

بررسی ارتباط یادگیری و استعداد ابتلاء به کیندلینگ شیمیایی پنتیلن تترازول در موش‌های صحرایی نر

دکتر محمدرضا پالیزوان^{۱*}، احسان اله غزنوی راد^۲

۱. استادیار، عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
 ۲. مربی، عضو هیئت علمی گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

تاریخ دریافت ۸۴/۳/۳۱، تاریخ پذیرش ۸۴/۶/۶

چکیده

مقدمه: صرع یکی از اختلالات عصبی مزمن در انسان است که از مهم‌ترین کانون‌های ایجاد کننده آن می‌توان به آمیگدال اشاره نمود. این ناحیه از مهم‌ترین مناطق مغزی دخیل در شرطی شدن نسبت به ترس است و به نظر می‌رسد اختلال در مدارهای نورونی این ناحیه می‌تواند زمینه ساز ابتلاء حیوان به تشنج باشد. هدف از این تحقیق پاسخ به این سوال است که آیا اختلال در یادگیری می‌تواند نشان دهنده اختلال در مدارهای نورونی این ناحیه و در نتیجه زمینه ساز استعداد حیوانات برای تشنج باشد.

روش کار: ۲۰ موش صحرایی نر از نژاد ویستار برای ایجاد شرطی شدن احترازی فعال دو طرفه تحت آزمایش شاتل باکس قرار گرفته و بر اساس پاسخ‌های ارائه شده توسط حیوان به دو گروه دیر یادگیر و زود یادگیر تقسیم شدند. سپس جهت ایجاد کیندلینگ تحت تزریق داخل صفاقی پنتیلن تترازول قرار گرفته و پاسخ‌های تشنجی حیوان ثبت و مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون توکی و آزمون من ویننی یو انجام گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که طی روند کیندلینگ موش‌های گروه دیر یادگیر نسبت به موش‌های گروه زود یادگیر استعداد بیشتری برای بروز تشنج از خود نشان داده و اختلاف معنی داری در مرحله حمله و مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان به مرحله دوم تشنج برسد بین دو گروه وجود داشت ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: با استناد به نتایج فوق می‌توان میزان استعداد موش‌های صحرایی نر را برای کیندلینگ از روی میزان اختلال در یادگیری شرطی شدن نسبت به ترس که نشان دهنده میزان اختلال در مدارهای نورونی آمیگدال می‌باشد حدس زد.

واژگان کلیدی: شرطی شدن ترس، کیندلینگ، آمیگدال، پنتیلن تترازول

*نویسنده مسئول: سردشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

E mail: palizvan@yahoo.com

مقدمه

صرع یکی از بیماری‌های رایج عصبی در انسان است. تحقیقات نشان داده که حدود یک تا دو درصد کل جمعیت بشری به این بیماری مبتلا هستند (۱). از عوامل مختلف ایجاد کننده این بیماری می‌توان آسیب‌ها و ضربات مغزی، استعمال بی رویه داروها، عفونت و نواقص ژنتیکی را نام برد. با این حال در بسیاری از مواقع علت ایجاد صرع در بیماران ناشناخته باقی می‌ماند (۲). 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 عوارض جانبی ناشی از آن بسیار مفید باشد. در حقیقت هدف از این تحقیق شناخت یکی از علائم مستعد کننده افراد برای بروز تشنج و صرع است. از مهم‌ترین کانون‌های ایجاد کننده صرع در انسان و موش می‌توان به آمیگدال اشاره نمود (۳). تحقیقات نشان داده است که تحریک این ناحیه برای ایجاد کیندلینگ نیاز به تحریکات کمتری دارد و از طرف دیگر تحقیقات نشان داده است که این ناحیه از مهم‌ترین مناطق مغزی دخیل در شرطی شدن^۱ است (۴) و به نظر می‌رسد اختلال در مدارهای نورونی این مرکز می‌تواند زمینه ساز ابتلاء حیوان برای تشنج باشد. از طرف دیگر تحقیقات نشان داده‌اند که به دنبال تشنج چه به شکل طبیعی و چه مصنوعی با ایجاد کیندلینگ، مدارهای نورونی دچار اختلال می‌گردند و معمولاً این اختلال با اختلال در یادگیری همراه است (۵). به این ترتیب هدف از این تحقیق نگاه به این حقایق از بعد دیگری است و آن این که آیا اختلال در یادگیری می‌تواند نشان دهنده اختلال در مدارهای نورونی این

ناحیه و در نتیجه زمینه ساز استعداد حیوانات برای تشنج باشد یا خیر؟

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی بوده و بر روی موش‌های صحرایی انجام گرفته است. در این تحقیق ۲۰ موش صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در شروع آزمایش که در شرایط ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد 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 حیوانات در قفس‌های چهارتایی نگهداری می‌شدند.

