Archive of SID

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۱، دی ۱۳۹۰، صفحه ۴۴-۳۶

مقاله تحقیقی

ارزیابی میزان فراموشی ناشی از اسکوپولامین بر تعداد آستروسیت های شکنج دندانه ای موش صحرایی نر

نسرین سادات اعظمی(PhD) [۱]، محمود حیدری(PhD) [۱]، مهرداد جهانشاهی(PhD) [۲*]

۱- گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

دریافت: ۹۰/۲/۲۱، اصلاح: ۹۰/۴/۸، پذیرش: ۹۰/۶/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: ارتباط فعالیت سیستم کولینرژیک و رسپتورهای موسکارینی در حافظه و یادگیری از پیش مشخص شده است. از آنجاییکه آستروسیت ها با سیناپس ها تماس دارند، تغییرات ساختاری و مورفولوژیکی قابل توجه ای در هنگام یادگیری پیدا می کنند. این مطالعه به منظور بررسی اثر میزان فراموشی ناشی از اسکوپولامین بر تعداد آستروسیتهای شکنج دندانه ای رت انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه تجربی بر روی ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی۲۵۰-۲۰۰ گرم که در ۶ گروه هشت تایی قرار گرفتند، انجام شد. پس از کانول گذاری دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ، رتها در دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری آموزش دیدند. بلافاصله تزریق سالین و یا دوزهای مختلف اسکوپولامین (۲و ۱، ۰/۵ µg/Rat) به درون (Cornu Amonis, CA1) انجام شد. تست حافظه ۲۴ ساعت بعد از آموزش به صورت اندازه گیری زمان تاخیر ورود به خانه سیاه گرفته شد. ۴۸ ساعت بعد از تست رفتاری، حیوانات تشریح شدند و برشهای عرضی از هیپوکامپ آنها گرفته و با رنگ آمیزی اختصاصی آستروسیت ها (PTAH) رنگ آمیزی شدند. تراکم آستروسیتها در ناحیه شکنج دندانه ای اندازه گیری و مقایسه شد.

یافته ها: تزریق اسکوپولامین توانست فراموشی ایجاد کند. در بررسی بافتی تفاوت معنی داری در تعداد آستروسیتها بین گروه کنترل و گروه شم که فقط استرس جراحی را داشتند، دیده شد ($p<0/05$). افزایش تعداد آستروسیتهای گروههایی که اسکوپولامین دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که با فراموشی القاء شده توسط اسکوپولامین، تعداد آستروسیتها در شکنج دندانه ای افزایش می یابد.

واژه های کلیدی: اسکوپولامین، فراموشی، آستروسیت، شکنج دندانه ای، موش بزرگ آزمایشگاهی.

مقدمه

یادگیری اجتنابی مهاری مدل step-through روشی است که برای مطالعه یادگیری و حافظه در موش های صحرایی به کار می رود (۱). طی دو دهه اخیر، موضوع اختلالات شناختی توجه بسیاری از محققین را به خود معطوف کرده است. شواهد بدست آمده از مطالعات فارماکولوژیک مبنی بر نقش مهم استیل کولین در اعمال شناختی نشان می دهد که اختلال در عملکرد مسیر کولینرژیک معمولا با اختلال در یادگیری همراه بوده و افزایش عملکرد کولینرژیک معمولا سبب افزایش یادگیری و حافظه می شود (۳و۲). تخریب و اختلال شدید فعالیت سیستم کولینرژیک، ارتباط نزدیکی با نقص های شناختی وابسته به سن و بیماری آلزایمر در حیوانات و انسان دارند (۵و۴). هیپوکامپ از قاعده مغز جلویی و سپتوم، آوران های کولینرژیک دریافت می کند که در اعمال حافظه و یادگیری نقش بسزایی ایفا می کنند و نقش گیرنده های موسکارینی و نیکوتینی استیل کولین بر شکل گیری یادگیری ثابت شده است (۷و۶). تحقیقات متعددی نقش سیستم کولینرژیک در یادگیری و حافظه ناحیه هیپوکامپ را نشان دادند (۸). شباهت های زیادی بین نقص حافظه ایجاد شده در بیماران مبتلا به آلزایمر و حیوانات تیمار شده با اسکوپولامین وجود دارد، به گونه ای که از اسکوپولامین برای ایجاد مدل حیوانی بیماری آلزایمر در مطالعات فارماکولوژیکی استفاده می شود (۹). سطح استیل کولین هیپوکامپی در موشهای بزرگ آزمایشگاهی و موشهای سوری بلافاصله بعد از جستجوی مکانی در تستهای ماز شعاعی هشت بازویی (۱۰)، فضای باز (۱۱) و فشار دادن پدال برای کسب پاداش غذایی (۱۲) از حد پایه افزایش می یابد. فعالیت گیرنده های موسکارینی در هیپوکامپ سبب افزایش میزان حافظه بلند مدت می شود. با فعالیت این گیرنده، آزاد شدن استیل کولین آندوژن زیاد شده و حافظه بلندمدت افزایش می یابد (۱۳). مطالعات نشان می دهند که اسکوپولامین می تواند مرحله تثبیت و استحکام اطلاعات حافظه را در هسته های مختلف مغزی تخریب کند (۱۴). تزریق اسکوپولامین به

* مسئول مقاله:
آدرس: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تلفن: ۰۱۷۱-۴۴۲۰۵۱۵
e-mail: mejahanshahi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

نواحی CA3 و (Cornu Amonis, CA1) هیپوکامپ مرحله تثبیت حافظه را تخریب می کند (۱۵). آستروسیت یک نوع از سلولهای گلیالی است که نسبت تعداد آن به نورونها، ۱۰ به ۱ می باشد و ۲۵٪ تا ۵۰٪ حجم مغز را اشغال کرده است.گرچه این سلولها بطور آناتومی مشاهده شده اند اما تعیین وظایف دقیق این نوروگلیا مشکل است. با وجود اینکه برهمکنش نورونها و آستروسیتها و نقش تداخلی آنها در یادگیری بطور گسترده ای ناشناخته است اما تحقیقات اخیر توانستند تا حدودی برخی از وظایفشان را روشن کنند و ارتباط تنگاتنگ بین آستروسیتها و نورونها برای عملکرد صحیح مغز را ثابت کنند. آستروسیتها نقشهای مهم و اساسی در اعمال مغز بازی می کنند مطالعات در زمینه یادگیری انجام شده تا بیشتر در مورد نقش آستروسیتها در روند تثبیت حافظه بحث کند و نقش آستروسیتها مشخص تر شود (۱۸-۱۶).

