

Effect of vitamin D deficiency and calcitriol supplementation on adult rats' learning and memory in Morris water maze

**Taghizadeh M¹, Jazayeri A¹, Salami M², Ashraghian M³,
Talaei Zavareh SA^{2*}**

1- Department of Nutrition & Biochemistry, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

2- Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran

3- Department of Biostatistics & Epidemiology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

Received September 6, 2009; Accepted December 8, 2009

Abstract:

Background: Vitamin D receptors have been presented in the areas involved in learning and memory. This study was done to assess the effect of the vitamin D deficiency and calcitriol supplementation on spatial learning and memory.

Materials and Methods: Twenty seven male rats were divided into three groups (n=9 for each): receiving normal (Control), diminished vitamin D (C-D) and calcitriol supplement (C+D) regimens for 45 days. The animals were introduced to the Morris water maze (MWM) trials (4trials/day for 5 consecutive days). The delay in finding and distance passed to reach the target platform were measured as spatial learning. The probe test was performed on the 5th day of experiment.

Results: The C-D group needed a longer time to reach the platform than the control and C+D animals ($P<0.0001$), demonstrating that vitamin D deficiency negatively affected the maze learning. On the other hand, calcitriol supplementation did not significantly influence the spatial learning. The probe trial was not affected by either vitamin D deficiency or calcitriol supplementation.

Conclusion: Although vitamin D deficiency deteriorates the maze learning it dose not affect the spatial memory consolidation. Also, calcitriol supplementation for 45 days is not effective in cognitive phenomena.

Keywords: Vitamin D, Memory, Maze learning, Rat

* **Corresponding Author.**

Email: talaei@ kaums.ac.ir

Tel: 0098 913 3623240

Fax: 0098 361 5575058

Conflict of Interests: *No*

Feyz, *Journal of Kashan University of Medical Sciences Winter 2010; Vol 13, No 4, Pages 251-260*

بررسی اثر رژیم های غذایی بدون ویتامین D و حاوی مکمل کلسیتریول، بر روند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی موش های صحرایی بالغ در ماز آبی موریس

محسن تقی زاده^۱، ابوالقاسم جزایری^۲، محمود سلامی^۳، محمد اشراقیان^۴، سید علیرضا طلائی زواره^{۵*}

خلاصه

سابقه و هدف: حضور گیرنده های ویتامین D در نواحی درگیر در یادگیری و حافظه نشان داده شده است. این مطالعه به منظور بررسی اثر کمبود ویتامین D و نیز افزودن کلسیتریول به رژیم غذایی، بر یادگیری و حافظه فضایی طراحی شده است. مواد و روش ها: تعداد ۲۷ سر موش صحرایی نر بالغ، در ۳ گروه (هر گروه ۹ سر) کنترل (C)، رژیم نرمال)، کمبود ویتامین D (C-D) و دریافت کننده مکمل کلسیتریول (C+D) قرار گرفتند. یادگیری فضایی طی ۵ شب و هر شب ۴ مرحله آزمایش، توسط ماز آبی موریس سنجیده شد. در شب آخر میزان تثبیت حافظه فضایی نیز بررسی شد. مدت زمان سپری شده و مسافت پیموده شده در ربع های مورد نظر ماز تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: حیوانات گروه C-D برای یافتن سکو مدت زمان بیشتری را در ماز سپری کردند و این اختلاف با گروه C و C+D از نظر آماری معنی دار بود. به عبارت دیگر، کمبود ویتامین D باعث کندتر شدن روند یادگیری می شود. از دیگر سو، مکمل کلسیتریول بر روند یادگیری بی تاثیر بود. همچنین، هیچ کدام از رژیم های مذکور بر میزان تثبیت حافظه موثر واقع نشدند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که اگر چه کمبود ویتامین D در روند یادگیری فضایی موش های صحرایی در ماز آبی موریس ایجاد اختلال می کند، اما اثر قابل توجهی در تثبیت حافظه فضایی ندارد. همچنین، افزودن مکمل کلسیتریول به مدت ۴۵ روز بر روند یادگیری و حافظه فضایی موش های صحرایی بی تاثیر است.

واژگان کلیدی: ویتامین D، حافظه، یادگیری ماز، موش صحرایی

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره سیزدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۲۶۰-۲۵۱

مقدمه

حافظه فضایی شامل حافظه های کاری و مرجع است و جنبه هایی از روندهای شناختی فضایی را در بر می گیرد که به وسیله آنها توانایی های انسان و حیوان در استفاده از کلیدهای فضایی به منظور یافتن یک موقعیت در فضا، مورد ارزیابی واقع می شود [۳]. امروزه مشخص شده است که مواد معدنی مثل کلسیم [۴] و یا بسیاری از ویتامین ها [۵-۸]؛ بالاخص ویتامین D [۹]، بر پدیده های یادگیری و حافظه تاثیر گذارند. نیاز بدن به ویتامین D از طریق رژیم غذایی و یا سنتز در اپیدرم پوست تامین می شود. به طور معمول این ویتامین بعد از دو بار هیدروکسیله شدن در کبد و کلیه، به فرم فعال خود (کلسیتریول) تبدیل می شود [۱۰]. کلسیتریول قادر است در سلول-های هدف ساخته شود. همچنین، می تواند به داخل سلول ها وارد شده، به صورت اتوکترین و یا پاراکترین عمل نماید [۱۱]. کلسیتریول برای فعالیت با گیرنده اختصاصی خود (VDR) متصل شده و نواحی خاصی از ژن ها را تنظیم و یا گسترش می دهد که نتیجه آن، می تواند افزایش سنتز پروتئین های خاص از جمله کالبدین، پاروآلبومین و کال رتینین است [۱۴-۱۲]. VDR در بسیاری از مناطق مغز از جمله قشر نو، تالاموس، قشر پریفورم، هیپوتالاموس، و مخچه پستانداران [۱۵، ۱۶] و بالاخص در نواحی درگیر در حافظه موش صحرایی؛ هیپوکامپ و آمیگدال [۱۶]

تثبیت اطلاعات وارد شده به مغز پدیده های یادگیری و حافظه را بنیاد می گذارد. این اطلاعات می تواند در بسیاری از قسمت های مغز از جمله در قشر نو و در هیپوکامپ ذخیره گردد [۱]. هیپوکامپ ناحیه ای واقع در لوب گیجگاهی میانی است که در تثبیت حافظه و یادگیری فضایی در پستانداران نقش اساسی را به عهده دارد [۱]؛ به طوری که تخریب این بخش کاربرد حافظه فضایی را مختل می کند [۲].

