

Effects of Intra-hippocampal Administration of Alpha-pinene on Learning and Memory Performances in Adult Male Rats

Royah Ahmadi-kanali¹,
Mehdi Abbasnejad²,
Saeed Esmacili-Mahani²,
Ali Mohammad Pourrahimi³,
Razieh Kooshki⁴

¹MSc in Animal Physiology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

² Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

³ Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received May 15, 2021 ; Accepted June 18, 2021)

Abstract

Background and purpose: Alpha-pinene (α -pinene) is a bicyclic monoterpene present in essential oils of some aromatic plants. α -pinene is involved in modulation of some neurophysiological processes in animals. This study assessed the effect of intra-CA1 administration of α -pinene on spatial and passive avoidance learning and memory, and induction of *long-term* potentiation (*LTP*) in hippocampal CA1 region.

Materials and methods: Male Wistar rats were cannulated in the CA1 area of hippocampus. Then, α -pinene (0.1, 0.2, and 0.4 μ g) was injected in *four consecutive days*. Passive avoidance and spatial learning and memory were assessed by shuttle box and Morris water maze (MWM) tasks, respectively. Also, *in vivo* recording of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) in hippocampal CA1 region was done.

Results: In MWM test, α -pinene decreased latency time and travelled distance to find the hidden platform ($P < 0.05$). In the shuttle box, α -pinene increased the step thought latency and decreased the time spent in dark chamber of maze compared to the control group ($P < 0.001$). There were no significant differences in induction of LTP in the CA1 area of the hippocampus between the controls and α -pinene group ($P > 0.05$).

Conclusion: Intra-CA1 administration of α -pinene affected learning and memory of rats. However, α -pinene did not induce significant alteration in *induction of LTP* in hippocampal CA1 region.

Keywords: α -pinene, CA1, learning and memory, rats

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (200): 26-37 (Persian).

* Corresponding Author: Razieh Kooshki - Faculty of Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran
(E-mail: kooshki.r@lu.ac.ir)

اثر تزریق داخل هیپوکمپی آلفاپین بر عملکرد حافظه و یادگیری موش های صحرایی نر بالغ

رویا احمدی کنهعلی¹

مهدی عباس نژاد²

سعید اسماعیلی ماهانی²

علی محمد پوررحیمی³

راضیه کوشکی⁴

چکیده

سابقه و هدف: آلفاپین یک مونوترین دو حلقه ای است که در اسانس برخی از گیاهان آروماتیک وجود دارد. آلفاپین در تعدیل برخی از فرآیندهای نوروفیزیولوژیک در جانوران درگیر است. در این مطالعه، اثر تزریق داخل CA1 آلفاپین بر حافظه و یادگیری فضایی و اجتنابی و القا تقویت سیناپسی طولانی مدت (LTP) در ناحیه CA1 هیپوکمپ بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، موش های صحرایی نر بالغ در ناحیه CA1 هیپوکمپ کانول گذاری شدند. سپس، آلفاپین (0/2µg، 0/1µg، 0/05µg) به مدت چهار روز متوالی تزریق شد. حافظه و یادگیری فضایی و اجتنابی غیرفعال به ترتیب توسط آزمون های ماز آبی موریس و دستگاه شاتل باکس مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، ثبت *vivo in* پتانسیل های پس سیناپسی تحریکی در ناحیه CA1 هیپوکمپ انجام شد.

یافته ها: آلفاپین زمان و مسافت طی شده تا رسیدن به سکو پنهان را در تست ماز آبی موریس کاهش داد ($P < 0/05$). همچنین، آلفاپین، زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک را افزایش و مدت زمان گذرانده شده در ناحیه تاریک جعبه شاتل باکس را در مقایسه با کنترل کاهش داد ($P < 0/001$). باین وجود، بین گروه کنترل و آلفاپین، تغییر معنی داری در روند القا LTP در ناحیه CA1 هیپوکمپ مشاهده نشد ($P > 0/05$).

استنتاج: تزریق داخل CA1 هیپوکمپ آلفاپین بر حافظه و یادگیری در موش های صحرایی موثر بود. با این وجود، آلفاپین تغییر معنی داری در القا LTP در ناحیه هیپوکمپ ایجاد نکرد.

واژه های کلیدی: آلفاپین، CA1، حافظه و یادگیری، موش صحرایی

مقدمه

توانایی تغییر رفتار در پاسخ به تجربه می باشد، در حالی که حافظه، توانایی حفظ و ذخیره رفتار یاد گرفته شده است.

حافظه و یادگیری از تکامل یافته ترین و پیچیده ترین عملکردهای سیستم عصبی هستند. در یک تعریف، یادگیری

E-mail: kooshki.r@lu.ac.ir

مؤلف مسئول: راضیه کوشکی - خرم آباد: دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه

1. کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

2. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

3. استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

4. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: 1400/2/25 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/3/10 تاریخ تصویب: 1400/3/28

یادگیری را در پیاز بویایی و هیپوکامپ افزایش دهد (11). در دیگر بررسی، آلفاپین میزان خواب بدون حرکات سریع چشم (non-REM) (non-rapid eye movement) را بدون تاثیر در شدت خواب با حرکات سریع چشم (REM) افزایش داده است (10). اخیراً گزارش شده است استنشاق آلفاپین به صورت وابسته به غلظت، در یک مدل القا آلزایمر عملکرد شناختی موش‌های سوری را در آزمون Y-maze بهبود می‌دهد (12). همچنین تجویز خوراکی مزمن آلفاپین در موش‌های صحرایی پارکینسونی، سطح مالون آلدهید در جسم مخطط و هیپوکامپ را کاهش و موجب بهبود حافظه اجتنابی و اختلالات حرکتی شده است (13).

