فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۳)، ۲۴۵ – ۲۵۳
پاییز ۱۳۸۷

فیزیولوژی و فارماکولوژی

نقش گیرنده NMDA هیپوکامپ (CA1) بر یاد گیری و حافظه درحضور وعدم حضور کلراید روی در موش‌های صحرایی نر بالغ

زهره ولی‌زاده[۱*]، احمدعلی معاضدی[۱]، غلامعلی پرهام[۲]
۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
۲. دانشکده آمار، دانشگاه شهید چمران، اهواز

دریافت: ۱۵اسفند ۸۶ بازبینی: ۲شهریور ۸۷ پذیرش: ۴شهریور ۸۷

چکیده

مقدمه: روی یک عنصر کمیاب ضروری است که نقش‌های مهمی در تنظیم سیناپسی و تعادل عملکردهای سیستم عصبی مرکزی ایفا می کند و در یادگیری وحافظه نقش دارد. وجود روی دروزیکول‌های سیناپسی هیپوکمپ اثرات تعدیل کنندگی بر گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA اعمال می‌کند.

روش‌ها: در این تحقیق اثر تزریق داخل هیپوکمپی آگونیست و آنتاگونیست گیرنده NMDA بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستاردرحضور وعدم حضور کلراید روی به کمک دستگاه استپ دان مورد بررسی قرار گرفت. به این منظورحیوانات به ۱۰ گروه تقسیم شدند (n=8). گروه کنترل، گروه دریافت کننده NMDA که مقدار NMDA 0.1µg/rat در حجم1 میکرو لیتر سالین به مدت ۴ روز دریافت کردند. گروه شاهد سرم فیزیولوژی آن‌ها نیز همین مقدار سالین دریافت کرد. گروه دریافت کننده MK-801که مقدار 1µg/rat ،MK-801 در حجم ۱میکرو لیتر سالین به مدت ۴ روز ۱۰ دقیقه قبل از آموزش دریافت کردند و گروه شاهد سرم فیزیولوژی آن‌ها نیز به همین مقدار سالین دریافت کرد. ۵ گروه دیگر به مدت دو هفته روزانه مقدار 30 mg/kg کلراید روی درآب آشامیدنی دریافت کردند، گروه ششم فقط کلراید روی دریافت کرد و گروه‌های بعدی (۷، ۸، ۹، ۱۰) علاوه برمصرف کلراید روی به ترتیب مشابه گروه های ۲، ۳، ۴، ۵ دارو یا سرم فیزیولوژی دریافت کردند.

یافته‌ها: نشان داد که مصرف کلراید روی باعث تخریب یادگیری و حافظه در موش‌های صحرایی نر بالغ می‌گردد. در صورتی که تجویز NMDA باعث بهبود اثرات تخریبی ناشی از مصرف کلراید روی می‌شود. همچنین دریافت MK-801 اثرات تخریبی کلراید روی را افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که روی با تاثیر بر زیرواحدهای گیرنده NMDA درون هیپوکمپ موجب اختلال در فرایند یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کلراید روی ،هیپوکمپ، یادگیری احترازی غیر فعال، استپ دان.

مقدمه

روی یک عنصر ضروری برای بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی بدن است ودر ساختمان بیش از ۳۰۰ آنزیم ایفاء نقش می کند. این عنصر بعد از آهن فراوان ترین عنصر در بدن است [۲۵] و نقش‌های مهمی را در تنظیم عملکردهای سیستم عصبی مرکزی ایفا می‌کند [۱۱]. بیشترین غلظت روی در وزیکول‌های فیبرهای خزه ای هیپوکمپ و قشر مغز وجود دارد [۲۷،۱۴،۱۱]. این عنصر با تنظیم فعالیت کانال‌های یونی دریچه‌دار گلوتامات و گابا انعطاف پذیری سیناپسی را تعدیل می‌کند [۹،۲] و درحافظه و یادگیری نقش دارد [۹]. این عنصر در غلظت‌های بالا اثرات نوروتوکسیک بر نورون‌ها اعمال می و

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: valizadeh_z@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

در صورتی که غلظت آن از حد فیزیولوژیک کمتر گردد باعث تخریب حافظه و یادگیری می شود [۱۱]. هیپوکمپ یکی از ساختارهای مغزی است که در پردازش اطلاعات فضایی نقش مهمی دارد [۱] بیشترین غلظت گیرنده‌های NMDA در ناحیه CA_1 هیپوکمپ یافت شده‌است که درتنظیم تسهیل سیناپسی و فرایند حافظه و یادگیری شامل حافظه کوتاه مدت و بلند مدت اهمیت دارد [۱۶].