^۱ دانشجوی مقطع دکتری، گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۲ استاد، گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۴ استاد، گروه آمارحیاتی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۵ مربی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

* نشانی نویسنده مسوول:

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

دوره نویسی: ۰۳۶۱۵۵۷۵۰۵۸

تلفن: ۰۹۱۳ ۳۶۲۳۲۴۰

پست الکترونیک: talaei@kaums.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۹/۱۷

تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۱۵

طور تصادفی به ۳ گروه (n=۹) تقسیم شدند: گروه کنترل (C)؛ گروهی که رژیم غذایی آنها فاقد ویتامین D بود (C-D) و گروه دریافت کننده مکمل کلسیتریول (C+D). موش ها به مدت یک و نیم ماه تحت تیمار با رژیم غذایی خود بودند: رژیم غذایی C طبق جدول AIN93 مخصوص موش های بالغ [۲۹] تنظیم گردید. گروه C-D رژیمی مشابه گروه اول، ولی فاقد ویتامین D داشتند. همچنین رژیم غذایی گروه C+D مشابه گروه کنترل بود، با این تفاوت که مقدار ۱۰۰۰ نانوگرم کلسیتریول (فرم فعال ویتامین D) برای هر ۱۰۰ گرم غذای خشک را دریافت می کردند. کلیه مواد ریز و درشت مغذی از شرکت سیگما (آلمان) خریداری شد و پس از مخلوط شدن، خمیرگردید. سپس به صورت کپسول در آمده و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد خشک شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید. هر موش در داخل یک قفس قرار داشت و به منظور کنترل میزان دریافت کلسیتریول، غذای موش ها به صورت روزانه و به مقدار ۱۷-۱۵ گرم در داخل قفس ها قرار داده شد. در نتیجه، دریافت روزانه مکمل کلسیتریول توسط هر کدام از حیوانات حدود ۱۵۰-۱۲۰ نانوگرم بود. طی دوره آزمایش، حیوانات از نظر وزن و وضعیت بیماری کنترل می شدند و آب به طور آزاد در اختیار حیوانات قرار داشت. دمای محل نگهداری حیوانات $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و رطوبت هوا 50 ± 5 درصد بود. کلیه موش ها در طی دوره بررسی در شرایط تاریکی روشنایی ۱۲-۱۲ ساعته قرار داشتند. در پایان تیمار، گروه ها جهت انجام آزمایشات یادگیری و حافظه فضایی به مدت ۵ شب طبق متود ماز آبی موريس مورد بررسی قرار گرفتند.

ماز آبی موريس

ماز آبی موريس یک تانک آب با قطر ۱۸۰ و عمق ۷۰ سانتیمتر است که تقریباً نیمی از آن از آب پر می شود. ماز به طور فرضی به چهار قسمت مساوی تقسیم می شود و یک سکوی نجات با ارتفاع ۲۵ سانتیمتر در یکی از چهار قسمت قرار می گیرد، به طوری که حدود ۱ سانتیمتر زیر سطح آب واقع می شود و از بیرون قابل دیدن نیست. حرارت آب در حدود ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد تنظیم می گردد. ماز در اتاقی قرار می گیرد که در آن علائم فضایی مختلفی وجود دارد که در طول آزمایشات ثابت بوده و برای حیوان در ماز قابل دیدن است. این مجموعه از طریق یک دوربین ردیاب که در ارتفاع ۱۸۰ سانتیمتری و در بالای مرکز ماز آبی قرار گرفته است، مانیتور شده و از طریق اتصال به کامپیوتر، اطلاعات مربوط به آزمایش در حال انجام، ذخیره می گردد. جهت انجام، ثبت و آنالیز بعدی داده های حاصل از آزمایش از نرم افزار

شناسایی شده است. همچنین، کلسیتریول می تواند با گیرنده های غشاء سلولی باند شود و عملکردهای غیر ژنتیکی از قبیل انتقال کلسیم از کانال های یونی ولتاژی و یا تحریک فعالیت پروتئین کیناز فعال شونده با میتوزن (MAPK)؛ که یکی از آنزیم های مهم در پایدار شدن و تثبیت حافظه است را سبب شود [۱۷]. اگر چه اطلاعات در این زمینه اندک است، اما، نتایج برخی تحقیقات نشان می دهند که ویتامین D و فرم فعال آن؛ کلسیتریول بر شناخت موثراند [۱۹، ۱۸]. Musiol و همکارانش نشان دادند که پس از تزریق کلسیتریول درون مغز همستر، این ویتامین در هسته نورون های نواحی درگیر در یادگیری و شناخت مثل سبتم و آمیگدال متجمع می شود [۲۰]. نشان داده شده است که کمبود ویتامین D باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری فضایی در ماز شعاعی می شود [۲۱، ۲۲]. Grecheck و همکارانش نیز بیان می دارند که کمبود ویتامین D در دوران بارداری باعث اختلال در تشکیل پدیده تقویت دراز مدت می شود [۲۳]. با این همه، Mynasian و همکارانش بیان می دارند که حذف ژن گیرنده ویتامین D در موش سوری، تاثیر چندانی بر فعالیت های شناختی این حیوان ندارد [۲۴]. همچنین، Burne و همکارانش نشان داده اند که موش های سوری که ژن گیرنده VDR آنها ناک اوت شده است، هیچ گونه اختلال در حافظه فضایی و کاری از خود بروز نمی دهند [۲۵]. سلامت ساختاری و عملکردی نورون ها در تشکیل پدیده های حافظه و یادگیری از اهمیت به سزایی برخوردار است و نقش این ویتامین در حفظ سلامت نورون ها نیز نشان داده شده است [۲۶]. ویتامین D از طریق افزایش بیان RNA پیامبر گیرنده خود به حفاظت از سلول های قشری مغز در مقابل آسیب های وارد شده به نورون ها می پردازد [۲۷]. در یک مطالعه، محققان به بررسی نقش حفاظتی ۱ و ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D بر روی نورون های که در معرض گلوتامات قرار گرفته بودند، پرداختند. فرم فعال این ویتامین، طی یک روند وابسته به دوز و زمان توانست از میزان نوروتوکسیسیته گلوتامات بکاهد [۲۸]. با توجه به موارد ذکر شده، این تحقیق به منظور بررسی اثر رژیم های غذایی بدون ویتامین D و حاوی مکمل کلسیتریول، بر روند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی موش های صحرائی بالغ در ماز آبی موريس انجام شده است.

