

بررسی آثار تزریق کورتیکواسترون بعد از آموزش و فعال‌سازی حافظه در به خاطر‌آوری اطلاعات مربوط به حافظه‌ی ترس شرطی شده‌ی موش صحرایی نر

کتانه ابراری^۱، علی رشیدی‌پور^۲، سعید سمنانیان^۱، یعقوب فتح‌اللهی^۱

۱) گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس؛ ۲) آزمایشگاه یادگیری و حافظه، مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان؛ نشانی مکاتبه‌ی نویسندگی مسئول: سمنان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، آزمایشگاه یادگیری و حافظه. کد پستی: ۳۵۱۹۵-۱۶۳؛ دکتر علی رشیدی‌پور e-mail: rashidy-pour@sem-ums.ac.ir

چکیده

مقدمه: شواهد جدید نشان می‌دهند که در طی به خاطر‌آوری، حافظه مجدداً ناپایدار شده، فرآیند تثبیت مجدد را طی می‌کند. با توجه به دخالت هورمون‌های استرس در تثبیت اطلاعات تازه، هدف این مطالعه بررسی آثار کورتیکواسترون بر روند تثبیت و تثبیت مجدد حافظه در یک مدل شرطی است. **مواد و روش‌ها:** موش‌های نر صحرایی نژاد ویستار در دستگاه **Contextual Fear Conditioning** آموزش داده شدند. بعد از قرار دادن موش در محفظه، در آزمایش تثبیت، شوک الکتریکی به میزان $0/4\text{ mA}$ به مدت ۲ ثانیه برای دو بار با فاصله‌ی ۱۲۰ ثانیه به حیوان اعمال شد. ۲۰ ثانیه بعد از شوک آخر، حیوان از قفس برداشته شد و کورتیکواسترون با دوزهای مختلف به حیوان تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد از آموزش به خاطر‌آوری انجام شد و مدت زمانی که طی ۵ دقیقه حیوان در حالت بی‌حرکت (**Freezing**) به سر می‌برد، ثبت شد. در آزمایش تثبیت مجدد، برای ایجاد حافظه متوسط (حدود ۴۰ درصد)، شدت شوک همانند آزمایش تثبیت بود. برای حافظه‌ی قوی، ۸ شوک الکتریکی با شدت $1/5\text{ mA}$ به مدت ۱ ثانیه در فواصل ۶۲ ثانیه اعمال شد. ۲۴ ساعت بعد، فعال شدن حافظه (به مدت ۹۰ ثانیه) انجام شد. بلافاصله بعد از آن، کورتیکواسترون با دوزهای مختلف تزریق و ۲۴ ساعت بعد از آموزش به خاطر‌آوری همانند بالا انجام شد. **یافته‌ها:** کورتیکواسترون با دوز ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، باعث افزایش تثبیت حافظه می‌شود در حالی که در همین دوز میزان تثبیت مجدد حافظه‌ی قوی را به طور معنی‌داری کم می‌کند ولی این اثر موقتی است. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های فوق نشان می‌دهند که تزریق کورتیکواسترون بعد از آموزش و فعال‌سازی حافظه آثار متضادی در به خاطر‌آوری اطلاعات حافظه‌ی ترس شرطی شده بازی می‌کنند که تعیین مکانیسم‌های درگیر به مطالعه‌های بیشتری نیاز دارد.

واژگان کلیدی: حافظه، کورتیکواسترون، تثبیت حافظه، تثبیت مجدد حافظه، ترس شرطی شده

دریافت مقاله: ۸۵/۹/۱۹ - دریافت اصلاحیه: ۸۵/۱۲/۲۲ - پذیرش مقاله: ۸۶/۱/۲۶

مقدمه

مدت (STM)^۱ بدون نیاز به ساخت پروتئین‌های جدید برای ثانیه‌ها تا ساعت‌ها دوام دارد. با گذشت زمان، این حافظه در ساختارهای مختلف مغز به شکل پایدار تثبیت می‌شود که به

شواهد زیادی نشان می‌دهد که ویژگی‌های حافظه طی زمان تغییر می‌نماید. حالت دینامیک و ناپایدار حافظه‌ی کوتاه

