

اثر ممانتین بر یادگیری و حافظه فضایی در مدل تخریب الکتریکی هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس موش صحرایی: مدل حیوانی بیماری آلزایمر

نسترن زمانی^۱، دکتر احمدعلی معاضدی^{۲*}، دکتر محمدرضا آفرینش خاکی^۳، دکتر مهدی پورمهدی بروجنی^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. ۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه

شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. ۳- استادیار، مرکز تحقیقات علوم شناختی و علوم اعصاب کرمان، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۴- دانشیار، گروه بهداشت و مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ممانتین آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA (N-methyl-D-aspartate) است که برای درمان بیماران مبتلا به آلزایمر استفاده می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر ممانتین بر یادگیری و حافظه فضایی در مدل تخریب الکتریکی هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس (NBM) موش صحرایی به عنوان یک مدل حیوانی بیماری آلزایمر انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در ۸ گروه شامل کنترل، تخریب (تخریب دو طرفه NBM با القای جریان الکتریکی ۰/۵ میلی آمپر به مدت ۳ ثانیه)، شاهد تخریب (ورود الکترود به NBM بدون القاء جریان الکتریکی)، گروه حلال (تخریب توام با دریافت سالین ۰/۲ ml) و گروه‌های تخریب توام با دریافت ممانتین با مقادیر ۱، ۳، ۵ و ۷ میلی گرم بر کیلوگرم انجام شد. یک هفته بعد، موش‌های صحرایی به مدت ۵ روز با دستگاه ماز Y شکل آموزش دیدند. ۲۵ روز بعد از آموزش، آزمون فراخوانی حافظه برای ارزیابی حافظه بلندمدت انجام گردید.

یافته ها: تخریب دو طرفه NBM منجر به کاهش یادگیری فضایی در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد تخریب گردید ($P < 0/05$). در گروه حلال در مقایسه با گروه تخریب هیچ تغییری در یادگیری فضایی مشاهده نشد. درمان با ممانتین در گروه‌های تخریب توام با دریافت ممانتین به میزان ۳، ۵ و ۷ میلی گرم بر کیلوگرم سبب افزایش معنی دار در یادگیری فضایی گردید ($P < 0/05$). بین نتایج مربوط به روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه روز سیام تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: درمان با ممانتین به صورت وابسته به دوز موجب بهبود نقص یادگیری فضایی در مدل بیماری آلزایمر با تخریب الکتریکی هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس می‌گردد.

کلید واژه‌ها: بیماری آلزایمر، هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس، یادگیری فضایی، ممانتین

* نویسنده مسؤول: دکتر احمدعلی معاضدی، پست الکترونیکی moazedi.a@gmail.com

نشانی: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن ۰۶۱-۳۳۳۳۱۰۴۵، نامبر ۳۳۳۳۱۰۴۵

وصول مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۲۱، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۵/۲۸، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۶/۱۴

نسترن زمانی <https://orcid.org/0000-0001-9293-190X>، دکتر احمدعلی معاضدی <https://orcid.org/0000-0003-1346-2426>

مقدمه

بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease: AD) یک اختلال نورودژنراتیو پیشرونده است که با از دست دادن حافظه و عملکردهای شناختی همراه با تحلیل انتخابی نورون‌ها و سیناپس‌های کولینرژیک در قشر مغز و هیپوکامپ و کاهش فعالیت‌های روزانه و تغییرات رفتاری شناخته می‌شود (۱). از ویژگی‌های بیماری آلزایمر دژنراسیون‌های سیناپسی، رسوب پلاک‌های آمیلوئید بتا، هیبرفسفوریل‌اسیون تائو (Tau) و کلافه‌های نوروفیبریلاری (Neurofibrillary tangles: NFTs) است. این تغییرات همراه با استرس اکسیداتیو و فعالیت بیش از حد گیرنده‌های NMDA

(N-methyl-D-aspartate receptors) است (۲). اعصاب کولینرژیک قشر مغز، پیاز بویایی، هیپوکامپ و آمیگدال در پستانداران از دستجات نورون‌های کولینرژیک واقع در قاعده مغز جلویی و سپتوم میانی منشأ می‌گیرند. دستجات نورون‌های کولینرژیک قاعده مغز جلویی در مغز جوانان به عنوان هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس (Nucleus basalis magnocellularis) (NBM) شناخته می‌شوند و معادل هسته قاعده‌ای مینرت (Nucleus basalis of Meynert) در انسان هستند. بخش قدامی NBM انشعابات کولینرژیک خود را به مسیر پرفورانت در هیپوکامپ، پیاز بویایی و بخش قابل توجهی از آمیگدال می‌فرستد.

بخش‌های میانی و پشتی NBM انشعابات کولینرژیک خود را به نئوکورتکس می‌فرستند (۳). آتروفی شدید سیستم کولینرژیک قاعده مغز جلویی، به‌ویژه هسته قاعده‌ای مینرت و متعاقب آن کاهش عصب‌دهی کولینرژیک به‌عنوان بخشی از آبشار پاتوفیزیولوژیک در پیشرفت بیماری آلزایمر در نظر گرفته می‌شود. در مطالعات حیوانی نشان داده شده کاهش عملکرد کولینرژیک در NBM همراه با از دست دادن توانایی یادگیری و حافظه است (۴). مدل‌های حیوانی با تخریب NBM، کاهش در مارکرهای کولینرژیک شامل سطح استیل کولین، آزادسازی و تغییر و تبدیل استیل کولین، بازجذب استیل کولین، فعالیت استیل کولین استراز و تعداد گیرنده‌های کولینرژیک موسکاربینی در قشر جلپیشانی را نشان داده‌اند (۵). در مطالعاتی گزارش شده یادگیری همراه با افزایش خارج سلولی مقادیر استیل کولین در هیپوکامپ است. همچنین فعالیت فارماکولوژیکی گیرنده‌های کولینرژیک موسکاربینی و یا گیرنده‌های کولینرژیک نیکوتینی موجب افزایش تقویت دراز مدت (Long-term potentiation: LTP) در انتقال سیناپسی در ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌گردد (۶). از اینرو مدل‌های تخریب هسته NBM برای مطالعه نقش سیستم کولینرژیک در هوشیاری و ادراک به کار می‌روند و بر نقص‌های ادراکی ایجاد شده در بیماری آلزایمر دلالت دارند.

گیرنده‌های NMDA کانال‌های کاتیونی دریچه‌داری هستند که به‌وسیله نوروترانسمیتر گلو تامات تحریک می‌شوند و در انتقال سیناپسی تحریکی، یادگیری و حافظه در سیستم عصبی مرکزی نقش مهمی را برعهده دارند. آمیلوئید بتا می‌تواند موجب سمیت تحریکی در سلول عصبی از طریق افزایش ورود کلسیم به سلول گردد (۳). فعالیت بیش از حد گیرنده‌های NMDA، افزایش ورود کلسیم و تولید رادیکال‌های آزاد با اختلال عملکرد سیناپسی و فسفوریلاسیون تائو همراه است (۷). با توجه به این که سمیت تحریکی ایجاد شده به‌وسیله گیرنده NMDA نقشی اساسی در پاتوژنز بیماری آلزایمر دارد؛ آنتاگونیست‌های این گیرنده به‌عنوان روش درمانی موثری در درمان بیماری آلزایمر در نظر گرفته شده‌اند. ممانتین (Memantine) یک آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA است که برای بهبود علائم بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات متعددی مکانیسم‌های عمل ممانتین را مورد بررسی قرار داده‌اند. در مطالعه‌ای مشخص گردید تزریق داخل صفاقی اسکوپولامین (۵۰mM) ۱۰ دقیقه قبل از آموزش موجب کاهش حافظه در آزمون حافظه اجتنابی چشایی در جوجه‌های یک روزه در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. در صورتیکه تزریق داخل صفاقی ممانتین (۱mM) ۳۰ دقیقه قبل از آموزش و به دنبال آن تزریق داخل صفاقی اسکوپولامین (۵۰mM) ۱۰ دقیقه قبل از آموزش موجب بهبود حافظه در این آزمون گردید. علاوه بر این

تزریق توام گلو تامات و اسکوپولامین (۵۰mM) اسکوپولامین توام با ۵۰mM گلو تامات موجب مهار اثر ممانتین بر بهبود حافظه گردید (۸). ممانتین موجب ظهور دوباره تقویت دراز مدت (LTP) سرکوب شده به‌وسیله آمیلوئید بتا (۹) و آمیلوئید بتا تولید شده در موش‌های ترانسژنیک مدل آلزایمر می‌گردد (۱۰). در مطالعه‌ای در شرایط محیط کشت ممانتین با کاهش فسفوریلاسیون تائو موجب محافظت نورون‌های قشر مغز موش صحرایی در برابر سمیت القاء شده توسط آمیلوئید بتا گردید (۱۱). علاوه بر این در موش‌های ترانسژنیک و غیر ترانسژنیک درمان با ممانتین موجب کاهش ۴۵-۵۵ درصدی سطوح پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید متصل به غشاء در قشر مغز و در نتیجه کاهش مقدار آمیلوئید بتا گردید (۱۲). از دیگر ویژگی‌ها و عملکردهای ممانتین می‌توان به افزایش انتقال سیناپسی در گیرنده‌های موسکاربینی استیل کولین (۶) و افزایش تکثیر سلولی و تولید نورون‌های بالغ (۱۳) در هیپوکامپ اشاره کرد. این مطالعه به منظور تعیین اثر ممانتین بر یادگیری و حافظه فضایی در مدل تخریب الکتریکی هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس موش صحرایی به‌عنوان یک مدل حیوانی بیماری آلزایمر انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی 20 ± 20 گرم خریداری شده از مرکز تکثیر دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در دانشگاه شهید چمران اهواز طی سال ۱۳۹۵ انجام شد.

در روند اجرای مطالعه، کلیه ضوابط منشور و موازین اخلاق پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رعایت گردید. مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق (ش ۱۳۹۰ الف ۹ ج ۵۵/ ۱۸۰/Q) دانشگاه شهید چمران اهواز قرار گرفت.

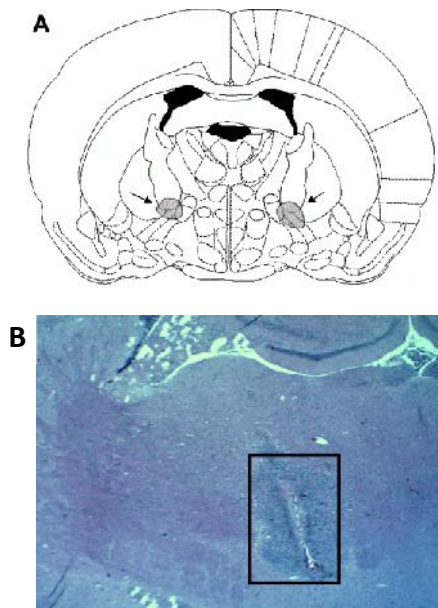
موش‌ها در گروه‌های ۴ تایی در هر قفس، در خانه حیوانات با درجه حرارت کنترل شده (۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد) و تحت چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات به آب و غذا به مقدار کافی دسترسی داشتند.

آزمایشات رفتاری در دوره روشنایی و با استفاده از دستگاه ماز Y شکل انجام گردید. ماده مورد استفاده ممانتین (CAS Number 41100-52-1) بود که از شرکت سیگما تهیه گردید و در روز آزمایش با غلظت موردنظر توسط حلال سالین ۰/۹ درصد به‌صورت روزانه آماده گردید (۸).

موش‌ها به‌طور تصادفی به ۸ گروه ۷ تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه اول (کنترل): گروهی که تحت هیچگونه تزریق یا جراحی قرار نگرفتند و تنها به مدت ۵ روز متوالی با ماز Y شکل آموزش دیدند.

گروه دوم (تخریب): گروهی که تحت عمل جراحی



شکل ۱: (A) موقعیت شماتیک هسته قاعده‌ای مگنوسولاریس در اطلس پاکسینوس و واتسون (فلش سیاه)؛ (B) برش بافتی مربوط به تخریب NBM ناحیه تخریب شده توسط الکترو (مشخص شده با مربع)

بررسی روند یادگیری و حافظه در مدل‌های آزمایشگاهی براساس دو روش تنبیه (دریافت شوک یا احساس ناخوشایند) و تشویق (دریافت پاداش مثل آب و غذا) توسط مازهای متنوعی انجام می‌شود. باتوجه به تداخل احتمالی برخی داروها در مکانیسم اشتها، به نظر می‌رسد برای بررسی اثر داروها بر روند یادگیری، روش تنبیه مناسب‌تر است. با توجه به این که هیپوکامپ در حافظه فضایی نقش عمده‌ای دارد؛ در این تحقیق از دستگاه ماز Y شکل برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی استفاده شد (۱۶). این دستگاه به شکل Y بوده و دارای سه بازوی کاملاً مشابه به ابعاد $۱۷/۵ \times ۶۰$ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر از جنس شیشه شفاف است. کف هر شاخه میله‌های آبکاری کروم - نیکل به فواصل یک سانتی‌متر از هم قرار دارند که به دو طرف دیواره نصب شده است. احساس ناخوشایند (شوک الکتریکی) توسط دستگاه و از طریق این میله‌ها به حیوان منتقل می‌شود. در انتهای هر بازو یک منبع نوری (لامپ ۱۲ ولت) نصب شده است. سطح بالای دستگاه نیز توسط سرپوش‌های کشویی مسدود است تا از خروج حیوان در حین آموزش جلوگیری شود. در دستگاه کنترل، مشخصات تحریک نظیر طول تحریک، فرکانس تحریک، فاصله زمانی بین روشن شدن لامپ و اعمال تحریک، فاصله زمانی بعد از عمل تحریک و شمارش تعداد دفعات تحریک قابل تنظیم است. دستگاه باید در یک محیط تاریک، آرام و بی‌سروصدا قرار گیرد. در روز اول آموزش ابتدا حیوان را در ماز قرار دادیم و به مدت ۱۵ دقیقه اجازه داده شد تا آزادانه درون ماز حرکت کند و با شکل ظاهری ماز آشنا شود. سپس از بازویی که

استرئوتاکیسیک الکترو تخریب به صورت دوطرفه وارد NBM شد و با عبور جریان الکتریکی عمل تخریب انجام گردید. یک هفته بعد این گروه بدون هیچگونه تزریقی آموزش دیدند.

گروه سوم (شاهد تخریب): گروهی که تحت جراحی و ورود الکترو به NBM بدون تخریب این هسته قرار گرفتند و پس از یک هفته بدون هیچگونه تزریقی آموزش دیدند.

گروه چهارم (تخریب توام با دریافت سالی): گروهی که تحت عمل جراحی تخریب دوطرفه NBM قرار گرفتند و یک هفته بعد، سالی (حلال دارو) را به میزان $۰/۲ \text{ ml}$ به مدت ۵ روز نیم ساعت قبل از آموزش به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه‌های پنجم، ششم، هفتم و هشتم (گروه‌های تخریب توام با دریافت مقادیر مختلف ممانتین): این گروه‌ها تحت عمل جراحی تخریب دوطرفه NBM قرار گرفتند. یک هفته بعد گروه تیمار اول، تیمار دوم، تیمار سوم و تیمار چهارم به ترتیب مقادیر ۱، ۳، ۵ و ۷ میلی گرم بر کیلوگرم از ممانتین (۹ و ۱۴) را به مدت ۵ روز نیم ساعت قبل از آموزش به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت نمودند.

حیوانات برای تخریب هسته NBM تحت بیهوشی عمومی با تزریق داخل صفاقی مخلوطی متشکل از ۷۸ میلی گرم بر کیلوگرم کلروهیدرات کتامین ۱۰ درصد و ۳ میلی گرم بر کیلوگرم زایلازین ۲ درصد قرار گرفتند (۱۵). سپس در دستگاه استرئوتاکیسی (Stoelting, USA) ثابت شدند. میله دندانی $۳/۳$ میلی‌متر زیر صفر افقی قرار گرفت تا مطابق اطلس وضعیت مناسب حجمه حاصل گردد. سپس موهای پشت سر حیوان از ناحیه بین چشم‌ها تا گوش‌ها تراشیده و پوست این ناحیه ضد عفونی شد. با کمک اسکالپل یک برش طولی در پوست ناحیه پشت سر حیوان داده شد و بعد از کنار زدن بافت‌های پیوندی محل مورد نظر با نرمال سالی تمیز گردید تا درزهای حجمه نمایان گردد. مختصات مورد استفاده برای NBM طبق اطلس پاکسینوس و واتسون شامل $AP = -۱/۳$ از برگما، $ML = \pm ۲/۸$ از خط وسط و $DV = -۷/۶$ از سطح سخت شامه بودند.

پس از قرار گرفتن الکترو در نقطه مورد نظر با استفاده از دستگاه ایجاد کننده ضایعه (Lesion Making Device, UGO Basile) با عبور جریان الکتریکی مستقیم به شدت $۰/۵$ میلی آمپر به مدت ۳ ثانیه NBM در هر دو نیمکره مغزی به صورت الکتریکی تخریب گردید (۱۵) و مدل آلزایمر ایجاد شد. پس از دوره بهبودی (یک هفته) آموزش در دستگاه ماز Y شکل به مدت ۵ روز آغاز گردید. برای اطمینان از این که ناحیه تخریب شده توسط الکترو، NBM است؛ از قسمت مورد نظر برش بافتی تهیه شد و پس از رنگ آمیزی با روش هماتوکیسین - اتوزین، ناحیه تخریب شده با موقعیت فضایی آن در اطلس پاکسینوس و واتسون مقایسه گردید و از ایجاد مدل آلزایمر در موش اطمینان حاصل شد (شکل یک).

جدول یک: میانگین و انحراف استاندارد تعداد پاسخ صحیح موش‌های صحرایی گروه‌های مورد مطالعه در روزهای اول تا پنجم و روز سی‌ام در ماز Y شکل

گروه‌ها	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز سی‌ام
کنترل	۲۳/۷۱±۰/۴۲۰	۲۶/۱۴±۰/۴۰۴	۲۷/۱۵±۰/۴۵۹	۲۸/۵۷±۰/۳۶۸	۲۸/۱۵±۰/۴۰۴	۲۸/۱۴±۰/۵۰۸
شاهد تخریب	۲۳/۵۷±۰/۴۲۸	۲۸/۸۵±۰/۵۰۸	۲۷/۵۷±۰/۵۲۸	۲۸±۰/۴۳۶	۲۸/۷۱±۰/۴۲۰	۲۷/۵۷±۰/۴۸۰
تخریب	۱۶/۴۲±۰/۶۴۹#	۱۹/۱۴±۰/۴۰۴#	۲۱/۱۵±۰/۴۰۴#	۲۴/۵۷±۰/۵۲۸#	۲۶/۲۸±۰/۳۵۹#	۲۶/۵۷±۰/۴۸۰
تخریب توام با سالین	۱۷/۵۷±۰/۴۲۰	۱۸/۸۵±۰/۴۰۴	۲۲/۵۷±۰/۵۷۱	۲۵/۴۲±۰/۳۶۸	۲۶/۴۲±۰/۳۶۸	۲۶/۷۱±۰/۳۵۹
تیمار اول	۱۷/۵۷±۰/۴۶۹	۲۱/۲۸±۰/۶۸۰	۲۳/۴۲±۰/۴۲۸	۲۶±۰/۴۳۶	۲۷/۵۷±۰/۵۲۸	۲۶/۷۱±۰/۴۲۰
تیمار دوم	۱۷/۲۸±۰/۵۲۱	۲۱/۵۷±۰/۶۸۵*	۲۴/۱۴±۰/۴۰۴*	۲۶/۷۱±۰/۴۲۰*	۲۸±۰/۴۳۶	۲۷/۵۷±۰/۴۲۸
تیمار سوم	۱۷/۷۱±۰/۶۴۴	۲۲/۱۴±۰/۴۰۴†	۲۴/۴۲±۰/۴۸۰†	۲۷±۰/۴۸۱†	۲۸/۲۸±۰/۴۲۰*	۲۷/۷۱±۰/۴۲۰
تیمار چهارم	۱۸/۲۸±۰/۵۶۵	۲۲/۱۴±۰/۴۵۹†	۲۴/۵۷±۰/۳۶۸†	۲۷/۱۴±۰/۴۰۴†	۲۸/۵۷±۰/۳۶۸†	۲۷/۸۵±۰/۵۵۳

گروه کنترل: تحت هیچ تخریب یا جراحی قرار نگرفتند و تنها به مدت ۵ روز متوالی با ماز Y شکل آموزش دیدند؛ گروه شاهد تخریب: الکترود به صورت دوطرفه به هسته NBM موش‌ها وارد شد؛ اما تخریبی ایجاد نگردید و تنها به مدت ۵ روز متوالی با ماز Y شکل آموزش دیدند؛ گروه تخریب: ایجاد مدل بیماری آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM و به مدت ۵ روز متوالی با ماز Y شکل آموزش دیدند؛ گروه تخریب توام با سالین: ایجاد مدل بیماری آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM، سپس دریافت سالین (حلال دارو) به میزان ۰/۷ml به مدت ۵ روز نیم ساعت قبل از آموزش؛ گروه‌های تیمار: ایجاد مدل بیماری آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM، سپس دریافت ممانتین به ترتیب با مقادیر ۱، ۳، ۵ و ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم در گروه‌های تیمار اول، تیمار دوم، تیمار سوم و تیمار چهارم به مدت ۵ روز نیم ساعت قبل از آموزش #P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل و گروه شاهد تخریب؛ *P<۰/۰۰۵، †P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه تخریب

به منظور مقایسه میانگین پاسخ صحیح روز پنجم و آزمون حافظه روز سی‌ام از آزمون t زوجی استفاده شد. سطح معنی داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان یادگیری فضایی در ۵ روز متوالی آموزش در مقایسه بین گروه کنترل و گروه شاهد تخریب در هیچ کدام از روزها تفاوت آماری معنی داری نشان نداد. میزان یادگیری فضایی بین گروه کنترل و گروه تخریب در روزهای اول (۱۶/۴۲±۰/۶۴۹)، دوم (۲۴/۵۷±۰/۵۲۸)، سوم (۲۱/۱۴±۰/۴۰۴)، چهارم (۲۶/۷۱±۰/۳۵۹) و پنجم (۲۶/۲۸±۰/۳۵۹) دارای تفاوت آماری معنی داری بود (P<۰/۰۰۱). بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه روز سی‌ام در گروه کنترل (۲۸/۱۴±۰/۵۰۸) و گروه تخریب (۲۴/۵۷±۰/۴۸۰) اختلاف آماری معنی داری مشاهده نگردید (جدول یک).

در میزان یادگیری فضایی گروه تخریب در مقایسه با گروه تخریب توام با سالین در هیچیک از روزها تفاوت آماری معنی داری دیده نشد. همچنین بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه روز سی‌ام در این دو گروه تفاوت آماری معنی داری یافت نشد (جدول یک).

میزان یادگیری فضایی در گروه تخریب در مقایسه با گروه تیمار اول در روزهای اول تا پنجم اختلاف آماری معنی داری نشان نداد. بین گروه تخریب و گروه تیمار دوم در روزهای دوم (۲۶/۷۱±۰/۴۲۰) و چهارم (۲۴/۱۴±۰/۴۰۴) اختلاف آماری معنی داری وجود داشت (P<۰/۰۵). در این گروه‌ها بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه روز سی‌ام اختلاف آماری معنی داری یافت نشد (جدول

حیوان در آن قرار داشت؛ آموزش شروع شد. انتخاب بازوها بر اساس جدول تصادفی صورت گرفت. با فشار دادن یک دکمه روی دستگاه کنترلی، چراغ یکی از بازوهای ماز روشن می‌شود که در یک فاصله زمانی کوتاه (۵ ثانیه) موش فرصت دارد تا از محل تاریک خارج شده و وارد بازوی روشن شود. در این صورت ورود موش به بازوی روشن به عنوان انتخاب صحیح محسوب می‌شود. در غیر این صورت بعد از ۵ ثانیه به پاهای موش شوکی داده می‌شود و در این صورت ورود به بازوی روشن به عنوان انتخاب صحیح و ورود به بازوی تاریک به عنوان انتخاب غلط محسوب می‌شود. براساس جدول تصادفی در هر روز به هر موش ۳۰ بار آموزش داده شد و در پایان هر جلسه تعداد پاسخ صحیح محاسبه گردید. جلسات آموزش به مدت ۵ روز متوالی ادامه یافت تا موش‌ها به معیار پاسخ صحیح برسند. به عبارتی دیگر از ۳۰ بار آموزش در روز حداقل ۲۶ بار انتخابی صحیح داشته باشند. بیست و پنج روز بعد از آموزش آزمون فراخوانی حافظه برای ارزیابی حافظه بلندمدت انجام گردید. در این آزمون حافظه هر کدام از حیوانات در روز سی‌ام به صورت یک جلسه در دستگاه ماز Y شکل مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن با نتایج روز پنجم آموزش مقایسه شد (۱۶).

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-20 تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به صورت توصیفی و تحلیلی با استفاده از آزمون‌های آماری پارامتریک بررسی شدند. به منظور مقایسه میانگین تعداد پاسخ صحیح در گروه‌های مختلف و تعیین اختلاف گروه‌ها با یکدیگر و مقایسه گروه‌های مختلف در ۵ روز متوالی، از آنالیز واریانس با اندازه گیری تکراری و آزمون تکمیلی Tukey استفاده گردید. مقایسه میانگین پاسخ صحیح بین گروه تخریب و حلال در ۵ روز متوالی آموزش با استفاده از آزمون t مستقل انجام شد.

موجب افزایش آماری معنی دار حافظه فضایی شد (۱۴). این نتایج مغایر با نتایج حاصله در مطالعه حاضر است. به نظر می‌رسد علت آن است که در مطالعه حاضر موش‌های صحرایی بعد از تخریب NBM تحت تیمار با ممانتین قرار گرفتند. در حالی که Zoladz و همکاران اثر ممانتین را بر موش‌های سالم بررسی کردند (۱۴). در مطالعه Klyubin و همکاران نیز تیمار با ممانتین در موش‌های صحرایی تحت تاثیر آمیلوئید بتا موجب کاهش خطای آزمون شناختی در Alternating Lever Cyclic Ratio گردید (۹). همچنین در شرایط آزمایشگاهی پیش‌درمان با ممانتین با مقدار ۲۰ mg/kg موجب کاهش مهار القای تقویت دراز مدت ناشی از تیمار با آمیلوئید بتا گردید. در حالی که مقدار ۵ mg/kg آن بر مهار تقویت درازمدت در این شرایط اثری نداشت (۱۹). علاوه بر این ممانتین در غلظت‌های درمانی موجب محافظت در برابر آسیب نورون‌ها و آپوپتوز القاء شده به وسیله تزریق مستقیم آمیلوئید بتا به هیپوکامپ شده است (۲۰). در مدل ایسکمی مغزی نیز پیش‌درمان با ممانتین موجب کاهش سمیت عصبی ایجاد شده توسط گلو تامات و محافظت در برابر آسیب نورونی شده است (۲۱). نقص کولینرژیک به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری آلزایمر شناخته شده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد ممانتین موجب کاهش نقص حافظه شناختی در موش‌های صحرایی مسن در آزمون شناخت اشیاء جدید می‌گردد (۲۲). علاوه بر این در موش‌های صحرایی مسن ممانتین موجب افزایش دوام تقویت درازمدت در هیپوکامپ گردید (۲۳). در یک مطالعه ممانتین موجب بازگشت نقص یادگیری القاء شده توسط اسکوپولامین در ماز آبی موریس گردید و اثر تحریکی ممانتین بر سیگنالینگ کولینرژیک از طریق اثر بر گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین بود (۱۱). همچنین ممانتین موجب بهبود اختلال شناختی ایجاد شده توسط اسکوپولامین در آزمون تشخیص شی جدید شده است. ممانتین موجب افزایش خارج سلولی استیل کولین در هیپوکامپ می‌گردد (۲۴). در مطالعه‌ای ممانتین در موش‌های صحرایی پس از تزریق حاد زیر پوستی با مقدار ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم موجب افزایش خارج سلولی استیل کولین در ناحیه تگمنتال شکمی و هسته اکومبیس گردید (۲۵). در مطالعه‌ای درمان سیستمیک با ممانتین در موش‌های صحرایی موجب افزایش وابسته به مقدار سطوح استیل کولین خارج سلولی در نئوکورتکس و هیپوکامپ گردید. در مقدار ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم این افزایش در نئوکورتکس ۲۴۱ درصد و در هیپوکامپ ۲۴۷ درصد بود. افزایش وابسته به مقدار استیل کولین خارج سلولی در درمان سیستمیک با دونپزیل در مقایسه با ممانتین کمتر (نئوکورتکس ۱۳۴ درصد و هیپوکامپ ۱۰۹ درصد) بود و این افزایش در مورد دونپزیل بیشتر به واسطه افزایش رهایش استیل کولین در سیناپس در مقایسه با مهار آنزیم استیل کولین استراز ارزیابی شد.

یک). میزان یادگیری فضایی گروه تخریب در مقایسه با گروه تیمار سوم و گروه تیمار چهارم در روزهای دوم، سوم و چهارم ($P < 0.01$) و نیز روز پنجم ($P < 0.05$) اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد. در این گروه‌ها بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه روز سی‌ام اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت (جدول یک).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه تخریب دوطرفه NBM باعث کاهش معنی‌دار در فرآیند یادگیری فضایی گردید.

در مطالعه ربیعی و همکاران نشان داده شد تخریب دوطرفه NBM با استفاده از روش الکتریکی باعث کاهش یادگیری فضایی در ماز آبی موریس و همچنین کاهش یادگیری اجتنابی غیرفعال در دستگاه شاتل باکس می‌شود (۵). همچنین در مطالعات دبیر و همکاران تخریب الکتریکی دو طرفه NBM موجب کاهش پاسخ‌های درست در آزمون اکتساب در ماز شعاعی هشت بازویی گردید (۱۷). همچنین در مطالعه زاهدی و همکاران تخریب الکتریکی دو طرفه NBM موجب کاهش یادگیری فضایی در ماز آبی موریس و کاهش یادگیری اجتنابی غیرفعال در دستگاه شاتل باکس گردید (۱۸). این نتایج هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر است.

در مطالعه حاضر مقایسه نتایج بین گروه کنترل و شاهد تخریب نشان داد که ورود الکتروده به NBM بدون تخریب این هسته اثری بر یادگیری فضایی ندارد که نشان می‌دهد مراحل مختلف بیهوشی، جراحی و ورود الکتروده به NBM بدون ایجاد تخریب اثری بر یادگیری فضایی در موش‌های صحرایی نداشته است. همچنین مقایسه بین دو گروه تخریب و تخریب توام با سالین نشان داد که سالین (حلال دارو) هیچ اثری بر یادگیری فضایی ندارد.

در مطالعه حاضر مقایسه بین گروه تخریب با گروه‌های تیمار نشان داد که ممانتین در مقادیر ۳، ۵ و ۷ میلی گرم موجب افزایش معنی‌دار یادگیری فضایی در مدل بیماری آلزایمر با تخریب NBM می‌گردد و اثرات رفتاری مشاهده شده برای ممانتین وابسته به مقدار بود.

ممانتین یک آنتاگونیست غیررقابتی با میل ترکیبی کم تا متوسط برای گیرنده‌های NMDA است که برخلاف بسیاری از آنتاگونیست‌های با میل ترکیبی بالای این گیرنده از فعالیت بیش از حد یا نامناسب آن ممانعت می‌کند. در حالی که بر انتقالات فیزیولوژیک گیرنده (۹) که برای اعمال شناختی مورد نیاز است؛ اثری ندارد (۱۴). در مطالعه Zoladz و همکاران تزریق داخل صفاقی ممانتین به مدت ۳ روز هر روز نیم ساعت قبل از آموزش در ماز آبی موریس در موش‌های صحرایی سالم اثری بر میزان یادگیری فضایی در مراحل آموزش نداشت؛ اما مقادیر ممانتین ۵ و ۷ میلی گرم بر کیلو گرم در آزمون حافظه ۲۴ ساعت پس از آموزش

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که درمان مزمن با ممانتین به‌صورت وابسته به دوز در مدل تخریب الکتریکی دو طرفه NBM و قطع ورودی‌های اصلی کولینرژیک به قشر و هیپوکامپ احتمالاً از طریق افزایش استیل کولین خارج سلولی در قشر و هیپوکامپ، اثر بر گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین و افزایش دوام تقویت دراز مدت در هیپوکامپ موجب بهبود یادگیری فضایی در دستگاه ماز Y شکل می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۳۹/م/۹۵/۱۲/۲۳) خانم نسترن زمانی برای اخذ درجه دکتری تخصصی در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز بود. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر همکاری و مساعدت در انجام این مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Tillement L, Lecanu L, Papadopoulos V. Alzheimer's disease: effects of β -amyloid on mitochondria. *Mitochondrion*. 2011 Jan; 11(1):13-21. doi:10.1016/j.mito.2010.08.009
2. Bezprozvanny I, Mattson MP. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 2008 Sep; 31(9):454-63. doi:10.1016/j.tins.2008.06.005
3. Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PG. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behav Brain Res*. 2011 Aug; 221(2):594-603. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.033
4. Goshadrou F. [Modified sensory processing in the barrel cortex of the Rat model of Alzheimer's disease]. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2011; 13(3): 16-25. [Article in Persian]
5. Rabiei Z, Asgharzadeh S, Bigdeli MR. [Medicinal Herbs Effective in the Treatment of the Alzheimer's Disease]. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2015; 16(15): 51-9. [Article in Persian]
6. Li SM, Mo MS, Xu PY. Progress in mechanisms of acetylcholinesterase inhibitors and memantine for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2015; 2(4): 274-80. doi:10.4103/2347-8659.167305
7. Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Okadaic acid-induced Tau phosphorylation in rat brain: role of NMDA receptor. *Neuroscience*. 2013 May; 238:97-113. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.01.075
8. Barber TA, Haggarty MK. Memantine ameliorates scopolamine-induced amnesia in chicks trained on taste-avoidance learning. *Neurobiol Learn Mem*. 2010 May; 93(4):540-5. doi:10.1016/j.nlm.2010.02.001
9. Klyubin I, Wang Q, Reed MN, Irving EA, Upton N, Hofmeister J, et al. Protection against A β -mediated rapid disruption of synaptic plasticity and memory by memantine. *Neurobiol Aging*. 2011 Apr; 32(4):614-23. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.005
10. Tozzi A, Sclip A, Tantucci M, de Iure A, Ghiglieri V, Costa C, et al. Region- and age-dependent reductions of hippocampal

همچنین سطوح افزایش یافته استیل کولین پس از درمان با دونپیزیل به سرعت (در حدود ۱۵ دقیقه) به سطح پایه بازگشت. در حالی که رسیدن استیل کولین به سطح پایه پس از تزریق ممانتین در زمان طولانی‌تری صورت گرفت (۲۶). گزارشات فوق هم‌راستا با نتایج ما در مطالعه حاضر است. به‌نظر می‌رسد در مطالعه حاضر نیز بعد از القای مدل آلزایمر به روش تخریب الکتریکی NBM که در آن بخش عمده‌ای از نورون‌های کولینرژیک قاعده مغز جلویی حذف می‌گردند؛ ممانتین از طریق افزایش استیل کولین خارج سلولی موجب افزایش یادگیری فضایی شده است. این افزایش استیل کولین خارج سلولی به‌واسطه اثر ممانتین بر سیستم‌های دوپامینرژیک، GABA و آدرنرژیک گزارش شده است (۲۴).

در مطالعه حاضر میزان بیان گیرنده‌های کولینرژیک موسکارینی و نیکوتینی در هیپوکامپ و قشر مغز بررسی نشده است و پیشنهاد می‌شود تا مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد.

- long-term potentiation and NMDA to AMPA ratio in a genetic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015 Jan; 36(1):123-33. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.002
11. Song MS, Rauw G, Baker GB, Kar S. Memantine protects rat cortical cultured neurons against beta-amyloid-induced toxicity by attenuating tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*. 2008 Nov; 28(10):1989-2002. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06498.x
12. Unger C, Svedberg MM, Yu WF, Hedberg MM, Nordberg A. Effect of subchronic treatment of memantine, galantamine, and nicotine in the brain of Tg2576 (APPswe) transgenic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Apr; 317(1):30-6.
13. Sun D, Chen J, Bao X, Cai Y, Zhao J, Huang J, et al. Protection of Radial Glial-Like Cells in the Hippocampus of APP/PS1 Mice: a Novel Mechanism of Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug; 52(1):464-77. doi:10.1007/s12035-014-8875-6
14. Zoladz PR, Campbell AM, Park CR, Schaefer D, Danysz W, Diamond DM. Enhancement of long-term spatial memory in adult rats by the noncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine and neramexane. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006 Oct; 85(2):298-306.
15. Shkavandi S, Moazedi AA, Semnani S, Eshagh-Harooni H, Mohammadi T, Pourmehdi-Brojeni M. [The effect of methylprednisolone on spatial learning and memory in adult male rats using an experimental model of Alzheimer's disease]. *Feyz*. 2015; 19(2): 102-10. [Article in Persian]
16. Hoveida RI, Moazedi AA, Rasekh A. [The effect of intra-Hippocampal CA1 area injection of Estradiol Benzoate on the spatial learning and memory in adult male rats]. *Modares Journal of Medical Sciences*. 2005; 7(2): 115-24. [Article in Persian]
17. Dabir N, Moazedi AA, Haghparsat A, Khajepour L, Akhoond M. [Effects of Estrogen Therapy on Cognitive Performance Deficit Induced by Nucleus Basalis Magnocellularis Lesion: Animal Model of Alzheimer's Disease]. *J Isfahan Med Sch*. 2016; 34(370): 64-73. [Article in Persian]

18. Zahedi M, Hojjati MR, Fathpour H, Rabiei Z, Alibabaei Z, Basim A. Effect of Rheum Ribes Hydro-Alcoholic Extract on Memory Impairments in Rat Model of Alzheimer's Disease. *Iran J Pharm Res*. 2015 Fall;14(4):1197-206.
19. Li F, Chen X, Wang F, Xu S, Chang L, Anwyl R, et al. Chronic pre-treatment with memantine prevents amyloid-beta protein-mediated long-term potentiation disruption. *Neural Regen Res*. 2013 Jan; 8(1):49-55. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.01.006
20. Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res*. 2002 Dec; 958(1):210-21.
21. Babu CS, Ramanathan M. Pre-ischemic treatment with memantine reversed the neurochemical and behavioural parameters but not energy metabolites in middle cerebral artery occluded rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 May;92(3):424-32. doi:10.1016/j.pbb.2009.01.010
22. Pietá Dias C, Martins de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Garcia VA, Siciliani Scalco F, et al. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*. 2007 Jun; 146(4):1719-25.
23. Barnes CA, Danysz W, Parsons CG. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. *Eur J Neurosci*. 1996 Mar;8(3):565-71.
24. Yamaguchi Y, Takeda K, Hino M. Combination effects of ZSET1446/ST101 with memantine on cognitive function and extracellular acetylcholine in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 2013;123(4):347-55.
25. Shearman E, Rossi S, Szasz B, Juranyi Z, Fallon S, Pomara N, et al. Changes in cerebral neurotransmitters and metabolites induced by acute donepezil and memantine administrations: a microdialysis study. *Brain Res Bull*. 2006 Mar; 69(2):204-13. doi:10.1016/j.brainresbull.2005.12.001
26. Ihalainen J, Sarajärvi T, Rasmusson D, Kemppainen S, Keski-Rahkonen P, Lehtonen M, et al. Effects of memantine and donepezil on cortical and hippocampal acetylcholine levels and object recognition memory in rats. *Neuropharmacology*. 2011 Oct-Nov;61(5-6):891-9. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.06.008

Original Paper

Effect of memantine on spatial learning and memory in electrical lesions model of nucleus basalis magnocellularis: animal model of Alzheimer's disease

Nastaran Zamani (M.Sc)¹, Ahmad Ali Moazedi (Ph.D)^{*2}
Mohammad Reza Afarinesh Khaki (Ph.D)³, Mehdi Pourmehdi Boroujeni (Ph.D)⁴

¹Ph.D Candidate in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. ²Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

³Assistant Professor, Kerman Cognitive Research Center, Kerman Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. ⁴Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background and Objective: Memantine (MEM) an uncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist is used for treatment of patients with Alzheimer disease. This study aimed to examine the effect of Memantine on the spatial learning and memory in electrical lesion's model of nucleus basalis magnocellularis (NBM) in animal model of Alzheimer's disease.

Methods: In this experimental study, 56 adult male Wistar rats were allocated into eight groups: control group; lesion group, which received bilateral electrically lesion (0.5 mA, 3s) in NBM; sham group (the electrode was entered into the NBM with no lesion); Memantine groups (lesion+1 mg/kg/bw of MEM; lesion+3 mg/kg/bw of MEM; lesion+5 mg/kg/bw of MEM; lesion+7 mg/kg/bw of MEM) and Vehicle group (lesion+0.2 mL saline). After one week, animals were trained to perform the Y-maze task for five days. Twenty five days after training, a retention test was performed to determine long-term memory.

Results: The bilateral lesion of NBM impaired the spatial learning compared to the control and sham groups ($P<0.05$). No effect on spatial learning was seen in saline group compared with the lesion group. The treatment with Memantine in lesion+MEM 3 mg/kg/bw, lesion+MEM 5mg/kg/bw and lesion+MEM 7mg/kg/bw groups significantly improved spatial learning ($P<0.05$). Moreover, no significant difference of memory was observed between the results in the 5th day of training and the retention test of the 30th day.

Conclusion: Treatment with memantine improves spatial learning defects in electrical lesions model of NBM of Alzheimer's disease in dose dependent manner in animal model.

Keywords: Alzheimer disease, Nucleus basalis of magnocellularis, Spatial learning, Memantine

* Corresponding Author: Moazedi AA (Ph.D), E-mail: moazedi.a@gmail.com

Received 11 Mar 2017

Revised 19 Aug 2017

Accepted 26 Aug 2017

Nastaran Zamani (<https://orcid.org/0000-0001-9293-190X>), Ahmad Ali Moazedi (<https://orcid.org/0000-0003-1346-2426>)