

Effect of Oral Administration of Zinc Chloride on Passive Avoidance Memory and Oxidative Stress Following Acute Stress in Male Rats

Karimi B¹, Ghotbeddin Z^{1*}, Fatemi Tabatabaei SR¹

1. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +986134474078, Fax: +986134470369, E-mail: z.ghotbeddin@scu.ac.ir

Received: Aug 22, 2016

Accepted: Dec 26, 2016

ABSTARCT

Background & objectives: Zinc as one of the most important trace elements is needed for proper functioning of the nervous system and homeostasis. Many studies show that stress causes memory impairment through various mechanisms, including oxidative stress induction and some mechanisms which are directly effecting brain function. So, in this work we assessed the effect of zinc chloride on passive avoidance memory and oxidative stress following acute stress in male rats.

Methods: In this study, 50 male Wistar rats were used in five groups: control, sham, stress, zinc chloride treatment and zinc chloride treatment before stress induction. For stress induction, rats were restrained (not immobilized) for 6 h/day, 7 days in a Plexiglas restrainer, and treated rats received an oral dose of zinc chloride 32 mg/kg/day by gavage for 6 days. At the end of the experiment, passive avoidance memory was evaluated by shuttle box and some oxidative damage markers were determined in all groups.

Results: Results of this study showed that animals which were exposed to stress showed a significant decrease in passive avoidance memory compared to control group ($p < 0.01$) and the oxidative stress parameters in this group showed significant changes compared to the control group ($p < 0.05$). While passive avoidance memory and oxidative stress parameters in group treated with zinc chloride were nearly closed to control group.

Conclusion: According to our results, zinc chloride with antioxidant properties can have a protective effect on memory impairment and oxidative stress induced by stress.

Keywords: Zinc chloride; Stress; Passive Avoidance Memory; Oxidative Stress; Rat.

اثر تجویز خوراکی کلریدروی بر حافظه احترازی غیرفعال و استرس اکسیداتیو متعاقب استرس حاد در موش صحرایی نر

بهادر کریمی^۱، زهره قطب الدین^{۱*}، سیدرضا فاطمی طباطبایی^۱

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۶۱۳۴۴۷۴۰۷۸ فاکس: ۰۶۱۳۴۴۷۰۳۶۹ پست الکترونیک: z.ghotbeddin@scu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: روی به عنوان یک عنصر کمیاب نقش بسیار مهمی برای عملکرد صحیح سیستم عصبی و حفظ هومئوستاز دارد و مطالعات زیادی نشان می دهند که استرس از طریق مکانیسم های مختلفی از جمله ایجاد استرس اکسیداتیو و بسیاری از مکانیسمهایی که به طور مستقیم عملکرد مغز را تحت تاثیر قرار میدهند باعث اختلال حافظه میشود. لذا در این کار تحقیقاتی اثر کلرید روی بر حافظه احترازی غیرفعال و پارامترهای اکسیداتیو ایجاد شده متعاقب استرس در موشهای صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه از ۵۰ سر موش صحرایی نر (نژاد ویستار) در ۵ گروه: کنترل، شاهد، در معرض استرس، تیمار شده با کلریدروی و گروه دریافت کننده کلرید روی قبل از اعمال استرس استفاده شد. به منظور ایجاد استرس، موشها به مدت ۷ روز و هر روز ۶ ساعت درون مهار کننده^۱ قرار گرفتند. موشهای تیمار، کلرید روی را به مدت ۷ روز به روش گاواژ با دوز ۳۲ mg/kg دریافت کردند. در پایان تیمار حافظه احترازی حیوانات به کمک آزمون شاتل باکس و برخی از پارامترهای آسیب اکسیداتیو در هیپوکامپ تمام گروه ها ارزیابی شدند.

یافته ها: نتایج به دست آمده از این تحقیق بیانگر کاهش معنی دار حافظه احترازی غیرفعال در گروه استرس نسبت به گروه کنترل است ($p < 0.01$). همچنین پارامترهای استرس اکسیداتیو نیز در این گروه نسبت به گروه کنترل تغییرات قابل توجهی را نشان میدهد ($p < 0.05$). در حالی که تیمار با کلرید روی توانست حافظه احترازی و پارامترهای استرس اکسیداتیو را به شرایط کنترل نزدیک کند.

نتیجه گیری: طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق، کلرید روی میتواند با خاصیت آنتی اکسیدانی خود یک اثر محافظتی برای اختلال حافظه و استرس اکسیداتیو ایجاد شده متعاقب ایجاد استرس داشته باشد.

واژه های کلیدی: کلرید روی، استرس، حافظه احترازی غیرفعال، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰۱ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۶

مقدمه

هر گونه شرایطی که منجر به ایجاد پاسخ غیراختصاصی و غیرطبیعی به محرک عادی گردد استرس نامیده میشود [۱]. استرس میتواند از طریق مکانیسمهایی که به طور مستقیم عملکرد مغز را تحت تاثیر قرار میدهند باعث اختلال حافظه شود [۲،۳]. استرس در بروز بیماریهایی که با اختلال

شناختی همراه هستند نظیر آلزایمر، اسکیزوفرنی و کم کاری تیروئید نقش دارد [۴-۸]. تحقیقات اپیدمیولوژیکی نیز نشان داده است افرادی که استرس دارند در مقایسه با افراد بدون استرس نسبت به اختلالات شناختی مستعدترند [۹]. مشاهده شده است که استرس به طور برگشت پذیر باعث آتروفی نورونهای هیپوکامپ و اختلال شناختی می شود [۴]. از طرف دیگر، تحقیقات جدید نشان میدهند که استرس با تعدیل فرایند تثبیت حافظه

¹ Restrainer

کوتاه مدت به بلند مدت باعث بهبود حافظه اخباری می‌شود و گلوکوکورتیکوئیدها با عبور از سد خونی- مغزی و اتصال به گیرنده خود در سیستم لیمبیک خصوصاً آمیگدال باعث تسهیل مرحله تثبیت و فراخوانی حافظه می‌شوند [۱۰].