شواهد وسیعی نشان می‌دهد که گیرنده گلوتاماتی NMDA برای تسهیل سیناپسی و شکل‌گیری حافظه در جوندگان اهمیت دارد [۱۰]. همچنین معلوم شده که روی به مقدار زیاد درون وزیکول‌های سیناپسی تکمه‌های گلوتامینرژیک هیپوکمپ وجود دارد و همزمان با گلوتامات در این سیناپس‌ها رها می‌شود و فعالیت گیرنده‌های NMDA را تنظیم می کند [۱۱،۸،۴]. مطالعات نشان می‌دهد کاهش روی می‌تواند باعث تخریب حافظه گردد. از طرفی مشخص شده که روی در درون هیپوکمپ عملکرد حافظه فضایی کارکردی رااز بین می‌برد و پیشنهاد می کند که روی برای عملکرد مدارهای عصبی هیپوکمپ ضروری است. این عنصر تحریک گیرنده های NMDA و پاسخ های القایی تولید شده توسط فعالیت گیرنده های گلوتاماتی متابوتروپیک را مهار می کند، در صورتی که تحریک گیرنده AMPA را افزایش می دهد [۲۷]. آزادسازی روی می توانند باعث تنظیم کاهشی گلوتامات از دو مسیرگردد: ۱- مهار آزاد سازی پیش سیناپسی گلو تامات از طریق آزادسازی GABA از درون نورون ها، ۲- کاهش توانایی گلوتامات برای فعال کردن گیرنده های NMDA از طریق واکنش مستقیم با این گیرنده های در سطح غشا پس سیناپسی. تحقیقات نشان می دهد رژیم فاقد روی باعث عملکرد نامناسب مغز مثل تخریب یادگیری می شود [۲۵]. همچنین معلوم شده که کاهش روی می تواندعملکرد مغز را از طریق تغییر در محتویات میانجی های عصبی و فعالیت گیرنده‌ها تغییر دهد [۱۷]. نشان داده شده که موش هایی که به مدت 12هفته تحت رژیم کمبود روی قرارگرفته بودند رفتار یادگیری شان به طور معنی داری تخریب شده بود [۲۴]. بعضی از محققان بیان کرده‌اند که کمبود روی قبل و بعد از تولد باعث تخریب حافظه و یادگیری می شود [۵]. با این وجود نقش روی بر تنظیم فعالیت گیرندهای NMDA به خوبی معلوم نشده است. با توجه به اثرات متفاوت روی برحافظه و یادگیری و به منظور بررسی مکانیسم عملکرد روی برفرایند حافظه و یادگیری در این کار پژوهشی تاثیر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده NMDA در ناحیه CA_1 هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش های صحرایی نر بالغ در حضور و عدم حضور کلرید روی با استفاده از دستگاه استپ دان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این کار پژوهشی تعداد ۸۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰±۱۸۰ گرم از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات قبل از جراحی در گروه‌های ۸ تایی تقسیم شدند و پس از جراحی به طور انفرادی در قفس نگهداری شدند. محل نگهداری حیوانات دارای تاریکی – روشنایی ۱۲ ساعته و دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد بود. همه موش‌ها آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. غذای حیوانات از کارخانه دام و طیور پارس تهران تهیه شدند.

حیوانات قبل از شروع جراحی با داروی کتامین ۱۰درصد (100 mg/kg) و گزیلازین ۲ درصد (10mg/kg) [۱۲] که با یکدیگر مخلوط شده بود و به صورت داخل صفاقی تزریق گردید بیهوش شدند و سپس تحت عملیات جراحی برای کانول گذاری قرار گرفتند. برای کانول گذاری از دستگاه استریو تاکسی ساخت شرکت استولتینگ استفاده گردید. کانول های مورد استفاده عبارت بود از سرسوزن شماره۲۱ که پس ازآماده شدن به صورت یکطرفه در ناحیه CA1 هیپوکمپ قرار گرفتند. مختصات مورد استفاده طبق اطلس پاکسینوس و واتسون عبارت بودند از 3.8 mm AP=-از برگما ,ML=-2.2mm از خط وسط و DV=- 3mm از سطح سخت شامه. میله دندانی 3.3 میلی متر زیر صفرافقی قرار داشت تا مطابق اطلس وضعیت صاف جمجمه حاصل گردد. کانول‌ها توسط سیمان دندانپزشکی و پیچ های کوچک عینک بر روی جمجمه ثابت می شدند. یک هفته پس از جراحی و طی دوره بهبودی، آزمایشات رفتاری آغاز می گردید. در گروه هایی که نیاز به مصرف کلراید روی بود مقدار ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم کلراید روی روزانه به مدت ۲ هفته از طریق آب آشامیدنی به حیوان داده می‌شد بطوریکه

پایان ۱۴ روز همزمان با پایان هفته بهبودی و شروع آزمایشات رفتاری بود. جهت تست رفتاری ازدستگاه استپ دان استفاده گردید. تزریق مواد هرروزبه مدت ۴ روز و از طریق کانول به ناحیه CA1 هیپوکمپ انجام می شد. عمل تزریق از طریق یک سرسوزن شماره ۲۷ دندانپزشکی که توسط یک لوله پلی اتیلین به طول ۲۰ سانتی متر به سرنگ هامیلتون ۱۰میکرولیتری متصل شده بود صورت می گرفت. سرسوزن تزریق به طول مشخصی بریده می شد تا هنگامی که داخل کانول قرار می گیرد درحد ۱ میلی متر از سر کانول بیرون بیاید و به راحتی مواد در ناحیه مورد نظر تزریق و منتشر شود. هر تزریق به آرامی و در طول ۱ دقیقه صورت می گرفت.

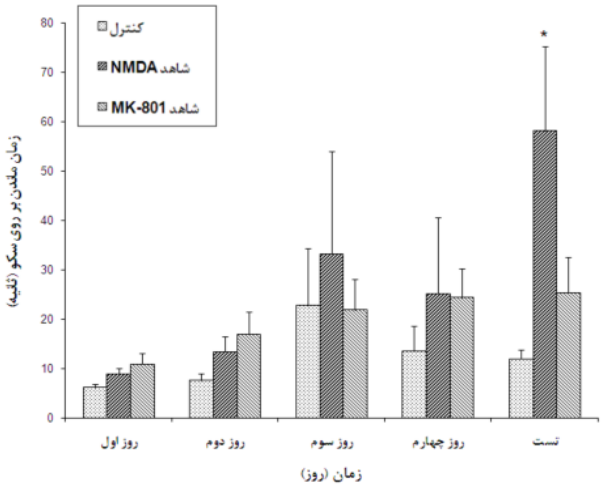
حیوانات به ۱۰ گروه به صورت زیر تقسیم شدند (n=8): ۱- گروه کنترل که هیچ گونه عملیات جراحی بر روی آن‌ها صورت نگرفته بود. ۲- گروه آزمایش NMDA که به مدت ۴ روز هر روز بلافاصله پس از آموزش مقدار ۰/۱ میکروگرم NMDA در حجم ۱ میکرلیتر[۱۶] درهرناحیه CA1 هیپوکمپ دریافت می کردند. ۳- گروه شاهد سرم فیزیولوژی NMDA که هر روز به مدت ۴ روز بلافاصله پس از آموزش مقدار ۱میکرولیتر سرم فیزیولوژی در ناحیه CA1 دریافت می کردند. ۴- گروه آزمایش MK- 801 که به مدت ۴ و هر روز روز ۱۰ دقیقه قبل ازآموزش [۱۹] مقدار ۱ میکروگرم MK- 801 در حجم ۱ میکرولیتر[۱۶] در ناحیهCA1 هیپوکمپ دریافت می کردند. ۵- گروه شاهد MK-801 که به مدت ۴ روز ۱۰ دقیقه قبل از آموزش [۱۹] مقدار ۱میکرولیتر سرم فیزیولوژی در ناحیه CA1 هیپوکمپ دریافت کردند ۶- گروه کنترل که به مدت ۲ هفته روزانه مقدار ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم کلراید روی در۲۵ سی سی آب آشامیدنی دریافت می کردند. گروه‌های ۷، ۸، ۹، ۱۰علاوه بر مصرف 30mg/kg/day کلراید روی به مدت دو هفته دقیقا مشابه گروه های ۲، ۳، ۴، ۵ و به همان مقدار و حجم NMDA و MK-801 و سالین دریافت کردند. سپس همه گروه‌ها به مدت ۴ روز با دستگاه استپ دان آموزش داده شدند و روز پنجم تست حافظه بر روی آن‌ها انجام شد.