رسپتورهای شیمیایی تمام نوروترانسمیترها (امینواسیدی،مونوآمینی وپپتیدی) روی آستروسیتها دیده شده است و این نشان می دهد که آستروسیتها مکانیسمهای ویژه یادگیری و حافظه را حمایت می کنند (۱۹). تا حدودی برخی از مکانیسمهای ویژه ای که تصور می شود آستروسیتها توسط آنها حافظه را تثبیت می کنند، شناخته شده اند. آستروسیتها نقش تنظیمی فعالی در تکوین مغز بازی می کنند (۲۰). Eriksen و همکاران نشان دادند که آستروسیتها در تکوین سیستم سروتونرژیک نقش مهمی دارد (۲۱). همچنین Song و همکاران نشان دادند که آستروسیتهای هیپوکامپ، سلولهای بنیادی را در تمایز به نورونها راهنمایی می کنند و بیان کرد که یک احتمال نوروژنز، می تواند به دلیل سیگنالهای تولید شده توسط آستروسیتهای ویژه ای باشد (۲۰). فاکتور رشد عصبی، بقاء و تمایز نورونهای کولینرژیک را در مغز قدامی تقویت می کند و گرچه این فاکتور بطور طبیعی از نورونها سنتز می شود اما آستروسیتها نیز در زمان تکثیر سریع گلیال ها در مراحل اولیه تکوین مغز و یا بعد از جراحت این فاکتور را افزایش می دهند (۲۲).

آستروسیتها برای تثبیت حافظه کوتاه مدت و میان مدت در هیپوکامپ ضروری هستند (۲۳). در سالهای اخیر توجه زیادی به مکانیسمهای پلاستیسیتی سیناپسی یادگیری و حافظه شده است (۲۴). اکثر مطالعات in vivo و in vitro از قبیل حافظه بلندمدت در قطعاتی از نواحی مختلف مغز صورت گرفت و این مکانیسمهای سیناپسی، در فعالیت بالای نورونها و نوروگلیا با پروسه یادگیری نشان داده شد (۲۵). مدارک نشان داد که در نواحی مختلف مغز پلاستیسیتی وابسته به آستروسیتها وجود دارد و در مدلهای یادگیری رفتاری ارتباطات زیادی در سیناپسهای ایجاد شده با آستروسیتها دیده شد، در واقع در یادگیری تعداد آستروسیتها، میزان تماس بین زوائد آستروسیتها و سیناپسها افزایش نشان داد (۲۶). این نکته حائز اهمیت است که القاء حافظه بلندمدت در شرایط in vivo با تحریک مداوم هیپوکامپ افزایش تقریبا یکسانی را در تعداد، تراکم بالاو نزدیک شدن زوائد آستروسیتها در شکافهای سیناپسی ایجاد می کند (۲۷). دانشمندان معتقدند که سلولهای گلیال و بویژه آستروسیتها برای ایجاد تغییرات پلاستیسیتی بعد از یادگیری و حافظه نقش بسیار مهمی را بعهده دارند (۲۸). در یادگیری تغییرات ساختاری و مورفولوژیکی آستروسیتها در متابولیسم انرژی، افزایش تشکیل مویرگ، انشعابات مویرگی و افزایش سطح تماس در کورتکس بینایی گزارش شده است (۲۹). آستروسیتها نقش اساسی در تنظیم پلاستیسیتی سیناپسی و تشکیل سیناپس دارند. اخیرا Bracchi-Ricard و همکارانش با استفاده از موش ترانسژنیک ثابت کردند که فاکتورهای رونویسی خانواده nuclear factor- kappa B (NF-κB) آستروگلیال کنترل کننده مهم پلاستیسیتی سیناپسی و فرآیند یادگیری/ حافظه هستند (۳۰). مطالعات زیادی ارتباط قوی بین کارهای تمرینی و نوروژنز در هیپوکامپ و بویژه شکنج دندانه ای را تایید می نمایند. یکی از روشهای تمرینی و یادگیری فضائی، روش ماز آبی موریس است. در واقع آموزش نیازمند برخی امکانات برای ذخیره اطلاعات و مکانیسمهای نگهداری اطلاعات شبیه حافظه است.در یکی از مطالعات صورت گرفته، تاثیر آموزش فضائی حافظه مرجع (Reference memory) بر تعداد آستروسیتهای نواحی مختلف هیپوکامپ موش صحرائی انجام گرفته که در آن مطالعه نشان داده شد که آموزش حافظه مرجع می تواند موجب افزایش تعداد آستروسیتها گردد (۳۱). امکان دارد تغییرات آستروگلیال نقش مهمی در پیری داشته باشد. پیری فیزیولوژیکی و زوال عقل هر دو همراه با تغییرات میکروآناتومیکی مغز هستند. Amenta و همکاران نشان دادند که پیری با تغییرات آستروگلیال در قشر پیشانی و ناحیه CA_1 هیپوکامپ همراه است. این تغییرات شامل افزایش در تعداد و اندازه آستروسیتها علاوه بر افزایش در GFAP- mmunoreactivity آنها است (۳۲).

