Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No. 5, Dec. – Jan. 2014, Pages: 88-95

The effect of Epigallocatechin-3-Gallate on Spatial Memory after Demyelination Induced by Lysolecithin in Rat Hippocampus Formation

Najmeh Kiamarsian, Shiva Khezri*, Minoo Ilkhanipour

Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 3 Oct, 2013 Accepted: 8 Jan, 2014

Abstract

Background and Objectives: Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disorder in central nervous system characterized by neuroinflammation. In this study, the effect of Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) on learning and spatial memory was investigated following a demyelination induction using lysolecithin injection into the rat hippocampus.

Materials and Methods: In this experimental study, for the demyelination induction, 2µl lysolecithin (LPC) was injected streotaxically into the dentate gyros. Then, animals received 30mg/kg catechin for 7, 14, and 28 days after demyelination induced by lysolecithin. Subsequently, the spatial memory was investigated by a radial maze. Repeated measurement used for statistical evaluation.

Results: The impairment of the spatial memory was more significant 7 and 14 days after the LPC injection. Hence, food finding time has increased significantly compared to the control group (P<0/001). Moreover, the administration of EGCG has improved the spatial memory so that receiving EGCG for a longer time e.g. 28 days after demyelination induction can significantly recover the learning and spatial memory compared to the LPC-receiving group (P<.001).

Conclusion: The long-term administration of EGCG can improve the spatial memory and learning of rats. Hence, it can be suggested as a treatment for demyelinated disease such as MS.

Keywords: Lysolecithin, Demyelination, Hippocampus, Spatial Memory, Multiple Sclerosis, Rat

*Corresponding author:
E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir

مقاله پژوهشی

اثر اپی گالو کاتچین-۳- گالات بر حافظه فضایی پس از القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین در تشکیلات هیپوکامپ موش صحرایی

نجمه کیامرثیان، شیوا خضری*، مینو ایلخانی پور

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

دریافت: ۹۲/۷/۱۱ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۸

چکیده

زمینه و اهداف: مالتیپل اسکلروزیس (ام اس) یک بیماری خود ایمنی سیستم عصبی مرکزی است که از طریق التهاب نورونی تشخیص داده می شود. در این مطالعه اثر اپی گالو کاتچین ۳- گالات (EGCG) بر روند یادگیری و حافظه فضایی به دنبال القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین در هیپوکمپ موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، برای القای دمیلیناسیون ۲ میکرولیتر لیزولسیتین (LPC) بصورت استریوتاکسیک در شکنج دندانه دار هیپوکامپ تزریق شد سپس حیوانات ۳۰ mg/kg، EGCG را بصورت داخل صفاقی و به مدت ۷، ۱۴، ۲۸ روز پس از القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین دریافت کردند، در نهایت حافظه فضایی توسط دستگاه ماز شعاعی بررسی شد. یافته ها با استفاده از آزمون اندازه گیری های مکرر و با سطح معنی داری P<۰/۰۵ مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق لیزولسیتین منجر به دمیلیناسیون موضعی شده و حافظه فضایی را مختل کرد، این اختلال در روزهای ۷ و ۱۴ پس از تزریق لیزولسیتین بارزتر و زمان رسیدن به غذا به طور معناداری نسبت به گروه کنترل بیشتر شد (P<۰/۰۰۱) به علاوه تیمار موش ها با EGCG باعث بهبود حافظه فضایی شد، بطوریکه تزریق EGCG به مدت طولانی یعنی ۲۸ روز بعد از القای دمیلیناسیون، به طور معناداری یادگیری و حافظه فضایی را نسبت به گروه دریافت کننده لیزولسیتین (LPC) بهبود بخشید (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص شد که تیمار طولانی مدت با EGCG می تواند یادگیری و حافظه فضایی موشها را بهبود بخشد، از این رو می تواند به عنوان دارویی برای عارضه های دمیلینه شدن مانند ام اس پیشنهاد شود.

کلید واژه‌ها: لیزولسیتین، دمیلیناسیون، هیپوکامپ، حافظه فضایی، مالتیپل اسکلروزیس، موش صحرایی

***ایمیل نویسنده رابط:** sh.khezri@urmia.ac.ir

مقدمه

میلیناسیون آکسونی در سیستم عصبی مهره داران برای انتقال و هدایت ایمپالس های الکتریکی ضروری است، بطوری که دمیلیناسیون می تواند عارضه هایی مثل مالتیپل اسکلروزیس (ام اس) را پدید آورد (۱). ام اس یک بیماری خود ایمنی و التهابی سیستم عصبی مرکزی است که در آن پوشش میلین از دست رفته یا آسیب دیده است. این بیماری با وجود ضایعات و پلاکهای متعدد در ماده سفید سیستم عصبی مرکزی مشخص می شود که این ضایعات انتقال طبیعی ایمپالس را در طول عصب مختل می-کنند و منجر به آسیب های مغزی و نخاعی می‌شوند و از معمول ترین عارضه های نورولوژیکی در افراد جوان با میانگین سنی حدود ۳۰ سال است (۲). دمیلیناسیون پروسه دژنراتیو و تخریبی است و سلول های اولیگودندروسیتی و غلاف میلین که اطراف آکسون هاست را تخریب می‌کند و یک جنبه تشخیصی و شاخص برای بیماری هایی مثل ام اس است (۳). شواهدی وجود دارد که افزایش استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بیماری های تخریب نورونی از جمله بیماری MS بازی می‌کند (۴). اکسیژن به عنوان یک واسطه است و منجر به اکسیداسیون مولکول ها می شود بطوریکه تولید رادیکال های آزاد در CNS را به دنبال دارد و