i- Short Term Memory

حیوان دو نوع رفتار شرطی نشان می‌دهد: ۱- شرطی شدن نسبت به علامت‌های ثابت محیط آموزش CFC^{iv} و ۲- شرطی شدن نسبت به محرک شنوایی جفت شده با شوک AFC^v. نوع اول شرطی شدن به هیپوکمپ وابسته است. مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که گلوکوکورتیکوئیدها قادرند تثبیت این نوع حافظه را هم در شدت شوک پایین و هم در شدت شوک بالا افزایش دهند.^{۱۱} عقیده بر این است که C.F.C (وقتی که شدت شوک بالا باشد) یکی از بهترین مدل‌های حیوانی مطالعه‌ی اختلال‌های رفتارهای اضطرابی از جمله PTSD^{vi} است.^{۱۱} در PTSD که بعد از مواجهه با یک ترومای شدید ایجاد می‌شود یک سری علایم رخ می‌دهند که عبارتند از تقویت حافظه‌های وابسته به عناصر تجربه‌ی تروما، واکنش‌های هیجانی و فیزیولوژیک به محض مواجهه با آثار تروما و فقدان حافظه در مورد بعضی از اطلاعات معین از قبیل محرک‌های استرس‌زای وابسته به تروما یا سایر اتفاقاتی که قبل یا بعد از تروما رخ داده‌اند. بنابراین، گلوکوکورتیکوئیدها قادرند تشکیل حافظه‌ی مربوط به C.F.C را هم در شدت تحریک پایین که منجر به حافظه‌ی ضعیف تا متوسط می‌شود و هم در شدت تحریک بالا که منجر به حافظه‌ی قوی‌تر و طولانی مدت (مشابه حافظه‌های مربوط به وقایع تروما) می‌شود، افزایش دهند.^{۱۲-۱۴}

تاکنون آثار گلوکوکورتیکوئیدها بر تثبیت مجدد حافظه بررسی نشده است و مطالعه‌های انجام شده در زمینه‌ی آثار گلوکوکورتیکوئیدها بر فرایند تثبیت C.F.C اندک است. اهداف این مطالعه بررسی آثار دوزهای مختلف کورتیکوسترون بر تثبیت مجدد حافظه‌ی قوی ترس (که با تحریک شدید ایجاد شده و مشابه حافظه برای یک تروما است) و بررسی آثار دوزهای مختلف گلوکوکورتیکوئیدها بر تثبیت اطلاعات تازه آموخته شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه موش‌های نر نژاد ویستار با وزن ۲۲۰ تا ۳۰۰ گرم مورد آزمایش قرار گرفتند. موش‌ها در گروه‌های ۵ تایی در قفس و در اتاقی با حرارت حدود ۲۲ درجه سانتی‌گراد، در دوره‌ی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲

آن حافظه‌ی بلند مدت (LTM)ⁱ می‌گویند. این فرایند به ساخت پروتئین‌های جدید نیازمند است. نشان داده شده است که اعمال شوک الکتریکی اندکی بعد از آموزش، یعنی در مرحله‌ی STM، حافظه تازه را از یاد می‌برد ولی اگر این شوک چند ساعت بعد، طی LTM اعمال شود، مؤثر نخواهد بود. این آثار وابسته به زمان، پایه و اساس تئوری «تثبیت حافظه» را که امروزه به «تئوری سلولی تثبیت حافظه» معروف است تشکیل می‌دهند.^{۱۲}

در سال ۱۹۶۸ لوییس و همکاران این تئوری را زیر سؤال بردند.^۲ آن‌ها مشاهده کردند که اگر چه اعمال شوک الکتریکی ۲۴ ساعت بعد از آموزش نمی‌تواند منجر به فراموشی شود، اگر قبل از اعمال شوک، حافظه‌ی تثبیت شده طی عمل به خاطر آوری، مجدداً فعال شود، فراموشی ایجاد خواهد شد. به عبارت دیگر ایجاد فراموشی توسط شوک الکتریکی منوط به فعال‌سازی حافظه‌ی تثبیت شده و به خاطر آوری آن است. فعال‌سازی حافظه، مجدداً آن را به وضعیت ناپایداری برگردانده، می‌تواند طی یک فرایند وابسته به ساخت پروتئین مجدداً تثبیت شود. به این فرآیند، تثبیت مجدد^۳ می‌گویند. البته حافظه‌ی ناپایدار همیشه مشمول روند تثبیت مجدد نمی‌شود بلکه در شرایط خاصی اطلاعات آن به فراموشی^۳ سپرده می‌شود.^{۳-۶}

شواهد زیادی نشان می‌دهند که آزاد شدن هورمون‌های استرس (اپی‌نفرین و گلوکوکورتیکوئیدها) در شرایط هیجانی از غده‌ی فوق کلیه بر جنبه‌های مختلف اعمال شناختی اثر می‌گذارد. مطالعه‌های گذشته نشان می‌دهند که گلوکوکورتیکوئیدها به صورت وابسته به دوز، اکتساب و تثبیت اطلاعات را در انواع یادگیری به ویژه یادگیری‌های هیجانی افزایش می‌دهند در حالی که به خاطر آوری را مختل می‌نمایند.^۷ از آن‌جا که گلوکوکورتیکوئیدها به راحتی از سد خونی مغز عبور می‌کنند، مشخص شده است که آثار آن‌ها عمدتاً ناشی از فعال شدن گیرنده‌های آن‌ها در ساختارهای مغز به ویژه هیپوکمپ و آمیگدال است.^۸