اسکوپولامین در درمان بیماریهای قلبی – عروقی، اختلالات تنفسی و اختلالات سیستم ادراری – تناسلی بکار می رود. همچنین اسکوپولامین یکی از قدیمی ترین داروها برای درمان دریازدگی است و به اندازه تمام داروهای جدید موثر است. با این وجود از آنجایی که اسکوپولامین با تخریب سیستم کولینرژیک باعث القاء فراموشی می شود، از این دارو جهت ایجاد بیماری آلزایمر در مدل حیوانی مطالعات فارماکولوژیک استفاده می شود.

دوران پیری اثرات گسترده ای بر فیزیولوژی کل بدن دارد. به خصوص در سیستم عصبی مرکزی علاوه بر بیماری های بسیار مخرب نظیر آلزایمر و پارکینسون اختلالات مزمن و کاهش کارآیی حافظه و یادگیری در پیری امری طبیعی است. از آنجایی که اسکوپولامین باعث تخریب حافظه می شود و مطالعه در مورد تعداد آستروسیتهای حیواناتی که اسکوپولامین دریافت کرده و حافظه آنها تغییر پیدا کرد، بسیار کم و ناچیز است و با توجه به نقش تعداد آستروسیتها در فرآیند حافظه و یادگیری این مطالعه به منظور بررسی تعداد آستروسیتها در فراموشی القاء شده توسط اسکوپولامین انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه تجربی بر روی ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰–۲۰۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید، انجام شد. در طول آزمایشها آب و غذای کافی در اختیار موشها قرار گرفت و دمای حیوانخانه بین ۳±۲۲ درجه سانتیگراد متغیر بود. موش ها در ۶ گروه هشت تایی قرار گرفتند. گروه کنترل بدون جراحی، بدون دریافت دارو و بدون انجام تست رفتاری، تشریح شدند. یک گروه از رتها بعنوان گروه شم، جراحی شده و بدون دریافت دارو یا سالین تست رفتاری انجام دادند. یک گروه از رت ها به عنوان گروه شاهد (سالین)، جراحی شده و بلافاصله بعد از آموزش و ۵ دقیقه قبل از آزمون فقط مقدار (۱µl/rat) سالین را به صورت درون مغزی (Intra-CA1) دریافت کردند. سه گروه از رتها بعنوان گروه تجربی جراحی شده و بلافاصله بعد از آموزش

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر مختلف اسکوپولامین (µg/rat ۲ و ۱ و ۰/۵) و ۵ دقیقه قبل از آزمون مقدار (۱µl/rat) سالین را بصورت درون مغزی (Intra-CA1) دریافت کردند.

دستگاه بررسی حافظه (Step-Through): دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری (غیر فعال) ۱، مدل Step-Through، از جعبه ای تشکیل شده که به وسیله دیواره ای به دو قسمت با اندازه یکسان (با ابعاد ۲۰×۲۰×۳۰ سانتی متر) تقسیم می شود. درون دیواره بین دو قسمت درب کشویی به ابعاد ۹× ۷ سانتی متر تعبیه شده است. این دستگاه دارای دو بخش سفید و سیاه رنگ می باشد، بخش سیاه رنگ در قسمت کف دارای میله های فولادی با فاصله یک سانتی متر بوده و شوک الکتریکی از طریق این میله ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می شود. داروی مورد استفاده در این تحقیق اسکوپولامین (سیگما، آمریکا) بود که بلافاصله قبل از آزمایش ها در سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد حل گردید.

روش جراحی و کانول گذاری در ناحیه پشتی هیپوکامپ(CA1): موش های صحرایی توسط تزریق کتامین هیدروکلراید[2] (۵۰ mg/kg) بعلاوه زیلزین[3] (۴ mg/kg) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفته و دو کانول راهنمای (۲۲ G)[4] به صورت دو طرفه بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون در هیپوکامپ پشتی قرار داده شد. مختصات ناحیه A1 هیپوکامپ پشتی برابر(AP=-۳/۲، ML=±۲، V=-۳) می باشد(۳۳).

آزمون های رفتاری: یادگیری اجتنابی مهاری مدل step-through روشی برای مطالعه یادگیری و حافظه در جوندگان می باشد. معمولاً بررسی حافظه در دو روز متوالی صورت می گیرد، روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوان ها در دستگاه بوده و در روز دوم یا روز آزمون میزان حافظه حیوان های آموزش دیده بررسی می شود.

مرحله آموزش: در روش اجتنابی مهاری مدل Step-through، هر حیوان به آرامی در بخش روشن دستگاه قرار می گیرد، پس از گذشت ۵ ثانیه درب کشویی باز شده، به حیوان اجازه داده می شود از این قسمت وارد قسمت سیاه دستگاه شود بلافاصله بعد از ورود حیوان به خانه سیاه درب کشویی بسته شده و حیوان از دستگاه خارج می شود. پس از گذشت ۳۰ دقیقه این حیوان دوباره به بخش سفید دستگاه منتقل شده و بعد از ۵ ثانیه درب کشویی باز می شود تا حیوان وارد بخش تاریک شود. با ورود حیوان به بخش تاریک، درب کشویی پشت سرحیوان بسته شد و حیوان تحریک الکتریکی با شدت یک میلی آمپر و به مدت ۳ ثانیه را دریافت کرد.

