مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره ۴، فروردین ۱۳۹۴، صفحه ۴۳-۳۶

اختلال یادگیری و حافظه ناشی از تزریق داخل هیپوکمپی اسیداسکوربیک و اسکوربات اکسیداز در مدل ماز آبی موریس

شعله جمالی (MSc)[۱]، مهدی عباس نژاد (PhD) *[۲]، سعید اسماعیلی ماهانی (PhD)[۲]، ارسطو بدویی دلفارد (PhD)[۲]، راضیه کوشکی (MSc)[۱]

۱-انجمن پژوهشگران جوان، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان

دریافت: ۹۳/۷/۱۱، اصلاح:۹۳/۹/۱۵ ، پذیرش:۹۳/۱۱/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: اسید اسکوربیک دارای طیف وسیعی از عملکرد ها در سیستم عصبی مرکزی از جمله نورومودیولاتور و آنتی اکسیدانی می باشد. آسکوربیک اسید با نوروترانسمیترهای دخیل در یادگیری و حافظه مداخله دارد. در این مطالعه اثر تزریق آن وآنزیم حذف کننده اش در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه فضایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی از ۴۹ سر موش صحرایی نژاد ویستار (۲۲۰-۲۷۰ mg/kg)در قالب هفت گروه شامل: کنترل، شاهد (دریافت کننده حلال داروها)، اسکوربات اکسیداز (۰/۲, ۰/۴µg/kg)، اسید اسکوربیک(۱۲،۲۴ µg/kg) و اسکوربات اکسیداز غیرفعال(۰/۲ µg/kg) استفاده شد. کانول گذاری دو طرفه در ناحیهCA1 هیپوکمپ با استفاده از دستگاه استریوتکسی انجام شد. بعد از یک هفته دوره ریکاوری تزریق داروها با حجم یک میکرولیتر با سرنگ همیلتون صورت گرفت. حافظه و یادگیری فضایی با استفاده از ماز آبی موریس اندازه گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد اسید اسکوربیک در دوز ۱۲ µg/kg مسافت طی شده(۶۳/۵۵±۱۰۱۲/۹۸) و زمان (۲/۳۸±۵۵/۴۸) رسیدن به سکو پنهان را در مقایسه با کنترل (۱۸/۴۶±۶۳۳/۳۳) (۱/۸۴±۴۵/۹) افزایش می دهد (p<۰/۰۵). همچنین مسافت طی شده(۱۰۸/۸۹±۱۱۲۳/۷۳) و تاخیر رسیدن به سکو پنهان (۱/۱۸±۵۷/۳۱) با دوز ۲۴ µg/kg اسید اسکوربیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (p<۰۱/۰). مشخص شد اسکوربات اکسیداز در هر دو دوز ۰/۲ µg/kg (p<۰۱/۰) و ۰/۴ µg/kg (p<۰۰۱/۰) مسافت و زمان رسیدن به سکو را نسبت به گروه کنترل افزایش می دهد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تزریق اسید اسکوربیک و آنزیم حذف کننده آن در ناحیه CA1 هیپوکمپ هر دو منجر به کاهش یادگیری و حافظه فضایی می گردد.

واژه‌های کلیدی: یادگیری و حافظه فضایی، ماز آبی موریس، آسکوربات اکسیداز، اسید اسکوربیک، هیپوکمپ.

مقدمه

اسید اسکوربیک علاوه بر نقش آنتی اکسیدان به عنوان کوفاکتور در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی عمل می کند و در سال‌های اخیر به عنوان نورومدلاتور نیز در سیستم عصبی مرکزی معرفی شده است (۳-۱). این ویتامین در مغز پستانداران بیش از هر بافت دیگری تجمع یافته است اما در مغز پستانداران سنتز نمی شود. این ترکیب بواسطه مکانیسم انتقال فعال و انتشار در شبکه کوروئید جذب و توسط SVCT2 که در سلول های نوروایی تلیال شبکه کوروئید حضور دارد به مغز و نورون ها انتقال می یابد، این سیستم انتقالی فعال و اشباع پذیر در شبکه کوروئید اجازه می دهد اسکوربات توسط یک مکانیسم دو مرحله ای از پلاسما به مایع مغزی-نخاعی و سپس به نورون ها انتقال یابد (۴). در مغز اسید اسکوربیک با تراکم بالا در جسم مخطط، هیپوتالاموس، عقده‌های قاعده‌ای و هیپوکمپ یافت می‌شود(۵). تجمع اسید اسکوربیک در نواحی مرتبط با حافظه و یادگیری مغز نقش نورومدولاتور مذکور بر روند حافظه و یادگیری را حائز اهمیت می‌سازد. در مغز این ویتامین از انتهای نورون‌های گلوتامینرژیک آزاد شده و فعالیت دو سیستم گلوتامینرژیک و دوپامینرژیک که میانجی های عصبی مهم در فرآیند حافظه و یادگیری می باشند را تا حدود زیادی تنظیم می کند (۶). تاکنون در چندین مطالعه نقش اسید اسکوربیک بر روند حافظه و یادگیری مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱-۷). برای مثال مشخص شده تزریق درون صفاقی میان مدت اسیدآسکوربیک یادگیری فضایی موش‌ها در ماز شعاعی را کاهش داده و البته دوز بالاتر اسیدآسکوربیک تاثیر بیشتری در کاهش یادگیری داشته است (۸). همین طور نشان داده شد که تجویز طولانی مدت و دهانی اسیدآسکوربیک به موش های مسن تر بر خلاف تزریق کوتاه مدت درون صفاقی به موش های جوان نه تنها حافظه و یادگیری فضایی مختل نمی‌شود، بلکه حافظه کاری را نیز تا حدودی بهبود می بخشد(۹). همچنین گزارش شده آسکوربات (۱ gr/kg i.p.) به طور معنی داری سطح یادگیری اجتنابی را در جعبه شاتل کاهش می‌دهد.

این مقاله حاصل پایان نامه شعله جمالی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری و طرح تحقیقاتی به شماره ۳۱۶/۷۱/۴۴۲ دانشگاه شهید باهنر کرمان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر مهدی عباس نژاد
آدرس: کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن: ۳۲۲۲۰۳۲-۰۳۴۱
E-mail: mabbas@mail.uk.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.4.5.8]
[DOI: 10.22088/jbums.17.4.36]

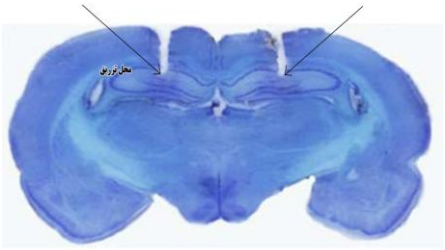
سیستم دوپامینی در موش های صحرایی در جسم مخطط نقش مهمی در رفتارهای اجتنابی فعال بازی می‌کند که تزریق داخل صفاقی اسیدآسکوربیک فعالیت مخالف آن را موجب می شود (۱۵). همچنین مشخص شده تزریق دو دوز ۸ و ۴ میکرولیتر اسید اسکوربیک به درون ناحیه تگمنتوم شکمی (Tegmental Ventral Area=VTA) موش‌های صحرایی به ترتیب باعث افزایش و کاهش میزان یادگیری فضایی در ماز هشت پر شعاعی گردید(۸). در مطالعه دیگر گزارش شده تزریق درون بطن‌های مغزی اسید اسکوربیک منجر به کاهش یادگیری فضایی موش های صحرایی در ماز آبی موریس می‌گردد(۱۰).

در همین راستا گزارش شده اثرات مثبت تزریق اگونیست گیرنده D_2 دوپامینی در هیپوکمپ بر روند حافظه و یادگیری با تزریق توام اسید اسکوربیک و اگونیست گیرنده D_2 کاهش می‌یابد (۱۱). ناحیه CA1 هیپوکمپ مهمترین ناحیه درگیر در یادگیری و حافظه فضایی و نیز یکی از نواحی مغزی رهایش اسیدآسکوربیک می باشد بنابراین مکان مناسبی جهت بررسی نقش نورومدولاتوری اسیدآسکوربیک بر ساختارهای عصبی دخیل در حافظه و یادگیری می باشد. با توجه به تراکم بالای اسید اسکوربیک در مغز و تاثیر پذیری نوروترانسمیترهای درگیر در حافظه و یادگیری و اسید اسکوربیک از یکدیگر و همچنین با توجه به تناقض در نتایج بررسی های صورت گرفته در این زمینه، در پژوهش حاضر با تزریق اسید اسکوربیک در ناحیه CA1 جهت افزایش سطح این نورومدولاتور و اسکوربات اکسیداز (Ascorbate oxidase) تخریب کننده و کاهش دهنده اسیداسکوربیک به مقایسه اثر تزریق اسید اسکوربیک و آنزیم حذف کننده آن با تاکید بر اندازه گیری غلظت در محل بر یادگیری و حافظه فضایی در موش های صحرایی نر بالغ پرداخته شد.

مواد و روشها

در این تحقیق تعداد ۴۹ سر موش صحرایی نر نژاد wistar با وزن ۲۷۰-۲۲۰ گرم با دامنه سنی ۱۰-۸ هفته مورد استفاده قرار گرفتند. موش ها تحت سیکل ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی در شرایط دمایی کنترل شده (۲±۲۱) سانتیگراد نگهداری شدند و به جزء در حین آزمایش آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. به منظور تزریق داخل ناحیه CA1 هیپوکمپ جراحی استریوتکسی با استفاده از دستگاه استریوتکس (استولتینگ آمریکا) انجام شد. قبل از انجام مراحل جراحی حیوان با مخلوطی از کتامین ۱۰ درصد و زایلازین ۲ درصد به صورت تزریق داخل صفاقی (به ازای هر کیلوگرم وزن موش ۶۰ میلی گرم کتامین و ۴ میلی گرم زایلازین) بیهوش شد.

پس از مرحله بیهوشی و ثابت کردن موش در دستگاه استریوتاکسی، میله دهانی۳/۳ میلی متر زیر صفر افقی قرار گرفت تا مطابق اطلس، وضعیت صاف جمجمه حاصل شود. بعد از حذف بافت های سطحی و مشخص شدن نواحی برگما و لامبدا با استفاده از اطلس پاکسینوس کانول گذاری دو طرفه ناحیه هیپوکمپ با مختصات (ML=±2/2mm, DV=-3/2mm AP=-3/8mm,) صورت گرفت. جهت اطمینان از موضع تزریق به وسیله دستگاه ویبرواسلایس برش‌هایی در حد ۱۰۰-۱۵۰میکرون از موضع کانول‌گذاری تهیه شد. سپس با کمک رنگ‌آمیزی نیسل مقاطع مورد نظر رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی و تایید قرار گرفتند(شکل ۱). پس از طی دوره بهبودی(یک هفته بعد از جراحی) تزریق داروها به کمک سرنگ همیلتون ۱ میکرولیتری به صورت دو طرفه در ناحیه CA1صورت گرفت.



شکل۱. برش مغزی تهیه شده از ناحیه کانول گذاری(CA1 هیپوکمپ)

جهت اجرای آزمایش رفتاری حیوانات مورد آزمایش در ۷ گروه هفت تایی شامل گروه کنترل(موش های سالم و بدون هیچ گونه جراحی)، گروه شاهد جراحی(دریافت‌کننده حلال داروها)، گروه‌های اسید اسکوربیک (داروپخش) (AA) (۲۴،۱۲ µg/kg)، گروه-های اسکوربات اکسیداز (سیگما-آلدریچ) (AO) (۰/۲, ۴/۰ µg/kg) و گروه اسکوربات اکسیداز غیر فعال (سیگما-آلدریچ) (I-AO) (۰/۲ µg/kg) تقسیم بندی شدند. تزریق اسید اسکوربیک ۳۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش و اسکوربات اکسیداز فعال و غیرفعال ۲۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه انجام شد. گروه شاهد جراحی سرم فیزیولوژیک به عنوان حلال داروها دریافت نمود.

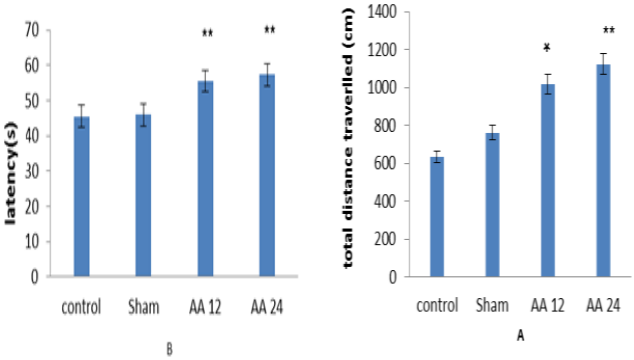
در این پژوهش جهت سنجش یادگیری و حافظه فضایی از ماز آبی موریس استفاده شد (۱۲). ماز آبی موریس حوضچه دایره ای شکل تیره رنگی به قطر۱۳۶ سانتی متر و ارتفاع ۶۰ سانتی متر است که تا ارتفاع ۲۵ سانتی متر با آب با دمای ۲±۲۰ پر می شود. این حوضچه به چهار ربع مساوی تقسیم می شود و در هر ربع دایره یک نقطه برای رها کردن حیوان در آب در نظر گرفته شده است. یک سکو فلزی به قطر ۱۰ سانتیمتر در مرکز ربع دایره جنوبی ۵/۱ سانتیمتر در زیر سطح آب و بصورت غیر قابل رؤیت قرار گرفت، این دایره به عنوان ربع هدف در نظر گرفته شد. در این مطالعه، از پروتکل یک روزه جهت سنجش یادگیری و حافظه فضایی استفاده شد. آزمایش یادگیری(acquisition) شامل ۳ بلوک است که با فاصله ۳۰ دقیقه از یکدیگر انجام می گیرد و هر بلوک خود شامل ۴ کارآزمایی است. در هر کارآزمایی حیوان از یکی از ربع دایره های چهارگانه که دستگاه بطور تصادفی انتخاب می کند به داخل آب رها شده و حداکثر ۶۰ ثانیه فرصت دارد تا با استفاده از سرنخ های فضایی اطراف، سکوی پنهان در زیر سطح آب را پیدا نموده و بر روی آن استراحت کند. حیوان پس از قرار گرفتن بر روی سکو ۳۰ ثانیه بر روی آن استراحت کند. در هر بلوک حیوان از ۴ ربع دایره مختلف به داخل آب رها می شود. در این آزمایش مدت زمان سپری شده (escape latency) و مسافت پیموده شده تا یافتن سکوی پنهان در این سه بلوک بعنوان معیاری از یادگیری فضایی محاسبه می شود. ۲ ساعت پس از اتمام آخرین کارآزمایی، آزمون پروب (Probe test) بمنظور بررسی حافظه فضایی(retention) حیوانات انجام می گیرد. این آزمون (بلوک چهارم) شامل یک کارآزمایی منفرد است که در آن سکوی پنهان از داخل ماز برداشته شده و حیوان از ربع مخالف ربع دایره هدف به داخل آب رها شده و به‌مدت ۶۰ ثانیه آزادانه در آب شنا می کند. متغیرهای مورد بررسی در این آزمون مدت زمان حضور و مسافت پیموده شده در ربع هدف

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.4.5.8]
[DOI: 10.22088/jbums.17.4.36]

می باشد. تصاویر با دوربین نصب شده در بالای قسمت مرکزی حوضچه با سرعت ۲۵ تصویر در ثانیه توسط مانیتور دریافت و با استفاده از نرم افزار ردیابی maze router ثبت و آنالیز شد . بعد از اتمام آزمون رفتاری غلظت اسید آسکوربیک در هیپوکامپ موش های صحرایی با استفاده از روش Roe and Kuther اندازه‌گیری شد (۱۳). در این روش موش‌ها با استفاده از گاز co_2 بیهوش و سر حیوان توسط گیوتین جدا و هیپوکامپ آن بعد از جداسازی در نیتروژن مایع فریز شد. سپس هر هیپوکامپ وزن و به اندازه ۹ برابر حجم آن از بافر مورد نظر(اسید پرکلریک ۰/۳۵M با ۰/۱mg/ml EDTA) اضافه شد و در دمای صفر درجه سانتی گراد هموژن شدند. نمونه‌ها با دور ۱۵۰۰۰ rpm و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. ۲۰۰ µL از مایع رویی (عصاره بافت) در یک میکروتیوب ریخته و ۵۰ µL معرف اضافه کرده و سپس به مدت ۳ ساعت نمونه ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند بعد نمونه ها را در دمای صفر درجه سانتیگراد گذاشته و به آنها اسیدسولفوریک ۸۵٪ اضافه شد. دانسیته بهینه نمونه را در طول موج ۵۱۵ nm اندازه‌گیری کرده و برای محاسبه غلظت اسید اسکوربیک هر نمونه، عدد به دست آمده در فرمول منحنی استاندارد گذاشته شد. جهت مقایسه گروه‌های مورد آزمایش از آزمون (ANOVA) و متعاقب آن از پس آزمون توکی استفاده گردید و $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

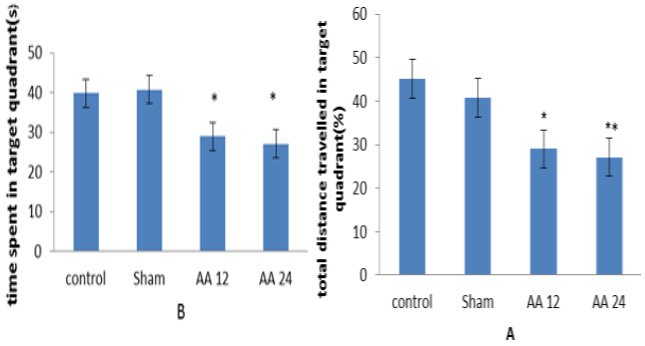
یافته ها

براساس نتایج به دست آمده در بخش یادگیری، در گروه دریافت‌کننده اسیدآسکوربیک با دوز ۱۲ µg/kg میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو (۱۰۱۲/۹۸±۶۳/۵۵) می‌باشد که نسبت به گروه کنترل (۶۳۳/۳۳±۱۸/۴۶) افزایش نشان داد ($p<0/05$). همچنین در گروه دریافت کننده دوز ۲۴ µg/kg اسید اسکوربیک میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو (۱۱۲۳/۷۳±۱۰۸/۸۹) میباشد که نسبت به گروه کنترل (۶۳۳/۳۳±۱۸/۴۶) افزایش نشان می دهد ($p<0/01$) (نمودار۱A). میانگین زمان طی شده برای یافتن سکو نیز در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۱۲ µg/kg، ۲۴ اسیداسکوربیک به ترتیب (۵۵/۴۸±۲/۳۸) و(۵۷/۳۱±۱/۱۸) بود که نسبت به گروه کنترل(۴۵/۹±۱/۸۴) افزایش نشان می‌دهد($p<0/01$) (نمودار ۱B).



نمودار۱. A مقایسه میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو در میانگین سه بلوک، B مقایسه میانگین زمان رسیدن به سکو در میانگین سه بلوک اسیداسکوربیک(AA)، کنترل (control)، شاهد (sham) (n=۷).
$p<0/05$* و $p<0/01$ در مقایسه با کنترل و شاهد**

نتایج بررسی حافظه فضایی با آزمون پروب نشان داد تزریق داخل هیپوکامپی دوز ۱۲ µg/kg اسیدآسکوربیک منجر به کاهش میانگین درصد مسافت طی شده در ربع هدف (۴۵/۱۰±۲/۹۱) در مقایسه با کنترل (۲۶/۱۹±۱/۷۱) گردید ($p<0/05$). تزریق دوز ۲۴ µg/kg اسیداسکوربیک نیز منجر به کاهش میانگین درصد مسافت طی شده در ربع هدف (۱۱/۲۷±۹۵/۰) در مقایسه با کنترل شد ($p<0/01$) (نمودار۲A). همچنین مشخص شد درصد زمان گذرانده شده در ربع هدف در گروه های دریافت کننده دو دوز ۱۲، ۲۴ µg/kg اسید اسکوربیک به ترتیب (۱۷/۱۱±۲/۲۹) و (۱۶/۳۳±۰/۴۹) می باشد که در مقایسه با گروه کنترل (۲۰/۹۵±۲/۴۱) کاهش نشان می‌دهند ($p<0/05$) (نمودار۲B).



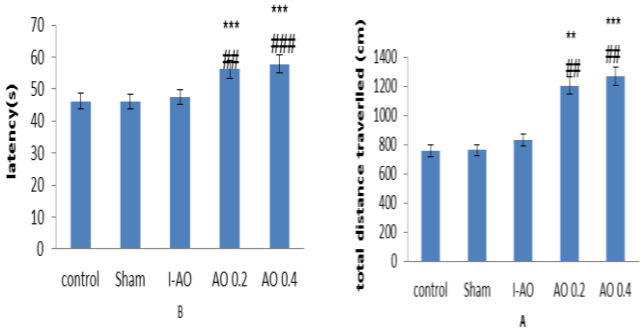
نمودار۲. A مقایسه درصد مسافت طی شده در ربع هدف در بلوک چهارم، B مقایسه میانگین زمان گذرانده در ربع هدف در بلوک چهارم.
اسیداسکوربیک (AA)، کنترل (control)، شاهد (sham) (n=۷).
$p<0/05$* و $p<0/01$ در مقایسه با کنترل و شاهد**

بررسی اثر تزریق درون هیپوکامپی آسکوربات اکسیداز بر میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو نشان داد میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو در دوز ۰/۲ µg/kg اسکوربات اکسیداز (۱۲۵۱/۵۸±۹۲/۷۴) می باشد که اختلاف معنی دار با کنترل (۷۶۰/۶۲±۱۰۱/۴۳) نشان می‌دهد ($p<0/01$) (نمودار۳A). مسافت طی شده برای یافتن سکو نیز در گروه دریافت کننده دوز ۰/۴ µg/kg اسکوربات اکسیداز (۱۲۶۳/۷۹±۸۱/۷۸) می باشد که افزایش معنی دار در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد ($p<0/01$). همچنین مسافت طی شده جهت رسیدن به سکو در هر دو دوز ۰/۲ µg/kg، ۰/۴ آسکوربات اکسیداز نیز نسبت به گروه آسکوربات اکسیداز غیرفعال(۸۳۱/۱۷±۵۱/۳۸) افزایش نشان داد ($p<0/01$) (نمودار۳A). زمان رسیدن به سکو در گروه های دریافت کننده دوزهای ۰/۲ µg/kg، ۰/۴ آسکوربات اکسیداز به ترتیب (۵۶/۱۶±۱/۹۶) و (۵۷/۸±۱/۳) می باشد که در مقایسه با گروه کنترل (۴۵/۸۹±۰/۷۱) افزایش نشان می دهد ($p<0/01$). میانگین زمان طی شده برای یافتن سکو در دوزهای (۰/۲ µg/kg) ($p<0/01$) و (۰/۴µg/kg) ($p<0/001$) آسکوربات اکسیداز نیز نسبت به گروه آسکوربات اکسیداز غیرفعال (۴۷/۵۳±۱/۰۱) افزایش یافت (نمودار۳B).

نتایج تزریق داخل هیپوکامپی آسکوربات اکسیداز بر درصد مسافت طی شده در ربع هدف در آزمون پروب نشان داد آسکوربات اکسیداز در هر دو دوز(۰/۲ µg/kg) ($p<0/05$) و (۰/۴ µg/kg) ($p<0/01$) منجر به کاهش مسافت طی شده در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد(نمودار۴A). همچنین دوزهای (۰/۲ µg/kg)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.4.5.8]
[DOI: 10.22088/jbums.17.4.36]

(p<۰/۰۵) و (۰/۴ µg/kg) (p<۰۱/۰) آسکوربات اکسیداز موجب کاهش درصد زمان طی شده در ربع هدف در مقایسه با گروه کنترل شد(نمودار۴B).

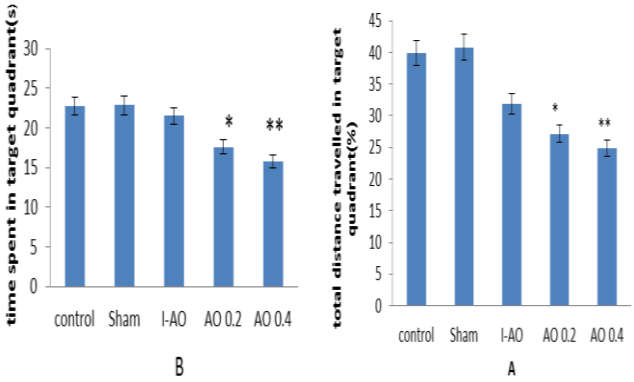


نمودار۳. Aمقایسه میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو در میانگین سه بلوک. B مقایسه میانگین زمان رسیدن به سکو در میانگین سه بلوک.

آسکوربات اکسیداز(AO) ،آسکوربات اکسیداز غیرفعال(I-AO) کنترل (control) ، شاهد (sham) (n=۷).

$p<۰/۰۱^{**}$، $p<۰/۰۰۱^{***}$ در مقایسه با کنترل و شاهد

$p<۰/۰۱^{\#\#}$، $p< ۰/۰۱^{\#\#}$ در مقایسه با I-AO

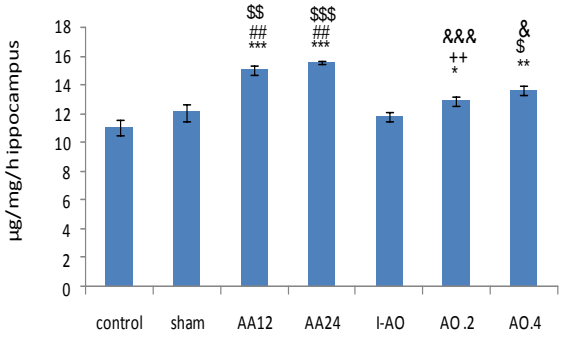


نمودار۴. A مقایسه درصد مسافت طی شده در ربع هدف در در بلوک چهارم، B مقایسه میانگین زمان گذرانده در ربع هدف در بلوک چهارم

آسکوربات اکسیداز(AO) ،آسکوربات اکسیداز غیرفعال (I-AO) کنترل (control)، شاهد (sham) (n=۷).

$p<۰/۰۵^{*}$ و $p<۰/۰۱^{**}$ در مقایسه با کنترل و شاهد

بررسی میزان غلظت اسید اسکوربیک در هیپوکامپ: غلظت اسیدآسکوربیک در گروه‌های دریافت کننده دو دوز µg/kg ۲۴،۱۲ اسید اسکوربیک به ترتیب (۱۴/۹۷±۰/۳۳) و (۱۵/۵۳±۰/۱) می‌باشد که نسبت به گروه کنترل (۱۱/۰۶±۰/۵۵) و آسکوربات اکسیداز غیرفعال (۱۱/۷۷±۰/۳۴) افزایش یافته است (p<۰۰۱/۰). غلظت این ویتامین در گروه دریافت کننده دوز µg/kg ۰/۲ آسکوربات اکسیداز(۱۲/۸۷±۰/۲۹) می‌باشد که در مقایسه با دوز µg/kg ۲۴ اسیداسکوربیک(p<۰۰۱/۰)، دوز µg/kg ۱۲ اسیداسکوربیک(p<۰۱/۰) و کنترل(p<۰/۰۵) کاهش نشان می دهد. همچنین در گروه دریافت کننده دوز µg/kg ۰/۴ آسکوربات اکسیداز غلظت اسید اسکوربیک (۱۳/۶۲±۰/۳۳) می‌باشد که نسبت به گروههای کنترل (p<۰۱/۰) و آسکوربات اکسیداز غیرفعال(p<۰/۰۵) افزایش یافته است. همچنین در این دوز آسکوربات اکسیداز غلظت اسیداسکوربیک نسبت به گروه اسید اسکوربیک با دوز µg/kg ۲۴ کاهش یافته است (p<۰/۰۵) (نمودار۵).



نمودار ۵. مقایسه غلظت اسید آسکوربیک در هیپوکامپ گروه های مورد آزمایش

کنترل (control)، شاهد (sham)، اسیداسکوربیک(AA) آسکوربات اکسیداز(AO) ،آسکوربات اکسیداز غیرفعال(I-AO)، (n=۷).

$p<۰/۰۵^{*}$، $p<۰/۰۱^{**}$، $p<۰/۰۰۱^{***}$ در مقایسه با کنترل

$p< ۰/۰۰۱^{\#\#}$ در مقایسه با شاهدوکنترل

$p<۰/۰۵^{\$}$، $p<۰/۰۰۱^{\$\$\$}$ در مقایسه با I-AO

$p<۰/۰۱^{++}$ در مقایسه با AA12

$p<۰/۰۵^{\&}$، $p<۰/۰۰۱^{\&\&\&}$ در مقایسه با AA 24

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه اثر تزریق اسید آسکوربیک و اسکوربات اکسیداز در ناحیه CA1هیپوکامپ موش صحرایی نر بالغ بر یادگیری و حافظه فضایی به وسیله ماز آبی موریس مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج به دست آمده نشان دهنده اختلال یادگیری و حافظه فضایی متعاقب تزریق درون هیپوکمپی هر دو ترکیب فوق در دوزهای استفاده شده می باشد.

براساس یافته های پژوهش حاضر مشخص شد تزریق اسید آسکوربیک باعث افزایش میانگین مسافت طی شده و زمان سپری شده تا رسیدن به سکوی پنهان در میانگین سه بلوک می گردد که موید کاهش یادگیری فضایی می باشند. بررسی نتایج آزمون پروب که نشان دهنده تغییرات حافظه می باشد، نشان داد تزریق درون هیپوکمپی اسید اسکوربیک(µg/kg ۲۴) درصد مسافت طی شده در ربع هدف در بلوک چهارم را کاهش می دهد. همچنین در صد زمان طی شده در ربع هدف در بلوک ذکر شده به دنبال تزریق اسید اسکوربیک هر دو دوز اسید اسکوربیک کاهش یافته است که حاکی از کاهش حافظه فضایی می باشد. در مطالعات قبلی نیز اثرات مخرب تزریق محیطی و مرکزی اسید اسکوربیک بر یادگیری و حافظه فضایی گزارش شده است (۱۰و۸). از علل توجیه کننده تخریب یادگیری و حافظه فضایی ایجاد شده متعاقب تزریق اسید آسکوربیک وابستگی این ویتامین با سیستم دوپامینرژیکی می‌باشد. در بسیاری از مطالعات این دارو با مهار سیستم دوپامینی همراه است و اتصال آگونیست های گیرنده دوپامینی (D_1 و D_2) را کاهش با مختل کردن عمل دوپامین باعث تخریب یادگیری و حافظه می شود (۱۶-۱۴). آنتاگونیست های گیرنده D_2 دوپامینی بر روی پایانه های پیش سیناپسی اثر می گذارند (۱۷). مشخص شده آسکوربات دارای عملکرد مشابه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.4.5.8]
[DOI: 10.22088/jbums.17.4.36]

با آنتاگونیست های گیرنده D_2 دوپامینی می‌باشد (۱۷). در همین راستا تحقیقات نشان می‌دهند تزریق آگونیست گیرنده D_2 دوپامینی در ناحیه CA1 منجر به بهبود حافظه و یادگیری موش های صحرایی می گردد که این اثر با تزریق توام اسیداسکوربیک و آگونیست گیرنده D_2 دوپامینی کاهش یافته است (۱۱). بنابراین ممکن است اسیداسکوربیک پس از تزریق با مداخله در کار گیرنده های پیش سیناپسی دوپامینرژیک باعث کاهش یادگیری و حافظه گردد. همچنین بررسی ها نشان می دهد هیپوکامپ ورودی های دوپامینرژیک از ناحیه VTA دریافت می‌کند نورون های دوپامینرژیک مذکور از طریق اثر بر گیرنده های D_1/D_5 دوپامینی بر سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکمپ اثر نموده و در ایجاد حافظه طولانی مدت این ناحیه مؤثر هستند (۱۸). بنابراین با توجه به نقش آنتی دوپامینرژیک اسید آسکوربیک (۱۷) ممکن است این ویتامین با تأثیر برگیرنده‌های دوپامینی موجب اختلال در حافظه و یادگیری گردد

همانگونه که عنوان شد اسید آسکوربیک از انتهای نورونهای گلوتامینرژیک در مغز آزاد شده و فعالیت سیستم گلوتامینرژیک را تا حدود زیادی تنظیم می‌کند، مشخص شده آسکوربات در دوزهای بالا (۱۰۰–۵۰۰ mg/kg) به صورت آنتاگونیست گیرنده NMDA عمل می‌کند و ممکن است آسکوربات با آنتاگونیزه کردن گیرنده NMDA موجب کاهش آزادسازی دوپامین گردد که کاهش فرآیند یادگیری و حافظه فضایی را بدنبال خواهد داشت (۱۹). از آن جا که بیشترین تراکم گیرنده های NMDA در ناحیه CA1 و شکنج دندانه ای هیپوکمپ می باشد، می توان گفت که اسیدآسکوربیک از طریق مهار این گیرنده ها باعث کاهش حافظه می شود(۱۹). مکانیسم احتمالی دیگر در خصوص ایجاد اثر مهاری اسیدآسکوربیک بر پارامترهای حافظه و یادگیری بلوک کانال‌های کلسیمی نوع L با اسیدآسکوربیک می باشد گزارش شده که بلوک فارماکولوژیکی کانال کلسیم نوع L باعث تخریب یادگیری می‌شود(۲۰).

با توجه به اینکه اسیدآسکوربیک دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد و نشان داده شده که عملکرد بهبود یادگیری و حافظه این ترکیب به علت ویژگی آنتی اکسیدانی آن می‌باشد (۷و۸) بنابراین نتایج این مطالعه با اثر تقویتی ترکیبات آنتی اکسیدان روی حافظه و یادگیری تناقض دارد. از آنجا که اسیدآسکوربیک به عنوان یک نورومدولاتور در سیستم عصبی مرکزی معرفی شده است(۲۱) و اثر مداخله در عملکرد سایر نوروترانسمیتر ها یک اثر اختصاصی و اثر آنتی اکسیدانی یک اثر عام می‌باشد بنابراین اثر مداخله اسیدآسکوربیک در عملکرد نوروترانسمیترها از جمله دوپامین، گلوتامات و سروتونین از تأثیر آنتی اکسیدانی آن بر یادگیری اثر بیشتری دارد و می توان بیان کرد که اسیدآسکوربیک می تواند با مهار کانال های NMDA و کلسیمی اثر مخربی روی یادگیری و حافظه فضایی داشته باشد(۲۱).

در مطالعه حاضر تزریق دو دوز آسکوربات اکسیداز (۰/۲ ،۰/۴ µg/kg) موجب افزایش معنی دار دو پارامتر مسافت طی شده و زمان طی شده در میانگین سه بلوک شد. همچنین در آزمون پروب به منظور بررسی حافظه فضایی مشخص شد تزریق آسکوربات اکسیداز در هر دو دوز در ناحیه CA1 هیپوکامپ درصد مسافت طی شده در ربع هدف و درصد زمان طی شده در ربع هدف را کاهش می دهد که این نتایج نشان دهنده کاهش یادگیری و حافظه فضایی می‌باشد.

تزریق آسکوربات اکسیداز غیرفعال در هیچ یک از پارامترها تغییر معنی داری را نشان نداد. بنابراین اختلالات ناشی از تزریق آسکوربات اکسیداز را نمی‌توان به وجود این گلیکوپروتئین با وزن مولکولی بالا نسبت داد. بنابراین علت کاهش یادگیری و حافظه مربوط به فعالیت آنزیمی این ماده می‌باشد که می‌تواند اسیدآسکوربیک را در ناحیه تزریقی یعنی CA1 هیپوکامپ حذف کند. مطالعات قبلی حذف ۷۰–۵۰ درصدی اسیدآسکوربیک خارج سلولی جسم مخطط را ۲۰ دقیقه پس از تزریق آسکوربات اکسیداز در این ناحیه نشان می دهد(۲۲).

در مطالعه حاضر این امکان وجود دارد که آسکوربات اکسیداز با اتصال به گیرنده های دوپامینی و یا مولکولهای دوپامینی باعث مهار آن ها شود و اثر کاهشی خود را از این طریق نیز اعمال کند. در واقع با توجه به اعمال اسیدآسکوربیک که می تواند به عنوان نورومدولاتور، نوروترانسمیتر، ضد استرس اکسیداتیو و یا آنزیم باشد مشخص است که آسکوربات اکسیداز می تواند در هر یک از این عملکردها مداخله داشته باشد. اندازه‌گیری سطح اسیداسکوربیک هیپوکامپ نشان داد که غلظت اسیداسکوربیک در گروه هایی که اسیداسکوربیک (۱۲،۲۴ µg/kg) دریافت کرده اند در مقایسه با کنترل به مقدار معنی داری کاهش یافته است اما در گروه هایی دریافت کننده آسکوربات اکسیداز (۰/۲، ۴/۰ µg/kg) در مقایسه با کنترل افزایش معنی داری در غلظت اسیداسکوربیک در هیپوکامپ دیده شده است، که البته این افزایش غلظت با نتایج رفتاری همخوانی ندارد. در مطالعات قبلی نیز تزریق آسکوربات اکسیداز در نواحی هیپوکامپ پشتی اثری بر رفتارها نداشته اما در جسم مخطط هم اسیداسکوربات خارج سلولی پایین آمده و هم رفتارها نارسا گردیده است(۱۸).

در مطالعه حاضر ممکن است علت افزایش غلظت اسیداسکوربیک ناشی از استرس اکسیداتیو ناشی از التهاب بافتی باشد که در اثر وجود کانول در محل گذاشته شده ایجاد شده و منجر به تجمع اسیداسکوربیک بیشتری در آن منطقه شده تا به عنوان یک عامل ضداسترس عمل کند(۲۳). علت دیگر افزایش غلظت اسیداسکوربیک می تواند مربوط به فعالیت ناقلین اسیداسکوربیک باشد، فعالیت این ناقلین تابع غلظت و فراوانی اسید اسکوربیک می باشد در واقع حذف اسیداسکوربیک می تواند منجر به بسیج قوی‌تر و بیشتر منابع داخل سلولی و نیز ناقل‌های افزایش دهنده سطح اسیداسکوربیک در فضای خارج سلولی باشد (۴). در مجموع نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که افزایش سطح اسیدآسکوربیک و نیز کاهش سطح این نورومدولاتور در ناحیه CA1 هر دو در جهت تخریب حافظه عمل می کنند. بنابراین باتوجه به نقش‌های متنوع اسیداسکوربیک به نظر می‌رسد تنها یک محدوده غلظتی مشخص برای عملکرد طیفی آن وجود دارد. خارج از آن از طریق مداخله در عملکرد نوروترانسمیتری و یا تغییر در عملکرد آنزیمی و آنتی اکسیدانی این ویتامین یادگیری و حافظه فضایی حیوانات دچار مشکل می شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل حمایت مالی از این مطالعه تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.4.5.8]
[DOI: 10.22088/jbums.17.4.36]

Learning and Memory Impairment Induced by the Injection of Ascorbic Acid and Ascorbate Oxidase into the Hippocampus in the Morris Water Maze

Sh. Jamali (MSc)[1], M. Abbasnejad (PhD)[*2], S. Esmaeili mahani (PhD)[2], A. Badoei-Dalfard (PhD)[2], R. Kooshki (MSc)[1]

1.Young Researchers Club, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R.Iran

2.Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(4); Apr 2015; PP: 36-43

Received: Oct 3th 2014, Revised: Dec 6th 2014, Accepted: Feb 4th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Ascorbic acid has a wide range of functions in the central nervous system such as neuromodulator and antioxidant. Ascorbic acid intervenes with the neurotransmitters involved in learning and memory. In this study, we examined the effects of its injection and its removal enzyme in the hippocampal CA1 region on spatial learning and retention.

METHODS: We used 49 Wistar rats in this study (220-270 mg/kg) and we divided them into seven groups including: control, sham (recipients of solvent), ascorbate oxidase (0.2, 0.4 µg/kg), ascorbic acid (24, 12µg/kg), and inactive ascorbate oxidase (0.2 µg/kg). Bilateral cannula was performed in the hippocampal CA1 region using stereotaxy device. After one week of recovery, one microliter of the drugs was injected by a Hamilton syringe. Spatial learning and retention was measured by using the Morris water maze.

FINDINGS: The results show that 12 µg/kg dose of ascorbic acid increases mileage (1012.98±63.55) and escape latency (55.48±2.38) compared to the control group (633.33±18.46) (45.9±1.84) ($p<0.05$). Also mileage (1123.73±108.89) and escape latency delay (57.31±1.18) were raised with 24 µg/kg dose of ascorbic acid compared to the control group ($p<0.01$). It was determined that ascorbate oxidase with both 0.2µg/kg ($p<0.01$) and 0.4µg/kg ($p<0.001$) dose increased the mileage and escape latency compared to the control group.

CONCLUSION: The results showed that the injection of ascorbic acid and its removal enzyme in the hippocampal CA1 region leads to spatial learning and retention loss.

KEY WORDS: *Spatial Learning and Retention, The Morris Water Maze, Ascorbate Oxide, Ascorbic Acid, Hippocampus.*

Please cite this article as follows:

Jamali Sh, Abbasnejad M, Esmaeili mahani S, Badoei-Dalfard A, Kooshki R. Learning and Memory Impairment Induced by the Injection of Ascorbic Acid and Ascorbate Oxidase into the Hippocampus in the Morris Water Maze. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(4):36-43.

[*]Corresponding Author: M. Abbasnejad (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R.Iran

Phone: +98 341 3222032

Email: mabbas@mail.uk.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.4.5.8]

[DOI: 10.22088/jbums.17.4.36]

References

1.Huang J, Agus DB, Winfree CJ, Kiss S, Mack WJ, McTaggart RA, et al. Dehydorascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(20):11720-4.

2.Naderi R, Abbasnejad M. Comparison of the effect of co-injection of aAcid and D2 agonist (bromocriptine) with acid in nAccumbens shell on male rats' anxiety. J Babol Univ Med Sci. 2013;15(4):100-8. [In Persian]

3.Rekha C, Poornima M, Manasa M, Abhipsa V, Pavithra Devi J, Vijay Kumar HT, et al. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. Chem Sci Trans. 2012;1(2):303-10.

4.Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. Amino Acids. 2008;34(3):347-55.

5.Stamford JA, Isaac D, Hicks CA, Ward MA, Osborne DJ, O'Neill MJ. Ascorbic acid is neuroprotective against global ischaemia in striatum but not hippocampus: histological and voltammetric data. Brain Res. 1999;835(2):229-40.

6.Rebec GV, Pierce RC. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the Brian regulates dopaminergic and glutaminergic transmission. Prog Neurobiol. 1994;43(6):537-65.

7.Raghu J, Raghuveer VC, Rao MC, Somayaji NS, Babu PB. The ameliorative effect of ascorbic acid and Ginkgo biloba on learning and memory deficits associated with fluoride exposure. Interdiscip Toxicol. 2013;6(4):217-21.

8.Esmaili MH, Sharifi M, Doodangeh E. The effect of ascorbic acid on spatial learning. J Qazvin Univ Med Sci. 2003;6(24):3-8. [In Persian]

9.Shahidi S, Komaki A, Mahmood M, Atravash N, Ghodrati M. Ascorbic acid supplementation could affect passive avoidance learning and memory in rat. Brain Res Bull. 2008;76(1-2):109-13.

10.Abbasnejad M, Nasri S, Nazem H, Bahaadini M. The effect of ascorbic acid injection into the lateral ventricle on spatial learning and memory in adult male rats. Physiol Pharmacol. 2008;12(1):227-37. [In Persian]

11.Esmaeilpour-Bezenjani Kh, Abbasnejad M. Effect of administration of ascorbic acid and dopamine D2 receptors agonist in the hippocampal CA1 area on spatial learning and memory in adult male rats. Iran J Veterinary Res, Shiraz Univ. 2013;14(2):126-32.

12.D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and Memory. Brain Res Rev. 2001;36(1):60-90.

13.Schulz HU, Schürer M, Krupp S, Dammann HG, Timm J, Gessner U. Effects of acetylsalicylic acid on ascorbic acid concentrations in plasma, gastric mucosa, gastric juice and urine--a double-blind study in healthy subjects. Int J Clin Pharmacol Ther. 2004;42(9):481-7.

14.Fujishiro H, Umegaki H, Suzuki Y, Oohara-Kurotani S, Yamaguchi Y, Iguchi A. Dopamine D2 receptor plays a role in memory function: implications of dopamine-acetylcholine interaction in the ventral hippocampus. Psychopharmacology (Berl). 2005;182(2):253-61.

15.Lemon N, Manahan-Vaughan D. Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long term depression. J Neurosci. 2006;26(29):7723-9.

16.Mehta MA, Montgomery AJ, Kitamura Y, Grasby PM. Dopamine D2 receptor occupancy levels of acute sulpiride challenges that produce working memory and learning impairments in healthy volunteers. Psychopharmacology(Berl). 2008;196(1):157-65.

17.Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamaine receptors: from structure to function. Physiol Rev. 1998;78(1):189-225.

18.Zarrindast MR, Farajzadeh Z, Rostami P, Rezayof A, Nourjah P. Involvement of the ventral tegmental area (VTA) in morphine-induced memory retention in morphine-sensitized rats. Behav Brain Res. 2005;163(1):100-6.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.4.5.8]
[DOI: 10.22088/jbums.17.4.36]

19.Pourmotabbed A, Nedaei SE, Mehrabinasab E. Assessment of the role of NMDA receptors located in hippocampal CA1 area on the effects of oral morphine dependency on spatial learning and memory in rat. Physiol Pharmacol. 2006;10(2):115-23. [In Persian]

20.Xi G, Hui J, Zhang Z, Liu S, Zhang X, Teng G, et al. Learning and memory alterations are associated with hippocampal N-acetylaspartate in a rat model of depression as measured by 1H-MRS. PLoS One. 2011;6(12):e28686.

21.Parle M, Dhingra D. Ascorbic acid: a pMemory-enhancer in mice. J Pharmacol Sci. 2003;93(2):129-35.

22.Liu W[1], Wu CF, Huang M, Xiao K. Opposite effects of sulpiride and SCH 23390 on ethanol-induced striatal ascorbic acid release in intact and 6-hydroxydopamine lesioned rats. Brain Res. 2000;869(1-2):31-8.

23.Tolbert LC, Morris PE Jr, Spollen JJ, Ashe SC. Stereospecific effects of ascorbic acid and analogues on D1 and D2 agonist binding. Life Sci. 1992;51(12):921-30.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.4.5.8]
[DOI: 10.22088/jbums.17.4.36]