University of Mosul

College of Veterinary Medicine

Assessment of Neuro-Behavioral Effects of Scopolamine in Male Mice

Maysam Mohsen Abbas Qanbar Al Mustafa

MSc/Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Pharmacology and Toxicology

Supervised by
Assist. Professor
Dr. Yamama Zuher Saleh Al-Abdaly

1446 A.H **2024 A.D.**

Abstract

To study the acute and sub-acute neuro-behavioral toxic effects of scopolamine by evaluating higher brain functions using the open field test and social interaction test in mice, evaluating the autonomic nervous system functions using swimming tests and light-dark tests, besides evaluating the cognitive functions using the negative geotaxis test and hole-board test. Additionally, to investigate some of the underlying mechanisms of the recorded neuro-behavioral effects on mice by measuring certain neurotransmitters which are serotonin (SER), acetylcholine (Ach), and the enzyme of Catechol-O-methyltransferase (COMT).

This study utilized approximately 85-90 male Swiss white mice. The mice weighed between 25-35 grams and were aged around 2 months. The median lethal dose (LD_{50}) of scopolamine was determined intramuscularly.

The effect of time and dose on neuro-behavioral functions were studied through a series of experiments. The experiments included administering low repeated doses daily for two weeks and four weeks in the second and third experiments, respectively, measuring the effect of an acute dose 24 hours post-administration in the fourth experiment, and testing the cumulative effect of a single dose after five days in the fifth experiment. To confirm these results, single doses were administered twice weekly in the sixth experiment. Each experiment used 15 mice, divided into three random groups of five mice. A control group was injected with distilled water and two groups injected intramuscularly with scopolamine. The measured tests included locomotors activity and neuro-behavioral function (open field test, social interaction test, swimming test, negative geotaxis test, hole-board test, and light-dark test). At the end of each experiment, the animals were anesthetized, and blood was collected to

separate plasma for biochemical tests to measure neurotransmitters such as SER, Ach, and COMT enzyme.

The LD_{50} of scopolamine was 148 mg/kg. Neuro-behavioral tests showed increased rearing activity in the 2 mg/kg group and significantly increased in the 4 mg/kg group. Social interaction decreased in both doses. Autonomic nervous system tests showed decreased swimming scores, negative geotaxis time, and head dips. Time spent in the dark decreased in the 4 mg/kg group.

After 4 weeks of daily scopolamine doses, Scopolamine doses significantly increased rearing activity, decreased square crossings, social interaction, swimming scores, negative geotaxis time, head dips, and time spent in the dark after 4 weeks compared to control.

The results of the third experiment showed that administering a single high acute dose of scopolamine (20 mg/kg) The 20 mg/kg group showed increased rearing events, decreased squares crossed, and social interaction, decreased swimming scores, increased negative geotaxis time, and decreased head dips in hole-board tests, while time spent in the dark was significantly reduced.

When single doses of 2 and 4 mg/kg were administered, and the animals were left for 5 days before behavioral measurements, no significant effects of the doses were observed within this period. In the experiment where two low doses of scopolamine were administered weekly, there was no difference in the number of rearing events between the control group and the 2 mg/kg group. The 4 mg/kg group showed a significant increase in rearing activity, decreased square crossings, social interaction scores, swimming scores, and negative geotaxis time, but no significant difference in head dips or time spent in the dark.

Biochemical tests revealed that a single acute high dose of scopolamine led to elevated serotonin levels, reduced acetylcholine levels,

and decreased COMT activity after 24 hours. However, administering a single dose and measuring after 5 days showed no neurotransmitter alterations. Meanwhile, administering two doses per week induced significant changes in serotonin and acetylcholine levels, as well as COMT activity compared to control.

Both sub-acute doses of scopolamine (2 and 4 mg/kg) and the acute 20 mg/kg dose significantly impacted mouse neurobehavior, cognition, and autonomic nervous system responses compared to control. Higher doses generally exhibited more pronounced effects, though differences between doses were often insignificant. The data suggests scopolamine induces neuro-behavioral changes, cognitive impairment, and anxiety-related behaviors in mice. Administering scopolamine every other day for a week notably affected mouse neuro-behavior, with the higher dose (4 mg/kg) showing more pronounced effects on various parameters compared to the lower dose (2 mg/kg) and control. Biochemical tests revealed increased serotonin levels and decreased acetylcholine levels and COMT activity with both daily and acute scopolamine doses.

جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

تقييم التأثيرات السلوكية-العصبية للسكوبولامين في ذكور الفئران

ميسم محسن عباس قنبر المصطفى

رسالة ماجستير
الطب البيطري / الادوية والسموم البيطرية

بإشراف
الأستاذ المساعد الدكتورة
يمامة زهير صالح العبدلي

ربيع الثاني / 1446 هـ
تشرين الأول/ 2024 م

الخلاصة

دراسة التأثيرات السمية السلوكية العصبية الحادة وتحت الحادة للسكوبلامين من خلال تقييم وظائف الدماغ العليا باستخدام اختباري الميدان المفتوح والتفاعل الاجتماعي للفئران و تقييم وظائف الجهاز العصبي اللاإرادي بإجراء اختبارات السباحة واختبار الضوء والظلام وتقييم الوظائف الادراكية باستخدام اختبارات الانتحاء الأرضي السالب و اختبار ادخال الراس في الثقوب وأخيرا الوقوف على بعض الاليات الكامنة للتأثيرات السلوكية العصبية المسجلة في الفئران من خلال قياس بعض النواقل العصبية مثل السيروتونين والاستيل كولين وانزيم COMT.

استخدم لهذه الدراسة ذكور الفئران السويسرية البيضاء بعدد تقريبي يعادل 85-90 فأرا ربيت في بيت الحيوان التابع لكلية الطب البيطري جامعة الموصل، كانت اوزان الفئران 25-35 غرام وبأعمار تراوحت 2 شهر. اوجدت الجرعة المميتة الوسطية للسكوبولامين عند الحقن العضلي وكانت 148 ملغم\كغم.

تمت دراسة تأثير الزمن والجرعة على الوظائف العصبية السلوكية من خلال سلسلة تجارب. شملت التجارب إعطاء جرع منخفضة بشكل يومي لمدة أسبوعين وأربعة أسابيع في التجربتين الثانية والثالثة على التوالي، وقياس تأثير جرعتين حادتين بعد 24 ساعة في التجربة الرابعة، واختبار التأثير التراكمي لجرعة مفردة بعد 5 أيام في التجربة الخامسة. وللتأكيد، أعطيت جرع مفردة مرتين أسبوعياً في التجربة السادسة. استخدم في كل تجربة 15 فأراً مقسمة إلى 3مجاميع عشوائية (5 فئران لكل مجموعة): مجموعة سيطرة حقنت بالماء المقطر، ومجموعتين حقنتا بالسكوبولامين عضلياً. شملت الاختبارات المقاسة النشاط الحركي والسلوك العصبي (اختبار الميدان المفتوح، اختبار التفاعل الاجتماعي، اختبار السباحة، اختبار الانتحاء الأرضي السالب، اختبار الصفيحة المثقبة، واختبار الضوء والظلام). بعد نهاية كل تجربة، تم تخدير الحيوانات وسحب الدم لفصل البلازما واستخدامها في اختبارات كيموحيوية لقياس النواقل العصبية مثل السيروتونين، الأسيتيل كولين، وإنزيم COMT.

كانت قيمة LD_{50} 148 ملغم /كغم عند الحقن بالعضلة. أظهرت الاختبارات العصبية السلوكية للفئران بعد الجرع اليومية من السكوبولامين بجرعة 2 و4 ملغم/كغم لمدة أسبوعين زيادة في عدد مرات الوقوف في مجموعة 2 ملغم/كغم مقارنة بمجموعة السيطرة، ولكنها لم تكن ذات دلالة إحصائية، وكانت الزيادة في مجموعة 4 ملغم/كغم كبيرة .($p \leq 0.05$) انخفض عدد المربعات المقطوعة بشكل ملحوظ في مجموعتي السكوبولامين مقارنة بمجموعة السيطرة، كما انخفض

التفاعل الاجتماعي بشكل ملحوظ في كلا الجرعتين مقارنة بمجموعة السيطرة. في اختبارات الجهاز العصبي اللاإرادي، انخفضت درجات السباحة بشكل ملحوظ في كلا الجرعتين ($p \leq 0.05$)، وزاد وقت الانتحاء الأرضي السالب بشكل ملحوظ، وانخفضت عدد مرات إدخال الرأس في الثقوب في اختبار اللوحة المثقبة بشكل ملحوظ في كلا الجرعتين مقارنة بمجموعة السيطرة. الوقت الذي قضته الفئران في الظلام انخفض بشكل ملحوظ في مجموعة 4 ملغم/كغم ($p \leq 0.05$) ولم يكن هناك فرق بين جرعة 2 ملغم/كغم ومجموعة السيطرة.

بعد 4 أسابيع من الجرع اليومية للسكوبولامين، زاد نشاط الوقوف بشكل ملحوظ في كلا الجرعتين مقارنة بمجموعة السيطرة، وكان الزيادة أكثر وضوحًا في الجرعة الأعلى. انخفض عدد المربعات المقطوعة بشكل ملحوظ في كلا الجرعتين، وكان الانخفاض أكثر وضوحًا في الجرعة الأعلى. انخفض التفاعل الاجتماعي ودرجات السباحة بشكل ملحوظ، وزاد وقت الانتحاء الأرضي السالب، وانخفضت عدد مرات إدخال الرأس في اللوحة المثقبة بشكل ملحوظ في كلا الجرعتين مقارنة بمجموعة السيطرة. الوقت الذي قضته الفئران في الظلام انخفض بشكل ملحوظ في كلا الجرعتين مقارنة بمجموعة السيطرة.

أظهرت نتائج التجربة الثالثة أن إعطاء جرعة عالية مفردة حادة من السكوبولامين (20 ملغم/كغم) زاد عدد مرات الوقوف بشكل معنوي مقارنة بمجموعة السيطرة، مع انخفاض معنوي في عدد المربعات المقطوعة والتفاعل الاجتماعي. كما سجلت المجموعة انخفاضاً معنوياً في مرتبة السباحة وزمن الانتحاء الأرضي السالب، وانخفاضاً في عدد مرات إدخال الرأس في الثقوب مقارنة بمجموعة السيطرة. لم يكن هناك فرق معنوي بين الجرعتين في هذا الاختبار. كان البقاء في الظلام منخفضاً بشكل معنوي في مجموعة 20 ملغم/كغم مقارنة بمجموعة السيطرة.

اما في تجربة إعطاء الجرع المفردة 2 و4 ملغم/كغم ثم ترك الحيوانات لمدة 5 أيام وبعدها اخذ القياسات السلوكية فلم يظهر أي تأثير معنوي للجرع المستخدمة بهذه المدة.

في تجربة إعطاء جرعتين منخفضتين من السكوبولامين أسبوعياً، لم يكن هناك فرق في عدد مرات الوقوف بين مجموعة السيطرة ومجموعة 2 ملغم/كغم. سجلت مجموعة 4 ملغم/كغم زيادة معنوية في نشاط الوقوف مقارنة بمجموعتي السيطرة و2 ملغم/كغم. كما سجلت مجموعة 4 ملغم/كغم انخفاضاً معنوياً في عدد المربعات المقطوعة ودرجة التفاعل الاجتماعي ودرجة السباحة وزمن الانتحاء الأرضي السالب مقارنة بالمجموعتين الأخرى. لم يكن هناك فرق معنوي في عدد مرات إدخال الرأس بين مجاميع السيطرة و2 ملغم/كغم و4 ملغم/كغم. سجل وقت البقاء في الظلام انخفاضاً معنوياً في مجموعة 4 ملغم/كغم مقارنة بمجموعة السيطرة.

أظهرت الاختبارات الكيميائية أن الجرعة العالية الحادة للسكوبولامين الفردية أدت إلى ارتفاع في مستويات السيروتونين، وانخفاض في مستويات الأسيتيل كولين، وانخفاض في نشاط COMT بعد مرور 24 ساعة. ومع ذلك، لم تظهر أي تغييرات في النواقل العصبية عند إعطاء جرعة واحدة وقياسها بعد 5 أيام. في الوقت نفسه، أدت إعطاء جرعتين في الأسبوع إلى تغييرات كبيرة في مستويات السيروتونين والأسيتيل كولين، وكذلك في نشاط COMT مقارنة بمجموعة السيطرة.

اثرت كل من جرعتي السكوبولامين (2 و4 ملغم/كغم) في التجارب تحت الحادة والحادة بجرعة 20 ملغم/كغم بشكل كبير على سلوك الفئران، ووظائف الإدراك، واستجابات الجهاز العصبي اللاإرادي مقارنة بمجموعة السيطرة. الجرع الأعلى عمومًا أظهرت تأثيرات أكثر وضوحًا، على الرغم من أن الفروق بين الجرع في نفس التجربة كانت في كثير من الأحيان غير معنوية. تشير البيانات إلى أن السكوبولامين يسبب تغييرات في السلوك وتدهورًا في الإدراك وسلوكيات مرتبطة بالقلق لدى الفئران. كما أظهر إعطاء السكوبولامين بجرعة كل يومين لمدة أسبوع تأثيرًا ملحوظًا على سلوك الفئران، حيث أن الجرعة الأعلى (4 ملغم\كغم) أظهرت تأثيرات أكثر وضوحًا على مختلف المعايير مقارنة بالجرعة الأقل (2 ملغم\كغم) ومجموعة السيطرة. أخيرًا، أظهرت الاختبارات الكيميائية زيادة ملحوظة في مستويات السيروتونين وانخفاض ملحوظ في مستويات الأسيتيل كولين ونشاط COMT مع كل من الجرع اليومية للسكوبولامين لمدة أسبوعين وأربعة أسابيع، والجرعة الحادة بمقدار 20 ملغم.