مستندات موجود نشان می‌دهند که آلفاپین می‌تواند بر فرآیندهای شناختی موثر باشد و از طرفی مقداری از پین‌ها از جمله آلفاپین از طریق رژیم غذایی وارد بدن می‌شود. با این وجود، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر تزریق مرکزی آلفاپین بر روند حافظه و یادگیری انجام نشده است. در این مطالعه، به منظور بررسی دقیق‌تر اثرات آلفاپین بر حافظه و یادگیری و روندهای شناختی، اثرات تزریق داخل هیپوکامپ آلفاپین بر عملکرد حافظه و یادگیری فضایی و اجتنابی و همچنین بر روند القا LTP در ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش‌های صحرایی نر بالغ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه

در این پژوهش، موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (با محدوده سنی 3 ماه)، با میانگین وزنی 220 تا 260 گرم که از مرکز نگهداری و تکثیر حیوانات کرمان تهیه شدند، مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات در قفس‌های مخصوص در شرایط 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد در حیوان‌خانه نگهداری شدند و آزادانه به غذا و آب دسترسی داشتند. غذای حیوانات از کارخانه خوراک دام و طیور جوانه

اساس ایجاد یادگیری و حافظه، تغییر در قدرت ارتباطات سیناپسی است. مشخص شده است اعمال تحریک‌های کوتاه مدت و فعال شدن مسیرهای تحریکی در برخی نواحی سیستم لیمبیک و قشر مخ می‌تواند با افزایش پایدار فعالیت سیناپس‌ها همراه باشد. این افزایش کارآیی سیناپس‌ها تقویت طولانی مدت (LTP) (long-term potentiation) است که نوعی از انعطاف‌پذیری سیناپسی است که بیش‌ترین ارتباط را با شکل‌گیری حافظه در مغز دارد. این پاسخ در بخش‌های زیادی از سیستم عصبی اتفاق می‌افتد، اما با بیش‌ترین جزئیات در هیپوکامپ مطالعه شده است (1-3). عوامل مختلفی در ایجاد و شکل‌گیری فرایند حافظه و یادگیری مؤثر می‌باشند. به‌ویژه مشخص شده است که استفاده از ترکیبات گیاهی می‌تواند با بهبود عملکردهای شناختی در هر دو شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک همراه باشد (4،5). گیاهان دارویی یک منبع وسیع، نسبتاً ارزان، در دسترس و حیاتی از ترکیباتی هستند که برخی از آن‌ها می‌توانند در دوز مؤثر روند تخریب عصبی را کاهش دهند. ترکیبات مؤثر گیاهان دارویی در ایجاد تعادل بیولوژیک و دفاع اکسیدانی مؤثر می‌باشند و از انباشته شدن سموم دارویی در بدن جلوگیری می‌کنند (6-8). ویژگی‌های اثربخش بسیاری از اسانس‌های گیاهی به طور عمده به دلیل ترکیبات مونوترپن موجود در این ترکیبات می‌باشد (9).

آلفاپین یک مونوترپن دو حلقه‌ای است که در اسانس برخی از گیاهان آروماتیک و درختان مخروط دار وجود دارد. مطالعات اخیر نشان می‌دهند اعمال *in vitro* و یا *in vivo* آلفاپین بر نمونه‌های جانوری با بهبود عملکردهای فیزیولوژیک همراه است (10). به‌طور ویژه، آلفاپین در تنظیم برخی از پاسخ‌های نوروفیزیولوژیک در جانوران درگیر می‌باشد. مشخص شده است که استنشاق آلفاپین در موش برای یک ساعت می‌تواند بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF)، از مهم‌ترین مولکول‌های درگیر در فرایند حافظه و

پارس تهیه و به صورت پلیت‌های فشرده در اختیار موش‌ها قرار داده شد. همه آزمایش‌ها مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شهید باهنر کرمان قرار گرفت (IR.UK. VETMED.REC.1400.005).

جراحی و کانول‌گذاری دوطرفه

تحت بیهوشی عمیق با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (65 mg/kg) (آلفاسان، هلند) و زایلازین (10mg/kg) (آلفاسان، هلند)، سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی ثابت شد. نقاط برگما و لامبدا روی سطح جمجمه تعیین و مختصات ناحیه CA1 با استفاده از اطلس پاکسینوس - واتسون تعیین شد (DV= 3/2mm, ML=±2/2mm, AP=3/8 mm) (15). محل قرار گرفتن پیچ‌های عینک (برای تثبیت کانول‌ها) و ناحیه CA1 به صورت دو طرفه روی جمجمه علامت‌گذاری شدند. سپس، محل تعیین شده برای ناحیه CA1 به وسیله مته دندانپزشکی سوراخ و کانول‌ها در محل تعیین شده به آرامی تا یک میلی‌متر کم‌تر از عمق مورد نظر پایین برده شدند. پس از انجام عملیات کانول‌گذاری، با استفاده از سیمان دندانپزشکی کانول‌های کار گذاشته شده ثابت شدند. بعد از جراحی حیوانات در قفس‌های انفرادی نگهداری و پس از یک هفته دوره بهبودی آزمایش‌های تجربی شروع شد. حیواناتی که هرگونه اثرات جانبی مرتبط با کانول‌گذاری نشان می‌دادند، از آزمایش کنار گذاشته می‌شدند. همچنین بعد از اتمام آزمایش‌های رفتاری، مغز حیوانات جدا و مکان کانول‌گذاری با تزریق متیلن بلو بررسی شد.

گروه‌های مورد آزمایش

حیوانات به طور تصادفی در 5 گروه 6 تایی به شرح ذیل تقسیم‌بندی شدند:

گروه کنترل: حیوانات نرمال بدون جراحی و هیچ‌گونه تیمار، گروه شاهد: در این گروه موش‌ها جراحی شده و پس از دوره‌ی بهبودی نرمال سالیان به شکل مرکزی

دریافت کردند، گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینین: در این گروه‌ها موش‌ها جراحی شده و پس از دوره بهبودی آلفاپینین (سیگما، آمریکا) در دوزهای (0/2µg, 0/1µg, 0/05µg) به شکل داخل هیپوکمپ تزریق شد. تزریق داروها در 4 روز انجام شد و در روز پنجم آزمایش‌های رفتاری شروع شد. در هر آزمون گروه‌های متفاوت از حیوانات مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب دوز داروها با توجه به آزمایش‌های پایلوت و مطالعات گذشته انجام شد (16).

