

دو فصلنامه طب جنوب

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال ششم، شماره ۱، صفحه ۱۳-۸ (شهریور ۱۳۸۲)

## اثر حذف برگشت پذیر دو طرفه هسته اکومبیس بر اکتساب و تثبیت یادگیری در موش بزرگ آزمایشگاهی

عباسعلی وفایی<sup>۱\*</sup>، علی جلال<sup>۲</sup>، حسن صادقی<sup>۳</sup>، علی رشیدی پور<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> استادیار بخش فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

<sup>۲</sup> دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

<sup>۳</sup> کارشناس بخش فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

<sup>۴</sup> دانشیار بخش فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

چکیده:

مطالعات قبلی نشان داده اند که هسته اکومبیس احتمالاً از ساختارهای مغزی است که در فرایند ذخیره حافظه هیجانی دخیل می باشد. هدف این مطالعه تعیین اثر حذف برگشت پذیر هسته مزبور بصورت دو طرفه بر اکتساب و تثبیت یادگیری و حافظه در مدل یادگیری احترازی غیر فعال می باشد. این پژوهش تجربی بوده و در طی آن از ۸۰ سر موش نر آلبینو نژاد ویستار با وزن ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. ابتدا به صورت دو طرفه روی هسته اکومبیس کانول راهنما گذاشته شد و یک هفته بعد، موش در دستگاه احترازی غیرفعال (۱ میلی آمپر شوک DC، برای مدت ۳ ثانیه) آموزش داده شدند. به منظور غیرفعال سازی ناحیه مزبور از لیدوکائین ۲٪ (۰/۶ میکرولیتر) ۲۰ دقیقه قبل از آموزش برای بررسی روند اکتساب و تروودوتوکسین (۵ نانوگرم در ۰/۶ میکرولیتر به ازای هر طرف) برای روند تثبیت بلافاصله ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از آموزش یا هم حجم آن سالین به صورت دو طرفه به داخل هسته فوق تزریق شد. ۴۸ ساعت بعد تست بخاطرآوری انجام شد که در طی آن مدت زمانی که طول می کشید تا حیوان برای اولین بار وارد محفظه تاریک شود و کل زمانی که در محفظه روشن طی می نمود (در طی ۱۰ دقیقه تست) یادداشت و به عنوان معیار میزان حافظه در نظر گرفته شد. نتایج نشان می دهد که غیرفعال سازی هسته اکومبیس به طور دو طرفه بلافاصله و تا ۶۰ دقیقه بعد از آموزش موجب اختلال در تثبیت اطلاعات تازه آموخته شده می شود ( $P < 0/01$ ). درحالی که غیرفعال سازی هسته مزبور قبل از آموزش اثر معنی داری بر اکتساب یادگیری هیجانی نداشت ( $P > 0/05$ ). یافته های فوق نشان می دهد که هسته اکومبیس وابسته به زمان نقش مهمی در تثبیت اطلاعات تازه آموخته شده دارد.

واژه های کلیدی: هسته اکومبیس، تروودوتوکسین، یادگیری، حافظه

\*بخش فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، صندوق پستی ۱۶۳-۳۵۱۹۵.

**مقدمه:**

تنظیم و کنترل هر فرایند ساده تا پیچیده به اطلاعاتی نیازمند است که باید به گونه ای ذخیره گردند و این ذخیره سازی که ناشی از تغییر ارتباطات بین سلولهای عصبی است بر اساس مکانیسم یادگیری و حافظه صورت می گیرد و دیده شده که این تغییرات در برخی از ساختارهای مغز مشهود تر و آشکارتر است (۲۰۱). بطوری که ساختارهای مشخصی در مغز در تعدیل اطلاعات تازه آموخته شده هیجانی دخالت دارند (۴۰). از طرفی شواهد قبلی نشان داده اند که حوادث هیجانی بر تعدیل یادگیری و حافظه بسیار تاثیر گذار بوده و اثرات آنها به خوبی حفظ می شود (۶۵) و اکومبسن هم یک ساختار مغزی است که احتمال می رود نقش مهمی در ذخیره حافظه مربوط به رویدادهای هیجانی بر عهده داشته باشد. این هسته یکی از هسته ای موجود در سپتوم در ناحیه مزانسفالیک بوده و از نظر آناتومیکی ارتباطات عصبی فراوانی با قسمت های مختلف سیستم لیمبیک برقرار می کند (۷).

