شده است. هم چنین اختلال حافظه نیز در ۲۵ تا ۶۰ درصد این بیماران گزارش شده است [۳۴]. هیپوکمپ هم چنین جایگاهی برای صدمات اکسیداتیو محسوب می‌شود [۳۸].

آنزیم‌های کلیدی سیستم دفاعی بدن شامل کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می باشند [۲۳-۳۱]. بافت مغز به دلایل بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و آناتومی خاص در مقابل آسیب های اکسیداتیو آسیب پذیر است [۱۰]. این بافت ۲۰ درصد از اکسیژن تنفس شده را، مصرف می‌کند و میزان آنزیمهای آنتی اکسیدانت آن پایین است [۳۹].

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می دهد که در مناطقی که غذاهای سرشار از ویتامین D3 مصرف می شود یا بیشتر در معرض نور خورشید هستند، شیوع بیماری‌های نورودژنراتیو کمتر است [۳۳-۳۶]. این مطالعات نشان از ارتباط ویتامین D با این بیماری ها دارد. اگرچه آنتی اکسیدان‌ها و ویتامین D3 در کنترل علایم این بیماری‌ها استفاده می‌شوند اما مکانیسم عمل دقیق آنها به خوبی مشخص نیست. هدف این مطالعه بررسی یادگیری، حافظه فضایی و اثر آنتی اکسیدانی ویتامین D3 بر هیپوکمپ موش صحرایی به دنبال القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین می‌باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه، از موش های صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم (خریداری شده از انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. حیوانات در هر قفس به طور انفرادی تحت شرایط ۱۲ ساعت تاریکی/ روشنایی در دمای کنترل شده اتاق (۲±۲۳) نگهداری شدند که دسترسی کامل به آب و غذا داشتند. در این مطالعه کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته اخلاق در پژوهش های پزشکی رعایت شد. حیوانات به طور تصادفی در ۵ گروه قرار گرفتند (n=۸).

۱. گروه کنترل (سالین) که تحت جراحی استرئوتاکسی قرار گرفتند و ۲ میکرولیتر سالین ۰/۹ درصد (حلال لیزولستین) در ناحیه CA1 هیپوکمپ آنها تزریق شد.
۲. گروه کنترل (روغن کنجد) که پس از جراحی استرئوتاکسی، به مدت ۷ روز ۱۵۰ میکرولیتر روغن کنجد (حلال ویتامین D3) را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند.
۳. گروه کنترل (ویتامین) که پس از جراحی استرئوتاکسی، به مدت ۷ روز ۵ μg/kg ویتامین D3 را در ۱۵۰ میکرولیتر روغن کنجد به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند.
۴. گروه لیزولسیتین که تحت جراحی استرئوتاکسی قرار گرفتند و به منظور القای دمیلیناسیون، ۲ میکرولیتر لیزولسیتین (Sigma, USA) ۱ درصد در سالین ۰/۹ ٪ در ناحیه هیپوکمپ (CA1) دریافت کردند.
۵. گروه تحت درمان که پس از جراحی و دریافت ۲ میکرولیتر لیزولسیتین، به مدت ۷ روز ۵ μg/kg ویتامینD3 را در ۱۵۰ میکرولیتر روغن کنجد به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند.

جهت القای دمیلیناسیون، حیوانات تحت جراحی استرئوتاکسی قرار گرفتند. به این منظور، حیوانات توسط داروی کتامین[1] (۱۰mg/Kg) و زایلزین[2] (۲mg/Kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند[۲۶]. سپس محور های دستگاه استرئوتاکسی در سه جهت فضایی تنظیم و حیوان در دستگاه استرئوتاکسی قرار گرفت. موهای سر حیوان با قیچی کوتاه و پوست ناحیه توسط پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد تمیز و سپس یک برش طولی ۱/۵ سانتی متری در پوست جمجمه در حد فاصل دو چشم تا برآمدگی استخوان پس سری ایجاد گردید. عضلات و بافت های سطح جمجمه برداشته شد و سطح استخوان تمیز و خشک گردید تا محل درزها (برگما، لامبدا و ساجیتال) نمایان گردد. مختصات ناحیه CA1 هیپوکمپ [۱] با توجه به اطلس پاکسینوس (DV=۳/۲ و ML=۲/۲ و AP= -۳/۸) تعیین گردید. سپس سوراخی به

1. ketamine hydrochlorid
2. xylazine

قطر ۱/۵ میلیمتر توسط مته دندان پزشکی در آن نقطه ایجاد گردید. پرده سخت شامه با نوک سوزن برداشته شد و یک نوبت تزریق مستقیم ۲ میکرولیتر لیزولسیتین [۳۷] (با سرعت ۱ میکرولیتر در هر دقیقه) با استفاده از سرنگ همیلتون در ناحیه CA1 صورت گرفت. پس از تزریق سرنگ به مدت ۵ دقیقه در محل تزریق باقی ماند تا مایع به طور کامل به فضاهای بافتی نفوذ کند. پس از جراحی هر حیوان به طور انفرادی در قفس نگهداری شد.

حیوانات گروه درمان با ویتامین D3 ۲۴ ساعت پس از القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین، به مدت ۷ روز ۵ μg/kg ویتامین D3 را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. هم چنین از روغن کنجد به عنوان حلال ویتامین استفاده گردید[۲۵].