نحوه تزریق داروها

تزریق داروها با استفاده از سرنگ هامیلتون و لوله پلی‌اتیلن شماره 10 به کمک تکنیک پیش‌راندن حباب صورت گرفت. بدین ترتیب که سر سوزن شماره 27 (کانول تزریق) یک میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما (سر سوزن شماره 21) از طریق لوله پلی‌اتیلن به سرنگ هامیلتون متصل و تزریق با تکنیک پیش‌راندن حباب انجام شد. تزریق به صورت دوطرفه و با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه، به مدت چهار روز انجام شد. پس از پایان تزریق، نیدل تزریق 30 ثانیه در محل تزریق به منظور انتشار بهتر دارو باقی می‌ماند.

سنجش یادگیری و حافظه فضایی

برای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی از ماز آبی موریس (MWM) استفاده شد (17). این ماز از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ با قطر 136 سانتی‌متر و ارتفاع 60 سانتی‌متر تشکیل شده که تا ارتفاع 25 سانتی‌متری با آب 20 ± 1 درجه سانتی‌گراد پر می‌شود. این حوضچه به لحاظ جغرافیایی به 4 ربع مساوی شمال، جنوب، غرب و شرق تقسیم می‌شود و در هر ربع دایره یک نقطه برای رها کردن حیوان در آب در نظر گرفته شده است. یک سکوی سیاه رنگ فلزی به قطر 10 سانتی‌متر در مرکز ربع دایره چهارم، 1/5 سانتی‌متر در زیر سطح آب و به صورت غیرقابل رویت قرار دارد. موقعیت سکو در طول آزمایشات ثابت باقی می‌ماند. این

ربع به عنوان ربع هدف در نظر گرفته شد. بر روی دیوارهای اتاق در اطراف ماز اشکال هندسی متفاوتی، سرخ‌های فضایی نصب گردید. عملکرد حیوان از طریق یک دوربین مداربسته نصب شده در بالای قسمت مرکزی ماز فیلم برداری شده و پس از انتقال به کامپیوتر با استفاده نرم افزار ردیابی Any maze ثبت و آنالیز می‌شد. حیوانات هر گروه به مدت چهار روز تحت آزمایش قرار گرفتند. در هر روز، 4 کارآزمایی انجام می‌شد. در هر کارآزمایی، حیوان از یکی از ربع‌های دایره که دستگاه به‌طور تصادفی انتخاب می‌کند به داخل آب رها شده و حداکثر یک دقیقه فرصت داشت تا با استفاده از سرخ‌های فضایی اطراف، سکوی پنهان در زیر سطح آب را پیدا نموده و بر روی آن استراحت کند. اگر حیوان در مدت این یک دقیقه موفق به پیدا کردن سکو نمی‌شد، حیوان به مدت 30 ثانیه بر روی سکو قرار داده می‌شد. در هر بلوک، حیوان از 4 ربع مختلف دایره به داخل آب رها می‌شد و پس از اتمام کارآزمایی چهارم، موش‌ها به آرامی با حوله خشک و سپس به قفس خود بازگردانده می‌شدند. در این آزمایش، میانگین مدت زمان سپری شده و مسافت پیموده شده تا یافتن سکوی پنهان به‌عنوان معیاری از یادگیری فضایی محاسبه شد. در روز پنجم، آزمون پروب به‌منظور بررسی حافظه فضایی حیوانات انجام شد. این آزمون شامل یک کارآزمایی منفرد است که در آن سکوی پنهان از داخل ماز برداشته شده و حیوان به داخل آب رها می‌شد و به‌مدت یک دقیقه آزادانه در آب شنا می‌کرد. متغیر مورد بررسی در این آزمون مدت زمان حضور در ربع دایره هدف می‌باشد.

سنجش یادگیری و حافظه اجتنابی

ارزیابی حافظه و یادگیری با استفاده از دستگاه شاتل باکس (کیمیا کهربای مبین، ایران) انجام شد. این دستگاه یک جعبه پلکسی گلاس دو قسمتی دارای یک بخش روشن و یک بخش تاریک بود. ابعاد دو قسمت با هم برابر بوده $(20 \times 40 \times 20)$ ، و با یک دریچه 8×8 cm

با هم ارتباط داشتند. در کف هر دو بخش، میله‌های فلزی از جنس فولاد زنگ نزن به فاصله یک سانتی‌متر از هم قرار داشتند که شوک از طریق آن‌ها و در محفظه تاریک به پای حیوان وارد می‌شدند. یک لامپ 60 وات برای روشنایی محفظه روشن مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا حیوانات به دستگاه عادت داده شدند، به این ترتیب که درب بین دو محفظه برداشته شده و به هر موش اجازه داده می‌شد بین محفظه‌ها رفت و آمد کند. سپس در مرحله اکتساب، 24 ساعت پس از عادت، هر حیوان در قسمت روشن جعبه گذاشته و پنج دقیقه به حیوان مهلت داده می‌شد تا وارد محفظه تاریک گردد. بلافاصله بعد از ورود موش به قسمت تاریک، درب بین محفظه‌ها بسته شده و شوک الکتریکی با فرکانس 50 هرتز و شدت $1/2$ میلی‌آمپر به مدت 4 ثانیه به پای حیوان اعمال گردید. سپس موش از محفظه تاریک خارج و به قفس برگردانده می‌شد. بعد از 5 دقیقه، موش مجدداً در ناحیه روشن قرار می‌گرفت و آزمون یادگیری اجتنابی تکرار می‌شد. در صورت ورود مجدد حیوان به ناحیه تاریک، درب برای بار دوم بسته و شوک به‌صورت قبل وارد می‌گردید و این کار آن قدر تکرار می‌شد تا موش یاد بگیرد وارد محفظه تاریک نشود. عدم ورود حیوان به ناحیه تاریک به مدت 300 ثانیه به عنوان یادگیری موفق در نظر گرفته می‌شد. تعداد دفعات لازم برای یادگیری برای هر موش ثبت می‌شد. در آزمون به خاطر آوری که 24 ساعت بعد از آموزش صورت گرفت حیوان در محفظه روشن قرار داده می‌شد و بعد از 5 ثانیه درب بین دو محفظه باز می‌شد. در این آزمون، تاخیر زمان ورود به ناحیه تاریک و همچنین مدت زمان حضور در ناحیه تاریک برای هر حیوان محاسبه گردید (18).