از طرفی شواهد زیادی نشان می دهند که غیرفعال سازی برگشت پذیر برخی ساختارهای مغزی بویژه سیستم لیمبیک از قبیل آمیگدال و هیپوکمپ توسط تترودوتوکسین سبب اختلال در تثبیت حافظه در مدل های یادگیری احترازی غیر فعال و ماز آبی موریس می شود (۸ و ۹). مطالعات قبلی نشان داده که اکومبسن ارتباطات نورونی مستقیم و غیر مستقیم فراوانی با آمیگدال و هیپوکمپ دارد و از آنجا که قبلا نقش این هسته ها در یادگیری های هیجانی اثبات شده است بنظر می رسد که هسته اکومبسن هم در یادگیری های هیجانی دخالت داشته باشد (۱۰) و در این خصوص پیشنهاد شده که هسته اکومبسن قسمتی از یک شبکه باشد که در این نوع یادگیری ها همراه با دیگر نواحی دخالت می کند. مطالعات دیگری نشان داده اند که تخریب دوطرفه هسته اکومبسن یا استریا ترمینالیس (فیبرهای عصبی که از آمیگدال به هسته اکومبسن مرتبط است) اثرات تعدیل عصبی ناشی از تزریق سیستمیک گلوکوکورتیکوئیدها را بلوک می کند که پیشنهاد شده احتمالا اطلاعات از هسته قاعده ای جانبی آمیگدال و هیپوکمپ به

هسته اکومبسن رله شده و در آنجا همگرایی پیدا نموده و در تثبیت حافظه نقش داشته باشد. این یافته ها همراه با اثبات حضور سیستم های نوروترانسمیتری مهم از قبیل دوپامینرژیک، گلوتامینرژیک و... که نقش اساسی در فرایند یادگیری و حافظه دارند (۱۱ و ۱۲) در ناحیه هسته اکومبسن مؤید این موضوع می باشند که احتمالا اکومبسن هم می تواند در تعدیل اکتساب و تثبیت اطلاعات تازه آموخته شده متأثر از رویدادهای هیجانی نقش مهمی بازی کند (۱۰). بر اساس این یافته ها و یافته های قبلی که احتمال دادند هسته اکومبسن در فرایند یادگیری و حافظه دارد هدف این مطالعه تعیین اثر غیرفعال سازی دو طرفه هسته اکومبسن بر اکتساب و تثبیت اطلاعات تازه آموخته شده در مدل یادگیری احترازی غیر فعال بوده است.

**مواد و روش ها:**

این پژوهش یک مطالعه تجربی بوده و در طی آن از ۸۰ سر (۸ گروه ده تایی) موش نر آلبینو از نژاد ویستار با وزن ۲۲۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. موشها در قفس های ۵ تایی و در یک اتاق با درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنائی نگهداری شدند و غذا و آب بطور آزادانه در اختیار آنها بود.

روش جراحی: موشها با ترکیب دارویی کتامین (۱۰۰ میلی گرم بازای هر کیلوگرم) و رمپوان (۱۴ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) با تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس جمجمه موش در دستگاه استریوتاکسی فیکس شده و دو کانول فلزی از جنس ضد زنگ (شماره ۲۲ و طول ۱۰ میلی متر) طبق اطلس Paxinos و Watson (۱۳) درست بالای هسته اکومبسن در هر طرف ( $AP=+2$  mm و  $ML=1.6$ mm و  $DV=5$ mm) از سطح جمجمه قرار داده شدند (شکل ۱). کانول ها با کمک دوپیچ ظریف عینک و اکریل دندانپزشکی به استخوان جمجمه فیکس شد. برای جلوگیری از بسته شدن کانول ها، یک سیم ظریف از جنس مس که به روغن معدنی



کنامین (۱۰۰ میلی گرم بازاء هرکیلوگرم) بیهوش شدند و مغز آنها خارج گشته و برای ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. سپس مقاطع ۴۰ میکرومتری تهیه شد و با کریستال ویولت رنگ آمیزی شد و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. داده‌های حیوان‌هایی که در آنها کانول در هسته مورد نظر قرارنگرفته بود از بررسی آماری حذف گردید.

**بررسی آماری:** نتایج با آزمون آماری تی تست و آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney آنالیز شدند و  $P < 0/05$  به عنوان ملاک معنی دار بودن بین گروه‌های مورد آزمایش در نظر گرفته شد.