مواد و روش ها

گروه های مورد مطالعه

این مطالعه بر روی ۲۷ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم انجام شد. حیوانات به

اختصاصی "ردیاب ۱ - ویرایش ۷" که توانایی پذیرش تنظیمات مختلف برای آزمایشات مختلف در ماز آبی را دارد، استفاده شده است. نتایج برای تعیین مدت زمان سپری شده و مسافت پیموده شده توسط حیوان به منظور یافتن سکوی پنهان در ماز آنالیز می-شود.

الف- مدت زمان حرکت حیوان در ماز؛ ب- مسافت طی شده تا رسیدن به سکوی ج- مدت زمانی که حیوان در هر یک از نواحی چهارگانه ماز گذرانیده است، آنالیز می شود.

مراحل انجام آزمایش

الف- مرحله یادگیری یا آموزش:

طی این مرحله، حیوان از یکی از سمت‌های چهارگانه (شمال، جنوب، مشرق و مغرب) ماز در حالی که صورت آن به طرف دیواره ماز است، در آب رها می‌شد (لازم به ذکر است که انتخاب ناحیه شروع آزمایش به طور تصادفی بوده و به وسیله برنامه نرم افزاری پیشنهاد می‌گردید). همزمان با رها شدن حیوان در ماز دکمه حس گر برنامه، که در هر چهارسوی ماز نصب شده است، فشار داده می‌شد و مرحله ثبت آزمایش شروع می‌گردید. با توجه به اندازه ماز و نوع حیوان (موش صحرایی) حداکثر زمان آزمایش ۹۰ ثانیه در نظر گرفته شد. حیوان به طور اتفاقی سکوی پنهان مخفی در زیر آب را پیدا می‌کرد و روی آن قرار می‌گرفت. در اینجا به حیوان اجازه داده می‌شد تا به مدت ۱۵ ثانیه روی سکوی بماند و با جستجوی اطراف و دیدن علائم موجود در آزمایشگاه موقعیت خود را شناسایی کند. این موضوع به حیوان کمک می‌کند تا در جلسات بعدی آزمایش با استفاده از علائم بینایی در اتاق محل آزمایش، جایگاه سکوی را پیدا نماید. لازم به ذکر است که هم علائم فضایی موجود در محل آزمایش و هم موقعیت سکوی در یکی از چهار قسمت ماز در طول آزمایشات ثابت بود. در صورتی که در مدت ۹۰ ثانیه موش نمی‌توانست سکوی را پیدا کند، آزمایش کننده حیوان را به آرامی به سوی سکوی هدایت می‌کرد تا اینکه موش سکوی را یافته و برای ۱۵ ثانیه روی آن قرار گیرد. پس از گذشت این زمان، حیوان از سکوی برداشته شده و بعد از خشک شدن با یک حوله به قفس خود برگردانده شد. پس از ۱۰ دقیقه آزمایش مجدداً تکرار گردید. با این تفاوت که محل رها شدن موش در ماز نسبت به مرحله قبل متفاوت بود. هر موش ۴ جلسه روزانه با فاصله ۱۰ دقیقه‌ای را تجربه می‌کرد. در مجموع این مرحله از آزمایش به مدت ۵ روز طول کشید که طی آن ۲۰ جلسه آزمایش روی حیوانات انجام گردید.

ب- مرحله باز خوانی یا پروب (Probe trial):

بلافاصله پس از تکمیل مرحله اول، مرحله بعد انجام گردید. در این مرحله (با توجه به اینکه حیوان محل سکوی پنهان را می‌داند) سکوی از ماز برداشته شده و آزمایش انجام می‌شود. در این مرحله از آزمایش این نکته مورد توجه قرار گرفت که موش در حین آزمایش (که قاعدتاً قادر به یافتن سکوی نیست) بیشترین وقت خود را در کدامیک از قسمت‌های چهارگانه ماز گذرانده است. به عنوان مثال، اگر بیشترین زمان مربوط به قسمتی بود که قبلاً سکوی در آن بوده است، روشن می‌شد که حیوان بر اساس علائم بینایی- فضایی خارج از ماز سکوی را پیدا می‌کرده است و نه به طور اتفاقی و یا به دلیل دیدن سکوی در زیر آب. لازم به ذکر است که در این مرحله از آزمایش هر جلسه الزاماً ۹۰ ثانیه طول کشید و به دلیل عدم وجود سکوی پس از پایان مدت، موش از ماز برداشته می‌شد. این مرحله از آزمایش برای هر موش یک بار انجام گردید و مدت زمان ماندن و نیز مسافت پیموده شده در ربع صحیح ماز (که در مرحله قبل واجد سکوی بود) معیار میزان یادگیری و یادآوری قرار گرفت. در پایان دوره موش‌ها با استفاده از اتیل اتر (شرکت مرک آلمان) در داخل دسیکاتور بیهوش شده و مقدار ۲ تا ۳ میلی لیتر خون از دم موش‌ها گرفته شد. خون در داخل لوله آزمایش اسید شو شده ریخته شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم خون در داخل تیوب های پلی اتیلنی ریخته شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان کلسیم و فسفر سرم با استفاده از کیت زیست شیمی و دستگاه اتو آنالایزر BT3000 به روش کلریمتری اندازه گیری شد.