در سال‌های اخیر، آثار گلوکوکورتیکوئیدها بر شرطی شدن ناشی از ترس مطالعه شده است. وقتی که طی آموزش در یک محیط (محفظه)، یک محرک شنوایی فزیک با اعمال شوک الکتریکی به حیوان جفت شود، طی آزمون‌های بعدی

iv- Contextual fear conditioning
v- Auditory fear conditioning
vi- Post traumatic stress disorder

i- Long Term Memory
ii- Reconsolidation
iii- Extinction

مشاهده نمود. ۲۰ ثانیه بعد از شوک آخر حیوان از قفس خارج شد. تزریق دارو بلافاصله بعد از آموزش انجام شد و ۲۴ ساعت بعد آزمون تثبیت حافظه انجام شد.^{۱۳} در مورد آزمایش‌های مربوط به تثبیت مجدد حافظه، برای ایجاد حافظه‌ی متوسط (حدود ۴۰ درصد)، شدت شوک همانند آزمایش تثبیت بود. برای ایجاد حافظه‌ی قوی حیوان بعد از ۱۲۰ ثانیه، ۸ شوک الکتریکی با شدت ۱/۵ mA، به مدت ۱ ثانیه با فواصل زمانی ۶۲ ثانیه از هم دریافت کرد و بعد از ۳۰ ثانیه از قفس خارج شد. این روش حدود ۶۰-۸۰ درصد Freezing ایجاد می‌نماید.^۹ ۲۴ ساعت بعد از آموزش، فعال‌سازی حافظه با قرار دادن حیوان به مدت ۹۰ ثانیه در همان قفس آموزش بدون دریافت هرگونه شوک الکتریکی انجام شد. بلافاصله بعد از آن، کورتیکوسترون با دوزهای مختلف به حیوانات تزریق شد.

تست به خاطر آوری: طی آزمون به خاطر آوری حیوان همانند مرحله‌ی آموزش در دستگاه قرار داده شد و رفتار آن به مدت ۵ دقیقه ثبت شد و میزان Freezing (حالتی که حیوان همه‌ی اعمال حرکتی خود را به جز حرکات تنفسی از دست می‌دهد) طی این مدت محاسبه شد. در این مرحله، حیوانات هیچ‌گونه شوک الکتریکی دریافت نکردند. درصد Freezing شاخص از یادگیری و حافظه است. هر چه مقدار آن بیشتر باشد، حاکی از بالا بودن میزان یادگیری و حافظه می‌باشد.

آزمایش ۱: در این آزمایش اثر تزریق محیطی دوزهای مختلف کورتیکوسترون بر تثبیت حافظه بررسی شد. به این منظور ۵۰ سر موش آموزش داده شده و به طور تصادفی به ۲ گروه آزمایشی زیر تقسیم شدند:

(الف) گروه شاهد: بلافاصله بعد از آموزش، به آن‌ها حامل تزریق شد ($n=10$).

(ب) گروه آزمون: بلافاصله بعد از آموزش، کورتیکوسترون (دوزهای ۱/۳، ۱، ۳، ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) دریافت کردند ($n=10$ در هر گروه).

آزمایش ۲: در این آزمایش اثر تزریق محیطی دوزهای مختلف کورتیکوسترون بر تثبیت مجدد حافظه‌ی متوسط بررسی شد. به این منظور ۴۰ سر موش آموزش داده شده و به طور تصادفی به ۲ گروه آزمایشی به شرح زیر تقسیم شدند:

(الف) گروه شاهد: بلافاصله بعد از آزمون به خاطر آوری به آن‌ها حامل تزریق شد ($n=10$).

ساعت روشنایی، در حالی که آب و غذا را آزادانه در اختیار داشتند، نگهداری شدند.

دارو: کورتیکوسترون (شرکت سیگما) در پروپیل گلیکول حل شد. دوزهای دارو عبارت بودند از ۱/۳، ۱، ۳، ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن. این دوزها براساس مطالعه‌های دیگران و انجام آزمایش‌های اولیه تعیین شد.^{۹،۱۲} دارو به صورت داخل صفاقی بلافاصله بعد از آموزش و یا بعد از آزمون به خاطر آوری تزریق شد.