دستگاه استپ دان جهت انجام مطالعات یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال مورد استفاده قرار می گیرد. دستگاه استپ دان به شکل جعبه مکعب است با ابعاد۳۰×۳۰×۳۰ سانتی متر و از جنس پلاکسی گلاس می باشد. کف جعبه از میله های استیل ضد زنگ موازی به قطر ۲/۵ میلی مترکه به فاصله ۱ سانتی متر از همدیگر قرار گرفته اند، تشکیل شده است. در موقع آموزش و نیاز به شوک الکتریکی از طریق همین میله‌ها شوک اعمال می شود. در وسط جعبه یک سکوی مدور پلاستیکی (۵ سانتی متربلند از سطح و۷ سانتی متر قطر) قرار گرفته است که پناهگاهی برای موش‌ها جهت فرار از شوک الکتریکی فراهم می کند. این دستگاه دارای یک قسمت کنترل کننده می باشد که با تنظیم آن میزان شوک الکتریکی لازم به پاهای حیوان اعمال می گردد [۴].

۳ روز پیش از آموزش موش های صحرایی به قفس‌های انفرادی منتقل شده و به منظور کاهش استرس ناشی از لمس در طی این ۳ روز کاملاً دستی می شدند همچنین در طی ۴ روز آموزش و روز تست حیوانات هر روز وزن می شدند.

آموزش در دستگاه استپ دان به این صورت انجام می‌گیرد که: الف: جلسات آموزش: در این جلسات هر حیوان به مدت ۴ روز و هر روز یک بار درون دستگاه و برروی سکویی که در وسط دستگاه قرار دارد گذاشته می شد و زمان ماندن حیوان بر روی سکو با کرنومتر اندازه گیری و ثبت می‌گردید. زمانی که حیوان از روی سکو پایین می‌آمد شوک الکتریکی با شدت ۰/۵ میلی آمپر به مدت ۲ ثانیه به او اعمال می شد. حداکثر زمان ماندن بر روی سکو برای هر حیوان ۵ دقیقه در نظر گرفته می‌شد. ب: مرحله به خاطر آوری: پس از گذشت ۲۴ ساعت از انجام جلسات آموزشی به خاطرآوری موش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که موش‌های آموزش دیده مجدداً بر روی سکو قرار داده می‌شدند و زمان ماندن آن‌ها بر روی سکو ثبت می‌شد. در این مرحله به حیوان هیچ شوکی وارد نمی شد. در این تست رفتاری زمان از اهمیت بالایی برخوردار است. هر موش در ساعتی که روزهای قبل آموزش دیده بود باید برای ارزیابی حافظه درون دستگاه قرار میگرفت. در این تحقیق تمام مراحل آموزش و به خاطرآوری در ساعت ۸ تا۱۰ صبح انجام می‌گرفت [۴].

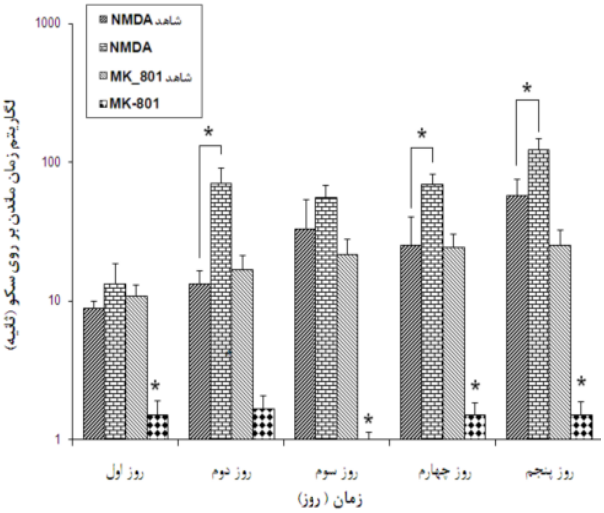
به منظور مقایسه نتایج به دست آمده از آزمون های حداقل تفاوت معنی‌دار (L.S.D)[1]، آنالیز واریانس یکطرفه[2] و آزمون t مستقل[3] موجود در نرم افزار SPSS ver 11.5 استفاده گردید. سطح معنی داری با ***P<0.001 و **P<0.01 و *P<0.05 در نظر گرفته شد.



