

## بررسی اثرات متقابل کورتیکوسترون، استرس حاد و گیرنده‌های 5-HT<sub>6</sub> سیستم سروتونرژیک بر بازتثبیت حافظه ترس در موش سفید آزمایشگاهی

رجب محمد رضایی<sup>۱</sup> (Ph.D Student)، رضا پورعلی<sup>۲،۳</sup> (M.D)، عبدالحسین شیروی<sup>۱</sup> (Ph.D)، علی رشیدی پور<sup>۲،۳</sup> (Ph.D)، عباسعلی وفاپی<sup>۲،۳</sup> (Ph.D)

۱ - دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد دامغان، دامغان، ایران

۲ - مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳ - گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۰

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳ ۲۳۶۵۴۱۸۴ aavaf43@gmail.com

### چکیده

هدف: مطالعات اخیر نشان داده که احتمالاً فعالیت گیرنده‌های سروتونرژیک می‌تواند اثرات ناشی از گلوکوکورتیکوئیدها را در فرایندهای رفتاری تعدیل نماید. هدف این مطالعه تعیین نقش گیرنده‌های سروتونرژیک (5-HT<sub>6</sub>) بر اثرات کورتیکوسترون و استرس حاد بر روند بازتثبیت حافظه ترس در موش سفید آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی موش‌های سوری در مدل یادگیری احترازی غیر فعال آموزش داده شدند (شوک ۱ میلی آمپر برای مدت ۳ ثانیه). اعمال استرس حاد (با کمک محدودکننده به مدت ۱۰ دقیقه) یا تزریق داخل صفاقی کورتیکوسترون (۳ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن) بلافاصله بعد از تست فعال‌سازی حافظه انجام شد. برای ارزیابی اثر متقابل از تزریق SC203575 به عنوان آگونیست گیرنده سروتونرژیک (5-HT<sub>6</sub>) و SB271046 به عنوان آنتاگونیست گیرنده سروتونرژیک (5-HT<sub>6</sub>)، ۱ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن به صورت داخل صفاقی به حیوان تزریق شد. در ارزیابی باز تثبیت حافظه بلافاصله بعد از فعال‌سازی حافظه، حیوانات استرس یا داروها را داخل صفاقی دریافت نمودند و حافظه موش‌ها در طی چندین تست متوالی در طی روزهای ۵، ۸، ۱۰ و ۱۲ بعد از فعال‌سازی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کورتیکوسترون یا اعمال استرس حاد به تنهایی موجب اختلال در بازتثبیت حافظه نسبت به گروه کنترل شد. تزریق هر دو آگونیست و آنتاگونیست گیرنده سروتونرژیک، اثرات کورتیکوسترون و استرس حاد را بر باز تثبیت حافظه مهار کرد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که گیرنده‌های سروتونرژیک و به‌ویژه 5-HT<sub>6</sub> اثرات استرس حاد و کورتیکوسترون را بر باز تثبیت حافظه تعدیل می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: کورتیکوسترون، استرس حاد، بازتثبیت حافظه، حافظه ترس، دستگاه احترازی غیر فعال، گیرنده سروتونرژیک، 5-HT<sub>6</sub>

### مقدمه

پیروی می‌کند یعنی غلظت‌های خیلی بالا یا خیلی پایین کورتیکوسترون اثر مخرب و غلظت متوسط اثر بهبوددهنده دارند. هم‌چنین مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تجویز گلوکوکورتیکوئیدها بلافاصله بعد از آموزش باعث تسهیل تثبیت اطلاعات می‌شود. به این ترتیب که غلظت‌های خیلی پایین کورتیکوسترون مثل آدرنالکتومی یا غلظت‌های خیلی بالا همانند غلظت آن‌ها طی استرس شدید باعث اختلال در تثبیت اطلاعات می‌شود اما در صورتی که غلظت کورتیکوسترون متوسط باشد مثلاً در استرس خفیف باعث تسهیل تثبیت اطلاعات

مطالعات قبلی نشان داده که گلوکوکورتیکوئیدها و استرس حاد بر فازهای مختلف حافظه دارای اثرات متفاوتی می‌باشند و دیده شده که در فازهای اکتساب و تثبیت دارای اثرات تسهیلی، در حالی که در فاز به خاطرآوری این اثرات با اختلال در حافظه همراه است. نتیجه این مطالعات نشان داد که استرس و گلوکوکورتیکوئیدها باعث بهبود فاز اکتساب و تثبیت حافظه می‌شوند [۱] و این اثر از رابطه‌ی دوز-پاسخ به شکل U معکوس

می‌شود. [۲]. در مطالعه که برای ارزیابی اثر گلوکوکورتیکوئیدها بر روی تثبیت اطلاعات انجام گرفت از ادرنالکتومی در موش‌ها به دو روش جراحی و شیمیایی استفاده شد که نتایج آن‌ها نشان داد که بعد از ادرنالکتومی به روش جراحی موش‌ها دچار اختلال در تثبیت حافظه در مدل احترازی غیر فعال می‌شوند [۳]. تزریق متی‌راپون به عنوان مهارگر سنتز گلوکوکورتیکوئیدی منجر به اختلال در تثبیت اطلاعات در مدل‌های Fear conditioning و ماز آبی موریس می‌شود. تجویز آنتاگونیست‌های اختصاصی گلوکوکورتیکوئیدی (RU38486) باعث اختلال در تثبیت حافظه در مدل ماز آبی موریس می‌شود [۴].