روش شرطی شدن ناشی از ترس در محفظه (مدل یادگیری CFC)^۱ (دستگاه CFC): این دستگاه (شرکت - TSE آلمان) شامل قفسی (Box) مکعب مستطیل شکل، از جنس پلاستیک شفاف (Plexiglas) به ابعاد ۱۹/۳×۲۰×۳۵ سانتی‌متر است. کف قفس از میله‌های ضد زنگ به قطر ۶mm که به فاصله‌ی ۱۲mm از یکدیگر قرار دارند، تشکیل شده است. قفس داخل حفاظ چوبی به ابعاد ۴۷ × ۷۲ × ۷۲ سانتیمتر قرار گرفته و این حفاظ مجهز به بلندگو، لامپ و تهویه است و کف آن سینی قابل برداشتی دارد که امکان پاکسازی قفس را از فضولات حیوانی فراهم می‌کند. یک در چوبی که در وسط آن دریچه‌ی شیشه‌ای تعبیه شده دیواره جلویی حفاظ را تشکیل می‌دهد. این در امکان مشاهده‌ی حیوان را هنگام آزمایش فراهم می‌کند. تمام متغیرهای آزمایش توسط نرم‌افزار FCS^۲ کنترل می‌شود. با اندازه‌گیری در صد زمانی که حیوان در طول مدت آزمون در حالت بی‌حرکتی^۳ سپری می‌کند میزان یادگیری حیوان سنجیده می‌شود.

سازش دادن: به منظور سازش یافتن حیوان با شرایط آزمایش، ۲۴ ساعت قبل از آموزش حیوان به مدت ۵ دقیقه در قفسی با لامپ روشن قرار گرفت. به دلیل روشن بودن تهویه، نوز زمینه به اندازه‌ی ۶۸dB وجود دارد.

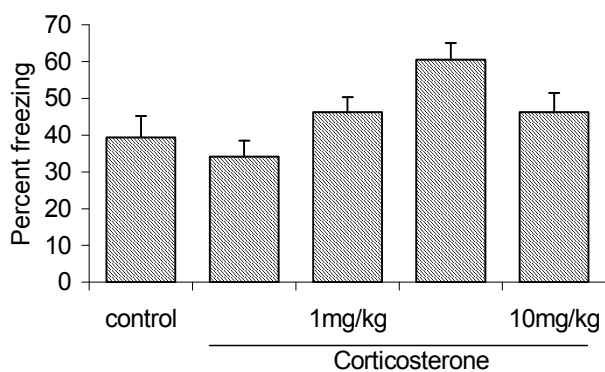
آموزش: برای آموزش، حیوان مجدداً در قفس قرار گرفت. در مورد آزمایش‌های مربوط به تثبیت حافظه، حیوان ۱۸۰ ثانیه بعد از قرارگیری در قفس ۲ شوک الکتریکی ۲ ثانیه‌ای، با شدت ۰/۴mA دریافت کرد. فاصله‌ی اعمال دو شوک از یکدیگر ۱۲۰ ثانیه بود. متغیرهای آموزش، سبب ایجاد Freezing به میزان متوسط (حدود ۴۰٪) می‌شود و از این رو، می‌توان آثار تسهیلی یا تخریبی دارو را بر حافظه

i- Contextual fear conditioning

ii- Fear conditioning software

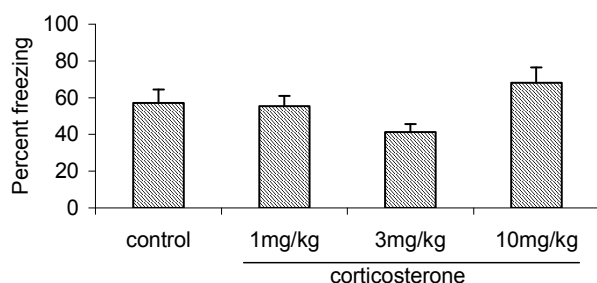
iii- Freezing

نشان می‌دهد. آنالیز واریانس یک طرفه حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های فوق است [$P=0/005$ ، $F(4, 20)=4$] (۴ و ۴۵). آنالیز بعدی نشان می‌دهد که کورتیکوسترون در دوز ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری تثبیت حافظه را افزایش می‌دهد ($P<0/01$) در حالی که در سایر دوزها اثر معنی‌داری را نشان نداد.



نمودار ۱- اثر تزریق کورتیکوسترون بعد از آموزش بر تثبیت اطلاعات ترس شرطی شده در مدل CFC. محور عمودی: میانگین \pm انحراف معیار میزان Freezing (بی حرکتی) طی آزمون به خاطر آوری. * $P<0/05$ در مقایسه با گروه شاهد.

نتایج آزمایش ۲: نمودار ۲ آثار تزریق محیطی دوزهای مختلف کورتیکوسترون را بر تثبیت مجدد اطلاعات در مدل CFC نشان می‌دهد. آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که بین گروه‌های فوق تفاوت معنی‌دار وجود ندارد [$P=0/08$ ؛ $F(3, 25)=2/51$].



نمودار ۲- اثر تزریق کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی حافظه‌ی متوسط بر میزان حافظه‌ی ترس شرطی شده در مدل CFC. محور عمودی: میانگین \pm انحراف معیار میزان Freezing (بی حرکتی) طی آزمون به خاطر آوری.