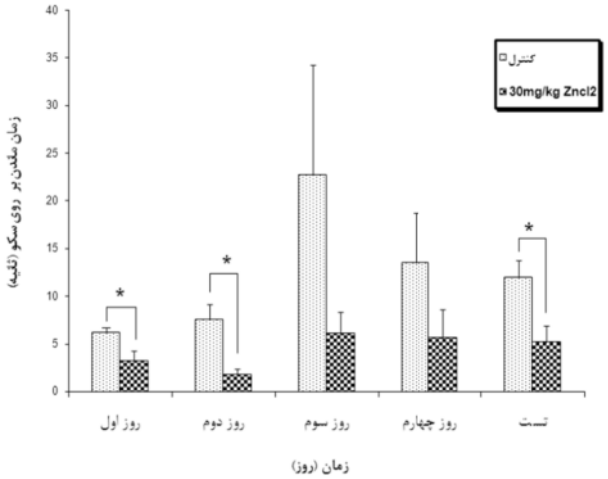
شکل۱- مقایسه میانگین زمان ماندن بر روی سکو در ۴ روز متوالی آموزش و روز تست حافظه درگروه کنترل و گروه شاهد NMDA و شاهد-MK 801در بررسی اثر تزریق داخل هیپوکمپی NMDA و MK-801 بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال موش‌های صحرایی نر بالغ در عدم حضور کلراید روی. $P<0.05$.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که بین گروه کنترل (گروه ۱) و شاهد NMDA (گروه ۳) در روز اول, دوم, سوم, چهارم اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ولی در روز تست اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0.05$) (شکل ۱). مقایسه بین



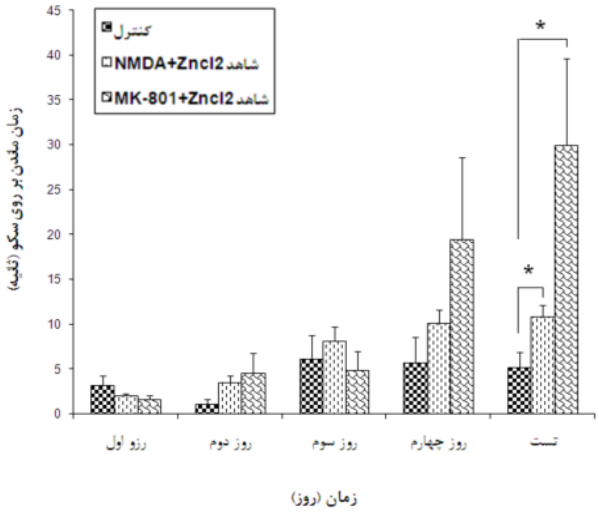
شکل۲- مقایسه میانگین زمان ماندن بر روی سکو در 4 روز متوالی آموزش و روز تست درگروه شاهد NMDA و گروه دریافت کننده NMDA وگروه شاهد MK-801 و گروه دریافت کننده MK-801 در بررسی اثر تزریق داخل هیپوکمپی NMDA و MK-801 بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش‌های صحرایی نر بالغ در عدم حضور کلراید روی $P<0.05$.



شکل۳- مقایسه میانگین زمان ماندن بر روی سکو در 4 روز متوالی آموزش و روز تست در گروه کنترل و گروه دریافت کننده کلراید روی در بررسی اثر داخل هیپوکمپی NMDA و MK-801 در حضور و عدم حضور کلراید روی بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش‌های صحرایی نر بالغ *$P<0.05$.

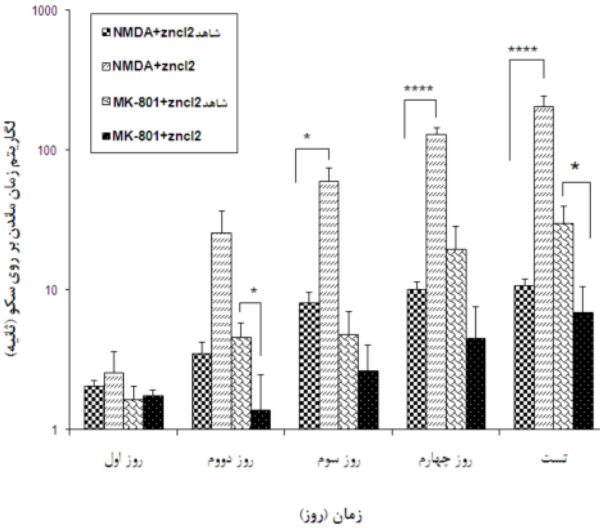
گروه NMDA (گروه ۲) و گروه شاهد (گروه ۳) نشان می‌دهد که بین این دو گروه در روزهای دوم, چهارم و روز تست اختلاف معنی داری وجود دارد. ($P<0.05$)(شکل ۲). NMDA یادگیری وحافظه احترازی غیر فعال را در موش‌های گروه دوم افزایش می‌دهد. از طرفی بین گروه کنترل (گروه ۱) و گروه شاهدMK-801 (گروه ۵) در هیچ یک از ۵ روز اختلاف معنی داری وجود ندارد(شکل ۱). ولی بین گروه دریافت کننده (801 -MKگروه ۴) و گروه شاهد MK-801 (گروه ۵) در هر ۵ روز اختلاف معنی داری وجود دارد ($P<0.05$) (شکل۲). به عبارتی MK-801 قبل از آموزش باعث تخریب یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش های صحرایی نر بالغ می گردد. از طرفی نتایج مربوط به گروه کنترل (گروه ۱) و گروه دریافت کننده 30mg/kg کلراید روی (گروه ۶) نشان داد که بین این دو گروه در روزهای سوم و چهارم تفاوت معنی داری وجود ندارد اما در روزهای اول و دوم و روز تست اختلاف معنی داری ($P<0.05$) مشاهده شده است (شکل ۳) و نشان می دهد که مصرف کلراید روی باعث تخریب یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش‌های صحرایی نر بالغ می گردد.