برای ایجاد شرطی شدن احترازی دو طرفه^۲ از شاتل باکس استفاده شد. شاتل باکس جعبه ای از جنس فلاکسی گلاس و با ابعاد ۱۸×۱۸×۶۰ می‌باشد که توسط دیواره‌ای به دو قسمت مساوی تقسیم شده است. در هر قسمت برای تحریک کف پای حیوان توسط جریان الکتریکی میله‌هایی از جنس فولاد زنگ نزن در کف جعبه جاسازی شده است. فاصله بین میله‌ها یک سانتی‌متر است، شوک آزار دهنده^۳ می‌باشد، لامپ آن ۵ وات و ۱۲ ولت می‌باشد، دیود آن از نوع اشعه مادون قرمز است و دکتور آن از نوع حساس به نور مادون قرمز بوده که در فاصله ۵ سانتی‌متر از کف قفس قرار گرفته است و با فرکانس ۴۰۰ هرتز کار می‌کند. به این ترتیب قادر خواهیم بود تا تاخیر زمانی شروع پاسخ شرطی^۴ را در حیوان اندازه گیری کنیم. موج تحریکی شامل یک

2 - Two way active avoidance learning.

3 - Scrombed foot shock.

4 - Conditional response latency.

1- Faire conditioning .

موج مربعی تک فازی با دامنه قابل تنظیم از ۱۵۰-۰ ولت می‌باشد که به این ترتیب با افزایش هر ۱۵ ولت اختلاف پتانسیل ۰/۱ میلی آمپر جریان ورودی به سیستم شوک دهنده افزوده خواهد شد، عرض موج ۱۸۰ میکروثانیه و فرکانس آن ۸۰ هرتز بود. آزمایش‌ها در یک محل تاریک صورت گرفته و قبل از شروع، برای ایجاد تطابق، حیوان به مدت ۵ دقیقه بدون هیچ محرکی در داخل دستگاه قرار می‌گرفت. آزمایشات در روزهای متوالی انجام گرفت و در هر جلسه آموزش^۱ ۴۰ تست^۲ برای هر حیوان انجام شد و در هر تست، محرک شرطی شدن که نور می‌باشد به مدت ۱۰ ثانیه در محفظه‌ای که حیوان در آن قرار نداشت روشن می‌شد و مدت زمان اجازه برای فرار حیوان^۳ ۵ ثانیه بود. پس از این مدت به کف محفظه‌ای که حیوان در آن قرار دارد شوک وارد می‌شد. در این آزمایش شوک یک محرک غیر شرطی بوده و به عنوان یک واقعه ناخوش آیند حیوان به طور طبیعی از آن فرار می‌کند. زمان شوک ۵ ثانیه طول می‌کشد و بدین ترتیب پس از ۱۰ ثانیه نور و شوک با هم خاتمه پیدا می‌کردند. اگر حیوان قبل از گرفتن شوک به قسمت دیگر شاتل باکس می‌رفت پاسخ درست و در غیر این صورت پاسخ غلط برای حیوان در نظر گرفته می‌شد و پس از ۲۰ ثانیه تست بعدی آغاز می‌شد. آزمایش‌ها بدین صورت ادامه داشت تا حیوان بتواند در یک جلسه آموزش در ۸۰ درصد موارد پاسخ صحیح از خود ارائه نماید. بر این اساس حیواناتی که پس از ۱۰ روز آموزش می‌توانستند به این مرحله از یادگیری برسند به عنوان

زود یاد گیر و حیواناتی که قادر به ارائه چنین پاسخی نبودند به عنوان دیر یاد گیر در نظر گرفته می‌شدند. به منظور ایجاد کیندلینگ شیمیایی، پنتیلن تترازول (PTZ) ۳۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی (هر ۴۸ ساعت یکبار) (۶) 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 قبلی (۷) به شکل زیر طبقه‌بندی شدند: 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 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.