### نتایج:

آنالیز STL گروه‌های مختلف در طی مرحله آموزش عدم تفاوت بین گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد که حاکی از همگونی و یکنواختی گروه‌های مختلف است (داده‌ها نشان داده نشده است). شکل (۲) STL و TLC گروه‌های مختلف را در طی تست بخاطرآوری نشان می‌دهد. نتایج به خاطرآوری را به دنبال غیرفعال سازی موقتی دو طرفه هسته اکومبسن قبل و بلافاصله ۶۰ و تا ۱۲۰ دقیقه بعد از آموزش را بر اکتساب و تثبیت اطلاعات نشان می‌دهد. آنالیز داده‌ها (STL و TLC) حاکی از این است که تزریق لیدوکائین ۲۰ دقیقه قبل از آموزش به طور دو طرفه به داخل هسته اکومبسن بر اکتساب اطلاعات تاثیر معنی داری نداشت در حالی که تزریق تترودوتوکسین بلافاصله و تا ۶۰ دقیقه بعد از آموزش در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری بخاطرآوری را کاهش داده است ( $P < 0/01$ ) ولی تزریق به داخل هسته اکومبسن ۱۲۰ دقیقه بعد از آموزش در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد ( $P < 0/05$ ).

شدن موش به قسمت تاریک درب بسته شده و شوک الکتریکی با شدت ۱ میلی آمپر و به مدت ۱/۵ ثانیه از طریق سیم‌های استیل تعبیه شده در کف قسمت تاریک به حیوان اعمال شد.

**نحوه آزمایش:** در طی آزمایش‌ها اثر غیرفعال سازی برگشت پذیر هسته اکومبسن به صورت دوطرفه بر اکتساب و تثبیت اطلاعات در مدل احترازی غیرفعال در گروه‌های مختلف بررسی و با گروه‌های کنترل مقایسه گردید.

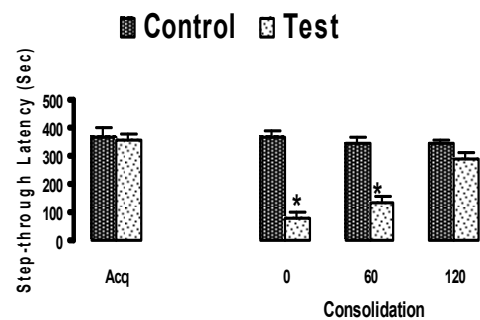
**روش غیر فعال کردن اکومبسن:** در زمانهای ۲۰ دقیقه قبل از آموزش لیدوکائین ۲٪ (۰/۶ میکرولیتر) و بلافاصله و ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از آموزش، تترودوتوکسین (۵ نانوگرم در ۰/۶ میکرولیتر به ازاء هر طرف) بطور دوطرفه تزریق شد. برای تزریق از سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری و لوله پلی اتیلن استفاده شد. در یک سر لوله پلی اتیلن یک سوزن تزریق (شماره ۲۷ با طول ۱۲ میلی‌متر) قرار داده شده بود که وارد کانول می‌شد و در سر دیگر سرنگ هامیلتون قرار می‌گرفت. تزریق با سرعت ۱ میکرولیتر در مدت ۶۰ ثانیه با کمک پمپ اتوماتیک صورت می‌گرفت و سوزن تزریق برای ۲ دقیقه برای جلوگیری از پس زدن مایع در داخل کانول باقی می‌ماند. ضمناً گروه‌های کنترل در زمان‌های مورد نظر هم حجم تترودوتوکسین سالین دریافت کردند.

**تست بخاطرآوری:** ۴۸ ساعت بعد از آموزش تست به خاطرآوری انجام شد. حیوان در قسمت روشن پشت به درب قرار داده شد و پس از چرخیدن موش به طرف درب، درب باز شد. زمانی که طول می‌کشید (Step-through latency, STL) تا حیوان برای اولین بار وارد قسمت تاریک شود و کل مدت زمانی که حیوان در مدت ۶۰۰ ثانیه تست در قسمت روشن به سر می‌برد (Total time spent in light Chamber, TLC) یادداشت شد.