ثبت پتانسیل‌های میدانی از ناحیه CA1

ابتدا هر موش با تزریق داخل صفاقی پورتان (سیگما، آمریکا) $(1/8-1/2)$ بی‌هوش و در دستگاه

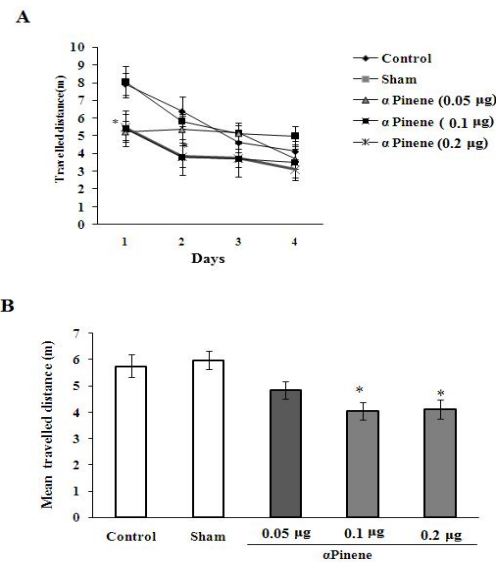
مدت 20 دقیقه ثبت پایه گرفته شد. فاصله بین پالس‌های تحریکی (Inter-stimulus interval) با مشخصات فوق در تمامی مراحل آزمایش 10 ثانیه در نظر گرفته شد. پاسخ نورون‌های ناحیه CA1 که همان fEPSP (field excitatory postsynaptic potential) هستند، توسط الکتروود ثبت دریافت شده و به واسطه سیم‌های رابط به دستگاه Data acquisition منتقل می‌شد. تا سیگنال آنالوگ به دیجیتال تبدیل شود. در تنظیمات نرم افزار، محدوده فیلترینگ بالا و پایین به ترتیب 3000 و 1 هرتز و میدان تقویت سیگنال (Gain) 100 برابر در نظر گرفته شد. پاسخ‌ها با مشخصات فوق بر روی صفحه مانیتور نمایان شده و در حافظه آن ذخیره می‌شدند. برای القای LTP در مدار مورد نظر از تحریکات با فرکانس بالا (HFS) استفاده شد. الگوی این تحریک شامل 10 قطار 10 پالسی با فرکانس 400 Hz و به عرض پالس 0/2 میلی‌ثانیه و فواصل بین تحریک 7 ثانیه‌ای بود. پس از تحریک تتانیک، روند تحریک و ثبت با همان الگوی پایه به مدت 90 دقیقه ادامه یافت. برای آنالیز و تفسیر نتایج، خصوصیات fEPSP قبل و بعد از تحریک تتانیک توسط نرم‌افزار مخصوص Potentialize محاسبه شد (21,20). لازم به ذکر است در این مرحله فقط دوز مناسب آلفاپین بر اساس مطالعات رفتاری در نظر گرفته شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه 22 استفاده شد. داده‌ها در کلیه نمودارها به صورت میانگین به اضافه منهای خطای استاندارد میانگین ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) نشان داده شده‌اند. در تست MWM، اختلاف گروه‌ها طی روزهای یادگیری با استفاده از روش repeated-measures ارزیابی شد. اختلاف گروه‌ها در میانگین زمان و مسافت طی شده برای یافتن سکو و مدت زمان گذرانده شده در ربع هدف در تست پروب و همچنین تاخیر ورود و مدت زمان حضور در محفظه تاریک در تست شاتل باکس با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شد.

استریوتکس ثابت می‌گردید. در این آزمایش، با توجه به مدت طولانی آزمایش (حدود 4 ساعت) و نیاز به بیهوشی طولانی مدت از یورتان استفاده شد. همچنین، مشخص شد خطر اختلالات قلبی و عروقی تحت بیهوشی القا شده با یورتان نسبت به کتامین پایین‌تر می‌باشد (19). مختصات ناحیه قرارگیری الکتروود تحریک در ناحیه CA1 و الکتروود ثبت در ناحیه شافر با استفاده از اطلس پاکسینوس واتسون تعیین می‌شد (CA1): AP=4.1mm; ML=3mm; DV=2.5mm و شافر الکتروودهای (AP=3mm; ML=3.5mm; DV=2.5-3mm). دو قطبی از جنس استیل ضد زنگ با پوشش تفلونی به ضخامت 125 میکرومتر مورد استفاده قرار گرفت. الکتروود تحریکی به میزان 2/8-3 میلی‌متر از سطح جمجمه به آرامی پایین برده شد تا به مسیر شافر کولترال برسد. الکتروود ثبت نیز با دقت و به آرامی از سطح جمجمه به عمق اولیه 2/5 میلی‌متر پایین فرستاده شد تا به دندریت‌های اپیکال نورون‌های هرمی ناحیه CA1 برسد. برای تحریک و ثبت پتانسیل‌های میدانی از دستگاه eLab و ePulse (پرتو دانش، ایران) استفاده شد. جهت تحریک از یک دستگاه مولد جریان ثابت (WPI stimulus isolator A365) استفاده شد. دو قطعه سیم رابط تحریکات دستگاه را به الکتروود تحریک منتقل می‌کردند. قطبیت تحریکات و شدت آن‌ها بر روی دستگاه قابل تنظیم بود. ابتدا با تغییر بسیار دقیق و آرام عمق الکتروودها، بهترین و بزرگترین سیگنال بدست آمد. بعد از پیدا کردن بهترین سیگنال دیگر هیچ گونه تغییری در محل قرارگیری الکتروودها داده نشد و حدود 30 دقیقه به مغز استراحت داده شد. سپس منحنی ورودی-خروجی (Input-output curve) رسم شد. برای رسم این منحنی، شدت تحریک از زیر آستانه به فواصل 10 میکروآمپر افزایش داده می‌شد تا جایی که دیگر با افزایش شدت تحریک، پاسخ‌ها بزرگ‌تر نمی‌شدند. سپس شدتی از تحریک که در آن 40 تا 50 درصد بزرگ‌ترین پاسخ ظاهر می‌شد، انتخاب شده و به

همان‌طور که در تصویر شماره 2A نشان داده شده است، در روز اول آزمون یادگیری مسافت طی شده تا رسیدن به سکو پنهان در هر سه گروه دریافت‌کننده آلفاپینین نسبت به گروه‌های کنترل و شم به شکل معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$). در روز دوم، مسافت طی شده تا رسیدن به سکو پنهان در گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینین ($0/2 \mu\text{g}$, $0/05 \mu\text{g}$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0/05$). در روز سوم و چهارم اختلاف معنی‌داری در مسافت طی شده تا رسیدن به سکو پنهان بین گروه‌ها مشاهده نشد. طی چهار روز آزمون یادگیری، میانگین مسافت طی شده تا رسیدن به سکو پنهان در گروه‌های دریافت‌کننده دوز $0/1 \mu\text{g}$ و $0/2 \mu\text{g}$ آلفاپینین نسبت به گروه کنترل و شم به شکل معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$) (تصویر 2B).



تصویر شماره 2: مقایسه مسافت طی شده تا رسیدن به سکو پنهان در آزمون ماز آبی موریس طی 4 روز یادگیری (A) و میانگین کل روزهای یادگیری (B) بین گروه‌های مورد آزمایش. نمودارها بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد رسم شده است ($n=6$).
* $P < 0.05$ vs. control and sham

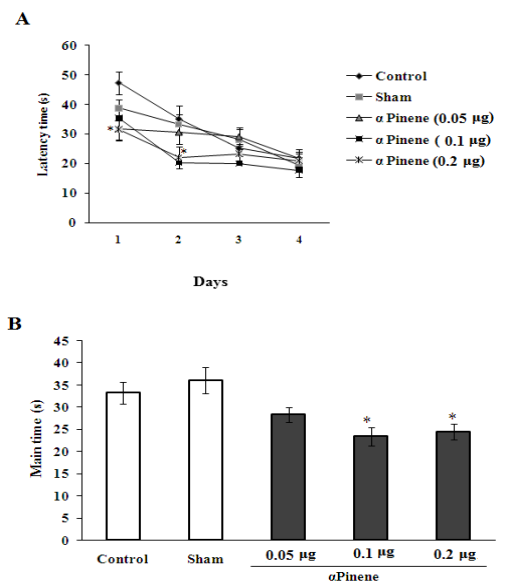
ارزیابی حافظه فضایی در آزمایش پروب انجام شد. در این آزمون، سکو پنهان حذف و مدت زمان گذرانده شده در ربع دایره محل سکوی پنهان برای تعیین حافظه

جهت پیدا کردن اختلاف بین گروه‌ها از پس آزمون توکی استفاده شد. همچنین $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

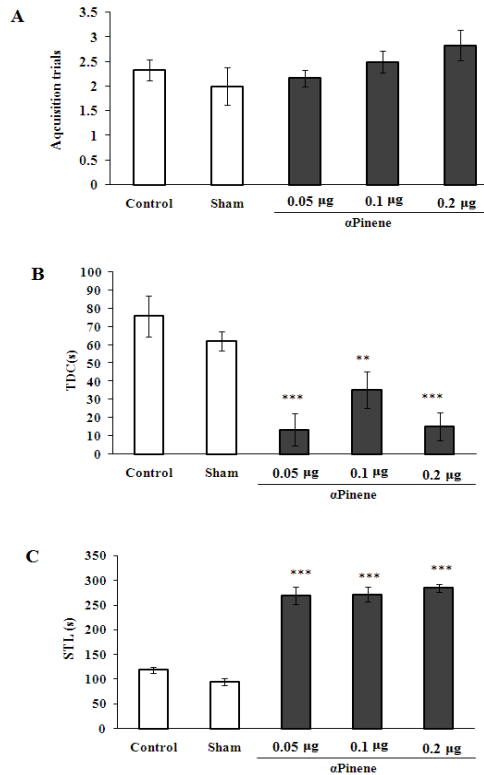
ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی

در آزمایش یادگیری، طی روزهای اول و دوم مدت زمان رسیدن به سکوی پنهان در گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینین ($0/2 \mu\text{g}$, $0/1 \mu\text{g}$) در مقایسه با گروه کنترل و شم کاهش یافت ($P < 0/05$). با این وجود، در روزهای سوم و چهارم اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها در مدت زمان رسیدن به سکو مشاهده نشد (تصویر شماره 1A). همچنین، طی چهار روز آزمون یادگیری، درمان با آلفاپینین ($0/2 \mu\text{g}$, $0/1 \mu\text{g}$) میانگین مدت زمان رسیدن به سکوی پنهان را در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم به شکل معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/05$) (تصویر شماره 1B).



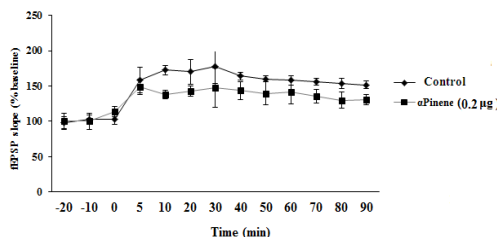
تصویر شماره 1: مقایسه زمان طی شده جهت یافتن سکو پنهان در تست ماز آبی موریس طی 4 روز یادگیری (A) و میانگین کل روزهای یادگیری (B) بین گروه‌های مورد آزمایش. نمودارها بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد رسم شده است ($n=6$).
* $P < 0.05$ vs. control and sham

معنی داری در روند القا LTP در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نمی کند ($P > 0/05$).