(ب) گروه آزمون: بلافاصله بعد از آزمون به خاطر آوری شماره ۱، کورتیکوسترون (دوزهای ۱، ۳، ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) دریافت کردند ($n=10$ در هر گروه). آزمایش ۳: در این آزمایش اثر تزریق محیطی دوزهای مختلف کورتیکوسترون را بر تثبیت مجدد حافظه‌ی قوی بررسی شد. به این منظور ۴۰ سر موش آموزش داده شده و به طور تصادفی به ۲ گروه آزمایشی به شرح زیر تقسیم شدند:

(الف) گروه شاهد: بلافاصله بعد از آزمون به خاطر آوری به آن‌ها حامل تزریق شد ($n=10$).

(ب) گروه آزمون: بلافاصله بعد از آزمون به خاطر آوری شماره ۱، کورتیکوسترون (دوزهای ۱، ۳، ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) دریافت کردند ($n=10$ در هر گروه).

آزمایش ۴: آزمایش ۳ نشان داد که تزریق کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی حافظه به خاطر آوری بعدی آن را مختل می‌کند. مشخص نیست که آیا این اثر کورتیکوسترون به فعال شدن مجدد حافظه نیاز دارد یا حتی در فقدان فعال‌سازی حافظه نیز دیده می‌شود. از این رو، در این آزمایش اثر کورتیکوسترون در فقدان فعال‌سازی بر تثبیت مجدد بررسی شد. به این منظور ۲۰ سر موش مشابه آزمایش‌های مربوط به تثبیت مجدد حافظه آموزش داده شدند، به جز این‌که در روز به خاطر آوری شماره‌ی ۱ در قفس قرار نگرفتند (عدم فعال سازی حافظه) و تنها به آن‌ها دارو تزریق شد. موش‌ها به طور تصادفی به ۲ گروه تقسیم شدند:

(الف) گروه شاهد: که به آن‌ها حامل تزریق شد ($n=10$).

(ب) گروه آزمون: که کورتیکوسترون به میزان ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن به آن‌ها تزریق شد ($n=10$).

آزمون آماری: داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارایه شده است. از آنالیز واریانس برای بررسی وجود تفاوت بین گروه‌های آزمایشی و از آزمون توکی برای تعیین تفاوت بین هر کدام از گروه‌ها استفاده شد. برای بررسی تفاوت بین دو گروه از آزمون تی استفاده شد. $P<0/05$ به عنوان ملاک معنی‌دار بودن مطرح شد.

یافته‌ها

نتایج آزمایش ۱: نمودار ۱ آثار تزریق محیطی دوزهای مختلف کورتیکوسترون را بر تثبیت اطلاعات در مدل CFC

نتایج آزمایش ۳: نمودار ۲ آثار تزریق محیطی دوزهای مختلف کورتیکوسترون را بر تثبیت مجدد اطلاعات در مدل CFC نشان می‌دهد. آنالیز واریانس حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌هاست [F(۲ و ۲۷) = ۱۰/۷۵, P=۰/۰۰۰۴]. نتایج نشان می‌دهد که کورتیکوسترون در دوز ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری تثبیت مجدد حافظه را مختل می‌نماید در حالی که در سایر دوزها اثر معنی‌داری نداشتند.

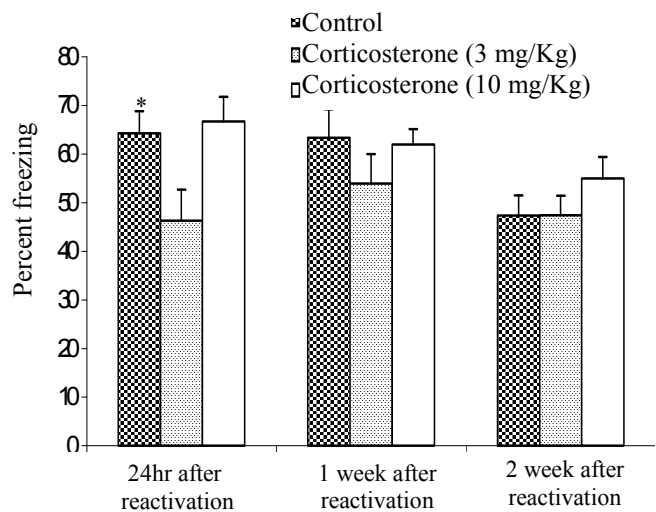
بحث

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تزریق محیطی کورتیکوسترون بلافاصله بعد از آموزش به طور وابسته به دوز، تثبیت حافظه، C.F.C را در موش صحرایی نر می‌افزاید. تزریق محیطی کورتیکوسترون بلافاصله بعد از فعال‌سازی حافظه قوی، به صورت وابسته به دوز به خاطر آوری بعدی را کاهش می‌دهد. ضمناً تزریق محیطی کورتیکوسترون بلافاصله بعد از فعال‌سازی حافظه‌ی متوسط، اثری بر به خاطر آوری اطلاعات ندارد.