پروتئین ها و لیپید ها را تخریب می‌کند. از آن جایی که ۷۰٪ غلاف میلین از ترکیبات لیپیدی تشکیل شده است، لذا تخریب لیپیدها در MS به عنوان عامل مهمی مطرح می‌شود (۵). مدل های تخریب میلین در حیوانات آزمایشگاهی بهترین راه برای کشف چگونگی بیماری و پیدا کردن راه حل‌هایی برای ترمیم میلین می-باشد، که در این میان، مدل‌های موضعی دمیلیناسیون مخصوصا برای سنجش مکانیسم‌های درگیر در پروسه های دمیلیناسیون و رمیلیناسیون سودمند هستند. لیزولسیتین (LPC) یک توکسین خاص برای سلول های میلین ساز همراه با یک اثر کمتر روی دیگر سلول‌های عصبی است. در مقایسه با دیگر توکسین‌ها، لیزولسیتین با اثرات بیشتر روی سلول های میلینی کننده، عموماً کمترین سمیت را روی دیگر سلول‌ها مثل آستروسیت‌ها دارد و می‌تواند دمیلیناسیون و متعاقب آن ترمیم را در بازه زمانی کوتاه تری فراهم کند (۶). لذا در این مطالعه برای القای دمیلیناسیون از لیزولسیتین (Sigma- Aldrich) استفاده شد. یادگیری (Learning) توانایی تغییر رفتار بر اساس تجربه، و حافظه (Memory) یعنی توانایی به یاد آوردن وقایع گذشته به صورت خودآگاه یا ناخودآگاه است. حافظه که بعضی از مواقع به وسیله تغییرات در رفتار حیوان بعد از یادگیری سنجیده می‌شود، منعکس‌کننده فرایندهای زیادی شامل اکتساب، به رمز در آوردن، تثبیت، به یادآوری و عملکرد می‌باشد (۷). ناحیه هیپوکمپ بخشی از سیستم لیمبیک است که نقش فیزیولوژیک آن در بروز رفتارهای هیجانی و دخالت آن در پردازش اطلاعات فضایی و برخی از انواع حافظه و یادگیری مشخص شده است (۸). آسیب های شناختی در ۲۵-۶۰٪ بیماران MS که از ضایعات هیپوکامپ رنج می برند مشخص شده است. این ناحیه یک جایگاه عملکردی مهم برای استرس اکسیداتیو است (۹). اپی گالو کاتچین گالات (EGCG) (Fluka) جزئی از خانواده کاتچین هاست و پلی فنول اصلی چای سبز می‌باشد، سرشار از گروه های هیدروکسیل روی حلقه‌های آروماتیکی‌اش می باشد که به فعالیت آنتی اکسیدانی آن اشاره دارد. EGCG توانایی عبور از سد خونی- مغزی را دارد و می تواند سلول های مغزی را در برابر عوامل نوروتوکسیک محافظت کند (۱۱،۱۰). نشان داده شده است که این ترکیب پلی فنولی دارای فعالیت پاک کنندگی رادیکال های آزاد می‌باشد و توانایی برای فعال کردن آنزیم های آنتی اکسیدانی در نتیجه توقف چرخه معیوب ناشی از استرس اکسیداتیو و آسیب های بافتی دارند (۴). مطالعات نشان داده‌اند که EGCG آنتی آپوپتوتیک، ضد تخریب نورون و ضدالتهاب می باشد (۱۲)، و نقش واسطه‌ای در بیماری هایی که رادیکال های آزاد درگیر هستند بازی می‌کند (۱۳). در سیستم عصبی مرکزی فعالیت ضد التهابی EGCG در شرایط in vivo و in vitro ثابت شده است، برای مثال EGCG می‌تواند ضایعات نورونی ایجاد شده توسط استرس اکسیداتیو را در سلول‌ها و مدل‌های حیوانی در بیماری های تخریب نورونی مثل پارکینسون را محدود کند (۱۴) و به این طریق از آپوپتوزیس و نکروزیس جلوگیری کند. از آنجایی که فرایندهای التهابی در مغز عامل اصلی در پیشرفت بیماری های نورودژنراتیو می باشند، لذا EGCG به واسطه فعالیت آنتی اکسیدانی و کاهش التهاب عصبی از طریق کاهش آزاد سازی سیتوکین ها از جمله اینتر لوکین ۱-بتا، اینترفرون گاما و فاکتور نکروز توموری آلفا می‌تواند اثرات خود را اعمال کند (۱۲). الگوهای رفتاری متعددی برای سنجش حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد و در این مطالعه برای بررسی حافظه فضایی از دستگاه ماز شعاعی استفاده شد. از آن جایی که ساختار هیپوکامپ به عنوان یکی از مواد خاکستری مهم که تحت تاثیر MS قرار می گیرد و یکی از نواحی مغزی در ارتباط با عملکرد حافظه و یادگیری هیپوکامپ است، لذا در این مطالعه بررسی اثر EGCG بر روند بازسازی میلین، یادگیری و حافظه فضایی در هیپوکامپ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

