اثرات تزريق داخل هيپوكامپ ۱۷- بتا استرادیول بـــر تثبيت حافظه در رت هاي ماده تخمدان زدايي شده

مهدي اورديخاني سيدلر[۱]، شيرين ببري[۱و۲]*، حميد غلامي پور بديع[۲] و ناهيده قندچيلر[۲]

[۱] مركز تحقيقات كاربردي داروئي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز، [۲] دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز

تاريخ دريافت: ۸۶/۲/۲۶ ، تاريخ پذيرش: ۸۶/۳/۲۴

Effects of intrahippocampal injection of 17-β estradiol on memory consolidation in the female ovariectomized rats

Ordikhani Seydlar M.[1], Babri Sh. *[1,2], Gholamipour Badie H.[2], Ghandchilar N.[2]

[1]Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, [2] Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences

Received: 2007/5/16 , Accepted: 2007/7/2

Objectives: Sexual hormones affect most of the cerebral functions as well as learning and memory. More investigations are required to clarify the effects of local administration of estradiol in the central nervous system. In this research we aimed at the effects of different doses of estradiol on memory consolidation in female gonadectomized rats. **Methods:** Female Wistar rats (weighing 200-250 g, aged 3-4 months) were divided into 6 groups randomly (n=9). Five groups of animals were ovariectomized and implanted by cannulae in the CA1 region of hippocampus. Except sham group the other groups treated respectively with saline, sesame oil 0.5 µL and estradiol at the doses of 0.5, 1 and 2 µg / 0.5 µL sesame oil bilaterally in the CA1 region immediately after the passive avoidance training session. They were tested 10 min and 24 h after training. **Results:** Our results demonstrated that 0.5 µg estradiol had no significant effect on retention latency compared to sham group,1 µg estradiol treated group showed a significant increase ($p<0.001$) in retention latency compared to sham group while it decreased in the group treated with 2 µg dose of estradiol ($p<0.05$). **Conclusion:** According to our findings, it seems that effects of estradiol in local administration are dose dependent and high doses of estradiol caused impairment of passive avoidance learning.

Keywords: *Estradiol, Memory consolidation, Hippocampus, Passive avoidance learning, Ovariectomy.*

زمينه و هدف: هورمونهاي جنسي روي بسياري از فرايندهاي مغزي از جمله حافظه و يادگيري اثر دارند. تاثير تجويز موضعي استرادیول در سيستم عصبي و ميزان دوز موثر آن از جمله مسائلي است كه نياز به تحقيق و بررسي بيشتر دارد در همين راستا در اين تحقيق اثر دوزهاي مختلف استرادیول بر تثبيت حافظه در موشهاي صحرايي ماده تخمدان زدايي شده مورد بررسي قرار گرفت. **روش ها:** موشهاي صحرايي ماده نژاد ويستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم و متوسط سني ۴-۳ ماه بطور تصادفي در ۶ گروه ۹ تايي تحت آزمايش قرار گرفتند. ۵ گروه از موشها تخمدان زدايي شده و بلافاصله توسط استريوتاكسي كانول گذاري در ناحيه CA1 هيپوكامپ صورت گرفت. پس از بهبودي، به جز گروه شم بقيه گروهها به ترتيب روغن كنجد ۰/۵ ميكروليترو استرادیول با دوزهاي ۰/۵ ، ۱ و ۲ ميكرو گرم در ۰/۵ ميكرو ليتر روغن كنجد بلافاصله پس از آموزش اجتنابي غيرفعال به طور دو طرفه در CA1 دريافت نمودند. تست تثبيت حافظه ۱۰ دقيقه و ۲۴ ساعت بعد از آموزش انجام گرفت. **يافته ها:** نتايج حاصله حاكي از اين است كه دوز ۰/۵ ميكروگرم استرادیول تاثير معني داري بر زمان تاخير در مقايسه با گروه تخمدان زدايي شده نداشت .گروه دريافت كننده استرادیول با دوز ۱ ميكروگرم افزايش معني دار در زمان تاخير ($p<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه تخمدان زدايي شده داشت، اما ۲ ميكروگرم استرادیول موجب كاهش زمان تاخير ($p<۰/۰۵$) در ورود به محفظه تاريک در مقايسه با گروه تخمدان زدايي شده گرديد. **نتيجه گيري:** بر طبق نتايج به دست آمده از اين تحقيق به نظر مي رسد اثرات تزريق موضعي استرادیول وابسته به مقدار آن بوده و استرادیول در مقادير زياد اثر مضعف بر يادگيري اجتنابي غير فعال دارد.

واژه هاي كليدي: *استرادیول، تثبيت حافظه، هيپوكامپ،يادگيري اجتنابي غيرفعال، تخمدان زدايي.*

*نويسنده مسئول: دكتر دكترشيرين بيرى، دانشكده پزشكى دانشگاه علوم پزشكي تبريز
تلفن ۳۳۶۴۶۶۴-۰۴۱۱، نمابر: ۳۳۶۴۶۶۴-۰۴۱۱

**Corresponding Author: Dr. Shirin Babri , Assistant Professor, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 0411-3364664 ; Fax: 0411- 3364664 ; E-mail: shirinb46@yahoo.com*

۱- مقدمه

استرادیول مهمترین استروژن بدن در مقایسه با دو استروئید دیگر (استریول، استرون) است. این هورمون وظیفه تنظیم و کنترل اعمال و رفتارهاي توليدمثلي در جنس مونث را بر عهده دارد. مطالعاتي كه اخيراً روي اين هورمون انجام گرفته، بيانگر اثرات مختلف اين هورمون در سيستم عصبي مركزي است (۱ و۲) كه از جمله مهمتـــــرين آنها، دخالت در فرايند يادگيري و حافظه مي باشد (۱، ۳ و۴).

هيپوكامپ بخشي ازسيستم ليمبيک است كه در قسمت داخلي قشر گيجگاهي مغز قرار گرفته و از نظر فيزيولوژيک نقشي مهمي درروندهاي مربوط به حافظه و يادگيري دارد (۵). تركيبات استروژني اثرات چشمگيري برعملكرد وساختمان هيپوكامپ دارند (۶ و۷). بر اساس يک گزارش فقدان تركيبات استروژني قادر به كاهش دانسيته خارهاي دندريتي در ناحيه CA1 هيپوكامپ است (۸ و۹). همچنين اين هورمون قادر به تنظيم خواص الكتروفيزيولوژيكي (۱۰)، بيوشيميايي و مورفولوژيكي نورونها در سيستم عصبي (۱۱) از جمله افزايش حساسيت به گلوتامات، كاهش فعاليت گابا، افزايش فعاليت سيستم كولينرژيک، بالا بردن ميزان آدنوزين منو فسفات حلقوي و افزايش پلاستيسيتي نورونهاي ناحيه CA1 هيپوكامپ مي باشد (۱، ۸ ،۱۲و۱۳). بررسيهاي متعددي نشان داده است كه گنادكتومي رتهاي نر و ماده موجب تغيير روندهاي مربوط به حافظه مي گردد (۱۶-۱۴). براساس برخي تحقيقات، بالا بودن سطوح استرادیول، سبب افزايش تعداد سيناپسهاي تحريكي در ناحيه CA1 هيپوكامـــپ مي گردد (۹ و۱۷)، از سوي ديگر نشان داده شده كه سطوح پايين استرادیول، مرحله اكتساب را درحافظه مرجع reference memory بهبود بخشيده، اما سطوح بالاي آن اثر معني داري بر حافظه جاري working memory نداشته است و مقادير متفاوت استرادیول اثرات متفاوتي برفرآيندهاي مربوط به حافظه دارند (۶). مشخص شده كه همزمان با تغييرات سطوح هورمون استروژن در پلاسما، القاي تقويت طولاني مدت يا Long Term Potentiation (LTP) و تضعيف طولاني مدت يـــا Long Term Depression (LTD) وابسته به گيرنده هاي NMDA در سيناپسهاي نواحي CA1 و CA3 هيپوكامپ تحت تاثير قرار گرفته است (۱۹-۱۷)، يعني در طول مرحله پرواستروس از سيكل جنسي موشهاي صحرايي كه ميزان استروژن خون بالاست و يا متعاقب تجويز حاد استرادیول، القاي LTP، بهبود يافته و امكان القاي LTD كاهش مي يابد (۶ و۱۷). در مقابل در گزارشات ديگر، عملكرد موشهاي صحرايي ماده در ماز آبي موريس در طي مرحله پرواسترس نسبت به مرحله استروس كاهش چشمگيري داشته است (۲۰ و۲۱).

در مجموع مطالعه و بررسي مقالات منتشره در مورد تاثير تخمدان زدايي و استروژن درماني بر روندهاي شناختي حاكي از عدم تاثير اين هورمون در روندهاي شناختي (۱۲)، اثرات دو جانبه (۲۲) و يا اثرات بهبود دهنده بوده است (۲۳ و۲۴). احتمالا تناقض موجود در اين نتايج ناشي از رژيم هاي درماني متفاوت، دوزهاي مختلف هورمون و يا طريقه تجويز بوده است. با توجه به تناقضات موجود در نتايج حاصل از گزارش هاي مربوطه و با توجه به اينكه نواحي مختلف سيستم عصبي در روند يادگيري و تشكيل حافظه به يک اندازه در گير نبوده وبر حسب ميزان پراكندگي گيرنده ها حساسيت متفاوت به استروژن دارند، در اين مطالعه سعي شد از طريق تزريق حاد دوزهاي متـــــفاوت ۱۷بتا- استرادیول ۳- بنزوات در ناحيه CA1 هيپوكامپ (كه از نواحي مهم درگير در تشكيل حافظه و حساس به استرادیـــول مي باشد) بلافاصله پس از آموزش (post training)، اثرات موضعي مقادير مختلف استرادیول بر تثبيت حافظه در يادگيري اجتنابي غير فعال مورد بررسي قرار گيرد.

۲- مواد و روشها

۲-۱: حيوانات

براي انجام آزمايشات از موشهاي صحرايي ماده سفيد نژاد ويستار (n=۵۴) با وزنهاي ۲۵۰-۲۰۰ گرم و متوسط سني ۴-۳ ماهه كه از مركز پرورش و نگهداري حيوانات آزمايشگاهي دانشگاه علوم پزشكي تبريز تهيه شده بودند، استفاده گرديد. موشها قبل از جراحي در گروههاي ۵ تايي نگه داري شدند اما پس از جراحي و در طي آزمايشات، بطور انفرادي و در شرايط كنترل شده از نظر دما (۱ ± ۲۴ درجه سانتي گراد)، دوره تاريكي– روشنايي (۱۲ ساعته) و رطوبت (۷۰%) نگهداري گرديدند. حيوانات دسترسي آزادانه به آب و غذا داشتند.

۲-۲: عمل تخمدان زدائي و كاشت كانول ها

ابتـــــدا حيوانـــات تحت بـــيهوشي بـــا كلرال هيـدرات ۱۰% (۴۰۰ mg/kg) بصورت داخل صفاقي قرار گرفتند (۲۵). تخمدان زدائي (Ovarioctomy) از قسمت پشتي جانبي (dorsolateral) بدن، عقبتر از دنده ها و حدود ۱/۵ سانتيمتر زير مهره هاي كمري انجام گرديد. پس از چيدن موها و ضدعفوني ناحيه جراحي توسط بتادين ۱۰% و الكل ۷۰% ، دو برش ۱ سانتيمتري ايجاد و تخمدانها به همراه مقداري از بافتهاي چربي اطراف از محل خارج شده و شكافهاي عضلات و پوست بخيه شدند. بلافاصله پس از اين عمل، سر حيوان در دستگاه استريوتاكسي ثابت شده و دو كانول (سرسوزنهاي شماره ۲۲) بصورت دو طرفه و با استفاده از مختصات (AP= -4.3mm از نقطه برگما، L=±4mm و DV=3.4mm از سطح سخت شامه) در ناحيه CA1 هيپوكامپ (dorsal hippocampus) قرار داده شده (۵ و۲۶) و توسط پيچهاي كوچک و سيمان دندانپزشكي در محل خود محكم گرديدند.

پس از اتمام اين مراحل براي جلوگيري از ايجاد عفونتهاي ثانويه و كاهش درد، بترتيب حيوانات تحت درمان با دو دوز پني سيلين

جي پروكائين (۲۵۰۰۰۰units/ml) به حجم تزريق ml ۰/۳ به فاصله ۲۴ ساعت از همديگر و بصورت داخل عضلاني قرار گرفتند و استامينوفن به نسبت ۱:۱۰۰ در آب آشاميدني به مدت ۴۸ ساعت تجويز گرديد (۲۷).

۲-۳: دستگاه آموزشي اجتنابي غير فعال و آزمايشات رفتاري

آموزش و تست رتها در گروههايي كه مورد جراحي قرار گرفته بودند ۱۰ روز بعداز جراحي صورت گرفت (۱۷). دستگاه آموزش اجتنابي غيرفعال شامل يک بخش روشن و يک بخش تاريک است كه توسط يك درب گيوتيني به ابعاد ۸×۸ سانتي‌متر از هم جدا شده اند. ابعاد هر اتاقك ۲۰×۲۱×۳۰cm بوده و در بالاي محفظه روشن يك لامپ ۱۲ ولت ۱۰ وات قرار گرفته است. در كف اتاقك ها ميله‌هايي به قطر ۳ ميليمتر با فاصله ۱ سانتيمتر از هم تعبيه گرديده است. آموزش در دستگاه اجتنابي غير فعال به ترتيب زير انجام گرفت:

الف- مـــرحله عادت كردن: اين قسمت شامل دو مرحله ۱۰ دقيقه اي بود كه با فاصله ۳۰ دقيقه از هم تكرار شد. حيوان در محفظة روشن قرار گرفته و درب گيوتني پس از ۱۰ ثانيه باز شد تا حيوان بـتواند بطور آزادانه بين دو قسمت تاريك و روشن حركت كند.

ب- مرحله آموزش: ۳۰ دقيقه پس از عادت مرحله دوم، موش در محفظه روشن قرار گرفت. درب گيوتيني ۱۰ ثانيه بعد باز شد، مدت زماني كه طول كشيد تا حيوان با چهار دست و پا وارد محفظه تاريک شود ثبت گرديد تا در صورت تاخير بيش از ۱۲۰ ثانيه از دور آزمايشات حذف گردد. پس از ورود حيوان به اين منطقه، در بسته شده و شوک الكتريكي با شدت ۱ ميلي آمپر، فركانس ۵۰ هرتز و مدت ۵ ثانيه از پاهاي حيوان عبور كرد.

ج- مرحله تست: موشها ۱۰ دقيقه پس از آموزش و ۲۴ ساعت بعد تست شدند. بدين صورت كه ۱۰ ثانيه پس از قرارگيري حيوان در قسمت روشن دستگاه، درب گيوتيني باز شده و مدت زماني كه طول كشيد تا حيوان وارد بخش تاريک شود بعنوان زمان تاخير (Retention latency) ثبت گرديد. حداكثر زمان تاخير ۶۰۰ ثانيه در نظر گرفته شد (۱۴).

۲-۴: تزريق داروها

۱۷بتا- استرادیول ۳-بنزوات با خلوص ۹۸% از شركت Sigma- Aldrich و روغن كنجد از شركت Fluka خريداري گرديدند. تزريق داروها با استفاده از سرسوزنهاي دندانپزشكي شماره ۲۷ متصل به لوله پلي پروپلين انجام گرفت. قسمت فلزي اين سرسوزنها به گونه اي برش داده شد كه به هنگام تزريق، طول آن ۱ ميليمتر بيشتر از طول كانول هدايتي باشد. حجمهاي تزريق ۰/۵ ميكروليتر در داخل سرنگ هاميلتون آماده سازي شده و بلافاصله پس از مرحله آموزش، در مدت ۴۵ ثانيه در ناحيه CA1 هر طرف تزريق شد. جهت جلوگيري از پس زدن مايع، سرسوزن بمدت ۱۵ ثانيه در داخل كانول هدايتي باقي ماند (۵).

۲-۵: خونگيري و اندازه گيري استرادیول

خونگيري از گروه كنترل وگروههاي آزمايشي پس از اتمام آموزش وتست صورت گرفت. موشها ابتدا توسط تزريق داخل صفاقي كلرال هيدرات ۱۰% (۴۰۰ mg/kg) بيهوش شدند. از هر موش مقدار ml ۱ خون به روش cardiac puncture توسط سرسوزن شماره ۲۳ اخذ شده و به لوله هاي حاوي ماده ضد انعقاد EDTA انتقال داده شدند. نمونه ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقيقه بمدت ۱۰ دقيقه در دماي ۴° درجه سانتيگراد سانتريفوژ گرديده و پلاسماي آنها جدا و تا زمان اندازه گيري، در فريـزر ۷۰- درجه سانتي گراد نگهداري شدند.

اندازه گيري مقدار استرادیول نمونه ها توسط روش ELISA و كيت خريداري شده از شركت IBL انجام گرفت.

۲-۶: گروههاي مورد آزمايش

موشها بطور تصادفي به ۶ گروه ۹ تايي تقسيم گشتند. گروه كنترل آموزش اجتنابي يافته و تست شدند. گروه شـم پـس از تخمـدان زدايـي و كاشـت كـانول و طـي دوره بهبـودي آمـوزش يافتـه و بلافاصله پس از آموزش ۰/۵ ميكروليتر سالين به طور دو طرفه در نواحي كانول گذاري شده تزريق گرديـد. در چهـار گـروه بعـدي موشها پس از جراحي و بهبودي آموزش ديده و بلافاصله پـس از آموزش به ترتيب روغن كنجد (S.O.) به ميـزان ۰/۵ ميكروليتـر و در سه گروه ديگر۱۷بتا- استرادیول به ترتيب به ميـزان ۰/۵، ۱و۲ ميكروگرم در ۰/۵ ميكروليتر روغن كنجد، بـه طـور دو طرفـه در ناحيه CA1 تزريق شد. تست گروههاي فوق نيز نظير گروه كنتـرل ده دقيقه و ۲۴ ساعت بعد انجام گرفت.

۲-۷: مطالعه بافتي

پس ازاتمام آزمايشات، حيوانات توسط دوز بالاي هيدرات كلرال داخل صفاقي كشته شده و مغز آنها بمدت ۱ هفته در محلول فرمالين ۱۰% قرار داده شد. سپس برشهايي با ضخامت ۱۰۰ ميكرومتر تهيه گشت. رنگ آميزي بـــا اسـتفاده از روش Cresyl Violet صورت گرفت. برش هاي بافتي توسط لوپ مورد بررسي قرار گرفتند تا صحت محل قرارگيري كانول ها تاييد شود (شكل ۱).

۲-۸: آناليز آماري

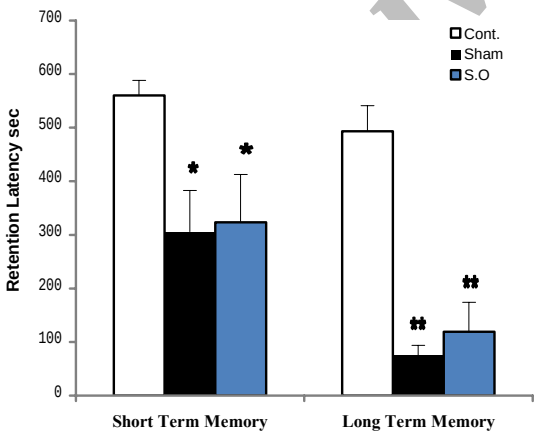
جهت مقايسه زمان تاخيرو ميزان استرادیول در گروههاي مختلف با همديگر، از روش آماري One Way ANOVA و بدنبال آن در صورت معني دار بودن نتايج ازپس آزمون Tukey استفاده شد. داده ها بصورت Mean± S.E.M نشان داده شدند و مقادير $p<0/05$ معني دار تلقي گرديدند.

۳- نتایج

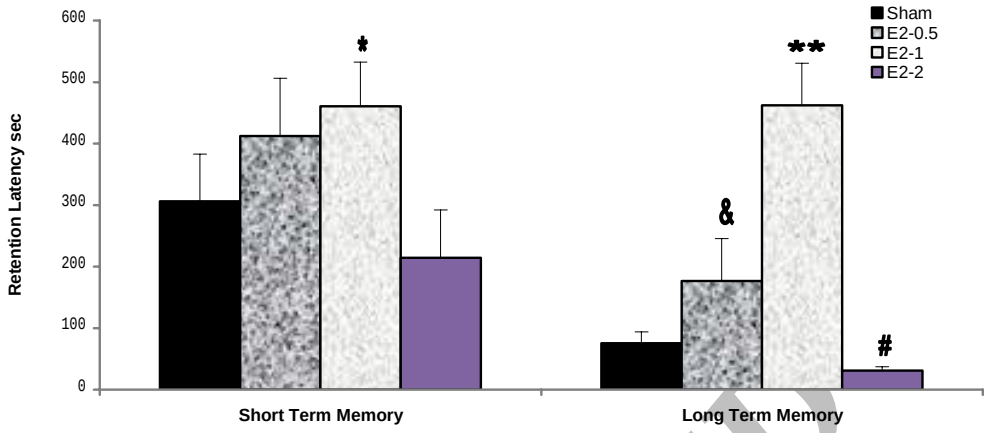
اندازه گیري میزان استرادیول پلاسما در موشهاي صحرایي گـروه کنترل وگروههاي تخمدان زدایي شـده بـروش ELISA، مـشخص نمود که غلظت استرادیول پلاسمایي موشهاي گروههاي تخمـدان زدایي شده بطور معني داري (p<۰/۰۰۱) نسبت بـه گـروه کنتـرل کاهش یافته است. مقایسه زمان تاخیربین گروه کنترل و گروه شم نشان داد که با برداشت تخمدانها و در نتیجه کـاهش هورمونهـاي جنسي، زمان تـاخیر در تـست حافظـه کوتـاه مـدت (p<۰/۰۵) و طولاني مدت (p<۰/۰۰۱) به طـور معنـي داري نـسبت بـه گـروه کنترل کاهش یافته اسـت (شـکل ۳)، زمـان تـاخیرگروه دریافـت کننده روغن کنجد بصورت داخل هیپوکامپ، در تستهاي حافظـه کوتاه مدت و طولاني مدت در مقایـسه بـا گـروه شـم اخـتلاف معني داري نداشت (شکل ۲).

شکل۱: محل قرار گیري کانول در ناحیه CA1 هیپوکامپ

گروه دریافت کننده استرادیول با دوز ۰/۵ میکروگرم درمقایسه بـا گروه S.O تفـاوت معنـي داري در تـست حافظـه کوتـاه مـدت و طولاني مدت نشان نداد. تزریق استرادیول به میـزان ۱ میکروگـرم باعث افزایش معني دار در زمان تاخیر ۱۰ دقیقه پـس از آمـوزش نسبت به گروه S.O نشد، اما در تست ۲۴ ساعت بعد، ایـن زمـان بصورت معني داري (p<۰/۰۰۱) افزایش یافت (شکل ۳). تجـویز داخل هیپوکامپ استرادیول به مقدار ۲ میکروگـرم کـاهش معنـي داري در زمان تاخیر نسبت به گروه شم در تست ۲۴ ساعت بعـد ایجاد نمود (p<۰/۰۰۱). مقایسه نتایج حاصله از سه گروه دریافت کننده استرادیول در تست حافظه کوتـاه مـدت و طـولاني مـدت حـاکي ازایـن اسـت کـه در تـست ۱۰ دقیقـه بعـد، دوز ۱ µg استرادیول افزایش معني داري در زمـان تـاخیر نـسبت بـه گـروه دریافت کننده ۲µg ایجاد نموده اسـت (p<۰/۰۰۱) (شـکل ۳). در تست ۲۴ ساعت بعد نیز گروه دریافت کننده دوز ۱µg اسـترادیول افزایش معني داري در زمان تاخیر نسبت بـه گـروههـاي دریافـت کننده دوز ۰/۵ µg (p<۰/۰۵) و ۲µg (p<۰/۰۰۱) استرادیول نـشان داد (شکل ۳).



شکل ۲: مقایسه زمانهاي تاخیر بین گروههاي کنترل، شم و گروهي کـه روغـن کنجد بـه میـزان ۰/۵ میکرولیتـر بـصورت دوطرفـه در ناحیـه CA1 هیپوکامـپ دریافت کردند(گروه شم)، در تستهاي مربوط به حافظه کوتاه مـدت (سـتونهاي روشن) و طولاني مدت (سـتونهاي تیـره)،* معنـي دار نـسبت بـه گـروه کنتـرل (P<۰/۰۵)،** معني دار نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)، مقـادیر بـر حـسب میـــــانگین ± S.E.M. نـــــشان داده شـــــده اســـــت (n=۹).



شكل ۳: مقايسه زمانهاي تاخير بين گروههاي شم و گروههاي دريافت كننده استرادیول با مقادير ۰/۵، ۱ و ۲ ميكروگرم بصورت دوطرفه در ناحيه CA1 هيپوكامپ، در تستهاي مربوط به حافظه كوتاه مدت و طولاني مدت،* معني دار نسبت به گروه دريافت كننده استرادیول با دوز ۲ميكروگرم (P<۰/۰۵)،& معني دار نسبت به گروه دريافت كننده استرادیول با دوز ۱ و ۲ ميكروگرم (p<۰/۰۵)،# معني دار نسبت به گروه sham (P<۰/۰۵) ** معني دار نسبت به گروه sham و گروه دريافت كننده استرادیول با دوز ۲ ميكروگرم (p<۰/۰۰۱) مقادير بر حسب ميانگين ± S.E.M. نشان داده شده است (n=۹)

۴- بحث

نتايج بدست آمده از اين تحقيق نشان داد كه تخمدان زدايي و كاهش هورمونهاي جنسي اثر معني دار در كاهش زمان تاخير در تست اجتنابي غير فعال داشته و بعبارت ديگر موجب تخريب حافظه كوتاه مدت و طولاني مدت شده است. بررسي هاي متعددي كه در ارتباط با اثرات تنظيمي استروژن روي مغز (۲و۲۷) و همچنين نقش اين هورمون در روندهاي مربوط به اعمال شناختي صورت گرفته است (۱۳و۲۸) مؤيد اثرات منفي فقدان اين هورمون بر يادگيري و حافظه در حيوانات تخمدان زدايي شده مي باشد. گزارش شده است كه استروژن دانسيته خارهاي دندريتي در ناحيه CA1 هيپوكامپ را افزايش داده (۲۹) و پلاستيسيتي نورونها در حضور استروژن افزايش مي يابد. بر اساس يک مطالعه شش روز پس از تخمدان زدايي خارهاي دندريتي در انشعابات جانبي دندريتها در سلولهاي هرمي شكل ناحيه CA1 هيپوكامپ كاهش يافت (۳۰). اين يافته ها در جهت نتايج بدست آمده از اين تحقيق است، اما گزارشات متناقص ديگري نيز وجود دارد، بطوريكه بر اساس اين گزارشات، تخمدان زدايي هيچ اثري بر روندهاي حافظه و يادگيري نداشته و حتي در مواردي باعث بهبود آن شده است (۲۲و۳۱و۳۲).

در تحقيق حاضر، زمان تاخير در تستهاي مربوط به حافظه كوتاه مدت در گروههاي آزمايشي دريافت كننده استرادیول و روغن كنجد تغيير معني داري را در مقايسه با گروه شم نشان نداد. اين امر ممكن است بيانگر وجود پاره اي عوامل مداخله گر ديگر در ايجاد اثرات سريع استرادیول باشد. ولي مقايسه ما بين سه گروه دريافت كننده استرادیول، كاهش معني دار را درزمان تاخير در دوز دو ميكروگرم در ميلي ليتر استرادیول نسبت به دوز يک ميكروگرم در ميلي ليتر نشان داد. مكانيزم هاي مربوط به تشكيل حافظه كوتاه مدت و طولاني مدت با هم ديگر متفاوت مي باشند بـطوريكه گزارش گرديده، در هنگام استـفاده از مهار كننده هاي MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) و (Extracellular single Regulated kinase) ERK، در تست حافظه كوتاه مدت در ترس شرطي شده، تا ۳ ساعت تغييري به وجود نيامده ولي در ۲۴-۶ ساعت بعدي حافظه تخريب گرديد (۱۴) يعني ممكن است اين نوع از شرطي شدن در مدت ۶ ساعت بعد از آموزش حساسيتي به ايجاد تخريب در اثر مهار كننده هاي آنزيم پروتئين كيناز A (PKA) و سنتز پروتئينها نداشته است (۱۴و۱۸). اثرات سريع استروژن، همچنين مي تواند از طريق افزايش سياليت غشاء و فعال سازي كانالهاي يوني از جمله گيرنده هاي NMDA انجام گيرد (۳۳).

سيستمهاي نوروترانسميتري متفاوتي در مغز وجود دارد كه برخي از آنها در روندهاي شناختي مغز دخيـــلند از جمله: سيستم هاي گلوتاماترژيک، كولينرژيک، دوپامينرژيک، سروتونرژيک و آلفا آدرنرژيک كه ممكن است در تنظيم جايگاه استروژن ها نقش داشته باشند (۲۹و۳۴) و در مواردي اثرات سينرژيسمي مشخصي بين اين سيستمها و هورمونهاي جنسي بيان شده است (۵). تاثيرات وابسته به دوز استرادیول كه در مطالعه حاضر مشاهده شده احتمالا تا حدودي ناشي از تغيير عملكرد اين سيستمهاي نوروترانسميتري در حضور اين هورمون مي باشد. در تاييد اين مطلب گزارش شده كه استرادیول به صورت وابسته به دوز انتقال دوپامين را تغيير مي دهد (۳۵ و۳۶).

اثرات وابسته به ژن استروژنها تا حدود زيادي نيـــازمند زمان مي باشند. طبق بررسيهاي قبلي، شروع اثرات استروژن ها بعد از تجويز، بيش از۳۰ دقيقه و گاها ساعتها و روزها طول مي كشد (۲۸) اما مطالعاتي كه در اين زمينه انجام گرفته است نـــشان داده اند كه راه هاي ديگري به نام مكانيزم هاي غير ژنوميک جهت شروع اثر اين هورمون ها وجود دارد كه بسيار سريع تر (حدود ۳-۲ دقيقه) از اثرات ژنوميک آنها مي باشند و بدين ترتيب باعث تسريع در تحريک پذيري غشاهاي سلولهاي عصبي مي گردند (۲و۲۸). بررسي هايي كه روي هيپوتالاموس انجام گرفته اند، نشان مي دهند كه اين هورمونها قادر به افزايش سريع cAMP در اين ناحيه بوده و از طريق كاهش انتقال يونهاي پتاسيم، باعث ايجاد ديپولاريزاسيون سلولي مي گردند (۱۲و۳۷).

تاثير تغييرات ميزان استروژن پلاسما در روزهاي مختلف سيكل جنسي حيوانات آزمايشگاهي نيز از مسائل مورد توجه است كه تحقيق در مورد آن منجر به نتايج متناقض شده است. در همين راستا گزارش شده كه عليرغم تغييرات مرفولوژيک در ساختمان خارهاي دندريتي هيپوكامپ در مراحل مختلف سيكل جنسي حافظه فضايي رتهاي ماده نرمال دچار تغيير نگرديد (۳۸).

يافته هاي حاصل از يک تحقيق ديگر نيز بيانگر اين است كه در مرحله پرواستروس عملكرد حافظه و يادگيري در موشهاي سوري افزايش مي يابد (۳۹) اما در مقابل Warren و همكارانش گزارش كردند در مرحله پرواستروس كه ميزان استراديول پلاسما در بالاترين حد خود مي باشد، يادگيري و حافظه فضايي در رتهاي ماده مختل مي شود (۲۰).

عده ديگري از محققين نشان دادند كه تعداد سيناپسهاي تحريكي axospinus، همـــزمان با بالارفتن سطوح استراديول افزايش مي يابد (۳۳ و۴۰) و احتـمال دادند كه رابـــــطه مستقيمي بين غلظت استروژن مغز و قدرت سينـاپتوژنزي آن وجود دارد و حتي بالا بـــــودن ميزان استروژن مغز را دليلي بـــر بالا رفتن مقادير بعضي نشانگرهاي سيناپسي از جمله spinophilin, Syntaxin و Synapthophysin دانستند (۳۲ و۴۰). گزارش شده غلظت استراديول در مغز حدود ۶ برابر بيشتر از غلظت آن در پلاسما مي باشد و معتقدند كه اين تفاوت غلظت ناشي از سنتز استروژن در مـغز و از طريق آنزيم آروماتـــــاز مي باشد، بگونه اي كه كاهش هورمون متعاقب مهار آنزيم مربوطه، باعث كاهش تعداد خارهاي سيناپسي گرديد (۴۱) يعني ممكن است عملكردهاي شناختي استراديول در سيستم عصبي مركزي مستقل از غلظت اين هورمون در پلاسما باشد كه تا حدودي نظريه Berry را مبني بر بي تاثير بودن تغييرات سيستميک هورمون بر فرآيندهاي شناختي تاييد مي كند، ولي از سوي ديگر، مطالعات متعددي نيز وجود دارد كه تغييرات در عملكردهاي شناختي را متعاقب تغييرات سيستميک هورمون به دنبال تخمدان زدايي و درمان با استروژن را نشان داده اند (۱و۱۳و۲۹).

اثرات استراديول احتمالادر منـاطق مختلف مغزي، متـــــفاوت مي باشد، گزارش شده تجويز حاد غلظت هاي فيزيولوژيک بالاي استراديول در ناحيه پره فرونتال كورتكس گيرنده هاي گلوتامات را در مقايسه با گروه كنترل به طور معني دار كاهش داده اما تاثيري بر تعداد اين گيرنده ها در ناحيه هيپو كامپ نداشت (۴۲) به اين ترتيب احتمالا ممكن است وجود اختلافات در نتايج بيان شده ناشي از تفاوت در محل هاي تزريق و يا حتي تفاوت در اثر تزريق هاي سيستميک و موضعي باشد.

گزارش شده دوزهاي فيزيولوژيک استراديول باعث تقويت برگشت پذير جريانات القا شده توسط كاينات و افزايش فرآيندهاي فسفريلاسيون وابسته به پروتئين G مي شود (۱۲و۴۰). اين فرآيندها بدليل برگشت پذير بودن ممكن است در دوزهاي پايين تر از حد معمول استراديول كه تحريک كمتـــــري ايجاد مي كند، اثر معني داري روي حافظه نداشته باشد،كه احتمالا يكي از علل عدم مشاهده اثرات هورمون در دوز نيم ميكروگرم در اين مطالعه مي باشد.

بر اساس يک گزارش ديگر تجويز دوزهاي بالاي استراديول، حافظه وابسته به ناحيه خلفي استرياتوم را تحت تاثير قرار داده و موجب تخريب آن شد، اين اثر ممكن است ناشي از تاثير هورمون استراديول بر آزادسازي دوپامين در اين ناحيـــه باشد (۲۷ و۳۱) نتايج حاصل از يک تحقيق ديگرحاكي از اين است كه سطوح بالاي استراديول ممكن است يک نقش رقابتي انتخابي با گيرنده هاي دوپامينرژيک و آلفا-آدرنژيک در غشاهاي سلولي ايفا كرده (۵) و از اين طريق باعث كاهش عملكرد و بروز آن در تستهاي رفتاري گردد.

اين گزارشات در راستاي نتايج به دست آمده از مطالعه فعلي بوده و مي توانند از علل عدم تاثير دوز نيم ميكرو گرم استراديول در مقايسه با دوز يک ميكروگرم و همچنين اثر تخريبي دوز دو ميكرو گرم در مقايسه با دوز هاي ديگر باشند.

۵- نتيجه گيري

در مجموع با توجه به نتايج حاصل از اين مطالعه مي توان گفت تخمدان زدايي اثر منفي بر حافظه اجتنابي غير فعال دارد. استراديول از هورمونهاي موثر بر يادگيري وحافظه است كه داراي اثرات تعديل كننده عصبي (Neuromodulatory) مي باشد، اما با توجه به نتايج اين تحقيق و مطالعات ديگر ذكر اين مورد ضروري است كه پاسخ ايجاد شده به اثرات مركزي استراديول به طور وابسته به عواملي ازقبيل ميزان هورمون مورد تجويز (كه در اين تحقيق مشاهده گرديد)، مدت زمان درمان، محل تجويز و نوع حافظه اي كه مورد سنجش قرار مي گيرد متفاوت خواهد

بود. علیرغم اینکه برخي از مکانیسمهاي درگیر در این اعمال مورد شناسایي قرار گرفته اند، اما تحقیقات بیشتري مورد نیاز است تا بتوان نقش این هورمون ومکانیسم عمل وابسته به دوز آن را در نواحي متفاوت سیستم عصبي مرکزي که در گیر در تشکیل انواع حافظه مي باشند از جمله: هیپوکامپ، استریاتوم، آمیگدال و کورتکس پره فرونتال مشخص نمود.

۶- تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از همکاري هاي صمیمانه پرسنل محترم آزمایشگاه فیزیولوژي و مسوولین محترم مرکز تحقیقات کاربردي- داروئي دانشگاه علوم پزشکي تبریز در انجام این طرح تحقیقاتي، نهایت سپاس را دارند.

7- References:

1. Mc Ewen B. Estrogens actions throughout the brain. Recent Prog Horm Res., 2002, 57: 357-384.
2. Sandstorm N.J., Williams C.L. Spatial memory retention is enhanced by acute and continuous estradiol replacement. Horm. Beh., 2004,45 (2): 128-135.
3. Fugger H.N., Foster T.C., Gustafsson J.A., Rissman E.F. Novel effects of estradiol and estrogen receptor α and β on cognitive function. Brain Res., 2000, 883 (2): 258-264.
4. Li P.K., Rhodes M.E., Jagannathan S., Hohnson D.A. Reversal of scopolamine induced amnesia in rats by the steroid sulfatase inhibitor estrone-3-O-sulfamate, Cog. Brain Res., 1995, 2: 251-254.
5. Zanatta M.S., Quillfeldt J.H., Schaeffer E., Schmitz P.K., Quevedo J., Medina J.H., Izquierdo I. Involvement of the hippocampus, amygdale, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. Braz. J Med. Biol. Res., 1997, 30(2): 135-140.
6. Galea L.A.M., Wide J.K., Paine T.A., Holmes M.M., Ormerod B.K., Floresco S.B. High levels of estradiol disrupt conditioned place perference learning, stimulus response learning and reference memory but have limited effects on working memory. Beh. Brain Res., 2001, 126(1-2): 115-126.
7. Bi R., Foy M.R., Vouimba R.M., Thompsom R.F., Baudry M. Cyclic changes in estradiol regulates synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. Neurobiol., 2001,98(23): 13391-13395.
8. Gould E., Woolley C.S., Frankfurt M., Mc Ewen B.S. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. J Neurosci., 1990,10(4): 1286-1291.
9. Woolley C.S. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. Horm. Beh., 1998,34(2): 140-148.
10. Woolley C.S. Elecetrophysiological and cellular effects of estrogen on neural function. Crit. Rev. Neurobiol., 1999, 13(1): 1-20.
11. Foy M.R., Xu J., Xie X., Brintone R.D., Thompson R.F., Berger T.W. 17β-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation, The American Physiol. Soc., 1999, 81(2) : 925-929.
12. Varga H., Nemeth H., Toth T., Kis Z., Farkas T., Toldi J. Weak if any effect of estrogen on spatial memory in rats. Acta. Biologica. Scegediensis. 2002, 46: 13-16.
13. Cutter W.J., Norbury R., Myrphy D.G.M. Oestrogen, Brain function and neuropsychiatric disorder. J Neurol. Neurosurg. Psychat., 2003,74 (7): 837-840.
14. Vazquez-Pereyra F., Rivas-Arancibia S., Castillo A.L.D., Shcneider-Rivas S. Modulation of short term and long term memory by steroid sexual hormones. Pharmacol. Let., 1995,56(14): 255-260.
15. Sato T., Teramoto T., Tanaka K., Ohnishi Y., Irifune M., Nishikawa T. Effects of ovariectomy and calcium deficiency on learning and memory of eight-arm radial maze in middle-aged female rats. Beh. Brain Res., 2003,142(1-2): 207-216.
16. Levinoff E.L., Chertkow H. The biological and cognitive effects of estrogen on the aging brain, Drug & Aging. 2002,5: 41-44.
17. Zamani M.R., Levy W.B., Desmond N.L. Estradiol increases delayed N-methyl-D-aspartate receptor-mediatedexcitation in the hippocampal CA1 region. Neurosci., 2004,129(1): 243-254.
18. Warren S.G., Humphery S.A.G., Juraska J.M., Greenough W.T. LTP varies across the estrus cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. Brain Res., 1995, 703(1-2): 26-30.
19. Desmond N.L., Zhang D.X., Levy W.B. Estradiol enhances the induction of homosynaptic long-term depressiol in the CA1 region of the adult ovariectomized rat. Neurobiol. Learn. Mem., 2000, 73: 180-187.
20. Warren S., Juraska J. Spatial and nonspatial learning across the rat estrus cycle. Beh. Neurosci., 1997,111(2): 259-266.
21. Frye C. Estrus-associated decrements in water maze task are limited to acquisition. Physiol. Beh., 1995, 57(1): 5-14.
۲۲. گشادرو فاطمه، جرجاني معصومه. تاثیر سیکل استروس، تخمدان زدائي و تیمار با استرادیول روي یادگیري شرطي غیرفعال در موش صحرائي ماده. فیزیولوژي و فارماکولوژي.۱۳۸۳، شماره ۸،ص۲۱-۱۳.
23. Leuner B., Mendolia-Loffredo S., Shors, T. 2004. High levels of estrogen enhance associative memory formation in OVX females. Psychoneuroendocrinology ,2004,29 (7): 883–890.
24. Iivonen S., Heikkinen T., Puolivali S., Helisalmi M., Hiltunen M., Soininen H., Tanila H. Effects of estradiol on spatial learning, hippocampal cytochrome P450 19, and estrogen alpha and beta mRNA levels in ovariectomized female mice. Neuroscience, 2006, 137 (4): 1143–1152.
25. Guerrero G.R., Garcia M.V., Elias-Vinas D., Donatti-Albarran O.A., Guevara-Guzman R. Effects of 17 b-estradiol and extremely low-frequency electromagnetic fields on social recognition memory in female rats: A possible interaction?, Brain Res.,2006, 1095(1):131-138.
26. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Vol.2, Acad. Press, New York, (1986).

27. Rebas E., Lachowicz L., Lachowicz A. Estradiol modulates the synapsins phosphorylation by various protein kinase in the rat brain under in vitro and in vivo conditions. J Physiol. Pharmacol., 2005, 56(1): 39-48.
28. Wood G.E., Shors T.J. Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. Proc. Natl. Acad. Sci., 1998, 95(7): 4066-4071.
29. Gazzaley A.H., Kay S., Benson D.L. Dendritic spine plasticity in hippocampus. J Neurosci., 2002,111(4): 853-862.
30. Bourtchuladze R., Frenguelli B., Blendy J., Cioff D., Schutz G., Silva A.J. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. Cell, 1994, 79 (1): 59-68.
31. Gazzaley A.H., Weiland N.G., McEwen B.S., Morrison J.H. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. J Neurosci., 1996,16 (21): 6830-6838.
32. Adams M.M., Morrison J.H., Gore A.C. N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels change during reproductive senescence in the hippocampus of female rats. Exp. Neurol., 2001, 170(1): 171-179
33. Gu Q., Moss R.L. 17β-estradiol potentiates kinate-induced currents via activation of the cAMP cascade. J Neurosci., 1996,16: 3620-3629.
34. Monteiro S.C., Matte C., Delwing D., Wyse A.T.S. Ovariectomy increases Na-K-ATPase, acetylecholine and catalase in rat hippocampus. Mol. Cell. Endocrinol., 2005,236(1-2): 9-16.
35. Becker J.B. Estrogen rapidly potentiates amphetamine-induced striatal dopamine release and rotational behavior during microdialysis. Neurosci. Lett., 1990, 118(2):169–71.
36. McDermott JL. Effects of estrogen upon dopamine release from the corpus striatum of young and aged female rats. Brain Res., 1993, 606(1):118–25.
37. Schafe G.E., Atkins C.M., Swank M.W., Bauer E.P., Sweatt J.D., LeDoux J.E. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdale is required for memory consolidation of Pavolovian fear conditioning. J Neurosci., 2000,20(21): 8177-8187.
38. Berry B., McMahan R., Gallagher M. Spatial Learning and Memory at Defined Points of the Estrous Cycle: Effects on Performance of a Hippocampal-Dependent Task. Behavioral Neuroscience, 1997, 111(2): 267-274.
39. Frick K.M., Berger-Sweeney J. Spatial Reference Memory and Neocortical Neurochemistry Vary With the Estrous Cycle in C57BL/6 Mice. Behavioral Neuroscience, 2001,115 (1): 229-237
40. Gu Q., Korach K.S., Moss R.L. Rapid action of 17β-estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. Endocrinol. Soc., 1999, 140(2): 660-666.
41. Wong M., Thompson T.L., Moss R.L. Nongenomic actions of estrogen in the brain: physiological significance and cellular mechanisms. Crit. Rev. Neurobiol., 1996, 10 (2): 189-203.
42. Cyr M., Ghribi O., Di Paolo T. Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. J Neuroendocrin., 2000,12 (5):445–52.