مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره هفتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۷، ۱۹۰-۱۸۱

ارزیابی تداخل اثر تزریق نالتروکسان در ناحیه خلفی هیپوکمپ بر اثرات کورتیکوسترون بر روند تثبیت و به خاطرآوری حافظه در مدل یادگیری احترازی غیرفعال در موش صحرایی

عباسعلی وفایی[۱]، علی رشیدی‌پور[۲]

دریافت مقاله: ۸۶/۱۰/۲۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۷/٤/۱۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۷/٦/۲۵ پذیرش مقاله: ۸۷/۷/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات قبلی پیشنهاد نموده‌اند که کورتیکوسترون احتمالاً نقش خود را بر حافظه از طریق اثر متقابل با گیرنده‌های اوپیوییدی ناحیه خلفی هیپوکمپ اعمال می‌کند. براین اساس، هدف این مطالعه تعیین اثر متقابل تزریق نالتروکسان در ناحیه خلفی هیپوکمپ بر اثرات کورتیکوسترون بر تثبیت و به خاطرآوری حافظه در مدل یادگیری احترازی غیرفعال در موش صحرایی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۱۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. ابتدا به صورت دوطرفه روی ناحیه خلفی هیپوکمپ کانول راهنما قرارداده شد. یک هفته بعد موش‌ها در مدل احترازی غیرفعال تحت آموزش قرار گرفتند و ۴۸ ساعت بعد تست به خاطرآوری برای آن‌ها انجام شد. کورتیکوسترون ۱ میلی‌گرم و یا حلال آن بلافاصله بعد از آموزش و یا ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری به طور داخل صفاقی و هم‌چنین نالتروکسان (۱۰ و ۲۰ میکروگرم در یک میکرولیتر به ازاء هر طرف) یا سالین بلافاصله بعد از آموزش و یا ۶۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری به داخل هیپوکمپ تزریق گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق محیطی کورتیکوسترون موجب تقویت تثبیت و اختلال در به خاطرآوری حافظه می‌شود ($p<۰/۰۱$) و تزریق هم‌زمان نالتروکسان در هر دو دوز به داخل هیپوکمپ موجب مهار اثرات کورتیکوسترون بر تثبیت و به خاطرآوری حافظه می‌گردد ($p<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان می‌دهد که گیرنده‌های اوپیوییدی ناحیه خلفی هیپوکمپ نقش مهمی در اثرات سیستمیک گلوکوکورتیکوییدها بر روند تثبیت و به خاطرآوری حافظه در مدل احترازی غیر فعال دارند.

واژه‌های کلیدی: هیپوکمپ، تثبیت و به خاطرآوری حافظه، نالتروکسان، کورتیکوسترون، موش صحرایی

مقدمه

در طی مطالعات چند دهه گذشته به خوبی اثبات شده است که هورمون‌های گلوکوکورتیکوییدی (کورتیکوسترون در موش‌ها و کورتیزول در انسان) به دنبال استرس یا تجربیات مهیج از قشر غدد فوق کلیه آزاد می‌شوند و از طریق اتصال به گیرنده‌هایشان بر بسیاری از اعمال شناختی تأثیر می‌گذارند

۱- (نویسنده مسؤول) دانشیار گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

تلفن: ۰۲۳۱-۳۳۳۲۰۸۰، فاکس: ۰۲۳۱-۳۳۳۱۵۵۱، پست الکترونیکی: aavaf43@yahoo.com

۳- استاد گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

[۱]. گلوکوکورتیکوییدها بسیار لیپوفیلیک هستند و بلافاصله وارد مغز شده و مستقیماً به دو نوع از گیرنده‌های داخل سلولی خود که عبارتند از: گیرنده‌های مینرالوکورتیکوییدی و گلوکوکورتیکوییدی متصل می‌شوند [۲]. ترشح گلوکوکورتیکوییدها در پاسخ به حوادث هیجانی دو اثر مهم به دنبال دارد: ۱- به پاسخ‌های سریع بدن نسبت به حوادث استرسی ۲- به وسیله تقویت حافظه هیجانی به دنبال تحریکات تجربی به پاسخ‌های آینده کمک می‌کنند [۳].

شواهد زیادی نشان می‌دهند که هیپوکمپ یک ساختار مهم مغزی است که در ذخیره حافظه مربوط به رویدادهای هیجانی شرکت می‌کند و ناحیه خلفی هیپوکمپ حاوی تراکم بالایی از گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی است و دیده شده که تزریق موضعی گلوکوکورتیکوییدها یا آنتاگونیست‌های اختصاصی گیرنده آن‌ها به داخل هیپوکمپ ذخیره حافظه را در مدل‌های مختلف بررسی حافظه تعدیل می‌کند [۴] و تزریق بعد از آموزش آگونیست اختصاصی گلوکوکورتیکوییدی (RU28362) به داخل ناحیه خلفی هیپوکمپ، ذخیره حافظه را در مدل یادگیری احترازی مهاری افزایش می‌دهد و تزریق قبل از آموزش آنتاگونیست اختصاصی‌گیرنده گلوکوکورتیکوییدی، ذخیره حافظه فضایی را در مدل یادگیری ماز آبی موریس کاهش می‌دهد [۳]. این موضوع نشان می‌دهد که اثرات افزایش ذخیره حافظه در هیپوکمپ توسط گلوکوکورتیکوییدها ناشی از فعال شدن گیرنده گلوکوکورتیکوییدی در این ناحیه می‌باشد.

به علاوه یافته‌های دیگر نشان می‌دهند که گلوکوکورتیکوییدها بر تحریک‌پذیری عصبی و القاء تقویت طولانی مدت در هیپوکمپ مؤثر هستند [۵]. این یافته‌ها همراه با شواهد رفتاری مؤید آن است که هیپوکمپ یک ساختمان مهم مغزی است که در تعدیل ذخیره حافظه توسط گلوکوکورتیکوییدها شرکت می‌کند [۴]. البته تاکنون مطالعات کمتری برروی مکانیسم‌های احتمالی دخالت کننده صورت گرفته است و در این خصوص عوامل گوناگونی پیشنهاد شده که احتمال می‌رود اثرات گلوکوکورتیکوییدها را واسطه‌گری نمایند که یکی از این موارد سیستم اوپیوییدی است.

از طرفی مطالعات قبلی حضور پپتیدهای اپیوییدی و انواع مختلف گیرنده‌های آنها در نواحی مختلف هیپوکمپ موش صحرایی از جمله ناحیه CA1، را نشان داده‌اند .اپیوییدها از طریق گیرنده‌های مختلف اپیوییدی، باعث افزایش تحریک‌پذیری سلولی در هیپوکمپ می‌شوند و هم‌چنین تقویت بلند مدت توسط اپیوییدهای با منشاء درونی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. علاوه بر این تزریق بلافاصله بعد از آموزش آگونیست‌ها و یا آنتاگونیست‌های سیستم اپیوییدی به ترتیب موجب افزایش و یا کاهش تثبیت حافظه می‌شود [۶].

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که بین گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی و سیستم اپیوییدی در بعضی از رفتارها تعامل وجود دارد و در این زمینه فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- آدرنال یک جزء مهم نوروآندوکرین پاسخ به اوپیوییدها است. ضمناً تجویز مکرر مورفین، گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی را در برخی نواحی مغزی کاهش می‌دهد [۷]. نتایج مطالعه دیگری نشان داد که هورمون‌های گلوکوکورتیکوییدی اثرات مرفین را بر رفتار تسهیل می‌کنند [۶]. هم‌چنین گلوکوکورتیکوییدها از طریق گیرنده‌هایشان اثرات رفتاری وابسته به دوپامین را احتمالاً به وسیله رهاسازی آن تسهیل می‌کنند. ضمناً اثرات رفتاری و دوپامینی اوپیوییدها به وسیله تجویز فوری آنتاگونیست گیرنده گلوکوکورتیکوییدی کاهش می‌یابد که ممکن یک استراتژی درمانی جدید برای درمان اعتیاد دارویی باشد [۸].

بر اساس یافته‌های فوق احتمال می‌رود که گلوکوکورتیکوییدها برای ایفای نقش خود بر تعدیل ذخیره حافظه با سیستم اوپیوییدرژیک تعامل داشته باشند که این مسئله به روشنی مشخص نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین دخالت سیستم اپیوییدی بر اثرات گلوکوکورتیکوییدها در تثبیت و به خاطرآوری حافظه در هیپوکمپ در مدل یادگیری احترازی غیرفعال در موش صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوان‌ها: در این مطالعه تجربی از ۱۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد

که در شرایط کنترل شده درجه حرارت (۲±۲۲ درجه) و نور طبیعی (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری می‌شدند وآب و غذا آزادانه و به اندازه کافی در اختیار آن‌ها قرار داشت.

دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال: این دستگاه یک جعبه پلکسی‌گلاس مکعب مستطیل با ابعاد ۹۱ سانتی‌متر طول و ۲۰ سانتی‌متر عرض در قسمت بالا و ۶/۴ سانتی‌متر در قسمت کف و ۲۰ سانتی‌متر عمق و حاوی دو قسمت است که یک بخش آن روشن و بخش دیگر تاریک است ابعاد بخش روشن ۲۰×۳۱×۲۰ و قسمت روشن ۲۰×۶۰×۲۰ است که با یک درب ۸×۸ سانتی‌متری گیوتینی به هم راه دارند. در کف هر دو بخش میله‌های ضد زنگ با فاصله یک سانتی‌متر از هم قرار دارند و یک لامپ ۱۰۰ واتی با فاصله ۴۰ سانتی‌متر بالای قسمت روشن دستگاه قرار دارد. کف قسمت تاریک به یک مدار الکتریکی وصل است که با روشن شدن کلید مدار، جریان الکتریکی با مدت، شدت و فرکانس مشخص از کف آن عبور می‌کند. این دستگاه ساخت شرکت ایرانی نورسا می‌باشد.

روش قرار دادن کانول روی هیپوکمپ: برای دسترسی به ناحیه خلفی هیپوکمپ، متعاقب بیهوشی حیوان با کتامین و برداشتن نسوج سطحی، جمجمه موش در دستگاه استروتاکسی فیکس شد و با استفاده از اطلس Paxinos & Watson و به وسیله دستگاه استریوتاکسی (AP=3.6, DV=3.5, ML=±3 از سطح جمجمه) نقطه قرار دادن کانول مشخص شد [۹]. سپس استخوان جمجمه را سوراخ نموده و کانول راهنما را که قبلاً آماده شده بود درون مغز موش قرار داده و توسط پیچ ظریف عینک و اکریل دندان‌پزشکی آن را فیکس نمودیم. برای باز نگه‌داشتن کانول‌ها از ماندرن مسی آغشته به روغن معدنی کمک گرفته شد و بلافاصله پس از جراحی جهت جلوگیری از عفونت پنی‌سیلین به میزان ۱۵۰۰۰ واحد به صورت عضلانی تزریق شد و تا زمان به هوش آمدن، موش‌ها در درجه حرارت کنترل شده قرار داشتند. بعد از پایان جراحی حداقل ۷ روز به موش‌ها استراحت داده شد تا بهبود یابند و استرس جراحی از بین برود و سپس آزمایش‌های مربوطه انجام گرفت.

روش یادگیری احترازی غیرفعال: الف) آشنا شدن: یک هفته بعد از جراحی موش‌ها، ابتدا همه گروه‌های آزمایشی به دستگاه عادت داده شدند. بعد از قرار دادن حیوان در قسمت روشن دستگاه در حالی که صورت آن پشت به درب بود وقتی که موش به طرف درب می‌چرخید درب بین دو قسمت تاریک و روشن باز شده و اجازه داده می‌شد حیوان وارد قسمت تاریک شود بلافاصله بعد از ورود حیوان به قسمت تاریک درب بسته شده و حیوان از قسمت تاریک گرفته و به قفس بازگردانیده شد. این کار ۳۰ دقیقه بعد و در ۳ مرحله تکرار گردید.

ب) آموزش (اکتساب یادگیری): ۳۰ دقیقه بعد از بار سوم سازش یافتن، اکتساب یادگیری آموزش داده شد. بلافاصله بعد از ورود موش به قسمت تاریک، درب بین قسمت روشن و تاریک بسته و شوک الکتریکی به شدت ۰/۵ میلی‌آمپر و به مدت ۱/۵ ثانیه (برای ارزیابی فرایند تثبیت) یا ۳ ثانیه (برای ارزیابی به خاطرآوری) از طریق سیم‌های استیل تعبیه شده در کف به حیوان اعمال گردید. بعد از ۲۰ ثانیه موش از قسمت تاریک گرفته و موقتاً به قفس بازگردانیده شد و دو دقیقه بعد رفتار موش همانند قبل آزمایش شد. عدم ورود به قسمت تاریک در مدت ۱۲۰ ثانیه به عنوان اکتساب موفقیت‌آمیز در نظر گرفته شد. در غیر این صورت با ورود حیوان به قسمت تاریک برای بار دوم درب بسته شده و حیوان برای بار دوم همان شوک بالا را دریافت کرد.

ج) تست به خاطرآوری: ۴۸ ساعت بعد از آموزش موش‌ها تحت تست به خاطرآوری قرار گرفتند. به نحوی که ابتدا حیوان در قسمت روشن قرار داده شد و پس از باز شدن درب گیوتینی زمان قبل از ورود برای اولین بار به داخل اتاق تاریک Step- Throuhg Latency (STL) و کل زمان صرف شده در قسمت روشن Time in Light Chamber / Total (TLC) به مدت ۶۰۰ ثانیه برای گروه‌های مختلف آزمایشی اندازه‌گیری و به طور دقیق ثبت گردید. لازم به ذکر است که برای ارزیابی وضعیت تثبیت هم از تست به خاطرآوری و ۴۸ ساعت بعد از آموزش استفاده می‌شود.

روش تزریق دارو: کورتیکوسترون به میزان ۱ میلی‌گرم (به عنوان بهترین دوز که طی مطالعات قبلی پژوهش گران به

دست آمده بود) به صورت داخل صفاقی بلافاصله بعد از آموزش و یا ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری تزریق شد. هم‌چنین بلافاصله بعد از آموزش یا ۱ ساعت قبل از تست به خاطرآوری نالتروکسان به عنوان آنتاگونیست سیستم اوپیوییدی به میزان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میکرولیتر به ازاء هر طرف توسط سرنگ هامیلتون از طریق کانول‌های راهنما به داخل هیپوکمپ و بر طبق گروه‌های پیش‌بینی شده تزریق گردید. تزریق با سرعت ۰/۵ میکرولیتر در مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفته و سوزن تزریق برای مدت ۲ دقیقه برای جلوگیری از پس زدن مایع در داخل کانول باقی گذاشته شده و سپس خارج گردید.

روش اندازه‌گیری فعالیت حرکتی: فعالیت حرکتی موش‌ها با استفاده از سیستم کنترل فعالیت TSE infraMot, TSE, Bad Homburg, Germany (TSE) اندازه‌گیری شد این سیستم از سنسورهای مادون قرمز تشکیل شده که به صورت نامحسوس عمل می کند. این سنسورها برروی قفس حیوان تعبیه شده و فعالیت حیوان را به صورت انفرادی و با استفاده از تصویربرداری از سر و بدن، به مدت ۱۰ دقیقه (۵ مرحله ۲ دقیقه‌ای) ثبت و اندازه‌گیری می‌کند.

آزمایش‌ها و گروه‌های آزمایشی: آزمایش ۱: برای ارزیابی نقش سیستم اوپیوییدی در اثرات کورتیکوسترون بر تثبیت یادگیری در مدل یادگیری احترازی غیرفعال آزمایش زیر انجام گردید. ۶۰ سر موش به شش گروه زیر تقسیم شدند:

الف) گروه۱: بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک وهیکل دریافت نمودند و هم‌زمان در داخل هیپوکمپ آن‌ها سالین تزریق شد.

ب) گروه ۲: بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک کورتیکوسترون با دوز ۱ میلی‌گرم دریافت نمودند و هم زمان در داخل هیپوکمپ آن‌ها سالین تزریق شد.

ج) گروه‌های ۳ و۴: بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک وهیکل دریافت نمودند و هم‌زمان نالتروکسان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در داخل هیپوکمپ آن‌ها تزریق شد.

د) گروه‌های ۵ و۶: بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک کورتیکوسترون ۱ میلی‌گرم دریافت نمودند و هم‌زمان نالتروکسان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در داخل هیپوکمپ آن‌ها تزریق شد.

آزمایش ۲: برای ارزیابی نقش سیستم اوپیوییدی در اثرات کورتیکوسترون بر به خاطرآوری یادگیری در مدل یادگیری احترازی غیرفعال آزمایش زیر انجام گردید. ۶۰ سر موش به شش گروه زیر تقسیم شدند:

الف) گروه۱: ۶۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری سالین در داخل هیپوکمپ تزریق شد و ۳۰ دقیقه بعد به طور سیستمیک حلال دریافت نمودند.

ب) گروه ۲: ۶۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری سالین در داخل هیپوکمپ تزریق شد و ۳۰ دقیقه بعد به طور سیستمیک کورتیکوسترون با دوز ۱ میلی‌گرم دریافت نمودند.

ج) گروه ۳ و۴: ۶۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری نالتروکسان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در داخل هیپوکمپ تزریق شد و ۳۰ دقیقه بعد به طور سیستمیک وهیکل دریافت نمودند.

د) گروه‌های ۵ و۶: ۶۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری نالتروکسان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در داخل هیپوکمپ تزریق و ۳۰ دقیقه بعد به طور سیستمیک کورتیکوسترون ۱ میلی‌گرم دریافت نمودند.

ضمناً در همه حیوانات پس از انجام آزمایشات فعالیت حرکتی ارزیابی شد.

روش بررسی بافت‌شناسی: در پایان آزمایش‌ها موش‌ها با کتامین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بی‌هوش شدند. پس از آن مغز موش از جمجمه خارج و برای ۴ روز در فرمالین۱۰٪ قرار داده شد. سپس برش‌های ۴۰ میکرومتری تهیه و با کریستال ویولت رنگ‌آمیزی و جهت تعیین محل قرار گرفتن کانول زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. نتایج به دست آمده از حیواناتی که محل کانول درست نبود در تحلیل آماری استفاده نشد.

روش بررسی آماری: داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه و به دنبال آن با تست توکی ارزیابی شدند و $p<0/05$ به عنوان ملاک معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد از میانگین در نمودارهای مربوطه گزارش شدند.

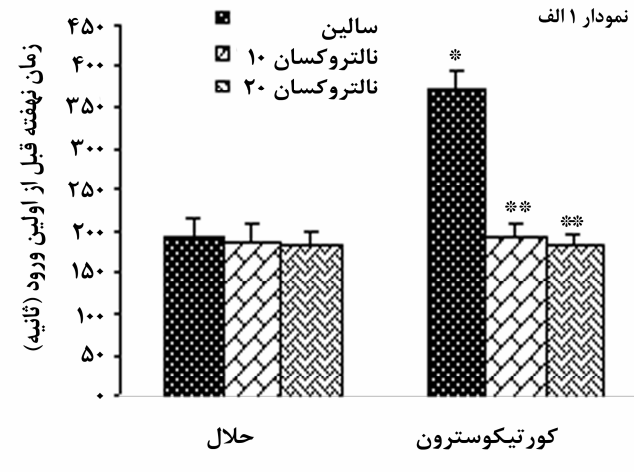
نتایج

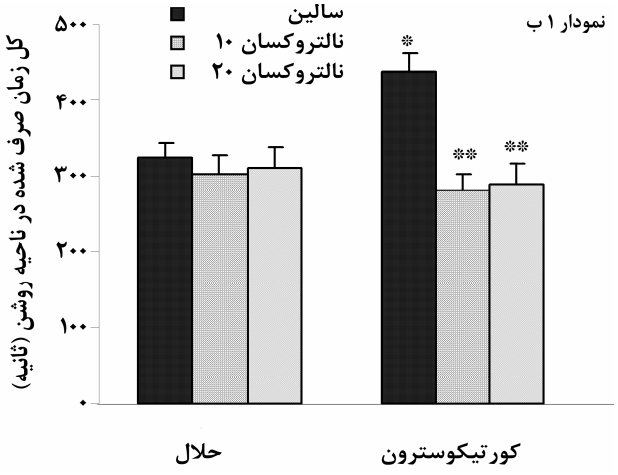
نتایج مربوط به ارزیابی روند تثبیت حافظه:

الف: آنالیز STL: آنالیز واریانس دو طرفه STL حاکی از اثرات معنی‌دار کورتیکوسترون و عدم تأثیر معنی‌دار نالتروکسان و تعامل معنی‌دار بین آن‌ها بر تثبیت یادگیری بوده و آنالیز بعدی با کمک تست توکی نشان داد که تزریق کورتیکوسترون بلافاصله بعد از آموزش به طور معنی‌داری تثبیت حافظه را افزایش داده است ($p<۰/۰۱$) در حالی که تزریق نالتروکسان این اثر را بلوک نموده است ($p<۰/۰۵$).

ب: آنالیز TLC: آنالیز واریانس دو طرفه TLC هم حاکی از اثرات معنی‌دار کورتیکوسترون و عدم تأثیر معنی‌دار نالتروکسان و تعامل معنی‌دار بین آن‌ها بر تثبیت یادگیری بوده و آنالیز بعدی با کمک تست توکی نشان داد که تزریق کورتیکوسترون بلافاصله بعد از آموزش به طور معنی‌داری تثبیت حافظه را افزایش داده است ($p<۰/۰۵$) در حالی که تزریق نالتروکسان این اثر را بلوک نموده است ($p<۰/۰۵$).

یافته‌های فوق نشان می‌دهند که گلوکوکورتیکوییدها نقش مهمی در فرآیند تثبیت یادگیری بازی می‌کنند و احتمالاً سیستم اوپیوییدی در این نقش با گلوکوکورتیکوییدها اثر متقابل دارد (نمودار ۱ الف و ۱ ب).





نمودار ۱- اثر تزریق کورتیکوسترون به صورت داخل صفاقی و تزریق داخل هیپوکمپی نالتروکسان بر تثبیت حافظه در مدل یادگیری احترازی غیر فعال. محور عمودی، (میانگین ± خطای استاندارد از میانگین) الف- زمان نهفته قبل از اولین ورود و ب- کل زمان صرف شده در ناحیه روشن را در طی تست به خاطرآوری نشان می‌دهد *: تفاوت بین گروه سالین + کورتیکوسترون و سالین + وهیکل در سطح ($p<۰/۰۱$) معنی‌دار می‌باشد. **: تفاوت بین گروه کورتیکوسترون + نالتروکسان با کورتیکوسترون + سالین در سطح ($p<۰/۰۱$) معنی‌دار می‌باشد.

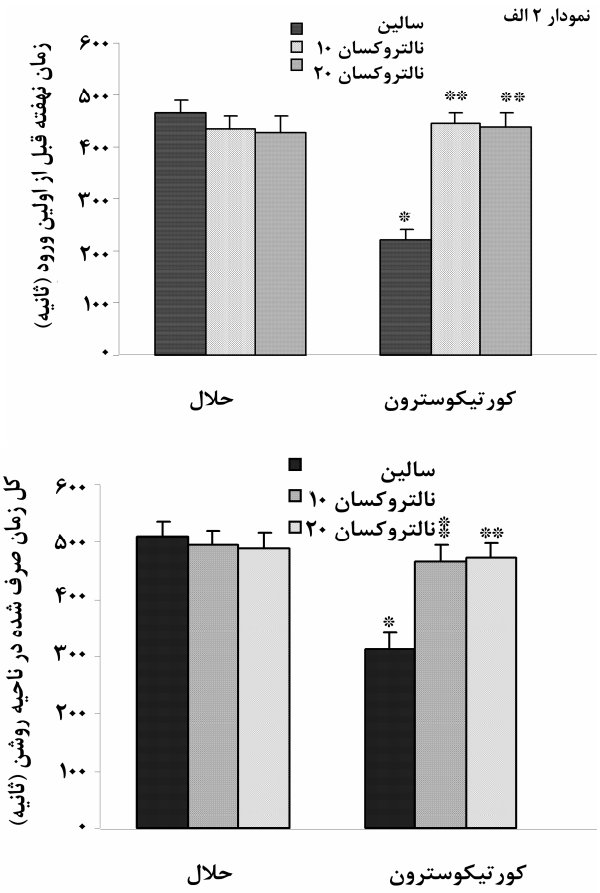
نتایج مربوط به ارزیابی روند بخاطرآوری حافظه:

الف: آنالیز STL: آنالیز واریانس دو طرفه STL حاکی از اثرات معنی‌دار کورتیکوسترون و عدم تأثیر معنی‌دار نالتروکسان و تعامل معنی‌دار بین آن‌ها بر به خاطرآوری حافظه بوده و آنالیز بعدی با کمک تست توکی نشان داد که تزریق کورتیکوسترون ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری به طور معنی‌داری این فرآیند را کاهش داده است ($p<۰/۰۱$) در حالی که تزریق نالتروکسان این اثر را بلوک نموده است ($p<۰/۰۱$).

ب: آنالیز TLC: آنالیز دو طرفه TLC حاکی از اثرات معنی‌دار کورتیکوسترون و عدم تأثیر معنی‌دار نالتروکسان و تعامل معنی‌دار بین آن‌ها بر به خاطرآوری حافظه بوده و آنالیز بعدی با کمک تست توکی نشان داد که تزریق کورتیکوسترون بلافاصله بعد از آموزش به طور معنی‌داری به خاطرآوری حافظه را کاهش داده است ($p<۰/۰۱$) در حالی که تزریق نالتروکسان این اثر را بلوک نموده است ($p<۰/۰۱$).

یافته‌های فوق نشان می‌دهند که گلوکوکورتیکوییدها نقش مهمی در فرآیند به خاطرآوری حافظه بازی می‌کنند و احتمالاً

سیستم اوپیوییدی در این نقش با گلوکوکورتیکوییدها اثر متقابل دارد (نمودار ۲ الف و ۲ ب).

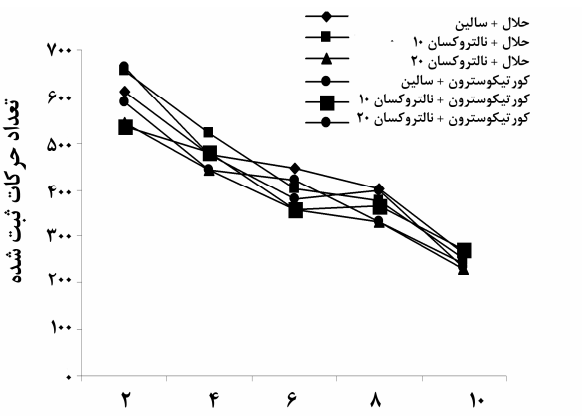


نمودار ۲- اثر تزریق کورتیکوسترون به صورت داخل صفاقی و تزریق داخل هیپوکمپی نالتروکسان بر روند به خاطرآوری حافظه در مدل یادگیری احترازی غیر فعال. محور عمودی، (میانگین ± خطای استاندارد از میانگین) الف- زمان نهفته قبل از اولین ورود و ب- کل زمان صرف شده در ناحیه روشن را در طی تست به خاطرآوری نشان می‌دهد.

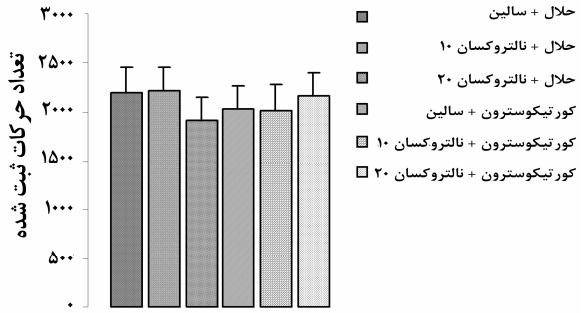
****: تفاوت بین گروه سالین + کورتیکوسترون و سالین + وهیکل در سطح (p<۰/۰۱) معنی‌دار می‌باشد.***

*****: تفاوت بین گروه کورتیکوسترون + نالتروکسان با کورتیکوسترون + سالین در سطح (p<۰/۰۱) معنی‌دار می‌باشد.***

نتایج ارزیابی فعالیت حرکتی: هدف از این آزمایش بررسی اثر کورتیکوسترون و نالتروکسان بر فعالیت حرکتی بود. بنابراین اثرات کورتیکوسترون و نالتروکسان بر فعالیت حرکتی آزمایش گردید. نتایج فعالیت حرکتی در نمودار ۳ نشان داده شده است. هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در فعالیت ثبت شده در طی ۱۰ دقیقه وجود نداشت (نمودار ۳ الف) و نتایج حاکی از عدم اثر معنی‌دار کورتیکوسترون و یا نالتروکسان بر فعالیت حرکتی بود (نمودار ۳ ب). این نتایج نشان می‌دهد که اثرات کورتیکوسترون یا نالتروکسان بر فرآیند حافظه ناشی از اثر خالص آن‌ها بوده و ناشی از اثر بر فعالیت حرکتی نیست.



نمودار ۳ الف



نمودار ۳ ب

نمودار ۳- اثرات تزریق کورتیکوسترون و نالتروکسان بر فعالیت حرکتی حیوانات. محور عمودی: (میانگین ± خطای استاندارد از میانگین). الف: میانگین فعالیت طی هر دو دقیقه ب: میانگین کل فعالیت طی ۱۰ دقیقه.

بحث

مهم‌ترین یافته‌های این مطالعه عبارتند از: ۱- تزریق آگونیست گلوکوکورتیکویید (کورتیکوسترون) بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک (داخل صفاقی) سبب تقویت تثبیت اطلاعات تازه آموخته شده در مدل یادگیری احترازی غیرفعال می‌شود و تزریق هم زمان آنتاگونیست کلاسیک اوپیوییدی (نالتروکسان) به داخل هیپوکمپ موجب مهار اثرات کورتیکوسترون می‌شود. ۲- تزریق آگونیست گلوکوکورتیکویید (کورتیکوسترون) ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطرآوری سبب اختلال در به خاطرآوری اطلاعات تازه آموخته شده در مدل یادگیری احترازی غیرفعال می‌شود و تزریق آنتاگونیست اوپیوییدی (نالتروکسان) به داخل هیپوکمپ وقتی ۳۰ دقیقه

قبل از کورتیکوسترون انجام می‌شود موجب مهار اثرات آن بر به خاطرآوری اطلاعات می‌شود.

مکانیسم اثرات کورتیکوسترون بر تثبیت و به خاطرآوری حافظه: مطالعات قبلی نشان داده که ناحیه خلفی هیپوکمپ حاوی تراکم بالایی از گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی است [۵] و داروهای تزریق شده از طریق تغییر فعالیت این گیرنده‌ها بر ذخیره حافظه اثر گذاشته‌اند. نتایج این مطالعه شواهد دیگری مبنی بر نقش گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی هیپوکمپ در تعدیل ذخیره حافظه ارایه می‌کنند و با یافته‌های مطالعات قبلی مبنی بر دخالت گیرنده گلوکوکورتیکوییدی هیپوکمپ در ذخیره حافظه در دیگر مدل‌های یادگیری (مازآبی موریس) هم‌خوانی دارد [۱۰]. یافته‌های مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژی نشان داده‌اند که اثرات ناشی از گلوکوکورتیکوییدها بر روی یادگیری و ذخیره حافظه به طور مستقیم و موضعی واسطه‌گری می‌شوند [۳] و گلوکوکورتیکوییدها اعمال مغزی و رفتاری را با مکانیسم‌های مختلفی تعدیل می‌کنند. اگر چه طبق تئوری رایج اثرات کلاسیک، آن‌ها با عبور از غشاء سلول و فعال کردن گیرنده‌های درون سلولی باعث تعدیل بیان ژن و سنتز پروتئین در بافت‌های هدف می‌شوند که این عمل به عوامل نسخه‌برداری وابسته است [۱۱]. ضمناً فعالیت گیرنده‌های داخل سلولی کورتیکوستروییدها طوری است که گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی میل ترکیبی پایینی برای کورتیکوسترون دارند و در طی استرس و در پیک ریتم‌های شبانه‌روزی (زمان بالا بودن گلوکوکورتیکوییدهای خون) اشغال می‌شوند. در مقابل، میل ترکیبی گیرنده‌های مینرالوکورتیکوییدی برای کورتیکوسترون ۱۰ برابر بیشتر از گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی است و این گیرنده‌ها در غلظت‌های پایه گلوکوکورتیکوییدها اشباع می‌باشند [۱۲].

علاوه بر مکانیسم‌های ژنی، مطالعات جدید نشان می‌دهند که گلوکوکورتیکوییدها از طریق مکانیسم‌های غیر وابسته به ژن و گیرنده‌های واقع در غشای سلول باعث بروز اثرات سریع می‌شوند [۱۳]. با توجه به بروز سریع اثر کورتیکوسترون بر به خاطرآوری حافظه، به نظر می‌رسد مکانیسم‌های غیر ژنی در این امر دخالت دارند. شواهدی وجود دارند دال بر این که کورتیکوسترون با سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری در مغز از جمله سیستم دوپامینرژیک [۸]، نورآدرنرژیک و اپیوییدی از طریق گیرنده‌های غشایی تعامل دارد [۱۳].

مکانیسم احتمالی اثرات متقابل نالتروکسان و کورتیکوسترون بر تثبیت و به خاطرآوری حافظه: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از آنتاگونیست کلاسیک گیرنده‌های اوپیوییدی در ناحیه خلفی هیپوکمپ اثرات کورتیکوسترون را بر تثبیت و به خاطرآوری اطلاعات بلوک می‌کند که با نتایج برخی از مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد. نتایج آزمایشات قبلی ما نشان داد که تزریق محیطی نالوکسان اثرات تخریبی کورتیکوسترون و استرس بر به خاطرآوری حافظه طولانی مدت را در مدل مهار اجتنابی بلوک می‌کند [۶]. هم‌چنین تزریق نالتروکسان به داخل هیپوکمپ آثار مخرب کورتیکوسترون بر به خاطرآوری حافظه فضایی در ماز آبی موریس را بلوک می‌کند [۷]. بنابراین، سیستم اوپیوییدی هیپوکمپ در اثرات مخرب کورتیکوسترون بر به خاطرآوری نقش دارد.

مکانیسم احتمالی تعامل بین این دو سیستم این است که کورتیکوسترون و نالتروکسان برای اشغال یک رسپتور با همدیگر رقابت می‌کنند. تزریق نالتروکسان مدت کوتاهی قبل از کورتیکوسترون رسپتورها را بلوک کرده و مانع از عمل کورتیکوسترون می‌شود [۱۴]. شواهدی برای تأیید این موضوع وجود دارند. حضور یک نوع گیرنده غشایی برای کورتیکوستروییدها در نوعی دوزیست نشان داده شده است. این گیرنده در رفتارهای جنسی و فعالیت حرکتی این جانور نقش دارد. هم‌چنین آگونیست‌های اختصاصی و آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده کاپا اپیوییدی قادر به رقابت با کورتیکوسترون برای اشغال این گیرنده می‌باشند. بنابراین، احتمالاً اثرات بلوک کنندگی نالتروکسان بر اثرات مخرب کورتیکوسترون بر به خاطرآوری از طریق اشغال این گیرنده و ممانعت اثر کورتیکوسترون اعمال می‌شود [۱۵].

سایر مکانیسم‌های احتمالی عبارتند از:

۱- کورتیکوسترون با فعال کردن سیستم اپیوییدی داخلی، اثرات خود را اعمال می‌کند. این فرضیه با یافته‌های زیر حمایت می‌شود. الف) پپتیدهای اپیوییدی و گیرنده‌های اپیوییدی در هیپوکمپ بیان می‌شوند. ب) فعال شدن گیرنده‌های اپیوییدی تقویت طولانی مدت و حافظه فضایی را تنظیم می‌کند. ج) گلوکوکورتیکوییدها بیان ژن دینورفین را تنظیم می‌کنند. د) روی نورون‌های حاوی پپتیدهای اپیوییدی گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی وجود دارد [۱۶].

۲- در مطالعات انسانی و حیوانی بعضی از جنبه‌های جدید محیط آزمایش موجب برانگیختگی می‌شود و این برانگیختگی مسئول وقوع آثار مثبت و منفی گلوکوکورتیکوییدها بر فازهای مختلف حافظه می‌باشد. بنابراین، امکان دارد که نالتروکسان با بلوک این برانگیختگی، اثرات مخرب کورتیکوسترون بر به خاطرآوری را بلوک کند [۱۷].

۳- امکان دارد کورتیکوستروییدها و اپیوییدها بر روی نورون دیگری با یکدیگر همگرایی داشته باشند و اثرات خود را از طریق این نورون سوم اعمال کنند [۱۸]. دیده شده که کورتیکوسترون و اپیوییدها در آمیگدال، رها شدن نوراپی نفرین را تنظیم می‌کنند و برخی از مطالعات گزارش کرده‌اند که اثرشان را بر تثبیت حافظه از این طریق اعمال می‌کنند [۱۹].

نتیجه‌گیری

به طور کلی مطالعه حاضر نشان می‌دهد فعال شدن گیرنده‌های گلوکوکورتیکوییدی در ناحیه هیپوکمپ نقش مهمی‌در تثبیت و به خاطرآوری اطلاعات بازی می‌کند و احتمالاً سیستم اوپیوییدی برای اجرای این اثر نقش تعدیل کننده مهمی را به عهده دارد که البته برای تعیین نوع گیرنده‌های اوپیوییدی و سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری درگیر و اثرات متقابل با نواحی دیگر مطالعات بیشتری لازم است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاران مرکز تحقیقات فیزیولوژی به ویژه آقایان صادقی، علی محمدی، حقیقی، دکتر یزدانی، دکتر صالحی و خانم پاکدل که در اجرای این پژوهش با ما همیاری نمودند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

[1] Khaksari M, Rashidy-Pour A, Vafaei AA. Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone induced impairment of memory retrieval in rats. *Neuroscience*. 2007; 149(4): 729–38. [Farsi]

[2] Roozendaal B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem*, 2002; 78(3): 578-95. [Farsi]

[3] Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Bures J, Sharifi MR, Fenton AA. Glucocorticoid antagonist administration into the basolateral amygdala modulates place avoidance memory. *Daru*. 2000; 8(1, 2): 30-6.

[4] Roozendaal B, Hui GK, Hui IR, Berlau DJ, McGaugh JL, Weinberger NM. Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*, 2006; 86(3): 249-55.

[5] Roozendaal B, Griffith QK, Buranday J, De Quervain DJ, McGaugh JL. The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2003; 100(3): 1328–33.

[6] Rashidy-pour A, Sadeghi H, Taherian AA, Vafaei AA, Fathollahi Y. The effect of acute restraint stress and dexamethasone on retrieval of long-term memory in rats: an interaction with opiate system. *Behav Brain Res*, 2004; 154: 193-8. [Farsi]

[7] Sajadi AA, Samaei SA, Rashidy-pour A. Blocking effects of intra–hippocampal naltrexone microinjections on glucocorticoid-induce impairment of spatial memory retrieval in rat. *Neuropharmacology*. 2007; 52(2): 347-54.

[8] Pakdel R, Rashidy-Pour A. Glucocorticoid-induced impairment of long-term memory retrieval in rat: An

interaction with dopamine D2 receptors. *Neurobiol Learn Mem*, 2006; 85(3): 300-6.

[9] Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed, Elsevier Academic Press, Orlando. 2005; pp: 58-9.

[10] Roozendaal B. 1999 curt P. Richter award. Glucocorticoids and there regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*. 2000; 25(3): 213-8.

[11] Akirav I, Kozenicky M, Tal D, Sandi C, Venero C, Richter-Levin G. A facilitative role for corticostrone in the acquisition of a spatial task under moderate stres. *Learn Mem*, 2004; 11(2): 188–95.

[12] Hui GK, Figueroa IR, Poytress BS, Roozendaal B, McGaugh JL, Weinberger NM. Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injection of corticosterone in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 2004; 81(1): 67-74.

[13] Chen YZ, Qiu J. Possible consequence of nongenomic action of glucocorticoids in neural cells. *News Physiol Sci*, 2001; 16: 292-6.

[14] Evans SJ, Searcy BT, Moore FL. Subset of kappa opioid ligands bind to the membrance glucocorticoid receptor in an amphibian brain. *Endocrinology*. 2000; 141(7): 2294-300.

[15] Bradford CS, Walthers EA, Searcy BT, Moore L. Cloning, heterologous expression and pharmacological characterization of a kappa opioid receptor from the brain of the rough-skinned newt, Taricha granulose. *J Mol Endocrinol*, 2005; 34(3): 809-23.

[16] Moore SD, Madamba SG, Schweitzer P, Siggins GR. Voltage-dependent effects of opioid peptides on hippocampal CA3 pyramidal neurons in vitro. *Neurosci*, 1998; 14: 809–20.

[17] Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training – associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101(3): 853-8.

[18] Belanoff JK, Gross K, Yager A, Schatzberg AF. Corticosteroids and cognition. *J Psycy Res*, 2001; 35(3): 127-45.

[19] Quirarte GL, Galvez R, Roozendaal B, McGaugh JL. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Res*, 1998; 808(2): 134–40.

Interaction of Intrahippocampal Injection of Naltheroxone and Corticosterone on Consolidation and Retreival Memory Processes in Passive Avoidance Task in Rat

AA. Vafaei[1], A. Rashidy-Pour[2]

Received: 15/01/08 **Sent for Revision: 01/07/08** **Received Revised Manuscript: 15/09/08** **Accepted: 20/10/08**

Background and Objectives Previous studies suggested that the role of corticosterone on memory process probably is mediated by opiate system in Dorsal Hippocampus (DH). The aim of this study was to test whether there is any interaction between glucocorticoids and opiate system on memory consolidtaion and retrieval in passive avoidance learning task.

Material and Methods: In this experimental study 120 male Wistar rats (250–300 gr) surgically implanted bilaterally with cannulae aimed at the DH were trained in passive anoidnace learning (PAL) task. Two days after training, retention test was done. Naltoroxe (10 or 20 µg/ul/ perside) were injected bilaterally into DH following immediately after training by IP injection of corticostrone (1 mg/kg) or 30 min before of IP injection of corticostrone (1 mg/kg) in retrieval test.

Results: The data indicated that injection of corticostrone immediatly after training of injected 30 min before of retrieval test enhanced and impaired memory consolidation and retrieval respectively ($p<0.01$) and these effects were blocked by injection of nalthroxone on DH ($p<0.01$).

Conclusion: The findings showed that the opioid receptors in hippocampus paly an important role in mediating the enhancing or impairing effects of corticosterone on memory consolidation and retrieval in passive avoidance task.

Key words: Hippocampus, Consolidation and Retrieval memory, Nalthroxone, Corticosterone, Rat

Funding: This research was funded by Semnan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Semnan University of Medical Sciences approved the study.

1- Associated Prof., Dept. of Physiology, Physiology Research Center, University of Medical Sciences, Semnan, Iran (Corresponding Author) Tel:(0231) 3332080, Fax: (0231) 3331551, E- mail: aavaf43@yahoo.com

2- Prof., Dept. of Physiology, Physiology Research Center, University of Medical Sciences, Semnan, Iran