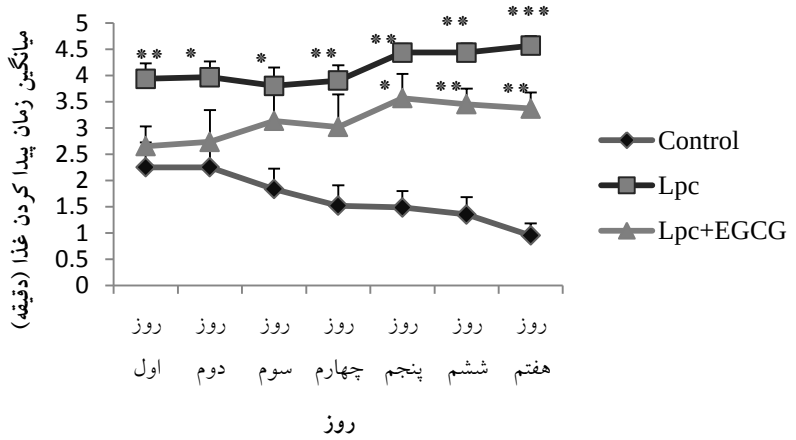
در این آزمایش تعداد ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم مورد بررسی قرار گرفتند. حیوانات محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند و در شرایط کنترل شده نوری و گرمایی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای۱ ± ۲۲ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. کلیه عملیات آزمایشگاهی روی جانوران با رعایت مقررات بین المللی اخلاق علمی و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت. به منظور سازگاری با شرایط محیطی نوری و دمایی و دوری از استرس، حیوانات به مدت ۵ روز و در هر روز ۵ دقیقه در اتاق آزمایش به آزمایشگر، محیط آزمایش و ماز شعاعی سازش داده شدند. یک هفته قبل از آغاز آزمایش های رفتاری حیوانات توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰mg/kg) و زایلزین (۲mg/kg) بیهوش شدند و سپس به منظور جراحی در دستگاه استریوتاکسی (مدل SR-5R (Japan, Narishigo)) قرار گرفتند. همچنین کانول‌های راهنما از سرسوزن های G ۲۳ تهیه شده و پس از اطمینان از باز بودن دو طرف آن، به صورت دو طرفه در ناحیه شکنج دندانه‌دار (DG) هیپوکامپ و با مختصات AP = -۲/۸، ML =±۱/۸، DV= ۲/۵ از سطح جمجمه بر طبق اطلس پاکسینوس قرار داده شده و سپس با سیمان دندانپزشکی فیکس شدند. برای تزریق نیز از سرسوزن‌های ۳۰G دندانپزشکی و سرنگ هامیلتون استفاده شد. فرایند تخریب میلین توسط تزریق مستقیم ۲ میکرولیتر لیزولسیتین ۱٪ در سالین ۰/۹٪ و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه در ناحیه DG هیپوکامپ انجام گرفت. آزمایش ها در گروه های جداگانه انجام گرفت که عبارت بودند از: گروه کنترل که فقط تحت جراحی قرار گرفتند و هیچ تیماری دریافت نکردند؛ گروه لیزولسیتین (LPC) که جراحی شدند و سپس به منظور القای دمیلیناسیون، ۲ میکرولیتر لیزولسیتین در هیپوکامپ آن ها تزریق شد، و هیچ تیماری دریافت نکردند؛ و گروه های تیمار که پس از القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین، دوز ۳۰ mg/kg، EGCG را به صورت درون صفاقی، به مدت ۷، ۱۴، ۲۸ روز دریافت کردند تقسیم شدند (در هر گروه n=۶ بود). جهت انجام بررسی های رفتاری در گروه لیزولسیتین و گروه تیمار حیوانات پس از جراحی یک هفته ریکاوری شدند. پس از آن آزمایش‌های رفتاری با