بررسی یادگیری و حافظه فضایی توسط دستگاه ماز شعاعی ۸ بازویی انجام شد. این دستگاه یک رادیال ماز ساخته شده از چوب بود. ظروف غذا در کف هر بازو قرار داده شد تا تکه‌های غذا در آنجا ریخته شود که این امر به منظور کم کردن قابلیت دید از مرکز است. این وسیله شامل ۸ بازوی کاملاً یکسان است که به صورت شعاعی از یک صفحه مرکزی کوچک دایره‌ای شکل منشعب می‌شوند. چندین علامت قابل دید مانند پوسترهای و کاغذهای رنگی با اشکال مختلف روی دیوار قرار می‌گیرند. این علایم به حیوان جهت پیدا کردن غذا کمک می کنند. حیوان در تمامی روزهای آموزش و تست در یک جهت ثابت قرار گرفت تا شرایط برای تمامی حیوانات یکسان باشد. به منظور فراهم آوردن انگیزه لازم برای جستجو کردن حیوان، میزان غذای حیوان تا ۸۵ درصد کاهش یافت. یک ورود به بازو زمانی ثبت می شود که ۴ اندام حرکتی حیوان وارد بازو شود. وقتی حیوان بازوی محتوی غذا را پیدا کرد به حیوان اجازه داده می‌شود تا کمی غذا بخورد و سپس از ماز برداشته می‌شود. آزمایشات رفتاری در گروه‌های کنترل (کنجد و ویتامین) و گروه تحت درمان ۱ ساعت پس از تجویز داخل صفاقی روغن کنجد و ویتامین D3 انجام گرفت. در روز اول به حیوان اجازه داده شد تا ۵ دقیقه به منظور آشنایی با محیط، دستگاه ماز را آزادانه بگردد که به این مرحله، مرحله خوگیری گویند. در این مرحله هیچ گونه غذایی در دسترس حیوان قرار نگرفت. روزهای دوم و سوم به عنوان جلسات آموزش شامل دو جلسه در هر روز بود که در دو نوبت صبح و عصر انجام شد. در این مرحله غذا در یک بازوی ثابت قرار گرفت. در پایان این ۲ روز مرحله آموزش، رت ها به ۹۰ درصد معیار یادگیری رسیدند، به این ترتیب که همه موش ها قبل از اتمام ۵ دقیقه تست به بازوی مورد نظر می رسیدند. بعد از اتمام جلسات آموزش، جلسات تست با قرار دادن غذا در بازوی ثابت شامل یک جلسه در هر روز طی روزهای چهارم تا هفتم انجام شد. زمان سپری شدن تا رسیدن به غذا به وسیله یک دوربین دیجیتال نصب شده در بالای رادیال ماز ثبت شد. پس از اتمام تستهای رفتاری فیلم به کامپیوتر منتقل شد و اطلاعات ثبت شده شامل زمان یافتن بازوی محتوی غذا یادداشت گردید [۲۴].

در روز ۷ از انجام آزمایشات، حیوانات توسط کتامین و زایلزین بیهوش شدند و سپس عمل پرفیوژن به منظور خارج نمودن خون دورن رگ‌ها از طریق بطن چپ با بافر فسفات سالین (PBS) ۰/۱ مولار و پارافرمالدهید (PFA) ۴ درصد انجام شد. سپس مغز حیوان از جمجمه جدا و برای بهتر فیکس شدن به مدت ۲۴ ساعت در پارافرمالدهید ۴ درصد در دمای ۴ °c نگهداری شد.

پس از پاساژ نمونه بلوک‌های پارافینی تهیه و برشهای کرونال ۵ میکرونی از نمونه‌ها تهیه شد. سپس برش ها با رنگ آمیزی اختصاصی میلین Luxol Fast Blue و Crysel Fast Violet رنگ آمیزی شدند. برای اثبات دمیلیناسیون ناحیه CA1 هیپوکمپ توسط لیزولسیتین، از این نوع رنگ آمیزی استفاده شد و لامها با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند [۳۲].

جهت بررسی آزمایشات بیوشیمیایی حیوانات به صورت عمیق بیهوش شدند و سپس هیپوکمپ آنها جدا و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۸۰° c– نگهداری شدند. در روز آزمایش بافت‌های هیپوکمپ در بافر فسفات صفر درجه سانتیگراد ۰/۰۵ مولار با pH=7/4 و با غلظت ۱۰٪ (W/V) هموژنیزه گردید. سپس محلول های حاصل با دور ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و مایع روئی جهت سنجش میزان تولید محصولات پراکسیداسیون لیپیدها مورد استفاده قرار گرفت. سطوح پراکسیداسیون لیپیدها با استفاده از روش Cheeseman و Esterbauer اندازه‌گیری شد. درجه

پراکسیداسیون لیپیدها بـر مبنـای میـزان تشـکیل مـالون دی آلدهید[1] (MDA) تعیین می شود. مالون دی آلدهید محصـول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و با تیوباربیتوریـک اسید وارد واکنش می‌شود و تولید کمپلکس رنگـی مـی‌نمایـد. اساس روش، اندازه‌گیری اسپکتوفتومتریک رنـگ ایجـاد شـده می باشد. بدین منظور ۳۰۰ میکرولیتر تری کلرواسـتیک اسـید ۱۰٪ به ۱۵۰ میکرولیتر از نمونـه اضـافه شـد و بـه مـدت ۱۰ دقیقه بـا دور ۱۰۰۰ در دمـای ۴ درجـه سـانتیگراد سـانتریفوژ گردید. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول روئی به لوله آزمایش منتقـل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباربیتوریـک اسـید ۰/۶۷ ٪ در دمـای ۱۰۰ درجه سانتیگراد برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵ دقیقه پـس از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشـی از واکـنش مـالون دی آلدهید با تیوباربیتوریک اسید ظاهر و با اسـپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک ارزیابی گردید. میـزان مالون دی آلدهید به کمک ضریب جـذبی مـالون دی آلدهیـد محاسبه و به صورت nmol/g tissue بیان شد [۹].

