دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم– شماره ۸۹
آبان ۱۳۸۹

وصول: ۸۹/۵/۱۶
آخرین اصلاحات: ۸۹/۸/۲۴
پذیرش: ۸۹/۹/۱

برهمکنش رسپتورهای موسکارینی و NMDA در هیپوکامپ پشتی موش صحرایی در تست اضطراب ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع

نویسندگان: دکتر مرتضی پیری*[1]، دکتر محمد ناصحی[2]، نگار حیدری[3]، مریم‌السادات شاهین[4]، دکتر محمد رضا زرین دست [5]

۱- مربی- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل
۲- استادیار- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، سمنان
۳- دانشجوی دکتری داروسازی- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران
٤- کارشناس زیست‌شناسی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، تهران
۵- استاد- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز ملی مطالعات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول: دکتر مرتضی پیری **E-mail: biopiri@iauardabil.ac.ir**

چکیده:

مقدمه و هدف: انتقال پیام‌های تحریکی از طریق گیرنده‌های گلوتاماتی برای اعمال شناختی نظیر یادگیری و اضطراب حیاتی است. در مطالعه حاضر، نقش گیرنده‌های کولینرژیک موسکارینی هیپوکامپ پشتی در رفتار شبه اضطرابی القاءشده با مهارگیرنده‌های NMDA بررسی شده‌است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی از ۱۰۵ سر موش صحرایی نر با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوان‌ها پس از بیهوشی در دستگاه استریوتاکسی قرارگرفتند و کانول‌گذاری دوطرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی انجام شد. بعد از طی دوره بهبودی هفت روزه، آزمون رفتاری با استفاده از ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع انجام‌گرفت آنالیز واریانس یک-طرفه (ANOVA) و به دنبال آن تست توکی، داده‌ها را تجزیه‌وتحلیل کردند.

نتایج: یافته‌های ما نشان‌می‌دهند که تزریق MK801 (دو میکروگرم بر موش) و اسکوپولامین (چهار میکروگرم بر موش) به داخل ناحیه CA1 هریک به تنهایی، درصد حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز را افزایش می‌دهد، اما فعالیت حرکتی را تغییرنمی‌دهد؛ از طرف دیگر ، به‌کاربردن دوزهای غیر مؤثر اسکوپولامین با دوز غیر مؤثر MK801 فعالیت حرکتی را تغییرنمی‌دهد، اما درصد حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز را افزایش‌می-دهد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان‌می‌دهند که نه تنها هر دو گیرنده NMDA و گیرنده های موسکارینی استیل کولین در تعدیل اضطراب در هیپوکامپ پشتی موش صحرایی نقش دارند، بلکه بین آنها یک برهمکنش پیچیده نیز وجوددارد.

واژگان کلیدی: گیرنده‌های NMDA، گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین، هیپوکامپ پشتی، اضطراب، موش صحرایی

مقدمه

بیش از ٤٠٪ سیناپس‌های موجود در مغز از گلوتامات در جایگاه میانجی عصبی خود استفاده‌می‌کنند و این نورترانسمیتر به عنوان اصلی‌ترین نورترانسمیتر تحریکی در مغز عمل‌می‌کند (١). گیرنده‌های گلوتاماتی از نظر پراکنش در نواحی مختلف مغز و عملکرد تنوع زیادی دارند و انتقال پیام‌های تحریکی از طریق این گیرنده‌ها در نواحی مختلف مغز برای اعمال شناختی نقش حیاتی دارد (٢). گیرنده‌های یونوتروپیک گلوتاماتی گیرنده‌های NMDA، AMPA و گیرنده‌های کاینت را شامل می‌شوند؛ این گیرنده‌ها اغلب، به صورت پس سیناپسی قراردارند و ایجاد تحریک سریع و تغییر شکل سیناپسی را سبب‌می‌شوند که این اعمال در اثر بازشدن کانال‌های سدیمی و کلسیمی وابسته به لیگاند صورت‌می‌گیرد (٣). نقش گیرنده‌های یونوتروپیک NMDA و AMPA در اعمال شناختی نظیر حافظه، یادگیری و توجه اثبات شده‌است؛ به‌علاوه نقص در عملکرد این گیرنده‌ها به‌ویژه گیرنده NMDA در برخی از اعمال شناختی نظیر بیماری اسکیزوفرنی نقشی کلیدی دارد (٤, ٥). مطالعات نشان‌می‌دهند که گلوتامات در ایجاد اضطراب، نقشی مهم ایفامی‌کند و فعال‌شدن گیرنده‌های NMDA رفتارهای اضطرابی در حیوانات آزمایشگاهی را افزایش‌می‌دهد (٦).