استفاده از دستگاه ماز شعاعی انجام گرفت. همچنین در گروه تیمار، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق EGCG حیوان در ماز شعاعی قرار گرفت. حیوانات کلیه گروه ها به مدت ۷ روز و در طی ۳ مرحله جهت بررسی روند یادگیری و حافظه فضایی در دستگاه ماز شعاعی قرار گرفتند به طوری که مرحله اول مطالعات رفتاری شامل روزهای ۷-۱ بعد از تزریق لیزولسیتین، مرحله دوم روزهای ۱۸-۱۲ بعد از تزریق لیزولسیتین و مرحله سوم شامل روزهای ۲۸-۲۲ بعد از تزریق لیزولسیتین بود. در فاصله هر مرحله از مطالعات رفتاری به حیوانات استراحت داده شد. دستگاه مورد استفاده در کار تحقیقاتی حاضر، یک رادیال ماز ساخته شده از چوب بود (عرض بازوها۱۰cm، طول بازوها ۵۰cm، ارتفاع دیواره ها۱۳ cm). این وسیله شامل ۸ بازو است که کاملا یکسان هستند و به صورت شعاعی از یک صفحه مرکزی کوچک دایره ای شکل منشعب می‌شوند. این طرح تضمین می‌کند که بعد از اینکه حیوان برای یافتن غذا به یکی از بازوها بر می گردد، برای اینکه به بازوی دیگر برود مجبور است به صفحه مرکزی برگردد. در نتیجه حیوان همیشه ۸ گزینه ممکن را دارد. یک بازوی ثابت با یک ظرف مخفی همیشه محتوی غذاست (۱۵). رت ها به مدت ۲ روز مرحله ی خوگیری را تجربه کردند. روز اول غذا در تمام قسمت های ماز به صورت پراکنده قرار داده شد و به رت ها اجازه داده شد که به دنبال غذا بگردند. به منظور فراهم آوردن انگیزه لازم برای جستجو کردن حیوان میزان غذای حیوان تا ۸۵٪ کاهش یافت. تیمار بر روی موش ها بعد از ۲ روز خوگیری، شروع شد و رفتار حیوانات به مدت ۷ روز و در طی ۳ مرحله انجام گرفت. هنگام تست رفتاری، رفتار حیوان بوسیله یک دوربین دیجیتال در بالای رادیال ماز و سوار شده روی سقف، فیلم برداری شده و پس از اتمام تست های رفتاری فیلم به کامپیوتر منتقل و مشاهده شد و اطلاعات مورد نیاز یادداشت گردید که شامل زمان یافتن بازوی مورد نظر و محتوی غذا بود. پس از اتمام آزمایشات رفتاری از ۰/۵ میکرولیتر ماده رنگی متیلن بلو، به منظور مشخص شدن موقعیت کانول استفاده شد تا موقعیت کانول در ناحیه DG تایید شود. حیوانات کشته شده و مغزشان در فرمالین ۱۰٪ فیکس و برش هایی از مغز تهیه شد تا از صحت جایگیری مناسب کانول در ناحیه DG هیپوکامپ اطمینان حاصل شود. تنها حیواناتی که ناحیه تزریق در ناحیه DG هیپوکامپ قرار داشت، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل آماری یافته های حاصل از این پژوهش از آزمون اندازه گیری های مکرر و آزمون تعقیبی Bonferroni استفاده شد. داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (Mean±SEM) ارائه شده و P<۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

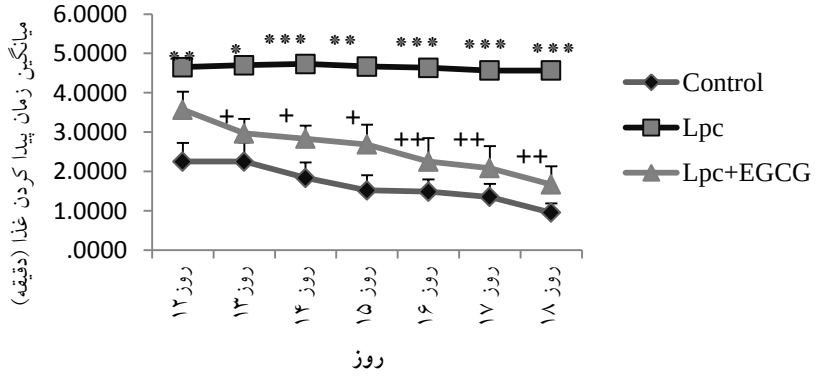
یافته‌ها

یافته‌های ما در این مطالعه نشان داد که تزریق لیزولسیتین علاوه بر تخریب میلین، باعث تخریب حافظه و یادگیری حیوانات پس از آموزش شد و بعضی از شاخص های یادگیری و حافظه مانند مسافت طی شده در ماز شعاعی و زمان سپری شده تا رسیدن به غذا را بطور معنی داری تغییر داد. این تغییرات توسط دستگاه ماز شعاعی سنجیده شد. به گونه ای که پس از تزریق LPC و القای دمیلیناسیون عملکرد موش ها در ماز شعاعی نسبت به قبل از آموزش و همچنین نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت، که ممکن است به علت تخریب ناحیه هیپوکامپ در اثر افزایش گونه های فعال اکسیژن و از بین رفتن بعضی از سیستم های نورونی دخیل در یادگیری باشد. در حالیکه پس از تیمار با EGCG روند یادگیری و حافظه، به تدریج، به ویژه در طولانی مدت (۲۸ روز) در مقایسه با گروه دریافت کننده لیزولسیتین بهبود یافت. با توجه به شکل ۱ بررسی میانگین ها در مرحله اول تست های رفتاری (روزهای ۱ تا ۷) بر اساس آنالیز واریانس تکراری به تفکیک هر روز نشان داد که در گروه دریافت کننده لیزولسیتین (LPC) زمان پیدا کردن غذا به تدریج افزایش یافت و در همه روزها (روز ۱ تا ۷) دارای تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۱ و P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵) با گروه کنترل بود. در گروه تیمار (LPC+EGCG))(که پس از القای دمیلیناسیون به مدت ۷ روز EGCG دریافت کردند) نیز زمان پیدا کردن غذا به تدریج نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، به طوریکه در روزهای ۵ تا ۷ دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل در همین روزها (P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵) بود. مقایسه میانگین ها در کل ۷ روز نشان داد که گروه کنترل در طی این مدت بهترین عملکرد و گروه LPC ضعیف ترین عملکرد را در پیدا کردن غذا در ماز شعاعی داشتند،LPC (P<۰/۰۰۱) و گروه تیمار (P<۰/۰۱) افزایش معنی داری در زمان یافتن غذا نسبت به گروه کنترل داشتند. گروه تیمار نیز در کل ۷ روز کاهش معنی داری (P<۰/۰۱) در زمان پیدا کردن غذا نسبت به گروه LPC داشت. مقایسه میانگین ها در مرحله دوم تست های رفتاری (روزهای ۱۲ تا ۱۸) به تفکیک هر روز نشان داد که درگروه (LPC) زمان پیدا کرده غذا به تدریج نسبت به گروه کنترل و تیمار افزایش یافت و در همه روزها (روز ۱۲ تا ۱۸) دارای تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵) با گروه کنترل در این روزها و از روز ۱۳ تا ۱۸ نیز دارای تفاوت معنی دار (P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵) با گروه تیمار در همان روزها بود. در گروه تیمار (که پس از القای دمیلیناسیون به مدت ۱۸ روز EGCG دریافت کردند) نیز زمان پیدا کردن غذا به تدریج در مقایسه با گروه LPC در همه روزها کاهش یافت ولی از گروه کنترل بیشتر بود، اما تفاوت معنی داری با کنترل نداشت (شکل ۲). همچنین بررسی میانگین ها در کل ۷ روز نشان داد که گروه LPC افزایش معنی داری (P<۰/۰۰۱) در زمان رسیدن به غذا نسبت به گروه کنترل داشت. در حالیکه در گروه تیمار، با توجه به کاهش زمان پیدا کردن غذا، تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. همچنین گروه تیمار نیز کاهش معنی داری (P<۰/۰۰۱) در یافتن غذا نسبت به گروه LPC داشت. با توجه به شکل ۳ مقایسه زمان پیدا کردن غذا درمرحله سوم تست های رفتاری (روزهای ۲۲ تا ۲۸) به تفکیک هر روز نشان داد که در گروه LPC زمان پیدا کردن غذا در کل ۷ روز به تدریج کاهش یافت ولی در همه روزها (روز ۲۲ تا ۲۸) دارای تفاوت معنی دار

