



ISMJ 2014; 17(4): 560-570

دوماهنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال هفدهم، شماره ۴، صفحه ۵۷۰ - ۵۶۰ (مهر و آبان ۱۳۹۳)

بررسی استریولوژیک هیپوکامپ و نقش گیرنده‌های دوپامین در یادگیری و حافظه

صدف عصایی^۱، اسما سبزواری فرد^۱، سهیلا منصورپور^۱، ذبیح‌اله عزیزی^۱

غلامحسین رنجبرعمرانی^{۱*}

^۱ مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

(دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲۷ - پذیرش مقاله: ۹۰/۹/۶)

چکیده

زمینه: علیرغم گزارش‌های موجود درباره‌ی ارتباط حافظه و یادگیری وابسته به هیپوکامپ در پی مصرف بروموکریپتین به‌عنوان آگونیست و هالوپریدول به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده D2، مطالعه‌ای درباره اثر مصرف این دو دارو بر اندازه هیپوکامپ و تعداد سلول‌های استروسیت صورت نگرفته است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر احتمالی مصرف داروی بروموکریپتین و هالوپریدول روی یادگیری و اندازه هیپوکامپ موش صحرایی نر انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها: ۴۵ موش صحرایی نر از نژاد Sprague – Dawley با وزن 20 ± 22 به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۹ تایی تقسیم شدند. گروه‌های مورد آزمایش به‌مدت یکماه داروهای بروموکریپتین با دوزهای ۱۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز و هالوپریدول با دوزهای ۲۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز را به‌صورت تزریق داخل صفاقی دریافت می‌کردند. بعد از پایان این مدت حافظه فضایی گروه‌های مختلف در ماز آبی مورس مورد آزمایش قرار گرفت. سپس از هیپوکامپ برش‌های سریالی به ضخامت ۷ میکرون تهیه گردید. از هر ۱۰۰ برش، به‌صورت تصادفی سیستماتیک ۱۰ نمونه انتخاب گردید و مورد بررسی قرار گرفت. تخمین حجم با استفاده از اصل کاوالیه انجام شد.

یافته‌ها: گروه‌های دریافت‌کننده حداکثر دوز هالوپریدول و بروموکریپتین در زمان و مسافت بیشتری سکوی ماز آبی مورس را پیدا کردند که حاکی از یادگیری ضعیف این دو گروه بود، همچنین این دو گروه در مقایسه با گروه کنترل، هیپوکامپ سمت راست کوچکتری داشتند. در حالی که گروه-های دریافت‌کننده بروموکریپتین و هالوپریدول با حداقل دوز در زمان و مسافت کمتری سکوی پلاکسی گلاس را پیدا کردند که حاکی از یادگیری قوی‌تر این دو گروه بود و افزایش حجم هیپوکامپ در گروه‌های دریافت‌کننده بروموکریپتین و هالوپریدول با حداقل دوز نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. همچنین نتایج نشان داد که تفاوت آماری معنی‌داری بین تعداد آستروسیت‌های هیپوکامپ در گروه‌های دریافت‌کننده حداکثر دوز بروموکریپتین و هالوپریدول با گروه کنترل و همچنین تفاوت آماری معنی‌داری بین تعداد آستروسیت‌های هیپوکامپ در گروه‌های دریافت‌کننده حداقل و حداکثر دوز بروموکریپتین و هالوپریدول با گروه کنترل وجود دارد که این تفاوت به‌ترتیب شامل افزایش و کاهش تعداد سلول‌های استروسیت می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داده شده که مصرف داروی هالوپریدول و بروموکریپتین با دوز پایین نه تنها در بهبود یادگیری بلکه در افزایش حجم هیپوکامپ و تعداد سلول‌های آستروسیت مؤثر است.

واژگان کلیدی: استریولوژی، بروموکریپتین، هالوپریدول، هیپوکامپ، یادگیری

* شیراز، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

Email :hormone@sums.ac.ir

مقدمه

هیپوکامپ قسمتی از سیستم لیمبیک می باشد که در لوب تمپورال قرار دارد و شامل سابیکولوم، شکنج دندانهای و ناحیه CA1^۱، CA2 و CA3 می باشد (۱). بسیاری از روان شناسان و نورولوژیست ها عقیده دارند که هیپوکامپ نقش مهمی در شکل گیری حافظه جدید در مورد رویدادهای مشاهده شده دارد (۲) و این ناحیه از مغز غنی از گیرنده های دوپامینی (۳) سلول های گلیال و به ویژه آستروسیت ها می باشد (۴). آزمایشات انجام شده بر روی مدل های حیوانی نشان می دهد که افزایش دوپامین در یادگیری نقش دارد که به موجب آن افزایش تقویت طولانی مدت (LTP) را در پی دارد (۵).

همان طور که سیستم دوپامین در یادگیری رفتار نقش دارد، در فعالیت های وابسته به شکل پذیری سیناپسی نیز نقش دارد. ورودی های دوپامینرژیک لازمه تغییرات طولانی مدت در اثرات سیناپسی نواحی مختلف یادگیری و حافظه می باشند، زیرا اختلالات دوپامینرژیک در کورتکس پری فرونتال یا هیپوکامپ در اختلالات یادگیری رفتار وابسته به هدف، حافظه کوتاه مدت و بلند مدت در خزندگان و پریمات های غیر انسان نقش دارد (۶).