اما بررسی‌های آماری و نتایج مربوط به اثر تزریق داخل هیپوکمپی آگونیست و آنتاگونیست گیرنده NMDA بر روی یادگیری حافظه احترازی غیر فعال موش‌های صحرایی نر بالغ در حضور کلراید روی نشان می‌دهد که بین گروه دریافت کننده

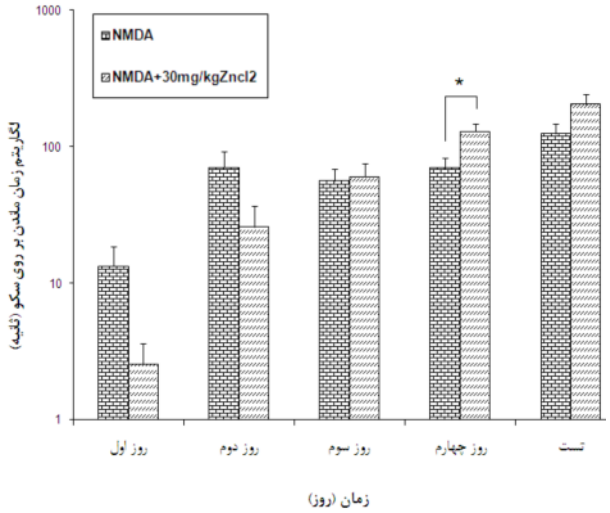


شکل۴- مقایسه میانگین زمان ماندن بر روی سکو در 4 روز متوالی آموزش و روز تست درگروه کنترل وشاهد NMDA و شاهدMK801 دربررسی اثر تزریق داخل هیپوکمپیNMDA و MK-801 بر یادگیری و حافظه احترازی غیرفعال در موش‌های صحرایی نر بالغ درحضور کلراید روی. سطح معنی‌داری عبارت است از:P<0.05

کلراید روی (گروه ۶) و گروه شاهد NMDA و کلرید روی (گروه ۸) در روز اول ,دوم ,سوم و چهارم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ولی در روز تست اختلاف معنی‌داری (P<0.05) وجود دارد (شکل ۴). از طرفی بین گروه دریافت کننده $ZnCl_2$+NMDA (گروه ۷) و گروه شاهد NMDA +$ZnCl_2$ (گروه ۸) در روزهای



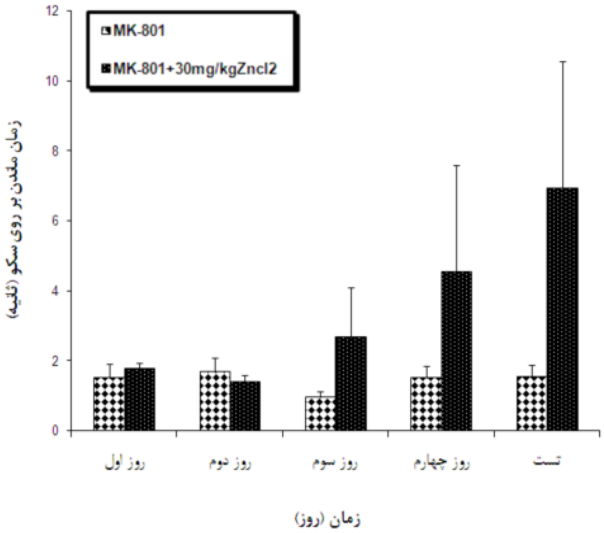
شکل۵- مقایسه میانگین زمان ماندن بر روی سکو در 4 روز متوالی آموزش و روز تست درگروه شاهد NMDA و گروه دریافت کننده NMDAوگروه شاهد MK-801 و گروه دریافت کننده MK-801 در بررسی اثر تزریق داخل هیپوکمپی NMDA وMK-801 بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش‌های صحرایی نر بالغ در حضور کلراید روی* P<0.05 و ****P<000.



شکل۶- مقایسه زمان ماندن بر روی سکو در 4 روز آموزش و تست در گروه دریافت کننده NMDA در حضور و عدم حضور کلراید روی بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش‌های صحرایی نر بالغ. سطح معنی‌داری عبارت است از *P<0.05

اول و دوم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ولی در روزهای سوم, چهارم و روز تست اختلاف معنی‌داری (P<0.05) و (P<0.001) مشاهده شد (شکل ۵). این نتایج نشان می‌دهد که تزریق داخل هیپوکمپی NMDA اثرات تخریبی ناشی از مصرف کلراید روی برحافظه ویادگیری را از بین می‌برد و باعث افزایش یادگیری و حافظه در موش های نر بالغ در این گروه می‌شود. همچنین مقایسه دو گروه MK-801+$ZnCl_2$ (گروه ۹) و گروه شاهد MK-801+$ZnCl_2$ (گروه ۱۰) و نشان می‌دهد که بین این دو گروه در روز اول , سوم و چهارم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. اما در روزهای دوم و تست تفاوت معنی‌دار (P<0.005) است (شکل۵).

به این معنی که MK-801 باعث افزایش اثرات تخریبی کلراید روی بر فرایند یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال می‌شود. آنالیز واریانس یکطرفه در گروه‌های ۶ تا ۱۰ نشان می‌دهد که در روز دوم و سوم وچهارم و تست بین گروه دریافت کننده NMDA و کلراید روی با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌دار است(P<0.05). از طرفی به منظور بررسی اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده NMDA در حضور و عدم حضور کلراید روی مقایسه ایی بین دو گروه دریافت‌کننده NMDA (گروه ۲) و گروه دریافت کننده NMDA و کلراید روی (گروه ۷) صورت گرفت و نتایج نشان داد که در روز چهارم تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود دارد (P<0.05) (شکل ۶). به عبارتی تجویز توام



شکل۷- مقایسه زمان ماندن بر روی سکو در 4 روز آموزش و تست در گروه دریافت کننده MK-801 در حضور و عدم حضور کلراید روی بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال موش‌های صحرایی نر بالغ. سطح معنی داری عبارت است از *P<0.05

NMDA و روی باعث افزایش یادگیری و حافظه در موش‌های صحرایی نر بالغ می‌گرد. اما آنالیز داده‌ها بین گروه دریافت کننده MK-801 (گروه ۵) و گروه دریافت کننده MK-801 وکلراید روی (گروه ۹) نشان داد که در هیچ کدام از روزها بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۷). از بررسی نتایج چنین استنباط می شود که مصرف روی باعث تخریب حافظه و یادگیری در موش های صحرایی نر بالغ می گردد و این اثرات تخریبی در حضور آگونیست و آنتاگونیست گیرنده NMDA تحت تاثیر قرار می‌گیرد.