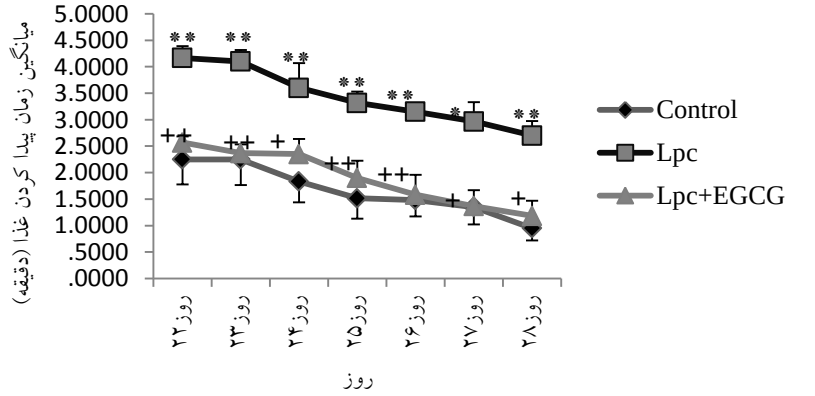
(P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵) با گروه کنترل و گروه تیمار در همین روزها بود. در گروه تیمار (که پس از القای دمیلیناسیون به مدت ۲۸ روز EGCG دریافت کردند) نیز زمان پیدا کردن غذا به تدریج در همه روزها کاهش یافت، به طوریکه در همه روزها نزدیک به گروه کنترل بود. همچنین آنالیزها در کل ۷ روز نشان داد که عملکرد گروه تیمار و کنترل بسیار به هم نزدیک بود و تفاوت معنی داری نداشتند، ولی گروه LPC دارای افزایش معنی داری (P<۰/۰۰۱) در زمان رسیدن به غذا نسبت به گروه کنترل و تیمار داشت. بنابراین می توان نتیجه گرفت که تزریق طولانی مدت EGCG به مدت ۲۸ روز باعث عملکرد بهتر موش ها در یافتن غذا شد.



شکل ۱: مقایسه میانگین تغییرات زمان پیدا کردن غذا در گروه های مختلف در مرحله اول تست های رفتاری (روزهای ۱ تا ۷) به تفکیک هر روز. داده ها به صورت mean ± SEM بیان شده اند. P<۰/۰۵* و P<۰/۰۱** و P<۰/۰۰۱*** در مقایسه با گروه کنترل در همان روز.



شکل ۲: مقایسه میانگین تغییرات زمان پیدا کردن غذا در گروه های مختلف در مرحله دوم تست های رفتاری (روزهای ۱۲ تا ۱۸) ، به تفکیک هر روز. داده ها به صورت mean ± SEM بیان شده اند. P<۰/۰۵* و P<۰/۰۱** و P<۰/۰۰۱*** در مقایسه با گروه کنترل در همان روز، P<۰/۰۵+ و P<۰/۰۱++ در مقایسه با گروه LPC در همان روز.



شکل ۳: مقایسه میانگین تغییرات زمان پیدا کردن غذا در گروه های مختلف در مرحله سوم تست های رفتاری (روزهای ۲۲ تا ۲۸)، به تفکیک هر روز. داده ها به صورت mean ± SEM بیان شده اند. P<۰/۰۵* و P<۰/۰۱** در مقایسه با گروه کنترل در همان روز، P<۰/۰۵+ و P<۰/۰۱++ در مقایسه با گروه LPC در همان روز.

