

# مطالعه توصیفی تأثیر یادگیری فضایی در ماز آبی موریس بر فراساختار سیناپسهای ناحیه CA1 تشکیلات هیپوکامپی موش صحرایی

عباس پیریایی M.Sc.؛ دکتر یعقوب فتح الهی Ph.D.\*، دکتر تقی الطریحی Ph.D.\*، دکتر ناصر نقدی Ph.D.\*

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه فیزیولوژی

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۷۱۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

## چکیده

**هدف:** بررسی تغییرات فراساختاری سیناپسهای ناحیه CA1 تشکیلات هیپوکامپی پستی در اثر یادگیری فضایی

**مواد و روشها:** در این مطالعه از ۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar استفاده شد، که به دو گروه آموزش دیده و شاهد تقسیم شدند. موشهای گروه آموزش دیده طی سه روز، و هر روز شامل هشت کار آزمایی در ماز آبی موریس (Morris water maze) تحت آموزش قرار گرفتند، در صورتیکه موشهای گروه شاهد هیچگونه آموزشی نمی‌دیدند. در روز آخر همه موشها تحت بیهوشی عمیق ابتدا توسط نرمال سالین و سپس فیکساتور کارنوسکی پرفیوژن شدند. سپس مغز آنها از جمجمه خارج گردید و با استفاده از تکنیک پانچ، ناحیه CA1 تشکیلات هیپوکامپی پستی در فاصله ۳/۵ - تا ۴/۵ میلی‌متر از ناحیه Bregma نمونه برداری شد، و نمونه‌ها جهت بررسی میکروسکوپ الکترونی گذاره آماده شدند، و بعد از برش‌گیری و رنگ آمیزی مورد مشاهده قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که در گروه آموزش دیده تعداد سیناپسهای مقعر و سیناپسهای که دارای ناحیه متراکم پس سیناپسی نازکی بودند نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود. همچنین در گروه آموزش دیده ناحیه اتصال سیناپسی وسیع و گاهی ۷ شکل شده بود، و نیز تعدادی سیناپس با ناحیه متراکم پس سیناپسی منفذدار مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان چنین عنوان کرد که عمل یادگیری فضایی شماری تغییرات فراساختاری را در سیناپسهای ناحیه CA1 القاء می‌کند که این تغییرات موجب افزایش کارآیی سیناپسی می‌شوند.

**کل واژگان:** شکل پذیری سیناپسی، ناحیه CA1، یادگیری فضایی، ماز آبی موریس، میکروسکوپ الکترونی گذاره

## مقدمه

فرآیند یادگیری و چگونگی ذخیره اطلاعات در مغز از جمله مسائلی است که مورد توجه محققین علوم اعصاب قرار گرفته است. در گذشته محققین بر این عقیده بودند که دستگاه اعصاب مرکزی (CNS) انعطاف‌ناپذیر است، و مغز در ابتدای زندگی به شکل نهایی خود تکامل یافته و پس از آن بصورت دستگاه غیرقابل انعطافی در می‌آید. اما طبق مطالعات اخیر مشخص شده حتی مغز یک فرد بزرگسال که فاقد توانایی تولید سلولهای جدید است می‌تواند برای سازش با محیط فعل و انفعالات بین سلولی خود را تغییر دهد (۲، ۱).

فرآیندهای رفتاری موجود زنده تحت کنترل دو عامل وراثت و محیط است. برای اینکه محیط بتواند بر رفتار موجود تاثیر بگذارد، باید دستگاه عصبی قدرت تاثیر پذیری داشته باشد. Ramon Y Cajal اولین بار بیان کرد که اطلاعات در مغز بصورت تغییر در کارآیی سیناپسی ذخیره می‌شود. همچنین در سال ۱۹۴۹، Hebb برای اولین بار تغییرات عصبی که در اثر پدیده‌های نمو، یادگیری و حافظه ایجاد می‌شوند را شکل پذیری سیناپسی نامید (Synaptic Plasticity)، که شامل تغییر در کارآیی، ساختار و بپوشی سیناپسها می‌باشد (۳، ۴).

شکل‌پذیری سیناپسی از نظر مورفولوژی شامل تغییرات فراساختاری در نواحی پیش و پس سیناپسی، همچنین شکل‌گیری سیناپسهای جدید (Modeling) می‌باشد. بنابراین شواهد، برخی از سیناپسها در نقاط ویژه‌ای از CNS مانند قشر مغز، آمیگدال و تشکیلات هیپوکامپی در شرایطی مانند تحریک فرکانس بالا در *in vivo* و *in vitro* پرورش موجود در محیطهای پیچیده و انواعی از شکلهای یادگیری و حافظه تغییرات عملکردی و مورفولوژیک واضحی را متحمل می‌شوند (۱، ۲، ۵، ۶).

یکی از ساختارهایی که نقش آن در برخی از انواع یادگیری در جوندگان به اثبات رسیده است، تشکیلات هیپوکامپی است. مدارهای عصبی تشکیلات هیپوکامپی اطلاعات را از نواحی مختلف قشر مغز دریافت، پردازش و ذخیره می‌کنند. مطالعات دیگری نیز نقش هیپوکامپ را در یادگیری فضایی ثابت کرده‌اند اما اطلاع دقیقی در مورد تاثیر این نوع یادگیری بر فرا ساختار سیناپسهای نواحی مختلف تشکیلات هیپوکامپی وجود ندارد (۵، ۸، ۹). بدین سبب بر آن شدیم تا تغییرات فرا ساختاری سیناپسهای ناحیه CA1 تشکیلات هیپوکامپی پستی را در اثر یادگیری فضایی بررسی نماییم.

## مواد و روشها

## \* حیوانات

۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar که همگی هم سن بوده و وزن آنها حدود ۲۵۰ - ۲۳۰ گرم بود به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند: گروه آموزش دیده (Trial) و گروه شاهد (Intact).

## \* آموزش فضایی در ماز آبی موریس

ماز آبی موریس شامل یک حوضچه دایره‌ای سیاه رنگ (با قطر ۱۳۶cm و ارتفاع ۶۰cm، که تا ارتفاع ۲۵cm از آب با دمای ۲۰+۱ درجه می‌شود) و یک سکو (با قطر ۱۰cm) که وسط یکی از ربع دایره‌های آن، ۱cm زیر سطح آب قرار می‌گیرد، است. موشهای گروه آموزش دیده طی سه روز، هر روز با دو تجربه (هر تجربه شامل چهار کارآزمایی) تحت آموزش قرار گرفتند. به این صورت که در هر کارآزمایی موش از یکی از ربعهای دایره در آب رها شده و به جستجو می‌پرداخت تا آنکه به طور تصادفی جایگاه سکو را پیدا کرده و روی آن قرار گیرد، و برای این کار ۶۰ ثانیه فرصت داشت. پس از پیدا کردن سکو به حیوان فرصت داده می‌شد که به مدت ۲۰ ثانیه بر روی آن قرار گرفته و به بررسی محیط اطراف خود پردازد و با استفاده از علائم خارج از ماز موقعیت مکانی سکو را به خاطر بسپارد. با پیشرفت آموزش حیوان موقعیت سکو را به خاطر می‌سپرد و پاسخهای بعدی بهتر و بهتر می‌شد. همه حرکات حیوان در ماز توسط دوربین و برنامه کامپیوتری ثبت می‌شد. در روز آخر آموزش، موشهای آموزش دیده و همچنین موشهای شاهد که هیچگونه آموزشی ندیده بودند نمونه برداری می‌شدند.

## \* روش نمونه برداری و آماده سازی برای

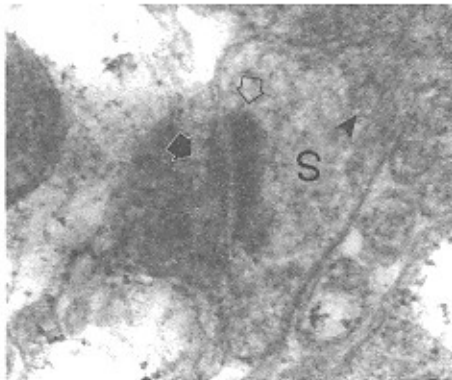
## میکروسکوپ الکترونی

موشها توسط پنتوباریتال سدیم (۸۰ mg/kg) بیهوش شده، و توسط نرمال سالین و سپس فیکساتور کارنوسکی (محلول ۲/۵ درصد گلوتارآلدئید و ۴ درصد پارافارماید در بافر فسفات ۰/۱ مولار) پرفیوژن شدند و مغز آنها از حجمه خارج گشت. مغز توسط ویراتوم بصورت مقطعی با ضخامت ۵۰ μm برش داده شد، و برشی که طبق اطلس استریوتاکی در فاصله ۳/۵- تا ۴/۵ میلی‌متر از برگما قرار داشت انتخاب شده و در زیر استریومیکروسکوپ قرار می‌گرفت. سپس توسط پانچی با قطر دهانه ۰/۵mm ناحیه CA1 آن برداشته می‌شد. این قطعات با استفاده از محلول تتروکسید اسمیوم ۱ درصد فیکس ثابته شده و پس از آبگیری توسط استن، در رزین اپوکسی قالب‌گیری شدند. سپس توسط دستگاه اولترامیکروتوم برشهایی با ضخامت ۵۰nm تهیه شد و توسط استات یورانیل و سترات سرب رنگ آمیزی، و با میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شدند (۱۲).

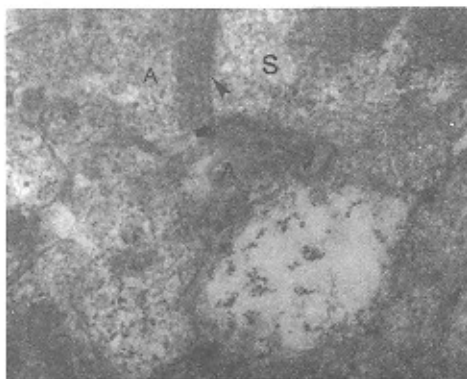
## یافته‌ها

در مراحل آموزش موشها، زمان طی شده در هر کار آزمایی (زمانی که صرف می‌شد تا حیوان سکو را پیدا کند) توسط کامپیوتر ثبت می‌گردید. در کار آزمایی اولیه چون موشها با ماز آشنایی نداشتند این زمان بیشتر بوده و گاهی ممکن بود حیوان در زمان یک دقیقه نتواند سکو را پیدا کند. به تدریج با پیشرفت آموزش پاسخها بهتر و بهتر می‌شد، که خود نشان دهنده وقوع یادگیری فضایی در آنها بود (شکل ۱).

نازکری نسبت به گروه کنترل بودند (شکل ۴).

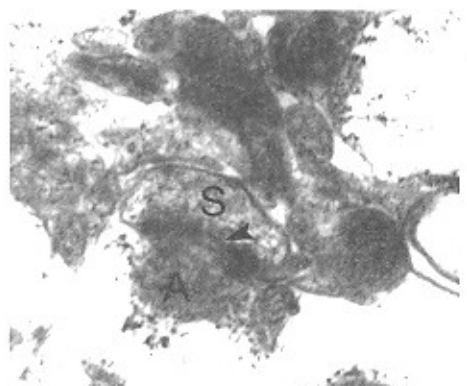


شکل ۳: الکترون میکروگراف: گروه Intact. ناحیه CA1. بزرگنمایی: ۳۷۰۰۰× مقطع یک سیناپس آکسون - خاری که بر روی خار قارچی شکل (S) تشکیل شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود SCZ مسطح و کوچک بوده، PSD (○) ضخیم و بدون منفذ می‌باشد، و تراکم بالایی از وزیکولهای سیناپسی (●) در پایانه آکسونی مشاهده می‌شود. همچنین در ناحیه اتصال سر به گردن خار - دستگاه خاری (▶) قابل مشاهده است.

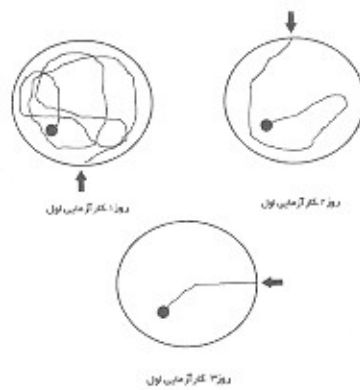


شکل ۴: الکترون میکروگراف: گروه Trial. ناحیه CA1. بزرگنمایی: ۲۸۰۰۰× مقطع عرضی دو سیناپس (●) که توسط دو پایانه آکسونی (A) بر روی یک خار دندریتی (S) ایجاد شده است همانطور که مشاهده می‌شود SCZ هر دو سیناپس کاملاً مسطح بوده و PSD یکی از سیناپسها (▶) بسیار نازک می‌باشد.

ناحیه اتصال سیناپسی (SCZ) وسیع و گاهی V شکل شده بود؛ همچنین تعدادی سیناپس با PSD منفذدار مشاهده گردید (شکل ۵).

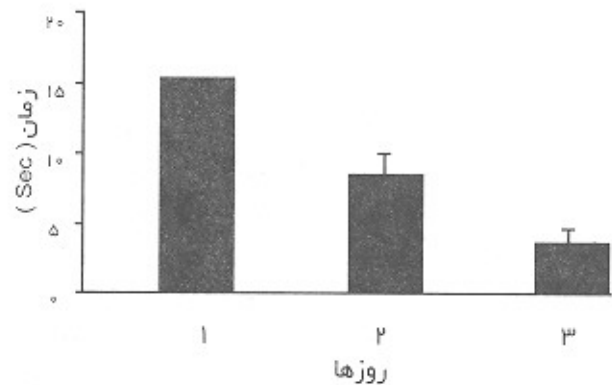


شکل ۵: الکترون میکروگراف: گروه Trial. ناحیه CA1. بزرگنمایی: ۲۸۰۰۰× تصویر. سطح مقطع یک پایانه آکسونی (A) را نشان می‌دهد که با سر خار قارچی شکل (S) سیناپس نموده است. همانطور که ملاحظه می‌شود SCZ وسیع و V شکل بوده، PSD ضخیم می‌باشد و در قسمت میانی آن یک منفذ (▶) مشاهده می‌شود.



شکل ۱: نحوه فعالیت یکی از موشهای گروه آموزش دیده در اولین کارآمایی روزهای مختلف آموزش.

بعد از ثبت زمانهای مربوط به همه موشها نمودار یادگیری برای روزهای اول تا سوم رسم شد (شکل ۲).



شکل ۲: نمودار یادگیری گروه آموزش دیده. همانطور که مشاهده می‌شود کاهش زمان جستجو برای یافتن سکو در روزهای دوم و سوم نسبت به روز اول کاملاً مشهود و معنی دار است.

در این مطالعه سیناپسهای آکسون - خاری طبقه شعاعی ناحیه CA1 تشکیلات هیپوکامپی پشتی مورد بررسی قرار گرفت. و پارامترهایی از سیناپسها مورد توجه قرار گرفت که با بررسی مقاطع متفرد بافتی قابل تفسیر و توجیه بودند.

معیار تشخیص خارهای دندریتی، وجود زمینه روشن و فقدان اندامکهای سلولی در مقایسه با سایر عناصر بافت عصبی بود. تنها اندامکهایی که در خار مشاهده می‌شوند دستگاه خاری و پلی ریبوزومهایی هستند که با تراکمهای مختلف در خار دیده می‌شوند. همچنین معیار تشخیص سیناپس، مشاهده وزیکولهای سیناپسی و ناحیه متراکم پس سیناپسی در مجاورت یکدیگر و وجود شکاف سیناپسی در بین آنها است (۲، ۱۱).

در گروه Intact ناحیه اتصال سیناپسی (Synaptic Contact Zone, SCZ) اکثر سیناپسها کوچک و مسطح بود و همچنین تعداد معدودی سیناپس مقعر مشاهده گردید (شکل ۳). در گروه آموزش دیده تعداد سیناپسهای مقعر افزایش چشمگیری را نشان می‌داد. اکثر سیناپسها دارای ناحیه متراکم پس سیناپسی (Post Synaptic Density, PSD)

## بحث

در مطالعه حاضر که بر روی ناحیه اتصال سیناپسی صورت گرفت، تقعر ناحیه پس سیناپسی در خارهای دندریتی ناحیه CA1 گروه آموزش دیده، در تعداد قابل ملاحظه‌ای از سیناپسها مشاهده شد. همچنین مشاهده گردید که اکثر سیناپسها داری SCZ وسیع می‌باشند. در مطالعه Reempts و همکارانش نیز که از مدل آموزش احترازی فعال یک طرفه استفاده کرده بودند تقعر ناحیه پس سیناپسی در سیناپسهای اکسون-خاری ناحیه یک سوم میانی لایه مولکولی تیغه فوق هرمی شکنج دندانهای پستی مشاهده شده است. بعلاوه مطالعات Desmond و همکارانش نشان داد که تقویت طولانی مدت (Long-Term Potentiation, LTP) نورونهای شکنج دندانهای موشهای صحرایی در vivo باعث افزایش سطح SCZ می‌شود (۱۲، ۱۳، ۱۴).

ایجاد تقعر در سیناپس موجب می‌شود که سطح وسیع‌تری از غشاء پس سیناپسی در مقابل سطح کوچکتری از غشاء پیش سیناپسی قرار گیرد، و بدین ترتیب گیرنده‌های بیشتری در معرض نوروترانسمیتر آزاد شده از پایانه اکسونی قرار می‌گیرند. از طرف دیگر به علت وسعت کم غشاء پیش سیناپسی میزان بازجذب نوروترانسمیتر توسط پایانه اکسونی کاهش یافته و سبب می‌شود که نوروترانسمیتر با تراکم بیشتری در شکاف سیناپسی وجود داشته باشد که این امر نیز به افزایش کارآیی سیناپسی کمک می‌کند (۱۰، ۱۵، ۱۶، ۱۷).

در مطالعه حاضر همچنین در گروه آموزش دیده چندین سیناپس ۷ شکل مشاهده گردید (شکل ۴). پارامتر دیگر که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت ضخامت ناحیه متراکم پس سیناپسی است، که در گروه آموزش دیده نسبت به گروه کنترل از نوع بیشتری برخوردار بود. به طوری که در گروه کنترل اکثر سیناپسها دارای PSD ضخیم و فاقد

منفذ بودند (شکل ۱). اما در گروه آموزش دیده سیناپسهایی با PSD ضخیم، متوسط و نازک مشاهده می‌گردید. به این صورت که سیناپسهای سطح بزرگ اکثراً دارای PSD نازک (شکل ۳)، و سیناپسهای غیر سطح (منفرع و یا محدب) دارای PSD متوسطی بودند. در این گروه همچنین سیناپسهای منفذدار دارای PSD ضخیم نیز مشاهده گردید (شکل ۴).

مطالعه Reempts و همکارانش نشان داده است که در مدل آموزش احترازی فعال یک طرفه نیز، در ناحیه متراکم پس سیناپسی ایجاد منفذ گردیده است. همچنین مطالعات Greenough و همکارانش بر روی موشهای صحرایی که در محیطهای پیچیده نگهداری شده‌اند، نشان داد که نورونهای کورتکس بینایی این حیوانات دارای تعداد سیناپس و PSDهای منفذدار بیشتری نسبت به گروههای کنترل می‌باشد (۱۴، ۱۸، ۱۹).

با بررسی نتایج حاصل از تحقیق حاضر بحث ارائه شده و مقایسه آن با سایر مطالعه‌های انجام شده، خلاصه نتایج حاصل از این مطالعه به صورت زیر ارائه می‌گردد:

۱. تغییرات مورفولوژیک که به دنبال القاء و پیشرفت LTP در شرایط in vivo مشاهده شده است، مشابه با تغییرات مورفولوژیک است که به دنبال فرآیندهای یادگیری (LTP رفتاری) رخ می‌دهند.
۲. به دنبال عمل یادگیری فضایی در ماز آبی موریس به نظر می‌رسد که نوعی LTP در سیناپسهای تحت بررسی ما رخ داده است.
۳. به نظر می‌رسد که یادگیری فضایی طی مکانیسمهایی که جزئیات آنها کاملاً شناخته شده نیست، با ایجاد تغییرات مورفولوژیک در سیناپسها، منجر به افزایش کارآیی سیناپسهای طبقه شعاعی ناحیه CA1 تشکیلات هیپوکامپی پستی می‌شود.

## References

1. Andersen P, Soleng AF: Long - term potentiation and spatial training are both associated with the generation of new excitatory synapses. *Brain Res Rev* 1998; 16: 353-359
2. Biessels GG, Kamel A, Urban IJA, Spurijt BM, Erkelens DW, Gispen WH: Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin - diabetic rats: Effect of insulin treatment. *Brain Res* 1998; 800: 125-135
3. Harris KM: Calcium from internal stores modifies spine shape. *PNAS* 1999; 96(22) : 12213-12215
4. Harris KM, Jensen FE, Tsao B: Tree - dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: Implications for the maturation of synaptic physiology and long- term potentiation. *J Neurosci* 1992; 12(7):2685-2705
5. Moser MB, Trommald M, Anderson P: An increase in

- dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12673-12675
6. Moser MB, Trommald M, Egeland T: Spatial training in complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol* 1997; 380:737-381
7. Necholas H, Greenough WT: Morphogenesis in memory formation: synaptic and cellular mechanisms. *Behav Brain Res* 1995; 66: 1-6
8. Patel SN, Stewart MG: Changes in the number and structure of dendritic spines 25 hours after passive avoidance training in the domestic chick, *Gallus domesticus*. *Brain Res* 1988; 449:34-46
9. Perkel DH, Perkel DJ: Dendritic spines: Role of active membrane in modulating synaptic efficacy. *Brain*

Res 1985; 325:331-335

10. Shepherd GM, Harris KM: Three- dimensional structure and composition of CA3-CA1 axons in rat hippocampal slices: Implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. J. Neurosci 1998; 18(20): 8300-8310

11. Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Levin GR, Bliss TVP, Stewart MG: Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. Neuroscience 1997; 80:69-77

12. Desmond NL, Levy WB: Changes in numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. J Comp Neurol 1986; 253: 466-475

13. Desmond NL, Levy WB: Synaptic correlates of associative potentiation/depression. An ultrastructural study in the hippocampus. Brain Res 1983; 265: 21-30

14. Reempts L, Stirling RV: Observations on the commissural projection to the dentate gyrus in the Reeler mutant mouse. Brain Res 1978; 150: 447-465

15. Schster T, Krug M, Wenzel J: Spinuls in axospinous synapses of the rat dentate gyurs: Changes in density following long - term potentiation . Brain Res 1990; 523:171-174

16. Trommald M, Hulleberg G, Andersen P: Long - term potentiation is associated with new excitatory spine synapses on rat dentate granule cells. Learn Mem 1996; 3: 218-228

17. Wang JH, Gladys YPK, Kelly T: Cellular and molecular bases of memory: Synaptic and neuronal plasticity . J Clin Neurophysiol 1997; 14(4): 264-293

18. Greenough WT, Volkmar FR, Jurasha: Effect of rearing complexity on dendritic spine density on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. Exp Neurol 1973; 41: 371-378

19. Greenough WT, Turner AM: Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. Brain Res 1985; 329: 195-203

