بررسی اثرات تزریق محیطی و داخل هیپوکمپی سیگلوهگزامید به عنوان مهارگر سنتز پروتئین بر بازتثبیت تأخیری حافظه احترازی غیر فعال در موش بزرگ آزمایشگاهی

رویا ملک‌لو[۱] (M.sc)، علی رشیدی‌پور[*۱] (Ph.D)، عباسعلی وفایی[۱] (Ph.D)، حمیدرضا ثامنی[۲] (Ph.D)

۱- *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، آزمایشگاه یادگیری و حافظه*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و گروه علوم تشریح*

چکیده

سابقه و هدف: فعال‌سازی حافظه‌های تثبیت شده، موج دوم تحکیم حافظه موسوم به بازتثبیت حافظه را فعال می‌کند. اخیراً، فرایند تثبیت تاخیری حافظه نیز پیشنهاد شده است که حاکی از وجود یک دوره تاخیری تثبیت حافظه بعد از یادگیری است. این فرایند به تولید پروتیین در مغز، به‌ویژه در هیپوکمپ وابسته است. هدف این مطالعه بررسی وجود فرایند احتمالی بازتثبیت تاخیری وابسته بعد از فعال‌سازی یک حافظه تثبیت شده و وابستگی آن به سنتز پروتیین، به‌ویژه در هیپوکمپ بود. هم‌چنین، مقاومت حافظه‌ها به سن‌های مختلف در برابر آسیب توسط مهارگرهای سنتز پروتیین بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی نر از نژاد ویستار در دستگاه احترازی غیر فعال (۱ میلی‌آمپر- ۳ ثانیه) آموزش داده شدند. در آزمایش اول، در گروه‌های مجزا در فاصله زمانی ۱۵ دقیقه قبل از فعال‌سازی و ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از فعال‌سازی حافظه، تزریق داخل صفاقی سیکلوهگزامید انجام شد. در آزمایش دوم، اثرات تزریق محیطی سیکلوهگزامید بر بازتثبیت تأخیری به موازات افزایش سن حافظه در گروه‌های با سن حافظه ۷، ۱۴، ۲۸ و ۵۶ روز انجام شد. در آزمایش سوم، اثرات داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید بر بازتثبیت تأخیری حافظه ارزیابی شد و در آزمایش آخر، اثرات تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید بر بازتثبیت تأخیری به موازات افزایش سن حافظه در گروه‌های با سن حافظه ۷، ۱۴، ۲۸ و ۵۶ روز بررسی شد. در تمام این آزمایش‌ها، بررسی تست حافظه در ۲ و ۷ روز بعد از فعال‌سازی حافظه انجام شد.

یافته‌ها: تزریق سیستمیک سیکلوهگزامید در زمان ۱۵ دقیقه قبل از فعال‌سازی و ۳، ۶، ۲۴ ساعت بعد از فعال‌سازی بر بازتثبیت حافظه ترس اثر معنی‌داری ندارد، ولی تزریق آن ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی، بازتثبیت حافظه ترس را مختل نمود. با افزایش سن حافظه، اثر آن دیده نشد. تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید اثر مختل‌کنندگی مشابه‌ای داشت. این اثر روی حافظه ۷ روزه نیز مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند که سنتز پروتئین، به‌ویژه در هیپوکمپ برای بازتثبیت تاخیری حافظه ضروری است. با گذشت زمان، بازتثبیت تاخیری حافظه‌ها نسبت به عوامل تخریب‌گر مقاومت بیش‌تری پیدا می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: سنتز پروتئین، سیکلوهگزامید، ناحیه خلفی هیپوکمپ، بازتثبیت تأخیری حافظه، حافظه احترازی غیر فعال

مقدمه

به‌دنبال فراخوانی حافظه و فعال شدن آن، حافظه فعال شده می‌تواند طی یک فرآیند وابسته به ساخت پروتئین، مجدداً تثبیت شود که به این روند "بازتثبیت" گویند و یا اینکه به فراموشی سپرده شده و توسط اطلاعات جدیدی جایگزین گردد که به آن "خاموشی" اطلاق می‌شود. چنانچه زمان به‌خاطرآوری طولانی باشد، پدیده خاموشی غالب است و حافظه قدیمی پاک می‌شود و اگر زمان فعال‌سازی حافظه کوتاه باشد، فرآیند باز تثبیت غالب است. شواهد جدید نشان می‌دهند که بین مکانیسم‌های پدیده تثبیت و بازتثبیت حافظه

*نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۴۵۱۳۳۶ - ۰۲۳ Email: Rashidy-pour@semums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸

Archive of SID
www.SID.ir

شباهت و تفاوت‌هایی وجود دارد. اهمیت بازتثبیت احتمالاً افزایش قدرت و شدت حافظه اولیه و به روز در آوردن آن است [۶-۱].

مطالعات جدید نشان می‌دهند که بعد از اکتساب حافظه، یک دوره زمانی تأخیری وجود دارد که در این دوره زمانی، تولید پروتئین برای ماندگاری، و نه تشکیل حافظه بلندمدت ضروری است، این مرحله، تثبیت تأخیری نامیده می‌شود [۷]. چندین مولکول از قبیل c-fos, Zif268, BDNF, ... و نیز سنتز پروتیین در تثبیت تأخیری نقش دارند و تغییر فعالیت آن‌ها می‌تواند منجر به افزایش و یا اختلال ماندگاری حافظه بلندمدت شود [۸-۱۲].