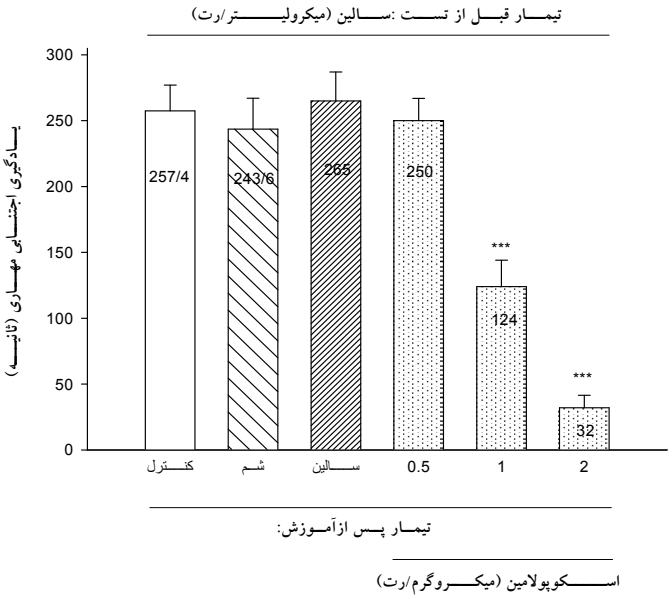
مرحله آزمون یا بررسی حافظه: آزمون ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش انجام می شود. برای بررسی حافظه، هر موش، همانند روز اول، در بخش روشن دستگاه قرار گرفته، درب کشویی بعد از ۵ ثانیه باز شده و زمان تاخیر حیوان در ورود به بخش تاریک دستگاه به عنوان معیاری برای بررسی میزان حافظه در نظر گرفته می شود. بیشترین مقدار تاخیر برای ورود به بخش تاریک که به عنوان حافظه کامل شناخته می شود ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می شود.

تزریق درون مغزی دارو: در مرحله تزریق پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن ۲۷ G دندانپزشکی در داخل کانول راهنما ۲۲ G قرار داده شد و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت۶۰ ثانیه تزریق شد.

تهیه مقاطع بافتی: ۲۴ ساعت پس از پایان آزمایشات رت ها توسط کلروفرم بیهوش شده و مغز آنها پس از بیرون آوردن در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شده و مدت دو هفته در فرمالین فیکس شدند. پس از فیکساسیون، مغز ها مراحل آماده سازی بافتی را طی کرده و نهایتا بلوک های پارافینی از آنها تهیه گردید. سپس توسط دستگاه میکروتوم برش های کورونال به ضخامت ۷ میکرون بصورت سریال (از قدام به خلف تشکیلات هیپوکامپ، یک برش از ده تا و در نهایت تعداد چهل عدد لام) تهیه شد و توسط محلول رنگی PTAH (Phosphotangestic acid haematoxylin) رنگ آمیزی شدند. جهت شمارش مورفومتریک آستروسیت ها از یک میکروسکوپ پیشرفته Olympus مدل Bx51 مجهز به دوربین دیجیتال مدل DP12 استفاده گردید. تصاویر از نواحی مختلف هیپوکامپ انتخاب و بر صفحه مانیتور یک دستگاه کامپیوتر آورده شد و پس از گرید بندی توسط نرم افزار مورفومتری Bioreporter، در سطحی معادل ۲۰۰۰۰ میکرومتر مربع شمارش صورت گرفت. در نهایت داده ها توسط تست آماری One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و $p<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثرات اسکوپولامین روی حافظه اجتنابی: تست حافظه برای تزریق اسکوپولامین بعد از آموزش یا قبل از تست به درون CA1 هیپوکامپ با توجه به تاخیر ورود به خانه سیاه (محل شوک) گرفته شد. نتایج نشان داد که تزریق دوزهای اسکوپولامین (µg/Rat ۲و ۱) به درون ناحیه CA1 هیپوکامپ زمان تاخیر ورود به خانه سیاه را کاهش دادند و بیان می کند که اسکوپولامین فراموشی را القاء می کند. تفاوت در گروهی از حیوانات که تزریق اسکوپولامین بعد از آموزش با گروهی که قبل از تست انجام شد، از نظر آماری معنی داری نبود و بنابراین یکنواختی آنها تایید شده است (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه حافظه در گروههای کنترل، شم، شاهد و تجربی

[1] - inhibitory (passive) avoidanse apparatus
[2] - ketamine hydrochloride
[3] - xylazine
[4] - gauge

www.SID.ir

Archive of SID

تزریق پس از آموزش اسکوپولامین (µg/Rat ۲ و۰/۱،۵) و قبل از آزمون سالین (µl/Rat ۱) بر حافظه اجتنابی مهاری در مقایسه با گروه کنترل {F (۵و۲۴)=۲۴/۹۵ ،p<۰/۰۰۰۱} باعث القاء فراموشی شد. علاوه بر این تعداد آزمایشها برای تثبیت حافظه بین گروهها معنی دار نبود {F (۳و۳۲۸) =۱/۶۲ و p>۰/۰۵} و بیانگر این است که شرایط برای گروهها رعایت شده است.

تاثیر اسکوپولامین بر تعداد آستروسیتها: یافته ها نشان دادند که تفاوت معنی داری در تعداد آستروسیتهای گروه کنترل (۱۷/۰۲±۶/۵) با گروه شم (۳۵/۸۸±۱۴/۰۳) که فقط استرس جراحی را داشتند، دیده شد و در گروههای دیگر گرچه تعداد آستروسیتها نسبت به گروه کنترل افزایش یافت اما این تفاوتها از نظر آماری معنی دار نبودند (جدول ۱).

جدول ۱. تعداد آستروسیتها در گروههای کنترل، شم، شاهد و تجربی

شکنج دندانه ای گروهها	آستروسیت ها Mean±SD
کنترل	۱۷/۰۲±۶/۵۰
شم (استرس جراحی)	۳۵/۸۸±۱۴/۰۳
شاهد (سالین – سالین)	۱۹/۶۲±۹/۶۲
اسکوپولامین ۰/۵– سالین	۲۴/۹۵±۱۳/۱۳
اسکوپولامین ۱– سالین	۱۹/۹۷±۱۱/۸۸
اسکوپولامین۲ – سالین	۲۳/۴۵±۱۲/۵۷

بحث و نتیجه گیری

یافته های این مطالعه نشان داد که تزریق اسکوپولامین به داخل هیپوکامپ باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری در روز آزمون می شود. Step-through یک مدل یادگیری اجتنابی می باشد که به صورت گسترده در مطالعات فارماکولوژیکی برای بررسی حافظه دراز مدت در جوندگان استفاده می شود. حافظه که گاهی اوقات توسط تغییرات در رفتار حیوان بعد از یادگیری سنجیده می‌شود؛ منعکس کننده فرآیندهای زیادی شامل اکتساب، به رمز در آوردن، تثبیت، به یادآوری و عملکرد می‌باشد (۱).

سیستم کولینرژیک مغز بویژه ورودیهای کولینرژیکی که وارد هیپوکامپ می شوند اهمیت زیادی در یادگیری و حافظه دارند (۳). موافق با این مطالعات، گزارشاتی وجود دارند و نشان می دهند که مهارکننده های استیل کولین استراز مانند فیزوستیگمین که میزان استیل کولین را در فضای سیناپسی افزایش می دهند باعث بهبود عملکرد شناختی در جوندگان و انسان می شود در حالیکه داروهای آنتی کولینرژیک در مغز باعث تخریب حافظه و یادگیری در مدلهای مختلف یادگیری می شوند (۵). همچنین تخریب یا عملکرد معیوب نورونهای کولینرژیک ارتباط تنگاتنگی با نقص های شناختی ایجاد شده در بیماران آلزایمری دارد تزریق مستقیم آگونیست رسپتورهای کولینرژیک به نواحی آمیگدال، استریاتوم و هیپوکامپ باعث افزایش حافظه و یادگیری شده و تزریق آنتاگونیستهای آن به یادگیری آسیب می رساند (۸). امروزه مطالعات زیادی هستند که نشان دهنده ارتباط نزدیک آزادسازی استیل کولین در هیپوکامپ با اعمال شناختی می باشند (۸و۵و۳). اسکوپولامین که یک آنتاگونیست گیرنده موسکارینی می باشد، باعث تخریب حافظه در مدلهای مختلف یادگیری می شود. تزریق اسکوپولامین به حافظه کوتاه مدت رت ها آسیب رسانده و شکل گیری حافظه شناختی در گوسفند را مهار می نماید (۳۵و۳۴). داروهایی از قبیل اسکوپولامین که باعث تخریب سیستم کولینرژیک می شوند، موجب تخریب حافظه در انسانها و حیوانات می شوند (۳۶).

در بسیاری از مطالعات رفتاری صورت گرفته نشان داده شد که اثرات آنتاگونیست موسکارینی کولینرژیک بسیار مشابه اثرات ایجاد شده توسط تخریب هیپوکامپ می باشد (۳۸و۳۷). مطالعات نشان می دهند که شباهت های زیادی بین نقص حافظه ایجاد شده در بیماران مبتلا به آلزایمر و حیوانات تیمار شده با اسکوپولامین وجود دارد به گونه ای که از اسکوپولامین برای ایجاد مدل حیوانی بیماری آلزایمر در مطالعات فارماکولوژیکی استفاده می شود (۳۹). همچنین نشان داده شد که اسکوپولامین توانست مرحله تثبیت و استحکام اطلاعات حافظه را در هسته های مختلف مغزی تخریب کند (۴۰). تزریق اسکوپولامین به نواحی CA3 و CA1، هیپوکامپ مرحله تثبیت حافظه را تخریب کرد (۴۱).

مطالعات رفتاری فراوانی نشان می دهند که سیستم کولینرژیک مغز در یادگیری و حافظه درگیر است (۴۲) گرچه استیل کولین می تواند تشکیل حافظه را از طریق اثرات متفاوتی در سطوح مختلف عمل سیستم عصبی مرکزی مدوله کند و یکی از این راهها می تواند این باشد که در سطح سلولی برای تنظیم تغییرات وابسته به فعالیت در توسعه سیناپسی از قبیل (Long term potentiation, LTP) عمل کند و اثر تداخلی خود را ایجاد کند که از این مسیر در ذخیره اطلاعات جدید طی یادگیری درگیر می باشد (۴۳). در واقع گرچه القاء حافظه بلندمدت در سیناپسهای تحریکی ناحیه CA1 هیپوکامپ ابتدا وابسته به فعالیت رسپتورهای گلوتاماتی نوع NMDA می باشد (۴۴)، اما فعالیت رسپتورهای کولینرژیک القاء حافظه بلندمدت را در بعضی موارد تحریکی بطور قوی افزایش می دهند (۴۵). مکانیسمهای سلولی مسئول این اثرات عمل رسپتورهای کولینرژیک، روی القاء حافظه بلندمدت هنوز ناشناخته هستند. یک فرضیه این است که رسپتورهای کولینرژیک در القاء حافظه بلندمدت از طریق اثر افزاینده روی قابلیت تحریک پذیری نورونها، باعث افزایش فعالیت رسپتور NMDA طی فعالیت سیناپسی می شوند (۴۵). این رسپتورها ممکن است القاء حافظه بلندمدت را با تنظیم اجزاء مسیر حافظه بلندمدت و فعالیت رسپتور NMDA تنظیم کنند. برای مثال القاء حافظه بلند مدت در بعضی از الگوهای تحریکی سیناپسی احتیاج به یک پروتئین کیناز A وابسته به مهار پروتئین فسفاتاز دارد (۴۶). آگونیستهای رسپتورهای کولینرژیک آبشار سیگنالی (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) (پروتئین کیناز وابسته به میتوژن) را در نورونهای هیپوکامپ فعال می کنند (۴۷) در صورتی که مهار فعالیت MAPK القاء حافظه بلندمدت را متوقف می کند (۴۸) و از آنجایی که اسکوپولامین آنتاگونیست سیستم کولینرژیک می باشد باعث می شود مسیرهای القاء حافظه بلندمدت بلوکه شود و حافظه و یادگیری دچار اختلال شود.

حضور رسپتورهای شیمیایی تمام نوروترانسمیترها (آمینواسیدی،مونوآمینی و پپتیدی) روی آستروسیتها نشان می دهد که اثرات وابسته به رسپتورهای داروهای روان گردان، می توانند آستروسیتها را درگیر کنند و این نشان می دهد

www.SID.ir

Archive of SID

که آستروسیتها مکانیسمهای ویژه یادگیری و حافظه را حمایت می کنند. مطالعات اخیر نقش آستروسیتها را بر حافظه نشان می دهند و مطالعات بافتی و کشت آستروسیتها در آزمایشات مربوط به یادگیری به درک بیشتر نقش آستروسیت در یادگیری کمک می کنند (۴۹).

در تحقیق انجام شده با تخریب سیستم کولینرژیک، تعداد آستروسیتها افزایش کمی پیدا کرد. مطالعاتی مشابه در مورد نقش آلفا آدرنوسپتورهای آستروسیتی و تاثیر آن بر یادگیری و بتاآدرنوسپتورهای آستروسیتی و تاثیر آن بر حافظه و یادگیری انجام شده است (۵۰و۲۳). آستروسیتهایی که با فعال شدن رسپتورهای بتا نورآدرنرژیک تحریک شدند، گلوکز را جذب می کنند و توسط متابولیسم گلیکولیتیک / اکسیداتیو انرژی را فراهم می کنند (۲۳). در یک مطالعه بیان شد که فعالیت آلفا آدرنوسپتور برای تثبیت حافظه کوتاه مدت و میان مدت در هیپوکامپ جوجه ضروری بوده است و این مطالعه پیشنهاد می کند که عمل تثبیت حافظه که توسط آلفا آدرنوسپتورها ایجاد می شود ناشی از آدرنوسپتورهایی است که روی آستروسیتها قرار دارند و باعث افزایش کلسیم آزاد سیتوزولی می شوند (۵۰). آگونیستهای نورآدرنرژیک، متابولیسم مغزی را در in vivo و همچنین فعالیت پمپ Na^{+},K^{+} - ATPase و بازجذب انتقال دهنده های آمینواسیدی را در آستروسیتها تحریک می کنند، در حالیکه اثر بسیار کمتری بر نورونها دارند (۵۱). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که اثرات استفاده از گلوکز، ۱۵ تا ۲۵ دقیقه بعد از آموزش روی تثبیت حافظه از طریق آستروسیتها میانجیگری می شود و بیان شد که متابولیسم انرژی آستروسیتی حافظه را در جوجه تثبیت می کند (۵۲). در مخچه نیز بعد از پلاستیسیتی سیناپسی ایجاد شده توسط یادگیری مهارتی حرکتی تعداد آستروسیتها افزایش پیدا کردند (۵۳).

GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) پروتئینی است که در آستروسیتها یافت می شوند. اندازه و تعداد آستروسیتهای (GFAP) کورتکس بینایی حیواناتی که در محیط پیچیده ای در مقایسه با حیواناتی که در محیط عادی بزرگ شدند، افزایش داشت (۲۹). بعد از انجام یادگیری فضای (the Morrris water maze test) تراکم GFAP آستروسیتهای ایمونو رادیواکتیو در هیپوکامپ افزایش چشمگیری را نشان دادند. این افزایش در GFAP با افزایش بیان bFGF (فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه) مرتبط می باشد و حضور این فاکتور در پروسه یادگیری بسیار مهم است (۵۴). تصور می شود آستروسیتها از طریق نوروترانسمیتر گلوتامات و افزایش کلسیم درون سلولی در پروسه یادگیری و پلاستیسیتی سیناپسی نقش مهم خود را ایفا می کند (۵۵). آستروسیتها بر خلاف نورونها در سنتز حد واسطهای سیکل، اسید تری کربوکسیلیک را که برای سنتز گلوتامات مورد نیاز است، انجام می دهند. وجود امواج القاءکننده ناشی از افزایش کلسیم در آستروسیتها با دخالت گلوتامات و یا تحریکات مکانیکی بوجود می آیند و در سلولهای دیگر نیز نشان داده شده است. امواج کلسیمی آستروسیتها ممکن است از طریق فعالیت نورونهای مجاور نیز انجام پذیرد. عملکرد امواج کلسیمی در آستروسیتها می تواند با فعالیت این سلولهای گلیال مرتبط باشد. احتمالا امواج کلسیمی می تواند نورونهای مجاور را تحت تاثیر قرار دهد. در حقیقت بالا رفتن کلسیم در آستروسیتها می تواند عامل افزایش کلسیم نورونی بوده و تشکیل پتانسیل عمل در نورونهای هیپوکامپ را نیز القاء کند (۵۶). مطالعات دیگری نیز نشان دادند که تزریق α-GPC (پیش ساز کولینرژیک) قبل از تست رفتاری از نقص یادگیری ناشی از اسکوپولامین جلوگیری می کند زیرا امکان دارد این دارو مرتبط با افزایش سنتز و رهاسازی استیل کولین هیپوکامپی باشد. درمان با α-GPC میزان واکنش گلیال را در هیپوکامپ تضعیف می کند که این مطلب بیانگر آن است که امکان دارد موجب حفاظت نورونی شود و بر دینامیک آستروگلیال اثر کند و برای برخی اختلالات تخریب عصبی مهم مانند پیر شدن مغزی، سکته، ایسکمی مغزی، بیماری پارکینسون و آلزایمر موثر باشد (۵۶).

همچنین مشاهده شد که تخریب سیستم کولینرزیک باعث افزایش مختصری در تعداد آستروسیتها شده است.گرچه این افزایش معنی دار نبود اما می توان بیان کرد، آز آنجایی که نوروژنز بطور فعال در شکنج دندانه ای صورت می گیرد و با توجه به مطالعه Eriksen و همکاران که بیان کردند آستروسیتها بعد از جراحت، فاکتور رشد عصبی را افزایش می دهند که و پیشنهاد می دهند با افزایش آستروسیتها bFGF نیز افزایش می یابد (۲۱)، می توان پیشنهاد داد که با تخریب سیستم کولینرژیک توسط اسکوپولامین فعالیت نوروژنز شکنج دندانه ای اندکی بیشتر شده و تعداد آستروسیتها را بالا برده تا فاکتور رشد عصبی و فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه، سنتز شده توسط آستروسیتها بتواند جلوی تخریب حافظه را بگیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی گلستان جهت انجام آزمایشات رفتاری و آزمایشات بافتی و همچنین از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان جهت حمایت مادی و معنوی، تشکر و قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

The Evaluation of Amnesia Induced by Scopolamine on the Astrocytes Number in Rats' Dentate Gyrus

N.S. Azami (PhD) [1], M. Heidari (PhD) [1], M. Jahanshahi (PhD) [2*]

1. Department of Biology, Gorgan Branch Islamic Azad University, Gorgan, Iran
2. Neuroscience Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(1); Jan 2012

Received: May 11th 2011, Revised: Jun 29th 2011, Accepted: Sep 7th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The relation between cholinergic system and muscarinic cholinergic receptors (mR) associated with learning and memory has been recognized. Because of astrocytes contact to synapses, they are undergoing remarkable structural and morphological changes in learning. The aim of this study was to evaluate amnesia induced by scopolamine (Antagonist mR) on the number of astrocytes in rats' dentate gyrus.

METHODS: In this experimental study, 48 male Wistar rats, 200-250 gr were used in 6 groups and each group contains 8 rats. The animals were bilaterally implanted with chronic cannulae in the CA1 regions, trained in a step-through type inhibitory avoidance task, and immediately after training, animals received saline or different doses of scopolamine (0.5, 1 and 2 µg/rat, intra-CA1) and tested 24 h after training to measure step-through latency. Then all rats were sacrificed 48h after behavioural test and cross sections were taken from the dorsal hippocampal formation of the right cerebral hemispheres and stained with PTAH (the specific staining for astrocytes). The area densities of the astrocytes was measured in dentate gyrus and compared in the all groups.

FINDINGS: Scopolamine injection can induce amnesia. There was a significant difference in astrocyte number between control and sham group which only had surgical stress ($p<0.05$). Whereas there was no significant increase in astrocyte number of scopolamine received groups compared to control group.

CONCLUSION: The results of this study showed that amnesia induced by scopolamine can little increase astrocytes number in the rats dentate gyrus.

KEY WORDS: *Scopolamine, Amnesia, Astrocyte, Dentate gyrus, Rat.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Department of Anatomy, Neuroscience Research Center, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran, Postal Code: 4934174515
Tel: +98 171 4420515
E-mail: mejahanshahi@yahoo.com

www.SID.ir

References

1.Kameyama T, Nabeshima T, Kozawa T. Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method. Suitability for experimental amnesia models. J Pharmacol Methods 1986;16(1):39-52.

2.Myher T. Neurotransmitter system involved in learning and memory in the rat: a meta analysis based on studies of four behavioral tasks. Brain Res Brain Res Rev 2003;41(2-3):268-87.

3.Warburton EC, Koder T, Cho K, et al. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. Neuron 2003;38(6):987-96.

4.Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of Geriatric memory dysfunction. Science 1982;217(4558):408-14.

5.Coyle JT, Price DL, Delong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. Science 1983; 219(4589):1184-90.

6.Hasselmo ME, Bower JM. Acetylcholine and memory. Trends Neurosci 1993;16:218-22.

7.Van Der Zee EA, Biemans BA, Gerkema MP, Daan S. Habituation to a test apparatus during associative learning is sufficient to enhance muscarinic acetylcholine receptor–immunoreactivity in rat suprachiasmatic nucleus. J Neurosci Res 2004;78(4):508-19.

8.Bermúdez-Rattoni F, Coburn, KL, Fernandez J, Chavez AF, Garcia J. Potentiation of odor by taste and odor aversions in rats are regulated by cholinergic activity of dorsal hippocampus. Pharmacol Biochem Behav 1987;26(3): 553-9.

9.Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. Exp Neurol 2000;163(2):495-529.

10.Toumane A, Durkin T, Marigheto A, Galay D, Jaffard R. Differential hippocampal and cortical cholinergic activation during the acquisition, retention, reversal and extinction of a spatial discrimination in an 8 arm radial maze by mice. Behav Brain Res 1988;30(3):225-34.

11.Kopf, SR, Bechholzer ML, Hilgert M, Lloffelholz K, Klein J. Glucose plus choline improve passive avoidance behavior and increase hippocampal acetylcholine release in mice. Neuroscience 2001;103(2):365-71.

12.Orsetti M, Casamenti F, Pepeu G. Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. Brain Res 1996;724:89-96.

13.Vanree JM, Ramsey N. The dopamine hypothesis of opiate reward challenged. Eur J Pharmacol 1987;134(2):239-43.

14.Hasselmo ME. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. Trends Cogn Sci 1999;3(9):351-9.

15.Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. Neurobiol Learn Mem 2003;80(3):178-93.

16.O'Kusky J, Colonnier M. A laminar analysis of the number of neurons, glia and synapses in the visual cortex (area 17) of adult macaque monkeys. J Comp Neurol 1982;210(3):278-90.

17.Kimelberg HK, Norenberg MD. Astrocytes. Sci Am 1989;260(4):66-72, 74, 76.

18.Bignami A. Glial cells in the central nervous system. Discussions in neuroscience. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier 1991; pp:1-45.

19.Coyle JT, Schwarcz R. Mind glue: implications of glial cell biology for psychiatry. Arch Gen Psychiatry 2000;57:90-3.

20.Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature 417:39-44.

21.Eriksen JL, Druse MJ. Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. Brain Res Dev Brain Res 2001;131(1-2):9-15.

www.SID.ir

Archive of SID

22.Jurič DM, Čarman-Kržan M. Interleukin-1β, but not IL-1α, mediates nerve growth factor secretion from rat astrocytes via type I IL-1 receptor. Int J Dev Neurosc 2001;19(7):675-83.
23.Gibbs ME, Hutchinson D, Hertz L. Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. Neurosci Biobehav Rev 2008;32(5):927-44.
24.McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci 1999;22:295-318.
25.Nawashiro H, Brenner M, Fukui S, Shima K, Hallenbech JM. High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. J Cereb Blood Flow Metab 2000;20:1040-4.
26.Jones TA, Greenough WT. Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment. Neurobiol Learn Mem 1996;65(1):48-56.
27.Wenzel J, Lammert G, Meyer U, Krug M. The influence of longterm potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. Brain Res 1991;560(1-2):122-31.
28.Muller CM. Glial cell functions and activity-dependent plasticityof the mammalian visual cortex. Perspect Dev Neurobiol 1993;1(3):169-77.
29.Sirevaag AM, Black JE, Shafron D, Greenough WT. Direct evidence that complex experience increases capillarybranching and surface area in visual cortex of young rats. Brain Res 1988;471(2):299-304.
30.Bracchi-Ricard V, Brambilla R, Levenson J, et al. Astroglial nuclear factor-kappaB regulates learning and memory and synaptic plasticity in female mice. J Neurochem 2008;104(3):611-23.
31.Jahanshahi M, Sadeghi Y, Hosseini A, Naghdi N. The effect of spatial learning on the number of astrocytes in rat dentate gyrus. Neuroanatomy 2007;6:51-3.
32.Amenta F, Bronzetti E, Sabbatini M, Vega J. Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study. Microsc Res Tech 1998;43(1):29-33.
33. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Academic Press 2007; pp:209-12.
34.Squire LR, Kandel ER. Memory: from mind to molecules. 2nd ed. New York: W. H. Freeman and Company, Scientific American Library 1999; pp: 103-55.
35.Frey KA, Ehrenkaufer RL, Agranoff BW. Quantitative in vivo receptor binding. II. Autoradiographic imaging of muscarinic cholinergic receptors. J Neurosci 1985;5(9):2407-14.
36.Deutsch JA. The cholinergic synapse and the site of memory. Science 1971;174(11):788-94.
37.Fibiger HC. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia, review of recent evidence. Trends Neursci 1991;14 : 220-223.
38.Gallagher M, Colombo PJ. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. Curr Opin Neurobiol 1995;5(2): 161-8.
39.Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. Exp Neurol 2000;163(2):495-529.
40.Hasselmo ME. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. Trends Cogn Sci 1999;3(9):351-9.
41.Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. Neurobiol Learn Mem 2003;80(3):178-93.
42.Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. Neurochem Res 1997;22(4):507-15.
43.Izquierdo I, Medina JH. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. Neurobiol Learn Mem 1995;63(1):19-32.

www.SID.ir

Archive of SID

44.Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long term potentiation in the hippocampus. Nature 1993;361(6407):31-9.

45.Brocher S, Artola A, Singer W. Agonists of cholinergic and noradrenergic receptors facilitate synergistically the induction of long-term potentiation in slices of rat visual cortex. Brain Res 1992;573(1):27-36.

46.Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. Science 1998;280(5371):1940-3.

47.Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratick C, Sweatt JD. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. J Neurosci 1999;19(11):4337-48.

48.Rosenblum K, Futter M, Jones M, Hulme EC, Bliss TVP. ERKI/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. J Neurosci 2000;20(3):977-85.

49.Selemon LD, Lidow MS, Goldman-Rakic PS. Increased volume and glial density in primate prefrontal cortex associated with chronic antipsychotic drug exposure. Biol Psychiatry 1999;46(2):161-72.

50.Gibbs M. E and David N. Bowser. Astrocytic adrenoceptors and learning: alpha$_1$-adrenoceptors. Neurochem Int 2010;57(4):404-10.

51.Hertz L. Autonomic control of neuronal-astrocytic interactions, regulating metabolic activities, and ion fluxes in the CNS. Brain Res Bull 1992;29(3-4):303-13.

52.Gibbs ME, O'Dowd BS, Hertz E. and Hertz L Astrocytic energy metabolism consolidates memory in young chicks. Neurosciene 2006;141(1):9-13.

53.Anderson BJ, Li X, Alcantara AA, Isaacs KR, Black JE, Greenough WT. Glial hypertrophy is associated with synaptogenesis following motor-skill learning, but not with angiogenesis following exercise. Glia 1994;11:73-80.

54.Gomez-Pinilla F, So V, Kesslak JP. Spatial learning and physical activitycontribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. Neuroscience 1998;85(1):53-61.

55.Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte neuron signalling. Nature 1994;369(6483):744-7.

56.Bramanti V, Campisi A, Tomassoni D, et al. Effect of acetylcholine precursors on proliferation and differentiation of astroglial cells in primary cultures. Neurochem Res 2008;33(12):2601-8.

www.SID.ir