

یادگیری فضایی در ماز آبی موریس، شاخصی برای بررسی استعداد ایجاد کیندلینگ شیمیایی در موش‌های صحرائی نر

دانشور

پزشکی

نویسندگان: دکتر محمد رضا پالیزوان^{۱*} و احسان‌اله غزنوی‌راد^۲

۱. استادیار و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک

۲. مربی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک

Email: palizvan@yahoo.com

*نویسنده مسئول: دکتر محمدرضا پالیزوان

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین اختلال در یادگیری فضایی و استعداد ابتلا به کیندلینگ شیمیایی در موش صحرائی است.

روش بررسی: ۱۶ موش صحرائی نر از نژاد ویستار (Wistar) برای ارزیابی یادگیری فضایی آن‌ها در ماز آبی موریس مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس تمام موش‌ها برای ایجاد کیندلینگ تحت تزریق داخل صفاقی پنتیلین تترازول (۳۷/۵ mg/kg) قرار گرفته، پاسخ‌های تشنجی حیوان ثبت و مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون correlation و آزمون Pearson انجام گرفت. یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق، نشان دهنده ارتباط معنادار بین میزان یادگیری در ماز آبی موریس و برخی از پارامترهای تشنجی، از قبیل مرحله حمله، تعداد تحریکات لازم برای ایجاد مرحله پنج تشنج در حیوانات و مدت زمانی بود که حیوانات در مرحله پنج تشنج به سر می‌برند.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های به دست آمده می‌توان میزان استعداد موش‌های صحرائی نر را برای کیندلینگ شیمیایی با پنتیلین تترازول از روی میزان اختلال در یادگیری فضایی آن‌ها در ماز آبی موریس مورد ارزیابی قرار داد.

واژه‌های کلیدی: یادگیری فضایی، هیپوکمپ، کیندلینگ، پنتیلین تترازول

دوماهنامه علمی - پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال چهاردهم - دوره جدید

شماره ۶۹

تیر ۱۳۸۶

وصول: ۸۴/۱۲/۱۴

ارسال اصلاحات: ۸۵/ ۴/۱۰

دریافت اصلاحات: ۸۵/ ۶/۲۸

پذیرش: ۸۵/ ۷/۳۰

مقدمه

صرع یکی از اختلالات عصبی مزمن در انسان است. این بیماری در مجموع، به وسیله حملات متناوب حرکتی، حسی، اتونومیک و یا روانی مشخص می‌گردد [۱] و در حدود ۵۰ میلیون نفر در دنیا به آن مبتلا هستند [۲]. برای مطالعه صرع از مدل‌های آزمایشگاهی مختلفی، از جمله مدل کیندلینگ استفاده می‌شود. در این مدل، با تحریک مکرر یک ناحیه مغزی به وسیله محرک الکتریکی و یا شیمیایی - که در ابتدا قادر به ایجاد تشنج نیست - در حیوان تشنج ایجاد می‌کنند [۲-۴]. از مهمترین کانونهای ایجاد کننده صرع در انسان و موش می‌توان به هیپوکامپ اشاره کرد [۵، ۶]. تحقیقات نشان داده که تحریک این ناحیه برای ایجاد کیندلینگ نیاز به تحریکات کم‌تر دارد و از طرف دیگر نقش این ناحیه از مغز در یادگیری فضایی به اثبات رسیده است [۷]. به این ترتیب به نظر می‌رسد اختلال در مدارهای نورونی این مرکز می‌تواند زمینه ساز ابتلای حیوان برای تشنج باشد. از طرف دیگر، تحقیقات نشان داده‌اند که به دنبال تشنج در هیپوکامپ (چه به شکل طبیعی و چه به شکل مصنوعی با ایجاد کیندلینگ هیپوکامپ) مدارهای نورونی این ناحیه دچار اختلال می‌گردند و معمولاً این اختلال با اختلال در یادگیری فضایی همراه است [۸].

بنابراین اگر بتوان قبل از بروز علائم صرع در افراد، از وجود استعداد ذاتی آن‌ها برای تشنج و صرع آگاه شد این امر می‌تواند در جلوگیری از بروز حملات تشنجی و بروز عوارض جانبی ناشی از آن بسیار مفید باشد. به این ترتیب، هدف از این تحقیق، بررسی وجود ارتباط بین یادگیری فضایی در ماز آبی موریس و استعداد ابتلا به کیندلینگ شیمیایی در موش‌های صحرایی نر است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده، بر روی موش‌های صحرایی انجام گرفته است. در این تحقیق ۱۶ موش صحرایی نر از نژاد ویستار (Wistar) با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در شروع آزمایش که در شرایط ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد گرما و سیکل روشنایی خاموشی ۱۲ ساعت (۷ صبح تا ۷ شب روشن و ۷ شب تا ۷ صبح تاریک) نگهداری می‌شدند تحت آزمایش قرار گرفتند. به جز در هنگام آزمایش آب و

غذا به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داشت و هر چهار حیوان در یک قفس نگهداری می‌شدند.

آزمایش‌های رفتاری

ساختمان ماز آبی

به منظور بررسی میزان یادگیری فضایی حیوانات، ماز آبی موریس مورد استفاده قرار گرفت. ماز آبی از یک مخزن آب استوانه‌ای سیاه رنگ (به قطر ۱۴۰ سانتی متر و ارتفاع ۶۰ سانتی متر) تشکیل شده است که تا ارتفاع ۳۲/۵ سانتی متری از آب پر شده است. دمای آب، هم‌دمای اتاق آزمایشگاه و برابر با ۲۲ درجه سانتی‌گراد بود. یک سکوی قابل تغییر به ارتفاع ۳۰ سانتی متر (پایه پایینی که در کف استخر قرار می‌گرفت ۳۰ سانتی متر و پایه بالایی که محل قرارگیری موش بود ۱۰ سانتی متر قطر دارد) و به رنگ سیاه در یک جایگاه مشخص از استخر قرار داده می‌شد، به شکلی که به اندازه ۲/۵ سانتی متر زیر آب قرار می‌گرفت. استخر در اتاقی قرار گرفته بود که اشکالی در خارج از ماز بر روی دیوار آن نصب بود و در هنگام آزمایش، شخص آزمایش کننده همیشه در یک جا می‌ایستاد. در طول آزمایش‌ها، حرکات حیوان توسط دوربین ویدیویی که درست در بالای ماز قرار داشت ثبت می‌شد و در پایان آزمایش‌ها، رفتار حیوان در ماز مورد اندازه‌گیری قرار می‌گرفت [۹].

چگونگی انجام آزمایش‌ها در ماز آبی

کل آزمایش، شامل چهار روز آموزش و یک روز آزمون بود. در هر روز، آموزش شامل چهار بار رها کردن حیوان در ماز آبی بود. برای انجام این کار، همان‌گونه که در شکل ۱ نیز دیده می‌شود، ماز به چهار قسمت مساوی تقسیم شد.

به این ترتیب در اطراف ماز، چهار نقطه شمال، جنوب، مغرب و مشرق ایجاد می‌شد که در هر بار رها کردن حیوان در آب، موش از یکی از این نقاط به داخل آب رها می‌شد. این نقاط به شکل اتفاقی انتخاب می‌شدند؛ با این تذکر که در هر روز از هر چهار نقطه A، B، C، D برای رها کردن موش‌ها به داخل استخر استفاده می‌شد. در ابتدای آزمایش، موش به مدت ۱۰ ثانیه بر روی سکو قرار می‌گرفت.

چهارم) افتادن به پهلو و مرحله پنجم) افتادن به پشت و حملات عمومی تونیک و کلونیک. فعالیت‌های تشنجی در طول بیست دقیقه پس از تزریق PTZ ازریابی شدند. پس از اولین تزریق بعضی از موش‌ها مراحل اول و یا دوم تشنج را از خود نشان دادند. با ادامه تزریقات، به تدریج تشنج در موش‌ها پیشرفت کرد.

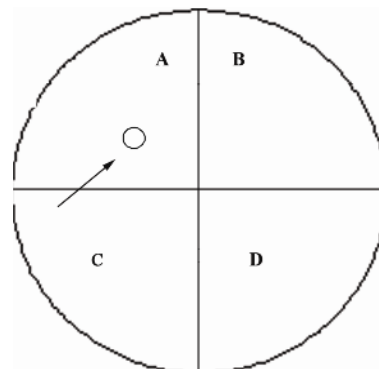
روش‌های آماری

در این تحقیق برای مقایسه کمیت‌های مختلف، پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirin از آزمون Correlation و پس از آن از آزمون Pearson استفاده شد.

در طول آزمایش‌ها نحوه کار با حیوانات بر اساس دستورالعمل کنترل و نظارت بر حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است.

یافته‌ها

در ابتدا لازم به توضیح است که چون برخی از حیوانات، مرحله پنج تشنج را تا پایان آزمایش‌ها از خود نشان ندادند، و در حقیقت برای این گروه از حیوانات مدت زمان و تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مرحله پنج تشنج «بی‌نهایت» خواهد بود برای وارد کردن اطلاعات مربوط به این دسته از حیوانات از معکوس مدت زمانی و تعداد تحریکاتی که طول می‌کشد تا حیوان به مرحله پنج تشنج برسد استفاده شد. بررسی جریان کیندلینگ در حیوانات نشان داد که در پایان تزریقات، چهار حیوان وارد مرحله پنج تشنج نشدند. بررسی نتایج ارتباط یادگیری فضایی در ماز آبی موریس و استعداد ابتلا به کیندلینگ شیمیایی با پتیلن تترازول، با استفاده از آزمون پیرسون (Pearson) نشان داد که ارتباط مثبت معناداری بین مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان سکو را در روز اول آموزش پیدا کند با مدت زمانی که حیوان در مرحله پنج تشنج به سر می‌برد وجود دارد ($p < 0/05$). به این ترتیب، هرچه مدت زمانی که حیوان در مرحله پنج تشنج به سر می‌برد بیشتر باشد حیوان مدت زمان بیشتری را برای پیدا کردن سکو در روز اول صرف کرده و به عبارت دیگر، میزان یادگیری فضایی کم‌تر بوده است (نمودار ۱). مقایسه معکوس مدت زمانی که طول می‌کشد تا پس از تزریق

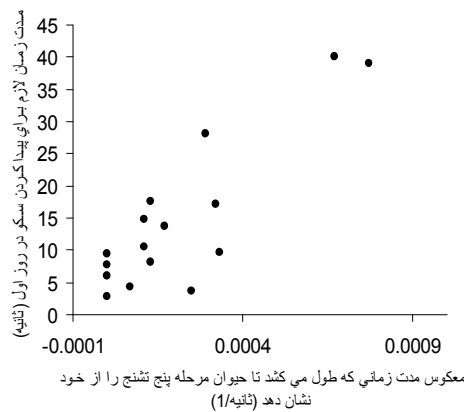


شکل ۱ نمایی از ماز آبی موریس. همان‌گونه که در شکل دیده می‌شود ماز آبی به چهار قسمت مساوی تقسیم می‌شود که سکو در یکی از این قسمت‌ها قرار دارد.

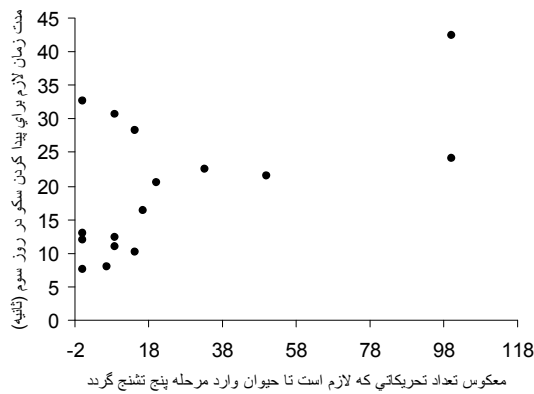
سپس از استخراج خارج و پس از یک دقیقه از یکی از نقاط مورد نظر در استخراج رها می‌شد. موش ۶۰ ثانیه برای پیدا کردن سکو وقت داشت. اگر در این مدت سکو را پیدا می‌کرد به او اجازه داده می‌شد تا ۱۰ ثانیه بر روی سکو قرار گیرد و اگر در این مدت قادر به پیدا کردن سکو نبود به آرامی با دست به طرف سکو راهنمایی می‌شد. پس از پیدا کردن سکو به او اجازه داده می‌شد تا ۱۰ ثانیه بر روی سکو قرار گیرد و سپس از استخراج خارج می‌شد. در پایان آزمایش‌ها در هر روز، حیوان به آرامی توسط حوله خشک و به قفس برگردانده می‌شد. در روز پنجم، سکو از داخل استخراج خارج گردید و هر کدام از حیوانات از نقطه B به داخل استخراج گذاشته شد. در مدت ۶۰ ثانیه حضور حیوان در استخراج، مدت زمانی که حیوان در هر ۱۵ ثانیه در یک چهارم هدف (یک چهارم از استخراج که سکو در آن قرار داشت) شنا می‌کرد اندازه‌گیری شد [۹].

ایجاد کیندلینگ در حیوانات

۴۸ ساعت پس از پایان آزمایش‌ها در ماز آبی موریس حیوانات، به منظور ایجاد کیندلینگ شیمیایی، داروی پتیلن تترازول (PTZ) با غلظت (۳۷/۵ mg/kg) به شکل داخل صفاقی هر ۴۸ ساعت یک‌بار [۱۰] به موش‌ها تزریق شد. پس از تزریق دارو، رفتارهای حیوان برای مدت ۲۰ دقیقه تحت نظر گرفته شد و پاسخ‌های تشنجی حیوان بر اساس تحقیقات قبل [۱۱، ۱۲] به شکل زیر طبقه بندی گردید: مرحله صفر = عدم پاسخ؛ مرحله اول) انقباض عضلات صورت و گوش‌ها؛ مرحله دوم) موج انقباضی بدن؛ مرحله سوم) پرش‌های میوکلونیک و ایستادن روی دو پا؛ مرحله



نمودار ۲ ارتباط معنادار بین معکوس مدت زمانی که طول می‌کشد حیوان مرحله پنج تشنج را از خود نشان دهد با زمان لازم برای پیدا کردن سکو در روز اول آموزش در ماز آبی موریس با استفاده از آزمون پیرسون و $p < 0/05$.



نمودار ۳ ارتباط معنادار بین معکوس تعداد تحریکاتی که لازم است حیوان وارد مرحله پنج تشنج گردد با زمان لازم برای پیدا کردن سکو در روز سوم آموزش در ماز آبی موریس با استفاده از آزمون پیرسون و $p < 0/05$.

بحث

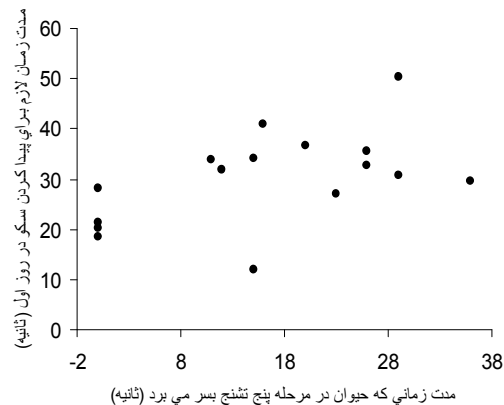
نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بین یادگیری موش‌ها در ماز آبی موریس و استعداد آن‌ها برای کیندلینگ شیمیایی با پنتیلن تترازول ارتباط معنی داری وجود دارد. در مورد ارتباط میان یادگیری و صرع مقالات زیادی منتشر شده است. تحقیقات بر روی مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد صرع نشان داده که به دنبال کیندلینگ الکتریکی [۱۳، ۱۴] و کیندلینگ شیمیایی [۱۲، ۱۵، ۱۶] فرایند یادگیری مختل می‌گردد. هیپوکمپ از مهم‌ترین مراکز درگیر در یادگیری فضایی است [۷]. تحقیقات نشان داده‌اند که PTZ با عبور

پنتیلن تترازول، حیوان مرحله پنجم تشنج را نشان دهد با مدت زمان لازم برای پیدا کردن سکو در روز اول آموزش نیز نشان دهنده ارتباط مثبت بین این دو متغیر بود ($p < 0/05$) (نمودار ۲).

مقایسه معکوس تعداد تزریقات لازم برای رسیدن حیوان به مرحله پنج تشنج نشان دهنده ارتباط مثبت بین این متغیر و مدت زمان لازم برای پیدا کردن سکو در روز سوم آزمایش در ماز آبی موریس بود ($P < 0/05$) (نمودار ۳).

به عبارت دیگر، هرچه زمان لازم برای پیدا کردن سکو کم‌تر باشد (که به معنی توانایی یادگیری بهتر در حیوان است) تعداد تزریقات لازم برای رسیدن حیوان به مرحله پنج تشنج بیشتر است (که به معنای مقاومت مغز حیوان در برابر گسترش تشنجات صرعی در مغز حیوان است). به این ترتیب، نتایج حاصل از تحقیق در ماز آبی موریس نشان دهنده ارتباط معنادار بین میزان یادگیری فضایی در ماز آبی موریس و استعداد حیوان برای ابتلا به کیندلینگ شیمیایی با پنتیلن تترازول بود به این معنی که حیواناتی که یادگیری بهتری داشتند در برابر ایجاد کیندلینگ از خود مقاومت بیشتری نشان می‌دادند.

مقایسه متغیرهای دیگر تشنج با متغیرهای یادگیری در ماز آبی موریس، ارتباط معناداری را بین این متغیرها نشان نداد.



نمودار ۱ ارتباط معنی دار بین مدت زمانی که حیوان در مرحله پنج تشنج به سر می‌برد با زمان لازم برای پیدا کردن سکو در روز اول آموزش در ماز آبی موریس با استفاده از آزمون پیرسون و $p < 0/05$.

وجود دارد و بنابراین فرار برای حیوان امکان پذیر است)، تمرکز حیوان در حین یادگیری و نیز حافظه عملکردی (working memory) و حافظه مرجع (reference memory) اشاره کرد که این متغیرها با آزمایش ساده ماز آبی قابل اندازه‌گیری نیستند [۲۱]. بنابراین پیدا کردن اختلال اصلی ایجاد شده در یادگیری موش‌هایی که سریع‌تر کیندل می‌شوند نیاز به تحقیقات دقیق‌تر در آینده دارد. به نظر می‌رسد استعداد حیوان به کیندلینگ را می‌توان از روی میزان اختلال در یادگیری که نشان دهنده میزان اختلال در مدارهای نورونی می‌باشد حدس زد. به این ترتیب، نتایج ما تأییدی است بر توانایی پیش بینی میزان اختلال در مدارهای نورونی هیپوکمپ از روی توانایی یادگیری فضایی. سرانجام این که از روی توانایی یادگیری فضایی در موش‌ها می‌توان به استعداد آن‌ها برای بروز حملات تشنجی پی برد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد که بدین وسیله از این معاونت تشکر می‌شود.

از سد خونی بر روی مغز اثر می‌گذارد [۱۷]. به این ترتیب، تزریق حتی یک دوز PTZ به موش‌های تازه متولد شده می‌تواند به شکل پایدار، میزان یادگیری آن‌ها را در ماز آبی موریس مختل کند [۱۸]. این اختلال به شکل افزایش میزان تسهیل دو پالسی [paired pulse facilitation] در موش‌هایی که PTZ دریافت کرده‌اند گزارش شده است [۱۹]. در مطالعه‌ای که توسط Hymie و همکارانش انجام شده مشخص گردیده که می‌توان موش‌ها را بر اساس میزان استعداد آن‌ها برای کیندلینگ به دو گروه تقسیم کرد. در این مطالعه نشان داده شده موش‌هایی که سریع‌تر مراحل تشنج را از خود نشان می‌دهند دارای اختلال در یادگیری فضایی در ماز آبی موریس هستند [۲۰]؛ اما به این نکته که آیا در کل جمعیت موش‌ها، بدون انتخاب و تکثیر آن‌ها نیز بین میزان یادگیری و استعداد ایجاد کیندلینگ رابطه‌ای وجود دارد توجه نشده است. از طرفی گزارش شده که در ماز آبی موریس، میزان کارایی مدارهای نورونی هیپوکمپ را می‌توان از روی میزان یادگیری مورد ارزیابی قرار داد [۸]. از طرف دیگر، یادگیری در ماز آبی موریس، شامل چندین قسمت است که از این قسمت‌ها می‌توان به درک موقعیت توسط حیوان (یادگیری این که در زیر آب سکو