**بافت شناسی:** برای پی بردن به محل قرار گرفتن کانول ، بعد از کامل شدن تستهای رفتاری موشها با دوز بالایی از

وابسته به زمان دخالت دارد بطوری که غیر فعال سازی آن تا ۶۰ دقیقه بعد از آموزش موجب اختلال در روند تثبیت اطلاعات میشود که این یافته با نتایج مطالعات دیگران که نشان دادند حضور هسته اکومبسن برای تثبیت اطلاعات ۶ ساعت پس از آموزش ضروری نیست همخوانی دارد (۷). بر این اساس احتمالاً نقش هسته اکومبسن در روند تثبیت یک نقش موقتی است بطوری که احتمالاً به عنوان دروازه ای عمل می کند که اطلاعات از طریق آن به نقاط دیگر مغزی رله شده و در آنجا ذخیره می شود.

همچنین مطالعات قبلی نشان داده که اکومبسن ارتباط نرونی مستقیم و غیر مستقیم فراوانی با قسمتهای مختلف مغز بویژه ناحیه تمپورال (آمیگدال و هیپوکمپ) دارد از آنجا که قبلاً نقش این هسته ها در یادگیری های هیجانی اثبات شده است بنظر می رسد که ارتباط این هسته از استدلال هایی باشد که احتمال نقش این هسته را در یادگیری های هیجانی تایید می کند (۱۲). مطالعات دیگری نشان داده اند که تخریب دوطرفه هسته اکومبسن یا استریا ترمینالیس (فیبرهای عصبی که از آمیگدال به هسته اکومبسن مرتبط است) اثرات هسته قاعده ای جانبی آمیگدال را بر تثبیت یادگیری های هیجانی در دیگر نواحی مغز واسطه گری می کنند (۱۰) و همچنین اثرات تعدیل یادگیری و حافظه ناشی از تزریق سیستمیک گلوکوکورتیکوئیدها را بلوک می کند که پیشنهاد شده احتمالاً اطلاعات از هسته قاعده ای جانبی آمیگدال و هیپوکمپ به هسته اکومبسن رله شده و در آنجا همگرایی پیدا نموده و در تثبیت حافظه نقش داشته باشد (۷ و ۱۲). بر این اساس اکومبسن ورودی های زیادی از ساختمانهای مختلف سیستم لیمبیک مثل هیپوکمپ و هسته قاعدهای جانبی آمیگدال دریافت می کند (۷) و از آنجا که مشخص شده که آمیگدال رابط بین سیستم حسی و ساختمانهایی است که درگیر رفتارهای هیجانی هستند. و همچنین هیپوکمپ که نقش آن در حافظه و بویژه حافظه فضایی اثبات شده است. (۱۴). بنابراین بر این اساس پیشنهاد شده که هسته اکومبسن قسمتی از یک شبکه می باشد که در نوع یادگیری ها دخیل



شکل ۲. اثر غیرفعال سازی موقتی و دوطرفه هسته اکومبسن بر اکتساب و تثبیت اطلاعات در مدل یادگیری احترازی غیر فعال الف: زمان صرف شده قبل از اولین ورود ب- کل زمان ماندن در ناحیه روشن محور عمودی Mean± SEM را نشان می دهد و  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

#### بحث:

مهم ترین یافته های مطالعه حاضر این است که ۱- غیرفعال سازی موقتی هسته اکومبسن به طور دو طرفه به وسیله تروودتوکسین بلافاصله و تا ۶۰ دقیقه بعد از آموزش سبب کاهش میزان به خاطر آوری موارد یادگرفته جدید بعد از آموزش در مدل یادگیری احترازی غیرفعال می شود در حالی که غیر فعال سازی هسته اکومبسن قبل از آموزش بر اکتساب اطلاعات آموخته شده جدید تاثیر معنی داری ندارد. همچنین تزریق دارو ۱۲۰ دقیقه بعد از آموزش تاثیر معنی داری بر روند تثبیت نداشت.

این یافته ها پیشنهادات مطالعات دیگران را که احتمال دادند هسته اکومبسن در یادگیری های هیجانی دخالت دارد را مورد تأیید قرار می دهد و با مطالعاتی که نشان دادند که هسته اکومبسن یک ساختمان کلیدی زیر قشری است که در روند یادگیری و حافظه مربوط به حوادث هیجانی دخالت دارد و غیر فعال سازی آن این روند را مختل می کند هم خوانی دارد (۷ و ۱۲).

از طرفی نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که هسته اکومبسن در تثبیت اطلاعات تازه آموخته هیجانی به صورت

بنابر این یکی از مکانیسم هایی که احتمال می رود در این هسته در این نوع یادگیری ها دخیل باشد سیستم نروترانسسمیتری دوپامینی می باشد.