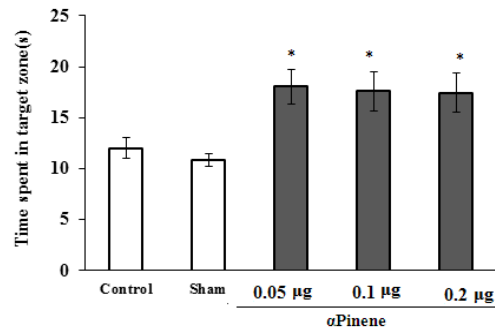
تصویر شماره 4: مقایسه میانگین تعداد دفعات یادگیری (A)، میانگین زمان سپری شده در ناحیه تاریک (B) و میانگین تأخیر در ورود به ناحیه تاریک (C) بین گروه های مورد آزمایش. نمودارها بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد رسم شده است ($n=6$).

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs. control and sham
TDC: Time spent in dark chamber
STL: Step through latency



تصویر شماره 5: اثر آلفاپینن بر القاء LTP. همه بازه های زمانی (از دقیقه 20- تا دقیقه 90 در محور افقی) در گراف میانگین شیب fEPSP از هر 10 شیب متوالی در طول ثبت می باشد. نمودارها بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد رسم شده است ($n=6$).

فضایی استفاده شد. نتایج نشان داد در گروه های درمان شده با آلفاپینن، مدت زمان گذرانده شده در ناحیه هدف در مقایسه با گروه کنترل و شم به شکل معنی داری افزایش یافته است ($P < 0/05$) (تصویر شماره 3).



تصویر شماره 3: مقایسه مدت زمان سپری شده در ناحیه هدف در آزمون ماز آبی موریس بین گروه های مورد آزمایش. نمودارها بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد رسم شده است ($n=6$).
* $P < 0.05$ vs. control and sham

ارزیابی یادگیری و حافظه اجتنابی غیرفعال

در آزمون شاتل باکس، اختلاف معنی داری در میانگین تعداد دفعات مورد نیاز برای یادگیری بین گروه های مورد آزمایش مشاهده نشد (تصویر شماره 4A). با این وجود، میانگین مدت زمان سپری شده در محفظه تاریک دستگاه در گروه های دریافت کننده آلفاپینن نسبت به گروه های کنترل و شم کاهش یافت ($P < 0/01$), ($P < 0/05$) (تصویر شماره 4B). همچنین، همان طور که در تصویر شماره 4C نشان داده شده است، درمان با آلفاپینن، میانگین تأخیر در ورود به محفظه تاریک را نسبت به گروه های کنترل و شم به شکل معنی داری افزایش داد ($P < 0/001$).

ارزیابی تقویت سیناپسی طولانی مدت

القا LTP به صورت افزایش شیب fEPSP (بعد از اعمال تحریک قوی با فرکانس بالا، HFS) به میزان حداقل 30 درصد تعیین شد. آزمون آماری نشان داد تزریق داخل هیپوکمپی آلفاپینن ($0/2 \mu$ g) اختلاف

بحث

در این مطالعه، برای اولین بار اثرات تزریق داخل مغزی آلفاپین بر حافظه و یادگیری با کمک تکنیک‌های رفتاری و الکتروفیزیولوژی ارزیابی شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تزریق داخل هیپوکمپی آلفاپین می‌تواند حافظه و یادگیری فضایی و حافظه اجتنابی غیرفعال را در موش صحرائی نر بالغ بهبود دهد. با این وجود، درمان با آلفاپین در مقایسه با گروه کنترل، تغییرات معنی‌داری در روند القا LTP در ناحیه CA1 هیپوکمپ ایجاد نکرد. ارزیابی حافظه و یادگیری فضایی در تست ماز آبی موریس نشان داد آلفاپین (0/1 μg ، 0/2 μg) زمان و مسافت طی شده تا رسیدن به سکو را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده است. همچنین در گروه‌های دریافت کننده آلفاپین مدت زمان حضور در ناحیه هدف به عنوان شاخصی از بهبود حافظه فضایی افزایش یافت.

در تست شاتل باکس، در آزمون یادگیری اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمایش پیدا نشد. با این وجود، در آزمون بازیابی، در حیوانات تیمار شده با هر سه دوز آلفاپین مدت زمان تاخیر ورود به ناحیه‌ی تاریک افزایش و مدت زمان حضور در ناحیه تاریک کاهش یافت که نشان دهنده بهبود حافظه اجتنابی می‌باشد.

در مطالعه حاضر، تزریق داروها در ناحیه CA1 هیپوکمپ انجام شد. مدارهای نورونی هیپوکمپ از مراکز اصلی درگیر در شکل‌گیری و پردازش انواع اطلاعات حافظه و یادگیری به‌ویژه حافظه اظهاری و حافظه یادگیری فضایی است. مشخص شده است تحریک کوتاه مدت اکسون‌ها با فرکانس بالا باعث افزایش طولانی مدت انتقال سیناپسی در سه زیر ناحیه اصلی هیپوکمپ شامل CA1، CA3 و شکاف دندانه‌دار می‌شود. تغییر فعالیت نورون‌ها و نوروترانسمیترها در این نواحی پردازش حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار می‌دهند (22، 23). در مطالعات تجربی، دستکاری عملکرد این نورون‌ها برای تعیین مکانیسم عمل ترکیبات دارویی استفاده می‌شود (24). هم جهت با نتایج مطالعه حاضر، مشخص شده است که

تجویز روزانه آلفاپین به شکل گاواژ به مدت دو هفته می‌تواند یادگیری اجتنابی موش‌های پارکینسونی شده با 6 هیپروکسی دوپامین را در آزمون شاتل باکس بهبود دهد (13). همچنین، تزریق محیطی آلفاپین اختلال شناختی القا شده با اسکوپولامین را در موش‌های سوری کاهش داده است. این اثر آلفاپین با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در هیپوکمپ و افزایش بیان mRNA استیل کولین همراه بوده است (25).

