

## بررسی نقش سیستم نیتریک اکساید در حافظه فضایی موش های مدل تجربی مالتیپل اسکلروزیس

\*زاهده رحیمولوی مرجانی: دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (\*نویسنده مسئول).  
rzahedeh72@yahoo.com

دکتر حمیرا حاتمی: استاد پارگروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. homeirahatami@yahoo.com  
علی رضا علی همتی: استاد یار گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. hemmatii@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis-MS) از دسته بیماری های خودایمن مزمن سیستم عصبی مرکزی با اتیولوژی ناشناخته است. نیتریک اکساید (Nitric Oxide-NO) به عنوان یک رادیکال آزاد اثرات متناقضی در سیستم عصبی مرکزی و بیماری MS دارد. نیتریک اکساید یکی از عوامل مخرب سیستم ایمنی و یک فاکتور در تخریب میلین است. از طرفی ارتباط متقابل بین NO و حافظه وجود دارد.

در این مطالعه اثرات تحریک سیستم NO بر حافظه موش های مبتلا به MS بررسی شد.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش های صحرایی نر پس از بیهوشی و کانول گذاری در ناحیه CA1 هیپوکمپ، به پنج گروه زیر تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه دریافت کننده سالین، گروه MS دریافت کننده اتیدیوم بروماید (EB) (۳ میکرولیتر به ازای هر موش EB)، گروه در یافت کننده (۱۵/۱ میکرولیتر به ازای هر موش) L- Arginine (پیش ساز نیتریک اکساید)، گروه MS دریافت کننده (۳ میکرولیتر به ازای هر موش) EB + L-Arginine (۱۵/۱ میکرولیتر به ازای هر موش) L-Arginine، سنجش حافظه فضایی توسط ماز آبی موریس به انجام رسید. تجزیه و تحلیل داده ها با روش تحلیل واریانس یک طرفه انجام شد.

**یافته ها:** تجویز EB به عنوان القا کننده بیماری MS سبب تخریب حافظه فضایی شد. تجویز L- Arginine علاوه بر افزایش میزان یاد گیری و حافظه در موش های سالم باعث بهبود حافظه فضایی در موش های مبتلا به MS گردید.

**نتیجه گیری:** در موش های مبتلا به MS، L-Arginine باعث بهبود حافظه فضایی گردید. به نظر می رسد NO با فعال کردن مسیر های پیامبر داخل سلولی باعث بهبود حافظه فضایی کاهش یافته طی بیماری MS می گردد.

**کلیدواژه ها:** مالتیپل اسکلروزیس، نیتریک اکساید، حافظه فضایی

### مقدمه

علائم بیماری MS بسیار گسترده بوده و مشکلات شناختی، خلقی و عاطفی، خستگی، مشکلات حرکتی، نورو سایکولوژیک و درد، مشکلات راه رفتن، اختلال بینایی، اسپاستیسیته، اختلال سیستم دفع، و اختلال عملکرد جنسی را در بر می گیرد (۳). به علاوه، نقایص شناختی در بیش از ۵۰ درصد بیماران مبتلا به MS حتی در مراحل اولیه بیماری و گاهی بدون علائم فیزیکی اتفاق می افتد. ابعاد مختلف شناخت که در طی این بیماری تحت تاثیر قرار می گیرند که شامل توجه، فرآیندسازی موثر اطلاعات، عملکرد اجرایی، سرعت پردازش و یادگیری بینایی و حافظه می باشد. از سوی دیگر اختلال حافظه شایع ترین اختلال عملکرد شناختی در MS می باشد و میزان

بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) نوعی بیماری سیستم عصبی مرکزی (CNS) است که در آن میلین رشته عصبی تخریب می شود. این بیماری دمیلینه کننده مزمن عصبی با التهاب بافتی و مرگ سلولی یا آپوپتوز همراه است (۱). تخریب میلین بیشترین آسیب را به سیستم ایمنی بدن می رساند. صدمه دیدن غلاف میلین سلول های عصبی در مغز، طناب نخاعی و اعصاب بینایی می تواند منجر به بروز علائم MS در آن قسمت گردد. در واقع، با آسیب پوشش میلین سرعت انتقال پیام های الکتریکی بسیار کاهش یافته و سبب بروز اختلال در کارکرد طبیعی آن ها می شود (۲).