قرا گرفتن در معرض استرس تاثیرات پیچیده‌ای در یادگیری و حافظه دارد و نظریات منسجمی در این رابطه وجود ندارد. مطالعات اخیر اثرات متناقض استرس حاد را بر حافظه نشان داده‌اند و برخی از این مطالعات بیانگر اختلال حافظه ناشی از استرس و برخی دیگر بیانگر اثر مثبت آن بر حافظه می‌باشند [۱۱] و یا حتی ممکن است هیچ اثری روی یادگیری و حافظه نداشته باشد [۱۶-۱۲].

ریزمغذی‌ها بخشی از تغذیه محسوب می‌شوند و نقش مهمی در فیزیولوژی بدن انسان دارند. یکی از این ریزمغذی‌ها، عنصر روی است. روی یک عنصر کمیاب ضروری است که نقش حیاتی برای سلامتی انسان در سراسر دوره زندگی ایفا می‌کند. این عنصر در بخش‌های مختلفی از سیستم عصبی مرکزی نظیر آمیگدال، جسم مخطط، نئوکورتکس و هیپوکامپ مشاهده می‌شود و بیشترین غلظت آن در ناحیه CA3 هیپوکامپ است [۱۷-۱۹] روی اغلب در سیستم عصبی مرکزی به آنزیم‌های وابسته به روی و سایر پروتئین‌ها متصل است و تنها ۱۰ درصد آن به فرم آزاد است [۲۰]. که فرم آزاد روی بیشتر در وزیکول‌های پیش سیناپسی نورون‌های گلوتاماترژیک و تا حدودی گاباارژیک متمرکز شده است و فیبرهای خزه ای هیپوکامپ، آمیگدال و پیاز بویایی^۱ نواحی غنی از وزیکول‌های حاوی روی آزاد هستند نورون‌های زینک ارژیک نیز بیشتر در کورتکس مغز یافت می‌شوند [۲۱].

در سیستم عصبی مرکزی روی بعد از آهن فراوانترین عنصر کمیاب است و عملکردهای متعددی به عهده دارد (۲۰). به طوری که برای

نوروژنز، تکامل و رشد مغز در دوره‌های حساس و عملکرد صحیح میانجی‌های عصبی ضروری است [۲۲] و تغییر غلظت آن می‌تواند در پاتوژنز بیماری‌های مرتبط با تکامل، اختلالات رفتاری نظیر افسردگی، اضطراب و نورودژنراتیو و دمانس ایجاد شده در بیماری آلزایمر تاثیر گذار باشد [۲۲].

با توجه به نقش مهم روی در سیستم عصبی مرکزی، نورون‌ها به شدت به کمبود روی حساس هستند و تحقیقات آزمایشگاهی بیانگر اثرات مخرب کمبود روی در تمام دوران زندگی: دوران بحرانی و قبل از تولد، ابتدای تولد^۲، بلوغ و بزرگسالی بر عملکرد سیستم عصبی مرکزی است. غلظت بالای روی در ناحیه CA3 هیپوکامپ متمرکز شده است و در بسیاری از مطالعات به ارتباط مستقیم بین این عنصر و افزایش یادگیری و حافظه اشاره شده است. مطالعات آزمایشگاهی و کلینیکی نشان می‌دهند که فقدان یا کمبود روی، سبب کاهش فعالیت حرکتی و کاهش توجه و یادگیری می‌شود و مصرف مکمل‌های روی این اثرات مخرب را بهبود می‌بخشد [۱۹].

کمبود روی می‌تواند با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن باعث افزایش فعالیت نیتریک اکسید سنتاز و NADPH اکسیداز و به دنبال آن تغییر در فیزیولوژی سلول عصبی و ایجاد استرس اکسیداتیو شود [۲۳].

مطالعات جدید نشان می‌دهند که اثر روی بر سیستم عصبی مرکزی وابسته به دوز است، به طوری که کمبود آن می‌تواند با افزایش مرگ سلولی (آپوپتوز) و افزایش ایجاد استرس اکسیداتیو، باعث اختلال حافظه شود [۲۴]. از طرف دیگر، در تحقیقی که بوسیله یانگ^۳ و همکاران انجام شد؛ نتایج نشان داد که مصرف بالای مکمل‌های روی نیز می‌تواند مخرب باشد و باعث اختلال حافظه شود [۲۵]. مطالعات دیگر

² Postnatal

³ Yang

¹ Olfactory Bulb

در همین راستا، نشان دهنده افزایش مصرف روی و اختلال حافظه هستند [۲۶].

با توجه به اینکه گزارشات متناقضی در ارتباط با اثر استرس بر یادگیری و حافظه وجود دارد و از آنجاییکه به نقش کلیدی و مهم روی بر عملکرد صحیح سیستم عصبی اشاره شده است، استفاده از این عنصر کلیدی به عنوان یک گزینه درمانی مناسب برای بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی مرکزی توصیه می‌شود. از آنجاییکه به نقش روی و ارتباط آن با بیماری‌هایی نظیر آلزایمر، پارکینسون، افسردگی و سایر بیماری‌های نورودژنراتیو اشاره شده است ولی گزارشی در مورد روی و تاثیر آن بر اختلال حافظه ناشی از استرس حاد و مکانیسم احتمالی آن انجام نشده است، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر تجویز خوراکی کلرید روی بر حافظه احترازی غیرفعال و شاخص‌های اکسیدان/ آنتی اکسیدان متعاقب ایجاد استرس، طراحی گردید.

روش کار

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار استفاده شد. تمام مراحل آزمایش بر اساس دستور العمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز طراحی و اجرا شد. برای انجام این مطالعه ۵۰ موش صحرایی نر با وزن تقریبی (۲۲۰-۱۸۰) گرم انتخاب شدند. حیوانات در طول مطالعه در شرایط استاندارد، ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ثابت (55 ± 5 درصد) نگهداری شدند. تمام حیوانات به طور آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. یک هفته پس از سازش با شرایط محیطی، حیوانات به طور تصادفی در ۵ گروه کنترل، شاهد، استرس، کلرید روی و کلرید روی + استرس قرار گرفتند ($n=10$) [۲۷]. گروه کلرید روی، کلرید روی را روزانه با دوز 32 mg/kg به مدت یک هفته با روش گاواژ دریافت

کردند [۲۶] و گروه استرس هر روز ۶ ساعت و به مدت یک هفته درون مهارکننده قرار گرفتند [۲۸]. گروه شاهد نیز به مدت یک هفته نرمال سالی را به روش گاواژ دریافت کردند. گروه دریافت کننده کلرید روی و استرس، کلرید روی را پیش از اعمال استرس دریافت می‌کردند.

کلیه آزمایش‌ها در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و در زمان روشنایی، بین ساعت ۸ صبح الی ۴ بعد از ظهر به منظور جلوگیری از تأثیر ریتم شبانه روزی حیوان بر آزمایش‌ها انجام گرفت. حیوانات یک ساعت قبل از شروع آزمون به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا با شرایط آزمایشگاه عادت کنند.

در تمامی گروه‌ها ۲۴ ساعت پس از اتمام تزریقات، به منظور ارزیابی حافظه احترازی غیرفعال حیوانات از آزمون شاتل باکس^۱ استفاده شد و پس از انجام این آزمون، حیوانات آسان کشی شده و هیپوکامپ تمام نمونه‌ها برای ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو (سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، MDA، و کاتالاز) از مغز حیوان جدا شد.

سنجش حافظه احترازی غیرفعال از طریق دستگاه شاتل باکس

این دستگاه از دو محفظه تاریک و روشن تشکیل شده است که در محفظه تاریک حیوان شوک دریافت می‌کند. روش کار با این دستگاه شامل ۳ مرحله آموزش، آزمون و مرحله اکتساب (به خاطر آوری) است.

- مرحله آموزش: حیوان فقط با دستگاه آشنا می‌شود (بدون اعمال شوک)؛

- مرحله آزمون: ۲۴ ساعت بعد از آموزش، شوک با شدت جریان مشخص (فرکانس ۵۰ هرتز، شدت ۰/۵ میلی آمپر و به مدت ۲ ثانیه) به پای حیوان در محفظه تاریک اعمال می‌شود.

¹ Shuttle Box

- مرحله اکتساب: به منظور تست به خاطر آوری و حافظه درازمدت، ۲۴ ساعت بعد از آموزش، موش در قسمت روشن قرار داده می‌شود و مدت زمان تاخیر در ورود به محفظه تاریک و زمان سپری شده در محفظه تاریک به عنوان شاخص‌های حافظه اجتنابی دراز مدت اندازه‌گیری می‌شوند [۲۹].

اندازه‌گیری شاخص‌های اکسیدان/آنتی اکسیدان

نمونه‌های هیپوکمپ پس از جداسازی در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از خارج شدن از فریزر با دقت میلی گرم وزن شده و در یک میلی لیتر بافر فسفات با $\text{pH}=7.2$ توسط دستگاه هموژنایزر هموژنیزه گردید و مایع رویی توسط سانتریفوژ یخچال دار ($g=10,000$, ۱۵ دقیقه) جداسازی شد. کلیه پارامترهای بیوشیمیایی در این مایع اندازه‌گیری شد و نتایج مقدار ماده در هر گرم وزن هیپوکمپ ارائه شد.

سطح فعالیت مالون دی آلدئید^۱ به عنوان شاخص انتهایی پراکسیداسیون لیپیدها و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز^۲، گلوکاتیون پراکسیداز^۳ و کاتالاز^۴ به عنوان شاخص‌های آنتی اکسیدان اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری میزان MDA

بر اساس روش TBARS اندازه‌گیری شد. در این روش غلظت مالون دی آلدئید بر اساس جذب نوری کمپلکس MDA-TBA در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقایسه با منحنی استاندارد MDA به دست می‌آید [۳۰].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SOD

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SOD با استفاده از کیت شرکت Biorex انجام گرفت که در آن رادیکال‌های سوپراکسید با ماده‌ای به نام I.N.T.^۵ واکنش داده و

کمپلکس قرمز رنگ فورمازون را تشکیل می‌دهد، فعالیت آنزیم SOD از طریق مهار واکنش و اندازه‌گیری جذب نوری کمپلکس فورمازون در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد [۳۱].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم GPx

اندازه‌گیری فعالیت گلوکاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت شرکت Biorex انجام شد. آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز، اکسیداسیون گلوکاتیون^۶ را به وسیله کومن هیدروپراکسید کاتالیز نمود. با اندازه‌گیری کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر فعالیت آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز اندازه‌گیری شد [۳۱].

اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از تجزیه پراکسید هیدورژن در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز معرف‌ها را با هم مخلوط کرده و در نهایت جذب نوری نمونه‌ها و کنترل در مقابل بافر ترنس-HCl در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد [۳۱].

روش آنالیز آماری

کلیه داده‌های حاصل از این مطالعه به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ارائه و تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از برنامه آماری SPSS-21 با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری $p<0.05$ انجام شد. تفاوت آماری پارامترهای مختلف در بین گروه‌های مختلف در صورت نرمال و همگن بودن داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه^۷ و آزمون متعاقب LSD انجام شد و در صورت عدم نرمال بودن یک پارامتر در گروه‌های آزمایشی از آزمون کروسکال-والیس^۸ استفاده شد.

^۱ MDA

^۲ SOD

^۳ GPx

^۴ CAT

^۵ 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium

^۶ GSH

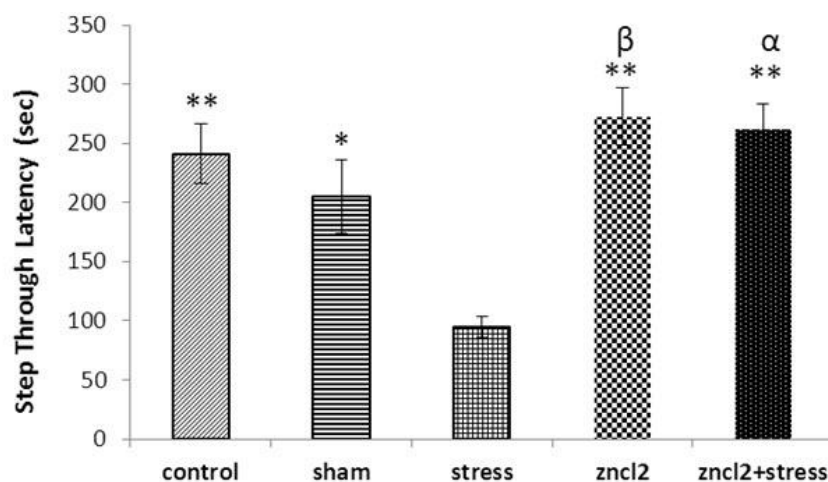
^۷ One-way ANOVA

^۸ Kruskal-wallis

یافته‌ها

میانگین مدت زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک در گروه کنترل ۲۴۰ ثانیه و در گروه‌های شاهد، استرس، گروه دریافت کننده کلرید روی و گروه دریافت کننده کلرید روی+ استرس به ترتیب ۲۱۲، ۸۹، ۲۲۸ و ۲۱۷ ثانیه بود. با توجه به غیرنرمال بودن این پارامتر از آزمون کروسکال-والیس استفاده شد و مقایسه میانگین مدت زمان تاخیر در ورود به اتاقک تاریک ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک نشان داد که بین دو گروه کنترل

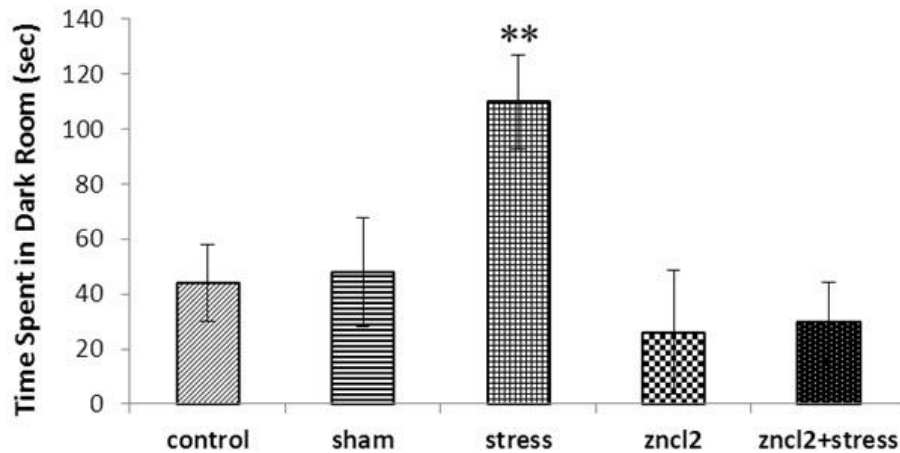
با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، مدت زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک در گروه استرس نسبت به گروه‌های کنترل، کلرید روی و گروه استرس تیمار شده با کلرید روی کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.01$) و این زمان در گروه استرس نسبت به شاهد نیز کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). مدت زمان تاخیر در گروه کلرید روی و گروه استرس تیمار شده با کلرید روی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داشت ($p < 0.05$) (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه میانگین زمان تاخیر در ورود به اتاقک تاریک ۲۴ ساعت پس از اعمال شوک (مرحله به خاطرآوری) در گروه‌های مورد مطالعه. * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه استرس با گروه کنترل، شاهد، کلرید روی و گروه استرس تیمار شده با کلرید روی است ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$). α نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه استرس تیمار شده با کلرید روی با گروه شاهد ($p < 0.05$) و β نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کلرید روی با گروه شاهد است ($p < 0.05$) ($n=10$).

میانگین مدت زمان سپری شده در جعبه تاریک ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک در گروه کنترل ۴۷ ثانیه و این زمان در گروه‌های شاهد، استرس، گروه دریافت کننده کلرید روی و گروه استرس تیمار شده با کلرید روی به ترتیب ۵۱/۴، ۱۱۳، ۲۵/۷ و ۳۱ ثانیه

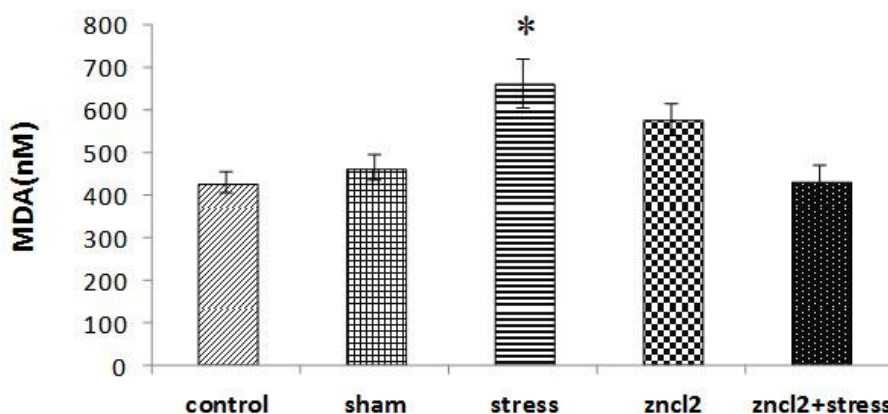
بود. مقایسه میانگین مدت زمان سپری شده در اتاقک تاریک با استفاده از آزمون کروسکال-والیس بیانگر افزایش این زمان در گروه استرس نسبت به سایر گروه‌های مورد مطالعه بود ($p < 0.01$). بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه مدت زمان سپری شده در اتاقک تاریک پس از اعمال شوک (مرحله به خاطرآوری) در گروه دریافت کننده استرس با سایر گروهها (**: $p < 0.01$).

کننده کلرید روی و گروه استرس تیمار شده با کلرید روی بود ($p < 0.05$). در بین سایر گروهها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳).

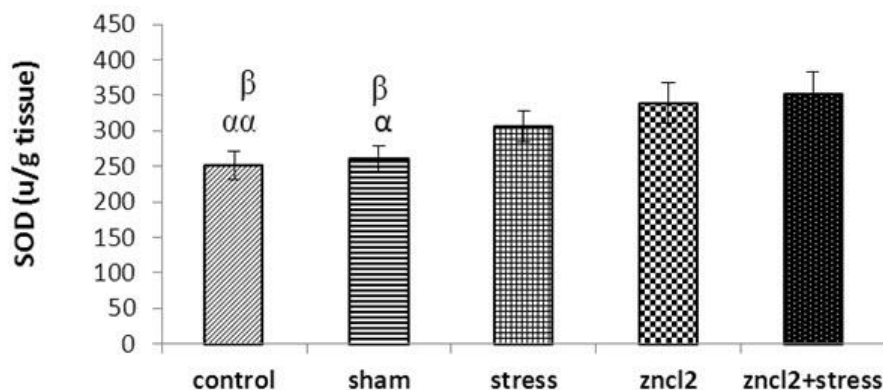
مقایسه سطح فعالیت مالون دی آلدئید با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه بیانگر افزایش معنی‌داری فعالیت این آنزیم در گروه استرس در مقایسه با گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت



شکل ۳. مقایسه سطح فعالیت مالون دی آلدئید در گروه‌های مورد مطالعه. *: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در گروه دریافت کننده استرس با سایر گروهها است ($p < 0.05$).

استرس تیمار شده با کلرید روی نیز در مقایسه با گروه شاهد ($p < 0.05$) و کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.01$) و در بین سایر گروهها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴).

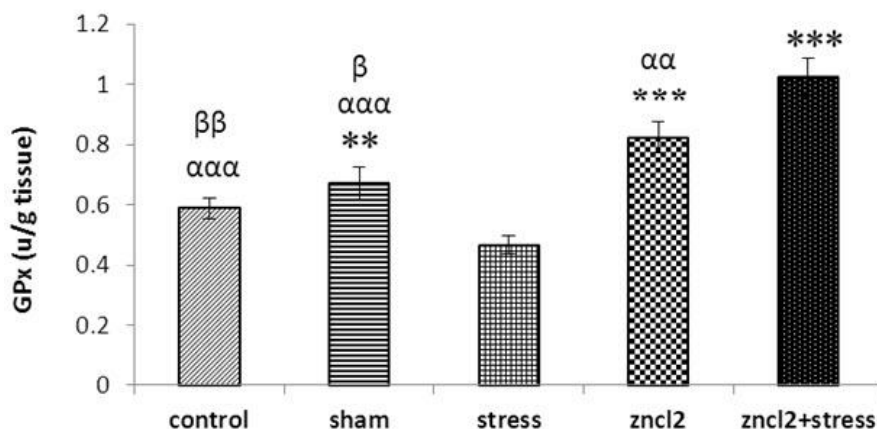
با مقایسه سطح فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در گروه‌های مورد بررسی، فعالیت این آنزیم در گروه کلرید روی در مقایسه با گروه کنترل و شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$). گروه



شکل ۴. مقایسه سطح فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز در گروه‌های مورد مطالعه. α نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه استرس تیمار شده با کلرید روی با گروه شاهد و کنترل است ($\alpha: p < 0.01$, $\beta: p < 0.05$). $\alpha\alpha$ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه استرس تیمار شده با کلرید روی با گروه شاهد و کنترل است ($p < 0.05$).

را نشان داد ($p < 0.01$). سطح فعالیت این آنزیم در گروه استرس تیمار شده با کلرید روی در مقایسه با گروه شاهد و کنترل ($p < 0.001$) و گروه کلرید روی ($p < 0.01$) افزایش یافت. فعالیت این آنزیم در گروه کلرید روی در مقایسه با گروه شاهد و ($p < 0.05$) و گروه کنترل ($p < 0.01$) افزایش یافت (شکل ۵).

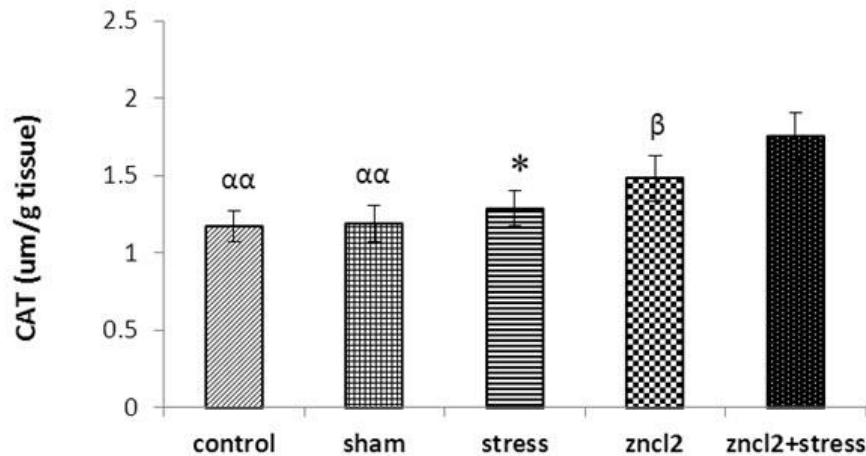
با مقایسه میزان فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در گروه‌های مورد بررسی، کاهش معنی‌داری در گروه استرس در مقایسه با گروه کلرید روی و گروه استرس تیمار شده با کلرید روی وجود داشت ($p < 0.001$). همچنین فعالیت این آنزیم در گروه استرس نسبت به گروه شاهد نیز کاهش معنی‌داری



شکل ۵. مقایسه فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه استرس با گروه‌های شاهد، کلرید روی و گروه استرس تیمار شده با کلرید روی است ($\alpha: p < 0.01$, $\beta: p < 0.05$). $\alpha\alpha$ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه استرس تیمار شده با کلرید روی با گروه شاهد، کنترل و گروه کلرید روی است ($\alpha\alpha: p < 0.001$, $\alpha: p < 0.01$). $\beta\beta$ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کلرید روی با گروه شاهد و کنترل است ($\beta\beta: p < 0.01$, $\beta: p < 0.05$).

تیمار شده با کلرید روی در مقایسه با گروه شاهد و کنترل ($p < 0.01$) افزایش یافت. فعالیت این آنزیم در گروه کلرید روی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$) (شکل ۶).

با مقایسه فعالیت کانالاز در گروه‌های مورد بررسی، کاهش معنی‌داری در گروه استرس در مقایسه با گروه استرس تیمار شده با کلرید روی وجود داشت ($p < 0.05$). سطح فعالیت این آنزیم در گروه استرس



شکل ۶. مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های مورد مطالعه. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه استرس با گروه استرس تیمار شده با کلرید روی است ($p < 0.05$), α نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه استرس تیمار شده با کلرید روی با گروه شاهد و کنترل است ($p < 0.01$). β نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کلرید روی با گروه کنترل است ($p < 0.05$).

بحث

یافته‌های حاصل از آزمون شاتل باکس بیانگر این مطلب است که در مرحله به خاطر آوری پس از اعمال شوک، گروه دریافت کننده کلرید روی در مقایسه با سایر گروه‌ها، تاخیر بیشتری برای ورود به محفظه تاریک شاتل باکس داشتند، در حالیکه مدت زمان کمتری در اتاقک تاریک سپری کردند، که این مسئله نشان دهنده افزایش حافظه احترازی در گروه دریافت کننده کلرید روی است. در این راستا مطالعات تاکدا^۱ و همکاران نشان می‌دهد که کمبود روی در طی دوران تکامل بر حافظه احترازی غیر فعال و حافظه کوتاه مدت تأثیر گذار است اما مصرف مکمل‌های روی تأثیری بر حافظه بلندمدت ندارد و باعث بهبود حافظه کوتاه مدت می‌شود [۳۲]. چووانادیسای^۲ و همکاران نیز نشان دادند که کمبود روی در دوران بارداری بیان گیرنده‌های NMDA را در مغز زاده‌های متولد شده کاهش می‌دهد و نشان دادند که بیان گیرنده‌های NMDA توسط روی تنظیم می‌شود و با توجه به اهمیت این گیرنده در یادگیری و حافظه، کمبود روی در دوران بارداری از

طریق این مکانیسم باعث اختلال در حافظه و یادگیری فرزندان آنها می‌شود [۳۳]. اثرات آشکار روی در سراسر دوره تکامل، از رشد مغز جنین گرفته تا پس از تولد، یادآور این مطلب است که روی یک عنصر ضروری برای حفظ هومئوستازی و ادامه زندگی است. این عنصر با غلظت بالا در سیستم عصبی مرکزی به ویژه هیپوکمپ متمرکز شده به طوریکه اختلاف در غلظت آن می‌تواند در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی مرکزی نظیر آلزایمر، افسردگی، تروما و صرع نقش داشته باشد [۲۰]. مطالعات یانگ و همکاران نشان می‌دهد که افزایش میزان روی در مغز می‌تواند باعث افزایش بیان BDNF شود. BDNF به عنوان یک فاکتور نوروتروفیک نقش مهمی در تشکیل حافظه بلند مدت دارد و این نتیجه بیانگر نقش مهم روی در یادگیری و حافظه تشکیل شده در هیپوکمپ و بیان BDNF است و کمبود روی در هیپوکمپ به دلیل کاهش میزان آن در سیناپس‌ها و کاهش بیان BDNF باعث اختلال یادگیری و حافظه می‌شود [۲۵]. در سطح مولکولی، روی از طریق تنظیم فعالیت فاکتورهای رونویسی بر بیان ژن تأثیر دارد و مسئول فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم

¹ Takeda

² Chowanadisai

سلول‌های عصبی است. در سطح سلولی، روی به عنوان یک مدولاتور عمل کرده و فعالیت سیناپسی و انعطاف پذیری عصبی را در طی تکامل و بزرگسالی تنظیم و تعدیل می‌کند. علت اثر مثبت کلرید روی بر روند حافظه را می‌توان تأثیر مهم آن بر رها شدن همزمان روی و گلوتامات از نورون‌ها و اثر گلوتامات بر گیرنده‌های NMDA که جزء مهم در ارتباط با یادگیری و تشکیل حافظه است، دانست [۳۴].

در آزمون شاتل باکس گروه دریافت کننده استرس در مقایسه با سایر گروه‌ها تاخیر کمتری برای ورود به جعبه تاریک داشتند و مدت زمان بیشتری در جعبه تاریک سپری کردند. که این بر کاهش حافظه احترازی در گروه تحت استرس دلالت دارد.

استرس می‌تواند بر اختلالات شناختی تأثیرگذار باشد. تحقیقی که توسط لیو^۱ و همکاران انجام گرفت، نشان داد که استرس حاد باعث اختلال در فراخوانی حافظه و تثبیت حافظه کوتاه مدت به بلند مدت می‌شود [۳]. گلوکوکورتیکوئیدهای آزاد شده به دنبال استرس به طور مستقیم و نورآدرنالین به طور غیرمستقیم بر هسته قاعده‌ای جانبی آمیگدال اثر می‌کنند و این هسته نیز بر فرایند تشکیل حافظه در هیپوکمپ و کورتکس پری فرونتال تأثیرگذار است [۳۵]. علاوه بر استرس در طول زندگی، استرس در دوران بارداری نیز می‌تواند بر عملکرد مغز زاده‌ها تأثیرگذار باشد. مطالعات لمیر^۲ نشان می‌دهد که استرس دوران بارداری می‌تواند باعث کاهش تکثیر نورون‌های هیپوکمپ، مهار تشکیل LTP و اختلال حافظه در ماز آبی موريس شود [۳۶]. مطالعات بالینی نیز نشان می‌دهند که استرس دوران بارداری نیز باعث کاهش یادگیری در کودکان ۵-۷ ساله می‌شود [۳۷]. به عبارتی استرس از طریق مکانیسم‌های مختلفی نظیر آسیب سلولی DNA، تغییر بیان ژن، اختلال در رونویسی mRNA و بیان

گیرنده‌های مختلف، انتقال سیناپسی، انتقال دهنده‌های عصبی، مهار LTP و مکانیسم‌های دیگری که به طور مستقیم عملکرد مغز را در یادگیری و حافظه تغییر می‌دهند، باعث اختلال حافظه می‌شود [۲].

نتایج حاصل از بررسی تغییرات شاخص‌های اکسیدان/آنتی اکسیدان ایجاد شده در هیپوکمپ متعاقب ایجاد استرس حاد بیانگر کاهش معنی‌دار سطح فعالیت سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز و افزایش مالون دی آلدئید در گروه دریافت کننده استرس در مقایسه با سایر گروه‌هاست. در حالیکه سطح فعالیت سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز در گروه دریافت کننده کلرید روی به تنهایی و گروه استرس تیمار شده با کلرید روی نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داد.

افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش مقدار آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌تواند یک مکانیسم احتمالی برای اثرات مخرب استرس بر یادگیری و حافظه باشد.

آنتی اکسیدان‌ها اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد را به حداقل رسانده و از سلول‌های بدن در برابر آسیب‌های ناشی از این رادیکال‌ها محافظت می‌کنند. از جمله این رادیکال‌های آزاد، یون پراکسید ناپایدار و فعال است که منجر به آسیب‌های غشای سلولی در سلول‌های مصرف کننده اکسیژن می‌شود. برای از بین بردن سمیت اکسیژن فعال، طیف وسیعی از مکانیزم‌های دفاعی بدن عمل می‌کنند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر SOD، CAT و GPx به عنوان یک مکانیسم دفاعی برای حفاظت سلول در برابر استرس اکسیداتیو عمل می‌کند [۳۸].

مالون دی آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است که مارکر خوبی برای سنجش دژنراسیون نورونی است. گونه‌های اکسیژن فعال^۳ که از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و دیگر ترکیبات شیمیایی

^۱ Liu^۲ Lemaire^۳ ROS

ساخته شده اند می‌توانند منجر به پیشرفت استرس اکسیداتیو در بدن و در نتیجه سبب مرگ نورونی گردند بافت مغز غنی از فسفولیپیدهایی است که می‌تواند مورد حمله گونه‌های بسیار واکنش پذیر اکسیژن برای شروع پراکسیداسیون لیپید قرار گیرد [۳۸]. مطالعات انجام شده در این راستا نشان می‌دهند که استرس ناشی از بی حرکتی باعث افزایش قابل توجهی در پراکسیداسیون چربی‌ها و اکسیداسیون پروتئین‌ها می‌شود [۳]. استرس از طریق تغییر میزان گلوکوکورتیکوئیدها، فاکتور نوروتروپیک مشتق از مغز^۱، تغییر فعالیت سیستم کولینرژیک، سیستم سروتونرژیک و تشکیل رادیکال‌های آزاد در اختلال حافظه و یادگیری شرکت می‌کند [۳۹].

فونتلا^۲ و همکاران نشان دادند که اثرات استرس ناشی از تکرار مهارکننده^۳ باعث افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و گلوکاتیون پراکسیداز

^۱ BDNF^۲ Fontella^۳ Restrain Stress

می‌شود در حالی که فعالیت سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز بدون تغییر می‌مانند [۲]. کمبود روی می‌تواند باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش آسیب اکسیداتیو به DNA، پروتئین و لیپید شود [۲۴]. نتایج بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهند که روی به طور غیرمستقیم به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و کمبود آن در رژیم غذایی با بیماری‌های مختلف در انسان از جمله سرطان و سایر بیماری‌های مزمن ارتباط دارد. روی با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر Cu/Zn SOD و Zn متالوتونین باعث مهار فعالیت NADPH اکسیداز و مهار تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود [۲۴].

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد مصرف کلرید روی با مکانیسم مهار تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌تواند از اختلال حافظه ناشی از استرس حاد جلوگیری کند.

References

- 1- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1998 Spring;10(2):230-1.
- 2- Fontella FU, Siqueira IR, Vasconcellos APS, Tabajara AS, Netto CA, Dalmaz C. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. Neurochem Res. 2005 Jan;30(1):105-11.
- 3- Liu J, Wang X, Shigenaga M, Yeo H, Mori A, Ames B. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. Faseb J. 1996 Nov;10(13):1532-8.
- 4- Alkadhi K, Alzoubi K, Srivareerat M, Tran T. Chronic psychosocial stress exacerbates impairment of synaptic plasticity in β -amyloid rat model of Alzheimer's disease: prevention by nicotine. Curr Alzheimer Res. 2011 Nov;8(7):718-31.
- 5- Alkadhi KA, Srivareerat M, Tran TT. Intensification of long-term memory deficit by chronic stress and prevention by nicotine in a rat model of Alzheimer's disease. Mol Cell Neurosci. 2010 Nov;45(3):289-96.
- 6- Gerges NZ, Alzoubi KH, Park CR, Diamond DM, Alkadhi KA. Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats. Behav Brain Res. 2004 Nov;155(1):77-84.
- 7- Srivareerat M, Tran TT, Alzoubi KH, Alkadhi KA. Chronic psychosocial stress exacerbates impairment of cognition and long-term potentiation in β -amyloid rat model of Alzheimer's disease. Biol Psychiat. 2009 Jun;65(11):918-26.
- 8- Walker E, Mittal V, Tessner K. Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. Annu Rev Clin Psychol. 2008 Dec;4:189-216.

- 9- Wilson RS, Schneider JA, Boyle PA, Arnold SE, Tang Y, Bennett DA. Chronic distress and incidence of mild cognitive impairment. *Neurology*. 2007 June;68(24):2085-92.
- 10- Vogel S, Schwabe L. Learning and memory under stress: implications for the classroom. *npj Science of Learning*. 2016 Jun;1:16011.
- 11- Wolf OT. The influence of stress hormones on emotional memory: relevance for psychopathology. *Acta Psychol*. 2008 Mar;127(3):513-31.
- 12- Conrad CD. The relationship between acute glucocorticoid levels and hippocampal function depends upon task aversiveness and memory processing stage. *Nonlinearity in biology, toxicology, MEDICINE*. 2005 Jan;3(1):nonlin. 003.01. 4.
- 13- Diamond DM, Park CR, Campbell AM, Woodson JC. Competitive interactions between endogenous LTD and LTP in the hippocampus underlie the storage of emotional memories and stress-induced amnesia. *Hippocampus*. 2005 Aug;15(8):1006-25.
- 14- Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P, Tang Y. Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci*. 2008 Apr;82(17):934-42.
- 15- Lupien SJ, Buss C, Schramek TE, Maheu F, Pruessner J. Hormetic influence of glucocorticoids on human memory. *Nonlinearity in biology, toxicology, Medicine*. 2005 Jan;3(1):nonlin. 003.01. .
- 16- McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science*. 2000 Jan;287(5451):248-51.
- 17- Flinn J, Hunter D, Linkous D, Lanzirotti A, Smith L, Brightwell J, et al. Enhanced zinc consumption causes memory deficits and increased brain levels of zinc. *Physiol Behav*. 2005 Jan;83(5):793-803.
- 18- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr*. 2000 May;130(5):1471S-83S.
- 19- Golub MS, Keen CL, Gershwin ME. Moderate zinc-iron deprivation influences behavior but not growth in adolescent rhesus monkeys. *J Nutr*. 2000 Feb;130(2):354S-7S.
- 20- Gower-Winter SD, Levenson CW. Zinc in the central nervous system: from molecules to behavior. *Biofactors*. 2012 May;38(3):186-93.
- 21- Micheletti A, Rossi R, Rufini S. Zinc status in athletes. *Sport Med*. 2001 July;31(8):577-82.
- 22- Boroujeni ST, Naghdi N, Shahbazi M, Farrokhi A, Bagherzadeh F, Kazemnejad A, et al. The effect of severe zinc deficiency and zinc supplement on spatial learning and memory. *Biol Trace Elem Res*. 2009 Jul;130(1):48-61.
- 23- Mackenzie GG, Salvador GA, Romero C, Keen CL, Oteiza PI. A deficit in zinc availability can cause alterations in tubulin thiol redox status in cultured neurons and in the developing fetal rat brain. *Free Radical Bio Med*. 2011 Jul; 51(2):480-9.
- 24- Eide DJ. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics*. 2011 Jul; 3(11):1124-9.
- 25- Yang Y, Jing XP, Zhang SP, Gu RX, Tang FX, Wang XL, et al. High dose zinc supplementation induces hippocampal zinc deficiency and memory impairment with inhibition of BDNF signaling. *PLoS One*. 2013 Jan;8(1):e55384.
- 26- Piechal A, Blecharz-Klin K, Pyrzanowska J, Widy-Tyszkiewicz E. Maternal zinc supplementation improves spatial memory in rat pups. *Biol Trace Elem Res*. 2012 Jan ;147(1-3):299-308.
- 27- Suh SW, Chen JW, Motamedi M, Bell B, Listiak K, Pons NF, et al. Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res*. 2000 Jan; 852(2):268-73.28.
- 28- Gomez J, Lewis M, Sebastian V, Serrano P, Luine V. Alcohol administration blocks stress-induced impairments in memory and anxiety, and alters hippocampal neurotransmitter receptor expression in male rats. *Horm Behav*. 2013 Apr; 63(4):659-66.
- 29- Ghotbeddin Z, Moazedi AA, Parham GA. Effect of combined administration of Zinc chloride and Aluminum chloride on memory and motor activity of young rats. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Jan;11(2):146-52.
- 30- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*. 1966 Aug;16(2):359-64.

- 31- Bavari M, Tabandeh MR, Najafzadeh Varzi H, Bahramzadeh S. Neuroprotective, antiapoptotic and antioxidant effects of l-carnitine against caffeine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Drug Chem Toxicol*. 2016 Jul;39(2):157-66.
- 32- Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Rev*. 2000 Dec;34(3):137-48.
- 33- Chowanadisai W, Kelleher SL, Lönnerdal B. Maternal zinc deficiency reduces NMDA receptor expression in neonatal rat brain, which persists into early adulthood. *J Neurochem*. 2005 Jul;94(2):510-9.
- 34- Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol*. 2005 Apr;75(6):367-90.
- 35- Schwabe L, Joëls M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS. Stress effects on memory: an update and integration. *Neurosci Biobehav R*. 2012 Aug;36(7):1740-9.
- 36- Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza P-V, Abrous DN. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiat*. 2006 May;59(9):786-92.
- 37- Laplante DP, Brunet A, Schmitz N, Ciampi A, King S. Project Ice Storm: Prenatal maternal stress affects cognitive and linguistic functioning in 5½-year-old children. *J AM Acad Child Psy*. 2008 Sep;47(9):1063-72.
- 38- Li J, Li W, Jiang Z-G, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*. 2013 Dec;14(12):24438-75.
- 39- Sandi C, Pinelo-Nava MT. Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast*. 2007 Feb;2007.