از طرف دیگر هیپوکامپ مقدار زیادی ورودی‌های کولینرژیک از بخش میانی سپتوم و نوار مورب بروکا دریافت‌می‌کند (٧). مطالعات نشان‌می‌دهند که سیستم کولینرژیک نقشی مهم در تغییرهای نورولوژیکی و فیزیولوژیکی که در طی شکل‌گیری حافظه و یادگیری (٨) و رفتارهای شبه اضطرابی رخ‌می‌دهد، بازی‌می‌کند (٩). آثار استیل کولین در سیستم عصبی از طریق دو دسته اصلی گیرنده‌های نیکوتینی و موسکارینی میانجی-گری می‌شود (١٠). مطالعات قبلی نشان‌دهنده اهمیت سیستم کولینرژیک در واسطه‌گری اضطراب‌اند (١١). مطالعات انجام‌شده روی بیماران مبتلا به آلزایمر نیز تأییدکننده اهمیت سیستم کولینرژیک در فرایند اضطراب است؛ در این بیماران، یکی از اولین سیستم‌هایی که در مغز به‌ویژه در لوب پیشانی و هیپوکامپ به مشکل دچارمی‌شود، سیستم کولینرژیک است. مطالعات نشان-می‌دهند که این بیماران علاوه‌بر نقص پیش‌رونده حافظه، اضطراب بسیار شدیدی را نیز تجربه می‌کند؛ این تجربه نشان‌دهنده این موضوع است که کاهش فعالیت سیستم کولینرژیک، افزایش اضطراب را سبب‌می‌شود (١٢). با وجود مشخص‌شدن اهمیت سیستمیک کولینرژیک در زمینه رفتار اضطرابی و مشاهدات انجام‌شده در بیماران مبتلا به آلزایمر، نتایج مطالعات پیشین آثار متضادی را در زمینه نقش سیستم کولینرژیک در رفتار شبه اضطرابی گزارش‌کرده‌اند، به‌گونه‌ای‌که برای این سیستم آثار ضد اضطرابی، اضطراب‌زایی و بی‌اثربودن روی رفتار اضطرابی گزارش شده‌است (١٣-١٥).

با توجه به مطالعاتی که نشان‌می‌دهد هیپوکامپ پشتی رفتار اضطرابی را تحت تأثیر قرارمی‌دهد و با درنظرگرفتن این نکته که گیرنده‌های موسکارینی و NMDA در هیپوکامپ پشتی حضور دارند، این احتمال مطرح می‌شود که گیرنده‌های موسکارینی و NMDA هیپوکامپ پشتی می‌توانند رفتار اضطرابی را تحت تأثیر قراردهند؛ لذا در بخش اول این مطالعه، اثر آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی و NMDA هیپوکامپ پشتی، روی رفتار اضطرابی، با هدف روشن‌کردن این نکته که این گیرنده‌ها در شرایط فیزیولوژیک در رفتار اضطرابی نقش دارند، یا نه انجام‌شد؛ در بخش دوم این مطالعه برهمکنش گیرنده‌های موسکارینی و NMDA هیپوکامپ پشتی در زمینه رفتار اضطرابی برای اولین بار مطالعه شد که مشخص گردد بین دو سیستم در زمینه رفتار اضطرابی چه رابطه‌ای وجوددارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در پژوهشکده علوم شناختی (تهران- ایران) انجام گرفت از ١٠٥ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ٢٠٠ تا ٢٥٠ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند استفاده گردید. حیوان ها به حیوانخانه تحقیقاتی منتقل شده، در هر قفس

پنج سر موش قرار داده‌شد. در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرارمی‌گرفت و هر سه روز یک‌بار قفس موش‌ها تمیزمی‌شد. دمای حیوانخانه بین۳ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد متغیر بود و در هر گروه هشت حیوان استفاده می شد.

دستگاه تست اضطراب و نحوه انجام تست رفتاری

برای سنجش اضطراب از مدل رفتاری ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع استفاده شد؛ این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت بعلاوه (+) است . ابعاد بازوی باز و بسته ۱۰×۵۰ است که در دو طرف و انتهای بازوی بسته دیوارهایی به ارتفاع چهل سانتی‌متر قرار دارند. چهار بازو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی-متر منتهی می‌شوند. ماز با پایه‌هایی در ارتفاع پنجاه سانتی‌متر از سطح زمین قرارمی‌گیرد. موش‌ها درون محدوده مرکزی و رو به یک بازوی باز قرارگرفته، در مدت پنج دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف ماز حرکت‌می‌کرد، چهار پارامتر به روش مشاهده اندازه‌گیری می‌شد: تعداد دفعاتی که حیوان به بازوی باز وارد می‌شد، تعداد دفعاتی که حیوان به بازوی بسته وارد می‌شد، مدت زمانی که حیوان در بازوی باز می‌ماند و مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته می‌ماند. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته قرارگرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی موردنظر است. مدت زمان ماندن در هر بازو نیز بر همین اساس محاسبه‌شده‌است؛ برای هر حیوان درصد ورود به بازوی باز و درصد زمان ماندن در بازوی باز به طریق زیر محاسبه شد.

درصد ورود به بازوی باز:

$$\frac{\text{تعداد ورود به بازوی باز}}{\text{تعداد ورود به بازوی بسته+تعداد ورود به بازوی باز}}\times ۱۰۰=$$

درصد ماندن در بازوی باز:

$$\frac{\text{مدت ماندن در بازوی باز}}{\text{مدت ماندن در بازوی بسته+ مدت ماندن در بازوی باز}}\times ۱۰۰=$$

داروها

داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت‌بودند از: MK801 که در جایگاه آنتاگونیست غیر رقابتی گیرنده NMDA عمل‌می‌کند (تاکریس) و اسکوپولامین که به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی عمل‌می‌کند (سیگما). هر دو دارو بی‌درنگ قبل از آزمایش‌ها در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹ درصد استریل حل شدند. دوزهای استفاده‌شده، در این تحقیق بر اساس مطالعات Pilot و مطالعات قبلی دکتر زرین دست انتخاب‌شدند (۱۶-۱۹).

روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی

موش‌های صحرایی با تزریق کتامین هیدروکلراید (۵۰ mg/kg) به‌علاوه زایلزین (٤ mg/kg) بی‌هوش شدند؛ بعد از بی‌هوشی، حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. دو کانول راهنمای (G ۲۲) به صورت دوطرفه یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۹۹۷) قرارگرفت (۲۰). مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی برابر (V = −۳ ، ML = ±۲ ، AP = −۳/۲) است. بعد از قراردادن کانول‌ها در مختصات مورد نظر با استفاده از سیمان دندان‌پزشکی کانول‌های راهنما در جای خود محکم شده، یک هفته پس از جراحی تست اضطراب انجام‌شد.

تزریق درون مغزی دارو

برای تزریق دارو از کانول (G ۲۷) دندان‌پزشکی به طول یازده میلی‌متر، (یک میلی‌متر بزرگ‌تر از کانول راهنما) به‌منظور دسترسی دقیق به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی و جلوگیری از آسیب آن استفاده شد؛ این سر سوزن به کت‌دان تیوپ نوزاد (شماره ٤) متصل است. برای تزریق از سرنگ هامیلتون دو میکرولیتر استفاده شد. در مرحله تزریق، سر سوزن ۲۷G دندان‌پزشکی در داخل کانول راهنما G ۲۲ قرارداده و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو طی مدت شست تا نود ثانیه تزریق شد. مجموع حجم تزریق درون مغزی به هر موش یک میکرولیتر بوده، در طول تزریق به حیوان اجازه داده‌شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت‌کند.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام‌شده

آزمایش اول: اثر MK 801 در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر رفتار اضطرابی در موش صحرایی

در این آزمایش، چهار گروه حیوان به‌کاررفت؛ گروه اول سالین (۱ میکرولیتر بر موش) و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف MK 801 (۲ ، ۱ ، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پشتی، پنج دقیقه قبل از تست اضطراب دریافت‌کردند. آزمایش دوم: اثر اسکوپولامین در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر رفتار اضطرابی در موش صحرایی

در این آزمایش چهار گروه حیوان به‌کاررفت؛ گروه اول سالین (۱ میکرولیتر بر موش) و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف اسکوپولامین (۱،۳،٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پشتی، پنج دقیقه قبل از تست اضطراب دریافت‌کردند.

آزمایش سوم: اثر MK 801 در ناحیه هیپوکامپ پشتی در حضور و غیاب اسکوپولامین روی پاسخ اضطرابی

در این آزمایش، چهار گروه حیوان به‌کاررفت؛ هفت دقیقه قبل از تست گروه اول سالین (۱ میکرو لیتر بر موش) و سه گروه باقیمانده مقدار غیر مؤثر MK 801 (۱ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی دریافت‌کردند؛ دو دقیقه بعد از تزریق اول، یعنی پنج دقیقه مانده به زمان تست گروه اول و دوم سالین، دو گروه باقیمانده مقادیر مختلف اسکوپولامین (۲، ۳ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی داخل هیپوکامپ پشتی دریافت‌کردند.