استرس اکسیداتیو تولید شده در مغز یک مشکل رایج در بسیاری از بیماری‌های عصبی مانند تشنج و آلزایمر است (26). آلفاپین به عنوان یک ترکیب با قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا شناخته شده است. مشخص شده است که آلفاپین اختلال حافظه و یادگیری را در موش‌های پارکینسونی به‌وسیله کاهش سطح مالون دی‌آلدید به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ و جسم معطط کاهش می‌دهد (27). مصرف آلفاپین به عنوان جز اصلی اسانس *Ferula Assa-foetida* استرس اکسیداتیو و تشنج ناشی از پنتیلن ترازول را کاهش داده است (28). همچنین، تزریق داخل صفاقی آلفاپین با کاهش تشنج ناشی از پنتیلن ترازول در موش‌های صحرائی همراه بوده است (29). بنابراین، با توجه به این که افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با بهبود عملکردهای شناختی همراه باشد (30)، این امکان وجود دارد که بخشی از اثر بهبود دهنده آلفاپین بر حافظه و یادگیری به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی این ترکیب باشد.

مشخص شده است آلفاپین یک جایگاه اتصال ویژه بر روی رسپتورهای بنزودیازپین دارد. مصرف دهانی آلفاپین طول مدت خواب non-REM را به‌طور عمده از طریق میانکنش با گیرنده‌های GABA A در موش‌های سوری افزایش می‌دهد (10). با توجه به این که فعالیت تونیک گیرنده‌های GABA A برای تنظیم بهینه مراحل مختلف حافظه و یادگیری ضروری می‌باشد. این احتمال وجود دارد که حداقل قسمتی از اثر بهبود دهنده حافظه و یادگیری ایجاد شده با آلفاپین از طریق مداخله

در ترشح این نوروترانسمیتر صورت گرفته باشد.

اسکوپولامین یک آنتاگونیست موسکارینی است که باعث بلوک گیرنده‌های کولینرژیک مرکزی می‌شود و برای القا اختلالات حافظه در مدل‌های حیوانی استفاده می‌شود. تجویز اسکوپولامین، فعالیت استیل کولین استراز در قشر جلویی و هیپوکمپ را کاهش می‌دهد (31). مشخص شده است که تجویز اسانس *R. officinalis* که شامل ترکیبات فعال بیولوژیکی از جمله ترپن‌هایی مانند آلفاپینین است، فعالیت استیل کولین استراز را مهار می‌کند و حافظه و یادگیری اجتنابی غیرفعال را در موش صحرایی افزایش می‌دهد (32). نشان داده شده است که افزایش در انتقال دهنده‌ی عصبی استیل کولین با مسدود کردن استیل کولین استراز یادگیری و حافظه کوتاه مدت را بهبود می‌دهد (33). آلفاپینین بیان پروتئین‌های مرتبط با سنتز استیل کولین و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را تنظیم می‌کند (34). با توجه به اثر آلفاپینین بر افزایش غلظت استیل کولین و با توجه به نقش استیل کولین در حافظه و یادگیری، به نظر می‌رسد حداقل بخشی از اثرات آلفاپینین بر حافظه و یادگیری از طریق سیستم کولینرژیک باشد.

در این مطالعه، تزریق داخل هیپوکمپی آلفاپینین با ایجاد تغییرات معنی‌داری در القا LTP در ناحیه CA1 همراه نبود. در یک مطالعه مرتبط، مشخص شده است که استنشاق آلفاپینین برای مدت یک ساعت می‌تواند میزان بیان BDNF در لوب بویایی و هیپوکمپ در موش‌های سوری را افزایش دهد (34). این نوروتروفین در تنظیم بقا نورونی از طریق تعدیل انتقال سیناپسی، اثرات سریع تحریکی در نورون‌ها، کنترل پتانسیل استراحت غشا و تحریک‌پذیری عصبی درگیر می‌باشد (35،36). مطالعات تکمیلی با کمک دیگر روش‌های ارزیابی در

تعیین جزئیات نقش آلفاپینین در ایجاد تغییرات بلند مدت در پلاستیسیته سیناپسی کمک‌کننده می‌باشند. به‌طور خلاصه در مطالعه حاضر مشخص شد تزریق داخل هیپوکمپی آلفاپینین باعث بهبود یادگیری و حافظه فضایی و نیز بهبود عملکرد حافظه اجتنابی غیرفعال در موش‌های صحرایی نر بالغ می‌گردد. با این وجود، در حیوانات درمان شده با آلفاپینین در مقایسه با گروه کنترل، تغییر قابل توجه‌ای در شکل‌پذیری سیناپسی در ناحیه CA1 مشاهده نشد. مکانسیم‌(های) احتمالی، اثرات بهبود دهنده حافظه آلفاپینین، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و اثرات تعدیلی این ترکیب بر سیستم‌های گابارژیک و کولینرژیک می‌باشد. برای اینکه اهمیت هر یک از این مکانسیم‌ها بیشتر مشخص گردد، احتیاج به تحقیقات مکمل می‌باشد.

از محدودیت‌های مطالعه فوق، تعداد کم حیوانات (6 سر موش صحرایی در هر گروه) بود. اگرچه تعداد حیوانات در هر گروه بر اساس مطالعات گذشته و با رعایت پروتکل‌های اخلاقی انتخاب شد، ولی جهت اطمینان از نتایج مطالعه به جامعه آماری وسیع‌تری نیاز است. همچنین، با توجه به برخی محدودیت‌های مالی و زمان‌بندی اجرا پروژه، امکان ثبت پتانسیل‌های میدانی برای همه گروه‌های استفاده شده در آزمایش‌های رفتاری فراهم نبود. بنابراین دوز موثر آلفاپینین در آزمایش رفتاری برای مطالعه الکتروفیزیولوژی استفاده شد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم رویا احمدی کنهعلی می‌باشد و با حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است.