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفـت. از آنالیز واریانس تکراری[2] برای تجزیه تحلیل داده‌های رفتاری و از آنالیز واریانس یک طرفه[3] برای مقایسـه میـزان مـالون دی آلدهید بین گروهها استفاده شد. داده ها به صـورت میـانگین± انحراف معیار (Mean±SEM) ارائه شده و P<۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

یافته ها

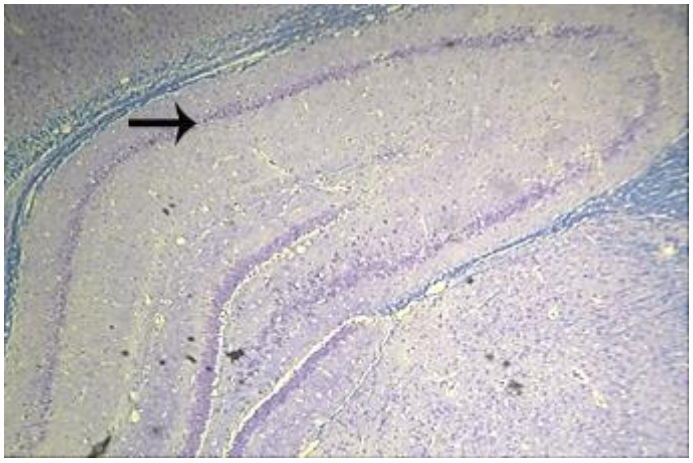
مطالعـه هیسـتولوژیک ناحیـه CA1 هیپوکمـپ نشـان می دهد که در گروه کنترل طبق شکل ۱ (الف) ناحیـه مزبـور سالم بوده و هیچ دمیلیناسیونی مشـاهده نمـی شـود. در گـروه دریافت کننده لیزولسیتین (ب) دمیلیناسیون وسـیعی در ناحیـه CA1 هیپوکمپ قابل مشاهده است. در گروه دریافـت کننـده ویتامین D3 پس از القـای دمیلیناسـیون (ج) منـاطق دمیلینـه قابل مشاهده است ولی نسبت بـه گـروه LFB لیزولسـیتین تـا حدودی ترمیم میلین صورت گرفته است.

جهت بررسی فرآیند یـادگیری و حافظـه فضـایی در طـی روزهای آزمایش، نتایج آماری حاصـل از میـانگین زمـان پیـدا کردن غذا در حیوانات گروه‌های مختلف طی روزهای آزمـایش مورد مطالعه قرار گرفت. مقایسـه میـانگین تغییـرات زمـان در گروه‌های مختلف در روزهای تست (چهارم تا هفـتم) از انجـام آزمایشات رفتاری نشان داد که با گذشت زمان طی این روزهـا در گروه‌های کنترل (سالین، ویتـامین و روغـن کنجـد) زمـان یافتن غذا کاهش یافت. در گروه دریافت کننده لیزولسیتین بـا گذشت روزها زمان یافتن غذا به تدریج افزایش یافت که ایـن امر حـاکی از دمیلینـه شـدن ناحیـه CA1 هیپوکمـپ رت‌هـا می‌باشد که باعث ایجاد اختلال در فراینـد یـادگیری و حافظـه فضایی شده است. زمان یافتن غذا در گـروه تحـت درمـان بـا ویتامین نسبت به گروه کنترل افزایش داشت اما با ایـن وجـود پایین‌تر از گروه دریافت کننده لیزولسیتین بود (شکل ۲ الف).

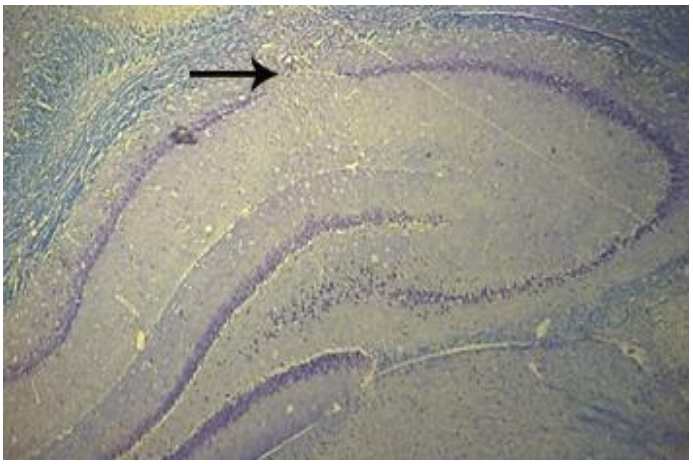
بررسی نتایج در کـل روزهـای تسـت نشـان داد کـه بـین گروه‌های کنترل (سـالین، ویتـامین و روغـن کنجـد) اخـتلاف معناداری در زمان یافتن غذا مشاهده نگردید. در گروه دریافت کننده لیزولسیتین و گروه تحت درمان بـا ویتـامین نسـبت بـه گروه‌های کنترل زمان پیدا کـردن غـذا افـزایش معنـاداری را داشت (P<۰/۰۰۱). این افزایش در زمان یافتن غـذا بـه نظـر می‌رسـد کـه ناشـی از دمیلیناسـیون ناحیـه CA1 هیپوکمـپ متعاقب تزریق لیزولسیتین باشد. همچنین مقایسه زمان یـافتن غذا در گروه تحت درمان با ویتامین نسبت به گروه لیزولسیتین در روزهای تست نشان داد که مصرف ویتـامین D3 بـه طـور معناداری باعث کاهش زمان پیدا کردن غذا و بهبود یادگیری و حافظه فضایی گردید (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲ ب).

آنالیز داده‌های پراکسیداسیونی لیپیدینشان داد کـه سـطوح پراکسیداسیون لیپیدها در گروه‌های کنترل (سالین ، ویتامین و روغن کنجـد) اخـتلاف معنـاداری را نداشـت. در گـروه هـای آزمایشی دریافت کننده لیزولسیتین و گـروه تحـت درمـان بـا ویتـامین نسـبت بـه گـروه هـای کنتـرل میـزان سـطوح پراکسیداسـیون لیپیـدی افـزایش معنـاداری را نشـان داد (P<۰/۰۰۱). دریافت ویتامین D3 به مدت ۷ روز نشان داد که میزان محصولات پراکسیداسیون لیپیدی (مـالون دی آلدهیـد) در گروه تحت درمان با ویتامین نسبت بـه گـروه لیزولسـیتین

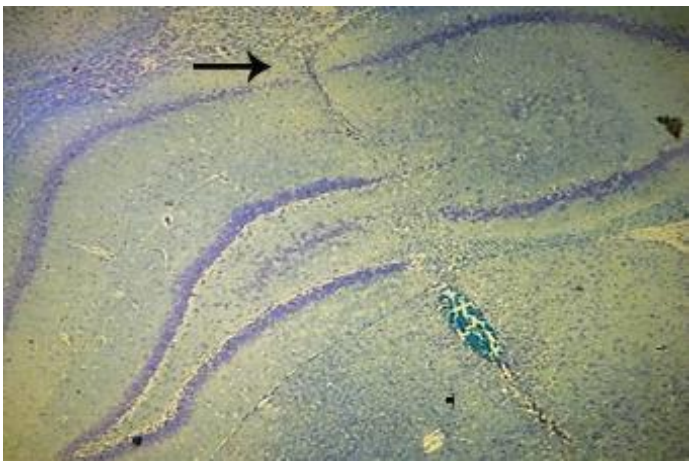
1. Malondialdehyde
2. Repeated measurement
3. One way anova



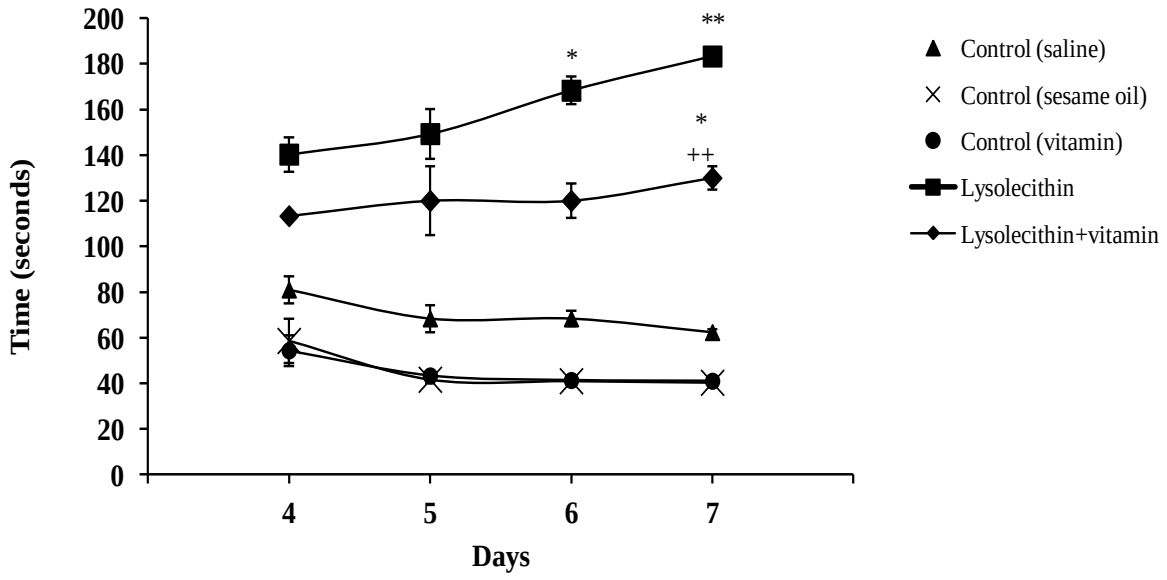
شکل ۱ (الف)- رنگ آمیزی اختصاصی میلین (لوگزول فست بلو (LFB) و کریزل فست ویولت (CFV)) از بافت هیپوکامپ (ناحیه CA1) در گروه های کنترل با بزرگنمایی۱۰×



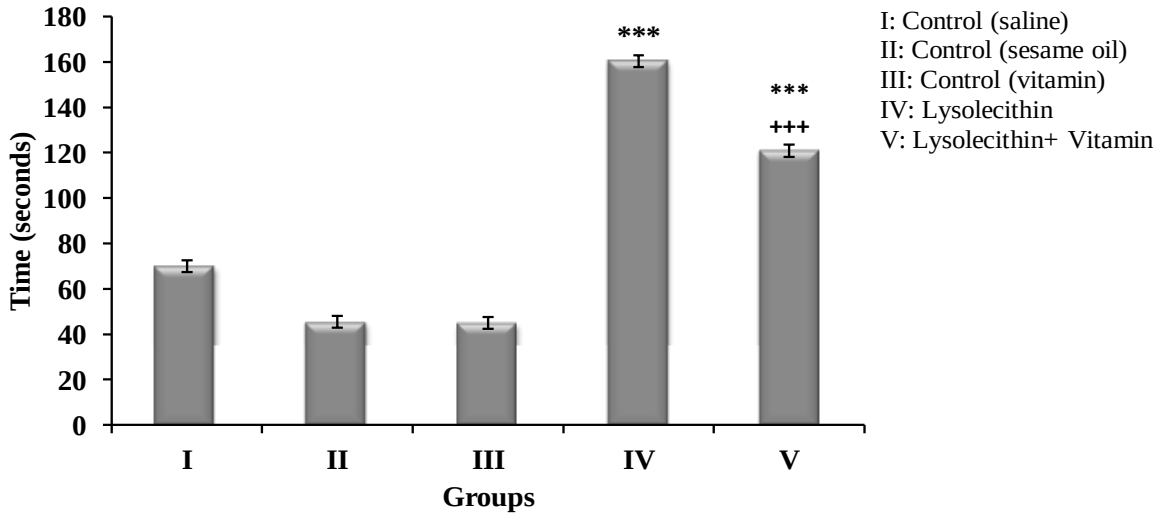
شکل ۱ (ب)- رنگ آمیزی اختصاصی میلین (لوگزول فست بلو (LFB) و کریزل فست ویولت (CFV)) از بافت هیپوکامپ (ناحیه CA1) در گروه دریافت کننده لیزولستین با بزرگنمایی۱۰×



شکل ۱ (ج)- رنگ آمیزی اختصاصی میلین (لوگزول فست بلو (LFB) و کریزل فست ویولت (CFV)) از بافت هیپوکامپ (ناحیه CA1) در گروه تحت درمان با ویتامین D3 با بزرگنمایی۱۰×



شکل ۲ (الف)- مقایسه میانگین تغییرات زمان پیدا کردن غذا در گروه های مختلف طی روزهای تست. نتایج به صورت میانگین± میانگین خطای استاندارد بیان شده است. *P<۰/۰۵ و **P<۰/۰۱ درمقایسه با گروه های کنترل و ++P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه لیزولسیتین در نظر گرفته شده است.