بافت‌شناسی

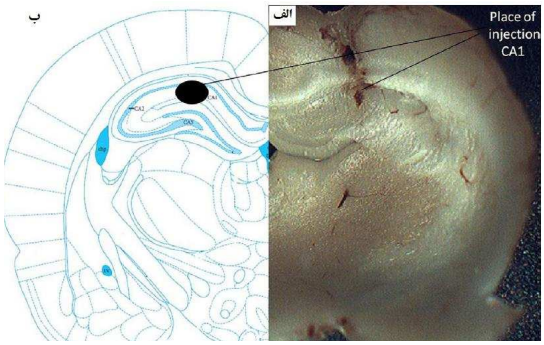
پس از کشتن حیوان‌ها با استفاده از کلروفرم با تزریق رنگ متیلن بلو ۱ ٪ (۰/۵ µl) به درون هر دو کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده‌شده، درون فرمالین ده درصد قرارگرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده‌شده، محل ورود کانول به مغز با میکروسکوپ لوپ بررسی‌شد تا صحت جراحی تأیید گردد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

در همه آزمایش‌ها درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز در جایگاه ملاک رفتار اضطرابی اندازه‌گیری شد؛ همچنین میزان فعالیت حرکتی حیوان نیز به صورت همزمان اندازه‌گیری گردید. نمره هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد (Mean ± S.E.M) ثبت گردید. به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایش، روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی استفاده‌شد. اختلاف در سطح P <۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنادار درنظرگرفته‌شد. برای انجام محاسبات آماری، نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها، نرم‌افزار Sigma Plot به‌کارگرفته‌شد.

یافته‌ها

مقطع بافتی مربوط به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی، نشان‌دهنده محل قرارگیری صحیح کانول در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس است؛ البته لازم به ذکر است تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که محل جراحی آنها در مقایسه با اطلس پاکسینوس صحیح بود، در تجزیه‌وتحلیل آماری استفاده‌شدند (شکل۱).



شکل ۱- عکس مقطع بافتی مربوط به کانول گذاری در ناحیه CA1 (الف) وشکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس که محل ناحیه CA1 در آن مشخص شده است (ب)

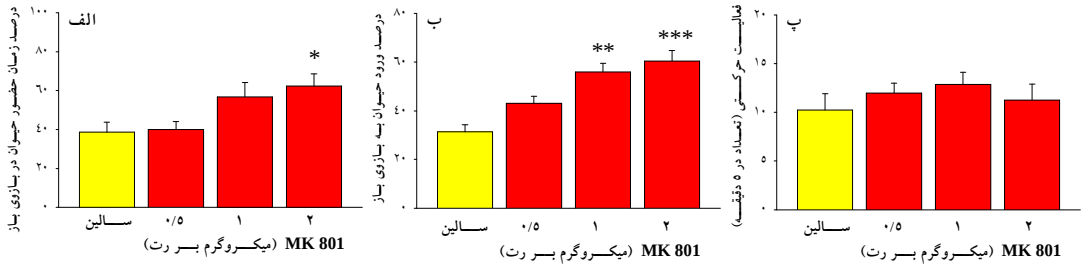
یافته‌های آزمایش اول: اثر MK801 ، آنتاگونیست گیرنده NMDA در ناحیه هیپوکامپ پشتی، روی رفتار اضطرابی

نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه مشخص‌کرد که تزریق مقادیر مختلف MK801 به ناحیه هیپوکامپ پشتی به صورتی معنی‌دار، درصد زمان حضور در بازوی باز [F (۳، ۲۸) = ۸/٦٤، p < ۰/۰۰۱] و درصد ورود به بازوی باز [F (۳، ۲۸) =۱٤/۲۹، p <۰/۰۰۱] را افزایش‌می‌دهد، اما روی فعالیت حرکتی حیوان اثری معنی‌دار ندارد [F (۳، ۲۸) = ۰/۸۳، p > ۰/۰۵]. این نتایج نشان‌دهنده ضد اضطراب‌بودن داروی MK801 است؛ به‌علاوه آزمون مکمل توکی نشان‌داد که افزایش درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز در دوز (دو میکروگرم بر موش) از نظر آماری معنی‌دار است.

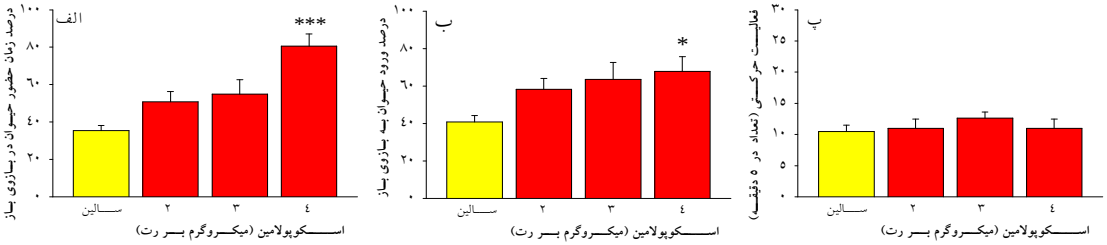
این شکل اثر تزریق MK801، آنتاگونیست گیرنده NMDA روی درصد زمان حضور در بازوی باز، درصد ورود حیوان به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان. ***P< ۰/۰۰۱، **P< ۰/۰۱ ، *P< ۰/۰۵ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین را نشان‌می‌دهد.