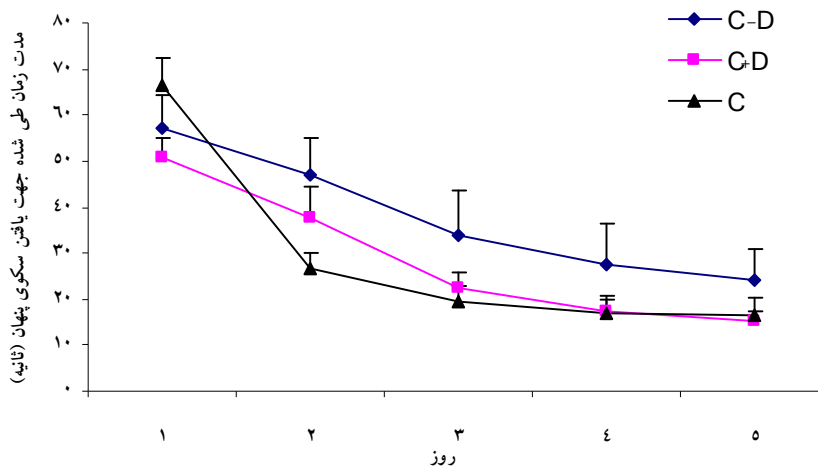
روش تجزیه و تحلیل داده ها:

نتایج به دست آمده از آزمایشات مرحله یادگیری، با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۷ و با روش آماری آنالیز واریانس همراه با تست تعقیبی LSD مقایسه گردیدند. برای نشان دادن ساده تر و درک بهتر رفتار حیوانات در سه گروه، میانگین رفتار حیوانات طی ۴ جلسه روزانه در شکل‌ها به صورت یک نقطه نمایش داده شده است. به منظور مقایسه نتایج حاصل از مرحله پروب و نیز مقایسه سطوح سرمی کلسیم و فسفر، از آزمون آنالیز واریانس همراه با آزمون تعقیبی LSD استفاده شده است.

نتایج

به منظور بررسی یادگیری و حافظه حیوان در ماز آبی موریس، دو فاکتور مدت زمان سپری شده و مسافت پیموده شده

تفاوت معنی دار وجود داشت ($F_{3, 536} = 942.110; P < 0.0001$). همان گونه که در نمودار شماره ۱ آورده شده است، در مقایسه با دو گروه دیگر، حیوانات گروه C-D برای یافتن سکو مدت زمان بیشتری را در ماز سپری کرده اند و این اختلاف با گروه C و C+D از نظر آماری معنی دار بوده است (به ترتیب $P < 0.0001$ و $P < 0.001$). به عبارت دیگر، حیوانات این گروه نسبت به سایر گروه ها یادگیری کندتری داشته اند. همچنین، نتایج آزمون تعقیبی LSD بیان گر آن است که اختلاف بین دو گروه C و C+D از نظر آماری معنی دار نمی باشد ($P < 0.109$).



نمودار شماره ۱- مدت زمان لازم جهت یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات هر سه گروه مورد مطالعه در روزهای مختلف آزمایش. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف میانگین استاندارد حاصل از مجموع جلسات انجام شده برای حیوانات هر گروه طی یک روز نمایش داده شده اند.

حیوان در ربع دارای سکو در مرحله قبل می گذراند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه ها از نظر زمان صرف شده جهت یافتن سکو بیان گر این مطلب است که تفاوت معنی داری بین هیچ یک از گروه های آزمایش شده وجود ندارد ($F_{3, 24} = 0.149; P = 0.742$) (نمودار شماره ۳).

ب- مسافت طی شده در ماز به منظور یافتن سکوی پنهان همچنین، نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر تفاوت معنی داری را از نظر مسافت طی شده برای یافتن سکو ماز در بین گروه های آزمایش شده در مرحله باز خوانی اطلاعات نشان نداد ($F_{3, 24} = 0.214; P = 0.829$)

کلسیم سرم

با توجه به آزمون آماری می توان گفت اختلاف بین میزان کلسیم سرم موش های هر ۳ گروه معنی دار می باشد ($F_{3, 24} = 27.536; P < 0.0001$). همان طوری که در نمودار شماره

توسط حیوان در ربع محل قرارگیری سکو، به عنوان متغیرهای حائز اهمیت مطرح می باشد، که به بررسی نتایج مربوط به آنها می پردازیم.

مرحله یادگیری:

الف- مدت زمان سپری شده به منظور یافتن سکوی پنهان پس از بررسی داده های جمع آوری شده از مجموع ۲۰ جلسه آموزش حیوانات در ماز آبی موریس، در رابطه با زمان سپری شده برای یافتن سکو در ماز، بین هر سه گروه از نظر آماری