بطور کلی، نتایج این بررسی نشان می دهد که غیرفعال شدن هسته اکومبسن تثبیت حافظه هیجانی را در مدل احترازی غیر فعال و ماز آبی موريس مختل می کند. همچنین غیر فعال شدن این هسته قبل از آموزش بر اکتساب اطلاعات جدید تاثیر معنی داری ندارد.

### تقدیر و تشکر:

از همکاران بخش فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سمنان بویژه آقایان دکتر طاهریان، میلادی گرجی، سجادی، جراحی و رجبی که در انجام کارهای عملی و آزمایشها همیار ما بودند تقدیر و تشکر به عمل می آید.

### REFERENCES:

- 1- وفائی ع.ع، رشیدی پور، ع، شریفی و همکاران، اثر حذف برگشت پذیر دوطرفه هسته قاعده ای جانی آمیگدال بر ذخیره حافظه، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال سوم (شماره ۱۱): ۱۳۷۸، ۲۸-۲۰.
- 2- وفائی ع.ع، ارزیابی نقش گلوکوکورتیکوئیدها در آمیگدال، هیپوکمپ و قشر اوربیتو فرونتال در یادگیری و حافظه، پایان نامه دکتری تخصصی (PhD) فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، مرداد ۱۳۸۰.
3. Ledoux JE, Emotion memory and the brain. *Sci Am J* 1994; 32: 39.
4. Parent MB, McGaugh JL. Posttraining infusion into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Res* 1994; 97: 97-103.
5. Akirav, I, Richter-Levin G. Biphasic modulation of hippocampal plasticity by behavioral stress and basolateral amygdala stimulation in the rat. *J Neurosci* 1999; 19: 10530-35.
6. Cahill L, McGaugh JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 1998; 21: 294-9.
7. Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C. et al. Time-dependent deficits of rat's memory consolidation by tetrodotoxin injection into the Caudate-Putamen, Nucleus Accumbens, and globus pallidus. *Neurobiol Learning Memory* 1995; 63: 87-93.

است. و این مسئله می تواند از استدلال های دیگری باشد که نقش هسته اکومبسن را در تثبیت یادگیری و حافظه هیجانی مطرح می کند.

در مطالعه دیگری گزارش شد که بلوک گیرنده های دوپامین در هسته اکومبسن از بخاطر آوری رفتار مادرانه جلوگیری می کند اما رفتارهای مراقبتی را در موشهای شیرده افزایش می دهد و یا دیده شد که تزریق ۵۰۰ نانوگرم هالوپریدول به داخل اکومبسن کاملاً یادگیری را بلوک می کند. شواهد نشان داده تزریق قبل از اکتساب دوپامین در مدل احترازی غیر فعال بخاطر آوری اطلاعات را دچار اختلال می نماید (۱۵).

از آنجا که هسته اکومبسن حاوی تراکم بالایی از گیرنده های دوپامینی است و همچنین نقش این گیرنده ها قبلاً در یادگیری و حافظه اثبات شده است بطوری که استفاده از بلوک کننده های آنها موجب اختلال در یادگیری شده است

8. Ishikawa K, McGaugh JL, Sakata H. Brain processes and memory proceeding of the 16th Nihon international symposium on brain processes and memory, Tokyo, Japan, 1995, 29: 39-54.
9. McGaugh, JL. Memory: a century of consolidation. *Science* 2000; 287: 248-51.
10. Roozendaal B, de-Quervain DJ, Ferry B, et al. Basolateral amygdala-nucleus accumbens interaction in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. *J Neurosci* 2001; 21: 2518-25.
11. McGaugh JL. Intraction of neuromodulatory system to modulating memory storage. *Behav Brain Res* 1997; 82: 31-8.
12. Mulder AB, Hodenpiji MG, Lopes-da-Silva FH. Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: Convergence, segregation and interaction of inputs. *Neurosci* 1998; 18: 5095-102.
13. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 3rd ed, Academic Press, Orlando, 1997, 37.
14. McGaugh JL. Involvement of the amygdala in memory storage interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 13508-14.
15. Keer SE, Syern JM. Dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens inhibits maternal retrieval and linking, but enhances nursing behavior in lacting rats. *Physio Behav* 1999; 67: 659-69.