هم‌چنین گلوکوکورتیکوئیدها و یا استرس حاد در فاز به خاطرآوری در مدل احترازی غیر فعال باعث اختلال در به خاطرآوری اطلاعات می‌شوند [۵]. مطالعات نشان داده که اثر گلوکوکورتیکوئیدها بر این فرایند از طریق فعال کردن گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی صورت می‌گیرد و به نظر می‌رسد اثر آن‌ها از طریق گیرنده‌های سطح سلولی و غیر ژنی اعمال شود و احتمالاً سنتز پروتئین ناشی از اثرات ژنی این هورمون‌ها در ایجاد اثرات مخرب آن‌ها بر به خاطرآوری نقش ندارد [۶]. در فاز بازتثبیت شواهد نشان داده که عواملی مثل (Post Traumatic Stress Disorder, PTSD) باعث اختلال این فرایند می‌شود. از طرفی در مطالعات اخیر به تاثیر گلوکوکورتیکوئیدها در درمان اختلالات حافظه مثل PTSD اشاره شده که ناشی از مهار بازتثبیت و تسهیل خاموشی است [۷]. نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که مهار سنتز گلوکوکورتیکوئیدها توسط متی‌راپون [۸] و یا تزریق محیطی و داخل هیپوکمپی آنتاگونیست گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی باعث تخریب بازتثبیت حافظه‌ی ترس می‌شود [۹] و تزریق محیطی یا داخل هیپوکمپی اسپیرینولاکتونوبه عنوان آنتاگونیست گیرنده مینرالوکورتیکوئید بر بازتثبیت حافظه بی‌اثر بوده است [۱۰]. بر اساس این یافته‌ها گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی نقش مهمی در بازتثبیت حافظه ایفا می‌کنند و بلوک گیرنده‌ی گلوکوکورتیکوئیدی در هیپوکمپ به صورت وابسته به دوز باعث مهار بازتثبیت حافظه می‌شود بنابراین هیپوکمپ نقش مهمی در بازتثبیت حافظه ایفا می‌کند. هم‌چنین اثرات بلوک گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی روی بازتثبیت حافظه نیازمند فعال‌سازی حافظه است چون در صورت عدم فعال‌سازی حافظه اثر RU38486 روی بازتثبیت حافظه ظاهر نمی‌شود و اثرات RU38486 پایدار است [۴].

سروتونین در عملکرد شناختی به خصوص یادگیری و حافظه نقش دارد [۱۱]. در بیماران افسرده‌ای که میزان سروتونین در مغز آن‌ها کاهش پیدا کرده اغلب اختلالات شناختی یافت می‌شود. در یک مدل فارماکولوژیک که طی آن نقش سیستم سروتونرژیک مورد ارزیابی قرار گرفت نتایج نشان داد که کاهش مرکزی سروتونین سنتز از طریق حذف ال-تریپتوفان در افراد سالم در اختلالات شناختی نقش دارد. در این مطالعه اثر حذف تریپتوفان بر عوامل شناختی ارزیابی شد و نتایج نشان داد که حذف تریپتوفان باعث اختلال عملکرد حافظه بلندمدت در همه بیماران شد. ولی حافظه کوتاه‌مدت و عملکرد سایکوموتور بدون تغییر باقی ماندند. بر پایه نتایج این مطالعات حذف تریپتوفان در نتیجه کاهش ناگهانی سروتونین در مغز به طور ویژه باعث اختلال در شکل‌گیری حافظه می‌شود [۱۲].

مطالعات قبلی نشان داده در بیماران دچار افسردگی شدید، کورتیزول و آگروژن باعث اختلال موقت عملکرد حافظه می‌شود. یافته‌ها نشان می‌دهد کاهش عملکرد حافظه در بیماران مبتلا به افسردگی شدید با گلوکوکورتیکوئیدها تنظیم می‌شود علت احتمالی این یافته این است که تغییر در سطح گلوکوکورتیکوئیدها در هیپوکمپ یا دیگر نواحی مغزی باعث کاهش حافظه می‌شود [۱۳]. مطالعات نشان داده که به دنبال اختلال عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال تقایص شناختی بروز می‌کند و به دنبال استفاده از آنتاگونیست گیرنده سروتونرژیک این تقایص بر طرف می‌شود و پیشنهاد شد که از آنتاگونیست مذکور می‌توان برای درمان اختلالات حافظه به دنبال استرس ناشی از اختلالات سایکولوژیک استفاده نمود [۱۴]. هم‌چنین دیده شده که کاهش سطح گلوکوکورتیکوئیدها به دنبال آدرنالکتومی موجب افزایش چشمگیری در بیان ژن گیرنده‌های سروتونرژیک (5-HT<sub>6</sub>) در هیپوکمپ می‌شود بر این اساس پیشنهاد شده که گلوکوکورتیکوئیدها در تعدیل عملکرد این گیرنده‌ها نقش اساسی دارند [۱۵].

نتایج مطالعات فوق نشان می‌دهد که بین فعالیت گیرنده‌های سروتونرژیک و به‌ویژه نوع 5-HT<sub>6</sub> و گلوکوکورتیکوئیدها و استرس حاد بر فازهای مختلف حافظه (به خاطرآوری، باز تثبیت و فراموشی)، احتمالاً اثرات متقابل فراوانی وجود دارد که طی بررسی‌های منابع اطلاع‌رسانی این اثرات در خصوص فرایند باز تثبیت حافظه مورد ارزیابی قرار نگرفته است. بر این اساس در این مطالعه اثرات بر روند بازتثبیت حافظه مورد ارزیابی قرار گرفت. ضمناً یکی از مدل‌های مورد استفاده برای ارزیابی حافظه دستگاه احترازی غیر فعال می‌باشد و بر اساس آن می‌توان حافظه ترس حیوان را که بر مبنای شوک دریافتی و احتراز از ورود به ناحیه تاریک که در طی آموزش به‌دست آمده ارزیابی نمود. از طرفی برای ارزیابی اثر متقابل سیستم سروتونرژیک از آگونیست اختصاصی گیرنده 5-HT<sub>6</sub> آن (SC203575) که با تزریق آن گیرنده‌های سروتونرژیک بیش‌تر تحریک شده و از آنتاگونیست