منابع

- Kandel ER, Kupfermann I. And Iversen S. Learning and memory. In: Principles of neural science. Edited by Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessell T.M. USA: McGraw Hill, 2000; 1227-1246.
- Barat SA and Abdel-Rahman MS Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants. Brain Res., 1996; 742: 157-162.
- Ebert U, Rundfeldt C and Losher W. Development and pharmacological suppression of secondary afterdischarges in the hippocampus of amygdala-kindled rats. Eur. J. Neurosci., 1995; 17: 732-741.
- Alasvand Zarasvand M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y and Palizvan MR Anticonvulsant effect of bilateral injection of N6-cyclohexyladenosine into the CA1 region of the hippocampus in amygdala-kindled rats. Epilepsy Res. 2001; 47: 141-49.
- Ishida S, Hamada K, Yogi K and Seino M. Comparing the anticonvulsive effects of dapson on amygdala-kindled seizures and hippocampal kindled seizures in rats, ACTA Neurol. Scand. 85: 132-135, 1992.
- McCandell DW and Finesmith RB, Chemically induced model of seizures, In Bouton AA Backer GB and Butterus RF, Neuromethods, Vol 22, The Human Press, Totowa, 1992, pp 133-151.
- Preston AR and Garieli JDE, Different function for different medial temporal lobe structures, learning and memory, 9: 215-217, 2002.
- Drapeau E, Mayo W, Aourousseau C, Moal M, Piazza PV and Abrous DN. Spatial memory performance of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis, PNAS, 25: 14385-14390, 2003.
- Anisman H. and McIntyre D.C. Conceptual, spatial, and cue learning in the morris water maze in fast or slow kindling rats: attention deficit comorbidity. The J. Neurosci. 2002;22:7809-7817.
- Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnanian S, Hajizadeh S, Mirnajafi-Zadeh J. Differential effects of pentetrazol-kindling on long term potentiation of population excitatory postsynaptic potential and population spikes in the CA1 region of rat hippocampus, Brain Research 2001; 898: 82-90.
- Zhao D, Leung LS, Boon F, Cain DP. persistent physiological effects caused by a single pentetrazol induced seizure in neonatal rats. Brain Res. Dev. Brain Res.1994;80:190-198.
- Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnanian S, Epileptogenic insult causes a shift in the form of long-term potentiation expression. Neuroscience. 2005;134:415-23.
- McNanara RK, Kirkuy RD, Depape GE, Skelton RW and Corcoran ME, Differential effects of kindling and kindled seizures on place learning in the morris water maze. Hippocampus 1993;3: 123-125.
- Holmes GL. Effects of seizures on brain development: lessons from the laboratory. Pediatr Neurol. 2005;33:1-11.

15. Gilbert ME and Cain DP. A single neonatal pentylenetetrazol or hyperthermia convulsion increases kindling susceptibility in adult rat. *Developmental Brain Res.*, 1985; 22: 169-180.
16. Mortazavi F, Ericson M, Story D, Hulce VD, Dunbar GL. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats. *Epilepsy Behav.* 2005 21; [Epub ahead of print]
17. Moriki Y, Suzuki T, Furuishi T, Fukami T, Tomono K, Watanabe J, In vivo evidence for the efflux transport of pentazocine from the brain across the blood-brain barrier using the brain efflux index method. *J Drug Target.* 2005;13 (1):53-9
18. Huang LT, Yang SN, Liou CW, Hung PL, Lai MC, Wang CL, Wang T.J., Pentylenetetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects., *Epilepsia.* 2002;43 [6]:567-73.
19. Zhao D, Leung LS, Boon F, Cain DP., Persistent physiological effects caused by a single pentylenetetrazol induced seizure in neonatal rats., *Brain Res Dev Brain Res.* 1994;80 (1-2):190-8.
20. Anisman H and McIntyre DC, Conceptual, spatial, and cue learning in the morris water maze in fast or slow kindling rats: attention deficit comorbidity. *J Neurosci.* 2002;22 (17):7809-7817.
21. Morris RG, Synaptic plasticity and learning: slelctive impairment of learning rats and blocksde of long-potentialiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neuroscie.*1989;9:3040-3057.