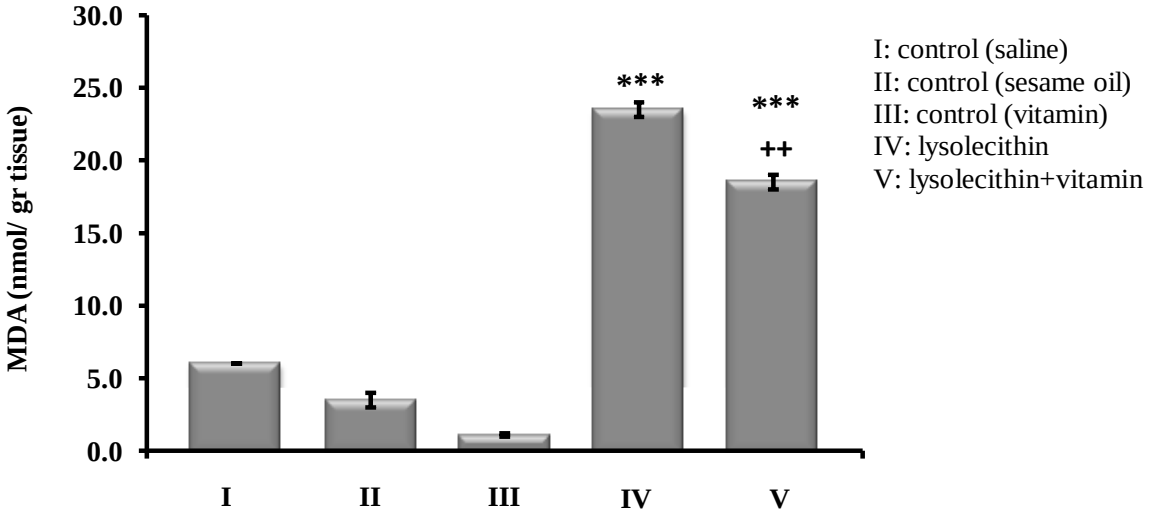


شکل ۲ (ب)- مقایسه میانگین زمان پیدا کردن غذا در گروه های مختلف در کل روزهای تست . نتایج به صورت میانگین± میانگین خطای استاندارد بیان شده است. ***P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه های کنترل و +++P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه لیزولسیتین در نظر گرفته شده است.

کاهش معناداری را داشت (P<۰/۰۱). نتایج حاصل از میزان پراکسیداسیون لیپیدی بیان میکنند که تزریق ویتامین D3 به مدت ۷ روز، آسیب اکسیداتیو القا شده توسط لیزولسیتین را بهبود بخشیده و سطوح پراکسیداسیون لیپیدی را به طور معنی داری کاهش داده است (شکل ۳).

بحث

در تحقیق حاضر یادگیری و حافظه فضایی و اثر آنتی اکسیدانی ویتامین D3 بر هیپوکمپ موش صحرایی به دنبال القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق لیزولسیتین به ناحیه CA1 هیپوکمپ باعث القای فرآیند دمیلیناسیون و استرس اکسیداتیو و متعاقب آن باعث ایجاد اختلال در حافظه و یادگیری فضایی شد. همچنین تیمار گروههای تحت درمان با ویتامین D3 نشان داد که باعث کاهش وضعیت استرس اکسیداتیو و بهبود اختلالات یادگیری و حافظه فضایی ناشی از تزریق موضعی لیزولسیتین می‌شود.



شکل ۳- مقایسه میانگین میزان مالون دی آلدهید در گروه‌های مختلف. نتایج به صورت میانگین± میانگین خطای استاندارد بیان شده است. ***P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه‌های کنترل (سالین، ویتامین و روغن کنجد) و ++P<۰/۰۱ درمقایسه با گروه لیزولسیتین در نظر گرفته شده است.

میلیناسیون آکسونی در سیستم عصبی مهره داران برای انتقال و هدایت ایمپالس‌های الکتریکی ضروری است [۳۰]. دمیلیناسیون پروسه دژنراتیو و تخریبی بوده و سلول‌های الیگودندروسیتی و پوشش میلین اطراف آکسون ها را تخریب می‌کند[۴۱]. فرآیند دمیلیناسیون ماده خاکستری سیستم عصبی مرکزی از جمله ساختار هیپوکمپ را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۳۵]. طبق پژوهشهای انجام شده تا به حال از توکسین لیزولسیتین جهت القای دمیلیناسیون موضعی در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی مثل طناب نخاعی [۳۱]، پایک تحتانی مخچه [۱۸]، کورپوس کالوزوم [۲۷]، عصب بینایی [۱۷] و هیپوکمپ [۲۷] استفاده شده است.

Makinodon و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از لیزولسیتین دمیلیناسیون موضعی را در رت‌های نژاد ویستار القا کردند [۲۲]. آزمایشات مشابهی نیز توسط Mozafari و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از روش فوق انجام شد و تاثیر لیزولسیتین را در تخریب میلین نشان دادند [۲۶]. در تحقیق حاضر میزان دمیلیناسیون و رمیلیناسیون در روز ۷ پس از تزریق لیزولسیتین و پس از تیمار با ویتامین D3 با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین بررسی گردید. با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات بافتی، تزریق موضعی لیزولسیتین منجر به القای دمیلیناسیون و تخریب میلین در ناحیه تزریق شد که با یافته های قبلی مطابقت دارد.

لیزولسیتین نفوذ سلولهای T را با فعال شدن ماکروفاژها و میکروگلیاها القا می‌کند [۱۱]. فعال شدن میکروگلیاها منجر به ترشح انواعی از سیتوکین‌ها از جمله اینترلوکین-۱ بتا، اینترفرون گاما، فاکتور نکروز توموری آلفا و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود [۴۳]. مطالعه فارماکولوژی نشان می‌دهد که لیزولسیتین باعث تخریب حافظه و یادگیری در مدل های مختلف یادگیری می‌شود [۴۴]. تشکیلات هیپوکمپ در اکتساب حافظه فضایی نقش عمده ای را بازی می کنند. حافظه فضایی به سلامت هیپوکمپ بستگی دارد، به طوری که با ایجاد ضایعه دو طرفه در ناحیه هیپوکمپ پشتی به میزان ۳۰ تا ۵۰ درصد حافظه فضایی مختل می‌شود [۶]. یافته‌های ما در این مطالعه نشان داد که تزریق لیزولسیتین در ناحیه هیپوکمپ علاوه بر تخریب میلین باعث تخریب حافظه و یادگیری در حیوانات شده و زمان سپری شدن تا رسیدن به غذا را به طور معناداری افزایش داد.

نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های Makinodon و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابقت دارد، به طوری که نشان دادند که تزریق لیزولسیتین باعث افزایش زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی شده و حافظه و یادگیری مختل شده است [۲۲].

افزایش استرس اکسیداتیو نقش مهمی را در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراتیو دارد. به طوری که نشان داده شده که

افـزایش اسـترس اکسـیداتیو توسـط افـزایش پراکسیداسـیون لیپیـدها و کـاهش فعالیـت آنـزیم هـای آنتـی اکسـیدانی در گونه‌های مختلف حیوانی تخریب نـورونی را تسـریع مـی‌کنـد [۸]. اکسیژن به عنوان یک واسطه بـا داشـتن توانـایی بـرای پذیرش الکترونها اثرات سمی را در سلول هـای زنـده بـه جـا می‌گذارد که منجر به اکسیداسـیون ماکرومولکولهـای اساسـی نظیر لیپیدها و پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود و از آن جایی که ۷۰ درصد غلاف میلین را ترکیبات لیپیـدی تشـکیل می‌دهد لذا تخریب لیپیـدها بـه عنـوان عامـل مهمـی مطـرح می‌شود [۷].

مشـاهده شـده کـه اسـترس اکسـیداتیو بـا تولیـد بـالای رادیکال‌های آزاد و آسیب به ماکرومولکول‌ها به طور معناداری عملکردهـای شـناختی و یـادگیری را کـاهش مـی‌دهـد [۲]. سیستم کولینرژیک مغز در حافظه و یادگیری دخیل مـی‌باشـد [۵]. رها شدن استیل کـولین در هیپوکمـپ، جسـم مخطـط و آمیگدال ثابت شده و از این طریق پـردازش انـواع مختلفـی از حافظه و یـادگیری را تعـدیل مـی‌کنـد [۱۳]. از طـرف دیگـر فعالیت سیستم کولینرژیک در طی شرایط اسـترس اکسـیداتیو تغییر می‌یابد [۴۲]. از آن جایی که تزریق لیزولسیتین از طریق فعال سازی میکروگلیاها منجر به ترشح فاکتورهـای التهـابی و افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن می‌شود، و با توجـه بـه حساس بودن هیپوکمپ به استرس اکسیداتیو و تغییـر فعالیـت سیسـتم کولینرژیـک در طـول شـرایط اسـترس اکسـیداتیو، لیزولسیتین ممکن است از طریق مداخله با سیستم کولینرژیک موجب کاهش یادگیری و حافظه فضایی شود.

نتـایج مطالعـه حاضـر نشـان داد کـه تزریـق موضـعی لیزولسیتین منجر به افزایش معنادار غلظت مـالون دی الدهیـد به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی می‌گـردد کـه نشـان دهنده افزایش تولیـد رادیکـال هـای آزاد در سیسـتم عصـبی مرکزی است.

مشاهده شده که در بیماری های نورودژنراتیو سطوح آنتـی اکسیدان های بافت مغز و مایع مغزی نخاعی تغییر می‌یابد لذا درمان آنتی اکسیدانی می‌تواند مفید واقع شود [۲۰].

ویتامین D3 یکی از ویتامین‌های محلول در چربـی اسـت که به راحتی از سد خونی مغزی عبور مـی‌کنـد. ایـن ویتـامین اثرات خود را بـه وسـیله رسـپتور داخـل سـلولی خـود کـه در سلول‌های سیستم عصبی مرکزی (نـورون هـای هیپوکمـپ و سلول‌های گلیا)، سلول‌های دندرتیک و سلول‌های ایمنی بیـان می‌شـود، اعمـال مـی‌کنـد[۱۱]. مطالعـه انجـام شـده توسـط گودرزونـد و همکـاران نشـان داد کـه ویتـامین D مـی‌توانـد دمیلیناسـیون و آپوپتـوز را کـاهش داده و بازسـازی میلـین را افزایش دهد. لذا این ویتامین می‌تواند شیوع و شدت بیماری را کاهش داده و باعث پیشرفت بهبودی بیماری شـود. همچنـین نشان داده شده که ویتامین D باعث بهبود زخم‌های اکسیداتیو حاد در قسمت ژیروس دندانه‌دار هیپوکمپ می‌شود [۱۴].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد کـه تزریـق داخـل صـفاقی ویتـامین D3 بـه مـدت ۷ روز اخـتلالات بـه وجـود آمـده در عملکرد یادگیری و حافظه فضایی را بهبود بخشید. به طـوری که زمان پیدا کرن غذا در گروه تحت درمـان بـا ویتـامین D3 نسبت به گروه دریافت کننده لیزولسـیتین بـه طـور معنـاداری کاهش یافت. (شکل ۲ ب).