بحث

به منظور بررسی مکانیسم اثرکلراید روی بر فرایند یادگیری و حافظه و با توجه به نقش گیرنده NMDA در یادگیری ابتدا اثر تزریق داخل هیپوکمپی ان – متیل دی – آسپارتات (آگونیست گیرنده NMDA) و MK-801 (آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA) بر فرایند یادگیری و حافظه در موش های صحرایی نر بالغ باروش احترازی غیر فعال و با استفاده از دستگاه استپ دان مورد مطالعه قرار گرفت. به دنبال آن اثر تزریق داخل هیپوکمپی آگونیست و آنتاگونیست گیرنده NMDA و مصرف خوراکی روی بر فرایند یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال بررسی گردید. نتایج نشان داد که بین گروه دریافت کننده NMDA و گروه شاهد آن در روزهای دوم، چهارم و تست اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) وجود دارد و نشان می دهد که آگونیست گیرنده NMDA باعث افزایش یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش های صحرایی نر بالغ می گردد و موید گزارشاتی است که نشان می دهد تزریق داخل هیپوکمپی (CA_1) مقادیر مختلف NMDA باعث افزایش حافظه می گرددو بیان می کند که فعالیت گیرنده NMDA به طور مستقیم در مکانیسم های اولیه تسهیل سیناپسی در شکل گیری حافظه نقش دارد [۱۶].

از طرفی نتایج مربوط به تزریق داخل هیپوکمپی (CA_1) MK-801 نشان می دهد که بین گروه دریافت کننده MK-801 وگروه شاهد آن در هر پنج روز اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0.05$) و موید این مطلب است که MK-801 سبب کاهش یادگیری و حافظه در موش‌های صحرایی نر بالغ در روش احترازی غیر فعال می گردد. تحقیقات بسیاری نیز این نکته را تایید می کند [۱۰،۱۶]. در بخش دوم این کار پژوهشی اثرات آگونیست و آنتاگونیست گیرنده NMDA در حضور 30mg/kg کلراید روی بررسی کردیم.

مقایسه دو گروه کنترل و گروه که30 mg/kg کلراید روی در آب آشامیدنی دریافت کرده‌اند نشان می دهد که در روزهای اول و دوم یادگیری وروز تست حافظه، اختلاف معنی داری ($P<0.05$) بین دو گروه وجود دارد که نشان دهنده این مطلب است که مصرف روی باعث تخریب یادگیری و حافظه در موش‌ها ی صحرایی نر بالغ با استفاده از روش احترازی غیر فعال شده است. بسیاری از تحقیقات نشان دهنده اثرات زیان آور مصرف روی برفرایند یادگیری و حا فظه هستند. روی به عنوان یک تنظیم کننده عصبی گیرنده های NMDA را مهار می‌کند و مهار گیرنده NMDA باعث تخریب حافظه فضایی در موش‌های صحرایی و موش‌های سوری میگرد [۱۳،۲۸]. فیلین و همکاران در سال2005 نشان دادند که مصرف $ZnCO_3$ در آب آشامیدنی به مدت طولانی سبب اختلال در حافظه فضایی در ماز آبی موریس در موش های نژاد اسپراگ– داولی می شود و باعث تغییر در مقادیر مغزی روی میگردد [۶]. همچنین تامی و همکاران در سال 2000 نشان دادند که مصرف 50 mg/kg و100 mg/kg کلراید روی باعث کاهش حافظه فضایی در

دستگاه ماز آبی موریس در موش های صحرایی نر بالغ نژاد اسپراگ- داولی میگردد [۲۷]. به نظر می رسد که روی کانال‌های کلسیمی پایانه های عصبی را مهار می‌کند و به این ترتیب منجر به مهار برقراری پتانسیل طولانی مدت (LTP) می‌شود و در نتیجه فراوانی پتانسیل پس سیناپسی تحریکی (EPSP) که منجر به آزادسازی گلوتامات می شود، کاهش می یابد [۹،۲۷]. همچنین معلوم شده که در بیماری آلزایمر تعادل روی در مغز به هم می‌خورد و غلظت روی در پلاک‌های مربوط به بیماری آلزایمر افزایش می‌یابد [۲۳]. معلوم شده که مصرف روزانه ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کلراید روی باعث بهبود حافظه در موش‌های جوان نژاد ویستار گردیده است [۲۰]. مطالعات نشان می دهد که حساسیت گیرنده NMDA به اثر مهاری روی به زیر واحدهای آن بستگی دارد. زیر واحد NR_1/NR_2A دو هزار برابر حساسیت بیشتری به روی نسبت به زیر واحد NR_1/NR_2B دارند. کمپلکس NR_1/NR_2B بیشتر در مغز موش‌های نابالغ حضور دارد در صورتی که NR_1/NR_2A جایگزین آن در مغز موش‌های بالغ گردیده است [۳،۱۷].

همچنین بیان شده که مهار وابسته به ولتاژگیرنده های NMDA توسط روی در همه زیرواحدهای گیرنده NMDA به طور یکسان وجود دارد. اما مهارغیر وابسته به ولتاژ گیرنده NMDA توسط روی در زیر واحد NR_1/NR_2A ۵۰ برابر بیشتر است در مقایسه با زیر واحد NR_1/NR_2B بنا براین زیر واحد NR_1/NR_2A توسط غلظت‌های کم روی مهار می شود [۱۵] واین مطلب نشان میدهد که مصرف 30 mg/kg کلراید روی در موش‌های بالغ سبب تخریب حافظه می گردد در حالی که مصرف همین دوز در موش‌های جوان باعث افزایش حافظه می‌گردد [۲۰]. به منظور بررسی مکانیسم اثرکلراید روی بر فرایند یادگیری و حافظه همزمان با مصرف 30 mg/kg کلراید روی به صورت روزانه آگونیست ویا آنتا گونیست گیرنده NMDA در ناحیه CA1 هیپوکمپ تزریق گردید. مقایسه گروه دریافت کننده کلرید روی و NMDA (گروه ۷) با گروه شاهد آن (گروه ۸) نشان داد که بین دو گروه در روزها ی سوم و چهارم و روز تست تفاوت معنی‌داری ($p<0.05$) و ($p<0.001$) وجود دارد که موید این مطلب است که تجویز مرکزی NMDA اثرات تخریبی ناشی از مصرف کلراید روی را از بین می برد و باعث بهبود یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در دستگاه استپ دان می شود. همچنین مقایسه گروه دریافت کننده توام کلراید روی و MK -801 (گروه ۹) با گروه شاهد آن (گروه ۱۰) نشان می دهد که بین این دو گروه در روزهای دوم و تست تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<0.05$) و نشان می‌دهد کهMK-801 اثرات تخریبی ناشی از مصرف کلراید روی بر یادگیری و حافظه افزایش می دهد. همچنین مشخص شد که گروه دریافت کننده $NMDA+ZnCl_2$ در مقایسه با گروه NMDA به تنهایی عملکرد شناختی بهتری را نشان می دهند به عبارت دیگر تجویز توام کلراید روی و NMDA باعث بهبود بهتری در یاد گیری و حافظه موش های صحرایی نر بالغ میگرد. اما مقایسه دو گروه دریافت کننده توام MK-801 و کلراید روی و گروه دریافت کننده MK-801 به تنهایی تفاوت معنی داری را در هیچ یک از روزهای یادگیری و حافظه نشان نمی دهد. گزارشات نشان میدهد که تحریک گیرنده‌های NMDA و پاسخ‌های القائی توسط فعالیت گیرنده‌های متابوتروپیک می‌تواند بوسیله روی مهار شود [۲۷]. بیان شده که آزاد سازی همزمان روی با گلوتامات توانایی گلوتامات را برای فعال کردن پس سیناپس گیرنده های NMDA کاهش میدهد [۲۲،۲۱]. تحقیقات بیان می‌کند که گیرنده NMDA دارای دو جایگاه برای روی است. یک جایگاه با میل ترکیبی کم در درون کانال NMDA و یک جایگاه با میل ترکیبی زیاد در بیرون از کانال NMDA [۲۲،۷]. آزادسازی همزمان روی با گلوتامات از وزیکول های سیناپسی نورون های غنی از روی، ممکن است در تنظیم جریانات سیناپسی تحریکی وابسته به گیرنده NMDA درگیرباشد [۲۱] از طرفی روی عملکرد گیرنده NMDA را توسط دو مکانیسم مهار می‌کند: ۱. مکانیسم وابسته به ولتاژ با میل بالا ۲. مکانیسم غیر وابسته به ولتاژ با میل کم [۲۸،۲۶،۲۱] .کسپر وگت و همکارانش در سال ۲۰۰۰ پیشنهاد کردند که روی خارج سلولی عملکرد گیرنده NMDA را مهار می کند[۲۸]. تمامی این گزارشات موید نتایج به دست آمده در این کار پژوهشی است. تزریق مرکزی NMDA باعث باز شدن کانال NMDA و از بین رفتن اثرات مهاری روی می گردد. تحقیقات نشان می دهد که روی فقط در پتانسیل غشایی منفی آزاد می‌شود و فعالیت گیرنده NMDA را در بخش بزرگی از جایگاههای اتصال وابسته به ولتاژ در درون کانال مهار می‌کند [۲۱]. از طرفی نتایج تحقیقات مولنر نشان می‌دهد که آزادسازی روی ممکن است

یک عمل مهاری اضافی با میل بالا در جایگاه غیر وابسته به ولتاژ در بیرون از کانال باشد که فاقد اثر مهاری بر روی جریانات سیناپسی است که توسط گیرنده NMDA در پتانسیل‌های غشایی مثبت تعدیل می‌شود [۲۲]. کسپرنشان داد که زیر واحد NR_2A در موش‌های بالغ بیشتر از موش‌های جوان وجود دارد و در مهار غیروابسته به ولتاژ با میل بالا برای روی نقش دارد [۲۸]. با توجه به گزارشات موجود و نتایج حاصل از این کار پژوهشی چنین استنباط می‌شود که روی در یک مکانیسم وابسته به سن برروی زیر واحدهای گیرنده‌های NMDA اثرمی گزارد و به این ترتیب عملکرد یادگیری و حافظه را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

منابع

[۱] معاضدی احمد علی ، هویدا ریحانه ، راسخ عبدالحمن ، اثر تزریق استرادیول بنزوات در نواحی CA_1 هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه فضایی در موش های صحرایی نر بالغ در حضور و عدم حضور غدد جنسی. ***فیزیولوژی فارماکولوژی***، ۵(۱۳۸۰) ۷۷-۸۳.

[2] Brown CE , Dyck RH , Modulation of synaptic zinc in barrel cortex by whisker stimulation**.** ***Neuroscience*** 134 (2005) 355-9.

[3] Chen N, Moshaver A, Ramond LA , differential sensitivity of recombinant N-methyl – d-aspartatereceptor subtype to zinc inhibition. ***Mol Pharm*** 51 (1997) 1015-1023.

[4] Chen Yi –Gong , Specific tau phosphorylation sites in hippocampus correlate with impairment of step-down inhibitory avoidance task in rats. ***Behav Brain Res*** 158 (2005) 277-284.

[5] Chowanadisai W, Kelleher SL, Lonnerdal B, Maternal zinc deficiency reduces NMDA receptor expression in neonatal rat brain, which persist into early adulthood. ***J Neurochem*** 94 (2005) 510-519.

[6] Chrosniak LD, Smith LN, Mc Donald CG, Jones BF, Flinn JM, Effects of enhanced zinc and copper in drinking water on spatial memory and fear condition. ***J Geochem Explor*** 88 (2006) 91-94.

[7] Christine CW, Choi DW, Effects of zinc on NMDA receptor mediataed channel currents in cortical neurons. ***Neuroscience*** 10 (1990) 108-116.