مطالعات جدید همچنین نشان می‌دهند که بعد از فعال‌سازی حافظه یک مرحله بازتثبیت تأخیری نیز وجود دارد که در طی آن ماندگاری حافظه تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۱۳]، ولی مشخص نیست که حافظه بلندمدت فعال شده، آیا نیازمند فرآیند تأخیری سنتز پروتئین هست یا نه؟ و اگر نیازمند سنتز پروتئین باشد وابستگی زمانی آن چگونه است؟ به عبارت دیگر چه مدت زمان بعد از فعال‌سازی حافظه، سنتز پروتئین برای بازتثبیت حافظه ضروری می‌باشد. از این‌رو یکی از اهداف اصلی این مطالعه، تعیین نقش سنتز پروتئین بر بازتثبیت تأخیری در زمان‌های مختلف (۱ ساعت، ۳ ساعت، ۶ ساعت، ۱۲ ساعت و ۲۴ساعت) بعد از فعال‌سازی حافظه است. از طرف دیگر، مطالعات نشان می‌دهند که با افزایش سن حافظه، میزان تأثیرپذیری آن از محرک‌های مختلف مانند عوامل فارماکولوژیک تغییر پیدا می‌کند. برای مثال، نشان داده شده است که با افزایش سن حافظه مقاومت آن‌ها در برابر اثرات مخرب مهارگرهای سنتز پروتئین زیاد می‌شود [۱۴-۱۶]. بنابراین، این احتمال وجود دارد که میزان تأثیرپذیری مرحله بازتثبیت تأخیری از مهار سنتز پروتئین، با افزایش سن حافظه کاهش پیدا کند، یعنی هر چه سن حافظه افزایش پیدا می‌کند، میزان مقاومت آن به مهارگرهای سنتز پروتئین زیاد می‌شود. از این رو، یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی میزان مقاومت مرحله بازتثبیت تأخیری به اثرات مخرب مهارگرهای سنتز پروتئین به موازات افزایش سن حافظه است. نهایتاً مطالعات گذشته نشان داده‌اند که هیپوکمپ نقش مهمی در بازتثبیت حافظه بازی می‌کند [۱۸،۱۷]، ولی نقش سنتز پروتئین در هیپوکمپ، در بازتثبیت تأخیری حافظه مشخص نیست، از این رو، یکی دیگر از اهداف این مطالعه، بررسی نقش هیپوکمپ پشتی در بازتثبیت تأخیری حافظه است.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی. در این تحقیق از موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی بالغ از نژاد ویستار استفاده شد. موش‌ها در یک چرخه شبانه‌روزی دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی و هم‌چنین دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و و آب و غذا آزادانه به جزء در زمان آزمایش‌ها در دسترس آن‌ها قرار داشت.

روش کانول‌گذاری در هیپوکمپ. پس از بی‌هوش نمودن حیوان با داروی کتامین (۷۰-۶۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم به صورت داخل صفاقی) و زایلازین (۱۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و برداشتن نسوج سطحی جمجمه، جمجمه موش در دستگاه استریوتاکسی فیکس گردید. سپس با استفاده از اطلس Paxinos & Watson [۱۹] و دستگاه استریوتاکسی، مختصات نقطه مورد نظر در هیپوکمپ (ML=±۲/۵, DV=۲ ,AP=-۴/۲) مشخص شد و با کمک مته دستی سوراخی در این نقطه در جمجمه حیوان ایجاد شد. در مرحله بعدی، کانول راهنما از جنس استیل که از قبل طبق مختصات مورد نظر آماده شده بود درون مغز موش قرار گرفت و با کمک پیچ ظریف عینک و اکریل دندان‌پزشکی فیکس شد. برای باز نگه داشتن کانول‌ها از ماندرن مسی که به روغن معدنی آغشته شده استفاده شد. بلافاصله پس از جراحی جهت جلوگیری از عفونت، پنی‌سیلین جی به میزان ۱۵۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ واحد بین‌المللی به صورت عضلانی تزریق شد. 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 شد. در پایان آزمایش‌ها موش‌ها

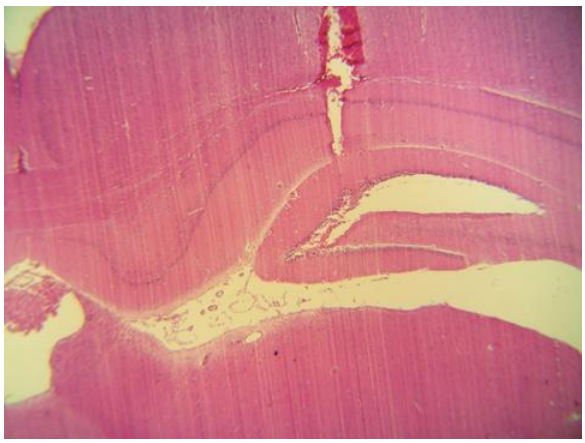
Archive of SID
www.SID.ir

با داروی کتامین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بی‌هوش شدند. پس از آن مغز موش از جمجمه خارج و برای چند روز در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. سپس برش‌های ۴۰ میکرومتری تهیه و با کریسال ویولت رنگ‌آمیزی و جهت بررسی محل قرار گرفتن کانول و تزریق در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شده و سپس با مقایسه و مشاهده نوع بافت با کمک اطلس رت پاکسینوس و واتسون (اطلس مذکور از ابعاد مختلف و بر اساس برش‌های مغزی هسته‌های مختلف را مورد ارزیابی قرار می‌دهد) محل کانول و تزریق دارو شناسایی و بررسی شد (شکل ۱).

یادگیری احترازی غیر فعال.

الف- دستگاه احترازی غیر فعال: دستگاه یادگیری احترازی غیر فعال یک محفظه پلکسی‌گلاس مکعب مستطیل (شاتل باکس) با طول ۴۱ سانتی‌متر، عرض ۲۰ سانتی‌متر در قسمت بالا و ۲۰ سانتی‌متر در قسمت کف و ۲۰ سانتی‌متر ارتفاع می‌باشد. دستگاه توسط یک درب گیوتینی‌به دو قسمت روشن به طول ۱۹ سانتی‌متر و تاریک ۲۰ سانتی‌متر تقسیم می‌شود. در کف هر دو بخش میله‌های ضد زنگ به فاصله یک سانتی‌متر از هم قرار دارند و کف قسمت تاریک دستگاه به یک مدار الکتریکی وصل می‌شود که با روشن شدن کلید مدار، جریان الکتریکی با مدت، شدت و فرکانس مشخص از کف آن عبور می‌کند. دستگاه در یک محل بدون صدا و رفت و آمد قرار می‌گیرد.

ب- آموزش یادگیری احترازی غیر فعال: سازش‌یافتن: هر موش ابتدا در قسمت روشن دستگاه پشت به درب قرار داده شد و وقتی که موش به طرف درب می‌چرخید درب باز می‌شد و اجازه داده می‌شد تا حیوان وارد قسمت تاریک شود. بلافاصله درب بسته می‌شد و حیوان پس از چند ثانیه از قسمت تاریک گرفته و به قفس بازگردانیده می‌شد.



شکل ۱: محل تزریق را در ناحیه خلفی هیپوکمپ نشان می دهد.

آموزش (اکتساب یادگیری): ۳۰ دقیقه بعد از سازش یافتن، اکتساب یادگیری انجام می‌شد. به دنبال وارد شدن موش به قسمت تاریک درب بسته شده و شوک‌الکتریکی با شدت ۱ میلی‌آمپر و به مدت ۳ ثانیه از طریق سیم‌های استیل تعبیه شده در کف قسمت تاریک به حیوان اعمال می‌شد.