ب- مسافت پیموده شده در ماز

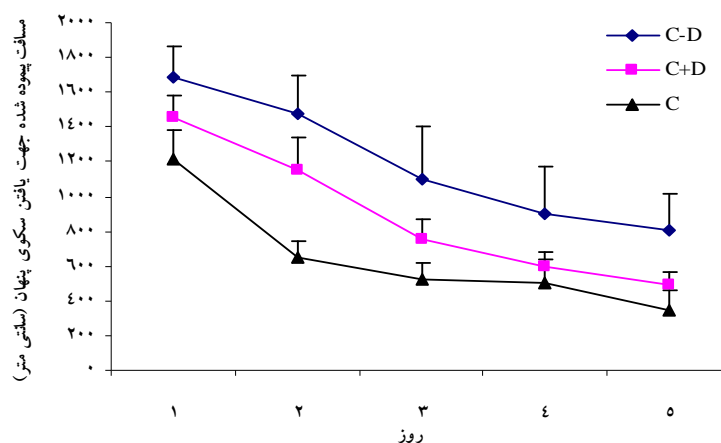
آزمون آنالیز واریانس نشان می دهد که اختلاف بین گروه های آزمایش از نظر مسافت پیموده شده در ماز جهت یافتن سکوی پنهان از نظر آماری معنی دار است ($F_{3, 536} = 968.423; P < 0.0001$). با توجه به نمودار شماره ۲ می توان دریافت که حیوانات محروم از ویتامین D به منظور یافتن سکوی پنهان مسافت بیشتری را پیموده اند. این اختلاف با مسافت پیموده شده توسط گروه کنترل ($P < 0.0001$) و گروه دریافت کننده کلسیتریول ($P < 0.0001$) معنی دار است. همچنین، نتایج آزمون تعقیبی بیان می دارد که اختلاف مشاهده شده بین گروه کنترل و گروه دریافت کننده مکمل از نظر آماری معنی دار نیست ($P = 0.094$).

مرحله باز خوانی (پروپ)

الف- مدت زمان سپری شده به منظور یافتن سکوی پنهان پس از مرحله یادگیری، روند آزمایش در مرحله پروپ ادامه یافت. در این مرحله سکوی پنهان از ماز برداشته شد و مدت زمانی را که

های گروه کنترل و دریافت کننده مکمل کلسیتریول از نظر آماری معنی دار نیست ($P=0/241$)، اما، اختلاف بین گروه‌های دریافت کننده مکمل و محروم از ویتامین D ($P<0/0001$) و نیز اختلاف بین گروه‌های کنترل و محروم از ویتامین D ($P<0/0001$) معنی دار است.

۴ نشان داده شده است میزان کلسیم سرم موش‌های محروم از ویتامین D ($8/17 \pm 0/44$ میلی گرم در دسی لیتر) کمتر از دو گروه دیگر (به ترتیب، $9/23 \pm 0/43$ میلی گرم در دسی لیتر برای گروه کنترل و $9/46 \pm 0/33$ میلی گرم در دسی لیتر برای موش‌های دریافت کننده کلسیتریول) می‌باشد. نتایج آزمون تعقیبی بیان گر این مطلب است که اگرچه اختلاف بین میزان کلسیم سرم موش-

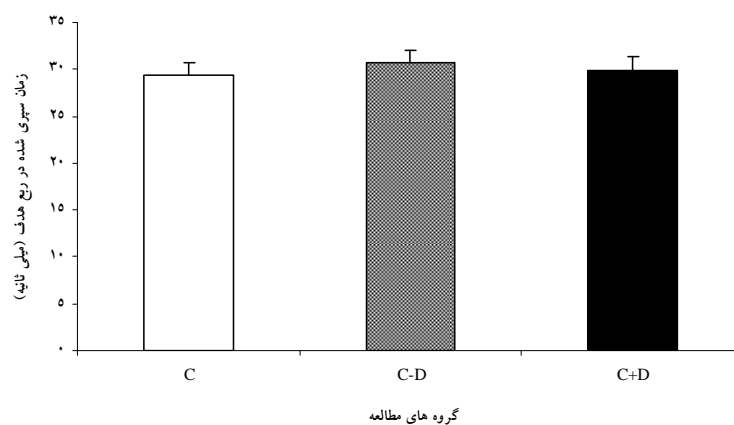


نمودار شماره ۲- مسافت پیموده شده جهت یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات هر سه گروه مورد مطالعه در روزهای مختلف آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف میانگین استاندارد حاصل از مجموع جلسات انجام شده برای حیوانات هر گروه طی یک روز نمایش داده شده‌اند.

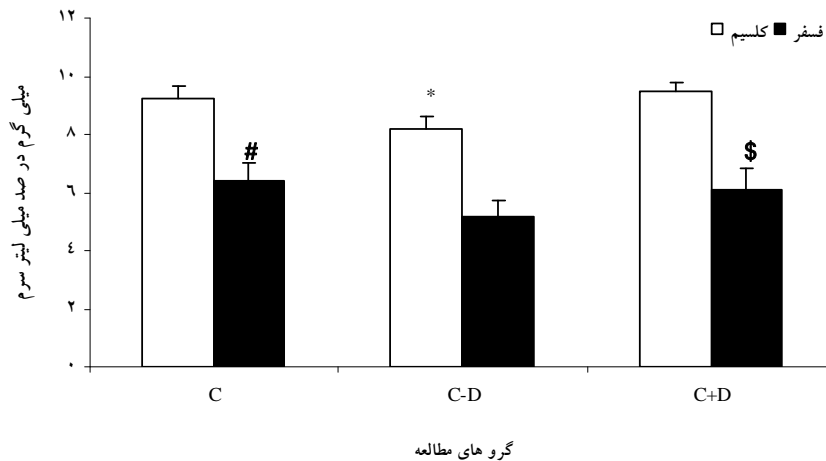
که اختلاف بین میزان فسفر سرم خون موش‌های هر ۳ گروه از نظر آماری معنی دار است ($F_{3, 24} = 19.286; P<0/001$). همچنین، یافته‌های آزمون تعقیبی LSD نشان می‌دهد که اختلاف بین میزان فسفر سرم موش‌های گروه C با C+D از نظر آماری معنی داری نیست ($P=0/350$). این در حالی است که اختلاف بین میزان فسفر سرم حیوانات C+D و C-D ($P<0/003$) و نیز C و C-D از نظر آماری معنی دار بود ($P<0/0001$).

فسفر سرم

نتایج آزمایشات کلریمتری نشان دادند که میزان فسفر سرم موش‌های محروم از کلسیتریول ($5/15 \pm 0/57$ میلی گرم در دسی لیتر) کمتر از سایر گروه‌ها (به ترتیب، $6/39 \pm 0/64$ میلی گرم در دسی لیتر برای گروه کنترل و $6/1 \pm 0/74$ میلی گرم در دسی لیتر برای حیوانات دریافت کننده کلسیتریول) می‌باشد (نمودار شماره ۴). با در نظر گرفتن نتایج آزمون آنالیز واریانس می‌توان دریافت



نمودار شماره ۳- مدت زمان سپری شده در ربع صحیح (محل قرارگیری سکو) ماز توسط حیوانات گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. تفاوت معنی داری بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد.



نمودار شماره ۴- سطوح سرمی کلسیم و فسفر در حیوانات گروه های مختلف بر حسب میلی گرم بر دسی لیتر. میزان کلسیم و فسفر در گروه C-D کمتر از سایر گروه ها بوده است. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده اند.

* $P < 0.0001$ اختلاف کلسیم سرم در موش های گروه C-D با دو گروه دیگر

$P < 0.0001$ اختلاف فسفر سرم موش های گروه کنترل با گروه C-D

\$ $P < 0.003$ اختلاف فسفر سرم موش های گروه C+D با گروه C-D

روده باریک اثبات شده است. به علاوه فعالیت این ویتامین برای عملکرد هورمون پاراتیروئید در جذب یون های ذکر شده در دستگاه گوارش لازم است [۳۰]. همچنین، ویتامین D اثرات مستقیمی بر متابولیسم سیستم اسکلتی نیز از خود به جا می گذارد [۳۱]. در مجموع می توان گفت: ویتامین D و هورمون پاراتیروئید موجب بالارفتن غلظت یون های کلسیم و فسفر در خون می شوند [۳۰]. از این رو کاهش غلظت یون های کلسیم و فسفر در خون حیوانات، همزمان با فقر ویتامین D تعجب آور نخواهد بود [۳۳،۳۲] آنچه که اهمیت دارد آن است که چنین تغییری در غلظت این یون ها چگونه بر عملکرد یادگیرانه موش های صحرایی در ماز آبی تاثیر می گذارد. بر اساس نتایج مطالعات دیگران به نظر می رسد اثرات مستقیم و یا غیر مستقیم ویتامین D در عملکرد مغز عمدتاً بر دو پایه استوار باشد که یکی نقش در کارکرد مدارهای نورونی در مغز [۱۹،۱۸] و دیگری حفاظت از مغز در برابر آسیب های وارده است [۳۶،۲۸-۳۴]. مطالعات انجام شده به وسیله محققین در مورد اثرات ویتامین D روی سیستم عصبی حاکی از آن است که این ویتامین نقش تعیین کننده ای در پدیده های شناختی ایفا می کند [۲۵،۱۵]. نتایج یک مطالعه نشان می دهد که پس از تزریق کلسیتریول درون مغز همستر، این ویتامین در هسته نورون های نواحی درگیر در یادگیری و شناخت مثل سیتوم و آمیگدال متجمع می شود [۲۰]. اکثر قریب به اتفاق مطالعات انجام شده روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان به بررسی نتایج کمبود ویتامین D

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کمبود ویتامین D در رژیم غذایی موش های صحرایی نر بالغ منجر به ایجاد اختلال در روند یادگیری فضایی می شود. این اختلال به صورت افزایش زمان و مسافت سپری شده برای رسیدن به هدف در ماز مشاهده شد. به عبارت دیگر، حیوانات گروه C-D نسبت به گروه های C و C+D یادگیری کندتری داشته اند. یافته های مطالعه حاضر از مجموعه آزمایشات پروب بیان گر آن است که تغییر در میزان ویتامین D دریافتی در موش های صحرایی تنها روی فاز یادگیری حیوانات در ماز آبی موثر است و در تثبیت حافظه در آنها نقش چندانی ندارد. از سوی دیگر نتایج این مطالعه نشان می دهد که افزودن مکمل ویتامین D به رژیم غذایی نرمال اثر چندانی در توانایی های یادگیری و حافظه حیوانات ندارد. بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که تنها کمبود ویتامین D در رژیم غذایی است که قابلیت های یادگیری و حافظه را تحت تاثیر قرار می دهد. شواهد آزمایشگاهی به دست آمده از اندازه گیری غلظت کلسیم و فسفر در خون حیوانات تحت آزمایش نیز هم خوانی جالبی با نتایج رفتاری مشاهده شده در ماز آبی موریس دارد. میزان کلسیم پلاسمایی در گروه C-D به طور قابل توجهی نسبت به گروه های دریافت کننده رژیم غذایی نرمال و دریافت کننده مکمل کلسیتریول پایین تر است. نتیجه مشابهی در ارتباط با میزان فسفر پلازما مشاهده می شود. نقش مستقیم فرم فعال ویتامین D در جذب کلسیم و فسفر از

دژنه شدن نورون‌ها که همراه با اختلالات شناختی است جلوگیری نماید. این عمل از طریق تنظیم کاهشی کانال‌های کلسیمی L در هیپوکامپ صورت می‌گیرد [۴۵]. در مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثر حفاظتی فرم فعال ویتامین D بر روی نورون‌های دوپامینرژیک که در معرض گلوتامات و دیگر نوروتوکسیک‌ها در محیط برون تنی قرار گرفته بودند انجام شد، درمان با ویتامین D سلول‌ها را در مقابل نوروتوکسیسته ایجاد شده محافظت نمود [۴۶]. همچنین Obradovic و همکارانش بیان نموده‌اند که مصرف همزمان ویتامین D و در معرض قرار دادن بافت با عوامل شناخته شده که منجر به آسیب در عملکرد مغز می‌شوند، تولید و ترشح ترکیبات محافظت کننده از نورون‌ها را تسهیل می‌کند [۴۷]. احتمالاً عوامل دیگری نیز می‌تواند عملکرد موش‌های صحرایی در یادگیری فضایی در ماز آبی را تحت تاثیر قرار دهد که از جمله آنها می‌توان به مدت زمان تجویز مکمل ویتامین D، نحوه مصرف و مقدار دریافت آن اشاره کرد. فعالیت حرکتی حیوان تحت آزمایش در ماز آبی، فاکتور بسیار مهمی در ارزیابی شاخص‌های یادگیری و حافظه است. اینکه آیا تغییر در میزان ویتامین D غذایی می‌تواند فعالیت حرکتی موش‌های صحرایی در ماز آبی را تحت تاثیر قرار دهد یا نه موضوعی است که نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اگر چه کمبود ویتامین D در روند یادگیری فضایی موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس ایجاد اختلال می‌کند، اما اثر قابل توجهی در تثبیت حافظه فضایی ندارد. به علاوه، افزودن کلسیتریول به رژیم غذایی موش‌های صحرایی به مدت ۴۵ روز، تاثیری بر روند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی آنها ندارد. اثر مثبت ویتامین D می‌تواند به نقش مهم این ویتامین روی عملکرد مدارهای مغز به خصوص در ناحیه هیپوکامپ و نیز نقش کمکی آن در جلوگیری از آسیب‌های وارده به مغز نسبت داده شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با هزینه تامین شده از طریق طرح تحقیقاتی شماره ۷۷۵۳ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان اجرا شده است. لذا، از کلیه همکارانی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

پرداخته‌اند [۱۹]. نتایج مطالعه Becker و همکاران حاکی از این است که کمبود ویتامین D باعث ایجاد اختلال در روند یادگیری در شاتل باکس می‌شود [۲۱]. Grecheck و همکارانش نیز بیان می‌دارند که کمبود ویتامین D در دوران بارداری باعث اختلال در تشکیل پدیده تقویت دراز مدت می‌شود [۲۳]. با این همه، Mynasian و همکارانش بیان می‌دارند که حذف ژن گیرنده ویتامین D در موش سوری تاثیر چندانی بر فعالیت‌های شناختی این حیوان ندارد [۲۴]. همچنین، Burne و همکارانش نشان داده‌اند که موش‌های سوری که ژن گیرنده VDR آنها ناک اوت شده است، هیچ گونه اختلال در حافظه فضایی و کاری از خود بروز نمی‌دهند [۲۵]. یک گروه از محققان نیز بیان کرده‌اند که محرومیت از ویتامین D باعث ایجاد اختلال در یادگیری فضایی در ماز شعاعی نمی‌شود [۲۲]. نتایج حاصل از مطالعات روی جمعیت‌های انسانی نیز حاکی از آثار سوء کمبود ویتامین D بر فعالیت‌های شناختی و حافظه و یادگیری دارد [۱۸]. برای مثال مشخص شده است که بین سطوح سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D و انجام صحیح آزمون‌های حافظه در افراد مسن رابطه عکس وجود دارد [۳۷]. Wilkins و همکارانش نیز بیان کرده‌اند که کمبود این ویتامین منجر به کاهش عملکرد شناختی انسان‌ها می‌شود [۳۸]. بیان شده است که عدم تعادل یون کلسیم و افزایش آن در سلول، خطر مرگ سلولی را افزایش می‌دهد [۳۹]. محققان نشان داده‌اند عدم تثبیت و تعادل مقدار یون آزاد کلسیم و نهایتاً افزایش ولتاژ وابسته به جریان این یون در نورون‌ها منجر به اختلال در یادگیری می‌شود [۴۰]. از طرف دیگر برخی مطالعات نشان می‌دهند که عدم تعادل میزان یون کلسیم در نورون‌ها، باعث بروز برخی بیماری‌های نورودژنراتیو عصبی می‌شود [۴۱، ۴۲]. افزایش جریان یون کلسیم به درون سلول همراه با یون‌های کلسیمی که از اجزای داخل سلولی آزاد می‌شود، منجر به افزایش یون کلسیم آزاد داخل سلول می‌شود و اگر مکانیسم‌های تعادلی قادر به تنظیم آن نباشد، مرگ سلول را به همراه دارد. به علاوه افزایش یون کلسیم به عنوان یک شروع کننده برای واکنش‌های آبشاری در نورون‌ها، خود منجر به تحریک گیرنده‌های گلوتامات می‌شود [۴۳]. معبر این کانال‌ها نسبت به یون کلسیم نفوذ پذیر بوده و فعالیت سرکش آنها می‌تواند هجوم بی رویه یون کلسیم به درون سلول و وقایع پس از آن را باعث گردد [۴۳]. ۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D نقش مهمی در تعادل یون کلسیم دارد و به همین دلیل می‌تواند عملکرد ویژه ای را در بقاء سلول داشته باشد [۴۰، ۴۳، ۴۴]. نشان داده شده است که ویتامین D با دخالت در تعادل کلسیم درون سلولی می‌تواند از

References:

- [1] Squire LR. Memory and the hippocampus-A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 1992; 99: 195-231.
- [2] Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, Okeefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal-lesions. *Nature* 1982; 297: 681-3.
- [3] Poucet B. Spatial cognitive maps in animals-new hypotheses on their structure and neural mechanisms. *Psychol Rev* 1993; 100: 163-82.
- [4] Hidalgo C, Nunez MT. Calcium, iron and neuronal function. *Iubmb Life* 2007; 59: 280-5.
- [5] Morris MC, Evans DA, Schneider JA, Tangney CC, Bienias JL, Aggarwal NT. Dietary folate and vitamins B-12 and B-6 not associated with incident Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 435-443.
- [6] Morris MC, Schneider JA, Tangney CC. Thoughts on B-vitamins and dementia. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 429-33.
- [7] Pinilla FG. The impact of diet and exercise on brain plasticity and disease. *Nutr Health* 2006; 18: 277-284.
- [8] Tafti M, Ghyselinck NB. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol* 2007; 64: 1706-11.
- [9] Przybelski RJ, Binkley NC. Is vitamin D important for preserving cognition? A positive correlation of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with cognitive function. *Arch Biochem Biophys* 2007; 460: 202-5.
- [10] Bland R, Walker EA, Hughes SV, Stewart PM, Hewison N. Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D-3-1 alpha-hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: Evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology* 1999; 140: 2027-34.
- [11] Deviragh PA, Haglid KG, Celio MR. Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin -D hypervitaminosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3887-90.
- [12] Eyles D, Almeras L, Benech P, Patatian A, Mackay-Sim A, McGrath J, et al. Developmental vitamin D deficiency alters the expression of genes encoding mitochondrial, cytoskeletal and synaptic proteins in the adult rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 538-45.
- [13] Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D-3 target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2685-95.
- [14] Alexianu ME, Robbins E, Carswell S, Appel SH. 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D-3-dependent up-regulation of calcium-binding proteins in motoneuron cells. *J Neurosci Res* 1998; 51: 58-66.
- [15] Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005; 29: 21-30.
- [16] Prufer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat* 1999; 16: 135-45.
- [17] Boyan BD, Wang LP, Wong KL, Jo HJ, Schwartz Z. Plasma membrane requirements for 1 alpha,25(OH)(2)D-3 dependent PKC signaling in chondrocytes and osteoblasts. *Steroids* 2006; 71: 286-90.
- [18] Buell JS, Dawson-Hughes B. Vitamin D and neurocognitive dysfunction: Preventing "D"ecline? *Mol Aspects Med* 2008; 29: 415-22.
- [19] McCann JC, Ames BN. Is there convincing biological or behavioral evidence linking vitamin D deficiency to brain dysfunction? *FASEB J* 2008; 22: 982-1001.
- [20] Musiol IM, Stumpf WE, Bidmon HJ, Heiss C, Mayerhofer A, Bartke A. (PHODOPUS-SUNGORUS) BRAIN. *Neuroscience* 1992; 48: 841-8.
- [21] Becker A, Eyles DW, McGrath JJ, Grecksch G. Transient prenatal vitamin D deficiency is associated with subtle alterations in learning and memory functions in adult rats. *Behav Brain Res* 2005; 161(2):306-12.
- [22] Altemus KL, Finger S, Wolf C, Birge SJ. Behavioral correlates of vitamin D deficiency. *Physiol Behav* 1987; 4: 435-40.
- [23] Grecksch G, Rüttrich H, Höllt V, Becker A. Transient prenatal vitamin D deficiency is associated with changes of synaptic plasticity in the dentate gyrus in adult rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2009. [Epub ahead of print]
- [24] Minasyan A, Keisala T, Lou YR, Kalueff AV, Tuohimaa P. Neophobia, sensory and cognitive functions, and hedonic responses in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 104(3-5): 274-80.
- [25] Burne THJ, McGrath JJ, Eyles DW, Mackay-Sim A. Behavioural characterization of Vitamin D receptor knockout mice. *Behav Brain Res* 2005; 157: 299-308.
- [26] Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 2005; 85(1): 373-422.
- [27] Taniura H, Ito M, Sanada N, Kuramoto N, Ohno Y, Nakamichi N, et al. Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons. *J Neurosci Res* 2006; 83(7):1179-89.

- [28] Wang JY, Wu JN, Cherng TL, Hoffer BJ, Chen HH, Borlongan CV et al. Vitamin D-3 attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res* 2001; 904: 67-75.
- [29] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents-final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76a rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-51.
- [30] Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997; 7: 439-43.
- [31] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.
- [32] Hamada K, Nagai S, Tsutsumi T, Izumi T. Ionized calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D concentration in serum of patients with sarcoidosis. *Eur Respir J* 1998; 11: 1015-20.
- [33] Tfelt-Hansen J, Schwarz P, Torring O. Rapid suppression of S-PTH by oral calcitriol and calcium in healthy premenopausal women. *Scan J Clin Lab Invest* 2001; 61: 395-400.
- [34] Ibi M, Sawada H, Nakanishi M, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, et al. Protective effects of 1 alpha, 25-(OH)₂D-3 against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. *Neuropharmacology* 2001; 40: 761-71.
- [35] Saporito MS, Brown ER, Hartpence KC, Wilcox HM, Vaught JL, Carswell S. 1, 25-dihydroxyvitamin D-3-mediated induction of nerve growth-factor messenger-RNA and protein in L929 fibroblasts and in adult-rat brain. *Brain Res* 1994; 633: 189-96.
- [36] Siegel GJ, Chauhan NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Rev* 2000; 33: 199-227.
- [37] McGrath J, Scragg R. No association between serum 25-hydroxyvitamin D3 level and performance on psychometric tests in NHANES III. *Neuroepidemiol* 2007; 29 (1-2): 49-54.
- [38] Wilkins CH, Birge SJ, Sheline YI, Morris JC. Vitamin D deficiency is associated with low mood and worse cognitive performance in older adults. *J Natl Med Assoc* 2009; 101(4):349-54.
- [39] Shah M, Haylett DG. Ca²⁺ channels involved in the generation of the slow afterhyperpolarization in cultured rat hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2000; 83: 2554-2561.
- [40] Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 2000; 78: 3-13.
- [41] Veng LM, Mesches MH, Browning MD. Age-related working memory impairment is correlated with increases in the L-type calcium channel protein alpha1D (Cav1.3) in area CA1 of the hippocampus and both are ameliorated by chronic nimodipine treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 110: 193-202.
- [42] Thibault O, Hadley R, Landfield PW. Elevated postsynaptic (Ca²⁺) (i) and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: Relationship to impaired synaptic plasticity. *J Neurosci* 2001; 21: 9744-56.
- [43] Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003; 34: 325-37.
- [44] Choi DW, Mauluccigedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell-culture. *J Neurosci* 1987; 7: 357-68.
- [45] Brewer LD, Porter NM, Kerr DS, Landfield PW, Thibault O. Chronic 1 alpha,25-(OH)₂ vitamin D-3 treatment reduces Ca²⁺-mediated hippocampal biomarkers of aging. *Cell Calcium* 2006; 40: 277-86.
- [46] Sawada H, Kawamura T, Shimohama S, Akaike A, Kimura J. Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. *J Neurosci Res* 1996; 43: 503-10.
- [47] Obradovic D, Gronemeyer H, Lutz B, Rein T. Cross-talk of vitamin D and glucocorticoids in hippocampal cells. *J Neurochem* 2006; 96: 500-9.