زمانی که نقش آن در انحطاط/ دژنراسیون نورونی ارزیابی می شود) و تاثیرات پاتولوژیکی مختلف آن که به وسیله ایزوفرم های مختلف NOS ایجاد می شود تاکید می گردد. iNOS اغلب اوقات با شرایط التهابی (که مقدار زیادی از آن به وسیله انواع سلول های اجدادی مونوسیت/ماکروفاژ تولید می شود) همراه است. iNOS به وسیله چندین نوع از این سلول ها از قبیل: ماکروفاژها، میکروگلیاها، آستروسیت ها الیگودندروسیت ها و حتی سلول های اندوتلیال مغزی تولید می گردد (۱۰). eNOS, nNOS نیز به طور مداوم در CNS بیان می شوند و در سیگنال های بین سلولی نوروترانسمیترها و تنظیم عروق دخالت می نمایند (۱۱). NO دو اثر عمده بر عروق مغزی دارد که هر دو ممکن است در پاتوژنز ضایعات MS درگیر شوند: یکی اتصال و گشاد سازی عروق و دیگری اختلال سد خونی-مغزی (Blood Brain Barrier-BBB). گشاد سازی عروق با واسطه NO اختلالی در نفوذ پذیری سد خونی-مغزی می باشد که عبور سلول های التهابی از داخل پارانشیم CNS را افزایش می دهد. مکانیسم های متعددی برای سمیت NO پیشنهاد شده است که شامل دامینه شدن DNA در جهت مهار تنفس میتوکندریایی و تخلیه DNA به وسیله پلی سنتاز و تشکیل پروکسی نیتريت می باشد (۱۲). پروکسی نیتريت یک اکسیدان قوی با قابلیت آسیب رسانی به بافت های هدف و به خصوص در مغز می باشد که از لحاظ بافری ظرفیت آنتی اکسیدانی فقیری دارد (۱۳). این مولکول در نهایت با ایجاد تغییر در ساختار پروتئین ها، چربی ها، و نوکلئیک اسید ها سبب از دست رفتن الیگودندروسیت ها می گردد. علاوه بر این NO قادر است با اختلال در فعالیت تنفسی میتوکندریایی و همینطور سنتز ATP پمپ های ATPase را غیر فعال کرده و در نهایت موجب مرگ سلولی شود (۱۴).

بیماری های نورودژنراتیو سیستم اعصاب مرکزی اغلب همراه با آسیب به حافظه و سایر اعمال شناختی است. این آسیب احتمالاً به دلیل مرگ انتخابی نورون های قشر مغز و هیپوکمپ و نواحی

شیوع آن بین ۴۰ تا ۶۰ درصد است (۴). عامل بیماری MS ناشناخته است. استعداد ژنتیکی، مکانیسم های خود ایمنی و عفونت ویروسی ممکن است نقش آسیب زایی در دمیالیناسیون را ایفا کند. داده های قانع کننده نشان می دهند که استعداد ابتلا به MS ارثی می باشد. مطالعات انجام شده بر روی خانواده ها و دوقلوها از استعداد ژنتیکی پشتیبانی می کند. احتمالاً نوعی ناهمگونی ژنتیکی در MS وجود دارد، به این معنا که در افراد مختلف، ژن های متفاوتی موجب بروز MS می شود (۵). سلول های میکروگلیا در شرایط نوروپاتولوژیک فعال می شوند تا هومئوستاز CNS را باز گردانند. میکروگلیاهای فعال شده با آزاد شدن فاکتورهای پیش التهابی و سیتوتوکسیک نظیر  $TNF-\alpha$ ، اینترلوکین ۱-بتا، اینترلوکین ۶، نیتريك اکساید (NO) و گونه های باز فعال اکسیژن (ROS) منجر به آسیب نورون ها می شوند (۶). استرس اکسیداتیو و به دنبال آن آپوپتوز از دیگر عواملی هستند که در پاتوژنز بیماری MS مطرح هستند. مطالعات اخیر حاکی از آن است که در این بیماری میزان تولید رادیکال های آزاد افزایش می یابد و این عوامل در تشدید بیماری موثر هستند. این احتمال مطرح است که افزایش رادیکال های آزاد از جمله نیتريك اکساید در بیماری MS ناشی از اختلال در سیستم پاکسازی کننده و یا کاهش سطح آنتی اکسیدان ها می باشد (۷). افزایش نیتريك اکساید باعث تشدید واکنش های التهابی و در نتیجه ضایعات بافتی می شود (۸). NO یک مولکول کوچک و کوتاه عمر با واکنش بسیار بالاست که با فعالیت فیزیولوژیکی مختلف در بسیاری از انواع سلول ها یافت می شود. NO تولید شده به وسیله بیان فعال NOS و NOS القائی (iNOS) نقش مهمی به عنوان تنظیم کننده و تعدیل کننده فرآیند های بیشماری از جمله عامل القاء کننده انقباض عضلانی، گشاد سازی عروق و انتقال نوروترانسمیترها دارد (۹). افزایش NO در سیستم عصبی مرکزی معمولاً با افزایش در ایزوفرم هایی از NO سنتز القایی (iNOS) که معمولاً توسط التهاب سلولی ایجاد می شود همراه است. بر اهمیت توجه به منبع NO

تایی قرار داده شدند. همه موش‌ها دارای شرایط یکسان دمایی و دوره ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بودند. در تمام مراحل انجام آزمایش‌ها اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مراعات شده است. قبل از جراحی به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط آزمایشگاه تطبیق دهند.

گروه‌های آزمایش: ۱- گروه کنترل (هیچ نوع تزریقی دریافت نمی‌کنند) ۲- گروه دریافت کننده سالیین (جراحی به اضافه دریافت حلال اتیدیوم بروماید و حلال داروها که همان سالیین می باشد). ۳- گروه دریافت کننده اتیدیوم بروماید (EB) (به عنوان القا کننده دمییلیناسیون) به میزان ۳ میکرو لیتر به ازای هر موش به صورت تک دوز. ۴- گروه دریافت کننده ال-آرژنین (پیش ساز نیتریک اکساید) (تهیه شده از شرکت دارویی سیگما آمریکا) به میزان (۱/۱۵ میکرو لیتر به ازای هر موش L-Arginine) به مدت ۵ روز. ۵- گروه دریافت کننده اتیدیوم بروماید و ال-آرژنین به میزان (۳ میکرو لیتر به ازای هر موش EB، ۱/۱۵ میکرو لیتر به ازای هر موش L-Arginine) که اتیدیوم بروماید را به صورت تک دوز دریافت کردند و بعد از یک هفته ال-آرژنین را به مدت ۵ روز دریافت کردند. ارزیابی یادگیری و حافظه بعد از ۵ روز دریافت دارو با ماز آبی موریس صورت گرفت. برای تزریق دارو، کانول تزریق راهنما در ناحیه CA1 هیپوکمپ تعبیه شده بود. ابتدا حیوان با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش گردید. سپس در دستگاه استرئوتاکس قرار گرفته و با استفاده از اطلس پاکسینوس کانول گذاری در ناحیه هیپوکمپ با مختصات  $(AP = -3/8ML; \pm 2/2DV; +2/7)$  صورت گرفت. این کانول با استفاده از خمیر دندان پزشکی فیکس گردید. دهانه کانول برای جلوگیری از عفونت به وسیله مفتول فلزی مسدود شد و یک هفته به حیوان جهت بهبودی فرصت داده شد.

برای ایجاد دمییلیناسیون سم اتیدیوم بروماید به میزان ۳ میکرو لیتر (از محلول ۰/۱ درصد اتیدیوم بروماید در سالیین ۰/۹ در صد) به ناحیه CA1

از مغز که مرتبط با یادگیری و حافظه هستند می‌باشد (۱۵). با وجود اینکه شواهدی که نشان می‌دهد نیتریک اکساید و متابولیت‌های آن در مالتیپل اسکلروزیس برای مغز مضر است، تلاش برای کاهش فعالیت NO و NOS در حیوانات مدل MS کمک نمی‌کند چرا که از یک سو NO فعالیت ضد التهابی دارد و از سوی دیگر نقش پیش التهابی دارد (۱۶). مشخص شده است که در هیپوکمپ نیتریک اکساید به عنوان یک پیامبر رتروگراید عمل می‌کند که به صورت پس سیناپسی ساخته شده و روی پایانه‌های پیش سیناپسی اثر می‌کند (۱۷). این مولکول در اعمال شناختی حیوان و تشکیل حافظه و یادگیری نقش کلیدی دارد. هیپوکمپ بالغین یک مرکز حیاتی برای فرآیندهای یادگیری و حافظه می باشد که به شدت نسبت به بیماری‌های نورولوژیک آسیب پذیر می باشد. نقایص شناختی در ۲۵ الی ۶۰ درصد بیماران مبتلا به MS که از آسیب هیپوکمپ رنج می‌برند، مشاهده شده است (۱۸). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد حین یادگیری و اکتساب حافظه، تغییرات نورونی ایجاد شده توسط NO به وقوع می‌پیوندد (۱۹). NO به عنوان یک عامل مهم در نورونز بالغین در نظر گرفته می‌شود. NO به عنوان تنظیم کننده منفی تقسیم سلولی در CNS بالغین عمل می‌نماید (۱۳). هیپوکمپ به عنوان مرکز اصلی یادگیری و حافظه در بیماری‌های نورولوژیک و ایسکمی، بسیار حساس و آسیب پذیر می باشد. اختلال حافظه در ۲۵ تا ۶۰ درصد بیماران MS گزارش شده است (۲۰). در مطالعه حاضر تداخل عمل سیستم نیتریک اکساید در حافظه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار گرفت. در واقع هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی این سوال است که آیا تحریک یا مهار سیستم NO طی بیماری MS تاثیری روی حافظه دارد یا نه؟

## روش کار

در این مطالعه تجربی از ۳۵ سر موش صحرائی نر از نژاد Wistar با محدوده وزنی  $20 \pm 200$  گرم استفاده شد که به طور تصادفی در پنج گروه هفت

کلیه آزمون‌ها حداقل سطح معنی داری تفاوت‌ها  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

اثر تجویز L-Arginine و اتیدیوم بروماید (EB) در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه فضایی:

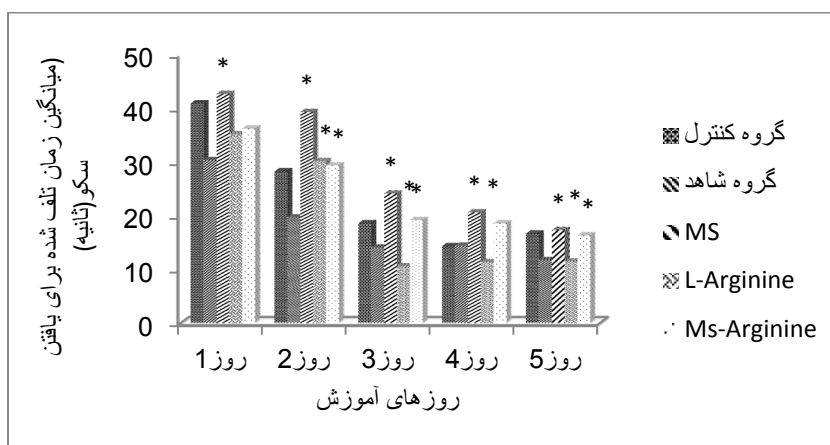
الف) میانگین زمان لازم برای یافتن سکو در طی یادگیری فضایی: نمودار شماره ۱ متوسط زمان لازم برای یافتن سکودر پنج روز آموزش را در هر پنج گروه مورد مطالعه نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی اختلاف معنی داری بین گروه کنترل، شاهد و گروه MS در روز اول، دوم، سوم، چهارم و روز پنجم مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). از طرفی گروه MS در یافتن کننده L-Arginine نسبت به گروه MS اختلاف معنی داری را در روز های دوم، سوم و پنجم نشان داد که گروه MS در یافتن کننده L-Arginine نسبت به گروه MS زمان کمتری برای پیدا کردن سکو تلف کردند که نشان دهنده بهبود حافظه فضایی در موش‌های مبتلا به MS است ( $p < 0.05$ ). در حالی که بین گروه کنترل و گروه دریافت کننده سالیین نسبت به گروه دریافت کننده L-Arginine اختلاف معنی داری در روز دوم، چهارم و پنجم نشان داد که بیانگر این است که گروه دریافت کننده L-Arginine نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده سالیین زمان کمتری برای یافتن سکو تلف کردند که نشان دهنده اثر مثبت L-Arginine بر روی حافظه می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

ب) میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو طی یادگیری فضایی: نمودار ۲ نشان دهنده مسافت طی شده برای یافتن سکو در طی پنج روز آموزش می‌باشد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی نشان داد که گروه MS در مقایسه با گروه کنترل و گروه دریافت کننده سالیین مسافت بیشتری را برای یافتن سکو در طی روز های آموزش طی کردند که نشان دهنده اثر تخریبی بیماری MS بر حافظه فضایی می‌باشد و اختلاف معنی داری بین گروه

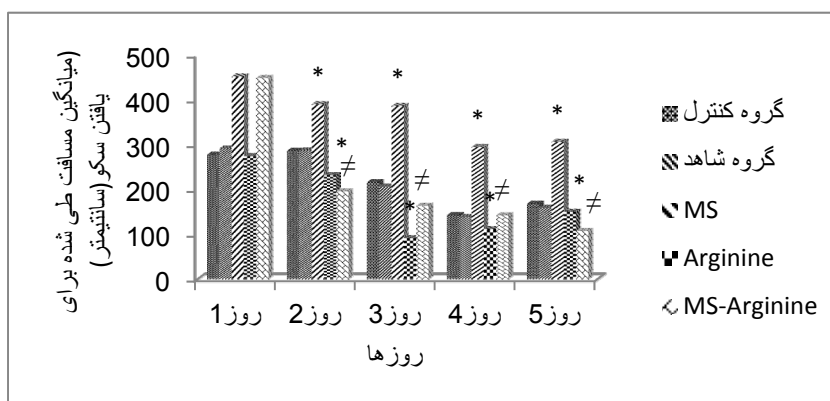
هیپوکمپ مغز به صورت یک طرفه تزریق شد. جهت بررسی اثرات تحریک کننده سیستم نیتریک اکساید یک هفته بعد از تزریق اتیدیوم بروماید، ال-آرژنین به مدت ۵ روز در مدت زمان یک دقیقه روزانه تزریق شد. با توجه به مختصات CA1 هیپوکمپ در اطلس پاکسینوس (۲۱)، از سرنگ همیلتون ۱۰ میکرولیتری و لوله پلی اتیلن ۱۰ cm و سر سوزن ۲۷ برای تزریق استفاده شد و تزریقات با حجم ۱ میکرولیتر به مدت یک دقیقه صورت گرفت.

جهت تأیید بافت شناسی و برای حصول اطمینان از قرار گیری صحیح کانول طبق اطلس پاکسینوس از نمونه‌ها مقاطع بافتی تهیه شده و با کریستال ویوله رنگ آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

ماز آبی موریس و روش یادگیری و حافظه فضایی: این دستگاه از یک حوضچه استوانه ای شکل سیاه رنگ تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتی متر آن با آب  $1 \pm 20$  درجه سانتی گراد پر خواهد شد. یک سکوی کوچک از جنس فلز تیره رنگ با قطر ۱۰ سانتی متر، و یک سانتی متر زیر سطح آب در مرکز ربع دایره جنوب غربی قرار دارد. موش به طور تصادفی از یکی از ربع های حوضچه آزاد شده و زمان پیدا کردن سکو توسط آزمایشگر ثبت خواهد شد. هر موش به مدت ۵ روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) از ۴ ربع حوضچه به طور تصادفی تحت آزمایش قرار خواهند گرفت. یک تجربه زمانی به اتمام می‌رسد که موش بر روی سکو رفته و یا ۹۰ ثانیه گذشته باشد. سپس ۳۰ ثانیه به حیوان فرصت داده می‌شود و پس از آن که تجربه بعدی شروع می‌گردد. موش‌هایی که محل سکو را پیدا نکنند توسط آزمایشگر به روی سکو منتقل شده و اجازه می‌یابند ۳۰ ثانیه در آن جا بمانند. پس از اتمام تجربه چهارم موش‌ها از حوضچه خارج می‌شوند. نتایج حاصل به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین ارائه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه انجام شد. از آزمون تعقیبی توکی Tukey جهت تعیین گروه‌هایی که با هم اختلاف معنی داری داشتند، استفاده شد. در



نمودار ۱- زمان سپری شده برای یافتن سکو در روزهای آموزش در گروه‌های کنترل، گروه دریافت کننده سالین (sham)، گروه MS دریافت کننده ArginineL-، گروه MS و گروه دریافت کننده



نمودار ۲- میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو در روزهای آموزش در گروه‌های کنترل، گروه دریافت کننده سالین (sham)، گروه MS دریافت کننده ArginineL-، گروه MS و گروه دریافت کننده

چهارم مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

زمان سپری شده در طی روزهای اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم توسط گروه MS نسبت به گروه کنترل، گروه دریافت کننده سالین افزایش نشان داد. گروه MS دریافت کننده ArginineL- نسبت به گروه MS زمان کمتری را برای پیدا کردن سکو در روزهای دوم، سوم و پنجم تلف کردند. گروه دریافت کننده ArginineL- نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده سالین در روزهای دوم، چهارم و پنجم زمان کمتری برای یافتن سکو سپری کردند، که اختلاف معنی داری بین گروه‌های مذکور در روزهای دوم، چهارم و پنجم مشاهده شد. \* ( $p < 0.05$ ) بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه کنترل، گروه دریافت کننده سالین و گروه‌های تجربی است. ( $p < 0.05$ ) بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه MS و گروه MS در

کنترل، گروه دریافت کننده سالین و گروه MS در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم وجود دارد ( $p < 0.05$ ). در طی روزهای آموزش گروه MS دریافت کننده L-Arginine در مقایسه با گروه MS مسافت کمتری را برای یافتن سکو طی کردند که بیانگر بهبود حافظه فضایی در موش‌های مبتلا به MS می‌باشد و اختلاف معنی داری بین دو گروه در روزهای دوم، سوم، چهارم و پنجم مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). از طرفی نتایج نشان داد که گروه دریافت کننده L-Arginine در مقایسه با گروه کنترل و گروه دریافت کننده سالین مسافت کمتری را برای یافتن سکو طی نمودند که بیانگر اثر تقویتی L-Arginine بر حافظه فضایی در موش‌های سالم می‌باشد. اختلاف معنی داری بین گروه دریافت کننده سالین، کنترل و گروه دریافت کننده L-Arginine در روزهای دوم، سوم و

عصبی ممکن است به وسیله ظرفیت فیزیولوژیک CNS ترمیم گردد (۲۳). Zeeberg و Elsass در بررسی زمان واکنش در بیماران مبتلا به MS مشاهده کردند که این بیماران نسبت به افراد طبیعی دارای تاخیر در زمان واکنش هستند (۲۴). Roa نشان داد که بیماران MS مستقل از مشکل حرکتی در سرعت پردازش ذهنی و متعاقب آن در حافظه، کندی نشان می دهند. Kujala و همکاران به این نتیجه رسیدند که سرعت پردازش در تمام حوزه های شناختی به خصوص حافظه با مشکل روبه رو می شود (۲۵).

۲- اثر نیتریک اکساید در ناحیه هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه فضایی: نتایج این مطالعه نشان می دهد که ArginineL- به عنوان تحریک کننده سیستم نیتریک اکساید یادگیری و حافظه را در موش های صحرایی مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس بهبود می بخشد. وجود یک رابطه علت و معلولی بین LTP و حافظه فضایی، دخالت NO را در حافظه حمایت می کند. مهارکننده های سنتز NO مانند L-NAME، نیز القاء LTP را در آزمایش های *in vivo* و *in vitro* (۲۶) مهار می کنند. اثرات آن ها با تحریک کننده نیتریک اکساید احتمالاً با دخالت ArginineL- معکوس می شود (۲۷). گروهی از محققین نشان دادند که ArginineL- به عنوان پیش ساز سنتز نیتریک اکساید، تثبیت حافظه و یادگیری را افزایش می دهد. این نتایج با یافته های حاصل از پژوهش های انجام شده توسط حسین زاده و پورابولی (۲۸) در اثر تجویز توام مورفین و ال-آرژنین در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه فضایی موش های صحرایی موافق است. همچنین با نتایج حاصل از پژوهش انجام شده توسط حسین زاده و کریمی (۲۹) در بررسی اثر تداخل آدنوزین و نیتریک اکساید بر حافظه فضایی موش به روش ماز آبی موریس هم خوان می باشد. Quing نشان داد که ArginineL- حافظه و یادگیری را در آزمایش ماز شعاعی در موش های صحرایی بهبود می بخشد (۲۹). Vanaja هم گزارش کرد که ArginineL- تثبیت حافظه را در موش های صحرایی را افزایش می دهد. افزایش دوز این دارو

یافت کننده L-Arginine است.

مسافت طی شده در طی روزهای دوم، سوم، چهارم و پنجم توسط گروه MS نسبت به گروه کنترل، گروه دریافت کننده سالین افزایش نشان داد. گروه MS دریافت کننده ArginineL- نسبت به گروه MS مسافت کمتری را برای پیدا کردن سکو در روزهای دوم، سوم، چهارم و پنجم طی کردند. گروه دریافت کننده ArginineL- نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده سالین در روزهای دوم، سوم، چهارم و پنجم مسافت کمتری برای یافتن سکو طی کردند، که اختلاف معنی داری بین گروه های مذکور در روزهای دوم، سوم، چهارم و پنجم مشاهده شد. ( $p < 0/05$ ) بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه کنترل، گروه دریافت کننده سالین و گروه های تجربی است. ( $p < 0/05$ ) بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه MS و گروه MS در یافت کننده L-Arginine است.

### بحث و نتیجه گیری

۱- اثر تزریق اتیدیوم بروماید (EB) به عنوان القا کننده MS در ناحیه هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه فضایی: نتایج تحقیق نشان می دهد که تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه هیپوکمپ باعث کاهش یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات می شود. تزریق EB به داخل هیپوکمپ موجب دمیلیناسیون موضعی می گردد. فرآیند دمیلیناسیون ناشی از تزریق EB ابزار مناسب جهت مطالعه بررسی اثرات داروهای گوناگون بر بیماری های دمیلینه کننده مانند MS است. مصرف بیولوژیکی آن موجب تداخل در نسخه برداری DNA، مختل کردن سنتز پروتئین به علت تاثیر بر روی RNA و مهار RNA وابسته به میتوکندری و در نتیجه منجر به مرگ سلولی می شود (۲۲). تزریق اتیدیوم بروماید یک هفته بعد از تزریق موجب القای دمیلیناسیون می شود که در بررسی های مولکولی به دنبال تزریق EB میزان پروتئین آپوپتیک caspase-3 فعال در ۷ روز پس از تزریق افزایش پیدا می کند (۲۲). EB موجب مرگ سلول های الیگودندروسیتی از طریق تولید رادیکال های آزاد می شود. اما این آسیب

حاصله حاضر نشان داد که تزریق EB به داخل هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر باعث دمیلینه شدن و التهاب بافت مغزی می‌شود که این اثر هیپوکمپ را تحت تاثیر قرار می‌دهد و موجب اختلال در یادگیری و حافظه موش‌ها می‌گردد. تزریق اتیدیوم بروماید به عنوان عامل دمیلینه کننده برای مطالعه بیماری MS مورد استفاده قرار می‌گیرد اما شرایط التهابی مشابه بیماری MS را در بر نمی‌گیرد. مدل MS ایجاد شده به وسیله اتیدیوم بروماید صرفاً جهت بررسی فرآیند دمیلینه شدن در فاز اولیه بیماری MS شامل عود کننده و فروکش کننده مناسب است. اتیدیوم بروماید در CNS دمیلیناسیون موضعی ایجاد می‌کند. تزریق اتیدیوم بروماید به داخل هیپوکمپ موجب دمیلیناسیون موضعی می‌شود. اتیدیوم بروماید موجب مرگ سلول‌های الیگودندروسیتی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۹). تزریق Arginine-L به موش‌های مدل تجربی MS باعث بهبود یادگیری و حافظه فضایی آن‌ها گردید و از طرفی تزریق L-Arginine به موش‌های سالم حافظه را در آن‌ها در مقایسه با موش‌های گروه کنترل و شاهد تقویت می‌نمود که نشان دهنده اثر مثبت تحریک سیستم نیتریک اکساید بر حافظه و یادگیری می‌باشد. NO می‌تواند در آسیب‌های ناشی از منابع مختلف همچون پایانه‌های عصبی، القاء iNOS و یا آزادسازی نوروترانسمیتر افزایش یابد. NO می‌تواند سبب گشادی عروقی بسیار قابل توجه در گردش خون مغزی در شرایط طبیعی و پاتولوژیک گردد (۱۶). نیتریک اکساید نقش چندگانه‌ای در MS و انسفالومیلیت تجربی (AE) دارد. عملکرد آن ممکن است هر دو اثر مثبت و منفی را بر روی توسعه بیماری MS داشته باشد. شناخت مکانیسم‌های مولکولی عملکرد NO در CNS در القاء جنبه‌های سودمند فعالیت NO و مهاراثرات مضر آن در کنترل بیماری‌های عصبی با اهمیت است (۱۳). Smith and Hans Lassmann بیان داشتند که پیچیدگی بیوشیمیایی بالای این مولکول این واقعت را تقویت می‌کند که NO یک مولکول سیگنالینگ قوی است، بنابراین حضور آن می‌

اثر بهتری روی حافظه دارد یعنی بر روند حافظه و یادگیری هر چه غلظت نیتریک اکساید در مغز بالاتر رود اثر تقویتی آن بیشتر است (۲۹). همچنین در مطالعه دیگری که توسط Telegoly و Kokavszky انجام شد نشان داده شد که Arginine-L تزریق شده به صورت داخل بطنی تثبیت حافظه را در آزمایش اجتنابی غیر فعال بهبود می‌بخشد اما بازیابی حافظه رادر موش‌های صحرایی متاثر نمی‌کند (۲۶). مکانیسم اثر NO بر یادگیری و حافظه بدین صورت است که نیتریک اکساید می‌تواند آزادسازی گلوتامات و دوپامین را از نورون‌های مجاور القا کند و بنابر این تسهیل سیناپسی را تحت تاثیر قرار دهد در فرم یادگیری، سیگنال ترانس داکشن NO شامل فعال شدن گیرنده جفت شده با گوانیل سیکلاز می‌باشد. نتیجه عمل افزایش cGMP است که این افزایش باعث شروع آبشار‌های فسفریلاسیون توسط پروتئین‌کینازها و در نتیجه فعال شدن فاکتورهای نسخه برداری می‌شود و از این طریق NO می‌تواند روی تشکیل حافظه نقش داشته باشد. در هیپوکمپ یادگیری و حافظه توسط تحریک مکرر فیبرهای گلوتاماترژیک آوران که وابسته به فعال شدن گیرنده‌های گلوتاماتی نوع NMDE پس سیناپسی می‌باشد، ایجاد می‌شود. این گیرنده‌ها با سنتز NO وابسته به کلسیم - کالمودولین در ارتباط می‌باشند. در واقع جریان یون کلسیم از طریق کانال‌های گیرنده NMDA با تشکیل NO همراه است. از آنجایی که NO در محیط‌های آبی و چربی قابل انتشار می‌باشد می‌تواند به عنوان یک مولکول سیگنالی داخل سلولی سریع روی تشکیلات سیناپسی اثر بگذارد در مورد L-Arginine، این مولکول از طریق تحریک آرژنین وازوپرسین (AVP) هم می‌تواند اثراتش را اعمال کند، که این اثرات توسط cGMP میانجیگری می‌شود. سپس AVP از طریق تحریک گیرنده‌های V1 وازوپرسین مرکزی روی حافظه اثر مثبت می‌گذارد (۲۸).

۳- اثر تجویز توام تحریک کننده سیستم نیتریک اکساید و اتیدیوم بروماید در ناحیه هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه فضایی: نتایج

با توجه به نقش دوگانه NO در سیستم عصبی مرکزی (اثر پیش التهابی و ضد التهابی) به نظر می رسد در دوزهای ارائه شده NO با فعال نمودن مسیر های پیامبرهای ثانویه و اعمال اثرات ضد التهابی سبب تقویت حافظه فضایی در موش های مبتلا به MS گردیده است.

#### منابع

1. Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F. Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *Journal of Rehabilitation Research and Development*. 2006; 43(1):123-32.
2. Gonzalez-Rosa JJ, Vazquez-Marrufo M, Vaquero E, Duque P, Borges M, Gamero MA, et al. Differential cognitive impairment for diverse forms of multiple sclerosis. *BMC Neurosci*. 2006; 7:39.
3. Tinnefeld M, Treitz FH, Haase CG, Wilhelm H, Daum I, Faustmann PM. Attention and memory dysfunctions in mild multiple sclerosis. *Eur Arch Psychiatry ClinNeurosci*. 2005; 255(5):319-26.
4. Audoin B, Guye M, Reuter F, Au Duong MV, Confort-Gouny S, Malikova I, et al. Structure of WM bundles constituting the working memory system in early multiple sclerosis: a quantitative DTI tractography study. *Neuroimage*. 2007; 36(4): 1324-30.
5. Wiener, C. *Harrison's Principles of Internal Medicine* McGraw-Hill; 2008.
6. Siegel GJ. *Basic Neurochemistry: Apoptosis and necrosis*. Seventh edition. . City: Elsevier Academic Press; 2006. P.603- 615.
7. Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema DJ, et al. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2006; 253(4):483-7.
8. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2002; 1(4):232-41.

تواند رفتار سلول را تغییر دهد از جمله در سلول هایی که به طور مستقیم در ایجاد و کنترل فرآیند های پاتولوژیکی درگیر هستند. همه این موارد نشان می دهد که درک درستی از نقش NO در MS وجود ندارد که به عنوان یک چالش برای سال های زیادی باقی مانده است. اما این چالش ها چندین نقش مستقیم NO را در فرآیند بیماری MS نشان می دهند. به عنوان مثال، NO در فرآیندهای ایمونولوژیکی درگیر می شود که منجر به توسعه ضایعات و اختلال در مکانیسم های زیر بنایی تولید نوروترانسمیترها می شود. NO اثر مستقیمی بر روی نفوذ پذیری سد خونی- مغزی (BBB) و کنترل فرآیندهای التهابی دارد. NO همچنین می تواند دمیالینه شدن و تخریب الیگودندروسیت ها و آسیب عملکردی و ساختاری اکسون ها را میانجیگری کند. NO مدت ها به عنوان عامل تشدید التهاب در CNS در نظر گرفته می شد. اما مطالعات اخیر با هدف درمان انسفالومیلیت تجربی با مهار کننده های خاص NOS نتایج گیج کننده ای را ارائه داد. یافته ها نشان داد که NO از یک طرف به وسیله اختلال در عملکرد سد خونی- مغزی (BBB) نقش پیش التهابی دارد و از طرفی به دلیل داشتن خواص سیتوتوکسیک ممکن است به کنترل فرآیندهای پاسخ ایمنی از طریق تنظیم فرآیند های ایمنی کمک نماید. به نظر می رسد احتمالاً NO نقش مهمی در از دست دادن عملکرد عصبی در MS داشته باشد (۱۶). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش سیستم نیتریک اکساید در دوز مورد نظر باعث بهبود حافظه فضایی در موش های مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس شد.

به طور خلاصه نقش سیستم نیتریک اکساید در CNS دوگانه است و دارای هر دو اثر پیش التهابی و ضد التهابی می باشد. به نظر می رسد غلبه اثر پیش التهابی آن بر اثر ضد التهابی سبب تشدید علائم بیماری MS و تخریب حافظه فضایی می گردد. در صورتی که غلبه اثر ضد التهابی آن بر اثر پیش التهابی آن با فعال نمودن مسیر های ضد التهابی از طریق پیامبرهای ثانویه سبب تخفیف علائم بیماری MS و بهبود حافظه فضایی می گردد.



of nitric oxide-producing neurons in rat brain. *Brain Research*. 1998; (801):101-6.

20. Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, Schonfeld MA, Busa E, et al. Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain*. 2003; 126:1734-44.

21. Paxinos G, Watson C. The rat in stereotaxic coordinates. Hard Cover Edition: Academic press; 2007.

22. Rus H, Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Shin ML. Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *J Rehab Res Dev*. 2006; 43: 123-32.

23. Franklin RJM, Setzu A, Ffrench-Constant C. CNS axons retain their competence for myelination throughout life. *Glia*. 2004; 45:307-11.

24. Elsass P, Zeeberg I. Reaction time deficit in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1983; 68:257-61.

25. Kujala P, Portin R, Revonsuo A, Ruutinen J. Automatic and controlled information processing in multiple sclerosis. *Brain*. 1994; 117:1115-26.

26. Plech A, Klimkiewicz T, Maksym B. Effect of L-arginine on memory in rats. *Pol J Pharmacol*. 2003; 55: 987-92.

27. Hosseinzadeh M, Pouraboli I, Abbasnejad M. The effect of the infusion of morphine and L - Arginine in the hippocampal CA1 region of male rat on spatial learning and memory in male rats. *Journal of Neurological Journal of Neurological Sciences (Turkish)*. 2009;5(67):309-16. Persian.

28. Hosseinzadeh M, Karimi GR, Masjedi F. Effect of adenosine and nitric oxide interaction on spatial memory in rats Morris water maze procedure. *Iranian Journal of Basic Medical* 2007; 10(1): 1-7. [Persian].

29. Christelle LM, Garthwaite B. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 2003; 23:1941-8.

9. Nathan, C, and Q. W. Xie. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994; 269:13725-8.

10. Borgerding RA, Murphy S. Expression of inducible nitric oxide synthase in cerebral endothelial cells is regulated by cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem*. 1995; 65:1342-7.

11. Linñares D, Taconis M, Man P Correcha M, Fordham S, Staykova M, et al. . Neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination. *The Journal of Neuroscience*. 2006; 26(49):12672-81.

12. Inoue S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett*. 1995; 371:868.

13. Encinas JM, Manganas L, Enikolopov G. Nitric oxide and multiple. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2005; 5:2328.

14. Akbarian F, Sanati MH. The role of mitochondria in multiple sclerosis disease. The 12th Iranian Genetics Congress. Sh. Beheshti university; 22-24 MAY 2012 [Persian].

15. Abe K, Saito H. Effect of Saffron extract and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. *Phytother Res*. 2000; 14:149-52.

16. Smith KJ, Lassman H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2002; 1:232-41.

17. Böhme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, et al. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:9191-4.

18. Goudarvand 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; 30:289-99.

19. Zhang S, Chen J, Wang S. Spatial learning and memory induce up-regulation



## The investigation of the role of nitric oxide system in the spatial memory of rats in experimental model of multiple sclerosis

\***Zahedeh Rahimluy Marjani**, MSc. Student of Animal physiology, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. (\*Corresponding author). [rzahedeh72@yahoo.com](mailto:rzahedeh72@yahoo.com)

**Homeira Hatami**, PhD. Assistant Professor of Animal Biology, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. [homeirahatami@yahoo.com](mailto:homeirahatami@yahoo.com)

**Ali Reza AliHemmati**, PhD. Assistant Professor of Histology & Embryology, Department of Histology & Embryology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [hmmatii@yahoo.com](mailto:hmmatii@yahoo.com)

### Abstract

**Background:** Multiple sclerosis (MS) is one of the chronic autoimmune diseases of the central nervous system with unknown etiology. Nitric oxide (NO) as a free radical has contradictory effect on the central nervous system and on MS disease. Nitric oxide is one of the distractive factors of the immune system and is a factor in the destruction of myelin. On the other hand, there is an interaction between NO and memory. In this study, the effects of stimulation and suppression of the NO system have been investigated on the memory of MS.

**Methods:** In this experimental 35 male rats were anesthetized and a cannula was placed in the hippocampus CA1 region, later were divided into five groups, including: control, sham, Ethidium Bromide (EB) (3  $\mu$ L / rat), L-Arginine (15/1  $\mu$ g / rat and), EB (3  $\mu$ L / rat) + L-Arginine (15/1  $\mu$ g / rat and). The Morris water maze was used for studying the spatial memory. Data analysis was performed by using one way ANOVA.

**Results:** Administration of EB as the inducer of MS disease caused the impairment of spatial memory, L-Arginine improved spatial learning and memory in healthy rats, L-Arginine improves spatial memory in rats with MS.

**Conclusions:** In MS rats, L-Arginine improved the spatial memory. It seems that NO by activating intracellular secondary messenger pathways improves the declined spatial memory during MS disease.

**Keywords:** Multiple sclerosis, Nitric oxide, Spatial memory