تست به‌خاطرآوری. در زمان تست به‌خاطرآوری، حیوان در قسمت روشن پشت به درب قرار داده می‌شد و پس از چرخیدن موش به طرف درب، درب باز می‌شد. زمانی که طول می‌کشید تاحیوان برای اولین بار وارد قسمت تاریک شود (Step through latency, STL) به طور اتوماتیک توسط دستگاه محاسبه می‌شد.

تزریق دارو: تزریق محیطی سیکلوهگزامید به صورت داخل صفاقی با دوز ۲/۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم [۲۰] انجام شد. برای تزریق داخل هیپوکمپی ۴ و ۸ میکروگرم سیکلوهگزامید در یک میکرولیتر [۲۱] توسط پمپ و سرنگ هامیلتون از طریق کانول‌های راهنما تزریق گردید. تزریق با سرعت ۰/۵ میکرولیتر در مدت ۲دقیقه صورت گرفت و سوزن تزریق برای مدت ۳۰ ثانیه برای جلوگیری از پس زدن مایع در داخل کانول باقی ماند و سپس خارج گردید.

آزمایش‌ها

آزمایش ۱: هدف این آزمایش بررسی اثرات تزریق محیطی سیکلوهگزامید در زمان‌های مختلف بعد از فعال‌سازی

Archive of SID

www.SID.ir

حافظه بر بازتثبیت تأخیری بود (شکل ۲، بازه زمانی آزمایش). به این منظور موش‌ها به ۵ گروه زیر تقسیم شدند:

۱- گروه ۱۵- دقیقه

۲- گروه ۳ ساعت

۳- گروه ۶ ساعت

۴- گروه ۱۲ ساعت

۵- گروه ۲۴ ساعت

در هر گروه ۲۰ سر رت وجود داشت، که بعد از فعال‌سازی حافظه، نیمی از موش‌ها سالین و نیمی دیگر سیکلوهگزامید دریافت کردند. تست حافظه، ۲ روز و ۷ روز بعد از فعال‌سازی انجام شد. در گروه ۱، ۱۵ دقیقه قبل از فعال‌سازی حافظه، دارو تزریق شد.

آزمایش ۲: هدف این آزمایش بررسی اثرات تزریق محیطی سیکلوهگزامید بر بازتثبیت تأخیری به موازات افزایش سن حافظه بود (شکل۳،: بازه زمانی آزمایش). به این منظور موش‌ها به ۴ گروه زیر تقسیم شدند:

۱- گروه با سن حافظه ۷ روز (۷ روز از زمان آموزش می‌گذرد).

۲- گروه با سن حافظه ۱۴ روز (۱۴ روز از زمان آموزش می‌گذرد).

۳- گروه با سن حافظه ۲۸ روز (۲۸ روز از زمان آموزش می‌گذرد).

۴- گروه با سن حافظه ۵۶ روز (۵۶ روز از زمان آموزش می‌گذرد).

در هر گروه، در زمان به‌دست آمده از آزمایش ۱، بعد از فعال‌سازی حافظه، نیمی از موش‌ها سالین و نیمی دیگر سیکلوهگزامید دریافت کردند. تست حافظه، ۲ روز و ۷ روز بعد از فعال‌سازی انجام شد.

آزمایش۳: هدف این آزمایش بررسی اثرات تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید بر باز تثبیت تأخیری بود (شکل ۴، بازه زمانی آزمایش). به این منظور موش‌ها به ۳ گروه زیر تقسیم شدند:

۱- گروه سالین

۲- گروه سیکلوهگزامید ۴ میکروگرم در یک میکرولیتر

۳- گروه سیکلوهگزامید ۸ میکروگرم در یک میکرولیتر

در هر گروه، در زمان به‌دست آمده از آزمایش ۱ بعد از فعال‌سازی حافظه، نیمی از موش‌ها سالین و نیمی دیگر سیکلوهگزامید دریافت کردند. تست حافظه، ۲ روز و ۷ روز بعد از فعال‌سازی انجام شد.

آزمایش ۴: هدف این آزمایش بررسی اثرات تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید بر باز تثبیت تأخیری به موازات افزایش سن حافظه بود (شکل ۵. بازه زمانی آزمایش). به این منظور موش‌ها به ۴ گروه زیر تقسیم شدند:

۱- گروه با سن حافظه ۷ روز

۲- گروه با سن حافظه ۱۴ روز

۳- گروه با سن حافظه ۲۸ روز

۴- گروه با سن حافظه ۵۶ روز

در هر گروه، در زمان به‌دست آمده از آزمایش ۱ بعد از فعال‌سازی حافظه، نیمی از موش‌ها سالین و نیمی دیگر سیکلوهگزامید (مناسب‌ترین دوز به‌دست آمده از آزمایش ۳) دریافت کردند. تست حافظه، ۲ روز و ۷ روز بعد از فعال‌سازی انجام شد.

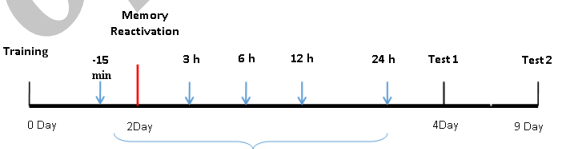
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها. توصیف اطلاعات به‌وسیله شاخص‌های میانگین و انحراف معیار و نمودارهای مناسب انجام شد. از آن‌جا که توزیع داده‌ها طبیعی بود از روش‌های پارامتریک (مدل آنالیز واریانس یک طرفه، دو طرفه، سه طرفه و تست Post-hoc توکی) استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ >P* و ۰/۰۱>P** در نظر گرفته شده است. اطلاعات به صورت میانگین ± خطای استاندارد از میانگین نشان داده شده است.