آثار مثبت کورتیکوسترون بر تثبیت اطلاعات در مدل CFC همانند آثار مثبت آن در انواع دیگر مدل‌های یادگیری شامل یادگیری‌های احترازی و فضایی است.^{۸،۷} مقایسه‌ی آثار دوزهای مختلف کورتیکوسترون، بیانگر وجود رابطه‌ی U شکل وارونه بین غلظت کورتیکوسترون و میزان تثبیت حافظه است، به طوری که در دوزهای کم (دوزهای ۰/۳ و ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) و زیاد (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) اثر کاهشی و در دوز متوسط آن (۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) اثر افزایشی بر تثبیت حافظه‌ی ترس شرطی شده‌ی محیطی دارد. این نتایج، نیز با شواهد قبلی هم‌خوانی دارد.^{۷،۸،۱۲} این یافته نشان می‌دهد که گلوکوکورتیکوئیدها تثبیت اطلاعات تازه آموخته شده را در انواع یادگیری افزایش می‌دهند.

هر چند در مطالعه‌ی اخیر، کورتیکوسترون به صورت محیطی تزریق شده است و از این رو تعیین جایگاه اثر آن در افزایش تثبیت اطلاعات در CFC مشخص نیست، ولی شواهد محکمی وجود دارد که نشان می‌دهد این اثر کورتیکوسترون از طریق سیستم عصبی مرکزی اعمال می‌شود. هیپوکمپ با داشتن تراکم بالایی از گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی، ساختار اصلی مغز در رابطه با حافظه‌ی ترس شرطی شده محیطی است.^۵ شواهد قبلی نشان دادند که گلوکوکورتیکوئیدها می‌توانند با اتصال به گیرنده‌های خود در هیپوکمپ، بر این نوع ترس شرطی شده مؤثر باشند، به این ترتیب که تزریق محیطی آگونیست گیرنده‌ی گلوکوکورتیکوئید بعد از آموزش موجب تسهیل ذخیره‌ی حافظه شده، تزریق آن قبل از آموزش ذخیره

چنان‌چه تزریق کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی حافظه، بر تثبیت مجدد حافظه اثر گذاشته باشد این اثر باید پایدار باشد، یعنی در آزمون‌های بعدی نیز این اثر باید مشاهده شود. از این رو، آثار کورتیکوسترون ۷ و ۱۴ روز بعد از آزمون اول مجدداً بررسی شد (نمودار ۳). نتایج نشان داد که تفاوتی بین گروه شاهد و کورتیکوسترون در روز ۷ [F(۲ و ۲۷) = ۱/۱۷, P=۰/۳۲] و ۱۴ [F(۲ و ۲۷) = ۲/۸, P=۰/۰۶۴] وجود ندارد. این یافته نشان می‌دهد که آثار تزریق کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی بر به خاطر آوری حافظه، موقتی و زودگذر است.



شکل ۳- اثر تزریق کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی حافظه‌ی قوی بر میزان حافظه ترس شرطی شده در مدل CFC. محور عمودی: میانگین ± انحراف معیار میزان Freezing (بی حرکتی) طی آزمون به خاطر آوری. ۲۴ ساعت، یک هفته و دو هفته بعد از فعال‌سازی حافظه. *P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد

نتایج آزمایش ۴: میزان پاسخ بی حرکتی در گروه‌های شاهد و دریافت‌کننده‌ی کورتیکوسترون به ترتیب برابر

حافظه را مختل می‌کند.^{۹۱،۹۲} در واقع یک رابطه‌ی U شکل وارونه بین دوز گلوکوکورتیکوئید و آثار آن وجود دارد. دوزهای بالا و پایین منجر به تخریب اکتساب یا تثبیت حافظه می‌شود ولی دوز متوسط موجب افزایش آن می‌شود. گلوکوکورتیکوئیدها اثر متضادی بر فراخوانی اطلاعات دارند و در صورت تزریق محیطی قبل از به خاطرآوری باعث اختلال در فراخوانی حافظه می‌شوند، در این مورد نیز از رابطه‌ی U شکل وارونه تبعیت می‌شود.^۷

آثار مخرب کورتیکوسترون بر به خاطرآوری اطلاعات بعد از فعال‌سازی حافظه می‌تواند به دو علت اصلی باشد:

الف) تخریب پدیده‌ی تثبیت مجدد: همان‌گونه که قبلاً ذکر شد فعال‌سازی حافظه، مجدداً آن را به وضعیت ناپایداری برگردانده و می‌تواند طی یک فرایند وابسته به ساخت پروتئین، آن را دوباره تثبیت کند.