یافته‌های آزمایش دوم: اثر اسکوپولامین آنتاگونیست گیرنده موسکارینی درناحیه هیپوکامپ پشتی، روی رفتار اضطرابی در موش صحرایی

نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه مشخص‌کرد که تزریق اسکوپولامین به ناحیه هیپوکامپ پشتی به صورتی معنی‌دار، درصد زمان حضور در بازوی باز [p<۰/۰۰۱، F (۳، ۲۸) = ۱۰/۳۱] و درصد ورود به بازوی باز [F (۳، ۲۸) = ۲/۹۹، p < ۰/۰۵] را افزایش‌می‌دهد ولی بر فعالیت حرکتی حیوان، اثری معنی‌دار ندارد [F (۳، ۲۸) = ۰/٥٤ ، p > ۰/۰۵].



شکل ۲- اثر تزریق MK801، آنتاگونیست گیرنده NMDA روی درصد زمان حضور در بازوی باز، درصد ورود حیوان به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان. ***P< ۰/۰۰۱، **P< ۰/۰۱ ، *P< ۰/۰۵ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین را نشان‌می‌دهد.



شکل ۳- اثر تزریق اسکوپولامین ، آنتاگونیست گیرنده موسکارینی بر روی درصد زمان حضور در بازوی باز ، درصد ورود حیوان به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان . ***P< ۰/۰۰۱ ، *P< ۰/۰۵ در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین می باشد .

شکل ۴- اثر تزریق MK801 در غیاب و حضور اسکوپولامین بر روی درصد زمان حضور در بازوی باز ، درصد ورود حیوان به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان

شکل بالا، اثر تزریق اسکوپولامین، آنتاگونیست گیرنده موسکارینی، روی درصد زمان حضور در بازوی باز، درصد ورود حیوان به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان. ***P< ۰/۰۰۱ ، *P< ۰/۰۵ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین را نشان‌می‌دهد.

یافته‌های آزمایش سوم: اثر تزریق اسکوپولامین در حضور MK801 بر رفتار اضطرابی

نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه مشخص‌کرد که به‌کاربردن دوزهای غیر مؤثر اسکوپولامین قبل از دوز غیر مؤثر MK801 آثار ضد اضطرابی MK801 را تقویت‌می‌کند، به‌گونه‌ای‌که دوزهای غیر مؤثر این دارو همراه با هم به صورت سینرژیک درصد زمان حضور در بازوی باز [F (۳، ۲۸) = ۱۷/٦٧ ، p <۰/۰۰۱] و درصد ورود به بازوی باز [F (۳، ۲۸) = ۳/۱ ،p <۰/۰۵] را افزایش‌می‌دهند، بدون اینکه اثری معنی‌دار بر فعالیت حرکتی جاندار [F (۳، ۲۸) = ۱/۳٤ ، p > ۰/۰۵] داشته‌باشند. آزمون مکمل توکی مشخص‌کرد که دوز (سه میکروگرم بر موش) اسکوپولامین همراه با دوز (سه میکروگرم بر موش) MK801 به‌طور معنی‌دار اضطراب را کاهش‌می‌دهد.

بحث

در این مطالعه، نقش گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی بر رفتار شبه اضطرابی متأثر از تزریق MK801 به ناحیه CA1 بررسی شده‌است. یافته‌های ما نشان‌می‌دهند که تزریق MK801 به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی، افزایش درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز را سبب‌می‌شود، بدون اینکه میزان فعالیت حرکتی حیوان را تغییردهد. یافته‌های ما از آثار ضد اضطرابی آنتاگونیست غیر رقابتی NMDA در هیپوکامپ پشتی حکایت‌دارند و موافق مطالعاتی هستند که نشان‌می‌دهند تزریق سیستمیک MK801، اضطراب را در مدل‌های مختلف تست اضطراب از جمله ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع کاهش‌می‌دهد (۲۱)؛ همچنین یافته‌های ما با گزارش‌هایی که نشان‌می‌دهند آنتاگونیست گیرنده NMDA جنبه‌های مختلف رفتارهای هیجانی مانند ترس، اضطراب و افسردگی را تحت تأثیر قرارمی‌دهد و بعضی از فرم‌های حافظه و یادگیری را تخریب‌می‌کند، تأیید می‌گردد (۲۲). یافته‌های ما در مطالعه حاضر می‌تواند پیشنهادکننده این موضوع باشد که آنتاگونیست گیرنده NMDA آثار خود را روی رفتار شبه اضطرابی تا حدود زیادی از طریق اثر بر هیپوکامپ پشتی اعمال‌می‌کند، زیرا تزریق آنتاگونیست گیرنده NMDA به هیپوکامپ پشتی همان پاسخی را ایجادمی‌کند که تزریق سیستمیک این آنتاگونیست در پی دارد؛ این ایده با مطالعات روی حیوانات ترنس ژنیک که فاقد گیرنده NMDA در هیپوکامپ‌اند نیز تأیید می‌گردد؛ نتایج این مطالعات نشان‌می‌دهند که گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ در رفتار اضطرابی نقش‌دارند (۲۳). مطالعات رفتاری نیز نشان‌می‌دهند که ساختارهایی که در بخش میانی لوب گیجگاهی قراردارند، نظیر هیپوکامپ و آمیگدال در اعمال شناختی و هیجانی نقشی مهم دارند (۲۲)؛ بنابراین به احتمال قوی، هیپوکامپ پشتی یکی از جایگاه‌هایی است که آنتاگونیست گیرنده NMDA با اثر بر آن آثار شبه اضطرابی خود را اعمال‌می‌کند.

مطالعات ما همچنین مشخص‌کرد که تزریق اسکوپولامین، آنتاگونیست گیرنده موسکارینی به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز را افزایش‌می‌دهد، بدون

اینکه بر فعالیت حرکتی حیوان اثری بگذارد. این مشاهدات نشان‌دهنده این موضوع‌اند که اسکوپولامین، آثار ضد اضطرابی دارد؛ همچنین تغییر رفتار شبه اضطرابی حیوان در پاسخ به آنتاگونیست گیرنده موسکارینی بیانگر این موضوع است که در شرایط طبیعی و فیزیولوژیک گیرنده‌های موسکارینی هیپوکامپ پشتی در رفتار اضطرابی حیوان تأثیر دارند.

گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین یکی از گیرنده‌های هستند که از طریق G پروتئین‌ها عمل‌می‌کنند و در بخش‌های وسیعی از مغز بیان می‌شوند (۲٤). گزارش‌های محدودی در مورد آثار اسکوپولامین، روی رفتار اضطرابی وجوددارند. برخی مطالعات نشان‌می‌دهند که تزریق درون صفاقی اسکوپولامین تعداد دفعاتی که حیوان وارد قسمت روشن دستگاه تست اضطراب روشن ـ تاریک می شود را کاهش‌می‌دهد که حاکی از اضطراب‌زابودن اسکوپولامین است (۲۵). اسمیت و همکارانش نیز نشان‌داده‌اند که تزریق درون صفاقی اسکوپولامین، افزایش اضطراب در دستگاه تست اضطرابی را سبب‌می‌شود که از دو قسمت سفید و سیاه تشکیل شده‌است (۲٦). جمع‌بندی مطالعات پیشین همچنین نشان‌می‌دهد که آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی واکنش ترس را در حیوان افزایش‌می‌دهد (۲۷). درحالی‌که مصرف سیستمیک اسکوپولامین، القاء اضطراب را باعث‌می‌شود، اما باید توجه داشت که اسکوپولامین نیز مانند داروهای دیگر در نواحی مختلف مغز می‌تواند آثاری متضاد را اعمال‌کند. به‌نظرمی‌رسد که تفاوت اصلی که به‌دست‌آمدن نتایج متضاد در این مطالعه موجب‌شده، نحوه مصرف دارو است که در این مطالعه به صورت درون مغزی و داخل ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی بوده‌است درحالی‌که در مطالعات قبلی به اثر سیستمیک دارو توجه می‌شده‌است، هرچندکه نباید تفاوت در نوع دستگاه استفاده‌شده برای تست اضطراب و دوز داروی به‌کاررفته را از نظر دور داشت؛ از طرف دیگر با توجه به اینکه استیل کولین یک تعدیل‌کننده قوی انتقال پیام‌های سیناپسی است که با اثر بر گیرنده‌های پیش سیناپسی موسکارینی و نیکوتینی موجود در پایانه اکسونی نورون های گابائرژیک و گلوتاماترژیک، انتقال پیام‌های تحریکی و مهاری را تعدیل‌می‌کند، این احتمال مطرح می‌شود که تونوس پایه سیستم کولینرژیک در رفتار اضطرابی دخیل باشد.