می‌شود [۲]. در مطالعه که برای ارزیابی اثر گلوکوکورتیکوئیدها بر روی تثبیت اطلاعات انجام گرفت از ادرنالکتومی در موش‌ها به دو روش جراحی و شیمیایی استفاده شد که نتایج آن‌ها نشان داد که بعد از ادرنالکتومی به روش جراحی موش‌ها دچار اختلال در تثبیت حافظه در مدل احترازی غیر فعال می‌شوند [۳]. تزریق متی‌راپون به عنوان مهارگر سنتز گلوکوکورتیکوئیدی منجر به اختلال در تثبیت اطلاعات در مدل‌های Fear conditioning و ماز آبی موریس می‌شود. تجویز آنتاگونیست‌های اختصاصی گلوکوکورتیکوئیدی (RU38486) باعث اختلال در تثبیت حافظه در مدل ماز آبی موریس می‌شود [۴].

هم‌چنین گلوکوکورتیکوئیدها و یا استرس حاد در فاز به خاطرآوری در مدل احترازی غیر فعال باعث اختلال در به خاطرآوری اطلاعات می‌شوند [۵]. مطالعات نشان داده که اثر گلوکوکورتیکوئیدها بر این فرایند از طریق فعال کردن گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی صورت می‌گیرد و به نظر می‌رسد اثر آن‌ها از طریق گیرنده‌های سطح سلولی و غیر ژنی اعمال شود و احتمالاً سنتز پروتئین ناشی از اثرات ژنی این هورمون‌ها در ایجاد اثرات مخرب آن‌ها بر به خاطرآوری نقش ندارد [۶]. در فاز بازتثبیت شواهد نشان داده که عواملی مثل (Post Traumatic Stress Disorder, PTSD) باعث اختلال این فرایند می‌شود. از طرفی در مطالعات اخیر به تاثیر گلوکوکورتیکوئیدها در درمان اختلالات حافظه مثل PTSD اشاره شده که ناشی از مهار بازتثبیت و تسهیل خاموشی است [۷]. نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که مهار سنتز گلوکوکورتیکوئیدها توسط متی‌راپون [۸] و یا تزریق محیطی و داخل هیپوکمپی آنتاگونیست گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی باعث تخریب بازتثبیت حافظه‌ی ترس می‌شود [۹] و تزریق محیطی یا داخل هیپوکمپی اسپیرینولاکتونوبه عنوان آنتاگونیست گیرنده مینرالوکورتیکوئید بر بازتثبیت حافظه بی‌اثر بوده است [۱۰]. بر اساس این یافته‌ها گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی نقش مهمی در بازتثبیت حافظه ایفا می‌کنند و بلوک گیرنده‌ی گلوکوکورتیکوئیدی در هیپوکمپ به صورت وابسته به دوز باعث مهار بازتثبیت حافظه می‌شود بنابراین هیپوکمپ نقش مهمی در بازتثبیت حافظه ایفا می‌کند. هم‌چنین اثرات بلوک گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی روی بازتثبیت حافظه نیازمند فعال‌سازی حافظه است چون در صورت عدم فعال‌سازی حافظه اثر RU38486 روی بازتثبیت حافظه ظاهر نمی‌شود و اثرات RU38486 پایدار است [۴].

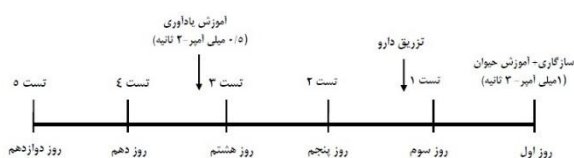
سروتونین در عملکرد شناختی به خصوص یادگیری و حافظه نقش دارد [۱۱]. در بیماران افسرده‌ای که میزان سروتونین در مغز آن‌ها کاهش پیدا کرده اغلب اختلالات شناختی یافت

می‌شود. این روش برای دو بار دیگر در فواصل ۳۰ دقیقه‌ای تکرار می‌گردد.

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

ج- تست به خاطر آوری: ۴۸ ساعت بعد از آموزش تست به خاطر آوری انجام می‌شود. حیوان در قسمت روشن پشت به درب قرار داده می‌شود و پس از چرخیدن موش به طرف درب، درب باز می‌شود. زمانی که طول می‌کشد (Step-through latency, STL) تا حیوان برای اولین بار وارد قسمت تاریک شود به طور اتوماتیک توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود [۱۷].

د- تست بازتثبیت حافظه: بر اساس پروتوکل شکل ۱ انجام شد.



شکل ۱. برنامه زمانی اجرای کار

#### نحوه ایجاد استرس حاد

برای این منظور حیوانات در زمان مشابه با دریافت کورتیکوسترون به مدت ۱۰ دقیقه در یک تیوپ پلکسی گلاس محدودکننده قرار گرفتند [۱۸].

#### آزمایش‌ها و گروه‌های مختلف آزمایشی

آزمایش ۱: هدف این آزمایش تعیین تعامل SC203575 و SB271046 (به عنوان آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های سروتونرژیک 5-HT<sub>6</sub>) و کورتیکوسترون بر باز تثبیت حافظه ترس است (n=۶۰ در ۶ گروه).

در بررسی باز تثبیت حافظه بلافاصله بعد از فعال‌سازی حافظه داروی ۱ و بعد داروی ۲ تزریق شد.

گروه ۱: حامل + حامل (n=۱۰)

گروه ۲: حامل + کورتیکوسترون (۳ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن حیوان) (n=۱۰)

گروه ۳: SC203575 (۱ میلی‌گرم) + حامل (n=۱۰)

گروه ۴: SC203575 (۱ میلی‌گرم) + کورتیکوسترون (۳ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن حیوان) (n=۱۰)

گروه ۵: SB271046 (۱ میلی‌گرم) + حامل (n=۱۰)

اختصاصی گیرنده 5-HT<sub>6</sub> آن (SB271046) که با تزریق آن گیرنده‌های سروتونرژیک بلوک می‌شوند استفاده گردید [۱۴].

### مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده و طی آن از ۱۲۰ سر موش‌های سوری (آلبینو) نر در محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم استفاده شد. حیوانات از مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان تهیه گردید و در قفس‌های ۱۰ تایی با سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و میزان آب و غذای کافی نگهداری شدند. این مطالعه بر اساس مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سمنان (کد: ۹۰/۷۹۰۱۸ مورخه ۱۳۹۰/۴/۱۸) اجرا شده است.

#### داروها

کورتیکوسترون با دوز ۳ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن حیوان به عنوان بهترین دوز به دست آمده طی مطالعات قبلی، بلافاصله بعد از تست فعال‌سازی حافظه در جهت ارزیابی باز تثبیت تزریق شد [۹]. SC203575 و SB271046 (۱ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم) به ترتیب به عنوان آگونیست و آنتاگونیست‌های گیرنده سروتونرژیک 5-HT<sub>6</sub> بلافاصله بعد از تست فعال‌سازی تزریق شدند [۱۶].

#### دستگاه احترازی غیر فعال

دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال یک محفظه پلکسی گلاس مکعب مستطیل با طول ۴۰ سانتی‌متر، عرض ۱۰ سانتی‌متر در قسمت بالا و کف و ۱۶ سانتی‌متر ارتفاع می‌باشد. دستگاه توسط یک درب گیوتینی به دو قسمت روشن به طول ۱۹ سانتی‌متر و تاریک ۲۱ سانتی‌متر تقسیم می‌شود. در کف هر دو بخش میله‌های ضد زنگ به فاصله نیم 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 و ضمناً باز شدن درب گیوتینی و سنسور زمان‌های حضور حیوان در نواحی تاریک و روشن به صورت تعریف شده و اتوماتیک انجام می‌شود.

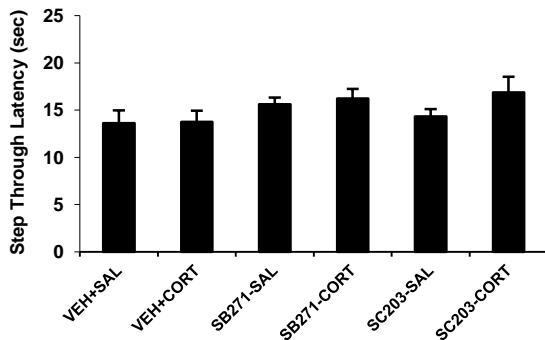
#### آموزش یادگیری احترازی غیرفعال

الف- سازش‌یافتن: هر موش ابتدا در قسمت روشن دستگاه پشت به درب قرار داده می‌شود و وقتی که به طرف درب می‌چرخد درب باز می‌شود و اجازه داده می‌شود حیوان وارد قسمت تاریک شود. سپس بلافاصله درب بسته می‌شود و حیوان پس از چند ثانیه از قسمت تاریک گرفته و به قفس بازگردانیده

گروه‌ها (۱ میلی‌گرم) + کورتیکوسترون (۳ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن حیوان) (n=۱۰) آزمایش ۲: هدف این آزمایش تعیین تعامل SC203575 و SB271046 (به عنوان آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های سروتونرژیک 5-HT<sub>6</sub>) و استرس حاد بر باز تثبیت حافظه ترس است (n=۶۰ در ۶ گروه). در بررسی باز تثبیت حافظه بلافاصله بعد از فعال‌سازی حافظه داروی ۱ و سپس استرس حاد دریافت نمودند.

گروه ۱: حامل + بدون استرس (n=۱۰)  
گروه ۲: حامل + استرس (n=۱۰)  
گروه ۳: SC203575 (۱ میلی‌گرم) + بدون استرس (n=۱۰)  
گروه ۴: SC203575 (۱ میلی‌گرم) + استرس (n=۱۰)  
گروه ۵: SB271046 (۱ میلی‌گرم) + بدون استرس (n=۱۰)  
گروه ۶: SB271046 (۱ میلی‌گرم) + استرس (n=۱۰)

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. چون توزیع داده‌ها نرمال بود از آنالیز واریانس (یک طرفه یا سه طرفه بر حسب نوع Data) و روش Repeated measurement (به دلیل تست موش‌ها در روزهای متوالی) و تست بعدی توکی استفاده شد. از آنالیز واریانس سه طرفه برای بررسی اثرات متقابل SC203575، SB271046 و کورتیکوسترون یا استرس حاد استفاده شد.



شکل ۲. زمان ورود به قسمت تاریک در طی آموزش در گروه‌هایی که بلافاصله بعد از فعال‌سازی حافظه کورتیکوسترون و هم‌زمان SC203575 یا SB271046 دریافت کردند. محور عمودی میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین را نشان می‌دهد. VEH: Vehicle SAL: Saline CORT: Corticosterone

شکل ۴ اثرات متقابل تزریق SC203575 به عنوان آگونیست و SB271046 به عنوان آنتاگونیست گیرنده سروتونرژیک و اعمال استرس حاد بر باز تثبیت حافظه را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس سه طرفه (تست‌ها  $\times$  مداخله  $\times$  گروه) دریافت یا عدم دریافت استرس)) با اندازه‌گیری تکراری حاکی از اثر معنی‌دار گروه‌ها (F<sub>1,42</sub> = ۲۶/۸۱، P < ۰/۰۰۰۱) عدم اثر معنی‌دار مداخله (F<sub>۲,۴۲</sub> = ۰/۱۶، P = ۰/۸۴) اثر معنی‌دار تست‌ها (F<sub>۱۶,۴۲</sub> = ۱۹/۳۸، P = ۰/۰۰۰۱) و تعامل معنی‌دار بین گروه و مداخله (F<sub>۲,۴۲</sub> = ۵/۰۵، P = ۰/۰۱) هم‌چنین عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و تست‌ها (F<sub>۲,۴۲</sub> = ۲/۲۵، P = ۰/۰۶) و عدم تعامل معنی‌دار بین مداخله و تست‌ها (F<sub>۱,۴۲</sub> = ۰/۸۳، P = ۰/۵۷) و عدم تعامل معنی‌دار بین سه متغیر فوق است (F<sub>۱۶,۴۲</sub> = ۰/۲۶، P = ۰/۹۷۸).

## نتایج

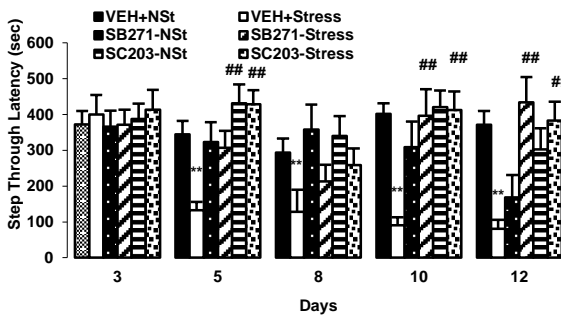
ارزیابی اثرات متقابل تزریق SB271046 و SC203575

کورتیکوسترون بر باز تثبیت حافظه

شکل ۲ اثرات متقابل تزریق SC203575 به عنوان آگونیست و SB271046 به عنوان آنتاگونیست گیرنده سروتونرژیک و تزریق محیطی کورتیکوسترون را بر باز تثبیت حافظه در طی دوره آموزش نشان می‌دهد. ملاک ارزیابی حافظه زمانی بود که طول می‌کشید تا حیوان وارد قسمت تاریک دستگاه شود. آنالیز واریانس یک طرفه زمان ورود حیوانات به داخل محفظه تاریک در طی آموزش حاکی از عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها (F<sub>۵,۴۲</sub> = ۰/۴۸، P = ۰/۷۸) بود (شکل ۱). این یافته نشان‌دهنده همگون بودن گروه‌ها است.

شکل ۳ اثرات متقابل تزریق SC203575 به عنوان آگونیست و SB271046 به عنوان آنتاگونیست گیرنده سروتونرژیک و تزریق محیطی کورتیکوسترون بر باز تثبیت حافظه را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس سه طرفه (تست‌ها  $\times$  مداخله) دریافت حامل یا آگونیست و آنتاگونیست  $\times$  گروه (دریافت حامل یا کورتیکوسترون)) با اندازه‌گیری تکراری حاکی از اثر معنی‌دار

آنالیز بعدی نشان داد که استرس حاد موجب اختلال در بازتثبیت حافظه شده است و پیش درمانی SC203575 و SB271046 موجب مهار اثرات استرس حاد بر بازتثبیت حافظه ترس شده است. به گونه‌ای که تفاوت بین گروه‌های دریافت‌کننده حامل + استرس حاد و SC203575 + استرس حاد و SB271046 + استرس حاد معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ) (شکل ۵).



شکل ۵. اثرات متقابل تزریق SC203575 و SB271046 و اعمال استرس حاد بر بازتثبیت حافظه در مدل احترازی غیر فعال می‌باشد. محور عمودی میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین را در مورد تاخیر زمان ورود به قسمت تاریک در طی تست فعال سازی و در طی تست های ارزیابی بازتثبیت (T1-T5) را نشان می‌دهد.  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه دریافت‌کننده حامل + بدون استرس  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه دریافت‌کننده حامل + استرس حاد

## بحث و نتیجه‌گیری

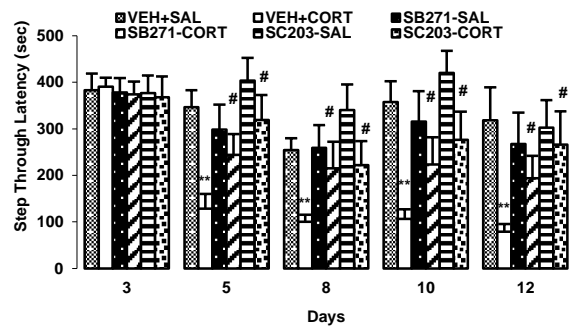
### یافته‌های اصلی

۱- تزریق محیطی کورتیکوسترون و اعمال استرس حاد محدود کننده منجر به اختلال بازتثبیت حافظه ترس می‌شود.  
۲- تزریق آگونیست SC203575 و آنتاگونیست SB271046، گیرنده  $5-HT_6$  اثرات هر دو کورتیکوسترون و استرس حاد را روی بازتثبیت حافظه ترس مهار می‌کند.

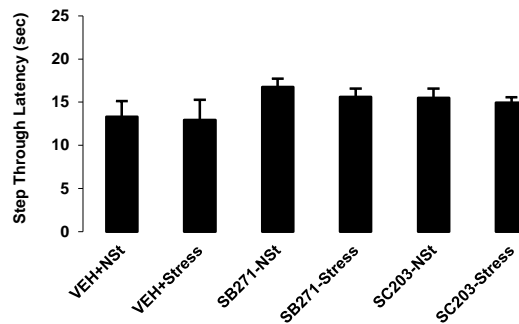
اثرات گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی بر بازتثبیت حافظه نتایج این مطالعه نشان داد که سیستم گلوکوکورتیکوئیدی نقش مهمی در بازتثبیت حافظه ترس بعد از فعال‌سازی حافظه بازی می‌کند. مطالعات انجام شده قبلی نشان داده‌اند که استرس و گلوکوکورتیکوئیدها با توجه به دوز خود می‌توانند اثرات تسهیل‌کنندگی یا اختلالی بر روند بازتثبیت حافظه داشته باشند [۲].

در این مطالعه ما مشاهده کردیم که تزریق محیطی کورتیکوسترون به عنوان لیگاند گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی منجر به اختلال بازتثبیت حافظه ترس شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی نقش مهمی در بازتثبیت حافظه بازی می‌کنند.

یافته‌های ما با مطالعات قبلی در این زمینه هم‌خوانی دارد. مطالعات قبلی در حیوانات آزمایشگاهی نشان داده است که تزریق محیطی گلوکوکورتیکوئیدها با دوزی که ما استفاده کردیم



شکل ۳. اثرات متقابل تزریق SC203575 و SB271046 و تزریق محیطی کورتیکوسترون بر بازتثبیت حافظه در مدل احترازی غیر فعال می‌باشد. محور عمودی میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین را در مورد تاخیر زمان ورود به قسمت تاریک در طی تست فعال سازی و در طی تست های ارزیابی بازتثبیت (T1-T5) را نشان می‌دهد.  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه دریافت‌کننده حامل + سالیین و  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه دریافت‌کننده حامل + سالیین و  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دریافت‌کننده حامل + کورتیکوسترون



شکل ۴. زمان ورود به قسمت تاریک در طی آموزش در گروه‌هایی که بلافاصله بعد از فعال‌سازی حافظه SC203575 یا SB271046 و استرس حاد به مدت ۱۰ دقیقه دریافت کردند. محور عمودی میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین را نشان می‌دهد. St: Stress

ارزیابی اثرات متقابل تزریق SC203575 و SB271046 و استرس حاد بر بازتثبیت حافظه

شکل ۵ اثرات متقابل تزریق SC203575 به عنوان آگونیست و SB271046 به عنوان آنتاگونیست گیرنده سروتونرژیک و اعمال استرس حاد بر بازتثبیت حافظه را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس سه طرفه (تست‌ها  $\times$  مداخله  $\times$  گروه) دریافت عدم دریافت استرس) با اندازه‌گیری تکراری حاکی از اثر معنی‌دار گروه‌ها ( $F_{1,42} = 26/81, P < 0.0001$ )، عدم اثر معنی‌دار مداخله ( $F_{2,42} = 0/16, P = 0/84$ )، اثر معنی‌دار تست‌ها ( $F_{2,42} = 0/16, P = 0/84$ )، و تعامل معنی‌دار بین گروه و مداخله ( $F_{2,168} = 19/38, P = 0/01$ ) هم‌چنین عدم تعامل معنی‌دار بین گروه و تست‌ها ( $F_{2,168} = 2/25, P = 0/06$ ) و عدم تعامل معنی‌دار بین مداخله و تست‌ها ( $F_{8,168} = 0/83, P = 0/57$ ) و عدم تعامل معنی‌دار بین سه متغیر فوق است ( $F_{8,168} = 0/26, P = 0/978$ )

SC203575 و SB271046 اثرات تخریبی کورتیکوسترون و استرس حاد را بر بازتثبیت حافظه مهار می‌نماید. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که SC203575 به عنوان آگونیست و SB271046 به عنوان آنتاگونیست گیرنده سروتونرژیک 5-HT6، موجب مهار اثرات اختلالی کورتیکوسترون و استرس حاد بر بازتثبیت حافظه می‌گردد. این یافته‌ها با نتایج برخی از مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد.

مطالعات قبلی نشان داده که فعال شدن گیرنده 5-HT6 در مغز و به‌ویژه در ناحیه قشر فرونتال با محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال مرتبط است و فرضیه‌ای که مطرح است این است که بلوک گیرنده 5-HT6 می‌تواند اثرات واسطه‌ای سیستم کولی نرژیک و هم‌چنین ارتباط بین سیستم کولی نرژیک و گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی را تسهیل کند.

بر اساس این عقیده بلوک گیرنده 5-HT6 می‌تواند منجر به افزایش سطح استیل کولین و نهایتاً مکانیسم‌های جبرانی و افزایش سطوح گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی در هیپوکمپ گردد. این موضوع یکی از مکانیسم‌های اساسی است که احتمالاً از طریق آن سیستم سروتونرژیک موجب تعدیل اثرات کورتیکوسترون بر روند بازتثبیت حافظه می‌گردد [۱۴].

هم‌چنین مطالعات قبلی نشان داده که فعالیت گیرنده 5-HT6 موجب پیشرفت حافظه از طریق تعدیل فعالیت سیستم کولی نرژیک و گلوتامینرژیک می‌گردد. ضمناً آنتاگونیست گیرنده 5-HT6 موجب تعدیل و برگشت اختلالات ایجاد شده در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال می‌گردد. هم‌چنین تزریق آنتاگونیست گیرنده 5-HT6 موجب افزایش و تقویت حافظه در بیماران آلزایمری می‌گردد. یا در جای دیگر دیده شده که داروهای ضد افسردگی موجب افزایش فعالیت گلوکوکورتیکوئیدها می‌شود. ضمناً کورتیکوسترون می‌تواند سطوح سروتونین هیپوکمپ را تغییر دهد و یا سروتونین موجب افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال می‌گردد [۱۴]. که همه این نکات نشان‌دهنده اثرات متقابل نزدیک بین سیستم سروتونرژیک و گلوکوکورتیکوئیدها به‌ویژه در فرایندهای شناختی می‌باشد.

در این مطالعه هم مشاهده شد که بعد از این‌که روند بازتثبیت به وسیله استرس حاد و یا گلوکوکورتیکوئیدها دچار اختلال گردید، استفاده از آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های سروتونرژیک 5-HT6 به عنوان پیش‌درمانی همراه با استرس حاد یا گلوکوکورتیکوئیدها، این اختلال در بازتثبیت به شکل معنی‌داری مهار شد.

البته در این‌جا تفاوت در تاثیر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده 5-HT6 مشاهده نگردید که چند فاکتور و مکانیسم

احتمالاً منجر به اختلال بازتثبیت حافظه [۱۹،۱۳] و تعدیل واکنش‌های اضطرابی می‌شود [۲۰]. بنابراین می‌توان تصور کرد که آگونیست‌های گیرنده گلوکوکورتیکوئید چنان‌چه بعد از فعال‌سازی حافظه تروماتیک تزریق شوند می‌توانند داروهای بالقوه برای درمان بیماری‌های ناشی از حافظه‌های پاتونرژیک مثل PTSD، فوبیا و اضطراب باشند.

گلوکوکورتیکوئیدها باعث القاء فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال می‌شود که باعث تنظیم مکانیسم‌های فیدبک منفی از طریق گیرنده‌های هسته‌ای و غشایی استروئیدها می‌شود. عوامل متعددی در تنظیم ترشح گلوکوکورتیکوئیدها نقش دارند که مهم‌ترین آن‌ها هورمون (Adrenocorticotrophic Hormone, ACTH) مترشح‌ه از هیپوفیز قدامی است. فیبرهای عصبی که از هسته‌های آمیگدال می‌آیند، باعث بروز پاسخ‌های ترشحی ناشی از استرس‌های هیجانی می‌شود و از این طریق ترس، اضطراب و وحشت موجب افزایش ترشح ACTH می‌گردد. فیبرهای عصبی که از هسته‌های فوق‌کیاسمایی می‌آیند در تولید ریتم شبانه‌روزی ترشح ACTH نقش دارند و سایر ایمپالس‌ها که از مراکز مختلف روی هیپوتالاموس متمرکز می‌شوند در ایجاد پاسخ ترشح هیپوتالاموس به صدمات و آسیب‌ها نقش دارند. فیدبک گلوکوکورتیکوئیدی نیز نقش مؤثری در تنظیم ترشح (Cortico Releasing Hormone, CRH) و ACTH دارد [۲۱].

ترشح گلوکوکورتیکوئیدها به دنبال استرس حاد اثرات آنی و مستقیم روی سیستم عصبی مرکزی دارد. در مطالعات invitro نشان داده شده که گلوکوکورتیکوئیدها انتقال گلوکز به داخل نورون‌ها را مهار می‌کنند. استرس مزمن نیز همانند استرس حاد اثرات تخریبی متعددی روی سیستم عصبی به خصوص نواحی مربوط به حافظه و یادگیری دارد، با این تفاوت که اثرات ایجاد شده توسط استرس مزمن بر روی سیستم عصبی، بسیار برجسته‌تر و پایدارتر از اثرات استرس حاد می‌باشد [۲۲،۲۳].

به طور کلی استرس از طریق افزایش غلظت گلوکوکورتیکوئیدها، کاتکول آمین‌ها و نوروپپتیدهایی نظیر وازوپرسین در خون، باعث تغییر در خصوصیات الکتریکی، شکل و ظرفیت تکثیری سلول‌ها در مغز می‌شود که همگی این عوامل پاسخ مرکزی و رفتاری به استرس را شکل می‌دهد [۲۴].

به‌طور کلی نتایج این قسمت از مطالعه نشان می‌دهد که تزریق کورتیکوسترون و هم‌چنین ایجاد استرس حاد، بعد از فعال‌سازی حافظه، سبب اختلال در بازتثبیت حافظه ناشی از ترس می‌شود. این اثر به فعال‌سازی حافظه وابسته است و ضمناً با شوک به خاطر آورنده باز نمی‌گردد.

اثر مهارى SC203575 و SB271046 بر اثرات تخریبی کورتیکوسترون و استرس حاد روی بازتثبیت حافظه

[7] Yehuda R. Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder. *Psychiatr Clin North Am* 2002; 25: 341-368.

[8] Nikzad S, Vafaei AA, Rashidy-Pour A. Assessment the effects of Metyrapone (as a glucocorticoids synthesis inhibitor) on memory retrieval and reconsolidation in rats. *Tabriz Pharmaci Sci* 2010; 16: 141-148. (Persian).

[9] Nikzad S, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Haghghi S. Systemic and intrahippocampal administrations of the glucocorticoid receptor antagonist RU38486 impairs fear memory reconsolidation in rats. *Stress* 2011; 14: 459-464.

[10] Vafaei AA, Pakdel R, Nikzad S, Rashidy-Pour A. Effects of mineralocorticoid receptors blockade on fear memory reconsolidation in rats. *Basic Clin Neurosci* 2011; 2: 58-66.

[11] Cruz-Morales SE, García-Saldívar NL, González-López MR, Castillo-Roberto G, Monroy J, Domínguez R. Acute restriction impairs memory in the elevated T-maze (ETM) and modifies serotonergic activity in the dorsolateral striatum. *Behav Brain Res* 2008; 193: 187-191.

[12] Jans LA, Blokland A. Influence of chronic mild stress on the behavioural effects of acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture. *Behav Pharmacol* 2008; 19: 706-715.

[13] Yang YL, Chao PK, Lu KT. Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 912-924.

[14] Marcos B, Aisa B, Ramírez M. Functional interaction between 5-HT 6 receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Cognitive implications. *Neuropharmacology* 2008; 54: 708-714.

[15] Holmes M, Yau J, French K, Seckl J. The effect of adrenalectomy on 5-hydroxytryptamine and corticosteroid receptor subtype messenger RNA expression in rat hippocampus. *Neuroscience* 1995; 64: 327-337.

[16] King MV, Marsden CA, Fone KC. A role for the 5-HT 1A, 5-HT 4 and 5-HT 6 receptors in learning and memory. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 482-492.

[17] Mokhtari-Zaer A, Ghodrati-Jaldbakhan S, Vafaei AA, Miladi-Gorji H, Akhavan MM, Bandegi AR, Rashidy-Pour A. Effects of voluntary and treadmill exercise on spontaneous withdrawal signs, cognitive deficits and alterations in apoptosis-associated proteins in morphine-dependent rats. *Behav Brain Res* 2014; 271: 160-170.

[18] Dehbasi F, Alizadeh N, Rashidy-Pour A, Vafaei AA. Effects of acute stress and corticosterone on fear memory extinction in mice. *Koomeh* 2012; 13: 375-381. (Persian).

[19] Donley MP, Schulkin J, Rosen JB. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav Brain Res* 2005; 164: 197-205.

[20] Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Taherian AA. Peripheral injection of dexamethasone modulates anxiety related behaviors in mice: an interaction with opioidergic neurons. *Pak J Pharm Sci* 2008; 21: 285-289.

[21] Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet R. Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 1987; 45: 407-412.

[22] Beato M, Sánchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocrine Reviews* 1996; 17: 587-609.

[23] Munck A, Mendel DB, Smith LI, Orti E. Glucocorticoid receptors and actions. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: S2-10.

[24] Roozendaal B, Quirarte GL, McGAUGH JL. Stress-activated hormonal systems and the regulation of memory storage. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 821: 247-258.

احتمالی می‌توانند در این تاثیر مشابه موثر باشند که عبارتند از  
 ۱- حضور سیستم‌های حد واسط نوروترانسسمیتری و یا تعامل آن با دیگر میانجی‌های عصبی ۲- عملکرد آن بر مبنای اشغال گیرنده‌ها در حد مطلوب و اپتیمال (نه اشباع خیلی زیاد و نه اشباع کم) بر این اساس دادن آگونیسست و آنتاگونیسست باعث می‌شود که میزان گیرنده‌های اشباع شده در حد مطلوب قرار گیرد و اثرات آن زمانی دیده می‌شود که گیرنده‌ها در حد اپتیمال اشغال شده باشند. ۳- از آن‌جا که نروترانسسمیتر سروتونین از انتهای نرون پیش‌سیناپسی رها می‌شود ممکن است اثرات مشابه دیده شود. البته برای پی بردن به مکانیسم‌های دقیق‌تر نیاز به مطالعه و بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

به طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان داد که فعال نمودن گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی توسط کورتیکوسترون و یا اعمال استرس حاد بازتثبیت حافظه را مختل می‌کند. ضمناً پیش‌درمانی SC203575 به عنوان آگونیسست و SB271046 به عنوان آنتاگونیسست گیرنده سروتونرژیک 5-HT6 منجر به مهار اثرات کورتیکوسترون و استرس حاد بر بازتثبیت حافظه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری و مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان بابت حمایت از این طرح تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

### منابع

- [1] Roozendaal B. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 2000; 25: 213-238.
- [2] Murphy D, Costall B, Smythe JW. Regulation of hippocampal theta activity by corticosterone: opposing functions of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Brain Res Bull* 1998; 45: 631-635.
- [3] McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 1-28.
- [4] Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiol Learn Memory* 1997; 67: 176-179.
- [5] Rashidy-Pour A, Vafaei AA, Taherian AA, Miladi-Gorji H, Sadeghi H, Fathollahi Y, Bandegi AR. Verapamil enhances acute stress or glucocorticoid-induced deficits in retrieval of long-term memory in rats. *Behav Brain Res* 2009; 203: 76-80.
- [6] Roozendaal B, McGaugh JL. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Memory* 1996; 65: 1-8.

## Interaction between 5-HT<sub>6</sub> receptors and acute stress and corticosterone on fear memory reconsolidation in mice

Rajab Mohammad Rezaei (Ph.D Student)<sup>1</sup>, Reza Pourali-Malabad (M.D)<sup>2,3</sup>, Abdolhossein Shiravi (Ph.D)<sup>1</sup>, Ali Rashidy-Pour (Ph.D)<sup>2,3</sup>, Abbas Ali Vafaei (Ph.D)<sup>\*2,3</sup>

1 - Faculty of Biology, Damghan Azad University, Damghan Iran

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

3- Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

\* Corresponding author. +98 23 33654184 aavaf43@gmail.com

Received: 27 Jan 2019; Accepted: 1 Jul 2019

**Introduction:** Recent studies indicated that serotonergic receptors can be mediate the glucocorticoids' effects on behavioral processes. The aim of this study was to determine the role of serotonergic receptor (5-HT<sub>6</sub>) in the effects of acute stress and corticosterone on fear memory reconsolidation in mice.

**Materials and Methods:** Male adult mice were trained and tested in an inhibitory avoidance task (1mA, 3sec). For assessment memory reconsolidation, immediately after memory reactivation memory (48 hr. after training) animal received corticosterone or exposed to an acute restraint stress (10 min) and also received SC203575 as a 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist or SB271046 as an antagonist of 5-HT<sub>6</sub> receptors simultaneously. Memory retention test was done 5, 8, 10 and 12 days after memory reactivation.

**Results:** The results showed that corticosterone injection or acute stress application after memory reactivation impaired memory reconsolidation in subsequent tests. Co-treatment with both the 5-HT<sub>6</sub> agonist SC203575 and antagonist SB271046 inhibited the effects of corticosterone or acute stress on memory reconsolidation.

**Conclusion:** These findings indicated that the 5-HT<sub>6</sub> receptors modulate the effects of glucocorticoids or acute stress on fear memory reconsolidation.

**Keywords:** Memory Reconsolidation, Glucocorticoids, Acute Stress, 5-HT<sub>6</sub> Serotonergic Receptors, Passive Avoidance Task.