[8] Cohen-Kfir E, Lee W, Nelson N, Zinc inhibition of gamma-amino butyric acid transporter 4 (GAT4) reveals a link between excitatory and inhibitory neurotransmission. ***Proc Natl Acad Scie USA*** 102 (2005) 6154-6159.

[9] Cole TB, Martyanova A, Palmiter RD, Removing zinc from synaptic vesicles dose not impair spatial learning, memory or sensory motor function in the mouse. ***Brain Res*** 891 (2001) 253-265.

[10] De Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N, Pre-or post- training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. ***Behav Brain Res*** 156 (2005) 139-143.

[11] De oliveria FS, Viana MR, Antoniolli AR, Marchioro M, Differential effects of lead and zinc on inhibitory avoidance learning in mice. ***Biol Med Behav*** 34 (2001) 117-120.

[12] Flecknell PA. Laboratory animal anesthesia. U.S. academic press Inc, 1996.

[13] Filinn JM , Hunter D , Kinkous DH , Lanzirotti A , Smith LN , Enhanced zinc consumption causes memory deficits and increased brain levels of zinc**.** ***Physiol Behav*** 83 (2005) 793-803.

[14] Halas ES, Diers MA, Sandstead HH, Learning and memory impairment in adult rats due to sever zinc deficiency during lactation**.** ***Physiol Behav*** 30 (1983) 371-381.

[15] Herin AG, Aizenman E, Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. ***Pharmacology*** 500 (2004) 101-111.

[16] Jafari-sabet M, NMDA receptor blockers prevents the faciliatory effects of post – training intra dorsal hippocampal NMDA and physostigmin on memory retention of passive avoidance learning in rats. ***Behav Brain Res*** 169 (2006) 120-127.

[17] Keller KA, Grider A, Coffield JA, Age dependent influence of dietary zinc restriction on short term memory in male rats. ***Physiol Behav*** 72 (2001) 339-348.

[18] Levin ED, Skdge D, Baruah A, Addy AN, Ventral hippocampal NMDA blocked and nicotinic effects on memory function. **Brain Res** 61 (2006) 489-495.

[19] Li-sha XV , Yang LX , Wei-Wei HU , Xiao YU , Li MA , Ying LV, Histamine ameliorates spatial memory deficits ivduced by MK-801 in to ventral hippocampus as evaluated by radial maze task in rats. ***Acta Pharma Sin***

26 (2005) 1448-1453.

[20] Moazedi AA, Ghotbedin Z, Parham GH, Comparison of the effects of dose dependent zinc chloride on short term and long term memory in young male rats. ***J Bio Sci*** 10 (2007) 2704-2708.

[21] Mocchegiani E, Freddari CB, Marcellini F, Malavolta M, Brain aging and neurodegeneration: Role of zinc ion availability. ***Prog Neurobiol*** 75 (2005) 367-390.

[22] Molnar P, Nader JV, Synoptically released zinc inhibits N-methyl D- aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. ***Brain Res*** 910 (2001) 205-207.

[23] Robertson JD, Crafford AM, Markeshery WB, Lovell MA, Disruption of zinc homoestasis in Alzheimer disease**.** ***Physiol Res*** 189 (2002) 454-458.

[24] Takeda A, Takefuta S, Takefuta S, Okada SH, Oku N, Relationship between brain zinc and transient learning impairment of adult rats fed zinc–deficiencent diet. ***Brain Res*** 859 (2000) 352-357.

[25] Takeda A, Movement of zinc and its functional significance in the brain. ***Brain*** 34 (2000) 137-148.

[26] Traynelis SF, burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL, Control of voltage–independent zinc inhibition of NMDA receptor by the NR_1 subunit. ***Neuroscience*** 18 (1998) 6163-6175.

[27] Turner TY, Soliman M, Effects of zinc on spatial reference memory and brain dopamine (D_1) receptor binding kinetics in rats. ***Neuropsychopharmacology*** 24 (2000) 1203-1217.

[28] Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R, The action of synoptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. ***Neuron*** 26 (2004) 187-196.

Physiology and Pharmacology, 12 (3), 245 - 253
Fall 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Zinc impairs learning and memory by modulating nmda receptors in hippocampal CA1 region in rats

Zohre Valizadeh [1*], Ahmad ali Moazedi [1], Gholam ali Parham [2]

1. Dept. Biology, School of Sciences, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran
2. Dept. Statistics, School of Mathematics, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran

Received: 5 Mar 2008 **Revised: 23 Aug 2008** **Accepted: 25 Aug 2008**

Abstract

Introduction: Zinc is an essential trace element that plays an important role in the synaptic plasticity and modulation of the CNS activity and is also involved in learning and memory. Synaptic vesicle zinc in the hippocampus area exerts modulatory effects on NMDA glutamate receptors.

Methods: In this study, the effects of intra hippocampal administration of NMDA agonist and antagonist in the presence and absence of $ZnCl_2$ was investigated on passive avoidance learning and memory by using step down task in adult male rats. Animals were divided into 10 groups (n = 8 each group). Control group, second group received NMDA 0.1 µg/rat in 1 µl saline for 4 days. Sham group received saline with the same volume. Fourth group received MK-801 1 µg/rat in 1 µl saline 10 min before training for 4 days. Sham group received saline in the same volume. Groups 6-10 received 30 mg/kg/day $Zncl_2$ in drinking water for 2 weeks. Sixth group received only $ZnCl_2$, but groups 7, 8, 9, and 10 received drug and saline in the same conditions as groups 2, 3, 4 and 5 in addition to $ZnCl_2$ in their drinking water.

Results: Our experiments showed that consumption of 30 mg/kg/day $ZnCl_2$ impaired learning and memory in adult male rats ($P < 0.05$). Administration of NMDA improved the impairments caused by $ZnCl_2$ consumption ($P < 0.05$), while the administration of MK-801 increased the impairments.

Conclusion: It seems that zinc impairs passive avoidance learning and memory by modulating the subunits of NMDA receptors in hippocampus.

Keywords: zinc chloride, hippocampus, passive avoidance learning, step down.

* Corresponding author e- mail: valizadeh_z@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj