دخالت سیستم کولینرژیک موسکارینی موجود در هیپوکمپ پشتی در تقویت یادگیری و حافظه فضائی ناشی از استرس حاد در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر

فاطمه تهرانی فرزین [۱](M.Sc)، مریم بنانج [۱](Ph.D)، هدایت صحرایی [۲*](Ph.D)

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۷۵۵۴۴۹۰-۰۲۱ hsahraei1343@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲۱

چکیده

هدف: تاثیر تحریک و مهار گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین در ناحیه هیپوکمپ پشتی بر حافظه و یادگیری فضائی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI پس از استرس حاد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: حیوانات به دو زیرمجموعه استرس و غیر استرس تقسیم شدند. هر زیرمجموعه شامل: گروه سالین، آتروپین- آنتاگونسیت گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین- (۱و ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش)، و پیلوکارپین- آگونیست گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین- (۱و ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش) بود. در زیرمجموعه استرس، ۵ دقیقه قبل از هر بار تزریق دارو و یا سالین، حیوانات استرس شوک الکتریکی کف پا را دریافت کردند. یک روز پس از دارودرمانی و یا استرس (به ترتیب)، حافظه و یادگیری فضائی حیوانات در ماز بارنز آزمایش شد. در این تحقیق، زمان و مسافت طی شده تا رسیدن به اتاقک هدف، و تعداد خطا در رسیدن به اتاقک هدف به عنوان متغییرهای یادگیری و حافظه مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: زمان رسیدن و مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف در موش‌های گروه استرس افزایش یافت. تعداد خطا در این موش‌ها کم‌تر بود. آتروپین (۱و ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش) اثر استرس حاد در بهبود حافظه فضائی را تخریب کرد اما پیلوکارپین (۱و ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش) این اثر را بهبود بخشید. آتروپین (۱و ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش) در حیوانات غیر استرسی فقط در روزهای اول و دوم توانست اثرات تخریب حافظه داشته باشد اما پیلوکارپین (۱و ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش) در حیوانات غیر استرسی توانست یادگیری و حافظه فضائی را القاء کند.

نتیجه‌گیری: استرس حاد توانست باعث تقویت حافظه و یادگیری فضائی در حیوانات شود و با توجه به اثربخشی آتروپین و اثربخشی نسبی پیلوکارپین در مهار یا تقویت اثرات استرس، به نظر می‌رسد که نقش سیستم موسکارینیک کولینرژیک در هیپوکمپ پشتی در القاء حافظه فضائی ناشی از استرس حاد مهم باشد.

واژه‌های کلیدی: آتروپین، برین فورنیکس، هیپوکامپ، پیلوکارپین ، حافظه فضایی ، یادگیری فضایی، استرس

مقدمه

اثرات مخرب استرس مزمن آن‌چنان بر زندگی و سلامت انسان‌ها اثرگذار است که توجه اکثر محققان را به خود معطوف کرده است در حالی‌که اثرات مفید استرس به‌خصوص استرس حاد معمولاً نادیده گرفته شده است [۱]. استرس مزمن را به عنوان یک عامل مهم در بروز انواع بیماری‌های عصبی، ایمنی و سرطان‌ها برشمرده‌اند [۲]. استرس‌های مزمن، باعث بروز انواع مختلفی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های دستگاه عصبی مانند افسردگی [۳]، اضطراب [۴]، و فراموشی [۵] می‌شود. در همین ارتباط، نشان داده شده است که هورمون‌های رهاشده از غدد فوق کلیه در استرس مزمن باعث بروز اثرات تخریبی گسترده بر هیپوکمپ می‌شوند [۶]. در حالی‌که در برخی دیگر از ساختارهای مغزی مانند آمیگدال، در اثر استرس مزمن و وجود هورمون‌های استرسی افزایش حجم و اندازه سلول‌ها مشاهده شده است [۶]. تخریب ساختارهای نورونی در هیپوکمپ در اثر استرس، به واسطه عملکرد سیستم گلوتاماتی صورت می‌گیرد که این سیستم نیز در اثر فعالیت گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی (GR) در هیپوکمپ فعال می‌شود [۷].

از سوی دیگر، تحقیقات زیادی نشان داده است که استرس‌های حاد با تحریک گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی نوع ۱ یا گیرنده‌های مینرالوکورتیکوئیدی (MR) نه تنها اثرات مخربی را بر ساختارهای نورونی در هیپوکمپ اعمال نمی‌کنند، بلکه با تحریک جابه‌جائی گیرنده‌های NMDA و AMPA

گلوتاماتی به سطح غشاء نورون‌های این بخش از مغز باعث افزایش سیناپس‌ها و تقویت آن‌ها و در نتیجه بهبود توانائی حافظه و یادگیری در فرد می‌شود [۸-۱۱].

مطالعات فراوانی نشان داده است که هیپوکمپ مهم‌ترین ساختار مغزی حساس به گلوکوکورتیکوئیدهای ترشح شده از غدد فوق کلیه است و ساختارهای نورونی موجود در آن در مقابل این هورمون‌ها دچار تغییرات فراوانی در دندریت‌های قطبی خود می‌شوند [۱۲]. از نظر ساختاری هیپوکمپ را می‌توان به دو بخش پشتی و شکمی تقسیم کرد که بخش پشتی هیپوکمپ را مرکز حافظه فضائی در مغز می‌دانند [۱۳]. روند تسهیل یا تخریب حافظه فضائی در هیپوکمپ پشتی از جمله مباحث مهم در بررسی‌های انجام شده در مورد عملکرد استرس مزمن در مغز می‌باشد [۱۴]. حافظه فضائی ارتباط بسیار تنگاتنگی با روندهای تولید و تقویت سیناپسی در هیپوکمپ پشتی دارد که با هماهنگی کامل با بخش قاعده‌ای-جانبی آمیگدال عمل می‌کند [۱۵]. در همین راستا محققان علاوه بر هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی، نقش سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف را در بروز اثرات استرس مزمن مورد تاکید قرار داده‌اند [۱۶]. از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده‌اند که حافظه و یادگیری فضائی به مقدار زیادی با فعالیت سیستم کولینرژیک هیپوکمپ پشتی در ارتباط هستند [۱۶-۱۸]. مثلاً، نشان داده شده است که فراموشی ناشی از تجویز محیطی ذرات نانوئی اکسید آهن در مدل حیوانی احترازی غیر فعال با تزریق داخل هیپوکمپ پشتی پیلوکارپین (آگونیست گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین) برگشت می‌کند [۱۹]. از سوی دیگر، تجویز اسکوپولامین به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی به داخل ناحیه CA1هیپوکمپ باعث بروز فراموشی در مدل‌های مختلف حافظه از جمله حافظه فضائی [۲۰،۲۱] و حافظه اجتنابی [۲۲] می‌شود. لازم به ذکر است که این تحقیقات در مورد حیوانات استرس ندیده بوده و تاکنون به نقش سیستم کولینرژیک هیپوکمپ در موش‌های استرس‌دیده توجه نشده است. در ادامه باید توضیح داد که تاکنون توجه زیادی به اثرات استرس حاد بر تقویت حافظه فضائی و مکانیسم‌های مداخله‌کننده در آن نشده است. به همین دلیل، نیاز به بررسی این جنبه جالب از کار استرس حاد دیده می‌شود.

از آن‌جا که تحقیقات در مورد اثر استرس بر حافظه و یادگیری فضائی بر اثر استرس‌های مزمن بر تخریب حافظه متمرکز بوده [۶،۲۳] و تاثیر استرس حاد در این زمینه کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است، و از سوی دیگر تحقیقی در مورد اثر سیستم کولینرژیک بر عملکرد استرس حاد در هیپوکمپ پشتی و تغییر در حافظه فضائی انجام نشده است، در این تحقیق اثر تجویز آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین در ناحیه هیپوکمپ پشتی قبل از القاء استرس حاد در موش کوچک آزمایشگاهی نر بررسی شد. برای بررسی اثر این داروها از ماز بارنز استفاده شد، زیرا تحقیقات قبلی نشان داده است که این ماز حساسیت بیش‌تری برای سنجش حافظه فضائی در موش‌های استرس‌دیده نسبت به ماز آبی موریس دارد [۲۴،۲۵].

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این تحقیق از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI به وزن ۲۵-۲۳ گرم (تهیه شده از انستیتوپاستور ایران) استفاده شد. حیوانات در قفس‌های ۶ تایی با دوره شبانه‌روزی معکوس (۱۲ ساعت تاریکی-۱۲ ساعت روشنائی: ساعت خاموشی از ۷ صبح) و در دمای ۲۰-۲۳ درجه سانتی‌گراد، با آب و غذای کافی نگهداری شدند. در هر گروه آزمایش ۸-۱۰ سر حیوان مورد آزمایش قرار گرفت. تا یک هفته پس از استقرار حیوان در محیط نگهداری (حیوان‌خانه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه بقیه الله) به منظور تطابق با محیط جدید، هیچ آزمایشی روی آن‌ها انجام نمی‌گرفت. تمامی آزمایشات با توجه به دستورالعمل کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (س/۵۸۵۸/۵/۳۴۰، ۱۳۹۶/۵/۸) و دستورالعمل دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال (کد: ۱۵۷۳۰۵۵۷۹۶۲۰۰۱، تاریخ: ۱۳۹۷/۲/۳۱) در مورد کار با حیوانات انجام شد.

گروه‌بندی حیوانات. حیوانات به صورت تصادفی به ۱۴ گروه ۸-۱۰ تایی تقسیم شدند (جمعاً ۱۲۰ سر موش):

۱. گروه کنترل منفی که حیوانات پس از جراحی و کانول‌گذاری در هیپوکمپ پشتی و گذشت یک هفته برای ریکاوری، در روز القاء استرس به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه القاء استرس خاموش قرار گرفتند. ۵ دقیقه قبل از قرار گرفتن حیوانات در دستگاه القاء استرس، به داخل هیپوکمپ پشتی حیوانات سالین استریل به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر در هر طرف در هیپوکمپ پشتی تزریق شد. روز بعد آزمایش‌های مربوط به ماز بارنز در این حیوانات انجام شد. در گروه کنترل مثبت پس از جراحی و کانول‌گذاری در داخل هیپوکمپ پشتی و هفت روز استراحت به منظور ریکاوری، به ناحیه هیپوکمپ پشتی این حیوانات نیز سالین استریل به میزان ۰/۲۵ میکروگرم در هر طرف تزریق شد و ۵ دقیقه بعد حیوانات به مدت ۶۰ دقیقه در داخل دستگاه القاء استرس قرار گرفتند. ۳۰ دقیقه پس از قرار گرفتن حیوانات در داخل دستگاه، القاء استرس الکتریکی شوک کف پا انجام شد (شدت ۴ میکروآمپر، فرکانس ۱Hz، به مدت

۱۰ ثانیه و مجموع ۱۰ شوک). حیوانات ۳۰ دقیقه دیگر در دستگاه باقی مانده و سپس به قفس نگهداری خود برگشت داده شده و از روز بعد پروتکل آموزش و یادآوری یادگیری و حافظه فضائی با استفاده از ماز بارنز در این حیوانات نیز انجام شد.

۲. گروه کنترل دارو که حیوانات جراحی شده و کانول‌ها در داخل هیپوکمپ پشتی آن‌ها قرار گرفت و به آن‌ها دوزهای مختلف پیلوکارپین (۱۰µg/mouse و ۵ و ۱) و یا آتروپین (۱۰µg/mouse و ۵ و ۱)، ۵ دقیقه قبل از قرار گرفتن در دستگاه استرس خاموش به‌صورت داخل هیپوکمپ پشتی تزریق شد. روز بعد آزمایش حافظه و یادگیری فضائی با استفاده از ماز بارنز در مورد آن‌ها انجام شد.

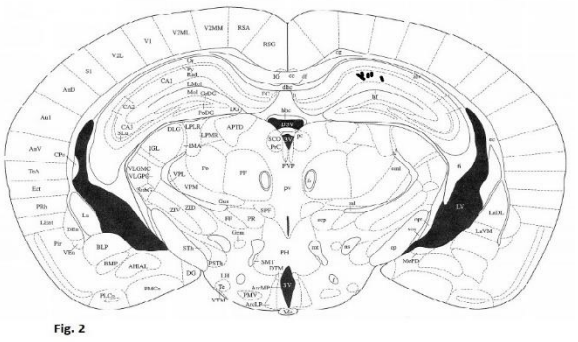
۳. گروه آزمایش که حیوانات جراحی شده و کانول‌ها در داخل هیپوکمپ پشتی آن‌ها قرار گرفت و به آن‌ها دوزهای مختلف پیلوکارپین (۱۰µg/mouse و ۵ و ۱)، و یا آتروپین (۱۰µg/mouse و ۵ و ۱) ۵ دقیقه قبل از قرار گرفتن در دستگاه استرس به‌صورت داخل هیپوکمپ پشتی تزریق شد و حیوانات به مدت ۶۰ دقیقه در داخل دستگاه القاء استرس قرار گرفتند. ۳۰ دقیقه پس از قرار گرفتن حیوانات در داخل دستگاه، القاء استرس الکتریکی شوک کف پا انجام شد (شدت ۴ میکروآمپر، فرکانس ۱Hz، به مدت ۱۰ ثانیه و مجموع ۱۰ شوک). حیوانات ۲۹ دقیقه ۵۰ ثانیه دیگر در دستگاه باقی مانده و سپس به قفس نگهداری خود برگشت داده شده و از روز بعد پروتکل آموزش و یادآوری یادگیری و حافظه فضائی با استفاده از ماز بارنز در این حیوانات نیز انجام شد.

داروها. داروهای مورد استفاده در این تحقیق شامل: کتامین هیدروکلراید (آلفاسان-هلند)، پیلوکارپین هیدروکلراید (سینادارو، هیران)، آتروپین هیدروکلراید (سینادارو، ایران)، و دیازپام هیدروکلراید (سیگما-آمریکا) بود. کتامین و دیازپام برای بی‌هوشی حیوانات استفاده شدند. برای این منظور، داروها در سالین استریل حل شده و در حجم ۱۰ml/kg (برای تجویز داخل صفاقی) به حیوانات تزریق شدند. پیلوکارپین (آگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینیک استیل‌کولین- که باعث تحریک تمامی انواع زیرگروه‌های گیرنده‌های موسکارینیک استیل‌کولین می‌گردد-)، آتروپین (آنتاگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینیک استیل‌کولین -که باعث مهار تمامی انواع زیرگروه‌های گیرنده‌های موسکارینیک استیل‌کولین می‌گردد-) در سالین استریل حل شده و در حجم µl/mouse ۰/۵ (برای تجویز داخل هیپوکمپی) مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به توضیح است که در تمامی تحقیقات قبلی برای تزریق داخل یک ناحیه از مغز، داروها به‌صورت میکروگرم/موش و در حجمی که بسته به گستردگی ناحیه مورد نظر دارد، تزریق می‌شود. کتامین هیدروکلراید (۷۰mg/kg) و دیازپام هیدروکلراید (۵mg/kg) برای القاء بی‌هوشی قبل از جراحی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شدند. پیلوکارپین هیدروکلراید، و آتروپین هیدروکلراید برای تزریق در نرمال سالین استریل حل می‌شدند و با دوزهای (۱۰µg/mouse و ۵ و ۱) به‌صورت داخل هیپوکمپ پشتی، ۵ دقیقه قبل از القاء استرس به حیوانات تجویز می‌شدند.

جراحی حیوانات و تعبیه کانول راهنما. برای انجام عمل جراحی ابتدا قبل از جراحی هر حیوان را با ترازو توزین کرده و برای بی‌هوش نمودن حیوان از دیازپام و کتامین به روش درون صفاقی استفاده شد. بعد از بی‌هوشی و برداشتن موهای پشت سر، حیوان درون دستگاه استریوتاکس (Stoelting Co.) قرار داده شد. با استفاده از مختصات موجود در اطلس پاکسینوس [۲۶]، و تعیین نقطه برگما محل قرار گرفتن کانول‌های راهنما (سر سوزن شماره ۲۳) محاسبه و ناحیه مورد نظر بر روی جمجمه علامت‌گذاری می‌شد و سپس به وسیله مته دندان‌پزشکی سوراخ‌هایی به قطر ۱ میلی‌متر بر روی جمجمه ایجاد می‌شد. سپس کانول‌ها به آهستگی و به‌وسیله بازوی دستگاه استریوتاکس در داخل سوراخ‌ها قرار داده می‌شدند. قبل از قرار دادن کانول‌های راهنما، دو عدد پیچ عینک در حد فاصل ۲mm محل قرارگیری کانول بر روی سطح جمجمه جهت محکم نگه داشتن کانول راهنما پیچ می‌شد. مختصات محل قرارگیری کانول راهنما در ناحیه هیپوکمپ پشتی در موش کوچک آزمایشگاهی با وزن ۲۵ گرم به قرار زیر بود: DV=۳ میلی‌متر از سطح جمجمه، ML=±۳ میلی‌متر از خط وسط و AP=۲/۷ میلی‌متر بود. کانول تزریق که از سرسوزن دندان‌پزشکی Gage۳۰ تهیه شده و ۰/۵mm بلندتر از کانول راهنما در نظر گرفته شد. بعد از کانول‌گذاری، اطراف کانول و پیچ‌های عینک با آکریل دندان‌پزشکی پوشیده شده و بعد از سفت شدن سیمان دندان‌پزشکی به آرامی بازوی دستگاه استریوتاکس از درون کانول خارج کرده و یک قطعه سیم از جنس فولاد زنگ نزن که به اندازه ارتفاع کانول بود را درون آن قرار می‌دادیم. بعد از پایان جراحی حیوان به مدت یک هفته استراحت می‌کرد تا استرس ناشی از جراحی منتفی شده و نیز اثرات داروهای بی‌هوشی از بین برود.

روش تزریق داخل هیپوکمپ پشتی. تزریق دارو به داخل نواحی کانول‌گذاری شده از طریق یک کانول تزریق Gage۳۰ که توسط یک رابط پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون با حجم ۰/۵ میکرولیتر وصل شده بود، صورت گرفت. در ابتدا لوله پلی‌اتیلنی و کانول تزریق از محلول دارو و یا سالین پر شد. هنگام تزریق حیوانات به آرامی با دست مهار می‌شدند، سیم فولادی از داخل

کانول راهنما خارج شده، و سپس کانول تزریق در کانول راهنما تعبیه و دارو به آرامی (۰/۲۵ µl در هر طرف به صورت دوطرفه) به مدت ۳۰ ثانیه تزریق شد. در طول تزریق حیوانات حرکت آزادانه داشتند. پس از اتمام تزریق کانول تزریق به مدت ۳۰ ثانیه جهت انتشار دارو در محل باقی ماند سپس به آرامی خارج شد و حیوانات جهت القاء استرس به Communication Box انتقال داده شدند. پس از پایان آزمایش‌ها، حیوانات با تزریق کتامین هیدروکلراید (۱۰۰mg/kg) بی‌هوش شده و با تزریق فرمالین ۴٪ به‌صورت ترانس کاردیاک مغز حیوانات فیکس شده و پس از خارج ساختن آن، برش‌هایی از محل کانول تهیه و توسط یک کارشناس صحت محل تزریق تایید می‌شد (شکل ۱).



شکل ۱. محل تزریق داروها در ناحیه هیپوکمپ پشتی

روش القاء استرس. دستگاه القاء استرس شوک الکتریکی کف پا متشکل از ۹ قسمت مجزا به ابعاد ۱۶×۱۶×۵۰ سانتی‌متر (طول، عرض، ارتفاع–به ترتیب) از جنس پلکسی‌گلاس است که دیواره‌های آن دارای سوراخ‌های ریزی جهت ارتباط دیداری، بویایی و شنیداری است [۲۷]. کف دستگاه دارای میله‌های استیل به قطر ۴ میلی‌متر و با فواصل ۱/۳ سانتی‌متری است که از طریق این میله‌ها شوک الکتریکی به کف پای حیوان منتقل می‌شود. شدت و مدت القای شوک توسط رایانه متصل به این دستگاه کنترل می‌شود (در این تحقیق از شدت جریان ۴ میکروآمپر، فرکانس ۱ هرتز و به مدت ۱۰ ثانیه استفاده شد). برای القاء استرس، ابتدا حیوانات به محل آزمایش منتقل شده، ۶۰ دقیقه بعد در دستگاه القاء استرس قرار می‌گرفتند، و پس از ۳۰ دقیقه القاء شوک شروع شده و تا ۱۰ ثانیه ادامه می‌یافت. پس از خاتمه شوک، حیوانات به مدت ۲۹ دقیقه ۵۰ ثانیه دیگر در دستگاه باقی می‌ماندند (مجموع ماندن در دستگاه ۶۰ دقیقه بود). سپس حیوانات را به آرامی از دستگاه خارج کرده و به قفس محل زندگی برگشت داده می‌شدند. القا استرس یک روز و زمان القاء بین ساعت ۹ صبح و ۱۶ عصر بود که به‌صورت تصادفی تعیین می‌شد.

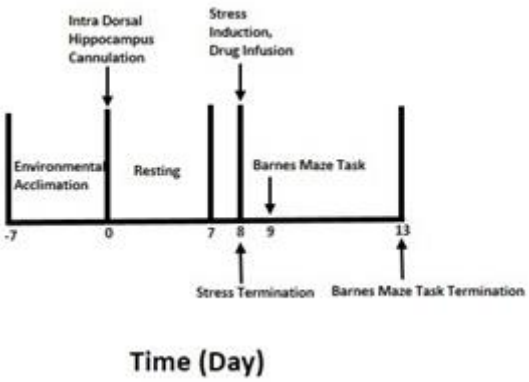
ماز بارنز و روش بررسی حافظه فضائی. ماز مورد استفاده در این تحقیق مشابه ماز استفاده شده در تحقیق قبلی بود که تغییرات اندکی در آن ایجاد شده بود [۲۸]. به‌طور خلاصه، این ماز از یک صفحه‌ی مدور از جنس پلاکسی‌گلاس شیری رنگ ساخته شده و ۹۲ سانتی‌متر قطر دارد. در اطراف این ماز به فاصله‌ی ۲ سانتی‌متر از لبه‌ی ماز ۱۲ سوراخ به قطر ۸ سانتی‌متر تعبیه شده است. فاصله‌ی سوراخ‌ها از هم ۵ سانتی‌متر است. در زیر یکی از این سوراخ‌ها (اتاقک هدف) یک اتاقک از جنس پلاکسی‌گلاس تیره به ابعاد ۲۰×۲۰ سانتی‌متر قرار دارد که می‌تواند از یک سوراخ به سوراخ دیگر جابه‌جا شود. این ماز بر روی یک پایه به ارتفاع ۱۰۰ سانتی‌متر قرار دارد و یک لامپ ۵۰۰ وات (کم‌مصرف) در ارتفاع ۱۰۰ سانتی‌متری بالای آن تعبیه شده است. در بالای این ماز یک دوربین نیز قرار دارد که حرکت حیوانات را ثبت و از طریق یک رابط به یک رایانه منتقل می‌کند. برنامه موجود در این رایانه قادر است سه پارامتر مهم در حافظه فضائی شامل زمان رسیدن به اتاقک هدف، مسافت طی شده تا رسیدن به اتاقک هدف، و تعداد دفعاتی که حیوان به سراغ سایر سوراخ‌ها غیر از سوراخی که اتاقک هدف در زیر آن قرار دارد، می‌رود (تعداد خطا) را تجزیه و تحلیل می‌کند.

آزمایش با ماز بارنز

روز آشنائی. ابتدا برای آموزش حیوانات، هر حیوان در روز اول به مدت ۶۰ دقیقه بر روی ماز قرار گرفت. در این حالت لامپ خاموش بود و اتاقک نیز در زیر هیچ سوراخی قرار نداشت (روز آشنایی).

روزهای یادگیری. از روز دوم تا روز پنجم، روزهای یادگیری بود. در روز دوم ابتدا اتاقک در زیر یکی از سوراخ‌ها که به‌صورت تصادفی تعیین شده بود قرار گرفت. سپس حیوانات به اتاق آزمایش آورده شده و پس از ۶۰ دقیقه که برای تطابق در نظر گرفته شده بود، یکی از حیوانات در زیر یک محفظه از جنس پلاکسی‌گلاس سیاه رنگ به ابعاد ۱۵×۱۵×۱۵سانتی‌متر در مرکز ماز قرار گرفت. ۱۰ ثانیه بعد لامپ روشن شده و محفظه برداشته می‌شد. به حیوان ۹۰ ثانیه زمان داده می‌شد تا سوراخ هدف را پیدا کند و در صورتی که نتوانست سوراخ هدف را بیابد، با دست به سوی سوراخ هدف راهنمایی می‌شد. پس از یافتن سوراخ هدف، لامپ خاموش شده و یک صفحه‌ی تیره بر روی محفظه اتاقک در سوراخ هدف گذاشته می‌شد و حیوان ۶۰ ثانیه در همان حال باقی می‌ماند. در این مدت، سطح ماز با الکل اتیلیک ۷۰٪ تمیز شده و رد بوی حیوان محو می‌شد. این کار ۴ بار در هر روز تکرار می‌شد. در روزهای سوم، چهارم و پنجم نیز همین روش برای هر حیوان تکرار می‌شد.

روز **تست حافظه**. در روز ششم، حیوانات به اتاق ماز منتقل شده و تمامی مراحل کار برای آن‌ها مثل روزهای آموزش انجام می‌شد اما هر حیوان فقط یک‌بار تست می‌شد در حالی‌که روی ورودی اتاقک پوشانده شده بود. در این روز میزان ماندن حیوان بر روی درپوش اتاقک هدف اندازه‌گیری شده و به عنوان نمادی از حافظه ثبت می‌شد. برای هر حیوان هم اتاقک مقصد پیش از شروع آزمایش با محلول فوق شسته می‌شد. در این تحقیق، زمان و مسافت طی شده توسط حیوان برای رسیدن به اتاقک هدف، و تعداد اشتباهات (تعداد دفعاتی که حیوان به سوراخ‌هایی غیر از سوراخ مرتبط با اتاقک هدف سر می‌زد) به عنوان متغییرهای تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل انجام کار در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲. مراحل انجام آزمایش

تجزیه و تحلیل آماری. برای آنالیز داده‌های کمی این مطالعه از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد. در مقایسه متغیرهای کمی بین گروه‌های مستقل، به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف–اسمیرونوف (KS) استفاده شد. در مقایسه متغیرهای کمی بین گروه‌های مستقل متغیرهای زمان صرف شده تا رسیدن به اتاقک هدف، مسافت طی شده تا رسیدن به اتاقک هدف و تعداد خطای انجام شده در رسیدن به اتاقک هدف از آزمون آنالیز–واریانس تکراری دو طرفه (Two-Way Repeated Measurement AVNOVA) استفاده شد. با توجه آن‌که فرض برابری واریانس‌ها رعایت شده بود، در ادامه، برای مقایسه تک‌تک گروه‌ها و بررسی سطح معنی‌داری بین دو متغیر مستقل در post hoc از آزمون بونفرونی (Bonferroni Post hoc Test) استفاده شد. تمام مقایسه‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده و $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. رسم تمامی نمودارها و منحنی‌ها توسط برنامه Exel ویرایش ۲۰۱۶ انجام گرفته است.

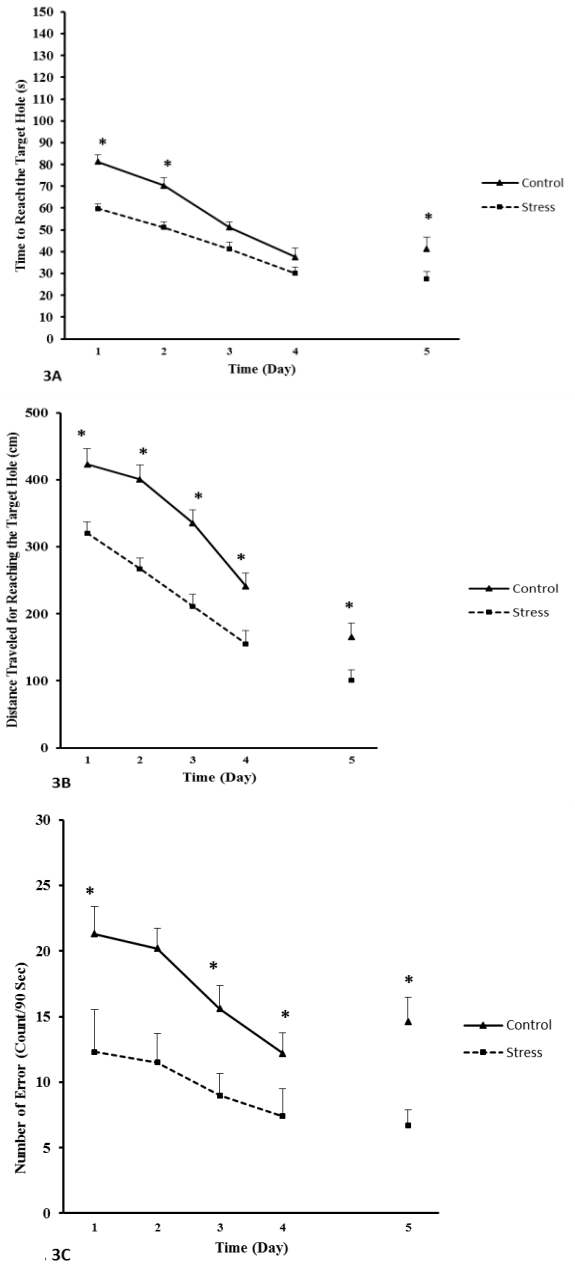
نتایج

اثر استرس حاد بر یادگیری و حافظه فضایی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. بررسی نتایج حاصل از تحلیل آماری آنالیز– واریانس دوطرفه در این بخش نشان داد که استرس حاد در القاء یادگیری و حافظه فضائی در حیوانات گروه استرس نسبت به حیوانات گروه کنترل (استرس ندیده) اثر تقویت‌کننده دارد. هر سه متغییر اندازه‌گیری شده در این تحقیق یعنی زمان رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر سالین: $P<۰/۱$، $F_{(۱۵و۷)}=۱/۳۱$، اثر استرس: $P<۰/۰۱$، $F_{(۱۵و۱)}=۳/۲۴$، اثر سالین×استرس: $P<۰/۰۱$، $F_{(۱۵و۷)}=۲/۲۵$].

(شکل A-۳)، مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر سالین: $P<۰/۱$، $F_{(۱۵و۷)}=۰/۹۲$، اثر استرس: $P<۰/۰۱$، $F_{(۱۵و۱)}=۲/۴۳$، اثر سالین×استرس: $P<۰/۰۱$، $F_{(۱۵و۷)}=۲/۴۷$].

(شکل B–۳)، و تعداد خطا در رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر سالین: $P<۰/۰۵$، $F_{(۱۵و۷)}=۲/۲۸$، اثر استرس: $P<۰/۰۵$، $F_{(۱۵و۱)}=۲/۱۲$، اثر سالین×استرس: $P<۰/۰۵$، $F_{(۱۵و۷)}=۲/۱۲$].

(شکل C–۳) در حیوانات استرس‌دیده نسبت به حیوانات گروه کنترل بهبود نشان دادند. آنالیز متعاقب با استفاده از تست بونفرونی نشان داد که در مورد زمان رسیدن به اتاقک هدف، استرس باعث کاهش زمان رسیدن به اتاقک هدف در روزهای اول و دوم (روزهای یادگیری، $P<۰/۰۵$) و روز پنجم (روز تست حافظه، $P<۰/۰۵$) شده است. هم‌چنین، استرس باعث کاهش مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف در تمام روزهای یادگیری (روزهای ۴–۱، $P<۰/۰۵$) و هم‌چنین در روز پنجم (روز تست حافظه، $P<۰/۰۵$) شد. بعلاوه، تست بونفرونی نشان داد که استرس باعث کاهش تعداد خطای حیوان در یافتن اتاقک هدف در روزهای یادگیری (روزهای اول، دوم، و چهارم، $P<۰/۰۵$) و روز پنجم (روز تست حافظه، $P<۰/۰۵$)، می‌گردد (شکل A-C۳).



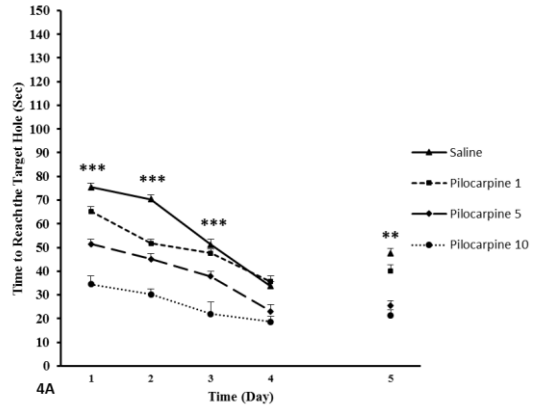
شکل۳. اثر تزریق سالین بر زمان سپری شده (A)، مسافت طی شده (B)، و تعداد خطای انجام شده (C) توسط موش‌های نر. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود موش‌های استرس دیده در روزهای آموزش (یادگیری) و در روز تست (حافظه) زمان کمتر، مسافت کمتر و خطای کمتری را برای یافتن اتاقک هدف انجام دادند. N=8/group، P<0.05* اختلاف نسبت به گروه کنترل است.

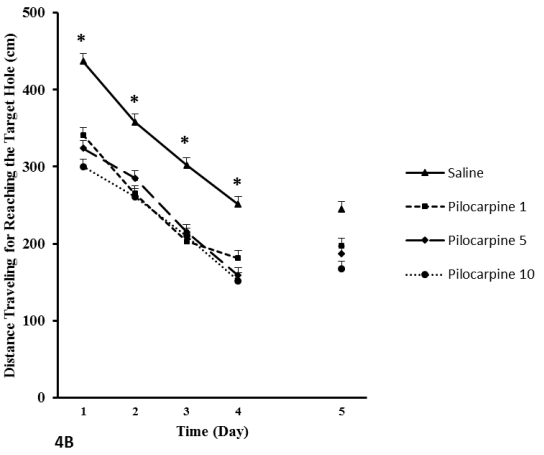
اثر تجویز داخل هیپوکمپ پشتی پیلوکارپین بر حافظه و یادگیری فضایی در موش‌های استرس‌ندیده و استرس‌دیده. بررسی نتایج حاصل از تحلیل آماری آنالیز- واریانس دوطرفه در بخش اول این قسمت از تحقیق نشان داد که یک‌بار تجویز پیلوکارپین در حیوانات استرس‌ندیده باعث بهبود یادگیری و حافظه فضائی شد. این آنالیز نشان داد که تجویز پیلوکارپین توانست زمان رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر پیلوکارپین: $P<0/01$، $F(8و35)=2/81$، اثر سالین: $P<0/1$، $F(1و35)=0/72$، اثر پیلوکارپین×سالین: $P<0/05$، $F(7و35)=2/12$] (شکل A-۴)، مسافت طی‌شده برای رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر پیلوکارپین: $P<0/01$، $F(6و35)=2/1$، اثر سالین: $P<0/05$، $F(1و35)=1/47$، اثر پیلوکارپین×سالین: $P<0/01$، $F(6و35)=3/1$] (شکلB-۴). تعداد خطا در رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر پیلوکارپین: $P<0/01$، $F(7و35)=2/1$، اثر سالین: $P<0/05$، $F(1و35)=1/47$، اثر پیلوکارپین×سالین: $P<0/01$، $F(7و35)=3/1$]، (شکلC-۴) را کاهش دهد.

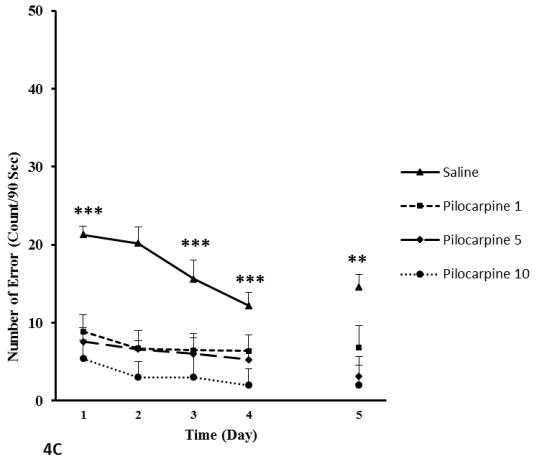
آنالیز متعاقب با استفاده از تست بونفرونی نشان داد که در مورد زمان رسیدن به اتاقک هدف، پیلوکارپین باعث کاهش زمان رسیدن به اتاقک هدف در روزهای اول، دوم و سوم (روزهای یادگیری، $P<0/001$) و روز پنجم (روز تست حافظه، $P<0/01$) شده است. هم‌چنین، پیلوکارپین باعث کاهش مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف در تمام روزهای یادگیری (روزهای ۴-۱، $P<0/05$) شد ولی و هم‌چنین در روز پنجم (روز تست حافظه، $P>0/05$) اثری از خود نشان نداد. بعلاوه، تست بونفرونی نشان داد که پیلوکارپین باعث کاهش تعداد خطای حیوان در یافتن اتاقک هدف در روزهای یادگیری (روزهای اول، دوم، سوم و چهارم، $P<0/001$) و روز پنجم (روز تست حافظه، $P<0/01$)، می‌گردد (شکلC-4A). بین دوزهای مختلف پیلوکارپین در تغییرات ایجاد شده در حافظه و یادگیری فضائی تفاوت آماری وجود نداشت.

بررسی نتایج حاصل از تحلیل آماری آنالیز- واریانس دوطرفه در بخش دوم این قسمت از تحقیق نشان داد که یک‌بار تجویز پیلوکارپین ۵ دقیقه قبل از القاء استرس حاد باعث بهبود تقویت اثر استرس حاد در القاء یادگیری و حافظه فضائی شد. این آنالیز نشان داد که تجویز پیلوکارپین توانست زمان رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر پیلوکارپین: $P<0/05$، $F(6و35)=1/98$، اثر استرس: $P<0/05$، $F(1و35)=1/90$، اثر پیلوکارپین×استرس: $P<0/05$، $F(6و35)=1/88$]، را کاهش دهد، (شکلA-۵). هم‌چنین مسافت طی‌شده برای رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر پیلوکارپین: $P<0/05$، $F(6و35)=1/49$، اثر استرس: $P<0/05$، $F(1و35)=1/56$، اثر پیلوکارپین×استرس: $P<0/05$، $F(6و35)=1/88$]، (شکلB-۵) و تعداد خطا در رسیدن به

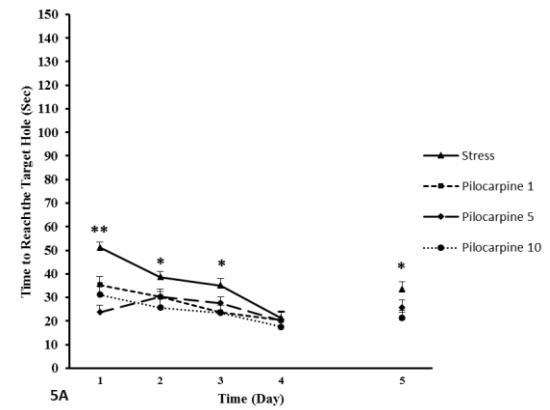
اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر پیلوکارپین: $P<0/2$، $F(۶و۳۵)=۱/۵۴$، اثر استرس: $P<0/05$، $F(۱و۳۵)=۱/۳۹$، اثر پیلوکارپین×استرس: $P<0/05$، $F(۶و۳۵)=۲/۰۴$]، (شکلC–۵) را بهبود ببخشد.

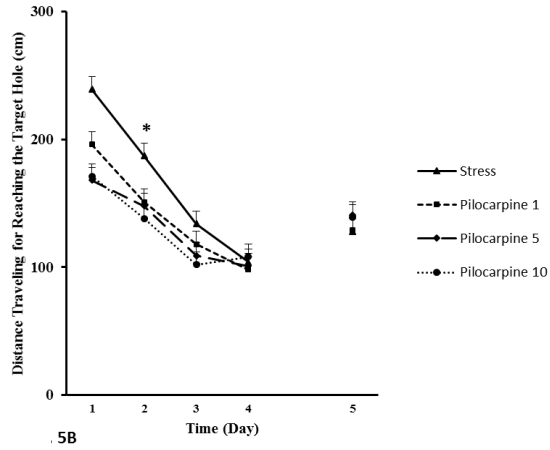


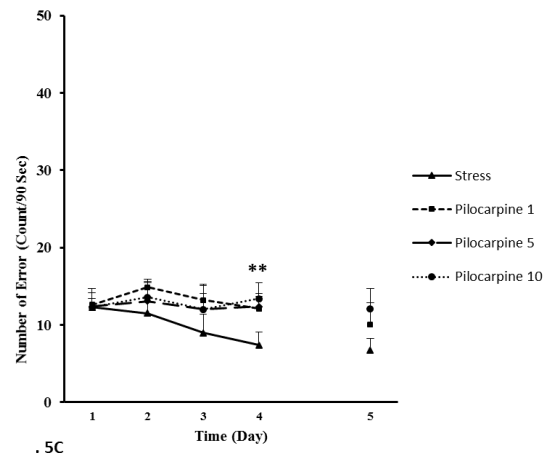




شکل ۴. اثر تجویز پیلوکارپین (µl/Mouse ۱۰و ۵ و ۱) داخل هیپوکمپی بر زمان سپری شده (A)، مسافت طی شده (B)، و تعداد خطای انجام شده (C) توسط موش‌های نر استرس ندیده به منظور یافتن اتاقک هدف. لوکارپین در موش‌های استرس ندیده در روزهای القاء یادگیری و در روز حافظه باعث کاهش زمان سپری شده برای یافتن اتاقک هدف شد که این کاهش زمان وابسته به دوز بود. N=9/group، *P<0.05، **P<0.01 و ***P<0.001 تفاوت نسبت به گروه کنترل است.



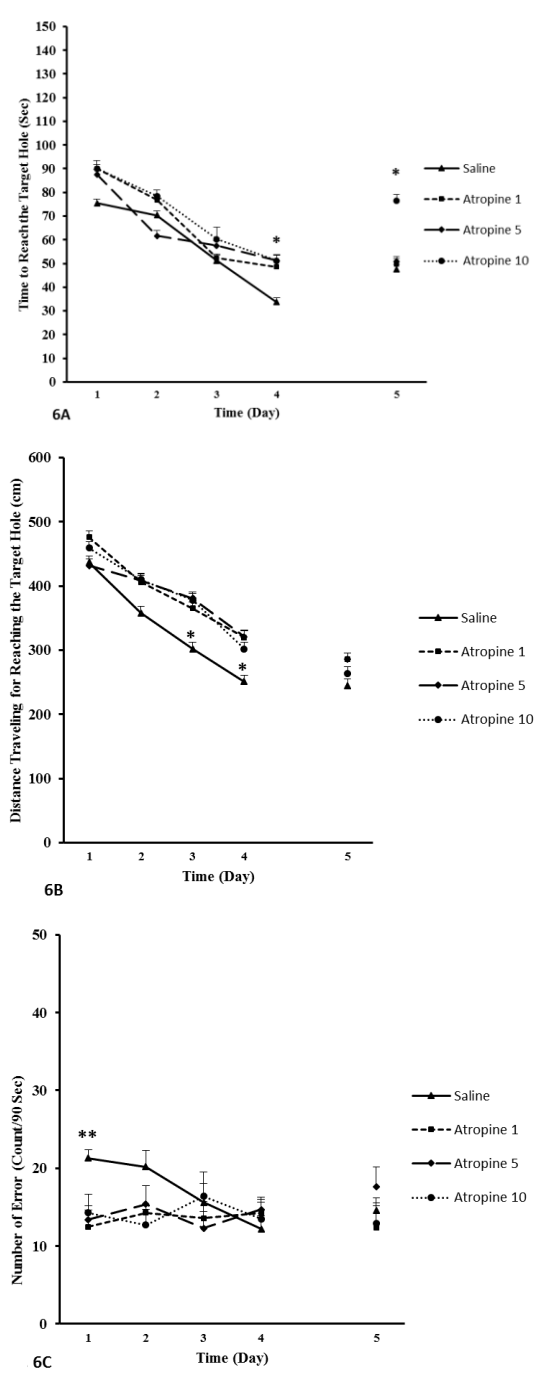




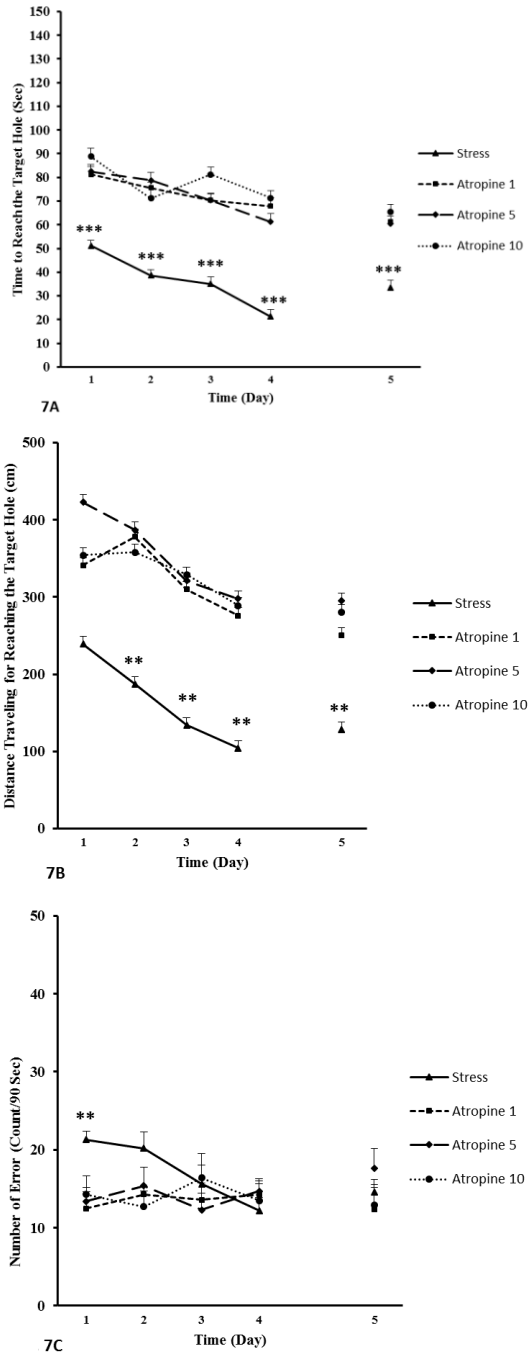
شکل۵. اثر تجویز پیلوکارپین (µl/Mouse ۱۰و ۵ و ۱) داخل هیپوکمپی بر زمان سپری شده (A)، مسافت طی شده (B)، و تعداد خطای انجام شده (C) توسط موش‌های نر استرس دیده به منظور یافتن اتاقک هدف. N=9/group، *P<0.05 و **P<0. 01 تفاوت نسبت به گروه کنترل است.

آنالیز متعاقب با استفاده از تست بونفرونی نشان داد که در مورد زمان رسیدن به اتاقک هدف، پیلوکارپین باعث کاهش زمان رسیدن به اتاقک هدف در روزهای اول، دوم و سوم (روزهای یادگیری، $P<۰/۰۱$ و $P<۰/۰۵$) و روز پنجم (روز تست حافظه، $P<۰/۰۵$) شده است. هم‌چنین، پیلوکارپین فقط در روز سوم باعث کاهش مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف ($P<۰/۰۵$) شد ولی و هم‌چنین در روز پنجم (روز تست حافظه، $P>۰/۰۵$) اثری از خود نشان نداد. بعلاوه، تست بونفرونی نشان داد که پیلوکارپین باعث کاهش تعداد خطای حیوان در یافتن اتاقک هدف فقط در روز سوم یادگیری ($P<۰/۰۱$) شد و بر حافظه فضائی (روز تست حافظه، $P>۰/۰۵$) اثر چندانی نداشت (شکل۵A-C). لازم به توضیح است که اثر پیلوکارپین وابسته به دوز نبود.

اثر تجویز داخل هیپوکمپ آتروپین بر حافظه و یادگیری فضایی در موش‌های استرس‌دیده و استرس‌ندیده. بررسی نتایج حاصل از تحلیل آماری آنالیز- واریانس دوطرفه در بخش اول این قسمت از تحقیق نشان داد که یک‌بار تجویز آتروپین در حیوانات استرس‌ندیده باعث کاهش یادگیری و حافظه فضائی شد. این آنالیز نشان داد که تجویز آتروپین توانست زمان رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر آتروپین: $P<۰/۰۵$، F (۸و۳۵)=۱/۸۳۱، اثر سالین: $P<۰/۵$، F (۱و۳۵)=۰/۸۶، اثر آتروپین×سالین: $P<۰/۱$، F (۸و۳۵)=۱/۴۳]، (شکلA-۶)، مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر آتروپین: $P<۰/۱$، F (۸و۳۵)=۱/۲۱، اثر سالین: $P<۰/۱$، F (۱و۳۵)=۱/۳۲، اثر آتروپین×سالین: $P<۰/۱$، F (۸و۳۵)=۱/۱ F]، (شکلB-۶)، و تعداد خطا در رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر آتروپین: $P<۰/۱$، F (۸و۳۵)=۱/۵۱، اثر سالین: $P<۰/۵$، F (۱و۳۵)=۱/۳۳، اثر آتروپین×سالین: $P<۰/۱$، F (۸و۳۵)=۰/۹۹]، (شکلC-۶) را افزایش دهد. آنالیز متعاقب با استفاده از تست بونفرونی نشان داد که در مورد زمان رسیدن به اتاقک هدف، آتروپین باعث افزایش زمان رسیدن به اتاقک هدف در روز چهارم ($P<۰/۰۵$) و روز پنجم (روز تست حافظه، $P<۰/۰۵$) شده است. هم‌چنین، آتروپین در روزهای سوم و چهارم باعث افزایش مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف ($P<۰/۰۵$) شد ولی و در روز پنجم (روز تست حافظه، $P>۰/۰۵$) اثری از خود نشان نداد. بعلاوه، تست بونفرونی نشان داد که آتروپین باعث افزایش تعداد خطای حیوان در یافتن اتاقک هدف فقط در روز اول یادگیری ($P<۰/۰۱$) شد و بر حافظه فضائی (روز تست حافظه، $P>۰/۰۵$) اثر چندانی نداشت (شکل ۶A-C). لازم به توضیح است که اثر آتروپین نیز وابسته به دوز نبود.



شکل۶. اثر تجویز آتروپین (µl/Mouse ۱۰و ۵ و ۱) داخل هیپوکمپی بر زمان سپری شده (A)، مسافت طی شده (B)، و تعداد خطای انجام شده (C) توسط موش‌های نر استرس ندیده. N=10/group، *P<0.05، **P<0. 01 تفاوت نسبت به گروه کنترل است.



شکل۷. اثر تجویز آتروپین (µl/Mouse ۱۰و ۵ و ۱) داخل هیپوکمپی بر زمان سپری شده (A)، مسافت طی شده (B)، و تعداد خطای انجام شده (C) توسط موش‌های نر استرس دیده. N=10/group، *P<0.05، **P<0. 01 تفاوت نسبت به گروه کنترل است.

بررسی نتایج حاصل از تحلیل آماری آنالیز- واریانس دوطرفه در بخش دوم این قسمت از تحقیق نشان داد که یک‌بار تجویز آتروپین ۵ دقیقه قبل از القاء استرس حاد باعث تخریب تقویت اثر استرس حاد در القاء یادگیری و حافظه فضائی شد. این آنالیز نشان داد که تجویز آتروپین به داخل هیپوکمپ پشتی ۵ دقیقه قبل از القاء استرس حاد توانست زمان رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر آتروپین: $P<0/01$، $F(8و35)=3/81$، اثر استرس: $P<0/05$، $F(1و35)=2/33$، اثر آتروپین×استرس: $P<0/01$، $F(8و35)=4/01$]، (شکل۷-A)، مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر آتروپین: $P<0/01$، $F(8و35)=3/71$، اثر استرس: $P<0/05$، $F(1و35)=2/11$، اثر آتروپین×استرس: $P<0/01$، $F(8و35)=3/34$]، (شکل۷-B)، و تعداد خطا در رسیدن به اتاقک هدف [آنالیز واریانس دو طرفه، مقایسه بین گروه‌ها: اثر آتروپین: $P<0/01$، $F(3و35)=3/69$، اثر استرس: $P<0/05$، $F(1و35)=2/11$، اثر آتروپین×استرس: $P<0/01$، $F(8و35)=3/28$]، (شکل۷-C) را افزایش داده و اثر استرس حاد را از مهار کند. آنالیز متعاقب با استفاده از تست بونفرونی نشان داد که در مورد زمان رسیدن به اتاقک هدف، آتروپین باعث افزایش زمان رسیدن به اتاقک هدف در تمام روزهای آموزش (روزهای اول تا چهارم یادگیری، $P<0/001$) و روز پنجم (روز تست حافظه، $P<0/001$) شده است. هم‌چنین، آتروپین در روزهای دوم، سوم و چهارم باعث افزایش مسافت طی شده برای رسیدن به اتاقک هدف ($P<0/01$) شد. در روز پنجم (روز تست حافظه، $P<0/01$) باعث کاهش اثر استرس حاد شد. بعلاوه، تست بونفرونی نشان داد که آتروپین باعث افزایش تعداد خطای حیوان در یافتن اتاقک هدف فقط در روز اول یادگیری ($P<0/01$) شد و بر حافظه فضائی (روز تست حافظه، $P>0/05$) اثر چندانی نداشت (شکل ۷A-C). لازم به توضیح است که اثر آتروپین نیز وابسته به دوز نبود.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق، نقش گیرنده‌های موسکارینی سیستم کولینرژیک در تقویت حافظه فضائی پس از استرس حاد شوک الکتریکی ملایم کف پا در موش‌های کوچک آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به متد کارشده (استرس شوک الکتریکی کف پا و استفاده از ماز بارنز برای بررسی حافظه و یادگیری فضایی) سابقه قبلی برای انجام این کار موجود نیست. نتایج ما نشان داد که استرس حاد شوک الکتریکی ملایم کف پا وقتی که به‌صورت غیر قابل اجتناب القاء شود می‌تواند یادگیری و حافظه فضائی در موش‌های کوچک را به نحو چشم‌گیری تسهیل کند. باید توجه داشت در این کار ما از ماز بارنز که به نوعی مدل خشک (بدون استرس شنای) ماز آبی موریس است استفاده کردیم. در تحقیقات قبلی مشخص شده که این نوع ماز برای بررسی‌های اثر استرس بر یادگیری و حافظه فضائی بهتر از ماز آبی موریس و ماز Y است، چرا که در دو نوع متد گفته

شده استرس شنا یا استرس گرسنگی و تشنگی به استرس یافتن مسیر اضافه شده و در اثر استرس قبلی تداخل خواهد کرد [۲۵].

از سوی دیگر، هر چند تجویز پیلوکارپین به عنوان آگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین توانست به تنهایی و در موش‌های استرس‌ندیده باعث بهبود حافظه و یادگیری فضائی شود، اما اثر استرس را به مقدار بسیار کم تقویت کرد. در عین حال، تجویز آتروپین به تنهائی اثربخشی زیادی را از خود نشان نداد اما اثر استرس را مهار کرد. با توجه به این یافته‌ها به نظر می‌رسد که اثرات این داروها در حیوانات استرس‌دیده تداخل زیادی با اثر استرس نداشته است و به همین دلیل ممکن است اثر استرس حاد در القاء تسهیل در حافظه و یادگیری فضائی ارتباط زیادی با سیستم موسکارینی کولینرژیک موجود در هیپوکمپ پشتی نداشته باشد.

در تحقیقات گذشته ثابت شده است که در هنگام استرس حاد، غلظت گلوکوکورتیکوئیدها در پلاسما و به دنبال آن در مغز و به‌خصوص در هیپوکمپ افزایش می‌یابد [۲۹،۲]. گلوکوکورتیکوئیدها به سرعت به گیرنده‌های خود در غشاء نورون‌های هیپوکمپ متصل‌شده و فعالیت‌های غیر ژنتیکی خود را افزایش می‌دهند [۳۰-۳۲]. به همین دلیل تحقیقات در اسلایس هیپوکمپ موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نشان داده است که تجویز کورتیکوسترون در این اسلایس‌ها باعث افزایش تقویت طولانی‌مدت (LTP) شده و این اثر در اسلایس هیپوکمپ موش‌هایی که تحت استرس حاد قرار داشته‌اند نیز وجود داشته است [۳۳]. باید توجه داشت که اثر استرس حاد در اغلب کارهای تحقیقاتی بر یادگیری و حافظه هیجانی متمرکز بوده است [۳۴-۳۶] و به همین دلیل اکثر تحقیقات قبلی بر نقش گلوکوکورتیکوئیدها در آمیگدال به‌خصوص بخش قاعده‌ای-جانبی آن متمرکز بوده است [۳۷-۴۲]. این امر می‌تواند باعث ایجاد دوگانگی ذهنی شود، چرا که استرس حاد و یا تجویز حاد کورتیکوسترون موجب خاموشی حافظه هیجانی (ترس) در موش‌ها می‌شود [۳۴] در حالی‌که تحقیق ما نشان داد که استرس حاد می‌تواند باعث بروز تقویت حافظه فضائی شود. به همین دلیل، به نظر می‌رسد که نوع استرس، زمان القاء استرس و نوع حافظه و یادگیری مطالعه شده همگی می‌توانند در این تفاوت‌ها دخالت داشته باشند. از سوی دیگر، تحقیقات قبلی بیش‌تر بر استرس مزمن تمرکز داشته‌اند که باعث تخریب حافظه و یادگیری فضائی در موش‌ها و آدم‌ها می‌شود [۴۳،۶-۴۵]. تحقیقات در مورد استرس حاد نیز در اکثر موارد بر اثرات تخریبی استرس حاد بر حافظه و یادگیری تمرکز دارد [۳۴]. محققان دریافته‌اند که اثر تخریبی یا سازنده استرس حاد وابسته به روش آزمایش دارد و این‌که در کدام مرحله از یادگیری استرس القاء شده است [۳۳]. در تحقیق ما استرس قبل از انجام تست حافظه و یادگیری در حیوانات القاء شده و نشان داد که در این مرحله باعث تقویت حافظه و یادگیری فضائی در مدل ماز بارنز می‌شود. حتماً بررسی اثر استرس حاد در روزهای مختلف آموزش (یادگیری) و یا در روز تست (حافظه) ممکن است اثرات دیگری را از خود نشان دهد که بایستی در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین، ما در این تحقیق از شوک الکتریک ملایم کف پا استفاده کردیم و ممکن است استفاده از روش‌های دیگری مانند استرس بی‌حرکتی و یا استرس آویزان کردن حیوان و یا استرس بوی حیوان شکارچی اثرات دیگری را نشان بدهد.

تحقیق ما نشان داد که حیوانات استرس‌دیده نسبت به حیوانات نرمال در زمان کم‌تری با طی مسافت کم‌تر و با تعداد خطاهای کم‌تری به اتاقک هدف رسیدند. این سه معیار، به عنوان معیارهای اصلی در بررسی حافظه و یادگیری فضائی در ماز بارنز محسوب می‌شوند [۴۶] کاهش هر سه معیار در حیوانات نشان‌دهنده اثر مثبت استرس حاد شوک الکتریکی کف پا پیش از شروع آزمایش‌ها بر بهبود حافظه و یادگیری فضائی می‌باشد. تحقیقات مشابه نشان دادند که استرس حاد می‌تواند زمان رسیدن به سکوی پنهان در روش ماز آبی موریس را هم کاهش داده و مدت زمان سپری شده توسط حیوان در ربع واجد سکوی پنهان در ماز آبی موریس را افزایش دهد [۴۷]. هم‌چنین در مدل ماز Y که نوع دیگری از روش‌های بررسی حافظه فضایی است، استرس حاد بی‌حرکتی می‌تواند موجب بهبود حافظه در موش بزرگ آزمایشگاهی ماده شود [۴۸] در حالی‌که حافظه فضائی را در موش‌های نر کاهش می‌دهد. البته در بررسی استرس‌های مزمن (۲۱ روز بی‌حرکتی دو نوبت در روز، هر نوبت ۶ ساعت) کاهش حافظه و یادگیری هم در مازبانز و هم در ماز آبی موریس در موش‌های آزمایشگاهی کوچک و موش صحرایی گزارش شده است [۵۰،۴۹]. نتیجه تحقیقات دیگر هم نشان داده است که استرس مزمن توانسته باعث تخریب گسترده هیپوکمپ (به‌خصوص ناحیه CA3) شود که محققان کاهش توان حافظه فضایی را با این تخریب مرتبط می‌دانند [۱۴]. از طرفی، تحقیقات نشان داده است که پس از القا استرس غلظت گلوکوکورتیکوییدهای پلاسما به شدت افزایش می‌یابد که این مسأله به دنبال فعالیت محور HPA می‌باشد [۵۱]. این افزایش گلوکوکورتیکوییدهای پلاسما، به دلیل آن‌که این هورمون‌ها به راحتی از سد خونی—مغزی عبور می‌کنند، باعث افزایش غلظت این هورمون‌ها در مغز می‌شود. تحقیقات McEwen و همکارانش نشان داده است که یکی از اصلی‌ترین مکان‌های اثر گلوکوکورتیکوییدها در مغز، هیپوکمپ است و نورون‌های

موجود در هیپوکمپ (به‌خصوص نورون‌های پیرامیدی موجود در نواحی CA1 و CA3) واجد گیرنده‌های نوع ۱ (مینرالو کورتیکوییدی) و نوع ۲ (گلوکوکورتیکوییدی) می‌باشند [۲۹]. این هورمون‌ها با اثر بر گیرنده‌های خود روندهای ژنومیک را در این سلول‌ها باعث می‌شوند. اما هم‌چنین نشان داده شده که گیرنده‌های مینراکورتیکوییدی به تعداد زیاد در سطح غشا سلولی این نورون‌ها وجود دارند که با ساز و کارهای مولکولی درون سلولی با گیرنده‌های گلوتاماتی AMPA و NMDA ارتباط داشته و هنگام تحریک آن‌ها باعث جابه‌جایی گیرنده‌های گلوتاماتی به سطح غشا می‌گردند [۳۱]. این جابه‌جایی به معنای افزایش توان سلول برای ایجاد سازوکارهای مرتبط با حافظه است. به همین دلیل نورون‌های موجود در هیپوکمپ در هنگام فعالیت گیرنده‌های مینرالوکورتیکوییدی توانمندی بیش‌تری در القا حافظه و یادگیری از خود نشان می‌دهند. از آن‌جا که تمایل گیرنده‌های مینرالوکورتیکوییدی به گلوکوکورتیکوییدهای ترشح شده از غده فوق کلیه بسیار بیش‌تر از تمایل گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی است، هنگام افزایش ترشح این هورمون‌ها ابتدا گیرنده‌های مینرالوکورتیکوییدی تحریک شده و به همین دلیل در استرس حاد احتمال القا تقویت سیناپسی در هیپوکمپ افزایش یافته و توان حافظه و یادگیری افزایش می‌یابد. نتایج به‌دست آمده از تحقیق هم ممکن است به دلیل همین مکانیسم‌ها باشد [۵۱].

از طرف دیگر، تحقیقات قبلی نشان داد که گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین هم در القاء حافظه و یادگیری فضائی دخالت دارند [۵۲،۱۸]. اما چون برهمکنش احتمالی استرس حاد و سیستم موسکارینی کولینرژیک در القاء حافظه و یادگیری فضائی چندان مطالعه نشده بود، بررسی اثر گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین در عملکرد استرس حاد برای افزایش توان حافظه فضائی مورد توجه ما قرار گرفت.

در یک جمع‌بندی، تحقیق ما نشان داد که تجویز داخل هیپوکمپ پشتی آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی استیل‌کولین باعث تقویت و مهار اثر استرس حاد در تسهیل حافظه و یادگیری فضائی در موش‌های کوچک نر شد. این اثر نشان‌دهنده تداخل بین این گیرنده‌ها و مکانیسم‌های تحریک‌شده در حین استرس حاد در هیپوکمپ پشتی برای تسهیل حافظه و یادگیری فضائی است. از آن‌جا که تاکنون در مورد تداخل سیستم‌های نوروترانسمیتری در کار استرس حاد در هیپوکمپ پشتی تحقیق زیادی انجام نشده است، افق پیش رو برای فهم مکانیسم اثر استرس حاد در هیپوکمپ پشتی و سازوکار تاثیر گیرنده‌های موسکارینیک استیل‌کولین در تحقیقات بعدی آن است که با استفاده از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های اختصاصی این گیرنده‌ها بتوانیم از مکانیسم‌ها و جزئیات اثر استرس در هیپوکمپ پشتی اطلاعات بیش‌تری را کسب کنیم.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقه الله انجام شده است.

مشارکت و نقش نویسندگان

فاطمه تهرانی: جمع آوری داده ها، مریم بنانج: آنالیز و تفسیر نتایج و نوشتن نسخه اولیه مقاله، هدایت صحرایی: ایده و طراحی مطالعه و آنالیز و تفسیر نتایج و نوشتن نسخه اولیه مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

[1] McEwen BS. The good side of "stress". Stress 2019; 22: 524-525. https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1631794 PMid:31237468

[2] McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol Rev 2007; 87: 873-904. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006 PMid:17615391

[3] Tafet, GE, Bernardini R. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2003; 27: 893-903. https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00162-3

[4] McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. Neuropharmacology 2012; 62: 3-12. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.014 PMid:21807003 PMCid:PMC3196296

[5] McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. Curr Opin Neurobiol 1995; 5: 205-216. https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80028-X

[6] McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. Neuropsychopharmacology 2016; 41: 3. https://doi.org/10.1038/npp.2015.171 PMid:26076834 PMCid:PMC4677120

[7] McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. Hum Psychopharmacol 2001; 16: S7-S19. https://doi.org/10.1002/hup.266 PMid:12404531

[8] Maggio N, Segal M. Differential modulation of long-term depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus. J Neuroscience 2009; 29: 8633-8638. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1901-09.2009 PMid:19587269 PMCid:PMC6664879

[9] Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 19204-19207. https://doi.org/10.1073/pnas.0507572102 PMid:16361444 PMCid:PMC1323174

https://doi.org/10.1196/annals.1314.047
PMid:15677437

[25] McLay RN, Freeman SM, Zadina JE. Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze. Physiol Behav 1998; 63: 933-993.
https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00529-5

[26] Paxinos G, Franklin KB. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. 2019; Academic press.

[27] Osanloo N, Sarahian N, Zardooz H, Sahraei H, Sahraei M, Sadeghi B. Effects of memantine, an NMDA antagonist, on metabolic syndromes in female NMRI mice. Basic Clin Neurosci 2015; 6: 239.

[28] Maghami S, Zardooz H, Khodagholi F, Binayi F, Ranjbar Saber R, Hedayati M, et al. Maternal separation blunted spatial memory formation independent of peripheral and hippocampal insulin content in young adult male rats. PloS One 2018; 13: e0204731.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204731
PMid:30332425 PMCid:PMC6192583

[29] McEwen BS. Magarinos, Ana Maria Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. Hum Psychopharmacol 2001; 16: S7-S19.
https://doi.org/10.1002/hup.266
PMid:12404531

[30] Nasca C, Zelli D, Bigio B, Piccinin S, Scaccianoce S, Nisticò R, McEwen B. Stress dynamically regulates behavior and glutamatergic gene expression in hippocampus by opening a window of epigenetic plasticity. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112: 14960-14965.
https://doi.org/10.1073/pnas.1516016112
PMid:26627246 PMCid:PMC4672825

[31] Nasca C, Bigio B, Zelli D, Nicoletti F, McEwen BS. Mind the gap: glucocorticoids modulate hippocampal glutamate tone underlying individual differences in stress susceptibility. Mol Psychiatry 2015; 20: 755-763.
https://doi.org/10.1038/mp.2014.96
PMid:25178162 PMCid:PMC4366364

[32] Musazzi L, Racagni G, Popoli M. Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. Neurochem Int 2011; 59: 138-149.
https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.002
PMid:21689704

[33] Conrad CD. The relationship between acute glucocorticoid levels and hippocampal function depends upon task aversiveness and memory processing stage. Nonlinearity Biol Toxicol Med 2005; 3: 57-78.
https://doi.org/10.2201/nonlin.003.01.004
PMid:16601824 PMCid:PMC1431575

[34] Dehbashi F, Alizadeh N, Rashidy Pour A, Vafaei AA. Effects of acute stress and corticosterone on fear memory extinction in mice. Koomesh 2012; 13: 375-382. (Persian).

[35] Mohammad Rezaei R, Pourali-Malabad R, Shiravi A, Rashidy-Pour A, Vafaei AA. Interaction between 5-HT6 receptors and acute stress and corticosterone on fear memory reconsolidation in mice. Koomesh 2020; 22: 185-191. (Persian).
https://doi.org/10.29252/koomesh.22.1.185

[36] Najjar M, Vaezi GH, Rashidy-Pour A, Vafaei AA. Effects of glucocorticoids on memory retrieval and reconsolidation of recent and remote memories in mice. Koomesh 2013; 512-520. (Persian).

[37] Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. Fear memory. Physiol Rev 2016; 96: 695-750.
https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015
PMid:26983799

[38] Kim JJ, Lee HJ, Han JS, Packard MG. Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. J Neurosci 2001; 21: 5222-5228.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-14-05222.2001
PMid:11438597 PMCid:PMC6762855

[39] McIntyre CK, Power AE, Roozendaal B, McGaugh JL. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. Ann N Y Acad Sci 2003; 985: 273-293.
https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07088.x
PMid:12724165

[10] Wong EY, Herbert J. Roles of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the regulation of progenitor proliferation in the adult hippocampus. Eur J Neurosci 2005; 22: 785-792.
https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04277.x
PMid:16115202 PMCid:PMC1592225

[11] Lopez J, Gamache K, Schneider R, Nader K. Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. J Neurosci 2015; 35: 2465-2475.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015
PMid:25673841 PMCid:PMC6605616

[12] Gulyaeva NV. Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage. Neurochem Res 2019; 44: 1306-1322.
https://doi.org/10.1007/s11064-018-2662-0
PMid:30357653

[13] Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? Neuron 2010; 65: 7-19.
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031
PMid:20152109 PMCid:PMC2822727

[14] McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. Annu Rev Neurosci 1999; 22: 105-122.
https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.105
PMid:10202533

[15] Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. Nat Rev Neurosci 2009; 10: 423-433.
https://doi.org/10.1038/nrn2651
PMid:19469026

[16] Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. Brain Res Rev 2003; 41: 268-287.
https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00268-0

[17] Brito GN, Davis BJ, Stopp LC, Stanton ME. Memory and the septo-hippocampal cholinergic system in the rat. Psychopharmacology 1983; 81: 315-320.
https://doi.org/10.1007/BF00427569
PMid:6419260

[18] Blake MG, Krawczyk MC, Baratti CM, Boccia MM. Neuropharmacology of memory consolidation and reconsolidation: Insights on central cholinergic mechanisms. J Physiol Paris 2014; 108: 286-291.
https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.005
PMid:24819880

[19] Karimi A, Khajehpour L, Kesmati M. Role of the cholinergic muscarinic receptors of the CA1 area in the memory impairment induced by iron oxide nanoparticle in adult male rats. Nanomed J 2019; 6: 301-310.

[20] Herrera-Morales W, Mar I, Serrano B, Bermúdez-Rattoni F. Activation of hippocampal postsynaptic muscarinic receptors is involved in long-term spatial memory formation. Eur J Neurosci 2007; 25: 1581-1588.
https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05391.x
PMid:17355252

[21] Riekkinen M, Riekkinen Jr P. Dorsal hippocampal muscarinic acetylcholine and NMDA receptors disrupt water maze navigation. Neuroreport 1997; 8: 645-648.
https://doi.org/10.1097/00001756-199702100-00013
PMid:9106739

[22] Tinsley MR, Quinn JJ, Fanselow MS. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance. Learn Mem 2004; 11: 35-42.
https://doi.org/10.1101/lm.70204
PMid:14747515

[23] Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Nat Rev Neurosci 2002; 3: 453.
https://doi.org/10.1038/nrn849
PMid:12042880

[24] Dawood MY, Lumley LA, Robison CL, Saviolakis GA, Meyerhoff JL. Accelerated Barnes maze test in mice for assessment of stress effects on memory. Ann N Y Acad Sci 2004; 1032: 304-307.

[40] Paré D. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. Prog Neurobiol 2003; 70: 409-420. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00104-7

[41] Roozendaal B, Griffith QK, Buranday J, De Quervain DJ, McGaugh JL. The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 1328-1333. https://doi.org/10.1073/pnas.0337480100 PMid:12538851 PMCid:PMC298772

[42] Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. Nat Rev Neurosci 2009; 10: 423. https://doi.org/10.1038/nrn2651 PMid:19469026

[43] de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? Trends Neurosci 1999; 22: 422-426. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01438-1

[44] Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nat Rev Neurosci 2009; 10: 434. https://doi.org/10.1038/nrn2639 PMid:19401723

[45] McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. N Engl J Med 1998; 338: 171-179. https://doi.org/10.1056/NEJM199801153380307 PMid:9428819

[46] Gawel K, Gibula E, Marszalek-Grabska M, Filarowska J, Kotlinska JH. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents-methodological consideration. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2019; 392: 1-18. https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-y PMid:30470917 PMCid:PMC6311199

[47] Vafaei AA, Rashidy-Pour A. Modulation of spatial memory by amygdala's glucocorticoid receptors. Koomesh 2002; 3: 167-173. (Persian).

[48] Conrad CD, Jackson JL, Wieczorek L, Baran SE, Harman JS, Wright RL, Korol DL. Acute stress impairs spatial memory in male but not female rats: influence of estrous cycle. Pharmacol Biochem Behav 2004; 78: 569-579. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.025 PMid:15251266

[49] Schwabe L, Joëls M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS. Stress effects on memory: an update and integration. Neurosci Biobehav Rev 2012; 36: 1740-1749. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002 PMid:21771612

[50] Sandi C, Pinelo-Nava MT. Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. Neural Plast 2007; 2007. https://doi.org/10.1155/2007/78970 PMid:18060012 PMCid:PMC1950232

[51] Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. Eur J Pharmacol 2003; 463: 235-272. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01285-8

Koomesh -Volume 23, Issue 6 (November and December 2021), 821-833

Involvement of muscarinic system of the dorsal hippocampus on acute stress-induced spatial learning and memory enhancement in male mice

Fatemeh Tehrani Farzin (M.Sc)[1], Maryam Bananej (Ph.D)[1], Hedayat Sahraei (Ph.D)[*2]
1 – Dept. of Biology, School of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
2 - Neuroscience Research Center, Baqyiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21-87554490 hsahraei1343@gmail.com
Received: 16 Aug 2020 ; Accepted: 11 May 2021

Introduction: The effects of stimulation and inhibition of muscarinic acetylcholine receptors in the dorsal hippocampus on spatial learning and memory in male NMRI mice after acute stress were investigated.

Materials and Methods: Animals were divided into two subsets of stress and non-stress. Each subset consisted of: saline, atropine (a muscarinic acetylcholine receptor antagonist) (1, 5, and 10 µg/mouse), and pilocarpine (a muscarinic acetylcholine receptor agonist) (1, 5, and 10 µg / mouse) groups. In the stress subset, the animals received an electro foot shock 5 minutes before each drug or saline injections. One day after drug injection with or without stress (respectively), the animals' spatial learning and memory were tested in the Barnes maze. In this study, the time and distance traveled to reach the target chamber, and the number of errors in reaching the target chamber were studied as variables of spatial learning and memory.

Results: The time of arrival and the distance traveled to reach the target hole was reduced in the stress group. The number of errors in these animals was also lower. Atropine (1, 5, and 10 µg / mouse) inhibited the improving effect of acute stress on spatial memory, but pilocarpine (1, 5, and 10 µg / mouse) improved the stress effect. Atropine (1, 5 and 10 µg/mice) in non-stressed animals only had memory impacts in the first and second days, but pilocarpine (1, 5 and 10 µ/ mice) in non-stressed animals improved the spatial memory.

Conclusion: Acute stress enhanced spatial learning and memory in mice. Considering the effectiveness of atropine and pilocarpine in inhibiting or enhancing the effects of stress (respectively), it seems that the effect of acute stress on improving spatial learning and memory, at least in part, might be mediated through the activation of cholinergic muscarinic in the dorsal hippocampus.

Keywords: Atropine, Brain Fornix, Hippocampus, Pilocarpine, Spatial Memory, Spatial Learning, Stress