

## Hippocampal Opioid Receptors Mediate the Effects of Peripheral Corticosterone on Consolidation and Retrieval of Spatial Memory in Rat

AA. Vafaei, Ph.D. , A. Rashidy-Pour, Ph.D., AA. Sajadi, M.Sc.

Learning and Memory Lab, Physiology Research Center, Semnan University of Medical Sciences

: Corresponding Address: P.O.Box: 35145-331, Learning and Memory Lab, Physiology Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran  
Email: aavaf43@yahoo.com

### Abstract

Received: 8/Nov/2007, Accepted: 20/Dec/2007

**Objective:** Strong evidence indicate that activity of glucocorticoid receptors is necessary for emotional memory processes and these effects probably are mediated by hippocampal opioid receptors. The aim of this study was to test whether there were any interaction between glucocorticoid and hippocampal opiate receptors on consolidation and retrieval of spatial memory.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 120 male Wistar rats (250 – 300 gr) were used. At first, the animals underwent surgery implant canulae in bilaterally of dorsal hippocampus (DH). Then one week later they were trained in a Water Maze task with eight trials for one day for consolidation and six trials per day for six consecutive days for retrieval processes. The retention of the spatial training was assessed 24h after the last training session with a 60-s probe trial. Corticosterone (1 mg/kg the best dose) was injected IP immediately after training or 30 min before retrieval. Also Naloxone (10 and 20 µg/ul/ per side) was injected bilaterally into hippocampus immediately after training or 60 min before retrieval test.

**Results:** The results indicated that injection of corticosterone immediately after training or 30 min before retention significantly enhanced or impaired consolidation and retrieval memory respectively ( $p < 0.01$ ) and these effects were blocked by injection of naloxone in to DH ( $p < 0.05$ ) in either cases.

**Conclusion:** The findings suggest that the opioid receptors in hippocampus play an important role in mediating the enhancing or impairing effects of systemic corticosterone on memory consolidation and retrieval.

**Keywords:** Hippocampus, Water maze, Spatial Memory, Naloxone, Corticosterone

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 4, Winter 2008, Pages: 268-275

## بررسی نقش گیرنده‌های اپیوئیدی ناحیه خلفی هیپوکامپ در تعدیل احتمالی اثرات گلوکوکورتیکوئیدها بر تثبیت و به خاطر آوری حافظه فضایی

عباسعلی وفايي Ph.D.، علی رشیدی پور Ph.D.، احمد علی سجادی M.Sc.

دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، آزمایشگاه یادگیری و حافظه

آدرس مکاتبه: سمنان، صندوق پستی: ۳۳۱-۳۵۱۴۵، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، آزمایشگاه یادگیری و حافظه

پست الکترونیک: Email:aavaf43@yahoo.com

### مکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۸/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۲۹

\* **هدف:** تعیین دخالت احتمالی گیرنده‌های اپیوئیدی ناحیه هیپوکامپ در اثرات سیستمیک گلوکوکورتیکوئیدها بر تثبیت و به خاطر آوری حافظه فضایی در مدل ماز آبی موريس در موش صحرايي

\* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی از ۱۲۰ سر موش نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. ابتدا به صورت دو طرفه روی ناحیه هیپوکامپ کانون راهنما قرار داده شد. یک هفته بعد موش‌ها در مدل ماز آبی موريس (۸ بار در مدت یک روز برای روند تثبیت و ۶ روز متوالی و هر روز ۶ بار برای روند به خاطر آوری) تحت آموزش قرار گرفتند. به خاطر آوری حیوانات، ۲۴ ساعت پس از اجرای آخرین مرحله آموزش ارزیابی شد. داروی کورتیکوسترون ۱ میلی‌گرم (بهترین دوز به دست آمده طی مطالعات قبلی) و یا حلال آن به طور داخل صفاقی بلافاصله بعد از آموزش و همچنین ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطر آوری تزریق شد. ضمناً هم‌زمان یا ۶۰ دقیقه قبل از تست به خاطر آوری نالتروکسان (۱۰ و ۲۰ میکروگرم در یک میکرولیتر به ازای هر طرف) یا سالین به داخل هیپوکامپ تزریق شد.

\* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد، تزریق کورتیکوسترون در دوز ۱ میلی‌گرم به ترتیب موجب تقویت تثبیت و اختلال به خاطر آوری حافظه می‌شود ( $P < 0.01$ ) و تزریق نالتروکسان در هر دو دوز به داخل هیپوکامپ به طور معنی‌داری موجب مهار اثرات کورتیکوسترون بر تثبیت و به خاطر آوری اطلاعات می‌شود ( $P < 0.05$ ).

\* **نتیجه‌گیری:** یافته‌های فوق نشان می‌دهد گیرنده‌های اپیوئیدی ناحیه هیپوکامپ نقش مهمی در اثرات سیستمیک گلوکوکورتیکوئیدها بر روند تثبیت و به خاطر آوری اطلاعات تازه آموخته شده دارند.

**کلیدواژگان:** هیپوکامپ، ماز آبی موريس، حافظه فضایی، نالتروکسان، کورتیکوسترون

فصلنامه پزشکی باخته، سال نهم، شماره ۴، زمستان ۸۶، صفحات: ۲۷۵-۲۶۸

### مقدمه

شواهد زیادی نشان می‌دهد که تزریق داروهای مؤثر بر سیستم‌های نوروترانسمیتری و نورومدولاتوری بعد از آموزش، ذخیره حافظه مربوط به اطلاعات تازه آموخته شده را تعدیل می‌کنند. این شواهد می‌گوید که اثر داروها و هورمون‌ها بر حافظه از طریق دخالت هسته‌های مغزی به ویژه هیپوکامپ اعمال می‌شود (۱).

مطالعات قبلی نشان می‌دهد گلوکوکورتیکوئیدها طی حالات هیجانی از قشر آدرنال رها می‌شوند و بر فعالیت‌های عصبی در نقاط مختلف مغز از طریق اتصال به گیرنده‌هایشان اثر می‌گذارند (۲).

گلوکوکورتیکوئیدها لپوفیلیک هستند و فوراً وارد مغز می‌شوند و مستقیماً به دو نوع از گیرنده‌های داخل سلولی خود که عبارتند از: گیرنده مینرالوکورتیکوئید (Mineralocorticoid Receptors: MR) و گیرنده گلوکوکورتیکوئید (Glucocorticoid Receptors: GR) متصل می‌شوند (۳). ترشح گلوکوکورتیکوئیدها در پاسخ به حوادث هیجانی دو اثر مهم به دنبال دارد: ۱. به پاسخ‌های سریع بدن نسبت به حوادث استرسی کمک می‌کنند. ۲. به دنبال تحریکات تجربی با افزایش حافظه اخباری به پاسخ‌های آینده کمک می‌کنند.

شواهد زیادی نشان می‌دهد که هیپوکامپ یک ساختار مهم مغزی است که در ذخیره حافظه مربوط به رویدادهای هیجانی شرکت می‌کند و ناحیه خلفی هیپوکامپ حاوی تراکم بالایی از گیرنده‌های استروئیدی غدد فوق کلیه است. نتایج حاصل از تزریق گلوکوکورتیکوئیدها یا آنتاگونیست‌های اختصاصی

گیرنده آنها به داخل هیپوکامپ نشان می‌دهند که گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدها در هیپوکامپ در تعدیل ذخیره حافظه دخالت دارند. تزریق موضعی گلوکوکورتیکوئیدها در هیپوکامپ ذخیره حافظه را در مدل‌های مختلف بررسی حافظه تعدیل می‌کند و تزریق آگونیست گیرنده گلوکوکورتیکوئید (RU28362) مستقیماً داخل هیپوکامپ به صورت وابسته به دوز، حافظه را افزایش می‌دهد (۴). مطالعات نشان داده است، تزریق بعد از آموزش آگونیست اختصاصی گلوکوکورتیکوئید داخل ناحیه پستی هیپوکامپ ذخیره حافظه را در مدل یادگیری احترازی مهار می‌دهد و تزریق قبل از آموزش آنتاگونیست اختصاصی گیرنده گلوکوکورتیکوئید ذخیره حافظه فضایی را در مدل یادگیری ماز آبی موريس کاهش می‌دهد (۱). این موضوع نشان می‌دهد اثرات افزایش ذخیره حافظه در هیپوکامپ توسط گلوکوکورتیکوئیدها ناشی از فعال شدن گیرنده گلوکوکورتیکوئید در این ناحیه است. به علاوه، یافته‌های دیگر نشان می‌دهند گلوکوکورتیکوئیدها بر تحریک‌پذیری عصبی و القای تقویت طولانی مدت در هیپوکامپ مؤثر هستند (۵). این یافته‌ها همراه با شواهد رفتاری نشان می‌دهند که گلوکوکورتیکوئیدها در تعدیل ذخیره حافظه دخالت دارند و هیپوکامپ یک ساختمان مهم مغزی است که در تعدیل ذخیره حافظه توسط گلوکوکورتیکوئیدها شرکت می‌کند (۴). البته تاکنون مطالعات کمتری بر روی مکانیسم‌های احتمالی دخالت‌کننده صورت گرفته است و در این خصوص عوامل گوناگونی پیشنهاد

قفسه، پنجره و غیره بود. ضمناً جهت ثبت مسیر حرکت، اطراف سینه حیوان یک نوار کشی بسته و به این نوار یک دیود ساطع کننده نور مادون قرمز متصل شده بود و مجموعه اشاره شده در پشت حیوان قرار می گرفت. حرکت و رفتار حیوان به وسیله یک دوربین تلویزیونی مادون قرمز که در ارتفاع دو متری بالای ناحیه مرکزی مخزن قرار گرفته بود ردیابی و تشخیص داده و کنترل می شد. سیگنال تلویزیونی دیجیتال وارد یک سیستم ردیاب کامپیوتری می شد که حرکت موش را هر ۱۰۰ میلی ثانیه ارزیابی و ذخیره می کرد. از این رو امکان ثبت دقیق مسیر شای موش در هر بار آموزش فراهم و از روی آن، متغیرهای زیر پایه گذاری می شد: الف) طول مسافت مسیر شای موش در هر ربع مخزن ب) درصد زمانی که حیوان در هر ربع مخزن گذرانده بود (هرچه درصد زمان و مسافت طی شده در ربعی که سکو در آن قرار گرفته بود بیشتر می بود نشانه یادگیری بهتر بود).

**روش آموزش و ارزیابی حافظه فضایی در ماز آبی موریس**  
الف) سازش یافتن (Habituation): به منظور عادت کردن به ماز ۲۴ ساعت قبل از آموزش موش ها به مدت سه دقیقه در مخزن فاقد صفحه پلکسی گلاس شنا کردند.

ب) فاز آموزش (Training trial): در این مرحله در خصوص بررسی روند تثبیت موش ها ۸ بار و به مدت ۱ روز و برای بررسی به خاطر آوری، موش ها روزانه ۶ بار به مدت شش روز جهت یافتن سکویی که در وسط یک ربع مخزن قرار داشت تحت آموزش قرار گرفتند. در هر بار آموزش موش به طور تصادفی از یکی از چهار نقطه اصلی مخزن (شمال، جنوب، شرق، غرب) به داخل آب رها می شد. سپس موش با شنا کردن سکوی زیر آب را پیدا می کرد و روی آن قرار می گرفت. پس از پیدا کردن سکو به موش اجازه داده می شد که به مدت ۳۰ ثانیه روی آن باقی بماند. در صورتی که موش قادر به پیدا کردن سکو در مدت ۶۰ ثانیه نبود با دست به طرف آن هدایت می شد. مدت زمان پیدا کردن سکو و مسافت کل طی شده در هر بار آموزش اندازه گیری می شد. موش ها پس از آخرین نوبت آموزش از حوضچه خارج و پس از خشک کردن با حوله به قفس خود باز گردانده می شدند.

#### فاز ارزیابی (Probe)

یک روز بعد از آخرین روز آموزش، حافظه فضایی حیوانات مورد ارزیابی قرار می گرفت. در این مرحله موش ها در یک آزمون ۶۰ ثانیه ای که طی آن سکو از داخل آب برداشته می شد مورد ارزیابی قرار می گرفتند و مدت زمان طی شده در ناحیه هدف و سرعت شنا کردن و نیز مسافت کل طی شده اندازه گیری می شد.

#### روش قرار دادن کانول روی هیپوکامپ

برای دسترسی به هیپوکامپ متعاقب بیهوشی با کتامین و برداشتن بافت های سطحی جمجمه، جمجمه موش در دستگاه استروتاکسی فیکس می شد و با استفاده از اطلس Paxinos & Watson و به وسیله دستگاه استریوتاکسی (AP = -۳/۶، DV = ۳/۵، ML = × ۲/۴) از سطح جمجمه نقطه قرار دادن کانول مشخص می شد (۹). سپس با مته دستی در نقطه مورد نظر، استخوان جمجمه را سوراخ و سپس کانول راهنما که قبلاً جهت قرار دادن در مغز موش آماده شده بود درون مغز موش قرار داده می شد و توسط پیچ ظریف عینک و اکریل دندانپزشکی ثابت می شدند. برای بازنگه داشتن کانول ها از ماندرن مسی که به روغن معدنی آغشته شده کمک گرفته شد

شده اند که احتمالاً اثرات گلوکوکورتیکوئیدها را واسطه گیری می کنند. یکی از این موارد سیستم اپیوئیدی است.

از طرفی، طی مطالعات قبلی حضور پپتیدهای اپیوئیدی و انواع مختلف گیرنده های اپیوئیدی در نواحی مختلف هیپوکامپ موش صحرایی از جمله ناحیه CA1 نشان داده شده است که اپیوئیدها از طریق گیرنده های مختلف اپیوئیدی، باعث افزایش تحریک پذیری سلولی در هیپوکامپ می شوند و تقویت بلند مدت (LTP) توسط اپیوئیدها با منشاء درونی تحت تاثیر قرار می گیرند و همچنین ترزریق آگونیست ها و آنتاگونیست های سیستم اپیوئیدی به ترتیب موجب افزایش و یا کاهش تثبیت حافظه می شود (۶).

از طرف دیگر مطالعات جدید نشان می دهد بین سیستم های گلوکوکورتیکوئیدی و اپیوئیدی در بعضی از رفتارها تعامل وجود دارد و فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال یک جزء مهم نروآندوکرین پاسخ به اپیوئیدها است و دیده شده که تجویز مکرر مورفین گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدها را در برخی نواحی مغزی کاهش می دهد (۷). نتایج مطالعه دیگری نشان داده است که هورمون های گلوکوکورتیکوئیدی اثرات مورفین را بر رفتارهایی مانند درد تسهیل می کنند (۶). همچنین گلوکوکورتیکوئیدها از طریق گیرنده های نشان اثرات رفتاری وابسته به دوپامین را تسهیل می کنند که احتمالاً به وسیله رهاسازی دوپامین صورت می گیرد و اثرات رفتاری و دوپامینی اپیوئیدها با تجویز فوری آنتاگونیست گیرنده گلوکوکورتیکوئید کاهش می یابد. این موضوع ممکن است یک استراتژی درمانی جدید برای درمان اعتیاد دارویی باشد (۸).

بنابراین بر اساس یافته های فوق احتمال می رود گلوکوکورتیکوئیدها برای ایفای نقش خود بر تعدیل ذخیره حافظه فضایی در مدل ماز آبی موریس با سیستم اپیوئیدریک در ناحیه هیپوکامپ تعامل داشته باشند. این مسئله هنوز به روشنی مشخص نشده است و هدف این مطالعه تعیین دخالت گیرنده های اپیوئیدی ناحیه خلفی هیپوکامپ در اثرات گلوکوکورتیکوئیدها بر تثبیت و به خاطر آوری حافظه در مدل یادگیری ماز آبی موریس در موش صحرایی بوده است.

#### مواد و روش ها

##### حیوانات

برای انجام این تحقیق تجربی از ۱۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور تهران تهیه شده بودند و در حیوانخانه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سمنان در شرایط کنترل شده درجه حرارت (۲۴-۲۲ درجه) و نور طبیعی (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنائی) نگهداری می شدند و آب و غذا آزادانه و به اندازه کافی در اختیار آنها قرار داشت.

##### دستگاه ماز آبی موریس

ماز آبی یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره آبی رنگ (۱۴۰ سانتی متر قطر و ۵۵ سانتی متر ارتفاع) بود که تا ارتفاع ۲۵ سانتی متری از آب ± ۲۲ درجه سانتی گراد پر شده بود. یک سکوی (با قطر ۱۱ سانتی متر) ۱ سانتی متر زیر سطح آب در مرکز یکی از چهار ربع شمال شرقی، جنوب شرقی، شمال غربی، جنوب غربی قرار داده شده بود. این سکو که فقط وسیله ای برای فرار حیوان از آب بود توسط یک پایه روی کف مخزن نگهداری می شد. اتافی که ماز در آن قرار داشت حاوی اجسام و علامت های اضافی تعبیه شده از قبیل پوستر،

و بلافاصله پس از جراحی برای جلوگیری از عفونت، پنی سیلین به میزان ۳۰۰۰۰-۱۵۰۰۰ 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 تزریق دارو

کورتیکواسترون (سیگما-آلمان) به میزان ۱ میلی گرم به عنوان بهترین دوز که در مطالعات قبلی به دست آمده است (۲، ۶ و ۷) به صورت سیستمیک و داخل صفاقی تزریق شد. همچنین نالتروکسان (سیگما-آلمان) به عنوان آنتاگونیست سیستم اوبیوئیدی به میزان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میکرولیتر به ازای هر طرف و توسط سرنگ هامپتون از طریق کانول‌های راهنما در گروه‌های آزمایشی متفاوت بر طبق گروه‌های پیش‌بینی شده تزریق شد. تزریق با سرعت ۰/۵ میکرولیتر در مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت و سوزن تزریق به مدت ۲ دقیقه برای جلوگیری از پس زدن مایع در داخل کانول مانده و سپس خارج می‌شد.

لازم به ذکر است برای ارزیابی روند تثبیت، کورتیکواسترون بلافاصله بعد از آخرین مرحله آموزش به صورت داخل صفاقی و هم‌زمان نالتروکسان در دوزهای مطرح شده به داخل هیپوکامپ تزریق شد و برای ارزیابی روند به خاطر آوری کورتیکواسترون ۳۰ دقیقه قبل از تست ارزیابی به خاطر آوری به صورت داخل صفاقی و نالتروکسان در دوزهای مطرح شده ۶۰ دقیقه قبل از ارزیابی به خاطر آوری به داخل هیپوکامپ تزریق شد. ضمناً حلال کورتیکواسترون پروپیل گلیکول و حلال نالتروکسان سالین بود.

### آزمایش‌ها و گروه‌های آزمایشی

**آزمایش ۱:** برای ارزیابی نقش سیستم اوبیوئیدی در اثرات کورتیکواسترون بر تثبیت یادگیری در مدل ماز آبی موریس آزمایش زیر انجام شد. ۶۰ سر موش به شش گروه زیر تقسیم شدند: الف) گروه ۱: بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک حلال دارو را دریافت کردند و هم‌زمان سالین در داخل هیپوکامپ آنها تزریق شد.

ب) گروه ۲: بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک کورتیکواسترون با دوز ۱ میلی گرم دریافت کردند و هم‌زمان سالین در داخل هیپوکامپ آنها تزریق شد.

ج) گروه ۳ و ۴: بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک حلال دارو را دریافت کردند و هم‌زمان نالتروکسان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در داخل هیپوکامپ آنها تزریق شد.

د) گروه‌های ۵ و ۶: بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک کورتیکواسترون با ۱ میلی گرم دریافت کردند و هم‌زمان نالتروکسان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در داخل هیپوکامپ آنها تزریق شد.

**آزمایش ۲:** برای ارزیابی نقش سیستم اوبیوئیدی در اثرات کورتیکواسترون بر به خاطر آوری یادگیری در مدل ماز آبی موریس آزمایش زیر انجام شد. ۶۰ سر موش به شش گروه زیر تقسیم شدند:

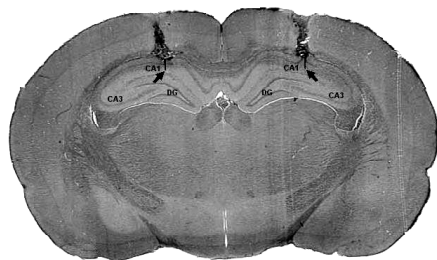
الف) گروه ۱: که به ترتیب ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطر آوری سالین در داخل هیپوکامپ آنها تزریق شد و به طور سیستمیک حلال دارو دریافت نمودند.

ب) گروه ۲: که به ترتیب ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطر آوری سالین در داخل هیپوکامپ آنها تزریق شد و به طور سیستمیک

کورتیکواسترون با دوز ۱ میلی گرم دریافت نمودند. ج) گروه ۳ و ۴: که به ترتیب ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطر آوری نالتروکسان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در داخل هیپوکامپ آنها تزریق شد و به طور سیستمیک حلال دارو دریافت نمودند. د) گروه‌های ۵ و ۶: که به ترتیب ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطر آوری نالتروکسان ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در داخل هیپوکامپ آنها تزریق شد و به طور سیستمیک کورتیکواسترون با دوز ۱ میلی گرم دریافت نمودند.

### روش بررسی بافت‌شناسی

در پایان آزمایش‌ها موش‌ها با کتامین دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس مغز موش از جمجمه خارج و برای ۴ روز در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. آنگاه برش‌های ۴۰ میکرومتری تهیه و با کریسیل ویوله رنگ آمیزی و جهت بررسی محل قرار گرفتن کانول زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. نتایج به دست آمده از حیواناتی که محل کانول در آنها درست نبود در تحلیل آماری استفاده نشد (شکل ۱).



شکل ۱: یک عکس بافت‌شناسی از مغز موش که محل کانول راهنما و تزریق را در ناحیه خلفی هیپوکامپ نشان می‌دهد

### روش بررسی آماری

داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه و تست توکی ارزیابی شدند که  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و داده‌های بارهای آموزش، مسافت و درصد زمان طی شده به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین گزارش شد.

### یافته‌ها

#### نتایج مربوط به ارزیابی روند تثبیت

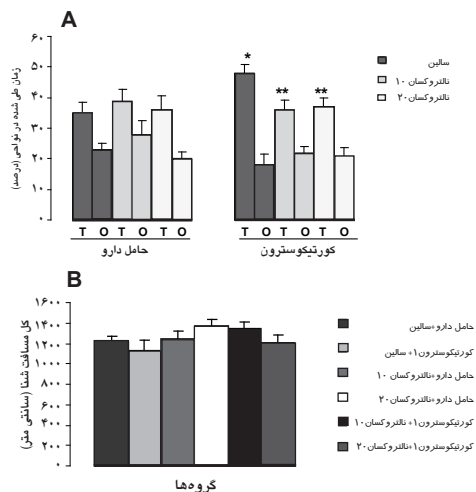
#### یافته‌های زمان آموزش

الف) Latency: شکل ۲A: گروه‌های مختلف را طی آموزش نشان می‌دهد. آنالیز واریانس حاکی از اثر معنی‌دار بارهای آموزش است. یافته‌های فوق نشان می‌دهد که با تکرار آموزش در دفعات متوالی، مدت زمان رسیدن به هدف کاهش می‌یابد.

ب) مسافت: شکل ۲B: مسافت طی شده در گروه‌های مختلف را طی آموزش نشان می‌دهد. آنالیز واریانس حاکی از اثر معنی‌دار دفعات آموزش است. که با تکرار آموزش مسافت طی شده برای رسیدن به هدف کاهش می‌یابد.

#### یافته‌های تست به خاطر آوری

الف) زمان گذرانده شده در ناحیه هدف و مخالف: شکل ۳A زمان گذرانده شده در ناحیه هدف و مخالف را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس دو طرفه حاکی از اثر معنی‌دار بین گروه‌ها است و تست توکی نشان داده است:



شکل ۳: اثر تزریق کورتیکوسترون به صورت سیستمیک و تزریق هم‌زمان نالتروکسان به داخل هیپوکامپ را بر روند تثبیت اطلاعات نشان می‌دهد. (A) ستون‌ها نمایانگر درصدی از زمان فاز ارزیابی هستند که در دو ناحیه هدف (T) و مخالف (O) گذرانده شده است. \* تفاوت بین گروه Sal+Vel با Sal+Cort در سطح ( $p < 0.01$ ) معنی‌دار است. \*\* تفاوت بین گروه Cort+Vel با Nalt+Cort در سطح ( $p < 0.05$ ) معنی‌دار است. B: ستون‌ها نمایانگر میانگین کل مسافت طی شده در طی فاز ارزیابی (تست Probe) هستند.

#### یافته‌های تست به خاطر آوری

الف) زمان گذرانده شده در ناحیه هدف و مخالف: شکل ۵A زمان گذرانده شده در ناحیه هدف و مخالف را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس دو طرفه حاکی از اثر معنی‌دار بین گروه‌ها است و تست توکی نشان داده است:

۱. زمان گذرانده شده ناحیه هدف در گروهی که کورتیکوسترون با دوز ۱ میلی گرم و سالین کرده‌اند نسبت به گروه کنترل که حلال دارو و سالین دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود ( $p < 0.01$ ).

۲. زمان سپری شده ناحیه هدف در حیواناتی که نالتروکسان در دوزهای مطرح شده همراه با کورتیکوسترون دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که کورتیکوسترون و سالین دریافت کرده بود به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ( $p < 0.01$ ).

ب) کل مسافت طی شده در ناحیه هدف و مخالف: آنالیز واریانس دو طرفه حاکی از اثر معنی‌دار بین گروه‌ها است و تست توکی نشان داد حیواناتی که کورتیکوسترون با دوز ۱ میلی گرم و سالین دریافت کرده‌اند نسبت به سایر گروه‌ها مسافت بیشتری را در ناحیه هدف پیموده‌اند و بقیه نتایج مشابه بخش الف در همین قسمت است (شکل نشان داده نشده است).

ج) کل مسافت طی شده طی تست Probe: نتایج کل مسافت طی شده در شکل ۵B نشان داده شده است. آنالیز واریانس دو طرفه حاکی از عدم تاثیر معنی‌دار بین گروه‌ها است بنابراین تزریق کورتیکوسترون و نالتروکسان بر فعالیت حرکتی حیوانات اثری نداشته است و تاثیر آنها بر فرآیند به خاطر آوری ناشی از اثر خالص دارویی بر میزان حافظه فضایی بوده است.

یافته‌های فوق نشان می‌دهد که گلوکوکورتیکوئیدها نقش مهمی در فرآیند تثبیت و به خاطر آوری یادگیری بازی می‌کنند و احتمالاً سیستم اپیوئیدی در این نقش با گلوکوکورتیکوئیدها اثر متقابل دارد.

۱. زمان گذرانده شده در ناحیه هدف در گروهی که کورتیکوسترون با دوز ۱ میلی گرم و سالین دریافت کرده‌اند نسبت به گروه کنترل که حلال دارو و سالین دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده بود ( $p < 0.01$ ).

۲. زمان سپری شده در ناحیه هدف در حیواناتی که نالتروکسان در دوزهای مطرح شده همراه با کورتیکوسترون دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که کورتیکوسترون و سالین دریافت کرده بود به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ( $p < 0.05$ ).

ب) کل مسافت طی شده در ناحیه هدف و مخالف: آنالیز واریانس دو طرفه حاکی از اثر معنی‌دار بین گروه‌ها است و تست توکی نشان داد حیواناتی که کورتیکوسترون با دوز ۱ میلی گرم و سالین دریافت کرده‌اند نسبت به سایر گروه‌ها مسافت بیشتری را در ناحیه هدف پیموده‌اند که بقیه نتایج، مشابه بخش الف در همین قسمت است (شکل نشان داده نشده است).

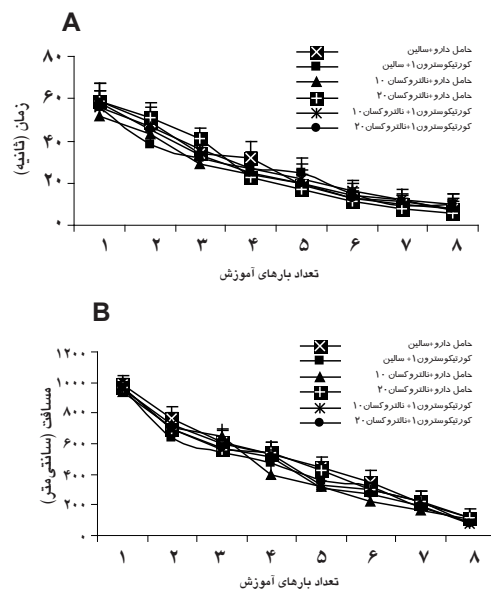
ج) کل مسافت طی شده در طی تست Probe: نتایج کل مسافت طی شده در شکل ۳B نشان داده شده است. آنالیز واریانس یک طرفه حاکی از عدم اثر معنی‌دار بین گروه‌ها است بنابراین تزریق کورتیکوسترون و نالتروکسان بر فعالیت حرکتی حیوانات اثری نداشته است و تاثیر آنها بر فرآیند تثبیت ناشی از اثر خالص دارویی بر میزان حافظه فضایی بوده است.

#### نتایج مربوط به ارزیابی روند به خاطر آوری

##### یافته‌های زمان آموزش

الف) Latency: شکل ۴A Latency گروه‌های مختلف را طی آموزش نشان می‌دهد. آنالیز واریانس حاکی از اثر معنی‌دار روزهای آموزش است. یافته‌های فوق نشان می‌دهد با تکرار آموزش در روزهای متوالی، زمان رسیدن به هدف کاهش می‌یابد.

ب) مسافت: شکل ۴B مسافت طی شده در گروه‌های مختلف را طی آموزش نشان می‌دهد. آنالیز واریانس حاکی از اثر معنی‌دار روزهای آموزش است. با تکرار آموزش، مسافت طی شده برای رسیدن به هدف کاهش می‌یابد.



شکل ۴: منحني یادگیری حیوانات در طی دفعات آموزش در ارزیابی روند تثبیت حافظه را نشان می‌دهد. (A) میانگین زمان رسیدن به هدف، (B) میانگین مسافت طی شده در طی دفعات آموزش

وقتی ۳۰ دقیقه قبل از کورتیکوسترون انجام می‌شود مانع تاثیر آن بر به خاطر آوری اطلاعات می‌شود. این یافته‌ها با نتایج مطالعات قبلی ما در مدل‌های یادگیری احترازی غیرفعال هم‌خوانی دارد (۶). همچنین بررسی داده‌ها طی مراحل آموزش نشان می‌دهد همه حیوانات از یک روند یادگیری نسبتاً مطلوبی برخوردار بوده‌اند و ضمناً بررسی مسافت طی شده توسط حیوانات در طی مرحله پروب نشان می‌دهد تزریق داروها بر فعالیت حرکتی حیوانات تاثیر معنی‌داری نداشته است. این نکته بیانگر آن است که تزریق داروها بر فعالیت حرکتی حیوان بی‌اثر و تغییرات روند یادگیری، ناشی از اثرات خالص داروها بر این روند بوده است.

#### مکانیسم‌های احتمالی اثرات کورتیکوسترون بر تثبیت و به خاطر آوری حافظه

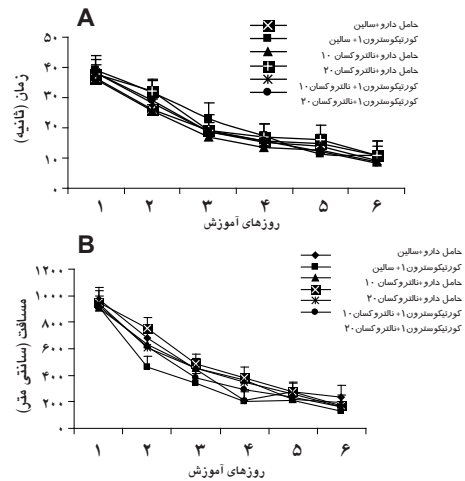
مطالعات قبلی نشان داده است که ناحیه خلفی هیپوکامپ حاوی تراکم بالایی از گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی است (۵) و داروهای تزریق شده از طریق تغییر فعالیت این گیرنده‌ها بر ذخیره حافظه اثر گذاشته‌اند. نتایج این مطالعه شواهد دیگری مبنی بر نقش گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید هیپوکامپ در تعدیل ذخیره حافظه فضایی ارائه می‌کند و با یافته‌های مطالعات قبلی مبنی بر دخالت گیرنده گلوکوکورتیکوئید هیپوکامپ در ذخیره حافظه در دیگر مدل‌های یادگیری (احترازی غیرفعال) هم‌خوانی دارد (۱۰). یافته‌های مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژی نشان داده‌اند که اثرات ناشی از گلوکوکورتیکوئیدها بر روی یادگیری و ذخیره حافظه به طور مستقیم و موضعی واسطه‌گری می‌شود (۱) و گلوکوکورتیکوئیدها اعمال مغزی و رفتاری را با مکانیسم‌های مختلفی تعدیل می‌کنند. اگر چه طبق تئوری رایج اثرات کلاسیک آنها با عبور از غشای سلول و فعال کردن گیرنده‌های درون سلولی باعث تعدیل بیان ژن و سنتز پروتئین در بافت‌های هدف می‌شوند که این عمل به فاکتورهای نسخه‌برداری وابسته است (۱۱).

دو نوع گیرنده داخل سلولی برای کورتیکوستروئیدها وجود دارد: گیرنده‌های میتروکورتیکوئیدی و گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی، گیرنده‌های GR میل ترکیبی پایینی برای کورتیکوسترون دارند و طی استرس و در پیک ریتیم‌های شبانه‌روزی (زمان بالا بودن گلوکوکورتیکوئیدهای خون) اشغال می‌شوند. در مقابل، میل ترکیبی گیرنده‌های MR برای کورتیکوسترون ۱۰ برابر بیشتر از گیرنده‌های GR است و این گیرنده‌ها در غلظت‌های پایه گلوکوکورتیکوئیدها اشباع می‌شوند (۱۲).

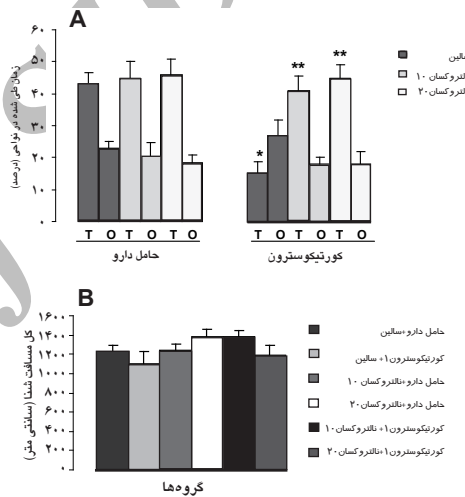
از طرفی علاوه بر مکانیسم‌های ژنی، مطالعات جدید نشان می‌دهد گلوکوکورتیکوئیدها از طریق مکانیسم‌های غیروابسته به ژن و گیرنده‌های واقع در غشای سلول باعث بروز اثرات سریع می‌شوند (۱۳). با توجه به بروز سریع اثر کورتیکوسترون بر به خاطر آوری حافظه، به نظر می‌رسد مکانیسم‌های غیرژنی دخالت دارند. شواهدی وجود دارد که کورتیکوسترون با سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری در مغز از جمله سیستم دوپامینرژیک (۸)، نورآدرنرژیک و اپیوئیدی (۱۳) از طریق گیرنده‌های غشایی تعامل دارد.

#### مکانیسم احتمالی اثرات متقابل نالتروکسان و کورتیکوسترون بر تثبیت و به خاطر آوری حافظه

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از آنتاگونیست کلاسیک گیرنده‌های اپیوئیدی در ناحیه خلفی هیپوکامپ مانع تاثیر کورتیکوسترون بر تثبیت و به خاطر آوری اطلاعات می‌شود



شکل ۴: منحنی یادگیری حیوانات در طی روزهای آموزش در ارزیابی بخاطر آوری حافظه را نشان می‌دهد. (A) میانگین زمان رسیدن به هدف، (B) میانگین مسافت طی شده در طی روزهای آموزش



شکل ۵: اثر تزریق کورتیکوسترون به صورت سیستمیک و تزریق هم‌زمان نالتروکسان به داخل هیپوکامپ بر روند به خاطر آوری اطلاعات (الف) ستون‌ها نمایان‌گر درصدی از زمان فاز ارزیابی هستند که در دو ناحیه هدف (T) و مخالف (O) گذرانده شده است. \* تفاوت بین گروه Sal+Cort با Sal+Vel در سطح (p<0/01) معنی‌دار است. \*\* تفاوت بین گروه Cort+Vel با Nalt+Cort در سطح (p<0/001) معنی‌دار است. (ب) ستون‌ها نمایان‌گر میانگین کل مسافت طی شده در طی فاز ارزیابی (تست Probe) است.

#### بحث

مهم‌ترین یافته‌های این مطالعه عبارتند از:

۱. تزریق آگونیست گلوکوکورتیکوئید (کورتیکوسترون) بلافاصله بعد از آموزش به طور سیستمیک (داخل صفاقی) سبب تقویت تثبیت اطلاعات فضایی تازه آموخته شده در مدل ماز آبی موریس می‌شود و تزریق هم‌زمان آنتاگونیست اپیوئیدی (نالتروکسان) به داخل هیپوکامپ مانع تاثیر کورتیکوسترون شده است.
۲. تزریق آگونیست گلوکوکورتیکوئید (کورتیکوسترون) ۳۰ دقیقه قبل از تست به خاطر آوری سبب اختلال در به خاطر آوری اطلاعات تازه آموخته شده در مدل یادگیری ماز آبی موریس شده و تزریق آنتاگونیست اپیوئیدی (نالتروکسان) به داخل هیپوکامپ

تنظیم می کنند. ج) گلوکوکورتیکوئیدها بیان ژن دینورفین را تنظیم می کنند. د) روی نورون های حاوی پپتیدهای اپیوئیدی گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی وجود دارد (۱۶).

۲. در مطالعات انسانی و حیوانی بعضی از جنبه های جدید محیط آزمایش موجب برانگیختگی می شود و این برانگیختگی مسئول وقوع آثار مثبت و منفی گلوکوکورتیکوئیدها بر فازهای مختلف حافظه هستند. بنابراین، امکان دارد نالتروکسان با بلوک این برانگیختگی، اثرات مخرب کورتیکوسترون بر به خاطر آوری را بلوک کند (۱۷).

۳. امکان دارد کورتیکوستروئیدها و اپیوئیدها بر روی نورون دیگری با یکدیگر هم گرایی داشته باشند و اثرات خود را از طریق این نورون سوم اعمال کنند (۱۸). دیده شده است که کورتیکوسترون و اپیوئیدها در آمیگدال، رهاسدن نوراپی نفرین را تنظیم می کنند و برخی از مطالعات گزارش کرده اند که اثرشان را بر تثبیت حافظه از این طریق اعمال می کنند (۱۹).

### نتیجه گیری

به طور کلی این مطالعه نشان می دهد فعال شدن گیرنده گلوکوکورتیکوئید در ناحیه هیپوکامپ نقش مهمی در تثبیت و به خاطر آوری اطلاعات بازی می کند و احتمالاً سیستم اپیوئیدی برای اجرای این اثر نقش تعدیل کننده مهمی دارد. البته برای تعیین نوع گیرنده های اپیوئیدی و سیستم های نوروترانسمیتری دیگر و اثرات متقابل با نواحی دیگر مطالعات بیشتری لازم است.

### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از آقای دکتر صالحی و کلیه همکاران مرکز تحقیقات فیزیولوژی سمنان به ویژه آقایان صادقی و علی محمدی که در انجام این پژوهش همیار ما بودند تقدیر و تشکر به عمل می آید.

### References

- Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Bures J, Sharifi MR, and Fenton AA. Glucocorticoid antagonist administration into the basolateral amygdala modulates place avoidance memory, DARU 2000; 8(1, 2): 30-36
- Khaksari M, Rashidy-Pour A, Vafaei AA. Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone induced impairment of memory retrieval in rats, Neuroscience 2007; 149: 729-738
- Roosendaal B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. Neurobiol Learn Mem 2002; 78: 578-595
- Roosendaal 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): 249-255
- Roosendaal B, Griffith QK, Buranday J, de Quervain DJF, McGaugh JL. The hippocampus

که با نتایج برخی از مطالعات قبلی هم خوانی دارد. نتایج آزمایش های قبلی ما نشان داد که تزریق محیطی نالتروکسان، اثرات تخریبی کورتیکوسترون و استرس بر به خاطر آوری حافظه طولانی مدت را در مدل مهار اجتنابی بلوک می کند (۶). همچنین تزریق نالتروکسان به داخل هیپوکامپ آثار مخرب کورتیکوسترون بر به خاطر آوری حافظه فضایی در مدل یادگیری احترازی غیرفعال را بلوک می کند (۷). بنابراین، سیستم اپیوئیدی هیپوکامپ در اثرات مخرب کورتیکوسترون بر به خاطر آوری نقش دارد.

یکی از مکانیسم احتمالی تعامل بین این دو سیستم این است که کورتیکوسترون و نالتروکسان برای اشغال یک گیرنده با یکدیگر رقابت می کنند و دیده شده است که تزریق نالتروکسان مدت کوتاهی قبل از کورتیکوسترون گیرنده ها را بلوک کرده و مانع از عمل کورتیکوسترون می شود. شاهد تایید این موضوع وجود و شناسایی یک نوع گیرنده غشایی برای گلوکوکورتیکوئیدها در مغز یک نوع سمندر (*Taricha granulosa*) است که یک نوع گیرنده متصل به G-protein بوده و مسئول تاثیر سریع کورتیکوسترون بر رفتارهای تولیدمثلی و فعالیت عصبی حیوان است. مطالعات نوروشیمی نشان داده است که این گیرنده قادر است به کورتیکوسترون و کورتیزول اتصال یابد و همچنین قادر به شناسایی لیگاند های اپیوئیدی خاص نظیر داینورفین و نالتروکسان است و این لیگاندها برای اشغال گیرنده با یکدیگر رقابت می کنند (۱۴). همچنین نشان داده شده که آگونیست های اختصاصی و آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده کاپاپیوئیدی قادر به رقابت با کورتیکوسترون برای اشغال این گیرنده اند. بنابراین، احتمالاً اثرات بلوک کنندگی نالتروکسان بر اثرات مخرب کورتیکوسترون بر به خاطر آوری از طریق اشغال این گیرنده و ممانعت اثر کورتیکوسترون اعمال می شود (۱۵).

سایر مکانیسم های احتمالی عبارتند از: ۱. کورتیکوسترون با فعال کردن سیستم اپیوئیدی داخلی، اثرات خود را اعمال می کند. این فرضیه با یافته های زیر حمایت می شود. الف) پپتیدهای اپیوئیدی و گیرنده های اپیوئیدی در هیپوکامپ بیان می شود. ب) فعال شدن گیرنده های اپیوئیدی تقویت طولانی مدت و حافظه فضایی را

mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: Dependence on the basolateral amygdala. Proc Natl Acad Sci 2003; 100: 1328-1333

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; 154:193-198

7. Sajadi AA, Samaei SA, Rashidy-pour A. Blocking effects of intra-hippocampal naltrexone microinjections on glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval in rat. Neuropharm 2006; 21: 1-8

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: 300-306

9. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5ed, Elsevier Academic

Press, Orlando, 2005: 58-59

10. Roozendaal B. Glucocorticoids and their regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 2000; 25: 213-23

11. Akirav I, Kozenicky M, Tal D, Sandi C, Venero C, Richter-Levin GA. Facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learn Mem* 2004; 11: 188-195

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: 67-74

13. Chen YZ, Qiu J. Possible consequence of nongenomic action of glucocorticoids in neural cells. *News Physiol. Sci* 2001; 16: 292-296

14. Evans SJ, Searcy BT, Moore FL. Subset of Kappa opioid Ligands Bind to the Membrane Glucocorticoid Receptor in an Amphibian Brain. *Endocrinol* 2000; 141: 2294-2300

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*. *Molecular Endocrinol* 2005; 4: 809-823

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: 809-820

17. Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid's effects on object recognition memory requires training-associate emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 853-858

18. Belanoff JK, Gross K, Yagar A, Schatzberg AF. Corticosteroids and cognition. *J Psycy Res* 2001; 35: 127-145

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: 134-140

Archive of SID