در این تحقیق برای مقایسه کمیت‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی استفاده شده است. برای مقایسه مرحله حمله پس از مشخص شدن توزیع غیر طبیعی داده‌ها از آزمون من ویتنی یو استفاده گردید. در تمام طول آزمایش‌ها نحوه کار با حیوانات بر اساس دستور العمل کنترل و نظارت بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است.

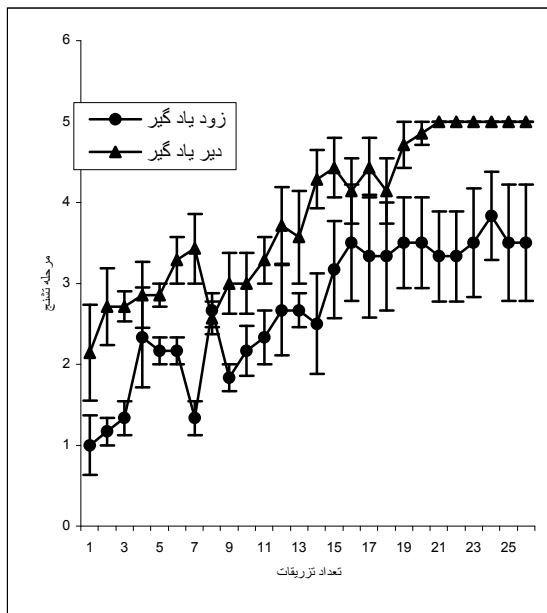
نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که می‌توان موش‌ها را بر اساس میزان شرطی شدن آنها در شاتل باکس که در حقیقت یک نوع شرطی شدن نسبت

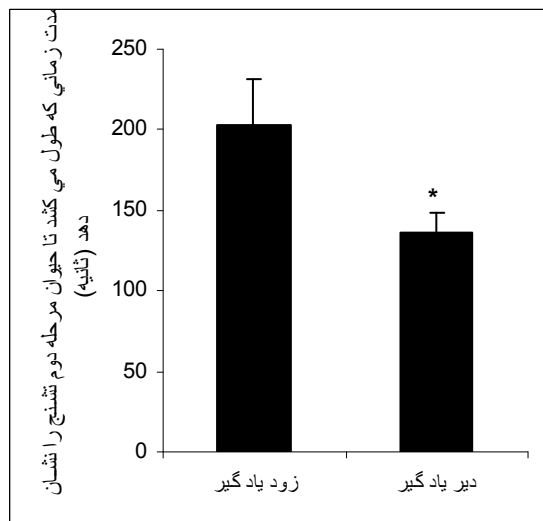
1 - Learning session.

2 - Trial.

3 - Warning period.



نمودار ۲. نمودار پیشرفت مرحله حمله در موش های زود یادگیر و دیر یادگیر

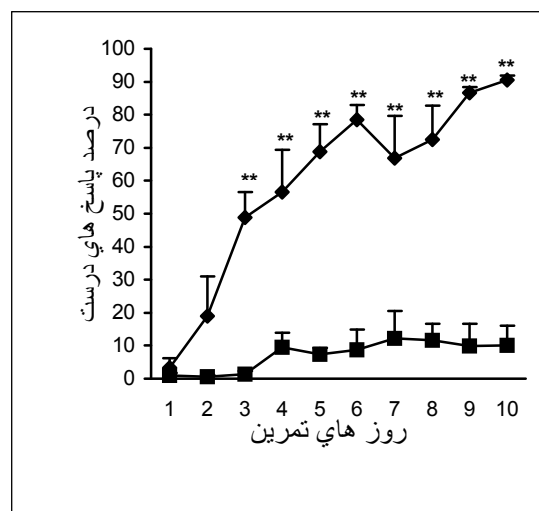


نمودار ۳. مدت زمانی که طول می کشد تا حیوانات مرحله دوم تشنج را نشان دهند (ثانیه)

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اختلاف معنی داری بین استعداد ابتلاء به کیندلینگ در دو گروه حیوانات دیر یادگیر و زود یادگیر در یادگیری مدل احترازی فعال دو طرفه وجود دارد. در مورد ارتباط میان یادگیری و صرع مقالات زیادی

به ترس است به دو گروه زود یادگیر و دیر یادگیر تقسیم بندی کرد (نمودار ۱). نتایج حاصل از کیندلینگ شیمیایی در دو گروه در نمودارهای ۲ و ۳ آورده شده است. همان گونه که در نمودار ۲ دیده می شود، طی روند کیندلینگ موش های گروه دیر یادگیر سریع تر از گروه زود یادگیر مراحل تشنج را پشت سر گذاشتند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون من ویتنی یو نشان داد که بین دو گروه در مرحله حمله اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$) (نمودار ۲). از دیگر متغیر های نشان دهنده استعداد حیوان برای کیندلینگ مدت زمانی است که طول می کشد تا حیوان مرحله دوم تشنج را از خود نشان بدهد. مقایسه این متغیر با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی در دو گروه نشان داد که مدت زمان رسیدن به مرحله دوم تشنج در حیوانات دیر یادگیر به شکل معنی داری از حیوانات گروه زود یادگیر کمتر است ($p < 0.05$) (نمودار ۳) که می تواند نشان دهنده توانایی کمتر مغز حیوانات دیر یادگیر در مهار گسترش تشنج باشد.



نمودار ۱. تقسیم بندی حیوانات بر اساس میزان توانایی آنها برای شرطی شدن گروهی که پس از ۱۰ روز تمرین به حداقل ۸۰ درصد پاسخ درست رسیدند ($n=10$) و گروهی که پس از ده روز تمرین به حد ۸۰ درصد پاسخ درست نرسیدند ($n=10$)

که استعداد ابتلا به کیندلینگ در گروه دیر یادگیر بیشتر است. به این ترتیب نتایج ما تاییدی است بر توانایی پیش‌بینی میزان اختلال در مدارهای نوروئی آمیگدال از روی توانایی شرطی شدن ترس در آنها و در نهایت این که از روی توانایی شرطی شدن در موش‌ها می‌توان به استعداد آنها برای بروز حملات تشنجی پی‌برد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد که از این معاونت تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. Learning and memory. In: Kandel E R, Schwartz J H, Jessell T M. USA, Principles of neural science. 4th ed. New York : McGrohill; 2000.p.227-1246.
2. Rall TW, Shleifer LS. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: Goodman A, Rall TW, Nies AS, and Taylor P. The pharmacological basis of therapeatica. 4th ed. New York: pergmon press;1991. p. 436-462.
3. Ishida S, Hamada K, Yogi K, Seino M. Comparing the anticonvulsive effects of dapsone on amygdala-kindled seizures and hippocampal kindled seizures in rats. ACTA Neurol Scand 1992;85: 132-135.
4. McCandles DW and Finesmith RB. Chemically induced models of seizures. In: Bouton AA, Baker GB and Butterus RF. Neuromethods. 3th ed. Totowa: The human Press; 1992. Vol 22.p. 133-151.
5. Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Spatial memory performance of aged rats in the water maze predict levels of hippoampal neurogenesis PNAS 2003; 25: 14385-14390.
6. Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnanian S, Hajizadeh S, Mirnajafi-Zadeh J. Differential effects of pentelentetrasol-kindling on long term potentiation of population excitatoty postsynaptic

منتشر شده است. تحقیقات بر روی مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد صرع نشان داده است که به دنبال کیندلینگ الکتریکی (۸، ۹) و کیندلینگ شیمیایی (۱۰)، (۱۱) فرآیند یادگیری مختل می‌گردد. آمیگدال از مهم‌ترین مناطق مغزی دخیل در شرطی شدن ترس است (۱۲). در مدل احترازی فعال دو طرفه با استفاده از شوک الکتریکی میزان شرطی شدن ترس در حیوان و بنابر این میزان کارآیی مدارهای نوروئی آمیگدال را می‌توان مورد ارزیابی قرار داد (۱۳). نیمین و همکارانش نشان دادند که کیندلینگ آمیگدال سبب تغییر پاسخ ترس در حیوانات می‌گردد (۱۴). وینتینک و همکارانش نیز گزارش کردند که کیندلینگ آمیگدال سبب افزایش رفتار ترس در موش‌های صحرائی نر و ماده می‌گردد (۱۵). سدنز و همکارانش در سال ۱۹۹۴ در تحقیقی که بر روی ۵۰ بیمار از کشور کانادا انجام دادند گزارش کردند که بیماران مبتلا به صرع دچار سندرم ترس هستند و میزان ترس با آتروفی آمیگدال در آنها ارتباط مستقیم دارد (۱۶). از طرف دیگر درایی و همکاران نشان دادند که از روی میزان یادگیری در رت‌های پیر می‌توان میزان اختلال نوروئی را در آنها حدس زد (۵). به این ترتیب به نظر می‌رسد که میزان استعداد حیوان به کیندلینگ را می‌توان از روی میزان اختلال در یادگیری که نشان دهنده میزان اختلال در مدارهای نوروئی می‌باشد حدس زد.

نتیجه گیری

نتایج ما در این تحقیق نشان داد که موش‌های صحرائی نر را می‌توان بر اساس استعداد یادگیری آنها در مدل احترازی فعال دو طرفه به دو گروه زود یادگیر و دیر یادگیر تقسیم بندی کرد. نتایج حاصل از کیندلینگ شیمیایی موش‌ها با بنتیلن ترازول نشان داد

potential and population spikes in the CA1 region of rat hippocampus. *Brain Research* 2001; 898: 82-90.

7. 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;80:190-198.
8. 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.
9. Holmes GL. Effects of seizures on brain development: lessons from the laboratory. *Pediatr Neurol* 2005;33:1-11.
10. 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.
11. Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnianian S. Epileptogenic insult causes a shift in the form of long-term potentiation expression. *Neuroscience* 2005; 14: [Epub ahead of print]

12. Williams LM, Barton MJ, Kemp AH, Liddell BJ, Peduto A, Gordon E, Bryant RA. Distinct amygdala-autonomic arousal profiles in response to fear signals in healthy males and females. *Neuroimage*. 2005 Aug 1; [Epub ahead of print]
13. Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ. Brain-derived neurotrophic factor in amygdala-dependent learning. *Neuroscientist*. 2005;11(4):323-33.
14. Nieminen SA, Sirvio J, Teittinen K, Pitkanen A, Airaksinen MM, Riekkinen P. Amygdala kindling increased fear-response, but did not impair spatial memory in rats. *Physiol Behav* 1992;51:845-9.
15. Wintink AJ, Young NA, Davis AC, Gregus A, Kalynchuk LE. Kindling-induced emotional behavior in male and female rats. *Behav Neurosci* 2003;117:632-40.
16. Cendes F, Andermann F, Gloor P, Gambardella A, Lopes-Cendes I, Watson C, Evans A, Carpenter S, Olivier A. Relationship between atrophy of the amygdala and ictal fear in temporal lobe epilepsy. *Brain* 1994;117:739-46.

The investigation of relation between learning and sensitivity to chemical kindeling with Pentylenetetrazole in male rats

Palizvan MR¹, Ghaznavi Rad E²

Abstract

Introduction: Epilepsy is one of the most common afflictions of human. The amygdala is one of the most sensitive epilepsy induction areas. This area has been the focus of interest, in large part due to its role in fear conditioning. It seems that any abnormality in the neuronal network in amygdala can increase the susceptibility of animal to seizure. The purpose of the present study was to evaluate the relationship between avoidance learning and kindeling susceptibility in rats.

Materials and Methods: In an experimental study, 20 Wistar male rats were trained for two way active avoidance learning in the shuttle box, and on the basis of escape response were divided into fast and slow learning animals. The rats were administered Pentylenetetrazole for induction of kindeling. Then seizure stages were noted. Data was analyzed using one way ANOVA and Tukey's test.

Results: Results of the present study demonstrated that slow learning animals comparing to fast learnings were more prone to kindeling and there was a significant difference in the seizure stage and stage 2 latency in the two groups.

Conclusion: On the basis of the present data it is possible to predict the predisposing of male rats to kindeling from the rate of fear conditioning that indicates the abnormality in amygdala neuronal circuits.

Key words: Fear conditioning, kindeling, amygdala, Pentylenetetrazole

1 - Assistant professor, Department of physiology, Arak university of medical sciences.

2 - Instructor, MSc in medical microbiology, Department of microbiology, Arak university of medical sciences.