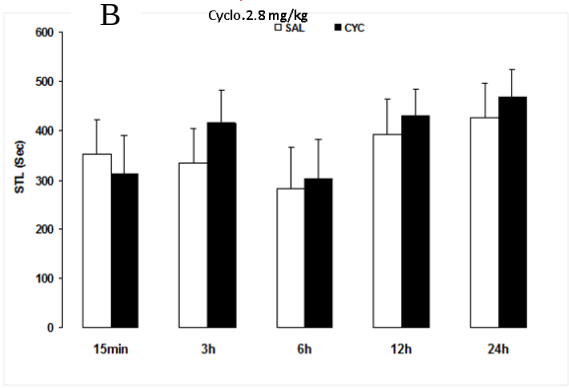
نتایج

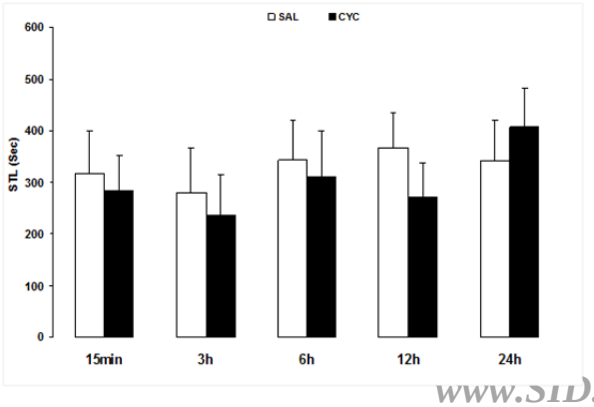
Archive of SID

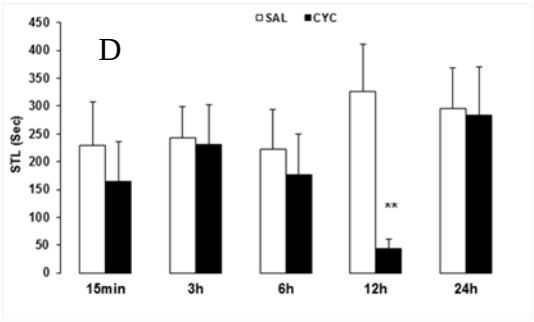
www.SID.ir

اثرات تزریق داخل صفاقی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین بر وابستگی بازتثبیت تأخیری حافظه به سنتز پروتئین. شکل ۲ (A، B ، C و D) اثرات تزریق داخل صفاقی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین بر وابستگی بازتثبیت (حافظه فعال شده) تأخیری حافظه به سنتز پروتئین نشان می‌دهد. آنالیز واریانس سه طرفه STL [تست‌ها × مداخله × گروه] با اندازه‌گیری تکراری حاکی از عدم اثر معنی‌دار گروه‌ها [$F_{1,160}$=۰/۷، P=۰/۴۱۳]، عدم اثر معنی‌دار مداخله [$F_{4,160}$=۱/۱، P=۰/۳۵۹]، اثر معنی‌دار تست‌ها [$F_{2,160}$=۰/۱۵، P<۰/۰۰۱] و عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و مداخله [$F_{4,160}$=۰/۵۶، P=۰/۶۸۹] و هم‌چنین عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و تست‌ها [$F_{2,160}$=۲/۰۴، P=۰/۱۳۲] و عدم تعامل معنی‌دار بین مداخله و تست‌ها[$F_{8,160}$=۰/۶۹، P=۰/۶۹۲]و عدم تعامل معنی بین سه متغیر فوق است [$F_{8,160}$=۰/۵۹، P=۰/۷۸۳].







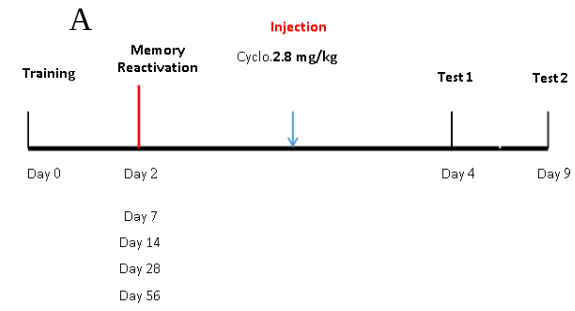


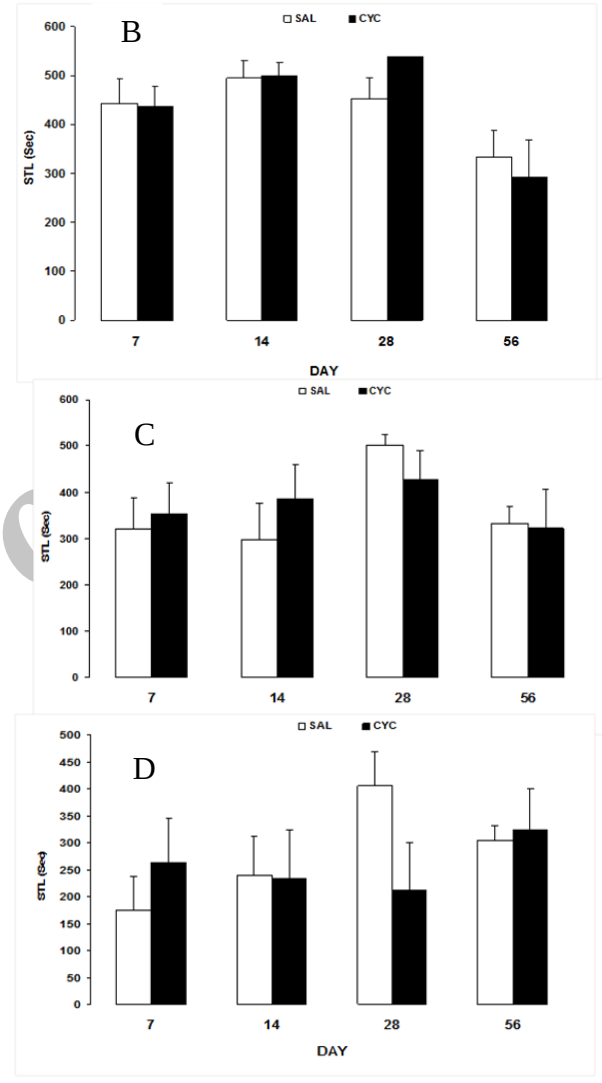
شکل ۲:اثرات تزریق داخل صفاقی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین بر وابستگی بازتثبیت تأخیری حافظه به سنتز پروتئین. A: بازه زمانی آزمایش، B: زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL) در زمان فعال‌سازی حافظه می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین زمان‌های مختلف وجود ندارد.C: زمان ورود حیوان به ناحیه تاریک (STL) دو روز بعد از فعال‌سازی حافظه (تست اول) می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین زمان‌های مختلف وجود ندارد.D: زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL) هفت روز بعد از فعال‌سازی حافظه (تست دوم) می‌باشد، که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری در گروه ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی حافظه وجود دارد (**P< 0.01).

اثرات متقابل تزریق داخل صفاقی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین و افزایش سن حافظه بر بازتثبیت تأخیری حافظه. شکل ۳ (A، B ، C و D) اثرات متقابل تزریق داخل صفاقی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین و افزایش سن حافظه بر بازتثبیت (حافظه فعال شده) تأخیری حافظه نشان می‌دهد. آنالیز واریانس سه طرفه STL [تست‌ها × مداخله × گروه] با اندازه‌گیری تکراری حاکی از عدم اثر معنی‌دار گروه‌ها[$F_{1,112}$=۰/۱۹، P=۰/۶۶۱]، اثر معنی‌دار مداخله [$F_{3,112}$=۳/۳۳، P=۰/۰۲۵]، اثر معنی‌دار تست‌ها [$F_{1,160}$=۲۴، P<۰/۰۰۰۱] و عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و مداخله [$F_{3,112}$=۰/۶۵، P=۰/۵۸۳] هم‌چنین عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و تست‌ها [$F_{2,112}$=۰/۰۲، P=۰/۹۷۶] و عدم تعامل معنی‌دار بین مداخله و تست‌ها[$F_{6,122}$=۱/۳، P=۰/۲۴۰] و تعامل معنی‌دار بین سه متغیر فوق است [$F_{1,160}$=۲/۲، P=۰/۰۴].

Archive of SID

www.SID.ir



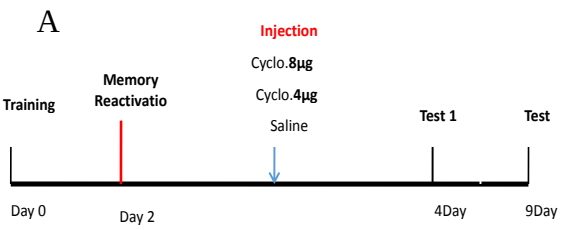


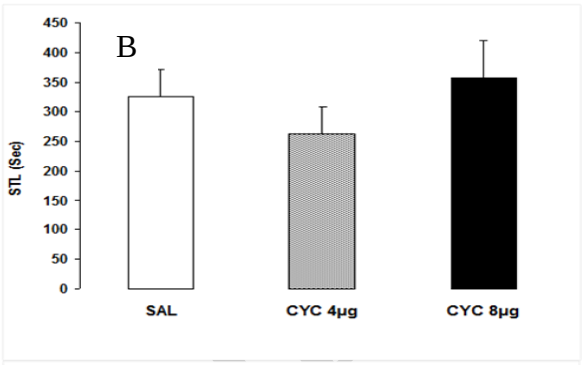
شکل ۳. اثرات متقابل تزریق داخل صفاقی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین و افزایش سن حافظه بر بازتثبیت تأخیری حافظه. A: بازه زمانی آزمایش، B: زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL) در زمان فعال‌سازی حافظه می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین زمان‌های مختلف وجود ندارد. C: زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL) دو روز بعد از فعال‌سازی حافظه (تست اول) می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین زمان‌های مختلف وجود ندارد. D: زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL)هفت روز بعد از فعال‌سازی حافظه (تست دوم) می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین زمان‌های مختلف وجود ندارد.

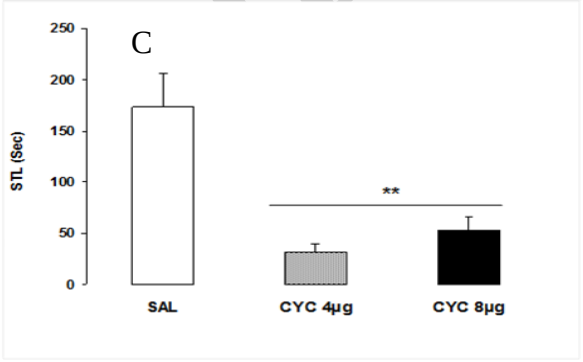
اثرات وابسته به دوز تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین بر بازتثبیت تأخیری حافظه. شکل‌های ۴ (A، B ، C و D) اثرات وابسته به دوز تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین بر بازتثبیت (حافظه فعال شده) تأخیری حافظه نشان می‌دهد. آنالیز واریانس دو طرفه STL [تست‌ها × گروه] با اندازه‌گیری تکراری حاکی از اثر معنی‌دار گروه‌ها [$F_{2,42}$=۸/۶، P=۰/۰۰۱]، اثر معنی‌دار تست‌ها[$F_{2,42}$=۴۸، P<۰/۰۰۰۱]و هم‌چنین عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و تست‌ها [$F_{4,42}$=۲/۱، P=۰/۰۹۷] است.

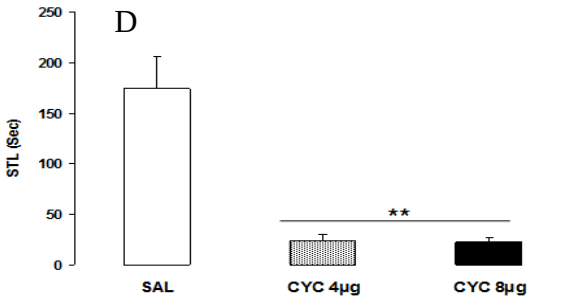
اثرات متقابل تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین و افزایش سن حافظه بر بازتثبیت تأخیری حافظه. شکل‌های ۵ (A، B ، C و D) اثرات متقابل تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین و افزایش سن حافظه بر بازتثبیت (حافظه فعال شده) تأخیری حافظه نشان می‌دهد. آنالیز واریانس سه طرفه STL [تست‌ها × مداخله × گروه] با اندازه‌گیری تکراری حاکی از عدم اثر معنی‌دار گروه‌ها [$F_{1,112}$=۱/۸، P=۰/۱۸۱]، اثر معنی‌دار مداخله [$F_{3,112}$=۲/۹، P=۰/۰۴۲]، اثر معنی‌دار تست‌ها [$F_{2,112}$=۴۸، P<۰/۰۰۰۱] و عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و مداخله [$F_{3,112}$=۱/۷، P=۰/۱۶۲] و عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و تست‌ها [$F_{2,112}$=۱/۸، P=۰/۱۶۵] و تعامل معنی‌دار بین مداخله و تست‌ها [$F_{6,112}$=۳/۸، P=۰/۰۰۱] و عدم تعامل معنی‌دار بین سه متغیر فوق است [$F_{6,112}$=۱/۰۴، P=۰/۳۹۹].

Archive of SID
www.SID.ir

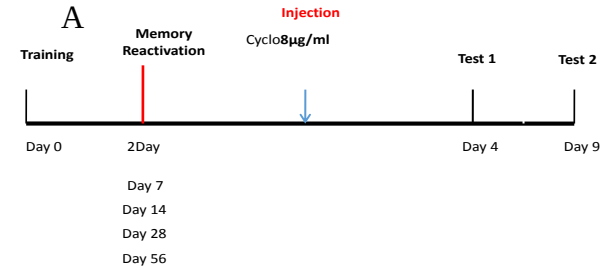


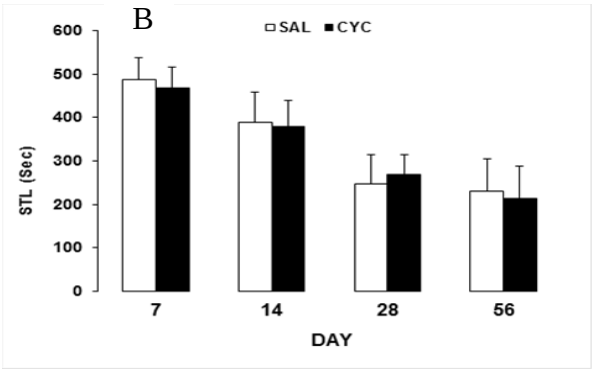


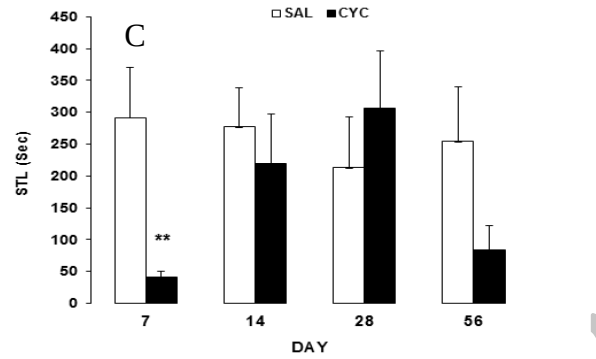


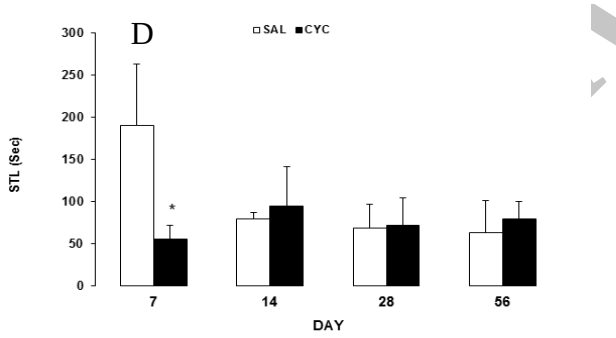


شکل ۴. اثرات وابسته به دوز تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین بر بازتثبیت تأخیری حافظه. A: بازه زمانی آزمایش، B: زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL)در زمان فعال‌سازی حافظه می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود ندارد.C:زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL) دو روز بعد از فعال‌سازی حافظه (تست اول) می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین گروه سالین و هر دو دوز سیکلوهگزامید وجود دارد (**P<0.01).D: زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL) هفت روز بعد از فعال‌سازی حافظه (تست دوم) می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین گروه سالین و هر دو دوز سیکلوهگزامید وجود دارد (**P<0.01).









شکل ۵. اثرات متقابل تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید به عنوان مهارکننده سنتز پروتئین و افزایش سن حافظه بر بازتثبیت تأخیری حافظه. A: بازه زمانی آزمایش(B) زمان ورود حیوان به ناحیه تاریک (STL) در زمان فعال‌سازی حافظه می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود ندارد. (C) زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL) دو روز بعد از فعال‌سازی حافظه (تست اول) می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری در گروه حافظه ۷ روزه وجود دارد (**P<0.01). (D) زمان ورودحیوان به ناحیه تاریک (STL) هفت روز بعد از فعال‌سازی حافظه (تست دوم) می‌باشد که نشان می‌دهد اثر معنی‌داری در گروه حافظه ۷ روزه وجود دارد (*P<0.05).

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های اصلی این مطالعه عبارتند از:

۱- تزریق سیستمیک سیکلوهگزامید در زمان‌های ۱۵ دقیقه قبل از فعال‌سازی ۳، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از فعال‌سازی بر بازتثبیت تأخیری حافظه ترس اثر معنی‌داری ندارد، ولی تزریق ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی موجب اختلال در بازتثبیت حافظه ترس می‌شود.

۲- اثرات تخریبی تزریق سیستمیک سیکلوهگزامید روی بازتثبیت تأخیری حافظه، ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی فقط در حافظه ۲ روزه دیده شد.

۳- تزریق سیستمیک سیکلوهگزامید ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی حافظه ۷، ۱۴، ۲۸ و ۵۶ روزه، اثر معنی‌داری بر بازتثبیت تأخیری حافظه ترس ندارد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که با افزایش سن حافظه بازتثبیت تأخیری آن‌ها نسبت به مهارگرهای سنتز پروتئین مقاوم می‌شود.

۴- تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید در دوزهای ۴ و ۸ میکروگرم، ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی منجر به اختلال بازتثبیت تأخیری حافظه ترس می‌شود که در دوز ۸ میکروگرم این اثر مشهودتر است.

۵- تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید با دوز ۸ میکروگرم ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی حافظه ۷ روزه، منجر به اختلال بازتثبیت تأخیری حافظه ترس شد ولی روزهای حافظه‌های ۱۴، ۲۸ و ۵۶ اثر معنی‌داری نداشت. این یافته‌ها نشان می‌دهند که با افزایش سن حافظه، وابستگی بازتثبیت تأخیری آن به سنتز پروتئین کم می‌شود.

در این مطالعه برای ارزیابی حافظه از دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال استفاده شد. اعمال شوک در این دستگاه، حافظه تروماتیک (حافظه ناشی از ترس) ایجاد می‌کند. این مدل معمولاً در مطالعات بررسی بازتثبیت حافظه استفاده می‌شود. برای مهار فرآیند سنتز پروتئین از داروی سیکلوهگزامید با دوز ۲/۸ برای تزریق سیستمیک و با دوز ۴ و ۸ میکروگرم برای تزریق داخل هیپوکمپی استفاده شد. دوز داروها با توجه به مطالعات قبلی انتخاب شد [۲۰،۲۱]. دوز استفاده شده، بعد از ۲۰ دقیقه حدود ۷۵ درصد تولید پروتیین را در مغز مهار می‌کند [۲۲].