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه همچنین نشان‌می‌دهند که به‌کاربردن اسکوپولامین همراه با مقدار غیر مؤثر MK801 که به تنهایی اثری روی رفتار اضطرابی ندارد به صورت سینرژیک باعث افزایش درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز می‌شود، بدون اینکه بر رفتار اضطرابی اثری بگذارد؛ این یافته‌ها بیان‌می‌کند که در هیپوکامپ پشتی اسکوپولامین، اثر ضد اضطرابی MK801 را تقویت‌می‌کند. این یافته‌ها می‌تواند نشان‌دهنده برهمکنش بین گیرنده‌های نیکوتینی و موسکارینی در زمینه رفتار اضطرابی در هیپوکامپ پشتی باشد. در حمایت از یافته‌های ما، مبنی بر برهمکنش بین گیرنده‌های NMDA و اسکوپولامین در زمینه رفتار اضطرابی در هیپوکامپ، تعدادی از مطالعات حاکی از این موضوع‌اند که بین گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین و گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA در زمینه ذخیره حافظه درازمدت برهمکنش برجسته‌ای وجوددارد (۲۸). گزارش شده‌است که به‌کاربردن همزمان دوزهای غیر مؤثر اسکوپولامین و MK801 به صورتی مؤثر و معنی‌دار، تخریب حافظه اجتنابی مهاری را سبب‌می‌شود (۲۹). با توجه به اینکه استیل کولین با اثر بر گیرنده‌های موسکارینی، پاسخ ایجادشده از طریق گیرنده‌های NMDA را تقویت‌می‌کند و تسهیل طولانی‌مدت پتانسیل پس سیناپسی تحریکی القاءشده با گلوتامات در هیپوکامپ را موجب‌می‌شود (۳۰)، این احتمال مطرح است که مهار گیرنده‌های موسکارینی نیز بتواند پاسخ ایجادشده با مهار گیرنده‌های NMDA را تقویت‌کند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های ما در این مطالعه حاکی از آن‌اند که آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی و NMDA در هیپوکامپ پشتی، آثار ضد اضطرابی دارند. با توجه به اثری که آنتاگونیست این دو گیرنده در هیپوکامپ پشتی ایجادکرده، می‌توان بیان‌داشت که هر دو گیرنده موسکارینی و NMDA هیپوکامپ پشتی در شرایط فیزیولوژیک، روی رفتار اضطرابی تأثیر دارند؛ به‌علاوه یافته‌های ما نشان‌می‌دهند که آثار ضد اضطرابی این دو آنتاگونیست، زمانی که به‌طور همزمان استفاده می‌گردند، به صورت سینرژیک تقویت می‌شوند که این یافته، حاکی از برهمکنش بین گیرنده‌های موسکارینی و NMDA در زمینه رفتار اضطرابی در هیپوکامپ پشتی است.

منابع

1. Coyle JT, Tsai G, Goff DC. Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets in schizophrenia. Current Drug Targets-CNS &# 38; Neurological Disorders 2002;1:183-9.

2. Fremeau RT, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, et al. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. Neuron 2001;31:247-60.

3. Kent JM, Mathew SJ, Gorman JM. Molecular targets in the treatment of anxiety. Biological psychiatry 2002;52:1008-30.

4. Homayoun H, Moghaddam B. Group 5 metabotropic glutamate receptors: Role in neuronal activity and relevance to cognition. European journal of pharmacology 2010.

5. Moghaddam B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. Neuron 2003;40:881-4.

6. O'Tuathaigh CMP, O'Connor AM, O'Sullivan GJ, Lai D, Harvey R, Croke DT, et al. Disruption to social dyadic interactions but not emotional/anxiety-related behaviour in mice with heterozygous [] knockout'of the schizophrenia risk gene neuregulin-1. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2008;32:462-6.

7. Jouvenceau A, Billard JM, Lamour Y, Dutar P. Persistence of CA1 hippocampal LTP after selective cholinergic denervation. Neuroreport 1996;7:948.

8. Janhunen S, Ahtee L. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: implications for drug development. Neurosci Biobehav Rev 2007;31:287-314.

9. Balerio GN, Aso E, Maldonado R. Involvement of the opioid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. Psychopharmacology (Berl) 2005 Sep;181:260-9.

10. Chae Y, Yeom M, Han JH, Park HJ, Hahm DH, Shim I, et al. Effect of acupuncture on anxiety-like behavior during nicotine withdrawal and relevant mechanisms. Neurosci Lett 2008 Jan 10;430:98-102.

11. Degroot A, Treit D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. Brain Res 2002; 13;949:60-70.

12. Weiner MF, Koss E, Wild KV, Folks DG, Tariot P, Luszczynska H, et al. Measures of psychiatric symptoms in Alzheimer patients: a review. Alzheimer Dis Assoc Disord 1996 Spring;10:20-30.

13. File SE, Kenny PJ, Ouagazzal AM. Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. Behav Neurosci 1998;112:1423-9.

14. Jarvik ME, Caskey NH, Rose JE, Herskovic JE, Sadeghpour M. Anxiolytic effects of smoking associated with four stressors. Addict Behav 1989;14:379-86.

15. Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. Neuroreport 2002; 2;13:1097-106.

16. Rezayof A, Golhasani-Keshtan F, Haeri-Rohani A, Zarrindast MR. Morphine-induced place preference: involvement of the central amygdala NMDA receptors. Brain Res 2007; 16;1133:34-41.

17. Zarrindast MR, Lashgari R, Rezayof A, Motamedi F, Nazari-Serenjeh F. NMDA receptors of dorsal hippocampus are involved in the acquisition, but not in the expression of morphine-induced place preference. Eur J Pharmacol 2007; 30;568:192-8.

18. Azami NS, Piri M, Oryan S, Jahanshahi M, Babapour V, Zarrindast MR. Involvement of dorsal hippocampal alpha-adrenergic receptors in the effect of scopolamine on memory retrieval in inhibitory avoidance task. Neurobiol Learn Mem 2010;93:455-62.

19. Rezayof A, Sharifi K, Zarrindast MR, Rassouli Y. Modulation of ethanol state-dependent learning by dorsal hippocampal NMDA receptors in mice. Alcohol 2008;42:667-74.

20. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (6rd ed.). Academic Press.London.UK. 2007.

21. Molchanov ML, Guimaraes FS. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. Psychopharmacology (Berl) 2002;160:30-8.

22. Bergink V, van Megen HJG. Glutamate and anxiety. European Neuropsychopharmacology 2004;14:175-83.

23. Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JNP, Bannerman DM. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. European journal of pharmacology 2009;3:17-24.

24. Cobb SR, Davies CH. Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. The Journal of Physiology 2005;562:81.

25. Hughes JW, Tomlinson A, Blumenthal JA, Davidson J, Sketch MH, Watkins LL. Social support and religiosity as coping strategies for anxiety in hospitalized cardiac patients. Annals of Behavioral Medicine 2004;28:179-85.

26. Smythe JW, Bhatnagar S, Murphy D, Timothy C, Costall B. The effects of intrahippocampal scopolamine infusions on anxiety in rats as measured by the black–white box test. Brain research bulletin 1998;45:89-93.

27. Degroot A, Treit D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. Brain research 2002;949:60-70.

28. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science 2000;288:1765.

29. Moreira KM, Ferreira TL, Fornari RV, Figueredo LZP, Oliveira MGM. Interaction between M1-muscarinic and glutamatergic NMDA receptors on an inhibitory avoidance task. Brain research bulletin 2005;67:504-8.

30. Markram H, Segal M. Long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine. The Journal of Physiology 1990;427:381.

Daneshvar

Medicine

Muscarinic and NMDA receptors interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze anxiety test

Morteza Piri[1*], Mohammad Nasehi[2], Negar Heidari[3], Maryam-sadat Shahin[4], Mohammad Reza Zarrindast[5]

1. Department of Biology, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.
2. Department of Biology, Islamic Azad University, Garmsar, Iran.
3. Department of Pharmacology and Toxicology, Azad University, Pharmaceutical Science Branch
4. Young Researchers Club, Islamic Azad University, Shahr-e-Rey, Iran.
5. Department of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: biopiri@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Excitatory transmission through glutamate receptors is critical for cognition such as learning and anxiety. In the present study, the involvement of dorsal hippocampal muscarinic cholinergic receptor on anxiety-like behavior induced by inhibition of NMDA receptors was investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, 105 adult male rats weighing 200–250 g were used. The animals were anaesthetized and cannulae implanted bilaterally in the CA1 regions of the dorsal hippocampus using stereotaxic device. Seven days after recovery from surgery, the behavioral testing was started in elevated plus maze task. The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test.

Results: Our finding indicated that intra-CA1 administration of MK801 (2 µg/rat) and scopolamine (4 µg/rat) by itself increased percentage of open arm time and open arm entries but did not alter locomotion. On the other hand, intra-CA1 co-administration of ineffective doses of scopolamine with ineffective dose of MK801 (1 µg/rat) did not alter locomotion activity but increased percentage of open arm time and open arm entries.

Conclusion: These results show that both NMDA receptors and muscarinic cholinergic receptors not only play a part in the modulation of anxiety in the dorsal hippocampus of rats but also demonstrate a complex interaction as well.

Key words: NMDA receptor, Muscarinic cholinergic receptor, Dorsal hippocampus, Anxiety, Rat

Scientific-Research Journal of Shahed University Eighteenth Year, No.89 October, November 2010

Received: 7/8/2010
Last revised: 16/11/2010
Accepted: 21/11/2010

Daneshvar(medicine) shahed University/ 18th year/2010/NO.89