

INFLUENȚAREA FAZEI DE ACHIZIȚIE A MEMORIEI CU AJUTORUL ADENOZINEI

Andreea Păsculescu*, Isabel Cristescu*, Smaranda Stoleru*,
Daniela Stanciu*, Teodora Răducanu*

REZUMAT

Odată cu creșterea proporției de persoane vârstnice arătată de evoluția demografică se impune studiul problemelor mnemonice și cognitive ce apar preponderent în cursul îmbătrânirii cerebrale.

Pornind de la acest fapt, studiul încearcă să stabilească un test comportamental la șobolan, care să permită studiul unei molecule presupuse active pe memorie - adenzina. Faza de achiziție a memoriei a fost influențată la șobolani Wistar masculi și femele prin injectarea i.p. de adenzină 20μg/kgc, 40 μg/kgc și teofilină 20 μg/kgc, lotul martor primind ser fiziologic. Testul presupune efectuarea timp de 10 zile succesive a câte două treceri printr-un labirint în Y la un interval de 6 h, la prima trecere unul dintre brațe fiind închis. Adenzina injectată înainte de primul pasaj labirintic scade semnificativ numărul de vizite în brațul nou, în timp ce procentajul timpului petrecut în brațul nou crește semnificativ statistic ($p < 0,05$). Teofilina are efecte contrare adenzinei, influențând în sens negativ achiziția. Deși adenzina și teofilina sunt considerate clasic a acționa asupra receptorilor adenzinici, cu ajutorul acestor rezultate am demonstrat că acești receptori nu sunt implicați în procesul de memorizare, acesta având la bază alte mecanisme.

Cuvinte cheie: adenzină, receptori adenzinici, memorie

Datele din literatură au arătat că pentru studiul procesului de învățare și memorizare pot fi utilizate diferite teste.

Metodele psihobiologice folosite pentru studiul memoriei la animal au utilizat tehnici comportamentale bazate pe procesul de condiționare. Rezultatele acestor prime „instrumente” sunt dificil de evaluat în termenii memoriei, ceea ce a determinat numeroase echipe de cercetători să dezvolte teste specifice:

● Evitarea pasivă

Animalul învață să-și reprime un comportament de înaltă probabilitate care este asociat cu un stimul dezagreabil (șoc electric); memoria de lucru va fi cea utilizată de animal pentru a efectua acest test. Totuși, intervin și alți factori cum ar fi sensibilitatea la șoc, nivelul emoțional al animalului și motilitatea (Buresova și col. 1964).

ABSTRACT

Influencing the acquisition phase of the memory using adenosine

Since the senior people percentage increased as set forth by the demographic evolution, the study of mnemonic and cognitive issues which mainly occur during cerebral aging has become a necessity.

Starting from this basis the present work attempts to set up a behavioral test in rats to allow the study of a molecule supposed to be active on the memory: adenosine. The acquisition phase of the memory was influenced on male and female Wistar rats by injecting i.p. 20μg/kgc adenosine and 40 μg/kgc theophylline, while the control group received saline. The test involved the carrying out for 10 successive days of 2 passages through a Y-shaped maze every 6 hours, while upon the first passage one of the arms was closed. The number of visits in the new arm was assessed as well as the time percentage spent in the new arm, and the t test and Anova were used to compare results. Adenosine injected before the first passage significantly decreased the number of visits in the new arm, while the percentage of time spent in the new arm undergoes a statistically significant increase ($p < 0,05$). Theophylline has contrary effects as compared to adenosine negatively influencing the acquisition.

Although both adenosine and theophylline are, classically speaking, considered to act on the adenosinic receptors, by means of the above results we have demonstrated that these receptors are not involved in the memory process, the latter being based on other mechanisms.

Key words: adenosine, adenosinic receptors, memory

● Evitarea activă

Animalul învață să evite survenirea posibilă a unui stimul dezagreabil, efectuând un răspuns motric. Această metodă prezintă aceleași inconveniente ca și testul de evitare pasivă (Evangelista și col. 1970).

● Apariția întârziată

Această probă de recunoaștere diferită constă în prezentarea într-o fază preliminară a stimulului animalului într-o perioadă de timp fixă. În faza de test stimulul este prezentat în asociere cu alți stimuli. Animalul este recompensat dacă răspunde (apăsare pe pedală, de exemplu) la stimulul precedent. În acest test este folosită memoria de referință. (Dunnett 1985).

● Non-apariția întârziată

Principiul este identic cu cel al testului precedent, dar animalul este recompensat dacă răspunde la stimulul nou. (Dunnett, 1985)

*UMF "Carol Davila" București, Catedra de Farmacologie

● Recunoașterea socială

Este un model de memorie pe termen scurt și mediată olfactiv. Recunoașterea unui șobolan tânăr de către unul adult este măsurată prin durata de investigare a primului față de al doilea, în timpul a două contacte succesive. În aceste condiții, un șobolan martor adult conservă mnezic mirosul unui șobolan timp de o oră. Durata investigației între cei doi șobolani, în cursul celui de-al doilea contact, la un interval mai mare de o oră, scade în prezența substanțelor promnezice (șobolanul adult își recunoaște congenerul). Avantajul acestei metode constă în specificitatea efectelor mnezice care este controlată de absența modificărilor de comportament de investigație socială, vis-a-vis de un șobolan tânăr non-familiar. (Perio și col. 1989)

● Labirintul lui Morris

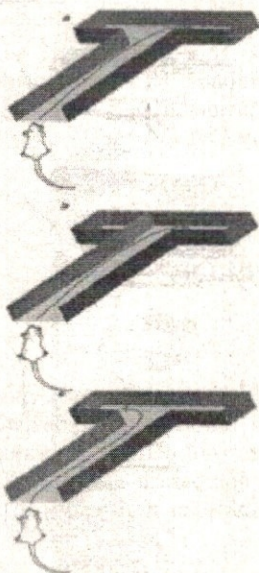
O piscină este acoperită de o platformă situată imediat deasupra suprafeței apei. Poziția platformei este păstrată în timpul experimentelor (de referință). Timpul necesar animalului ca să ajungă la această platformă și distanța parcursă sunt măsurate în mai multe zile consecutive și scad progresiv în timpul procesului de învățare, din primele zile. Se consideră că acest test realizat în condiții experimentale, explorează memoria de referință la animal (Morris, 1981).

● Labirintul radial

Aparatul este constituit din mai multe ramuri (între patru și opt) dispuse în stea, la capătul cărora se află o recompensă. La acest nivel, memoria de lucru este folosită și poate fi cuplată cu memoria de referință, adăugând unul sau mai multe brațe labirintului pentru un animal dat. Dezavantajul acestui test este timpul mare necesar pentru a efectua obișnuirea și învățarea înaintea efectuării testului propriu-zis.

● Labirintul în Y

Este un test de alternanță spontană care constă în a pune un șobolan într-unul din brațele labirintului în Y și de a-l lăsa liber pentru a explora ansamblul labirintului. Se măsoară procentajul de „alegere corectă” a animalului; „alegerea corectă” se definește ca fiind vizita brațului care recent nu a fost explorat. Acest test explorează preferențial memoria de lucru la animal. (Tolman 1925)



● Labirintul în T

Acest model este bazat, ca și modelul precedent, pe memoria spațială a animalului, asociată cu o motivare pozitivă. Șobolanul trebuie să-și amintească brațul pe care tocmai l-a explorat pentru a alege alt braț și a obține recompensa, realizând alternanța spontană.

În lucrarea noastră am folosit testul Deliu. Acesta constă dintr-un labirint în „Y” având brațele egale și situate la 120° între ele. Am studiat toate cele trei etape ale memorizării: procesul de achiziție, consolidare și de rapel.

ANIMALE UTILIZATE

Toate experiențele au fost realizate pe șobolani rasa Wistar atât masculi cât și femele, având o greutate corporală cuprinsă între 200 și 250 g. care pe toată durata experimentelor au avut acces liber la hrană și apă. Am ales această sușă ca urmare a unei bune reproductibilități a rezultatelor (Pulsinelli, Brierley, 1979).

COMPUȘI UTILIZAȚI

Am utilizat:

- adenozină în soluție injectabilă administrată intraperitoneal
- teofilină în soluție injectabilă administrată intraperitoneal
- ser fiziologic administrat intraperitoneal

SCHEMA DE ADMINISTRARE

Am căutat să administrăm substanțele într-o modalitate cât mai apropiată de influențarea celor trei faze ale procesului de memorizare. Astfel în cazul fazei de achiziție administrarea s-a făcut înainte de prima trecere prin labirint, în cazul studiului fazei de consolidare administrarea s-a făcut după prima trecere prin labirint, iar în cazul fazei de rapel, administrarea s-a făcut după cea de-a doua trecere prin labirint.

Tratamentul a fost realizat pe cale intraperitoneală în doze de 20 microg/kgc adenozină, 40 microg/kgc adenozină, 20 microg/kgc teofilină iar martorii au fost injectați intraperitoneal cu ser fiziologic.

PROTOCOL EXPERIMENTAL

Testul presupune efectuarea a două treceri printr-un labirint în Y, la un interval de șase ore. Prima trecere a animalelor a necesitat închiderea unuia din cele trei brațe ale labirintului astfel încât animalul să poată explora în decurs de cinci minute doar două brațe. Cea de-a doua trecere s-a realizat cu toate cele trei brațe deschise, astfel încât în condiția în care animalul își amintește brațele explorate anterior, în primul pasaj, să poată acum explora brațul nou care la prima trecere i-a fost complet necunoscut, fiind închis. Am repetat testul zece zile succesiv.

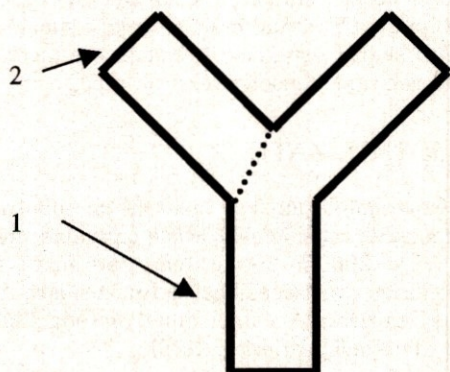
În funcție de fazele memorizării urmărite în studiu, injectările agonistilor și antagoniștilor adenozinici au fost făcute înainte de primul pasaj, urmărindu-se studierea procesului de achiziție.

Testul a fost realizat cu ajutorul unui labirint în „Y” confecționat din plexiglas, de culoare neagră, cu

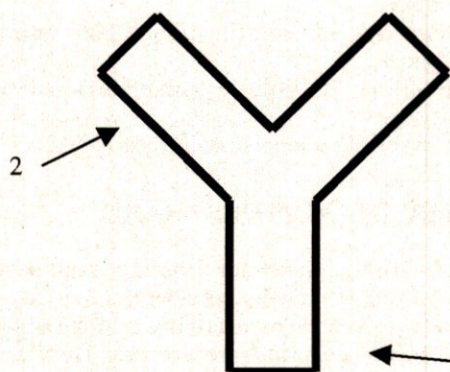
dimensiunile de 50cm.= lungimea fiecărui braț, 10cm.= lățimea fiecărui braț, iar înălțimea pereților laterali fiind de 10 cm cu unghiul dintre brațe de 120°.

Labirintul a fost așezat într-o cameră ferită de zgomote. Iluminarea a fost uniformă asupra tuturor celor trei brațe ale labirintului, făcându-se cu ajutorul unei lămpi verticale

situată la înălțimea de 1.5m deasupra labirintului, având grijă ca fiecare braț să fie iluminat cu o intensitate de 50 lx. Închiderea brațelor s-a făcut diferențiat de la un animal la altul, prin alternanță. Astfel, dacă pentru șobolanul 1, brațul nr.2 era închis, pentru șobolanul 2 brațul închis era nr. 3.



Imaginea 1: labirint cu un braț blocat



Imaginea 2: labirint cu toate brațele libere

Pe podeaua labirintului s-a introdus un strat de rumeguș, și după trecerea fiecărui animal prin labirint a fost făcută curățirea labirintului de eventualele excremente. Animalele au fost alimentate cu apă și hrană după cea de-a doua trecere.

MOD DE LUCRU

Se introduce animalul cu botul către porțiunea anterioară a brațului 1 și spatele către partea centrală a labirintului, labirintul având unul din cele două brațe blocat. Se menține animalul timp de cinci minute în labirint pentru a se putea familiariza cu cele două brațe deschise. Se notează brațul care a fost închis pentru fiecare animal. Cea de-a doua trecere prin labirint s-a realizat după un interval de șase ore, de această dată toate cele trei brațe ale labirintului fiind deschise. Am determinat timpul petrecut de fiecare animal în brațul nou ca și numărul de vizite efectuate de acesta în brațul nou.

Cercetările au fost efectuate pe patru loturi de câte zece șobolani pe parcursul a zece zile succesive.

- Lotul I (n=10) a primit adenzină 20 microg/kgc inj. intraperitoneal, înainte de prima trecere prin labirint

- Lotul II (n=10) a primit adenzină 40 ·g/kgc inj. intraperitoneal, înainte de prima trecere prin labirint

- Lotul III (n=10) a primit teofilină 20 ·g/kgc inj. intraperitoneal, înainte de prima trecere prin labirint

- Lotul IV (n=10) a primit ser fiziologic inj. intraperitoneal și a fost considerat ca martor

Atât în cazul primei treceri, cât și în cazul celei de-a doua, cronometrările au fost făcute pe o perioadă de cinci minute.

COMPARAREA STATISTICĂ A REZULTATELOR

REZULTATE

Rezultatele au fost exprimate prin media numărului de vizite petrecute în brațul nou, +/- deviația standard, ca și prin procentajul timpului petrecut în brațul nou, +/- deviația standard. Pentru comparare am utilizat testul Student și testul Anova cu unul sau doi factori de variație.

DISCUȚII

Studiile noastre farmacologice arată că injectarea i.p. a 20 microg/kgc de adenzină, înaintea primului pasaj labirintic scade semnificativ numărul de vizite efectuate în brațul nou. Numărul de vizite efectuate de lotul I inj. cu adenzină 20 microg/kgc, înainte de efectuarea primului pasaj, a fost pe parcursul celor zece zile, inferior celui înregistrat la lotul martor, rezultatele fiind semnificative statistic începând cu ziua a patra a experimentului și menținându-se pe parcursul celor zece zile.

ZIUA		Injectare			
		ADENOZINA 20	ADENOZINA 40	THEOFILINA	MARTOR
I	M	72.69%	38.53%	42.74%	30.84%
	DS	14.72%	10.31%	20.84%	11.92%
	P	0.002	0.156	0.143	
II	M	80.56%	24.75%	42.84%	31.86%
	DS	11.87%	13.80%	21.92%	18.80%
	P	0.0004	0.222	0.221	
III	M	61.73%	53.61%	45.00%	46.08%
	DS	23.88%	19.07%	18.64%	22.15%
	P	0.156	0.283	0.47	
IV	M	72.60%	67.57%	23.18%	37.32%
	DS	13.63%	13.93%	8.08%	7.40%
	P	3.427	0.002	0.005	
V	M	64.11%	45.23%	42.76%	36.55%
	DS	12.45%	30.93%	20.39%	15.53%
	P	0.007	0.259	0.323	
VI	M	69.58%	66.16%	28.07%	40.94%
	DS	14.82%	18.93%	15.34%	11.96%
	P	0.0054	0.049	0.098	
VII	M	50.29%	70.41%	40.73%	37.70%
	DS	25.55%	22.84%	15.83%	15.00%
	P	0.178	0.006	0.378	
VIII	M	58.55%	71.72%	43.17%	39.75%
	DS	11.85%	14.85%	17.10%	12.24%
	P	0.028	0.004	0.367	
IX	M	54.62%	55.17%	36.91%	36.90%
	DS	19.51%	18.29%	20.37%	15.49%
	P	0.01	0.005	0.357	
X	M	69.80%	68.55%	49.90%	31.71%
	DS	10.30%	14.05%	13.19%	9.74%
	P	0.0007	0.0007	0.002	

Evaluarea în dinamică a numărului de vizite efectuate de lotul I, demonstrează că adenzina injectată înainte de prima trecere prin labirint, limitează numărul de vizite și îl menține constant pe toată durata celor zece zile, comparativ cu loturile II și III, ca și comparativ cu lotul martor.

Lotul II injectat cu adenzina 40 microg/kgc înainte de efectuarea primului pasaj labirintic a înregistrat un număr de vizite redus, comparativ cu lotul martor, pe toată durata celor zece zile; diferența fiind semnificativă statistic ($p < 0.05$) în zilele 2,3, 5, 7, 8, 10.

Injectarea înainte de prima trecere prin labirint a influențat diferențiat numărul de vizite, astfel încât în prima zi el este net superior celui ce a primit adenzina 20 microg/kgc, putând concluziona că efectul ar putea fi dependent de doză. Din cea de-a doua zi, lotul II a înregistrat rezultate

asemănătoare lotului I, pe parcursul tuturor celor nouă zile rămase numărul de vizite fiind net inferior și semnificativ statistic față de lotul martor, în cazul lotului III injectat cu teofilină 20 microg/kgc înainte de efectuarea primului pasaj, am observat o creștere progresivă a numărului de vizite comparativ cu lotul I, diferențele menținându-se semnificativ statistic pe durata primelor opt zile. Putem concluziona că *teofilina are efect contrar adenzinei în ceea ce privește numărul de vizite*, astfel încât dacă prin injectarea a doze mici de adenzină am observat o hipomotilitate a animalului în labirint, și o scădere a capacității de explorare, prin injectarea de teofilină a crescut motilitatea în labirint, dar putem spune că în aceeași măsură ar putea scădea capacitatea animalului de concentrare, ceea ce ar duce la o influențare negativă a procesului memorizării.

În ceea ce privește procentajul timpului petrecut în brațul nou, în cazul lotului injectat cu adenzină 20 microg/kgc înainte de prima trecere prin labirint, se observă o creștere comparativ cu lotul martor pe toată durata celor zece zile ale experimentului, semnificativă statistic ($p < 0.05$) în zilele 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10. (Tabel 4).

Corelarea rezultatelor privind și numărul de vizite, ca și procentajul timpului petrecut în brațul nou, ar putea sta la baza a două ipoteze: prima, enunțată de COHEN H.D., BARONDES S.H, afirmă că adenzina în doză mică ar putea determina un efect sedativ, o hipomotilitate, o scădere a capacității de explorare și a vigilenței animalului, demonstrată de altfel și de noi prin scăderea numărului de vizite efectuate de către lotul I și creșterea timpului petrecut în brațul nou. Cea de-a doua ipoteză ar putea fi legată de faptul că prin creșterea timpului petrecut în brațul nou, animalul își amintește brațele explorate anterior și caută să se familiarizeze mai mult cu un mediu mai nou cu care vine în contact. Luând în considerare doar această creștere a procentului de timp petrecut în brațul nou, am putea afirma că în decursul celor zece zile, lotul I a înregistrat o îmbunătățire a procesului de achiziție, prin comparație cu lotul martor, rezultate înalt semnificative statistic. Pentru a scoate din discuție eventualitatea apariției efectului sedativ la doze scăzute de adenzină, lucrarea ar trebui completată cu o baterie de teste comportamentale care să evalueze și alte funcții nervoase centrale.

În cazul lotului II injectat cu doze mai mari de adenzină față de lotul injectat cu doze mai mici de adenzină, s-a observat prin corelare cu înregistrarea numărului de vizite, că în primele trei zile ale experimentului, *animalele explorează mai mult și pentru un timp mai mic brațul nou*, față de lotul injectat cu doze mici de adenzină ce *explorează mult mai puțin și pentru un timp mai îndelungat brațul nou*. Începând cu ziua a doua, lotul II injectat cu doze mai mari de adenzină va efectua un număr mai mic de vizite, în schimb va petrece mai mult timp în brațul nou, atât comparat cu lotul I cât și cu lotul martor.

Teofilina - în cazul lotului III, am observat o scădere a timpului petrecut în brațul nou, comparativ cu loturile injectate cu adenzină, aceasta fiind legată și de scăderea numărului de vizite efectuate în brațul nou. În primele cinci zile rezultatele au fost asemănătoare cu cele ale lotului martor, ca apoi, din ziua 5 să scadă numărul de vizite ca și procentajul timpului petrecut în brațul nou. Putem spune astfel că *teofilina a crescut capacitatea de explorare a animalului, a crescut vigilența, dar în același timp a crescut și capacitatea de a genera erori, astfel încât în timp îndelungat influențează nefavorabil procesul de achiziție a memoriei*.

CONCLUZII

1. Dozele mici de adenzină injectate înainte de achiziție au arătat pe parcursul celor zece zile o scădere a motilității animalului și implicit o creștere a capacității de explorare.

2. Teofilina în doze mici a influențat în sens negativ achiziția, scăzând procentajul timpului petrecut în brațul nou față de loturile injectate cu adenzină. În același timp putem spune că a determinat o hipermotilitate a animalului, comparativ cu loturile injectate cu adenzină, crescând astfel probabilitatea de eroare.

3. Rezultatele obținute am putea afirma că sunt în concordanță cu datele din literatură, astfel încât injectarea de doze mici de adenzină crește cantitatea de AMP_c sinaptic implicat în memoria tardivă.

4. Pornind de la rezultatele obținute și oarecum contrarii în cadrul loturilor injectate cu adenzină și cu teofilină, ce sunt cunoscuți a fi agoniști, respectiv antagoniști pe receptorii adenzinergici, aducem un argument în plus că la baza procesului de memorizare nu pot fi implicați receptorii adenzinergici, rămânând a fi luate în discuție și alte teorii printre care implicarea LTP-ului (long time potentialisation) în procesul de memorizare, implicarea receptorilor NMDA, ca și corelarea sistemului adenzinergic cu ceilalți neuromediatori excitatori. Teoria conform căreia teofilina nu determină efecte contrare adenzinei asupra memoriei datorită faptului că nu există un tonus adenzinergic cerebral în momentul injectării, ar putea implica receptorii adenzinergici în procesul memorizării, dar pentru a afirma acest lucru lucrarea de față ar trebui completată cu un studiu care să cerceteze efectele injectării concomitente de adenzină și teofilină.

5. Întrucât adenzina ar putea determina formarea de ATP exogen din AMP_c, putem incrimina încă o dată rolul ATP în procesul de LTP, acesta fiind o modificare a transmisiilor sinaptice indusă de un pattern specific de stimulare caracterizat prin frecvența înaltă sau administrarea locală de ATP extern.

6. ATP extracelular participă în procesele de fosforilare a ectoproteinelor și în amplificarea răspunsului sinaptic astfel: în timpul inducției LTP în hipocamp, ATP e secretat în fanta sinaptică, producându-se o fosforilare oxidativă a ecto-proteinkinazei la suprafața neuronilor piramidali

hipocampici (activitatea de fosforilare este detectată la suprafața neuronilor după sinaptogeneză, fără a fi detectată la nivelul neuronilor imaturi sau la nivelul celulelor gliale).

7. Cu ajutorul unor anticorpi monoclonali inhibitori (în domeniul catalitic al protein-kinazei C – care, de altfel, blochează stabilizarea LTP) s-a dovedit evidența cauzală a rolului ecto-proteinkinazei C în procesele de memorizare cerebrală (Chen W; Wieraszko A; Hogan MV; Yang MA; Ehrlich YH, 1966)

8. Contrar LTP, LTD (Long Time Depression) reprezintă o inhibiție de lungă durată a transmisiilor sinaptice și poate fi considerat un candidat al fenomenului de uitare, fiind important în procesele de învățare și memorie. Lipsa implicării receptorilor glutaminergici în inducerea LTD ar putea fi un nou tip de inhibiție sinaptică de lungă durată.

În încheiere, cu toate că adenzina și teofilina sunt considerate clasic a acționa asupra receptorilor adenzinergici, cu ajutorul rezultatelor obținute în această lucrare am demonstrat că receptorii adenzinergici nu sunt implicați în procesele de memorizare, aceasta având la bază procese mult mai complexe.

BIBLIOGRAFIE

1. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Japan; Authors: Ohno M, Watanabe S; Title: Working Memory Failure by Stimulation of Hippocampal Adenosine A1 Receptors in Rats;

2. Instituto de Biología celular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; authors: Bernabeu R., Schmitz R, Faillace MP, Izquierdo 1996 Ian; title: Hippocampal GMP and AMP are Differentially Involved in Memory Processing of Inhibitory Avoidance Learning;

3. Le bases neurales de la memoire de travail, Pour la science, Petit L, Zago L, 2001, 31, p 116-120

4. Memory and the Brain – Unexpected Chemistries and a New Pharmacology by Lynch G University of California, Irvine, California Neurobiol Learn Mem 1998 Jul;

5. Neuropsychologie de la memoire humaine par Bruyer R et M van der Linden 1994;

6. Spatial Learning and Memory Process: the Search for Their Neurobiological Mechanisms in Rat, C Barnes; Trends Neurosci. 1988, 11, p 593-598;