اگرچه به نظر می رسد گیرنده D1 دوپامین، تعدیل کننده روندهای حافظه ای در میمون ها می باشد، اما چندین تحقیق بیان می کند که گیرنده های D2 دوپامین نیز در اعمال شناختی نقش دارند (۷). چندین مقاله بیان می کند که تسهیل حافظه کاری در طی مصرف آگونیست های گیرنده D2 از جمله بروموکریپتین صورت می گیرد، از طرفی آسیب حافظه کاری بعد از

مصرف آنتاگونیست های D2 نیز مشاهده می گردد. علاوه بر آن، این امکان وجود دارد که تحریک گیرنده های D1 و D2 باعث بهبود حافظه کاری گردد که به علت فعالیت مشترک این دو گیرنده بر روی مولکول ها به صورت Downstream است (۸ و ۴۰).

علاوه بر دوپامین نوروترانسمیترهای مختلفی در هیپوکامپ موجود می باشند. استیل کولین یکی از مهم ترین نوروترانسمیترهای آزاد شده از هیپوکامپ است که توسط جسم سلولی کولینرژیک در ناحیه medial septal آزاد می گردد. مشاهدات بیان می کند که مصرف آگونیست های اوپوئیدی بر روی جسم سلولی کولینرژیک در ناحیه سپتال اثر گذاشته و فعالیت آوران های کولینرژیک را در هیپوکامپ تعدیل می کند (۹). گیرنده های سروتونین در سلول های پیرامیدال در هیپوکامپ و کورتکس موجود می باشند.

مطالعات انجام شده بر روی حیوانات نشان می دهد که با وجود ارتباط وسیع و یکپارچه سیستم کولینرژیک و سروتونرژیک گهگاهی دارای عملکرد آنتاگونیستی می باشند. اختلال در حافظه کاری به دلیل بلوکه شدن کولینرژیک می باشد که از طریق تقویت نوروترانسمیتر سروتونین بهبود می یابد (۱۰).

از طرفی مهم ترین عملکرد استروسیت ها تنظیم عملکرد سیناپس ها، میزان ترانسمیترها و متابولیسم نورونی است. استروسیت ها غنی از گلوکز بوده و انرژی آزاد شده توسط فرایند گلیکولیز را برای تبدیل گلوتامات به گلوتامین به کار می برد. استروسیت ها در محیط *in vitro* تقویت کننده شکل پذیری سیناپسی بوده، همچنین استروسیت ها در حذف و یا تکامل ارتباط سیناپسی از اهمیت به سزایی برخوردار هستند. استروسیت ها آزادکننده انواع مختلفی از نوروتروفین از

^۱cornu Ammon^۲long-term potentiation

قرار گرفته و به‌طور تصادفی در ۵ گروه ۹ تایی جایگزین شدند.

- **گروه شاهد:** هیچ‌گونه تیمار دارویی در مورد آن‌ها انجام نگرفت، ولی تمام شرایط نگهداری و تغذیه آن‌ها مشابه سایر گروه‌ها بوده و حافظه فضایی آن‌ها در جعبه ماز آبی موریس مورد آزمایش قرار گرفت.

- **گروه تجربی I:** حداکثر داروی بروموکریپتین روزانه ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و حافظه فضایی آن‌ها در جعبه ماز آبی موریس مورد آزمایش قرار گرفت (۱۳).

- **گروه تجربی II:** حداقل داروی بروموکریپتین (روزانه ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و حافظه فضایی آن‌ها در جعبه ماز آبی موریس مورد آزمایش قرار گرفت (۱۴).

- **گروه تجربی III:** حداکثر داروی هالوپریدول (روزانه ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و حافظه فضایی آن‌ها در جعبه ماز آبی موریس مورد آزمایش قرار گرفت (۱۵).

- **گروه تجربی IV:** حداقل داروی هالوپریدول (روزانه ۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و حافظه فضایی آن‌ها در جعبه ماز آبی موریس مورد آزمایش قرار گرفت (۱۶).

آموزش در ماز آبی موریس شامل ۵ مرحله بود:

در روز یادگیری: در مرحله اول حیوان از نقطه شروع ۶۰ ثانیه بدون هدایت برای آشنایی با محیط در مخزن شنا کرده سپس در پایان ۶۰ ثانیه حیوان از جعبه ماز خارج گردیده و به‌مدت ۳۰ ثانیه در قفس استراحت می‌کند، در مرحله دوم حیوان برای قرار گرفتن بر روی سکو از نقطه شروع توسط دم به‌سمت سکو هدایت شده و به‌مدت ۳۰ ثانیه برای آشنایی با صفحه پلاکسی‌گلاس بر روی آن باقی می‌ماند و سپس از جعبه ماز خارج گردیده و به-

جمله (BDNF)^۳ فاکتورهای نوروتروفیک مشتق شده از مغز و فاکتورهای نوروتروفیک مشتق شده از سلولهای گلیال (GDNF)^۴ فاکتور رشد فیروبلست (FGF-2) و نوروتروفین ۳ (NT-3) و نوروتروفین ۴/۵ (NT-۴/۵) می‌باشد (۱۱).

در واقع آستروسیت‌ها تبادل‌کننده مواد غذایی و متابولیک بین مویرگ‌های خونی و نورون‌های فعال هستند، این سلول‌ها در انواع مختلف گیرنده‌ها و سیستم انتقال پیام بیان می‌شوند. این گیرنده‌ها و پیام‌های ثانویه آن‌ها نقش خاصی را در انتقال پیام بین آستروسیت‌ها و حتی یک آستروسیت ایفا می‌کنند (۱۲). علی‌رغم این واقعیت، مطالعه تجربی که تأثیر مصرف داروی هالوپریدول و بروموکریپتین را بر اندازه هیپوکامپ و تعداد سلول‌های استروسیت سنجیده باشد در جستجوی ما یافت نشد. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر مصرف داروی هالوپریدول و بروموکریپتین بر یادگیری فضایی و اندازه هیپوکامپ و تعداد سلول‌های استروسیت در موش صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. موش‌های صحرایی نر از نژاد Sprague – Dawley و در محدوده وزنی 20 ± 220 گرم که در شرایط مناسب آب (لوله‌کشی شهر) و غذا (خوراک دام پارس)، به دور از سر و صدا و در دمای اتاق ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی، تاریکی ۱۲ ساعته (روشنی از ساعت ۶ صبح تا ۶ بعدازظهر) پرورش یافته بودند مورد بررسی

^۳.Brain – derived neurotrophic factor

^۴.Glial cell line – drived neurotrophic factor

مدت ۳۰ ثانیه در قفس استراحت می‌کند. در مرحله سوم حیوان بدون محدودیت زمانی از نقطه شروع به جستجوی سکو می‌پردازد و بعد از پیدا کردن سکو از جعبه ماز خارج گردیده و به مدت ۳۰ ثانیه در قفس استراحت می‌کند، و در مرحله چهارم حیوان بدون محدودیت زمانی از نقطه جدیدی به غیر از نقطه شروع به جستجوی سکو می‌پردازد و بعد از یافتن سکو از جعبه ماز خارج گردیده و به مدت ۳۰ ثانیه در قفس استراحت می‌کند.

در مرحله پنجم مجدداً از نقطه اولیه و بدون محدودیت زمانی به جستجو می‌پردازد (۱۷).

آماده‌سازی بافت

پس از پایان آموزش در ماز آبی موریس موش‌های صحرایی بیهوش و قفسه سینه آنها باز شد و از راه بطن چپ، ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر شده فرمالدئید (۴ درصد) در مدت ۱۰ دقیقه با فشار ۱۲۰ میلی‌متر جیوه، به دستگاه گردش خون جانور وارد شد. برای خروج خون و محلول، دهلیز راست پاره گردید، پس از ثبوت کامل بافت، مغز حیوانات خارج و به روش نمونه‌برداری تصادفی منظم برش خورده، ۱۰ قطعه از هر نمونه انتخاب و به روش همتوکسیلین اتوزین رنگ‌آمیزی گردید (۱۸ و ۱۹). این روش رنگ‌آمیزی می‌تواند، دیواره سلول و هسته‌ها را نمایان سازد.

بررسی استریولوژیک

برای محاسبه اندازه هیپوکامپ و تعداد سلول‌های استروسیت از یکی از روش‌های استریولوژی که تکنیک unbiased و مؤثر برای سنجش سه بعدی از برش‌های دو بعدی می‌باشد، استفاده گردید. به این منظور برای اندازه‌گیری حجم به کمک میکروسکوپ Microprojection تصویر برش بافتی را به روی سطح

سفیدی انداخته و صفحه‌ای شطرنجی Graid حاوی نقاط با فواصل معین از هم دیگر بر روی تصویر منطبق گردید و تعداد نقاط برخورد کرده با هیپوکامپ Σp شمرده شد و با در نظر گرفتن مساحت اطراف هر نقطه AP، سطح مقاطع محاسبه شده و با ضرب کردن آن در فاصله بین برش‌های انتخابی که ثابت بود (μm)، حجم با استفاده از فرمول ارائه شده بر طبق اصل کواولیه به- دست آمد (۱۷).

$$V = \Sigma P.a(p).t$$

همچنین برای شمارش تعداد سلول‌ها تصویر برش بافتی را به روی سطح سفیدی انداخته و Frame‌های با فواصل معین از همدیگر بر روی تصویر منطبق گردید، روش Unbiased Counting Frame شامل Rejection line (اضلاع پایین و چپ) و Acceptance lines (اضلاع بالا و راست) است، تنها اجزایی شمارش می- شوند که کاملاً درون Counting Frame و یا روی Acceptance line و Rejection line قرار گرفته باشند. سپس تعداد سلول‌های به دست آمده در فرمول زیر قرار داده شد (۲۰).