بحث

نواحی مختلف مغزی در یادگیری و حافظه دخالت دارند، یکی از نواحی مغزی مورد توجه در ارتباط با عملکرد حافظه و یادگیری هیپوکامپ است که این ساختار نقش اساسی در پردازش اطلاعات فضایی دارد. ساختار هیپوکامپ به عنوان یکی از مواد خاکستری مهم که تحت تاثیر MS قرار می گیرد شناخته شده است (۱۶). آسیب های شناختی در ۶۰-۲۵٪ بیماران MS مشاهده شده است که از ضایعات هیپوکامپ رنج می‌برند. همچنین این ناحیه یک جایگاه عملکردی مهم برای استرس اکسیداتیو است (۹). لذا در مطالعه حاضر بررسی اثرEGCG بر روند بازسازی میلین در ساختار هیپوکامپ و یادگیری و حافظه فضایی موش صحرایی بعد از القای دمیلیناسیون با تزریق موضعی لیزوستین انجام شد. LPC نفوذ سلول های T را با فعال شدن ماکروفاژها و میکروگلیاها القا می‌کند. فعال شدن میکروگلیاها منجر به ترشح انواعی از سیتوکین ها از جمله اینترلوکین ۱-بتا (IL- 1β)، اینترفرون گاما (IFγ)، فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-α) و همین طور باعث افزایش گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شود، در نتیجه منجر به عملکرد غیر طبیعی هیپوکامپ و به دنبال آن اختلال در حافظه و یادگیری می شود (۱۷). با توجه به نتایج این تحقیق، آنالیزهای رفتاری در روزهای ۱ تا ۷ پس از القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین نشان داد که تزریق داخل هیپوکامپی لیزولستین موجب کاهش یادگیری و حافظه فضایی شد، به گونه ای که زمان رسیدن به غذا به تدریج افزایش یافت. همچنین بررسی های رفتاری در روزهای ۱۲ تا ۱۸ پس از القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین نشان داد که موش ها در این روز ها به سختی قادر به یافتن غذا در ماز شعاعی شدند و نشان داد که لیزولسیتین در این روزها بیشترین اثر تخریبی در هیپوکامپ داشته است. به نظر می رسد که این افزایش در زمان رسیدن به غذا ناشی از دمیلیناسیون و تخریب ناحیه هیپوکامپ در اثر افزایش گونه های فعال اکسیژن و از بین رفتن بعضی از سیستم های نورونی دخیل در یادگیری باشد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد، حیواناتی که فقط LPC دریافت کرده بودند و دمیلیناسیون در آن ها القا شده بود در طولانی مدت یعنی ۲۸ روز عملکردشان از نظر زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی بهبود یافت، که می تواند به دلیل رمیلیناسیون ذاتی در هیپوکامپ باشد. چون مغز دارای سلول های بنیادی عصبی است که به طور خود به خودی می توانند به ناحیه آسیب مهاجرت کرده و به سلول مورد نظر متمایز شوند (۱۸). Makinodon و همکاران در سال ۲۰۰۸ یک دمیلیناسیون موضعی را در ناحیه هیپوکامپ با تزریق لیزولسیتین القا کردند. همچنین مشاهده کردند که مطابق تزریق لیزولسیتین حافظه و یادگیری مختل می شود. آن ها نشان دادند که منحصراً فعال شدن سلول‌های میکروگلیا برای القای تغییرات رفتاری بدون تحریک میلین در هیپوکامپ کافی است (۱۹). آزمایشات مشابهی نیز توسط Mozafari و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از روش فوق انجام شد و تاثیر لیزولسیتین را در تخریب میلین نشان دادند (۲۰). نتایج پژوهش حاضر با یافته های Makinodon و Mozafari مطابقت دارد، به طوری که در این تحقیق تزریق لیزولستین علاوه بر تخریب میلین، باعث افزایش زمان پیدا کرده غذا در ماز شعاعی شده و حافظه و یادگیری مختل شد. مطالعات فارماکولوژیکی نشان می‌دهد که سیستم‌های کولینرژیک و گلوتامینرژیک مغز در حافظه و یادگیری دخیل می-باشد. رهایش استیل کولین در هیپوکامپ، جسم مخطط و آمیگدال وجود دارد و از این طریق پردازش انواع مختلفی از حافظه و یادگیری را تعدیل می‌کند. تغییر در توانایی یادگیری و حافظه شاید با تخریب نورون های کولینرژیک در هیپوکامپ مرتبط باشد (۲۱)، زیرا این نورون ها ساختارهای اساسی برای یادگیری و حافظه فضایی هستند. همچنین فعالیت سیستم کولینرژیک در طی استرس اکسیداتیو تغییر می‌یابد (۲۲-۲۱). عملکرد نا به جای سیستم گلوتامینرژیک از طریق فعال سازی رسپتور ,AMPA باعث فعال سازی میکروگلیاها می شود، که منجر به مرگ الیگودندروسیت ها می شود (۲۳). از آن جایی که تزریق لیزولسیتین، از طریق فعال سازی میکروگلیاها منجر به ترشح فاکتورهای التهابی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و همچنین با توجه به حساس بودن هیپوکامپ نسبت به استرس اکسیداتیو (۱۷) و تغییر فعالیت سیستم کولینرژیک در طول شرایط اکسیداتیو، لیزولسیتین ممکن است از طریق مداخله با سیستم کولینرژیکی و گلوتامینرژیک موجب کاهش یادگیری و حافظه فضایی شود. از طرف دیگر اپی گالوکاتچین گالات (EGCG) یک ترکیب طبیعی در چای سبز می‌باشد که به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانی قوی شناخته شده است. این ترکیب پلی فنولی دارای فعالیت پاک کنندگی رادیکال های آزاد می باشد و توانایی برای فعال کردن آنزیم های آنتی اکسیدانی دارد (۴). در مطالعه حاضر دوز ۳۰mg/kg، EGCG به صورت درون صفاقی و پس از القای دمیلیناسیون با لیزولسیتین استفاده شد، که به تدریج علاوه بر ترمیم میلین در طی هر سه دوره رفتاری، سبب بهبود کارایی حیوان در ماز شعاعی شد، به گونه‌ای که این اثرات به صورت وابسته به زمان اعمال شد. حیواناتی که EGCG را به مدت ۲۸ روز دریافت کرده بودند، علاوه بر این که افزایشی در میلین سازی داشتند، در زمان رسیدن به غذا بهترین عملکرد را نسبت به گروه های قبل داشتند، به طوری که عملکردشان نزدیک به گروه کنترل بود ولی نسبت به گروه دریافت کننده LPC در همین مدت دارای تفاوت معنی دار بود. EGCG احتمالاً به واسطه فعالیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی خود، استرس اکسیداتیو و دمیلیناسیون القا شده در اثر تزریق LPC را از طریق کاهش رهاسازی فاکتورهای التهابی و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بهبود می بخشد، در نتیجه منجر به ترمیم شده، و حافظه و یادگیری را بهبود می بخشد. در مطالعه حاضر ثابت کردیم که تیمار طولانی مدت با EGCG به مدت ۲۸ روز کارایی حیوان را در ماز شعاعی بهبود می بخشد. ثابت شده که EGCG یک داروی موثر است که تغییرات رفتاری را در مغز موش ها آرام می کند، که می تواند ناشی از تاثیر بر روی نوروترانسمیترهای کولینرژیک و گلوتامینرژیک، در نتیجه بهبود عملکرهای شناختی در مغز باشد (۲۴). مطالعات بالینی و

آزمایشگاهی نشان می دهند که عملکرد نورون های کولینرژیک در طی یادگیری تغییر می یابند و این نورون ها فعال تر از حالت استراحت می گردند. به عنوان نمونه آزاد سازی استیل کولین در هیپوکامپ در طی یادگیری فضایی افزایش می‌یابند و این افزایش استیل کولین با بهبود عملکرد در طی یادگیری رابطه مستقیمی دارد (۲۴). استیل کولین استراز (AchE) یک نقش خیلی مهم در سیکل استیل کولین بازی می‌کند که شامل آزادسازی استیل کولین (Ach) می باشد. همچنین فعالیت سیستم AchE در شرایط پاتولوژیکی از جمله بیماری های تخریب نورونی کاهش می‌یابد (۲۵-۲۴). مطالعات قبل نشان می‌دهد که فعالیت AchE به واسطه تیمار با EGCG افزایش می‌یابد. EGCG به طور قابل توجهی بازیافت کولین را در پایانه پیش سیناپسی برای سنتز Ach افزایش می دهد. از سوی دیگر AchE آنزیمی است که در برابر استرس اکسیداتیو حساس است، در نتیجه EGCG در اثر فعالیت آنتی اکسیدانی و پاکسازی رادیکال های آزاد، فعالیت آنزیم های کاتالیتیکی را در نتیجه افزایش سطوح استیل کولین افزایش می‌دهد (۲۴). همچنین از آنجایی که EGCG به عنوان آنتاگونیست رسپتور AMPA گلوتامات عمل می کند، می تواند به واسطه اثر ضد التهابی و آنتی اکسیدانی خود باعث محدودیت تحریک واسطه های گلوتامات در نورون‌ها در نتیجه کاهش فاکتورهای التهابی باشد، که در اثر آن باعث بهبود یادگیری و حافظه ناشی از اختلال ایجاد شده با لیزولسیتین می شود (۲۶). تجربیات قبلی در خصوص تیمار با EGCG نشان داده بودند که تزریق این ماده به صورت داخل صفاقی(۲۷ و ۱۱)، خوراکی (۱۰) یا مرکزی در نواحی داخل بطنی (۲۸) از طریق کاهش سطوح گونه های فعال اکسیژن و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، آنژیوژنز و نوروژنز را در هیپوکامپ تسریع می کند، در نتیجه می‌تواند منجر به تعدیل پاسخ های رفتاری شود (۲۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که تیمار با EGCG موجود در چای سبز به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی، پس از القای دمیلیناسیون در ناحیه‌ی هیپوکامپ، علاوه بر این که باعث ترمیم میلین در این ناحیه می شود، توانایی یادگیری و حافظه را نیز بهبود می بخشد، که این اثرات به ویژه در طولانی مدت اعمال می‌شوند. پس به طور کلی EGCG فعالیت سلول های مغز به ویژه مربوط به حافظه را تقویت می‌کند، از طرفی خاصیت آنتی اکسیدانی بالای آن مانع از تخریب سلول های مغز می شود. همچنین EGCG با خنثی کردن رادیکال های آزاد حالت ارتجاعی رگ ها را حفظ کرده، موجب خون رسانی بهتر به مغز و اعصاب شده و به طور غیر مستقیم از کاهش توانایی فکری جلوگیری می کند (۲۹). بنابراین با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی EGCG نتایج این مطالعه با اثر تقویتی ترکیبات آنتی اکسیدانی روی حافظه و یادگیری مطابقت دارد و می‌تواند اثرات ترمیم نورونی در برابر اختلالات دمیلیناسیون اعمال کند، از این رو می‌تواند به عنوان درمانی برای بیماران MS و سایر بیماری های نورودژنراتیو پیشنهاد شود.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است. بدین وسیله از مساعدت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodrigez M, Weinshenkwr BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; **343**: 938-952.
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002; **359**: 1221-1231.
3. Tomassini V, Pozzilli C. Sex hormones: brain damage and clinical course of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009; **286**: 35-39.
4. Kovacsova M, Barta A, Parohova J, Vrankova S, Pechanova O. Neuroprotective mechanisms of natural polyphenolic. *Act Nerv Super Rediviva* 2010; **53**(3): 181-186.
5. Carlson NG, Rose JW. Antioxidants in multiple sclerosis: do they have a role in therapy? *CNS Drugs* 2006; **20**: 433–441.
6. Woodruff RH, Franklin RJM**.** The expression of myelin protein mRNAs during remyelination of lysolecithin-induced demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; **25**: 226-235.
7. Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 2001; **11**: 180-187.
8. Bliss TVP, Callingridge GL. Synaptic model of memory: long – term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; **361**: 31-39.
9. Vercellino M, Plano F, Votta B, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; **64**: 1101-1107.
10. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Hara Y, Shido O. Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Abeta1-40 in rats. *J Nutr Biochem* 2008; **19**: 619-626.
11. Lee S, Suh S, Kim S. Protective effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 2000; **287**: 191-194.
12. Chio D, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzeimer's disease. *Brain Res Rev* 2012; **87**: 144-153.
13. Yuan JH, Li YQ, Yang XY. Inhibition of epigallocatechin gallate on orthotropic colon cancer by

upregulating the Nrf2-UGT1A signal pathway in nude mice. *Pharmacol* 2007; **80**(4): 269-278.

14. Choi JS, Choi YJ, Shin SY. Dietary flavonoids differentially reduce oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells: role of MAPK- and JAK/STAT-signaling. *J Nutr* 2008; **138**(6): 983-990.
15. Alan B, Bond- Robert G, Cook M, Lamb R. Spatial memory and the performance of rat and pigeons in the radial arm maze. *A Learn Beh**av*** 1981; **4**: 575-580.
16. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tiraihi T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local Injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol* 2010; **30**: 289-299.
17. Ghasemlou N, Jeong SY, Lacroix S, Davis S. T cells contribute to lysophosphatidylcholine-induced macrophage activation and demyelination in the CNS. *Glia* 2007; **55**: 294-302.
18. Seaberg RM, Van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: The ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* 2002; **22**: 1784-1793.
19. Makinodon M, Tatsumi K, Okuda H, Manabe T, Yamauchi T, Noriyama Y, et.al. Lysophosphatidylcholin induces delayed myelination in the juvenile ventral hippocampus and behavioral alteration in adulthood. *Neurochem Int* 2008; **53**: 374-381.
20. Mozafari S, Javan M, Sherafat MA, Mirnajafi-Zadeh J, Heibatollahi M, Pour-Beiranvand S, et.al. Analysis of structural and molecular events associated with adult rat optic chiasm and nerves demyelination and remyelination; possible role for 3rd ventricle proliferating cells. *Neuro Mol Med* 2011; **13**:138-150.
21. Gold PE. Acetylcholine modulation of neural systems in volved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 2003; **80**: 194-210.
22. Turchi J, Saunders RC, Mishkin M. Effects of cholinergic deafferentation of the rhinal cortex on visual recognition memory in monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 2158–2161.
23. Tseng KY, Lewis BL, Lipska BK, O'Donnell. Post-pubertal disruption of medial prefrontal cortical dope mine-glutamate interactions in a developmental animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007; 62: 730–738.
24. Kalaiselvi P, Srividhya R, Gayathri R. Impact of epigallo catechin-3-gallate on acetylcholine-acetylcholin esterase cycle in aged rat brain. *Neurochemical Int* 2012; **60**: 517-522.
25. Herholz K, Weisenbach S, Kalbe E, Diederich NJ, Heiss WD. Cerebral acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment. *Neuro Report* 2005; **16**: 1431-1434.
26. Bae JH, Mun KC, Park WK, Lee SR, Suh SI, Baek WK, et.al. EGCG attenuate AMPA-induced intracellular calcium in hippocampal neurons**.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **290**: 1506-1012.
27. He M, Zhao L, Yao W, Zhao H, Chen F, Wei M . Protective effects of epigallocatechin-3-gallate on D-galactose-induced neuronal apoptosis in mice**.** *Neural Regen Res* 2009; **4**: 1024-1029.
28. Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetzel PM, et.al. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; **173**: 5794-5800.
29. Van praag H, Lucero MJ, Yeo GW. Plant-derived flavanol (-) epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J Neurosci* 2007; **27**: 5869–5878.