اثر تزریق دو طرفه داخل هیپوکامپی (CA1) فسفاتیدیل کولین بر یادگیری فضایی موشهای صحرایی نر بالغ

محمود امینی زاده[۱]، مهدی عباس نژاد*[۲]، احمد علی معاضدی[۲] و مهری بهاالدینی[۳]

[۱] اهواز، دانشگاه شهید چمران، گروه فیزیولوژی

[۲]کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۳ - کرمان، دانشگاه شهید باهنر، گروه فیزیولوژی

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲

چکیده

مطالعات نشان داده است، لسیتین(فسفاتیدیل کولین)که یکی از مواد موجود در رژیم غذایی و نیز یکی از ترکیبات غشای سلولی است، در روند پردازش یادگیری و حافظه و نیز در تنظیم غلظت استیل کولین در سیناپسهای مرکزی تأثیر دارد. از آنجایی که هیپوکامپ یکی از مهم ترین نواحی دخیل در یادگیری می باشد، در این تحقیق اثر تزریق دو طرفه داخل هیپوکامپی (CA1)، لسیتین بر یادگیری فضایی *موشهای صحرایی*، بررسی و مطالعه شد. بدین منظور ۴۹ سر حیوان در ۷ گروه استفاده گردید. درگروه اول تا چهارم لسیتین در مقادیر ۰/۵ ، ۱ ، ۲ و۴ میکروگرم در یک میکرولیتر سرم فیزیولوژیک با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه به مدت ۴ روز و هر روز به مدت ۲۰ دقیقه قبل از آموزش به صورت دو طرفه در ناحیه (CA1) هیپوکامپ تزریق می شد. به گروه پنجم به عنوان شاهد لسیتین، مشابه گروههای آزمایش، با همان حجم سرم فیزیولوژی، تزریق شد. گروه ششم شامل حیوانات شاهد جراحی بودند که جراحی می شدند، اما تزریقی در یافت نمی کردند. گروه هفتم نیز گروه کنترل (دست نخورده) بودند. عملکرد این گروهها در چهار روز با وجود سکو و در روز پنجم بدون وجود سکوی مخفی در ماز آبی موریس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که لسیتین در مقدار (۴ µg / µl)، یادگیری فضایی موشهای صحرایی نر بالغ را در چهار روز اول آزمایش به طورمعنی داری ($P < ۰/۰۵$) در ماز آبی موریس بهبود می بخشد. پارامتر های یادگیری مربوط به روز پنجم اختلاف معنی داری را نشان نداد. با توجه به نتایج حاصله به نظر می آید که لسیتین احتمالاً از طریق افزایش سیالیت غشای سلولهای عصبی و افزایش سطوح کولین و استیل کولین در نواحی (CA1) هیپوکامپ یادگیری فضایی موشهای صحرایی نر بالغ را در ماز آبی موریس بهبود می بخشد.

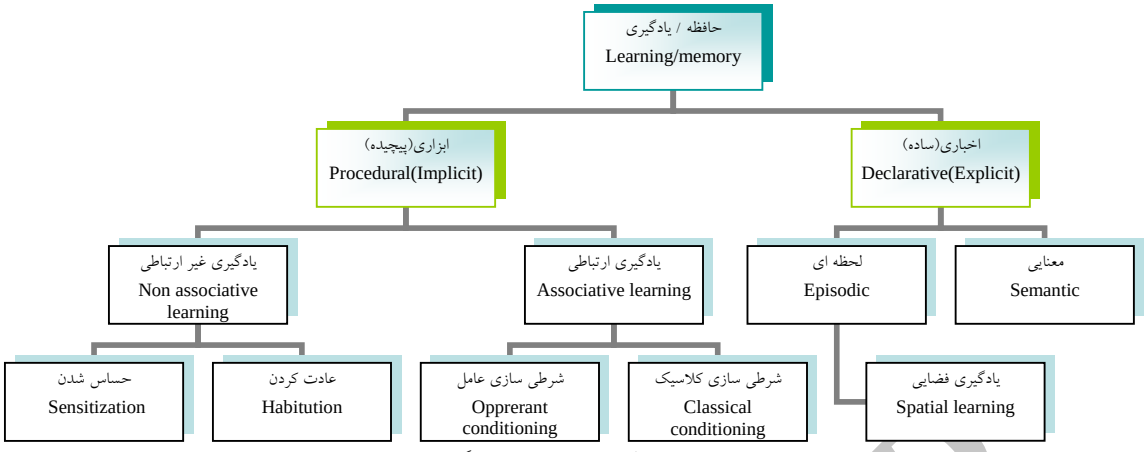
واژه های کلیدی: فسفاتیدیل کولین، یادگیری فضایی، ماز آبی موریس، هیپوکامپ، *موش صحرایی*

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳۴۱۳۲۲۲۰۳۲، پست الکترونیکی: mabbas@mail.uk.ac.ir

مقدمه

انسان همیشه در حال یادگیری است و نه تنها مهارتی جدید یا موضوعی درسی را می آموزد، بلکه رشد هیجانی، تعامل اجتماعی و حتی رشد شخصیت هم با یادگیری حاصل می شود. یادگیری را می توان تغییر نسبتاً دایمی رفتار که در نتیجه تمرین و تجربه به وجود آمده است تعریف نمود. طبقه بندیهای متفاوتی از یادگیری و حافظه ارائه شده است در یک تقسیم بندی کلی حافظه و یادگیری به دو بخش یادگیری اخباری (ساده) و یادگیری ابزاری (پیچیده) تقسیم بندی می شود (شکل ۱) (۲۵).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- طبقه بندی یادگیری (۲۵)

یادگیری فضایی نوعی یادگیری لحظه ای است که در این نوع یادگیری لوب گیجگاهی میانی، هیپوکامپ و نواحی از قشر جلوی پیشانی دخالت دارد. در سالهای اخیر مشخص شده است که درون هیپوکامپ دسته ای از نورونها وجود دارد که نسبت به موقعیت حیوان در فضا، الگوی آتش کردن خاصی را نشان می دهند این سلولها که به وفور در هیپوکامپ یافت می شوند، سلولهای مکانی نامیده می شوند. آسیب دیدن هیپوکامپ منجر به اختلالاتی در یادگیری فضایی می شود (۲۵).

فسفاتیدیل کولین با نام تجاری لسیتین، یکی از ترکیبات اصلی در غشاهای سلولی است (۲) که تقریباً، ۴۰ درصد فسفولیپیدهای غشای سلولی یوکاریوتها را تشکیل می دهد. همچنین این ماده به عنوان یک پیش ساز در ساخت میانجی عصبی، استیل کولین مطرح می باشد (۱۹). تحقیقات انجام شده در طی بیست سال گذشته، مکانیسمهای فیزیولوژیکی که منجر به شکسته شدن فسفولیپیدهای سلول برای ایجاد پیامبران ثانویه می شوند را شرح داده اند. به عنوان مثال گیرنده هایی که در نهایت منجر به تجزیه فسفاتیدیل اینوزیتول و تولید اینوزیتول تری فسفات، IP3 (Inositol triphosphate) و دی اسیل گلیسرول، DAG (Di-acyl glycerol) شده و یا محرکهای فیزیولوژیک فعال کننده فسفولیپازهایی که بر روی فسفولیپیدهای حاوی کولین اثر می گذارد، از این جمله اند (۱۹).

یک گروه مهم ازپروتئینهای غشاء، آنزیمهای فسفولیپازی هستند که پیوندهای گوناگونی را در فسفولیپیدها هیدرولیز می کنند. شکستن فسفولیپیدها نه تنها منجر به تشکیل پیامبران ثانویه می گردد، بلکه در نفوذپذیری غشاهای سلولی هم تأثیر می گذارد (۱۹). آنزیمهای هیدرولیز کننده فسفولیپیدها شامل، فسفولیپاز A، PLA (Phospholipas A)، فسفولیپاز C، PLC (Phpsphplipase C) و فسفولیپاز D، PLD (Phospholipase D) می باشند که هر کدام از این آنزیمها، جایگاههای خاصی از فسفولیپیدها را تجزیه می کنند (۱۹).

PLD) که در قشر مغز و هیپوکامپ بیان می شود (۶)، فسفاتیدیل کولین (لسیتین) را هیدرولیز کرده، فسفاتیدیک اسید، PA (Phosphatidic Acid) وکولین آزاد می کند. PA به نوبه خود به DAG و لیزو فسفاتیدیک اسید، LPA (Lysophosphatidic acid) بیشتر هیدرولیز می گرد (۸، ۱۹، ۳۲، ۳۳). دو نوع PLD در دستگاه عصبی مرکزی بیان می شود که شامل PLD1 و PLD2 می باشند. هر دو نوع PLD در پاسخ به میانجی های نورونی، فاکتورهای رشد و هورمونها فعال می شوند(۱۹ و ۳۲). شواهدی نیز حاکی از آن است که PLD1 به وسیله

Archive of SID
www.SID.ir

پروتئین کینازC (PKC) و نیز فسفو لیپیدها تحریک می گردد (۲۹). همچنین در هیپوکامپ،گیرنده های متابوتروپیکیِ مرتبط با G – پروتئین ها منجربه فعال سازی (PLD) می شوند (۱۸، ۲۹ و ۳۲). در مورد اثر فسفاتیدیل کولین بر یادگیری گزارشات متناقضی وجود دارد. در این رابطه لیتوود و همکارانش گزارش دادند که استفاده از فسفاتیدیل کولین به صورت خوراکی به مدت ۴ روز، اثری روی اجرای موشهای جوان در دستگاه شاتل باکس نداشته، در حالی که عملکرد موشهای پیر در مقادیر بالای فسفاتیدیل کولین تا ۳۰ درصد افزایش می یابد (۲۲). سوزوکی و همکارانش نیز گزارش کردند که تزریق خوراکی فسفاتیدیل کولین ، حافظه کوتاه مدت را در موشهای سوری که دچار فراموشی شده اند، افزایش می دهد اما روی حافظه موشهای طبیعی اثری ندارد(۲۴). همچنین ایشان گزارش کردند که تزریق داخل بطنی فسفاتیدیل کولین در مقادیر۲۰ و۵۰ میکروگرم به ازای هر موش، فراموشی ناشی از اسکوپولامین را بهبود نمی بخشد (۳۱). در ضمن مشخص شده است که تزریق داخل صفاقی ODHPC ،1-Oleoyl-2-Docosahexaenoyl-sn-Glycer-3-Phosphatidylcholine (نوعی فسفاتیدیل کولین)، ۲۰ دقیقه قبل از تحریک تتانیک، میزان تقویت طولانی مدت، LTP (Long Term Potentition) را در هیپوکامپ افزایش می دهد. هم چنین آفرینش و همکارانش نشان دادند که تجویز فسفاتیدیل کولین به صورت داخل معدی (با گاواژ) در مقادیر ۴۸۰،۱۴۰،۱۲۰ mg/kg یادگیری فضایی موشهای صحرایی نر بالغ در ماز T– شکل را افزایش می دهد (۱) . ایزاکی و همکارانش نیزگزارش دادند که تزریق داخل صفاقی، (ODHPC)، یادگیری موشهای صحرایی را افزایش می دهد(۱۵و ۱۶). شواهدی نیز به این نکته تاکید دارند که فسفاتیدیل کولین فراموشی ناشی از پیری را بهبود می بخشد (۱۶). تجویز فسفاتیدیل کولین به بیمارانی که دچار زوال عقل (دمانس) شده اند امیدوارکننده بوده است (۷). بنابر این با وجود اینگزارشات متناقض در مورد اثر فسفاتیدیل کولین بریادگیری، در این تحقیق اثر تزریق داخل هیپوکامپی فسفاتیدیل کولین بر یادگیری مورد بررسی قرار گرفت تا با بررسی اثر فسفاتیدیل کولین بر یادگیری فضایی زمینه تحقیقات برای استفاده از این ماده در جهت درمان بیماریهای زوال عقل مانند آلزایمرکه درآن غشای سلولهای عصبی و همچنین میزان لیپید های غشاء دستخوش تغییراتی می شود فراهم گردد.

مواد و روشها

در این مطالعه تعداد ۴۹ سر *موش صحرایی نر* از نژاد NMRI، از انستیتو پاستور ایران، تهران با میانگین وزنی۲۵± ۲۲۵ گرم، استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۱ ± ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند (۲۶). کلیه آزمایشها بین ساعت ۱۲ ظهر تا ۶ بعد از ظهر در ماز آبی موریس (Morris Water Maze)(MWM) انجام شد.

جراحی: *موشها* ابتدا با تزریق داخل صفاقی سدیم پنتوباربیتال (۵۰ mg/kg) (۲۶) بیهوش شده و سپس کانولها (سر سوزن شماره ۲۱) به صورت دو طرفه در ناحیه (CA_1) با مشخصات (DV=-3.2, AP=-3.8, ML=±2./2) کاشته می شدند (۲۶). برای درپوش کانولها از سر سوزن شماره ۲۵ و برای تزریق از سر سوزن شماره ۲۷ استفاده گردید. سرعت تزریق، یک میکرولیتر در دقیقه در نظر گرفته می شد (۲۶) و ابتدا محلول درون یکی از کانولهای کاشته شده تزریق می شد و سپس تزریق درکانول مقابل آن نیز انجام می شد. روش، ترتیب و زمان تزریق برای همه حیوانات یکسان در نظر گرفته می شد.

گروههای مورد آزمایش : *موشهای صحرایی* به هفت گروه هفت تایی تقسیم گردیدند:

– گروههای تزریق فسفاتیدیل کولین (گروههای اول تاچهارم): موشهای این گروهها تحت عمل جراحی استرئوتاکسی قرار گرفته و یک هفته پس ازکانول گذاری

Archive of SID
www.SID.ir

به صورت دو طرفه در ناحیه (CA_1)، به مدت چهار روز و هر روز ۲۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش به میزان ۰/۵ ، ۱ ، ۲ و ۴ میکروگرم فسفاتیدیل کولین (خریداری شده از شرکت سیگما – آلدریچ) حل شده در یک میکرولیتر سرم فیزیولوژی با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه دریافت می کردند (۲۶) .

– گروه پنجم (گروه تزریق سرم فیزیولوژی): موشهای این گروه جراحی شده و یک هفته پس از کانول گذاری به صورت دو طرفه در ناحیه (CA_1)، به مدت چهار روز و هر روز ۲۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش به میزان یک میکرولیتر سرم فیزیولوژی با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه دریافت می کردند. این گروه برای بررسی اثر تزریق سرم بر یادگیری فضایی موشها در دستگاه (MWM) مورد استفاده قرار می گرفت.

– گروه ششم (شاهد جراحی): موشهای این گروه جراحی شده و کانولهایی به صورت دو طرفه در ناحیه (CA_1) هیپوکامپ آنها کاشته می شد. موشهای این گروه هیچ گونه تزریقی دریافت نمی‌کردند و تنها برای تأثیر کانول گذاری بر یادگیری فضایی و مقایسه با گروه کنترل مورد استفاده قرار می گرفتند. عملکرد گروههای ذکر شده یک هفته پس از جراحی در مدت چهار روز در ماز آبی موریس مورد آزمایش قرار می گرفت.

– گروه هفتم (گروه کنترل): موشهای سالم و بدون هیچ گونه عمل جراحی، در مدت چهار روز در ماز آبی موریس مورد آزمایش قرار می گرفتند .

نحوه انجام آزمایش : آزمایشهای رفتاری با ماز آبی موریس انجام شد. این ماز از یک حوضچه استوانه ای شکل با قطر ۱۳۶ سانتیمتر و ارتفاع ۶۰ سانتیمتر تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتیمتری با آب ۱±۲۰ درجه سانتی گراد پر می شود. یک سکوی سیاه رنگی از جنس پلکسی گلاس با قطر ۱۰ سانتیمتر درون حوضچه، ۱/۵ سانتیمتری زیرسطح آب در مرکز یکی از چهار ربع حوضچه به گونه ای قرار می گیرد که فاصله مرکز سکو از دیواره حوضچه و مرکز دایره به یک اندازه باشد و موقعیت سکو در تمام طول آزمایشات ثابت باقی بماند. آزمایش رفتاری در هر روز به صورت یک بلوک مرکب از ۴ کارآزمایی انجام می شد. در هر کارآزمایی حیوان به گونه ای رها می شود که صورتش به طرف دیواره حوضچه باشد. چهار کارآزمایی هرروز از چهار جهت شمال،جنوب،شرق و غرب به طور تصادفی به وسیله نرم افزار ردیاب انتخاب می شد به طوری که از هر یک از این چهار نقطه شروع در هر روز یک بار استفاده گردید. برای شروع آزمایش موش از یکی از نقاط شروع درون حوضچه رها شده و ۹۰ ثانیه به موش فرصت داده شد تا سکوی مخفی را در زیر آب بیابد. چنانچه موش توانست در این مدت سکو را پیدا کند به حیوان اجازه داده می شد به مدت ۳۰ ثانیه روی سکو بماند. ولی اگر در مدت ۹۰ ثانیه حیوان نتوانست موقعیت سکو را پیدا نماید حیوان توسط آزمایشگر از درون آب خارج شده و به روی سکو منتقل می گردید. پس از اتمام ۲۰ ثانیه روی سکو، موش از درون حوضچه خارج شده و سپس از نقطه شروع دوم رها می شد. این عمل تا پایان کارآزمایی چهارم انجام گردید. پس از اتمام کارآزمایی چهارم موشها به آرامی با حوله خشک و مدتی گرم نگاه داشته شده و سپس به قفس خود باز گردانده می شدند. در هر کار آزمایی، نمایش حرکت موش بر اساس رنگ حیوان به نرم افزار معرفی می گردد و به وسیله یک دوربین که در بالای حوضچه نصب شده فیلم برداری شده و توسط نرم افزار ردیاب ابتدا پردازش و سپس اطلاعاتی نظیرمیانگین سرعت شنا کردن، میانگین زمان کل سپری شده برای یافتن سکو، میانگین مسافت کل طی شده برای یافتن سکو و میانگین درصد زمان و مسافت طی شده در ربع هدف (ربعی که سکو در آن قرار داشته) استخراج می گردید (۳ و ۲۶).

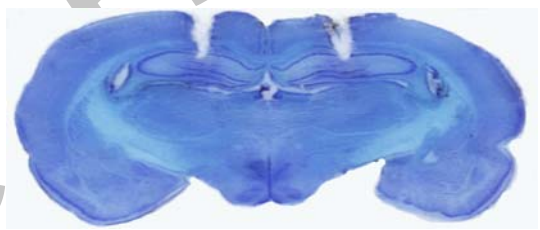
آزمایش روز پنجم : در روز پنجم تست پروب انجام شد که در آن جهت ارزیابی عملکرد حیوان، موش در حوضچه بدون سکو رها گردید. مسیر حرکت حیوان به مدت ۳۰

Archive of SID

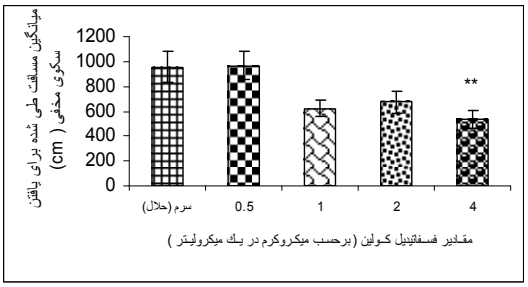
www.SID.ir

ثانیه ثبت شده و اطلاعاتی نظیر مسافت و زمان طی شده در ربعی که قبلاً سکو در آن قرار داشته و نیز سرعت شنا کردن استخراج شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۳ و ۲۶).

بعد از اتمام آزمایشها، سر حیوانات جدا شده و ازمغز موشها پس از خروج از جمجمه و فیکس کردن در محلول فرمالین ۱۰ درصد، برشهایی در حد ۲۰۰ میکرومتر از آنها به وسیله دستگاه ویبرواسلایس، تهیه گردید. سپس مقاطع مغزی رنگ آمیزی شدند تا موقعیت کانول در ناحیه (CA1) تأیید شود (شکل۲). نتایج به دست آمده از هر حیوان تنها در صورتی جهت تجزیه و تحلیل آماری پذیرفته می شد که محل تزریق در هر دو طرف در ناحیه (CA1) قرار داشت.

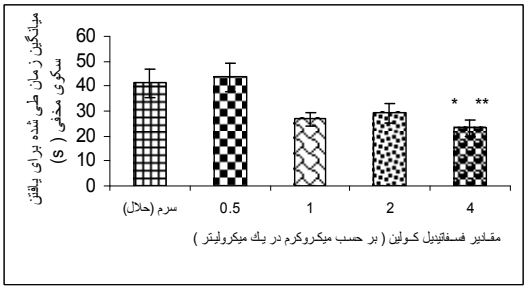


شکل ۲ – موقعیت کانول ها در برشهای مغز پس از رنگ آمیزی



نمودار ۱ – میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی در ماز آبی موریس در گروههای تزریق سرم (یک میکرو لیتر) و فسفاتیدیل کولین (درمقادیر ۴، ۲، ۱ ، ۰/۵ میکرو گرم در یک میکرو لیتر) در چهار روز آزمایش. (**، **p<۰/۰۱** در مقایسه با گروه تزریق سرم و فسفاتیدیل کولین در مقدار ۰/۵ µg/µl می باشد) .

محاسبات آماری : جهت مقایسه پارامترهای چهار روز آزمایش، از آزمون آماری طرح کاملاً تصادفی دو طرفه آنالیز واریانس‌استفاده گردید. جهت مقایسه پارامترهای روز پنجم آزمایش، از آزمون آماری طرح کاملاً تصادفی یک طرفه آنالیز واریانس‌استفاده گردید. همچنین ($P<0.05$) به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد و نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± خطای معیار بیان گردیدند (۳و۲۶).



نمودار ۲ – میانگین زمان طی شده برای یافتن سکوی مخفی در ماز آبی موریس در گروههای تزریق سرم (یک میکرو لیتر) و فسفاتیدیل کولین (در مقادیر ۴، ۲، ۱ ، ۰/۵ میکرو گرم در یک میکرو لیتر) در چهار روز آزمایش . (* ، p <۰/۰۵ در مقایسه با گروه تزریق سرم و ، p<۰/۰۱ *** در مقایسه با گروه تزریق فسفاتیدیل کولین µg/µl ۰/۵ می باشد) .

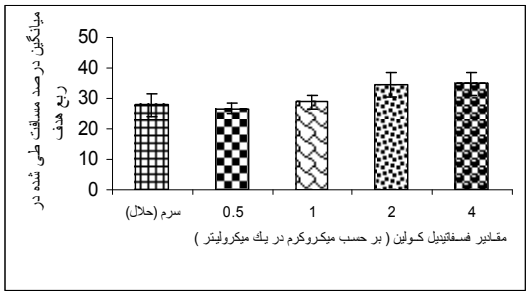
نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس دو طرفه در چهار روز آزمایش، بین گروههای کنترل، شاهد جراحی و تزریق سرم (به عنوان حلال فسفاتیدیل کولین) حاکی از آن بود که بین گروههای مذکور تفاوت معنی داری در هیچ یک از پارامترهای اندازه گیری شده وجود ندارد. میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی، در چهار روز آزمایش بین گروه تزریق سرم و گروههای آزمایش فسفاتیدیل کولین در مقادیر (µg / µl ۴ ، ۲ ، ۱ ، ۰/۵) اختلاف معنی داری را نشان می داد ($F_{4,120} = 5.331$ ، $p = 0.001$) (نمودار۱). در مقایسه بین روزها نیز اختلاف معنی داری مشاهده شد($F3,120 = 13.329$ ، $p<0.0001$) ولی تداخل گروه در روز معنی دار نبود($F12, 120 = 0.363$ ، $p = 0.974$). آزمون Tukey نشان داد که میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی در گروه تزریق فسفاتیدیل کولین با مقدار µg /µl به طور معنی داری کمتر از

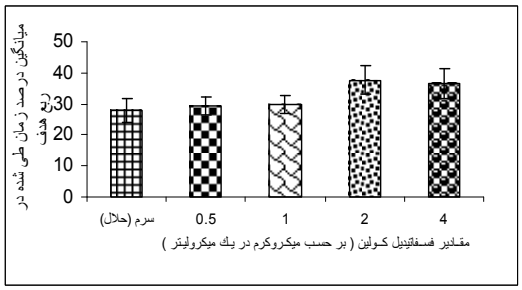
Archive of SID
www.SID.ir

گروههای تزریق سرم فیزیولوژی($p<0.01$) می باشد. همچنین میانگین زمان طی شده برای یافتن سکوی مخفی در چهار روز اول آزمایش، در بین گروههای تزریق سرم و گروههای آزمایش فسفاتیدیل کولین در مقادیر(۴µg/µl، ۲ ، ۱، ۰/۵) اختلاف معنی داری نشان می داد ($F_{4,120}$ = 5.191 ، p = 0.001) (نمودار۲). در مقایسه بین روزها، اختلاف معنی داری مشاهده شد (F3,120 = 13.82 ، p< 0.0001) ولی تداخل گروه در روز معنی دار نبود (F12 , 120 = 0.296 ، p = 0.989) . آزمون Tukey نشان داد که میانگین زمان طی شده برای یافتن سکوی مخفی در گروه تزریق فسفاتیدیل کولین با مقدارµg/µl ۴ به طورمعنی داری کمترازگروههای تزریق سرم فیزیولوژی ($p<0.05$) می باشد.

عملکرد گروههای فوق در روز پنجم آزمایش نشان داد که میانگین درصد مسافت طی شده در ربع هدف در روز پنجم آزمایش در مقادیر بالای فسفاتیدیل کولین(مقدارِ µg / µl ۴) افزایش پیدا کرده ولی این افزایش معنی داری نبود (P = 0.277 , $F_{4, 30}$= 1.342) (نمودار۳). میانگین درصد زمان طی شده در ربع هدف در روز پنجم برای دوز µg / µl ۴ فسفاتیدیل کولین افزایش بدون معنی نشان می داد ، (P = 0.265 , $F_{4 , 30}$= 1.379) (نمودار۴).



نمودار ۳ – میانگین درصد مسافت طی شده در ربع هدف در ماز آبی موریس در گروههای تزریق سرم (یک میکرو لیتر) و فسفاتیدیل کولین (در مقادیر ۴، ۲، ۱ ، ۰/۵ میکرو گرم در یک میکرو لیتر) در روز پنجم آزمایش .



نمودار ۴ – میانگین درصد زمان طی شده در ربع هدف در ماز آبی موریس در گروههای تزریق سرم (یک میکرو لیتر) و فسفاتیدیل کولین (در مقادیر ۴، ۲، ۱ ، ۰/۵ میکرو گرم در یک میکرو لیتر) در روز پنجم آزمایش .

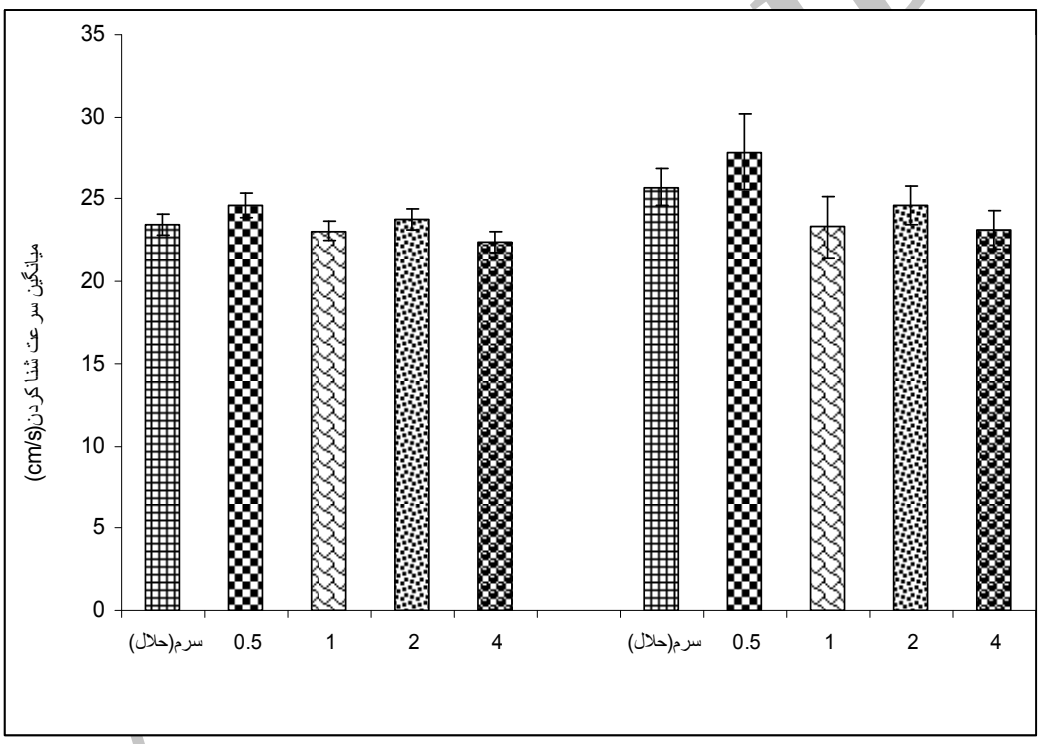
از آنجایی که میانگین سرعت شنا کردن برای یافتن سکوی مخفی در چهار روز اول آزمایش ، در بین گروههای تزریق سرم و گروههای آزمایشی فسفاتیدیل کولین در مقادیر (µg / µl ۴ ، ۲ ، ۱ ، ۰/۵) اختلاف معنی داری نشان نمی داد ($F_{4,120}$ = 1.538 ، p = 0.196) و میانگین سرعت شنا کردن در روز پنجم آزمایش نیز بین گروههای فوق اختلاف معنی داری را نشان نمی داد (P = 0.229 , $F4_{, 30}$= 1.494) (نمودار۵)، نتیجهٔ گیری کلی که از این آزمایشات گرفته می شود دلالت بر اثر بهبود دهندگی مقادیر بالای فسفاتیدیل کولین(مقدارِ µg / µl ۴) بر یادگیری فضایی موشهای صحرایی نر بالغ در ماز آبی موریس دارد .

بحث

با توجه به اینکه میانگین مسافت و زمان طی شده برای یافتن سکوی مخفی در چهار روز اول آزمایش کاهش پیدا کرده (نمودار ۱ و ۲) این موضوع حاکی از آن است که *موشهای* تحت تزریق فسفاتیدیل کولین به ویژه مقدار µg/µl ۴ مسافت و زمان کمتری را برای یافتن سکوی مخفی در حوضچه سپری کرده اند و نشان دهنده این است که یادگیری *موشها* پس از تزریق فسفاتیدیل کولین افزایش پیدا کرده است. از آنجایی که میانگین درصد مسافت و زمان سپری شده در ربع هدف در روز پنجم آزمایش افزایش معنی داری نداشته است (نمودار۴ و ۵) می توان چنین استنباط کرد که تزریق

Archive of SID
www.SID.ir

فسفاتیدیل کولین در دُزهای مصرفی نتوانسته است یادگیری فضایی را در روز پنجم آزمایش، بهبود ببخشد، هر چند که موشها در روز پنجم مسافت و زمان بیشتری را در ربعی سپری کرده اند، که قبلاً سکو در آن قرار داشته است. با این پیش فرض که در سیستم MWM چهار روز اول در رابطه با یادگیری و روز پنجم که سکویی وجود ندارد بیشتر حافظه را می آموزند، بنابراین تزریق فسفا تیدیل کولین بر حافظه در روز پنجم تأثیر معنی داری ایجاد نکرده است. با بررسی نمودار های (۲ و ۶) می توان دریافت که میانگین سرعت شنا کردن در چهار روز اول و همچنین در روز پنجم در بین گروههای تزریق فسفاتیدیل کولین و سرم فیزیولوژیک اختلاف معنی داری نداشته پس افزایش یادگیری ناشی از اثر فسفاتیدیل کولین بوده و اختلاف در فعالیتهای حرکتی در آن بی اثر بوده است. لذا موضوع تأکید می کند دارو اثر حرکتی نداشته که از این طریق پارامترهای مورد سنجش متأثر شوند، در واقع مؤکد اثر بر پارامترهای یادگیری است ، اگر دارو فعالیت حرکتی را افزایش می داد حیوان این شانس را داشت که زودتر سکو را پیدا کند، بدون اینکه بتوان توجیه کرد دارو بتواند در پارامترهای مربوط به یادگیری در سیستم عصبی مؤثر باشد.



نمودار ۵- میانگین سرعت شنا کردن در ماز آبی موریس در گروههای تزریق سرم (یک میکرولیتر) و فسفاتیدیل کولین (در مقادیر **۴، ۲، ۱، ۰/۵** میکرو گرم در یک میکرو لیتر) در چهار روز اول آزمایش (الف) و روز پنجم(ب).

نتایج به دست آمده از این تحقیق برخی از یافته های قبلی که بیان می کند، فسفا تیدیل کولین یادگیری فضایی موشهای صحرایی را افزایش می دهد را تایید می نماید . به طورکلی فراوانترین لیپیدهای غشاء، فسفولیپیدها هستند (۲، ۸، ۱۳، ۱۵ و ۱۶) و فراوان ترین فسفو لیپید بیشتر غشاهای سلولی، فسفا تیدیل کولین می باشد (۲). هم چنین فسفو لیپیدها، لیپیدهای اصلی غشای سلولهای عصبی به شمار می آیند (۷، ۱۰ و ۲۸) . فسفو لیپیدها به غشاهای عصبی، پایداری، سیالیت و نفوذ پذیری می بخشند. بنابراین فسفولیپیدهای غشای سلولهای عصبی، منبعی برای پیامبران ثانویه محسوب می شوند و در واقع در سیستمهای سیگنال ترانسداکش سلولی مداخله دارند (۱۰) . شواهدی

www.SID.ir

نیز حاکی از آن است که فسفاتیدیل کولین می تواند به غشاء ملحق شده (۲۱) و سیالیت غشاء را افزایش دهد (۱۰ و ۲۷) . فسفاتیدیل کولین گیرنده ها را در نورونها بیشتر در معرض قرار داده (۲۷)، بنابراین می تواند حساسیت سلولها را به لیگاند مورد نظر متأثر نماید. از این رو فسفاتیدیل کولین احتمالاً از طریق افزایش سیالیت غشاء عملکرد کانالها و گیرنده های مربوط به فرآیند (LTP) را تغییر داده و منجر به افزایش یادگیری می شود(۱) . لازم به ذکر است نباید تصور کرد چون حیوانات سالم بودند و از قبل محدودیت در فسفاتیدیل کولین نداشتند، پس نقش این ترکیب در حیوانات سالم که جمعیت مورد مطالعه تحقیق حاضر بودند در ابهام است زیرا که اولاً هر ترکیب داخلی در بدن دارای یک محدوده فیزیولوژی است که تغییر آن در محدوده فیزیولوژیک در حیوان سالم نیز منجر به دست آوردهای متعدد می گردد، ثانیاً دقیقاً همین ترکیب توسط محققین به صورت محیطی آن هم در حیوانات سالم و بدون نقص و یا محدودیت در فسفاتیدیل کولین اثر بخش بوده (۲۲، ۲۳) در نتیجه تفاوت پژوهش حاضر با آنها در جایگاه تزریق می باشد. مطالعات قبلی نشان داده اند که حتی تزریق فسفاتیدیل کولین به حیوان سالم بدون نقص در غلظت کولین یا استیل کولین نیز غلظت استیل کولین و کولین را در محدوده فیزیولوژیک می افزاید (۱۵، ۱۶، ۲۳ و ۲۴). همچنین پژوهشهای دیگران نشان داده اند رژیم غذایی سرشار از فسفاتیدیل کولین در حیوانات نرمال باعث افزایش خارهای دندریتی نورونها در نواحی خاصی در مغز می گردد(۵). افزایش فراهمی کولین به روش فسفاتیدیل کولین می تواند از طریق سایر ترکیبات فسفولیپیدی غشاء نورونها نیز پلاستیسیته نورونها را متأثر سازد (۱۷).

از طرفی مسیرکولینرژیک منشعب به هیپوکامپ و قشرمغز نقش مهمی را در یادگیری و حافظه ایفا می کند (۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۶). تخریب سیستم کولینرژیک و هسته های کولینرژیک، منجر به نواقصی در یادگیری و حافظه می شود (۹، ۱۱، ۲۴ و ۲۸). احتمالاً فسفاتیدیل کولین بعد از الحاق به غشاء (۲۱) در معرض فسفو لیپیازهای غشاء قرار گرفته و هیدرولیز می شود. فعال سازی(PLD) ، احتمالاً به وسیله خودِ فسفاتیدیل کولین، (PKC) و گلوتامات و حتی استیل کولین (۲۰)، منجر به هیدرولیز فسفاتیدیل کولین به فسفاتیدیک اسید و کولین می شود (۱۹، ۲۹، ۳۰، ۳۲ و ۳۳). فسفاتیدیک اسید تولید شده می تواند مستقیماً به صورت یک مولکول پیام رسان عمل نموده (۳۰) و یا به (DAG) و (LPA) بیشتر هیدرولیز شود (۳۰،۳۳). (DAG) قادر است، (PKC) را فعال کرده (۱۵، ۱۸، ۳۳) و لذا (LTP) را افزایش دهد (۱۵،۱۸). کولین آزاد شده نیز در ساخت فسفاتیدیل کولین و استیل کولین استفاده می شود (۴، ۱۵، ۱۹، ۲۸ و ۳۳).

اصولاً ساخت استیل کولین در نورونهای کولینرژیک متکی به منبع کولین می باشد، بنابراین فراهمی کولین برای سنتز استیل کولین یک مرحله مهم در ساخت استیل کولین می باشد(۲۰و۳۳). حیواناتی که دچار کمبود کولین هستند به طور معنی داری سطح پایینی از کولین استیل ترانسفراز، Choline acetyl transferase) ChAT) دارند (۱۴و۲۸). همچنین افزایش غلظت کولین، انتقال سیناپسی را در سیناپسهای کولینرژیک و توانایی این نورونها را در تولید استیل کولین افزایش می دهد (۱۸). مطالعات زیادی نشان داده اند که متعاقب تزریق فسفاتیدیل کولین، غلظت استیل کولین، کولین مغز و کولین سرم خون افزایش می یابد (۱۳، ۱۵، ۱۶، ۲۴، ۲۷). کولین در بقای سلولهای عصبی مغز قدامی و بقای حافظه موثر بوده(۱۴و۲۸) و اندازه جسم سلولی نورونهای کولینرژیک را افزایش می دهد (۱۴) و رژیم غذایی مملو از فسفاتیدیل کولین تراکم خارهای دندریتی مغز را افزایش می دهد (۱۸).

شواهدی نشان می دهند که لیپید های فعال زیستی در تنظیم عملکرد سیناپسی دخالت دارند (۵). احتمالاً تأمین کولین تولید فاکتور فعال کننده پلاکت، PAF (Platelet

Archive of SID

www.SID.ir

Activating Factor)، که یک فسفولیپید حاوی کولین است (۱۸) را افزایش می دهد. (PAF) موجود در مغز (۱۷) در انعطاف پذیری سیناپسی و حافظه مؤثر است (۵). در هنگام LTP ، بالا رفتن کلسیم داخل سلولی در نورون پس سیناپسی منجر به فعات سازی آنزیم Acetyl-coA:Lyso-PAFaceyltransferase می شود. این آنزیم در ساخت PAF در نورونها ضروری است. با افزایش تولید PAF، این ماده از نورون پس سیناپسی وارد نورون پیش سیناپسی شده و به عنوان یک پیامبر برگشتی در نواحی (CA1) در پیدایش (LTP) (۵، ۱۷ و ۱۸) نقش دارد. مشخص شده است که انتقال سیناپسی تحریکی در هیپوکامپ به وسیله(PAF) افزایش می یابد (۵) و همچنین(PAF) رهایش گلوتامات و نیز (LTP) را زیاد می کند (۱۷) .

نتیجه گیری کلی این خواهد بود، از آنجا که تزریق فسفاتیدیل کولین عملکرد پارامترهای یادگیری را در موشهای صحرایی در MWM تا حدودی بهبود بخشیده است بنابراین شاید واسطه اعمال این اثر از طریق تغییر در سیالیت غشاء، محتوای فسفولیپیدی آن و یا تغییر در حساسیت سلولهای عصبی به نورو ترانسمیترهای دخیل در یادگیری از طریق میزان دسترسی به گیرنده های اختصاصی شان باشد، البته روشن شدن مکانیسم دقیق احتیاج به انجام پروژه های تحقیقاتی تکمیلی در این زمینه خواهد بود.

منابع

۱- آفرینش- محمد رضا، معاضدی - احمد علی، عباس نزاد - مهدی، تابستان ۱۳۸۳، اثر تجویزدهانی لسیتین بر یادگیری موشهای صحرایی، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ، جلد سوم، شماره سوم، صفحات ۱۴۶- ۱۴۱

۲- بروس - آلبرتس و دیگران ، ۱۳۸۴، مبانی زیست شناسی سلولی، ترجمه بهاروند - حسین ، شیخیان - علی ، انتشارات تابش اندیشه ، صفحه ۳۳۴

۳- پور رحیمی - علی محمد، شیبانی - وحید، عباس نژاد - مهدی، مظهری- شهرزاد، بهار ۱۳۸۶، بررسی اثرات محرومیت از خواب REM در موشهای صحرایی حامله بر یادگیری فضایی فرزندان نر بالغ آنها، مجله فیزیولوژی و فارکولوژی ، جلد۱۱، شماره اول، صفحات ۳۷- ۳۰

4- Cermak . J M , Holler . T , Jackson . D A , Blusztajn . J K , 1998 Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system , The FASEB Journal ; 12 : 349 – 357

5- Chen . C , Bazan . N G , Sep2005, Lipid signaling : sleep , synaptic plasticity, and neuroprotection , Prostaglandings Other Lipid Mediat ; 77 (1-4) : 65-76

6- Choi . J S , Park . H J , Jo . Y C . Chun . M H , et all , March 2004, Immunohistochemical localization of phospholipase D2 in embryonic rat brain , Neuroscience Letters ; 357 : 147 – 151

7- Chung . S , Moriyama . T , Uezu . E , Uezu . K , et all . , 1995 Administration of phosphatidylcholine increases brain acetylcholine concentration and Improves memory in mice with dementia , J . Nutr ; 125: 1484 – 1489

8- Cockcroft . S , 2001, Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2 , CMLS , Cell . Mol . Life Sci ; 58 : 1674 – 1687

9- Drachman . D A ,Glosser . G , Fleming . P , Longenecker . G , 1982, Memory decline in the aged :treatment with lecithin and physostigmine , Neurology (Ny) ; 32: 944 – 50

10- Farooqui . A A , Antony . P , Ong . W Y i , Horrocks . L A , et al , 2004, Retinoic acid – mediated phospholipase A signaling in the nucleus , Brain Research Reviews ; 45(3) :179– 95

11- Giovanni . M G , Casamenti . F , Bartolini . G , Pepeu . G , 1997, The brain cholinergic system as a target of cognition enhancers , Behavioural Brain Research ; 83: 1 – 5

12- Harris . G , Dysken . M W , Fovall . P , Davis . J M , 1983, Effect of lecithin on memory in normal adults , Am J Psychiatry ; 140:1010 – 1012

Archive of SID
www.SID.ir

13- Hashimoto. M,Gong . X W , Izaki . Y, Iriki . M , 1999, 1-Oleoyl-2-docosahexaenoyl phosphatidylcholine increased paradoxical sleep in F344 rats , Neuroscience Letters ; 158: 29 – 32

14- Holmes . G L , Yang . Y , Liu . Z, Cermak . J M , et all , 2002, Seizure – induced memory impairment is reduced by choline supplementation before or after status epilepticus , Epilepsy Research ; 48: 3 – 13

15- Izaki . Y , Hashimoto . M , Arita . J , Iriki . M , et all , 1994, Intraperitoneal injection of 1-oleoyl-2-docosahexaenoyl phosphatidylcholine enhances discriminatory shock avoidance learning in rats , Neuroscience Letters ; 167: 171 – 174

16- Izaki . Y ,Hashimoto . M , Arita . J, 1999, Enhancement by 1-oleoyl-2-dococsahexaenoyl hosphatidylcholine of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 region , Neuroscience Letters ; 260: 146 – 148

17- Jerusalinnsky . D , Fin . C , Quillfeldt . G A , Ferreira . M B , et all , Jul 1994, Effect of antagonists of platelet – activating factor receptors on memory of inhibitory avoidance in rats , Behav Neural Biol ; 62 (1): 1 – 3

18- Jones . J P , Meck . W H , Williams . C L , Wilson . W A , et all , 1999, Choline availability to the developing rat fetus alters adult hippocampal long- term potentiation , Developmental Brain Research ; 118: 159 – 167

19- Klein . J, 2000, Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids , J Neural Transm ; 107 : 1027 – 1063

20- Koppen . A , Klein . J , Erb . C , Loffelholz . K , 1997, Acetylcholine release nd choline availability in rat hippocampus :effects of exogenous choline and nicotinamide , Pharmacology ; 82 : 1139 – 1145

21- Kubarko . A I , Tsaryuk . V , 1986 Effect of phosphatidylcholine on body temperature and posterior hypothalamic unit activity in animals ; 101(6) : 652 – 654

22- Leathwood . P D , Heck . E , Mauron . J , Mar 1982 Phosphotidylcholine and avoidance performance in 17 month-old SEC/1ReJ mince , Life Sci ; 30 (13): 1065 – 71

23- Lim . S Y , Suzuki . H , Mar 2008 Dietary phosphatidylcholine improves maze-learning performance in adult mice, J Med Food ;11(1) :86-90

24- Lim . S Y , Suzuki . H , 2000, Intakes of dietary docosahexaenoic acid ethyl ester and egg phosphatidylcholine improve maze-learning ability in young and old mice , Journal of Nutrition ; 130 : 1629 – 1632

25- Longstaff . A , 2000, Neuroscience , First published , Biddies LTD , Guild Ford Press; 375-399

26- Majlessi. N, Kadkhodaee . M, Parvis . M, Naghdi . N , 2003, Serotonin depletion in rat hippocampus attennates L-NAME- induced spatial learning deficits , Brain Research; 963; 244-251

27- Masuda . Y , Tokubo . T , Yamashita . M , Ikeda . H , et all , 1998, Egg phosphatidylcholine combined with vitamin B12 improved memory impairment following lesiooning of nucleus basalis in rats , Life Science ; 62(9) : 813 – 822

28- Nakamura . A , Suzuki . Y , Umegaki . H , Ikari . H , et all , 2001, Dietary restriction of choline reduces hippocampal acetylcholine release in rats: In vivo microdialysis study , Brain Research Bulletin ; 56(6) : 593 – 597

29- Rizzo . M A , Romero . G , 2002, Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade , Pharmacological & Therapeutics ; 94 , 35 – 50

30- Saito . S , Sakagami . H , Kondo . H , 2000, Localization of mRNAs for phospholipase D (PLD) type 1and 2 in the brain of developing and mature rat , Developmental Brain Research ; 120 : 41 – 47

31- Suzuki . S , Kataoka . A , Furushiro . M , 2000, Effect of intracerebroventricular administration of soybean lecithin transphosphatidylated phosphatidylserine on scopolamine –induced amnesic mice , Jpn . J . Pharmacol ; 84 : 86 – 88

32- Zhang . Y , Huang . P , Du . G , Kanaho . Y , et al , 2004, Increased expression of two phospholipas Disoforms during experimentally induced hippocampal mossy fiber outgrowth , GLIA ; 46: 74 – 83

33- Zhao . D , Frohmam . M A , Blusztajn. J K , 2001, Generation of choline for acetylcholine synthesis by phospholipase D isoforms , BMC Neurosci ; 2 (1) : 16

Archive of SID

www.SID.ir

The effect of bilateral intrahippocampal injection of phosphatidylcholine on spatial learning in adult male rats

Amini zadeh M.[1], Abbasnejad M.[2], Moazedi A.A.[2] and Bahaaddini M.[3]

[1]**Physiology Dept., Shaheed Chamran University, Ahvaz, I.R. of IRAN**

[2] **Biology Dept., Shaheed Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN**

[3] **Physiology Dept., Shaheed Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN**

Abstract

The previous studies have shown that lecithin (phosphatidylcholine), as an important lipid in the diet and plasma membrane has a crucial role in the release of acethylcholine and process of learning and memory. Due to the fact that hippocampus is the most important part of the brain involved in learning, The aim of this research is to study, the effect of intrahippocampal (CA1) injection of lecithin (phosphatidylcholine) on spatial learning. In so doing, 49 Adult *male rats* dividing in to 7 groups as fallow ; test groups (1 – 4), have received 1µl of lecithin dissolved in the physiological salin at concentration of (0.5 , 1 , 2 , 4 µg / µl) 4 days sequentially , 90 minutes, before training. Group 5 received, 1µl of physiological salin , the groups 6 and 7 were respectively sham operate and control (intact). Data analysis showed that lecithin at concentration of 4 µg /µl improved spatial learning in Morris Water Maze (p< 0/05). It seems that lecithin improves spatial learning via enhancing choline and acetylcholine levels in hippocampus and increasing of fluidity of plasma membrane.

Keywords: Phosphatidylcholine; Spatial Learning; Morris Water Maze; Choline; Hippocampus

Archive of SID

www.SID.ir