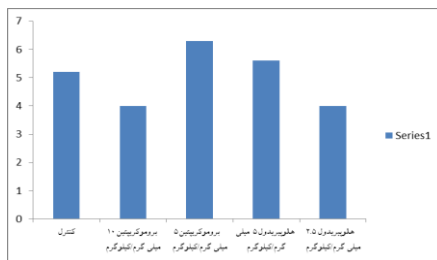
$$\Sigma Q$$

$$N_v = \frac{A \text{ frame} \times h \times \Sigma p}{N = N_v \times V}$$

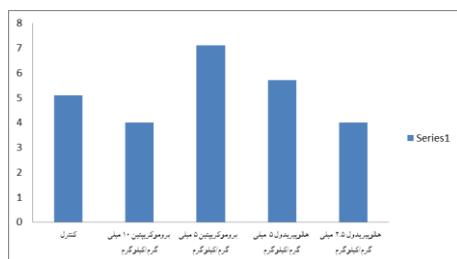
با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ (SPSS USA, Il, Chicago, Inc)، میانگین اندازه هیپوکامپ با مقادیر انحراف معیار توسط آزمون T و میانگین تعداد سلول‌های استروسیت با مقادیر انحراف معیار توسط آزمون Mannen Withney مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج با $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر احتمالی مصرف داروی بروموکریپتین و هالوپریدول بر روی یادگیری



نمودار ۲) بررسی تغییرات استریولوژیک هیپوکامپ چپ در گروه‌های مختلف نمودار بر اساس میانگین $\pm$ خطای معیار ($X \pm SEM$) هر گروه ترسیم شده است اختلاف معنی‌دار حداقل دوز بروموکریپتین با گروه کنترل است ($p \leq 0.05$)



نمودار ۳) بررسی تغییرات استریولوژیک تعداد سلول‌های آستروسیت در گروه‌های مختلف

- نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ($p \leq 0.05$)
- نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ($p \leq 0.05$)

بحث

این مطالعه نشان داد که مصرف داروی بروموکریپتین و هالوپریدول به مدت یک‌ماه با دوزهای متفاوت و همچنین آموزش یادگیری فضایی، اثرات متفاوتی را بر روی حجم هیپوکامپ، یادگیری و تعداد سلول‌های آستروسیت اعمال می‌کند.

در توضیح علل این عوامل چنین می‌توان گفت که بررسی‌های قبلی نشان داده است که هیپوکامپ سمت راست نقش مهمی در پیدا کردن مسیر و همچنین جهت‌یابی دارد (۲۱).

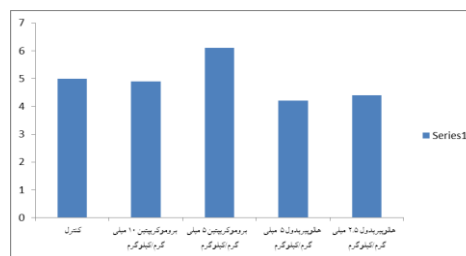
در مدل‌های حیوانی، کاهش حجم و تعداد آستروگلیا موجب کاهش حجم هیپوکامپ می‌گردد (آستروگلیا به وسیله GH بیان می‌گردد). این امکان وجود دارد که حجم هیپوکامپ در ارتباط با تراکم و پراکندگی

اندازه هیپوکامپ و تعداد سلول‌های آستروسیت موش صحرایی انجام گرفته است.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که موش‌های صحرایی دریافت‌کننده بروموکریپتین و هالوپریدول با حداکثر دوز به ترتیب با میانگین تأخیر زمانی $13/9 \pm 57/38$ ($P \leq 0.005$) و $10/2 \pm 49/48$ ($P \leq 0.035$) ثانیه و گروه‌های دریافت‌کننده بروموکریپتین و هالوپریدول با حداقل دوز به ترتیب با میانگین بهبود زمانی $15/27$ ($P \leq 0.020$) و $4/05 \pm 18/75$ ($P \leq 0.064$) ثانیه سکوی ماز آبی را یافتند.

نمودار ۱ تأثیر معنی‌دار مصرف داروی بروموکریپتین و هالوپریدول با حداکثر دوز را بر کاهش اندازه پارامتر حجم هیپوکامپ سمت راست نشان می‌دهد. همچنین نمودار ۲ نشان می‌دهد که حجم هیپوکامپ سمت چپ در طی مصرف داروی بروموکریپتین با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم افزایش می‌یابد.

نمودار ۳ نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار داروی بروموکریپتین و هالوپریدول با حداکثر دوز بر کاهش تعداد سلول‌های هیپوکامپ و همچنین افزایش تعداد سلول‌های هیپوکامپ در گروه‌های دریافت‌کننده حداقل دوز داروی بروموکریپتین و هالوپریدول می‌باشد.



نمودار ۱) بررسی تغییرات استریولوژیک هیپوکامپ راست در گروه‌های مختلف نمودار بر اساس میانگین $\pm$ خطای معیار ($X \pm SEM$) هر گروه ترسیم شده است. کاهش معنی‌دار حداکثر دوز هالوپریدول و بروموکریپتین با گروه کنترل است ($p \leq 0.05$) افزایش معنی‌دار حداقل دوز بروموکریپتین با گروه کنترل است ($p \leq 0.001$)

گیرنده‌ها باشد (۲۲).

علاوه بر این، کاهش نوروتروفین‌ها نیز از علل آتروفی سلول‌های عصبی می‌باشد (۲۳). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در بیماری پارکینسون، فاکتور رشد عصبی (NGF)^۵ و فاکتورهای نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF)^۶ کاهش می‌یابد. اگرچه NGFها بر روی بقا نورون‌های حرکتی و نورون‌های دوپامینرژیک اثر کمی دارد، GDNF می‌تواند این نورون‌ها را تقویت کند. BDNF مانع از دژنره شدن نورون‌ها شده در حالی که افزایش فعالیت عملکردی نورون‌های دوپامینرژیک را در پی دارد. بروموکریپتین به عنوان آگونیست D2 منجر به سنتز و ترشح NGF، GDNF و BDNF می‌گردد. مطالعه انجام شده توسط اوهاتا (Ohta) نشان می‌دهد که آگونیست دوپامین تحریک سنتز فاکتور نوروتروفین در استروسیت‌ها را بر عهده دارد. آگونیست‌های دوپامین مانند بروموکریپتین، پرگولید، کابرگولین و SKF 38393 در بیماران پارکینسونی باعث افزایش سنتز GDNF و NGF در استروسیت‌ها می‌گردد. به طور کلی آگونیست دوپامین القاکننده افزایش در NGF و GDNF به دلیل تحریک بیان ژن می‌باشد. در واقع این آگونیست‌ها بر روی سنتز RNA مؤثر هستند و هیچ تأثیری بر روی مورفولوژی استروسیت‌ها به دلیل خاصیت توکسیک ندارند (۲۴).

آگونیست‌های دوپامین اولین درمان برای بیماران پارکینسون می‌باشد. اثرات درمانی این داروها مشتق شده از اتصالات آگونیست دوپامین به گیرنده‌های پس سیناپسی دوپامین و کاهش بازجذب دوپامین توسط نورون‌های پیش سیناپسی دوپامین می‌باشد. استفاده از آگونیست دوپامین مانند PPX باعث تحریک تکثیر

به خصوص در ناحیه زیر بطنی SVZ^۷ در حیواناتی که میزان دوپامین کمی دارند، شده است. درمان با این داروها نه تنها باعث افزایش تکثیر سلولی شده، بلکه افزایش کل سلول‌ها را در لایه گرانولی و افزایش تمایز نورونی در لایه دانه‌دار را نیز بر عهده دارد (۲۵). مصرف هالوپیریدول منجر به افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفز. آدرنال HPA و در نتیجه بالا رفتن سطح کورتیکواستروئیدها به خصوص گلوکوکورتیکوئید می‌گردد، این در حالی است که کاهش هورمون رشد و شکل‌دهی استخوان نیز در پی مصرف این دارو ایجاد می‌گردد (۲۶) و مقادیر بالای این هورمون‌ها اثرات سوئی بر مغز و علی‌الخصوص هیپوکامپ می‌گذارد. معلوم شده است که هیپوکامپ بیشترین گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی را در مقایسه با سایر بخش‌های مغز داشته (۲۳) و به اثر این هورمون‌ها حساس‌تر می‌باشد. به طوری که افزایش گلوکوکورتیکوئید موجب بروز آتروفی و تغییرات دژنراتیو نورون‌های هیپوکامپی و کاهش یادگیری و حافظه می‌شود که این موضوع در مطالعات انسانی و حیوانی مکرراً گزارش شده است (۲۷).

مطالعات انجام شده بر روی بیماران اسکیزوفرنی کاهش ۴ درصد حجم دو طرفه هیپوکامپ را نشان می‌دهد. همواره کاهش حجم هیپوکامپ به دلیل تغییرات خاص در این ساختار نیست، بلکه ممکن است به دلیل تغییرات عمومی و کاهش ماده خاکستری هیپوکامپ باشد (۲۸).

از طرفی نوروتروفین‌ها نقش مهمی را در توسعه سیستم عصبی، تمایز، بقای سلولی و حتی مرگ سلول‌ها بازی می‌کنند. BDNF یکی از رایج‌ترین نوروتروفین‌ها در مغز می‌باشد و تنظیم کننده بقای

^۷ subventricular zone

^۵ Nerve Growth Factor

^۶ Brain – derived neurotrophic factor

سلولی، تمایز، قدرت سیناپسی و مورفولوژی بوده و در چندین اختلال سایکوتیک نقش دارد (۲۹). این دو فاکتور در شرایط نرمال و بیماری به بقا و شکل‌پذیری نورون‌های بالغ کمک می‌کنند. نوروتروفین‌ها نقش مهمی را در بقا و شکل‌پذیری نورون‌های کولینرژیک درگیر در روندهای شناختی در طی کاهش حافظه در بیماران آلزایمری و اسکیزوفرنی بازی می‌کند.

بسیاری از گزارشات بیان می‌کند که بعد از مصرف هالوپریدول و درمان با الکتروشوک در بیماران مبتلا به اسکیزوفرنی میزان NGF کاهش و اتو آنتی‌بادی NGF نیز مشاهده می‌گردد. این مطالعات نشان می‌دهند که مصرف حاد و مزمن داروهای آنتی‌سایکوتیک مانند کلوزاپین و هالوپریدول که به‌طور گسترده در بیماری‌های سایکوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد، میزان BDNF و NGF را در خون و مناطقی از مغز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۰).

مطالعه انجام شده توسط فیور (Fiore) نشان می‌دهد که میزان NGF و BDNF در هیپوکامپ بعد از مصرف هالوپریدول به‌طور خودبخود افزایش می‌یابد، این نوروتروفین‌ها به‌طور مشخص در تقویت و حفظ شکل‌پذیری سیناپسی بعد از مصرف هالوپریدول و کلوزاپین مؤثر هستند و اثرات تعدیل‌کنندگی بر سنتز و آزادسازی NGF/BDNF دارند (۳۱).

مصرف طولانی مدت آنتاگونیست‌های دوپامین باعث تغییر در حساسیت گیرنده‌های دوپامین شده است.

مطالعات انجام شده در محیط *in vitro* بیان می‌کند که هالوپریدول می‌تواند دارای اثرات سمی باشد، این درحالی است که در محیط *in vitro* نیز دارای اثرات سمی است. مصرف هالوپریدول باعث افزایش میزان OX42 و همچنین مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌گردد. طی روند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی

تعداد سلول‌ها به‌سرعت کاهش یافته و به‌طور مشخص ویژگی سلول‌ها تغییر می‌یابد (۳۲).

عقیده بر این است که مکانیزم‌های حافظه در سطح ارتباطات سیناپسی انجام می‌شود، اما تشخیص قطعی مدارهای مغزی وابسته به یادگیری و حافظه هنوز به‌درستی مشخص نشده است.

مطالعات زیادی بر روی حیوانات آزمایشگاهی و به‌خصوص موش‌ها صورت گرفته تا ارتباط سیناپس‌ها و یادگیری در آن‌ها ثابت شود. مطالعات اخیر توانسته است ارتباط بین یادگیری در محیط‌های پیچیده فضایی بر روی موش‌ها را با تراکم خارهای دندریتی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در محیط ماز آبی نشان دهند. این نتایج نشان داد که تعداد سیناپس‌ها بر حسب نورون‌ها در این آزمایش‌ها افزایش می‌یابد (۳۳).

بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که احتمالاً ساختار دوپامینرژیک مزولیمبیک در انسان در طول تشخیص و کد کردن تحریکات جدید فعال می‌باشد. افزایش انشعابات دوپامینرژیک به هیپوکامپ موجب بهبود انعطاف‌پذیری سیناپسی برای کد کردن تحریکات جدید در سیناپس‌های CA1-CA3 شده و مانع از تداخل دیگر اطلاعات ورودی می‌گردد. از طرفی سیستم دوپامین همان‌طور که در یادگیری رفتار نقش دارد، در فعالیت‌های وابسته به شکل‌پذیری سیناپسی نیز نقش دارد (۳۴).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که درمان مزمن و طولانی مدت با بروموکریپتین که آگونیست گیرنده D2 است، باعث دقیق شدن حافظه کاری و بهبود حافظه فضایی از طریق افزایش سیناپس‌ها می‌گردد (۳۵). به‌طوری‌که کاهش میزان دوپامین تغییر در عملکردهای شناختی را در پی دارد (۳۶).

مطالعات گذشته، استروسیست‌ها را به‌عنوان

حمایت‌کننده نورون‌ها در دستگاه عصبی مرکزی بیان می‌داشتند (۳۷). اما در سال‌های اخیر کشف شده است که آستروسیت‌ها در شکل‌پذیری سیناپسی و مسیرهای حافظه از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۳۸ و ۱۲). این در حالی است که مصرف مزمن داروی هالوپریدول و کلوزاپین مانع از انعطاف‌پذیری سیناپسی و نورون‌ز در هیپوکامپ می‌گردد، از طرفی استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ نیز منجر به مهار انعطاف‌پذیری نورونی و نورون‌ز و همچنین نقص‌های رفتاری القا شده به‌وسیله داروهای آنتی‌سایکوتیک می‌گردد (۳۹).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از نمودار ۱ مصرف داروی بروموکریپتین به‌مدت ۳۰ روز (روزانه به‌مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر روز) باعث کاهش یادگیری و حجم هیپوکامپ راست موش‌ها می‌شود. همچنین داده‌های این مطالعه که با استفاده از روش‌های دقیق و unbiased استریولوژی به‌دست آمده، نشان داده که حجم هیپوکامپ راست متعاقب مصرف داروی بروموکریپتین با دوز ۱۰ میلی‌گرم کاهش یافته است. در حالی‌که مصرف روزانه این دارو با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم در روز باعث افزایش یادگیری و همچنین افزایش حجم هیپوکامپ سمت راست و چپ گردیده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از نمودار ۲ مصرف

داروی هالوپریدول به‌مدت ۳۰ روز (روزانه به‌مقدار ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن در روز) باعث کاهش یادگیری و حجم هیپوکامپ موش‌ها می‌شود. همچنین داده‌های این مطالعه که با استفاده از روش‌های دقیق و unbiased استریولوژی به‌دست آمده، نشان داده که حجم هیپوکامپ راست و چپ متعاقب مصرف داروی هالوپریدول با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن در روز کاهش یافته است. در حالی‌که مصرف روزانه این دارو با دوز ۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن در روز باعث افزایش یادگیری گردیده و بر حجم هیپوکامپ بی‌تأثیر می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از نمودار ۳ تفاوت آماری معنی‌داری بین تعداد سلول‌های استروسیت هیپوکامپ در گروه‌های دریافت‌کننده حداکثر دوز بروموکریپتین و هالوپریدول با گروه شاهد و همچنین تفاوت آماری معنی‌داری بین تعداد استروسیت‌های هیپوکامپ در گروه‌های دریافت‌کننده حداقل دوز بروموکریپتین و هالوپریدول با گروه شاهد وجود دارد که این تفاوت به‌ترتیب شامل کاهش و افزایش تعداد سلول‌های استروسیت می‌باشد.

در این مطالعه نشان داده شده که مصرف داروی هالوپریدول و بروموکریپتین با دوز پایین نه تنها در بهبود یادگیری بلکه در افزایش حجم هیپوکامپ و تعداد سلول‌های استروسیت مؤثر است.

References:

1. Shahrivar T, Moazedi AA, Rasekh AR, et al. The effects of intrahippocampus injection of progesterone on passive avoidance learning and memory in adult male rats. ISMJ. In press 2012.
2. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. N Engl J Med 2003; 25: 1257-66.
3. Missale C, Nash S, Robinson SW, et al. Dopamine receptors from structure to function. Physl rev 1998; 78: 189-225.
4. Jahanshahi M, Sadeghi Y, Hosseini A, et al. Working memory, learning method and astrocytes number in different subfields of Rat's hippocampus. AJAVS 2008; 3: 28-31.
5. Lisman JE, Grace AA. The Hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information in the long-term memory. Neuron 2005; 46: 703-13.

6. Huang YY, Kanddel ER. D1/D5 receptors agonist induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the Hippoampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2446-50.
7. Floresco SB, Magyar O, Ghods-Sharifi S, et al. Multiple Dopamine receptor subtypes in the medial prefrontal cortex of the Rat regulate set-shifting. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 297-309.
8. Liggins JTP. The roles of Dopamine D1 and D2 receptors in working memory function. *MSURJ* 2009; 4: 39-44.
9. Favaroni Mendes LA, Menescal-de-Oliveira L. Role of cholinergic opiodergic and GABAergic neurotransmission of the dorsal hippocampus in the modulation of nociception in guinea pigs. *Life Sci* 2008; 83: 644-50.
10. Severino M, Pedersen AF, Trajkovska V, et al. Selective immunolesion of cholinergic neurons, leads to long-term changes in 5-HT2A receptor levels in hippocampus and frontal cortex. *neurosci lett* 2007; 428: 47-51.
11. Shen L. The effects of fluoxetine and quetiapine on the proliferation and differentiation of, and GDNF release from. C6 cell [dissertation]. Canada: saskatchewan univ., 2006.
12. Hansson E, Ronnback L. Astrocytic receptors and second messenger systems. *Adv Mol Cell Biol* 2004; 31: 475-501.
13. Davis LM, Michaelides M, Cheskin LJ, et al. Bromocriptine Administration reduces hyperphagia and adiposity and differentially affects Dopamine D2 receptor and Transporter binding in leptin-receptor-deficient Zuckerk rats and Rats with diet-induced obesity. *Neuroendocrinology* 2009; 89: 152-62
14. Marighetto A, Valerio S, Philippin JN, et al. Comparative effects of the dopaminergic agonists piribedil and bromocriptine in three different memory paradigms in rodents. *J Psychopharmacol* 2008; 22: 511-21.
15. Green MF, Marder SR, Glynn SM, et al. The neurocognitive effects of low-dose haloperidol: a two-year comparison with risperidone. *Biol Psychiatry* 2002; 51: 972-8.
16. Kirk SL, Cahir M, Reynolds GP. clozapine but not haloperidol, increase neuropeptide Y neuronal expression in the Rat hypothalamus. *J Psychopharmacol* 2006; 20: 577-9.
17. Tan SE. Activation of hippocampal nitric oxide and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in response to morris water maze learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 92: 260-6.
18. Noorafshan A, Poorasghar B, Esmaelzade B, et al. A Stereological Study on the Liver in the Early Stages of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Rats. *JMR* 2004; 2: 10-9.
19. Kurtulus A, Acar K, Adiguzel E, et al. Hippocampal neuron loss due to electric injury in rats: A stereological study. *Leg Med (Tokyo)* 2009; 11: 59-63.
20. Keuker JI, de Biurrun G, Luiten PG, et al. Preservation of hippocampal neuron numbers and hippocampal subfield volume in behaviorally characterized aged tree shrew. *J Comp Neurol* 2004; 468: 509-17.
21. Maguire EA, Burgess N, Donnett JG, et al. Knowing where and getting there: A Humans navigation network. *Science* 1998; 280: 921-4
22. Sabahi A, Hosseini sharif abad M. Effect of noise pollution on passive avoidance learning and size of hippocampus in Rat. *J Esfahan Med Sci* 2006; 24: 44-8.
23. Smith MA, Makino S, Kventansky R, et al. Stress and glucocorticoids affects the expression of brain neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA in the Hippocampus. *J Neurosci* 1995; 15: 1768-77.
24. Ohta K, Kuno S, Mizuta I, et al. Effects of dopamine agonist bromocriptine, pergolide, cabergoline and SKF-38393 on GDNF, NGF and BDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Life Sci* 2003; 73: 617-26.
25. Winner B, Sesplats P, Hagl C, et al. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp Neurol* 2009; 219: 543-52.
26. Zearak GM, Sadrkhanlou R. The effect of haloperidol on the weight loss and development of limb buds in mouse embryo. *Med J Tabriz* 2004; 60: 20-3.
27. McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol* 2001; 16: S7-S19.
28. Copolov D, Velakoulis D, McGorry P, et al. Neurobiological finding in early phase schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 31: 157-65.
29. Peng CH, Chiou SH, Chen SJ, et al. Neuroprotection by imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell mediated by activation of BDNF and MAPK

- pathway. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008; 18: 128-40.
30. Kalus P, Slotboom J, Gallinat J, et al. New evidence for involvement of the entorhinal region in schizophrenia a combined MRI volumetric and DTI study. *Neuroimage* 2005; 24: 1122-9.
31. Fiore M, Di fausta V, Lannitelli A, et al. clozapine or Haloperidol in Rats prenatally expose to methylazoxymethanol, a compounds inducing entorhinal hippocampal deficits, alter brain and blood neurotrophin's concentration. *Ann Ist Super Sanita* 2008; 44: 167-77.
32. Mitchell IJ, Cooper AC, Griffiths MR, et al. Acute administration of haloperidol induces apoptosis of Neurons in the striatum and substantia nigra in the rat. *Neuroscience* 2002; 109: 89-99.
33. Van P, Christic BR, Sejnowski TJ, et al. Running enhances neurogenesis, learning and long term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13427-31.
34. Mueller SG1, Stables L, Du AT, et al. Measurement of hippocampal subfields and age-related changes with high resolution MRI at 4T. *Neurobiol Aging*. 2007;28(5):719-26.
35. Schott BH, Sellner DB, Lauer CJ, et al. Activation of midbrain Structures by associative novelty and the formation of explicit memory in humans. *Learn Mem* 2008; 11: 383-7.
36. Line K, Massucci JL, Marion DW, et al. Attenuation of working memory and spatial acquisition deficits after a delayed and chronic bromocriptine treatment regime in rats subjected of traumatic brain injury by controlled cortical impact. *J Neurotrauma* 2002; 19: 415-25.
37. Nieoullon A, Coquerel A. Dopamine: a key regulatory to adept action, emotion, motivation and cognition. *Curr Opin Neurol* 2003; 16: S3-9.
38. Naghdi N, Asadollahi A. Genomic and nongenomic effects of intrahippocampal microinjection of testosterone on long-term memory in male adult Rats. *Behav Brain Res* 2004; 153: 1-6.
39. Kielbinski M, Soltys Z. S100 Protein astrocytes and memory 2006, DOI: 10.2478/v100052-008-0005.
40. Vafaei AA, Jalal A, Sadeghi H, et al. Effects of bilateral reversible inactivation of Accumbens Nucleus on acquisition and consolidation of memory in rats. *ISMJ* 2003; 6: 8-13.

Original Article

Stereological study of Hippocampus & Role of D₂ receptors on learning & memory

S. Asaei¹, A. Sabzevari Fard¹, S. Mansour Pour¹,
Z. Azizi¹, GH. Ranjbar Omrani^{1*}

¹Endocrinology and Metabolism Research Center, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN

(Received 16 Feb, 2011 Accepted 27 Nov, 2011)

Abstract

Background: Some of the studies showed that related to memory and Hippocampus- dependent learning, relation after take Bromocriptine (as D₂ agonist) and Haloperidol (as D₂ antagonist), there is no investigation concerning the effects of these two drugs on Hippocampus size and number of Asterocyt's cell . The aim of this study is to investigation the probable effects of Bromocriptine and Haloperidol on learning activities and Hippocampal size and number of Asterocyte in male Rats.

Materials and Methods: 45 male Rats of Sprague-Dawley race with the body weight of 220±20 gr have been selected randomly and divided to 5 groups (each one consists of 9 rats). The studied groups have been received 5 and 10 mg/kg/day and 2.5 and 5 mg/kg/day Bromocriptine and Haloperidol respectively and as daily Intra peritunial injections for one month. At the end of this period, spatial memory of different groups has been tested by Morris water maze. Then, the rats were anesthetized, and their brains have been fixed by intra cardiac fixator injection and then the brain was removed. The hippocampus serial sections of 7µm have been prepared. 10 samples have been chosen systematically from 100 and were evaluated. Volume estimation was done by Cavalier principle method.

Results: for the groups which received maximal dose of Haloperidol and Bromocriptine, it took long time and high distances to reach Morris water maze which indicated of week learning ability of these two groups. Furthermore, comparing to control, these two groups had small sized right Hippocampus. It took short time and low distances for the groups which received low dose of Haloperidol and Bromocriptine which indicated bether learning ability of these two groups and comparing to control one, these two groups had large sized Hippocampus. At the other hand, consumption of Haloperidol and Bromocritine with low and high dose in comparison with control group had increase and reduces in asterocytes cell respectively

Conclusion: This study demonstrated that the low dose consumption of Haloperidol & Bromocriptine not only affects the learning positively, but also increases the Hippocampus volume and the number of asterocytes.

Key words: stereology, bromocriptine, haloperidol, hippocampus, learning

*Address for correspondence: Endocrinology and Metabolism Research Center, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Fars, IRAN; E-mail: hormone@sums.ac.ir

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>