References

1. Benfenati F. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed* 2007; 78(Suppl 1): 58-66.
2. Kennedy MB. Synaptic signaling in learning and memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2016; 8(2): a016824.

3. Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 2004; 84(1): 87-136.
4. Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytother Res* 2006; 20(6): 427-437.
5. Salehi A, Setorki M. Effect of *Hyssopus officinalis* essential oil on chronic stress-induced memory and learning impairment in male mice. *Bangladesh J Pharmacol* 2017; 12(4): 448-454.
6. Khatoon SS, Rehman M, Rahman A. The role of natural products in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Studies in natural products chemistry*. Amsterdam, Elsevier; 2018.
7. Praticò D, Delanty N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J Med* 2000; 109(7): 577-585.
8. Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* 2007; 3(7): 408-414.
9. Guimarães AG, Quintans JS, Quintans Júnior LJ. Monoterpenes with analgesic activity: a systematic review. *Phytother Res* 2013; 27(1): 1-15
10. Yang H, Woo J, Pae AN, Um MY, Cho N-C, Park KD, et al. α -Pinene, a major constituent of pine tree oils, enhances non-rapid eye movement sleep in mice through GABA-benzodiazepine receptors. *Mol Pharmacol* 2016; 90(5): 530-539.
11. Kasuya H, Okada N, Kubohara M, Satou T, Masuo Y, Koike K. Expression of BDNF and TH mRNA in the Brain Following Inhaled Administration of α inene. *Phytother Res* 2015; 29(1): 43-47.
12. Satou T, Hanashima Y, Mizutani I, Koike K. The effect of inhalation of essential oil from *Rosmarinus officinalis* on scopolamine-induced Alzheimer's type dementia model mice. *Flavour Fragr J* 2018; 33(3): 230-234.
13. Goudarzi S, Rafeirad M. Evaluating the effect of α -pinene on motor activity, avoidance memory and lipid peroxidation in animal model of Parkinson disease in adult male rats. *Research Journal of Pharmacognosy* 2017; 4(2): 53-63.
14. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Cambridge: Academic Press; 2006.
15. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11(1): 4660-4667.
16. Rahbar I, Abbasnejad M, Haghani J, Raouf M, Kooshki R, EsmaeiliMahani S. The effect of central administration of alpha inene on capsaicin-induced dental pulp nociception. *Int Endod J* 2019; 52(3): 307-317.
17. Morris RG, Garrud P, Rawlins Ja, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297(5868): 681-683.
18. Ögren S, Stiedl O. Passive avoidance In: Stolerman I P, editors. *Encyclopedia of psychopharmacology*. New York: Springer; 2010. p. 960-967.
19. Lee Ch, Jones TA. Effects of Ketamine Compared with Urethane Anesthesia on Vestibular Sensory Evoked Potentials and Systemic Physiology in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2018; 57(3): 268-277.
20. Hooper SL, Schmidt J. Electrophysiological recording techniques In: Hooper SL, BuchGes A, (eds). *Neurobiology of Motor Control: Fundamental Concepts and New Directions*. New Jersey: Wiley Blackwell; 2017. p. 7-54.
21. Hajali V, Sheibani V, Ghazvini H, Ghadiri T, Valizadeh T, Saadati H, et al. Effect of castration on the susceptibility of male rats to

- the sleep deprivation-induced impairment of behavioral and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 2015; 123: 140-148.
22. van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* 2009; 10(4): 272-282.
 23. Thompson R F, Kim J J. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24): 13438-13444.
 24. Endan L, Kim DH, Cai M, Lee S, Kim Y, Lim E, et al. Hippocampus-dependent spatial learning and memory are impaired in growth hormone-deficient spontaneous dwarf rats. *Endocr J* 2011; 58(4): 257-267.
 25. Lee G-Y, Lee C, Park GH, Jang J-H. Amelioration of scopolamine-induced learning and memory impairment by α -Pinene in C57BL/6 Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017; 2017: 4926815.
 26. Shi A, Xiang J, He F, Zhu Y, Zhu G, Lin Y, et al. The phenolic components of *Gastrodia elata* improve prognosis in rats after cerebral ischemia/reperfusion by enhancing the endogenous antioxidant mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 7642158.
 27. Khyade VB, Chape VS, Ghadge PB. Influence of α -Pinene and Pine Needles of *Pinus sylvestris* (L) on the Cocoons and Silk Fibres Spinned by Fifth Instar Larvae of Silkworm, *Bombyx mori* (L)(Race: PM x CSR2). *Int J Curr Microbiol App Sci* 2016; 5(12): 36-55.
 28. Oz M, Lozon Y, Sultan A, Yang K-HS, Galadari S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacol Ther* 2015; 152: 83-97.
 29. Zamyad M, Abbasnejad M, Esmaeili-Mahani S, Mostafavi A, Sheibani V. The anticonvulsant effects of *Ducrosia anethifolia* (Boiss) essential oil are produced by its main component alpha-pinene in rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2019; 77(2): 106-114.
 30. Qaid EYA, Zakaria R, Sulaiman SF, Yusof NAM, Shafin N, Othman Z, et al. Role of Antioxidants in Hypoxia-Induced Learning and Memory Deficit. *Int Medical J* 2020; 27(1): 62-66.
 31. Ozarowski M, Mikolajczak PL, Bogacz A, Gryszczynska A, Kujawska M, Jodynis-Liebert J, et al. *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia* 2013; 91: 261-271.
 32. Zanella CA, Treichel H, Cansian RL, Roman SS. The effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) in animal models of memory. *Braz J Pharm Sci* 2012; 48(3): 389-397.
 33. Lahlou M. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr J* 2004; 19(2): 159-165.
 34. Oyemitan IA, Elusiyan CA, Akinkunmi EO, Obuotor EM, Akanmu MA, Olugbade TA. Memory enhancing, anticholinesterase and antimicrobial activities of β -phenylnitroethane and essential oil of *Dennettia tripetala* Baker f. *J Ethnopharmacol* 2019; 229: 256-261.
 35. Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 2005; 76(2): 99-125.
 36. Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 2003; 91(4): 267-270.