یافته‌های این پژوهش با نتـایج حاصـل از مطالعـه انجـام گرفته توسط گودرزوند و همکاران در سال ۲۰۱۰ مبنی بر تاثیر کاربرد تـوام ویتـامین‌هـای E و D3 بـر روی دمیلیناسـیون و رمیلیناسیون هیپوکمپ موش صحرایی که منجـر بـه کـاهش دمیلیناسیون و آپوپتوز و افزایش بازسازی میلین شده، مطابقت دارد [۱۴].

مطالعه دیگری کـه توسـط مسـیبی و همکـاران در سـال ۱۳۸۵ انجـام گرفتـه نشـان مـی‌دهـد کـه ویتـامین D3 در موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمن تجربـی از طریـق مهار تولید نیتریک اکساید، تعدیل پاسخ‌های ایمنـی و کـاهش ارتشاح لوکوسیت‌ها بـه مغـز سـبب کـاهش شـدت بیمـاری و علایم کلینیکی و تعدیل بیماری می‌گردد [۲۵].

مـالون دی آلدهیـد یکـی از محصـولات پراکسیداسـیون لیپیدی می‌باشد که به عنوان بیومارکر حساس بـرای اسـترس اکسیداتیو شناخته شده است. لیپیدهای اکسید شده قادر هستند مالون دی آلدهید را تولید نمایند [۱۶]. قسمت دیگری از نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ویتامین D3 باعث کاهش معنـادار در میزان سطوح پراکسیداسیون لیپیدها در گروه تحـت درمـان نسبت به گروه لیزولسیتین می‌شود. (شکل۳).

این یافته با بررسی دیگری که در آن تزریق داخل صفاقی ویتـامین E باعـث جلـوگیری از افـزایش محصـولات

پراکسیداسیون لیپیدی در رت های دمیلینه شده با سم اتیدیوم بروماید شده بود، مطابقت دارد [۴۰].

در مطالعه دیگری که توسط Besler و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شده، مشاهده شده که غلظت آلفا توکوفرول، گلوتاتیون، آسکوربیک اسید، رتینول و بتا کاروتن در پلاک‌های دمیلینه شده نسبت به گروه کنترل کمتر می‌باشد. هم چنین مشاهده شده که آنتی اکسیدان‌های تامین شده از رژیم غذایی مثل ویتامین‌ها در کنترل اثرات گونه‌های فعال اکسیژن از اهمیت زیادی برخوردارند[۱].

یافته‌های ما پیشنهاد می‌کنندکه تزریق کوتاه مدت ویتامین D3 می‌تواند از طریق کاهش وسعت دمیلیناسیون، اختلالات حافظه القا شده توسط لیزولسیتین را بهبود بخشد. هم چنین ویتامین D3 به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانت عمل نموده و احتمالاً می‌تواند با کاهش شرایط اکسیداتیو در ترمیم میلین نقش داشته باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت‌های مالی و ارائه امکانات آزمایشگاهی سپاسگزاریم.

References

[1] Aminizadeh M, Abbasnejad M, Moazedi A, PapahnA, The effect of bilateral intra hippocampal injection of all–transretinoic acid on spatial learning in adult male rat. ***Pharmacol*** 12 (2008) 60-67.

[2] Bishop NA, Lu T, Yankner BA., Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. ***Nature*** 464 (2010) 529-535.

[3] Blakemore WF, Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. ***Neuropathol App Neurobiol*** 8 (1982) 365-375.

[4] Bliss TV, Callingridge GL, Synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. ***Nature*** 361 (1993) 31-39.

[5] Blokland A, Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory. ***Brain*** 21 (1995) 285-300.

[6] Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE, Spatial memory, recognition memory and hippocampus. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 101 (2004) 14515-14520.

[7] Carlson NG, Rose JW, Antioxidants in multiple sclerosis: do they have a role in therapy? ***CNS Drugs*** 20 (2006) 433-441.

[8] Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, cacchio m, Algeri S, A review of specific dietry antioxidant and effects on biochemical mechanism related to neurodegenerative processes. ***Neurobiol Aging*** 23 (2002) 719-735.

[9] Esterbauer H, Cheeseman KH, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: molondealdehyde and 4- hydroxynonenal. ***Methods enzymol*** 186 (1990) 407-421.

[10] Evans PH, Free radicals in brain metabolism and phatology. ***Br Med Bull*** 49 (1999) 577-587.

[11] Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero-Menei CN, Treatment of experimentalautoimmune encephalomyelitis in rat by 1,25-dihydroxyvitamin D3 leads to early effects within the central nervous system. ***Acta Neuropathol*** 105 (2003) 438-448.

[12] Gasemlou N, Jeong SY, Lacroix s, davis S, T cells contribute to lysophosphatidylcholin- induced macrophage activation and demyelination in the CNS. ***Glia*** 55 (2007) 294-302.

[13] Gold PE, Acetylcholin modulation of neural systems in volved in learning and memory. ***Neurobiol Learn Mem*** 80 (2003) 194-210.

[14] Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafizadeh J, Mozafari S, Vitamins E and D attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. ***Cell mol Neurobiol*** 30 (2010) 289-299.

[15] Hadžović-Džuvo A, Lepara O, Valjevac A, Avdagić N, Hasić S, Kiseljaković E, Ibragić S, Alajbegović A. Serum total antioxidant capacity in patients with multiple sclerosis. ***Bosn J Basic Med Sci*** 11 (2011) 33-36.

[16] Lykkesfeldt J, Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. ***Clin Chim Acta*** 380 (2007) 50-58.

[17] Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJM, Myelin impairs CNS remyelination by inhibitingoligodendrocyte precursor cell differentiation. ***J Neurosci*** 26 (2006) 328-332.

[18] Lachapelle F, Bechelin C, Moissonnier P, Nait-Oumesmar B, Fontaine D, Baron-Van Evercooren A, Failure of remyelination in the non humanprimateoptic nerve. ***Brain Pathol*** 15 (2005) 198-207.

[19] Levine JM, Reynolds R, Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. ***Exp Neurol*** 160 (1999) 333-347.

[20] Liang zahang H, and Jiang W.U, Role of vitamin D in immune responses and autoimmune disease, with emphasis on its role in sclerosis. ***Neurosci*** 26 (2010) 445-454.

[21] Longstaff A, editor, ***Neuroscience***. First published, Biddies LTD, Guild Ford Press, 2000, p. 375-399.

[22] Makinodon M, Tatsumi K, Okuda H, Manabe T, Yamauchi T, Noriyama Y, Kishimato T, Wanaka A, Lysophosphatidylcholin induces delayed myelination in the juvenile ventral hippocampus and behavioral alteration in adulthood. ***Nurochem Int*** 53 (2008) 374-381.

[23] Mates JM, Perez-Gomez C, Núñez de Castro I., Antioxidant enzymes and human diseases. ***Clin Biochem*** 32 (1999) 595-603.

[24] MC Gurk SR, Lvin ED, Butcher LL, Radial- arm maze performance in rats is impaired by a combination of nicotinic- cholinergic and D2 dopaminergic antagonist drugs. ***Psychpharmacol*** 99 (1989) 371-373.

[25] Mosayebi G, Ghazavi A, Payani MA, The effect of vitamin D3 on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. ***Pak J Biol Sci*** 10 (2007) 1790-6.

[26] Mozafari S, Javan M, Sherafat M, Mirnajafi-Zadeh J, Heibatollahi M, Pour-Beiranvand SH, TakiTiraihi, Ahmadiani A, Analysis of structural and molecular events associated with adult rat optic chiasm and nerves demyelination and remyelination; possible role for 3rd ventricleProliferating. ***Neuromolecular Med*** 13 (2011) 138-150.

[27] Nait-oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Baron- Van A. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocyte after demyelination. ***Eur J Neurosci*** 11 (1999) 4357-4366.

[28] Nakatomi H1, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. ***Cell*** 110 (2002) 429-441.

[29] Nordberg J, Arner ES, Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. ***Free Radic Biol Med*** (2001) 1287-1312.

[30] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodrigez M, Weinshenkwr BG, Multiple sclerosis. ***N Engl j Med*** 343 (2000) 938-952.

[31] Pavelco KD, Van Engelen BG, Rodriguez M, Acceleration in the rate of CNS remyelination inlysolecithin-induced demyelination. ***J Neurosci*** 18 (1998) 2498-2505.

[32] Pistorio A, Hendry S, Wang X, A modified technique for high-resolution staining of myelin. ***J Neurosci Methods*** 153 (2006) 135-146.

[33] Ponsonby AL, Lucas RM, Van der Mei IA, A potential role for UVR and Vitamin D in the induction of Multiple Sclerosis, Type 1 Diabetes, Rheumatoid Arthritis. ***Photochem Photobiol*** 81 (2005) 1267- 1275.

[34] Rao SM, Leo GL, Bernardin L, Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. Frequency, patterns and prediction. ***Neurology*** 41 (1991) 685-691.

[35] Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, Schonfeld MA, Busa E, Focal thining of the cerebral cortex in multiple sclerosis. ***Brain*** 126 (2003) 1734-1744.

[36] Schwarz S, Leweling H, Multiple sclerosis and nutrition. ***Mult Scler*** 11 (2005) 24-32.

[37] Sherafat M, Javan M, Mozafari S, Mirnajafi-Zadeh J, Motamedi F, Castration attenuates myelin repair following lysolecithin induced demyelination in rat optic chiasm: An Evaluation Using Visual evoked Potential, Marker Genes Expression and Myelin Staining. ***Neuro chem Res*** 36 (2011) 1887-1895.

[38] Shin CM, Chung YH, Kim MJ, Lee EY, Kim E-G, Cha CI, Age-related changes in the distribution of nitrotyrosine in the cerebral cortex and hippocampus of rats. ***Brain Res*** 931 (2002) 194-199.

[39] Somani SM. Exercise, drugs and tissue specific antioxidant system. In: Somani SM, editor. ***Pharmacology in exercise and sports***. Boca Raton: CRC Press; 1996. pp. 57-95.

[40] Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R, Bagatini M,

Stefanello N, Correa M, Kaizer R, Maldonado P, Mazzanti A, Graça DL, Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. ***Brain Res Bull*** 80 (2009) 45-51.

[41] Tomassini V, Pozzilli C, Sex hormones, brain damage and clinical course of multiple sclerosis. ***J Neurol sci*** 286 (2009) 35-39.

[42] Tucek S, Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. ***J Neurochem*** 44 (1985) 11-24.

[43] Vela JM, Molina-Holgado E, Arevalo-Martin A, Almazan G, Guaza c, Interleukin-1 regulate proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. ***Mol cell Neurosci*** 20 (2002) 489-502.

[44] Wallace VC, Cottrell DF, Brophy PJ, Fleetwood-Walker SM, Focal lysolecithin-induced demyelination of peripheral afferents results in neuropathic pain behavior that is attenuated by cannabinoids. ***J Neurosci*** 23 (2003) 3221-3233.

[45] Woodruff RH, Franklin RJ, The expression of myelin protein mRNAs during remyelination of lysolecithin-induced demyelination. ***Neuropathol Appl Neurobiol*** 25 (1999) 226-235.