از نظر تئوری، اگر یک ترکیب اثر مخرب بر تثبیت مجدد حافظه‌ی مرتبط با ترس داشته باشد باید اثر آن مداوم و پایدار باشد. برای مثال، مطالعه‌های متعدد نشان داده‌اند که اثر آنیزوماپسین (یک مهارگر ساخت پروتئین) بر تثبیت مجدد، یک اثر پایدار و ماندگاری دارد،^{۳۱۵} هرچند در معدودی از مطالعه‌ها بازگشت خودبه‌خودی حافظه بعد از تزریق‌های مختلف به دنبال فعال‌سازی حافظه از جمله تزریق آنیزوماپسین نشان داده شده است.^{۱۶،۱۷} در این مطالعه مشخص شد که آثار مخرب کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی حافظه، موقت است به طوری که طی آزمون‌های بعدی (۷ و ۱۴ روز بعد از آزمون اول) تفاوتی بین گروه شاهد و آزمون شده با کورتیکوسترون وجود ندارد.

ب) تقویت تثبیت خاموشی (Extinction) حافظه‌ی ترس: وقتی که طی آزمون حیوان فقط در معرض محرک شرطی (محفظه) قرار گیرد به تدریج میزان حافظه برای محرک غیر شرطی کاهش می‌یابد. در مدل CFC، خاموشی به شکل کاهش ترس (یا میزان Freezing) بروز می‌کند. شواهد زیادی وجود دارد که کورتیکوسترون تثبیت خاموشی را در اشکال

دیگر حافظه افزایش می‌دهد.^{۱۸،۱۹} همان‌گونه که در شکل ۳ دیده می‌شود یک بار آزمون در CFC در گروه شاهد، خاموشی ایجاد نمی‌کند. با این وجود، امکان دارد که کورتیکوسترون خاموشی را تقویت کند به گونه‌ای که یک بار آزمون خاموشی ضعیفی ایجاد کند که فقط به صورت موقتی و زودگذر بیان شود. یکی از خصوصیات خاموشی توانایی برگشت خودبه‌خودی حافظه اولیه است.^{۲۰،۲۱} این ویژگی مشابه اثر زودگذر کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی است. بنابراین، به احتمال قوی اثر زودگذر کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی حافظه ناشی از اثر آن بر خاموشی حافظه است. با توجه به این که هیپوکمپ نقش مهمی در تثبیت و نیز خاموشی اطلاعات مربوط به حافظه‌ی ترس شرطی بازی می‌کند^{۲۲،۲۳} و نیز واجدگیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی است،^{۲۳،۲۴} به نظر می‌رسد که حداقل بخشی از آثار مخرب کورتیکوسترون بعد از فعال‌سازی اطلاعات، ناشی از آثار آن بر گیرنده‌های موجود در هیپوکمپ باشد. ارزیابی دقیق این فرضیه مستلزم پژوهش‌های بیشتری با تزریق موضعی آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی گلوکوکورتیکوئید به هیپوکمپ می‌باشد.

مطالعه‌های قبلی نشان دادند که که دوز ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و یا کمتر کورتیکوسترون بر مراحل مختلف یادگیری در انواع مدل‌ها مؤثر است.^{۱۰،۱۲،۲۵} در این مطالعه نیز آثار آن بر تثبیت حافظه‌ی متوسط و تثبیت مجدد حافظه‌ی قوی در مدل CFC نشان داده شد. توجه فقدان اثر دوز ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن کورتیکوسترون بر به خاطر آوری اطلاعات بعد از فعال‌سازی حافظه‌ی متوسط نیازمند مطالعه‌ها و آزمایش‌های بیشتری است. در همین راستا، در مطالعه‌های گذشته نشان داده شد که تأثیر بعضی از داروها از جمله مهارگران ساخت پروتئین بر حافظه نیز به قدرت و شدت حافظه بستگی دارد.^{۲۶،۲۷} پس، این عامل مهم تعیین‌کننده‌ی آثار داروها و عوامل شیمیایی بر تعدیل حافظه به شدت حافظه وابسته است.

References

- McGaugh JL. Memory-a century of consolidation. Science 2000; 286:248-51.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. The labile nature of consolidation theory. Nat Rev Neurosci 2000; 1:216-9.
- Duvarci S, Nader K. Characterization of fear memory reconsolidation. J Neurosci 2004; 24:9269-75.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature 2000; 406:722-6.

5. Debiec J, LeDoux JE, Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the Hippocampus. *Neuron* 2002; 36: 527-38.
6. Nader K. Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 2003;26:65-72.
7. Roozendaal B. Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Ann Rev Neurosci* 2004; 27:1-28.
8. Roozendaal B. Glucocorticoids and regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 2000; 25:213-38.
9. Cordero MI, Sandi C. A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: Dependence upon training intensity. *Brain Res* 1998; 786:11-7.
10. Pugh CR, Fleshner M, Rudy JW. Type II Glucocorticoid receptor antagonists impair contextual but not auditory - cue fear conditioning in juvenile rats. *Neurobiol Learn Mem* 1997; 67:75-9.
11. Cordero MI, Kruyt ND, Merino JJ, Sandi C. Glucocorticoids involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. *Stress* 2002; 5, 73-9.
12. Pugh CR, Tremblay D, Fleshner D, Rudy JW. A selective role of corticosterone in contextual-fear conditioning. *Behav Neurosci* 1997; 111: 503-11.
13. Conrad CD, McMillan D, Tsekhanov S, Baran RE, Fuchs RA. Influence of chronic corticosterone and glucocorticoid receptor antagonism in the amygdala on fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 81:185-99.
14. Hui GK, Figueroa IR, Poytress BS, Roozendaal B, McGaugh JL, Weinberger NM. Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 81: 67-74.
15. Biedenkapp JC, Rudy JW. Context memories and reactivation: Constraints on the reconsolidation hypothesis. *Behav Neurosci* 2004; 118:956-64.
16. Lattal KM, Abel T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:4667-72.
17. Anokhin KV, Tiunova AA, Rose SP. Reminder effects-reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. *Eur J Neurosci* 2002; 15:1759-65.
18. Moreira PS, Pulman KG, Pottinger TG. Extinction of a conditioned response in rainbow trout selected for high or low responsiveness to stress. *Horm Behav* 2005; 46:450-7.
19. Yang YL, Chao PK, LU KT. Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of consolidated fear. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31:912-24.
20. Bouton ME. Context, time and memory retrieval in the interference paradigms of pavlovian learning. *Psychol bull* 1993;114:80-99.
21. Myers KM. Behavioral and neuronal analysis of extinction. *Neuron* 2002; 36:567-84.
22. Vianna MR, Coitinho AS, Izquierdo I. Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning. *Curr Neurovas Res* 2004; 1:55-80.
23. Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 1985; 117: 2505-11.
24. Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res* 1996; 26: 235-69.
25. Roozendaal B. Stress activated hormonal systems and the regulation of memory Storage, Posttraumatic stress disorder. *Psychobiology* 1996; 821:247-58.
26. Alberini CM. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 2005; 28:51-6.
27. Suzuki A, Josselyn Sh A, Frankland P, Masushire Sh, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 2004; 24:4787-95.

Original Article

Effects of Corticosterone Injections After Training and Memory Reactivation on Recall of Fear Memory in Rats

Abrari K¹, Rashidy-Pour A², Semnanian S¹, Fathollahi, Y¹.

1) Department of Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, I.R.Iran.

2) Department and Research Center of Physiology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, I.R.Iran. e-mail: Rashidy-Pour@sem-ums.ac.ir

Abstract

Introduction: Recent evidence indicated that when a stabilized memory is recalled or reactivated, it again becomes labile and initiates a time-dependent process referred to “reconsolidation”. Considering the documented role of stress hormones on emotional memory, the purpose of this study was to compare the effects of glucocorticoids on consolidation and reconsolidation of a fear conditioning memory. **Materials and Methods:** Adult male Wistar rats were trained in fear conditioning system. In experiment 1, rats were placed into context and after 180 s were given two 2 s, 0.4 mA shocks with an interval of 120 s. Twenty seconds after the final shock, rats removed from the context box and were injected with different doses of corticosterone or vehicle. In reconsolidation experiments, rats received 2 s, 0.4 mA shocks with an interval of 120 s (moderate memory) or given eight 2 s, 1.5 mA shocks with an interval of 62 s (strong memory). Thirty seconds after the final shock, rats removed from the context box. For reactivation, 24 h later rats were returned to the chamber for 90s. Immediately after reactivation, rats were injected with different doses of corticosterone or vehicle. Twenty-four hours after training or memory reactivation, rats were returned to the context box for 5 min. Seconds of freezing (defined as the absence of all visible movement except respiration) during the retrieval testing were scored for each rat. **Results:** The findings indicated that injections of corticosterone after training enhanced memory consolidation at dose of 3 mg/kg. Injections of the drug after memory reactivation did not change recall of moderate memory, but impaired recall of strong memory at dose of 3 mg/kg. **Conclusion:** The data indicate that glucocorticoids have opposite effects on consolidation and reconsolidation of contextual fear conditioning memory. Further studies are needed to determine the underlying mechanisms.

Keywords: Learning, Memory, Glucocorticoid, Consolidation, Reconsolidation, Contextual fear conditioning