نقش فرآیند سنتز پروتئین بر بازتثبیت حافظه: احتمال وابستگی زمانی

یافته‌های این مطالعه نشان داد که تزریق سیکلوهگزامید ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی حافظه، موجب اختلال بازتثبیت تاخیری حافظه می‌گردد. این یافته با نتایج مطالعات دیگران هم‌خوانی دارد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند برای این که اطلاعات بتوانند بازتثبیت شوند مستلزم این است که حافظه فعال شده و در یک حالت ناپایدار قرار گیرد و در ادامه نیاز به فرآیند سنتز پروتئین می‌باشد و با مهار سنتز پروتئین در فاز ناپایداری، بازتثبیت اتفاق نمی‌افتد [۱۵]. هم‌چنین مطالعه Nader و همکارانش که نشان داد که بازتثبیت حافظه ترس شرطی، با انفوزیون مهارگر سنتز پروتئین (آنیزومایسین) به داخل آمیگدال، مختل می‌شود [۱]. از طرفی مطالعات جدید نشان می‌دهند که بعد از اکتساب حافظه، یک دوره زمانی تأخیری وجود دارد که در این دوره زمانی، تولید پروتئین برای ماندگاری، و نه تشکیل حافظه بلندمدت ضروری است، این مرحله، تثبیت تأخیری نامیده می‌شود و چندین مولکول (c-fos, Zif268, BDNF, ...) در تثبیت تأخیری نقش دارند و تغییر فعالیت آن‌ها می‌تواند منجر به افزایش و یا اختلال ماندگاری حافظه بلندمدت شود [۷-۱۲]. مطالعات جدید هم‌چنین نشان می‌دهند که بعد از فعال‌سازی حافظه یک مرحله بازتثبیت تأخیری نیز وجود دارد که در طی آن ماندگاری حافظه تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۲۳]. بر اساس یافته‌های مطالعه کنونی می‌توان گفت که حافظه بلندمدت فعال شده، به صورت وابسته به زمان نیازمند فرآیند تأخیری سنتز پروتئین هست به طوری که سنتز پروتیین ۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی برای بازتثبیت تاخیری حافظه ضروری می‌باشد.

برای ارزیابی نقش سنتز پروتئین از تزریق سیستمیک و داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید استفاده شد. این دارو یک مهارکننده سنتز پروتئین است که با مداخله در مرحله Translocation سنتز پروتئین، translational elongation را

Archive of SID
www.SID.ir

به وسیله مهار آنزیم پپتیدیل ترانسفراز مختل می‌کند[۲۲]. مطالعات نشان داده‌اند که مهار پروتئین یا مهار سنتز RNA هنگام آموزش، سبب فراموشی می‌شود و فرآیند سنتز پروتئین برای روند تثبیت حافظه بلندمدت و نه کوتاه‌مدت بسیار مهم است [۲۴،۲۳]. در هیپوکمپ عوامل مختلفی از جمله، نروتروفین‌ها، با تحریک تیروزین کیناز غلظت کلسیم داخل سلولی را زیاد می‌کنند. این حوادث و سیگنال‌ها ممکن است با فعالیت پروتئین کینازی مزدوج شود و سنتز پروتئین را تحریک کنند. پروتئین‌های سنتز شده جدید ممکن است به طور موضعی پاسخ‌های پس‌سیناپسی را افزایش دهند، یا ممکن است به ترمینال پیش‌سیناپسی مرتبط شوند و موجب افزایش رهایش نوروترانسمیترها گردند. از طرفی، ذخیره حافظه بلندمدت نیازمند فعالیت پروتئین کیناز A و سنتز پروتئین است. دیده شده است که کاهش فعالیت پروتئین کیناز A و سنتز پروتئین با نقص و اختلال LTP و حافظه بلندمدت همراه است [۲۴،۲۳].

Luft و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با تزریق داخل صفاقی سیکلوهگزامید قبل و بعد از آموزش نشان دادند که ایجاد حافظه‌های پایدار نیاز سنتز پروتئین جدید است که این پروتئین‌ها در جهت بازسازی ساختار سیناپسی و دندریتی به کار می‌روند. آن‌ها نشان دادند که تثبیت مهارت حرکتی پیچیده، و نه کسب آن به وسیله مهارگر سنتز پروتئین مختل می‌شود و هم‌چنین نشان دادند که LTP اولیه بر خلاف LTP تأخیری، نسبت به مهارگرهای سنتز پروتئین حساس نیست [۲۵].

در مطالعات Veronique و همکارانش در سال ۲۰۰۳، مشخص شد که تزریق سیکلوهگزامید بین ۱ تا ۴ ساعت بعد از آموزش باعث فراموشی می‌شود و در زمان صفر و ۶ پس از آموزش تأثیری نخواهد داشت و به این نتیجه رسیدند که، یک دوره زمانی برای حافظه وجود دارد که حساسیت بیش‌تری به مداخلات داروئی دارد. این یافته نشان می‌دهد که سنتز پروتئین به صورت وابسته به زمان برای تشکیل حافظه بلندمدت ضروری است [۲۶]. طی مطالعات انجام شده توسط Gordon و همکارانش، در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید در مناطق CA1 و CA3 هیپوکمپ، اثرات تخریبی شدیدی روی تثبیت حافظه بلندمدت دارد و سنتز پروتئین در نورون‌های پیرمیدال CA1 به طور چشمگیری در تثبیت سیناپسی حافظه اخباری نقش دارد [۲۷]. Mendonca و همکارانش در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید قبل از ایجاد استرس، می‌تواند از کاهش رفتارهای جستجوگرانه ناشی از استرس پیشگیری کند. آن‌ها مطرح کردند که افزایش در سنتز پروتئین پس از استرس حاد، منجر به تغییرات پلاستی‌سیتی نورونی می‌شود که تزریق سیکلوهگزامید مانع از این وقایع می‌گردد، یعنی اثرات ناشی از استرس توسط سیکلوهگزامید آنتاگونیزه می‌شود [۲۱].

از طرف دیگر مطالعات نشان می‌دهند که با افزایش سن حافظه، میزان تأثیرپذیری آن از محرک‌های مختلف مانند عوامل فارماکولوژیک تغییر پیدا می‌کند. برای مثال، نشان داده شده است که با افزایش سن حافظه مقاومت آن‌ها در برابر اثرات مخرب مهارگرهای سنتز پروتئین زیاد می‌شود [۲۵،۲۴]. در این مطالعه ما مشاهده کردیم که تزریق داخل هیپوکمپی سیکلوهگزامید فقط بازتثبیت تاخیری حافظه ۷ روزه را مختل می‌کند ولی روی حافظه‌های مسن‌تر اثری ندارد. این موضوع نشان می‌دهد که میزان تأثیرپذیری مرحله بازتثبیت تأخیری از مهار سنتز پروتئین، با افزایش سن حافظه کاهش پیدا کند، یعنی هر چه سن حافظه افزایش پیدا می‌کند، میزان مقاومت آن به مهارگرهای سنتز پروتئین زیاد می‌شود.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که سنتز پروتئین (۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی حافظه) برای بازتثبیت تاخیری ضروری است. قابل ذکر است که اثرات مهاری سیکلوهگزامید، غیر اختصاصی است و روند کلی تولید پروتیین‌ها را مهار می‌کند. تعیین نوع پروتیین‌های دخیل نیازمند مطالعات دقیق‌تر است. هم‌چنین با افزایش سن حافظه، میزان مقاومت آن در برابر اثرات مخرب مهارگرهای سنتز پروتیین کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

Archive of SID

www.SID.ir

این مقاله، برگفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی خانم رویا ملک در دانشگاه علوم پزشکی استان سمنان می‌باشد. از معاونت پژوهشی و فناوری این دانشگاه بابت تامین اعتبار این تحقیق تشکر و قدرانی می‌شود.

منابع

[1] Debiec J, LeDoux JE, Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. Neuron 2002; 36: 527-538.

[2] Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature 2000; 406: 722-726.

[3] Duvarci S, Nader K. Characterization of fear memory reconsolidation. J Neurosci 2004; 24: 9269-9275.

[4] Nader K. Memory traces unbound. Trends Neurosci 2003; 26: 65-72.

[5] Lin CH, Yeh SH, Lu HY, Gean PW. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. J Neurosci 2003; 23: 8310-8317.

[6] Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. J Neurosci 2004; 24: 4787-4795.

[7] Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. Proc Nat Acad Sci 2008; 105: 2711-2716.

[8] Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk L, Gonzalez C, Dorman G, Cammarota M, et al. Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. Neurotoxi Res 2010; 18: 377-385.

[9] Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. Science 2009; 325: 1017-1020.

[10] Katche C, Bekinschtein P, Slipczuk L, Goldin A, Izquierdo IA, Cammarota M, Medina JH. Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. Proc Nat Acad Sci 2010; 107: 349-354.

[11] Katche C, Goldin A, Gonzalez C, Bekinschtein P, Medina JH. Maintenance of long-term memory storage is dependent on late posttraining Egr-1 expression. Neurobiol Learn Mem 2012; 98: 220-227.

[12] Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? Behav Brain Res 2008; 192: 61-69.

[13] Yang C, Liu JF, Chai BS, Fang Q, Chai N, Zhao LY, et al. Stress within a restricted time window selectively affects the persistence of long-term memory. PloS One 2013; 8: e59075.

[14] Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM. Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. Learn Mem 2006; 13: 376-381.

[15] Dudai Y, Eisenberg M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. Neuron 2004; 44: 93-100.

[16] Milekic MH, Alberini CM. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. Neuron 2002; 36: 521-525.

[17] Nadel L, Moscovitch M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. Curr Opin Neurobiol 1997; 7: 217-227.

[18] Nader K, Einarsson EÖ. Memory reconsolidation: an update. Anna N Y Acad Sci 2010; 1191: 27-41.

[19] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition: Academic press; 2006.

[20] Milekic MH, Brown SD, Castellini C, Alberini CM. Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. J Neurosci 2006; 26: 3010-3020.

[21] Mendonça F, Guimarães F. Intra-hippocampal administration of cycloheximide attenuates the restraint-induced exploratory deficit of an elevated plus maze. Behav Brain Res 1998; 91: 207-211.

[22] Alberini CM. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? Trends Neurosci 2005; 28: 51-56.

[23] McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. Science 2000; 287: 248-251.

[24] Luft AR, Buitrago MM, Kaelin-Lang A, Dichgans J, Schulz JB. Protein synthesis inhibition blocks consolidation of an acrobatic motor skill. Learn Mem 2004; 11: 379-382.

[25] Agin V, Chichery R, Maubert E, Chichery M-P. Time-dependent effects of cycloheximide on long-term memory in the cuttlefish. Pharmacol Biochem Behav 2003; 75: 141-146.

[26] Gordon RY, Mugantseva EA, Khutzian SS, Podolski IY. Cycloheximide-induced inhibition of protein synthesis in hippocampal pyramidal neurons is time-dependent: Differences between CA1 and CA3 areas. Neurosci Lett 2009; 461: 249-251.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of systemic and intra-hippocampal injections of cycloheximide on the late reconsolidation of fear-based memory in rats

Roya Malekloo (M.Sc)[1], Ali Rashidy-Pour (Ph.D)[*1], Abbas Ali Vafaei (Ph.D)[1], Hamid Reza Sameni (Ph.D)[2]

1- Laboratory of Learning and Memory, Research Center and Dept. of Physiology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2- Stem Cell Research Center and Dept. of Anatomical Sciences, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 30 Dec 2014; Accepted: 17 Feb 2015)

***Introduction*:** Reactivation of a stabilized memory induces a second wave of consolidation process which is now called as reconsolidation. Recently, a late consolidation process was proposed, suggesting that memory after learning within a delayed time window was labile. This late memory consolidation needs protein synthesis in the hippocampus. The aim of this study was to test whether the re-stabilized memory after reactivation also requires a late-phase protein synthesis in the hippocampus. We also investigated whether memories become increasingly resistant to disruption with age.

***Materials and Methods*:** Male Wistar rats were trained in a one trial passive avoidance task (1mA, 3s). In the first experiment, cycloheximide (CYC, 2.8 mg/kg, i.p.) administrated 15 minutes before the memory reactivation and also 3, 6, 12 and 24 hours after the memory reactivation. In the second experiment, the same dose of CYC administrated to rats with memory age of 7, 14, 28 or 56 days. In the third experiment, CYC administrated (4 µg or 8µg/µl) into hippocampus. In the last experiment, CYC administrated (8µg/µl) into hippocampus of rats with memory age of 7, 14, 28 or 56 days. In all experiments, memory test was done 2 and 7 days after memory reactivation.

***Results*:** Results indicated that systemic administration of CYC only 12h after memory reactivation significantly impaired memory retention. With increasing the age of memory, no effect of CYC was found. This impairing effect also was found when CYC was injected into hippocampus. This impairing effect also was found on memory age with 7 days.

***Conclusion*:** Our findings indicate that protein synthesis, particularly in the hippocampus, plays an important role in the late memory reconsolidation and with increasing the age of memories, they become resistant to disruption.

***Keywords*:** Protein synthesis, Cycloheximide, Dorsal hippocampus, Late memory reconsolidation, Passive avoidance task.

* Corresponding author. Tel: 023-33451336

Rashidy-pour@semums.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir