



## Effect of Intra-CA1 injection of estrogen on spatial memory and learning in rats

Farshad Moradpour<sup>1,2</sup>, Nasser Naghdi<sup>1\*</sup>, Yaghub Fathollahi<sup>2</sup>

1. Dept. Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2. Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 22 Jan 2008

Revised: 4 Sep 2008

Accepted: 10 Sep 2008

### Abstract

**Introduction:** Sex hormones are one of the most important factors responsible for differences of learning and memory between males and females. High concentration of estrogen and androgen receptors and mechanism of testosterone and estrogen production in learning and memory center, especially in hippocampus show the role of these receptors, sex hormones and P450 enzymes in spatial memory. In this study we evaluated the effect of estradiol valerate (EV) and an aromatase inhibitor, anastrozole (An), on spatial learning and memory in Morris Water Maze.

**Methods:** Adult male rats were bilaterally cannulated into the CA1 region. After the recovery period, control groups received either DMSO 0.5  $\mu$ l or DMSO 0.5  $\mu$ l + 0.5  $\mu$ l. Different doses of EV (1, 2.5, 5, 10 and 15  $\mu$ g / 0.5  $\mu$ l), An (0.25, 0.5 and 1  $\mu$ g / 0.5  $\mu$ l) and EV 15  $\mu$ g / 0.5  $\mu$ l + An 0.5  $\mu$ g / 0.5  $\mu$ l were microinjected everyday before training. EV and An were injected 30-35 min and 25-30 min before training, respectively.

**Results:** Our results showed that escape latency and traveled distance were increased in EV 0.15  $\mu$ l / 0.5  $\mu$ l group. We also observed that An decreased escape latency and traveled distance in a dose-dependent manner.

**Conclusion:** EV impaired acquisition of spatial learning and memory but An improved it. However, when An and EV were administered together, An could not prevent EV-induced impairments.

**Keywords:** Estradiol valerate, Anastrozole, Hippocampus, Memory & Learnin.

\* Corresponding author e- mail: naghdi@pasteur.ac.ir  
nnaghdiir@yahoo.com  
Available online @: www.phypha.ir/ppj

## بررسی اثر تزریق استروژن به ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرائی نر بالغ بر یادگیری و حافظه فضایی

فرشاد مرادیپور<sup>۱</sup>، ناصر نقدی<sup>۱\*</sup>، یعقوب فتح اللهی<sup>۲</sup>

۱. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت: ۳ بهمن ۸۶ بازبینی: ۱۴ شهریور ۸۷ پذیرش: ۲۰ شهریور ۸۷

### چکیده

**مقدمه:** هورمون‌های جنسی از مهمترین عوامل ایجاد تفاوت یادگیری و حافظه در بین دو جنس (نر و ماده) می‌باشند. تراکم زیاد گیرنده‌های آندروژنی و استروژنی و تولید تستوسترون و استروژن در مراکز اصلی حافظه و یادگیری به ویژه هیپوکامپ، نقش این گیرنده‌ها را در حافظه فضایی نشان می‌دهند. به همین منظور ما در این تحقیق اثر استروژن و مهارکننده آروماتاز (آناسترازول) بر حافظه فضایی را در ماز آبی موریس (Morris water maze) مورد بررسی قرار دادیم.

**روش‌ها:** ناحیه CA1 حیوانات بصورت دو طرفه کانول گذاری شد. پس از طی دوره بهبودی، دو گروه کنترل، DMSO را با دوزهای ۰/۵μl + ۰/۵μl + ۰/۵μl دریافت کردند. استرادیول والرات با دوزهای ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ μg/۰/۵ μl، آناسترازول با دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ μg/۰/۵ μl و استرادیول والرات ۱۵ μg/۰/۵ μl + آناسترازول ۱ μg/۰/۵ μl هر روز قبل از آزمایش تزریق شدند. تزریق استرادیول والرات ۳۰-۳۵ دقیقه و آناسترازول ۳۰-۲۵ دقیقه قبل از آزمایش انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج تزریق استرادیول والرات با دوز ۱۵ μg/۰/۵ μl، افزایش در مسافت طی شده و زمان لازم برای پیدا کردن سکوی پنهان را نشان داد. و آناسترازول بصورت وابسته به دوز ۰/۵μg/۰/۵μl باعث کاهش در زمان و مسافت طی شده گشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که استرادیول والرات باعث تخریب حافظه و یادگیری می‌گردد و آناسترازول آنرا بهبود می‌بخشد. آناسترازول نمی‌تواند اثر تخریبی استرادیول والرات را خنثی کند.

واژه‌های کلیدی: استرادیول والرات، آناسترازول، آروماتاز، هیپوکامپ، یادگیری و حافظه فضایی

### مقدمه

بالایی از گیرنده‌های آندروژنی و استروژنی را در سلول‌های پیرامیدال هیپوکامپ نشان داده‌اند [۲۷]. هورمون‌های جنسی مانند تستوسترون و استروژن نقش مهمی در حافظه و یادگیری دارند [۱۳، ۱۵، ۲۰، ۲۶، ۲۸، ۳۹، ۴۱، ۵۱]. اولین گزارش‌ها در مورد تأثیر هورمون‌های جنسی بر یادگیری و حافظه به سال ۱۹۲۶ بر می‌گردد [۱]. مطالعات زیادی ارتباط متقابل بین سیستم عصبی و اندوکراین را در فرآیندهای مربوط به هوش و حافظه نشان داده‌اند [۴۲]. در

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که هیپوکامپ برای یادگیری و فراخوانی اطلاعات فضایی و همچنین تثبیت و ذخیره کردن این اطلاعات لازم است [۴۳، ۴۴]. مطالعات گذشته وجود غلظت

nnaghdiir@yahoo.com

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

naghdi@pasteur.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

اواسط دهه ۷۰ قرن بیستم تحقیقاتی که در انسان و حیوان انجام شد نشان داد که جنس مذکر در انجام کارهایی که به حافظه فضایی احتیاج دارند بر جنس مؤنث برتری دارد [۱۹، ۲۵، ۲۶، ۲۹، ۳۲].

به نظر می‌رسد که تستوسترون و متابولیت آن استروژن، از طریق اثر سازمان دهنده و فعال کنندگی خود بر حافظه و یادگیری فضایی اثر می‌کند [۱۶]. مقالاتی که در مورد اثرات آندروژن‌ها بر حافظه و یادگیری فضایی به چاپ رسیده است نتایج متناقضی را بیان می‌کنند. بعضی از مقالات بر ارتباط مثبت بین تستوسترون و توانایی فضایی دلالت دارند [۱۰، ۱۴، ۲۴] و بعضی از مطالعات نشان می‌دهند که تستوسترون و متابولیت آن می‌توانند باعث بهبود حافظه فضایی شوند [۹، ۱۱، ۴۹] و همچنین یک اتفاق نظر عمومی در مورد برتری جنس مذکر بر جنس مؤنث در انجام مهارت‌های فضایی وجود دارد [۴۸]. از طرفی آزمایشاتی که برای بررسی توانایی فضایی در انسان انجام شده است برتری مردانی که سطح تستوسترون پایین‌تری داشته‌اند را نشان می‌دهد [۱۲]. به علاوه نشان - داده شده است درمان مزمن با ترکیبات آندروژنیک در انسان و حیوانات باعث کاهش یادگیری و حافظه فضایی می‌شود [۱۸، ۱۶].

پیش از این نقش هورمون‌های استروئیدی بر یادگیری و حافظه فضایی با تزریق تستوسترون و استروژن به داخل هیپوکامپ و هسته آمیگدال بررسی شده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که تستوسترون و استروژن باعث تخریب حافظه و یادگیری فضایی می‌شوند [۱۷، ۳۱، ۳۶، ۳۷، ۴۳].

بسیاری از اثرات بیولوژیک آندروژن‌ها در مغز به تبدیل موضعی این آندروژن‌ها به استروژن نیاز دارند [۵، ۳۰، ۳۴، ۳۵، ۴۶]. تستوسترون که یک آندروژن غیر آروماتیزه است باید به یک استروژن آروماتیزه تبدیل شود [۱۱]. تزریق سیستمیک مهارکننده آروماتاز اثر تستوسترون برونزاد را بر اعمال شناختی و جنسی مهار می‌کند [۳، ۳۹]. آنزیم آروماتاز به وسیله ژن CYP19 بیان می‌شود و مسئول تولید استروژن و استرادیول از آندروژن‌های ۱۸ کربنه می‌باشد [۲، ۲۱]. تستوسترون می‌تواند به طور مستقیم با اثر بر گیرنده‌های آندروژنی و یا به طور غیر مستقیم با تبدیل شدن به

استرادیول بر عملکرد شناختی تأثیر بگذارد [۴۵، ۴۷]. در مطالعات گذشته نشان داده شده است تزریق تستوسترون و گلوتامید به ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌تواند باعث تخریب یادگیری و حافظه فضایی شود. این اثر می‌تواند با تبدیل تستوسترون به استروژن به انجام برسد [۳۶]. اما استروژن نمی‌تواند به طور مؤثری به سایر متابولیت‌ها تبدیل شود [۱۵، ۲۲]. یافته‌های متعددی نشان می‌دهند که استروژن نه تنها دارای اثرات مزمن (ژنومی) بر حافظه و یادگیری است، بلکه دارای اثرات سریع (غیر ژنومی) نیز می‌باشد [۶]. تولید دهیدرو اپی آندروسترون (DHEA) (آندروستنه‌دیون (AD)، تستوسترون و استروژن از کلسترول درونزاد در ناحیه CA1 هیپوکامپ گزارش شده است [۲۲]. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که هیپوکامپ دارای دسته‌ای از آنزیم‌ها می‌باشد که می‌توانند استروژن و تستوسترون را از کلسترول تولید کنند [۲۲، ۳۳]. بیان پروتئین‌های اساسی استروئیدساز مانند پروتئین تنظیمی حاد استروئیدساز (StAR)، ۳-بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (P450ScC, 17 $\alpha$ HSD) و P450 آروماتاز در سلول‌های اصلی هیپوکامپ نشان داده شده است [۱۵]. تخمین نسبت تولید آندروستنه‌دیون / تستوسترون / استروژن [۱۷:۲:۱] نشان می‌دهد که استروژن فعالانه تولید می‌شود. غلظت پایه استروژن در هیپوکامپ حدود ۶۰۰ PM می‌باشد که ۶ برابر بیشتر از غلظت آن در پلاسما است [۲۲]. با توجه به مطالب فوق برای بررسی نقش استروژن در ناحیه CA1 هیپوکامپ در یادگیری و حافظه فضایی ابتدا با تزریق استرادیول والرات و سپس با تزریق آناسترازول (مهار کننده آروماتاز) و در نتیجه عدم تبدیل تستوسترون به استروژن و در نهایت تزریق استرادیول والرات و آناسترازول به طور همزمان مورد بررسی قرار دهیم.

## مواد و روش‌ها

موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی (rat) نر بالغ از نژاد Albino- Wistar با وزن‌های ۲۵۰ - ۲۰۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات قبل از جراحی در گروه‌های ۴ تایی و پس از جراحی به طور انفرادی در قفس نگهداری می‌شدند. محل نگهداری حیوانات

برای هر حیوان در هر روز در چهار تریال و یک بلاک انجام می‌شد. در هر تریال به حیوان اجازه داده می‌شد تا ۹۰ ثانیه شنا کند و سکوی پنهان را که در ربع دایره جنوب غربی بود پیدا کند. این روند در چهار روز اول بدون تغییر تکرار می‌گردید. در روز پنجم سکو به روی آب آورده می‌شد و در ربع دایره شمال-غربی قرار داده می‌شد. و آزمایش در یک بلاک تکرار می‌گردید. بعد از آزمایشات رفتاری حیوانات بوسیله اتر بیهوش می‌شدند و با قطع کردن سرشان قربانی می‌شدند و مغز آنها خارج می‌گردید. از مغز حیوانات برش‌های ۱۰۰ میکرومتر تهیه می‌شد و به روش کرزیل ویوله (cresyl violet) رنگ‌آمیزی می‌شدند تا مکان قرارگیری کانول‌ها مشخص شود. این روند برای تمام حیوانات تکرار می‌شد و تنها داده‌های بدست آمده از حیواناتی که کانول به طور صحیح در ناحیه CA1 هیپوکمپ آنها قرار گرفته بود جهت تجزیه و تحلیل آماری مورد استفاده قرار می‌گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون ANOVA و T-test استفاده شده است.

آزمایش‌ها: آزمایش اول (تعیین اثر تزریق داخل هیپوکامپی استرادیول بر یادگیری و حافظه فضایی): در این آزمایش تعداد ۴۵ سر موش صحرایی را به شش گروه تقسیم کردیم، و به گروه‌های مختلف دوزهای متفاوت استرادیول‌الرات (EV)، ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم حل شده در ۰/۵μl DMSO تزریق شد. آزمایش دوم (تعیین اثر تزریق داخل هیپوکامپی آناسترازول بر یادگیری و حافظه فضایی): در این آزمایش تعداد ۳۳ سر موش صحرایی را به چهار گروه تقسیم کردیم، و به گروه‌های مختلف دوزهای متفاوت آناسترازول (An)، ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱μg حل شده در ۰/۵μl DMSO تزریق شد. آزمایش سوم (تعیین اثر تزریق داخل هیپوکامپی دو دوز DMSO بر یادگیری و حافظه فضایی): در این آزمایش تعداد ۱۶ سر موش صحرایی را به دو گروه تقسیم کردیم، و به گروه اول یک دوز DMSO (۰/۵μl) و به گروه دوم دو دوز DMSO (۰/۵μl+۰/۵μl) تزریق شد. آزمایش چهارم تعیین اثر تزریق داخل هیپوکامپی استرادیول والرات و آناسترازول (EV+An): در این آزمایش تعداد ۱۴ سر موش صحرایی را به دو گروه تقسیم کردیم، به گروه اول DMSO (۰/۵μl+۰/۵μl)، گروه دوم DMSO (۰/۵μl) + (An) ۱۵μg / ۰/۵μl DMSO تزریق شد.

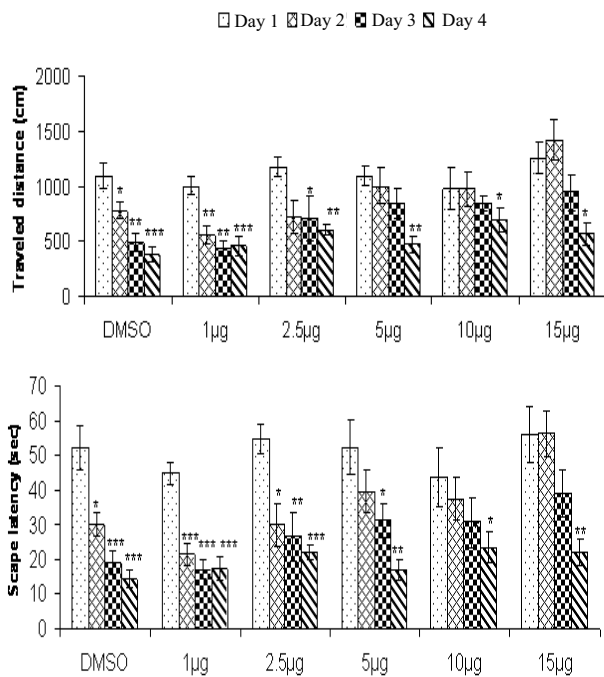
دارای دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد بود. آب و غذا به مقدار کافی در اختیار حیوانات قرار داشت. در تمام مراحل آزمایش طبق معادلات هلسینکی رفتار شده است.

حیوانات بوسیله کتامین ( $100 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $25 \text{ mg/kg}$ ) که به صورت داخل صفاقی تزریق می‌شدند بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکس (Stoeleting USA) قرار می‌گرفتند. ناحیه CA1 به صورت دو طرفه کانول گذاری می‌شد. عمل استریوتاکسی بر طبق اطلس پاکسینوس و واتسون با مختصات Anterior- Posterior AP-3/8 mm از برگما، mm Dorsal 3/7 mm ± Medial- lateral (ML) 2/2 ± از خط وسط، mm Ventral (DV) - از سطح مجمله انجام می‌شد.

در روزهای آموزش، ۳۰ دقیقه قبل از شروع تست  $1 \mu\text{l} / 0.5$  دارو یا حلال آن در مدت ۲ دقیقه بوسیله دستگاه Microinjection به درون ناحیه CA1 هیپوکمپ حیوانات تزریق می‌شد. در نمونه‌هایی که دو داروی متفاوت تزریق می‌شد داروی اول (استروژن) ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش و داروی دوم (آناسترازول) حدود ۵ دقیقه بعد یعنی ۲۵ دقیقه قبل از آزمایش تزریق می‌شد. هنگام تزریق حیوانات هوشیار بودند.

دستگاه ماز آبی یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ با قطر ۱۳۶ سانتی متر و ارتفاع ۶۰ سانتی متر می‌باشد، که تا ارتفاع ۲۵ سانتی متر آن با آب  $1 \pm 20$  درجه سانتی‌گراد پر می‌شود. سکویی کوچک از جنس پلکسی گلاس شفاف با قطر ۱۰ سانتی متر، که ۱ سانتی متر زیر سطح آب در وسط یکی از چهار ربع دایره فرضی حوضچه قرار می‌گیرد و حیوان می‌تواند برای فرار از آب به روی آن پناه ببرد. این ماز در اتاقی دارای نشانه‌های از قبیل یخچال، پوستر و کتابخانه قرار دارد. ماز به طور فرضی به چهار ربع دایره شمال شرقی، شمال غربی، جنوب شرقی و جنوب-غربی تقسیم می‌شود و دارای چهار نقطه شروع شمال، جنوب، غرب و شرق می‌باشد که با فاصله‌های مساوی در اطراف حوضچه قرار دارند. یک دوربین ویدیویی درست بالای حوضچه قرار دارد که مسیر شنای حیوان را فیلم برداری می‌کند. سرعت شنا، زمان سپری شده و مسافت طی شده توسط هر حیوان تا یافتن سکوی پنهان بوسیله سیستم کامپیوتری اندازه‌گیری و ثبت می‌شود.

همه آزمایشات در ساعت ۸ صبح شروع می‌شد. آزمایش

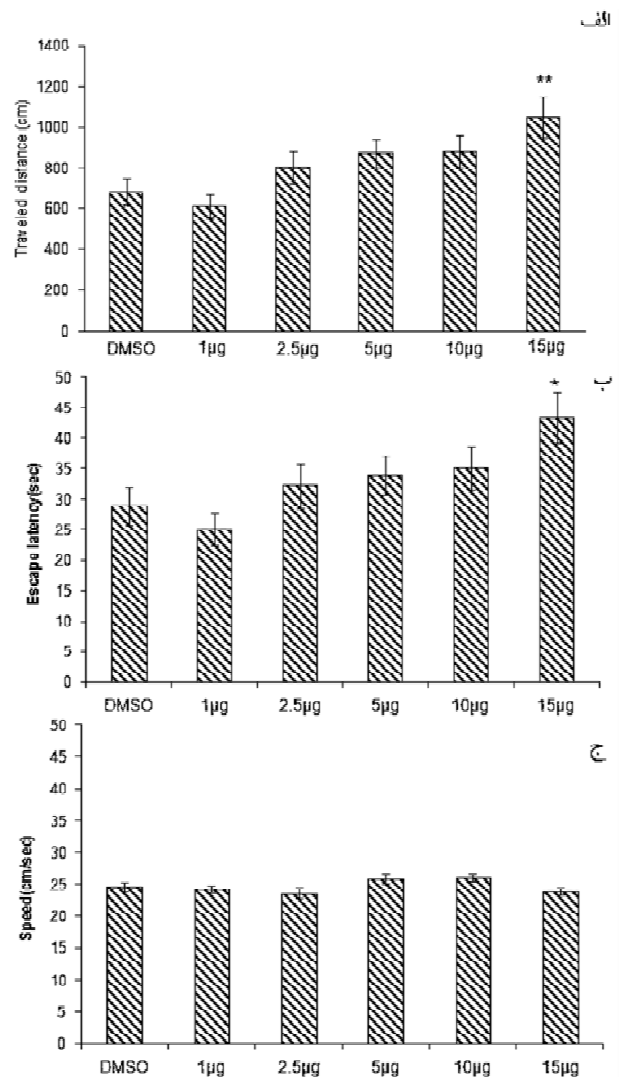


شکل ۲- مقایسه یادگیری در گروه‌های دریافت کننده استرادیول والرات با گروه کنترل. مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب). نمودارها نشان می‌دهند که تمام گروه‌ها راه پیدا کردن سکوی پنهان را یاد گرفته‌اند. اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب) تا یافتن سکوی پنهان در میان همه گروه‌ها وجود دارد. ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ )

نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرده‌است (شکل ۱:  $P < 0.0585$ ) که نشان می‌دهد داروی تزریق شده بر فعالیت‌های حرکتی تأثیری نداشته‌است. همچنین تفاوت معنی‌دار در زمان ( $F_{6,45} = 8.162$ ,  $P < 0.0001$ ) و مسافت طی شده ( $P < 0.0006$ )، وجود دارد که نشان دهنده ایجاد یادگیری است (شکل ۲: الف و ب). مقایسه عملکرد روزانه حیوانات در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که EV با دوز  $15 \mu\text{g}$  در روز دوم افزایش معنی‌دار در مسافت طی شده ( $F_{6,45} = 4.844$ ,  $P < 0.0015$ ) و زمان لازم برای یافتن سکوی پنهان ( $F_{6,45} = 4.513$ ,  $P < 0.0009$ ) ایجاد کرده‌است (شکل ۳: الف و ب).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که EV تزریق شده در ناحیه CA1 هیپوکمپ با دوز  $15 \mu\text{g}$  اثر تخریبی بر یادگیری و حافظه داشته‌است.

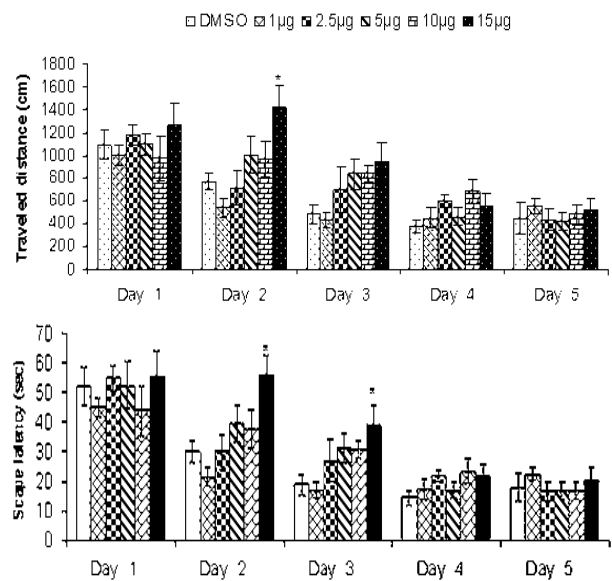
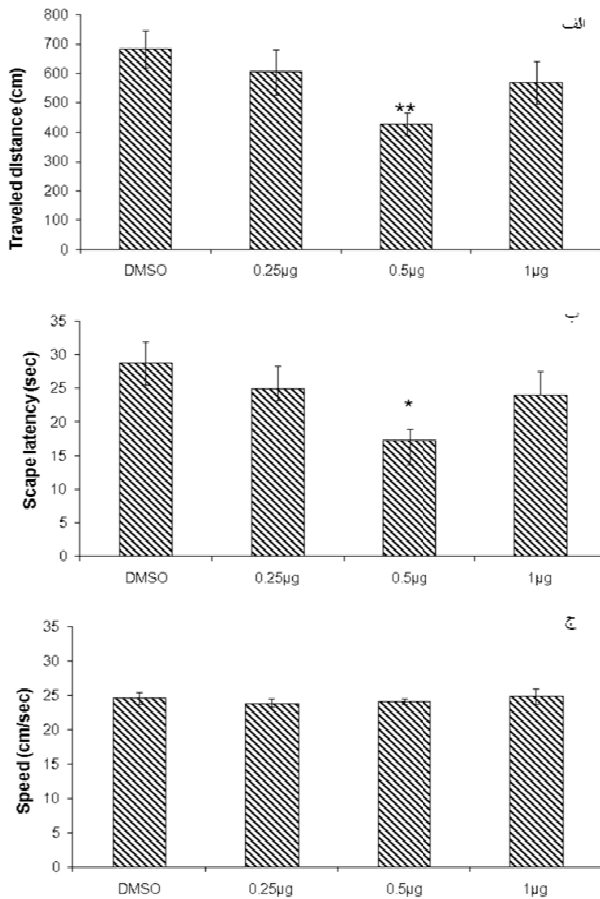
مقایسه عملکرد گروه‌های دریافت کننده CA1 در آزمایش سکوی آشکار (روز پنجم) با عملکرد گروه کنترل در مسافت طی شده و زمان سپری شده تا یافتن سکوی پنهان اختلاف معنی‌داری ندارد (شکل ۳: ب). بنابراین EV



شکل ۳- میانگین مسافت طی شده (الف) زمان سپری شده (ب) و سرعت شنا (ج) در روزهای آزمایش. نمودار اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده و زمان سپری شده تا یافتن سکوی پنهان، میان گروه دریافت کننده  $15 \mu\text{g}$  استرادیول والرات و گروه دریافت کننده DMSO  $0.5 \mu\text{l}$  (کنترل) را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$  و  $P < 0.001$ ).

## یافته‌ها

آزمایش اول: نتایج حاصل از تزریق استرادیول والرات نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده ( $F_{6,45} = 4.299$ ,  $P < 0.0010$ ) و زمان لازم ( $P < 0.0071$ )، برای یافتن سکوی پنهان بین گروه دریافت کننده  $15 \mu\text{g}$  استرادیول و گروه کنترل وجود دارد (شکل ۱: الف و ب). مقادیر مختلف EV تزریق شده در ناحیه CA1 هیپوکمپ تغییر معنی‌دار در سرعت شنای حیوانات ( $F_{6,45} = 2.180$ )،



شکل ۳- مقایسه مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب) در روزهای یکسان در گروه‌های مختلف نمودار نشان می‌دهد که مسافت طی شده در گروه دریافت کننده ۱۵µg / ۰/۵µl در روز دوم و زمان سپری شده در روز دوم و سوم آزمایش در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار دارد (\*\*P<۰/۰۱) و (\*P<۰/۰۵). در آزمایش سکوی آشکار اختلاف معنی‌دار در زمان سپری شده و مسافت طی شده دیده نمی‌شود (روز پنجم).

فعالیت‌های انگیزشی و دیداری حیوان اختلال ایجاد نکرده است.

۱. ۲. ۳- آزمایش با نتایج حاصل از آزمایش سکوی پنهان (روزهای ۴-۱) نشان می‌دهند که دوز ۰/۵µl آناسترازول (An) مسافت طی‌شده ( $F_{4,33}=3/684, P<0/013$ ) و زمان لازم ( $F_{4,33}=3/355, P<0/0211$ ) برای یافتن محل سکوی پنهان را بصورت معنی‌دار کاهش داده‌است (شکل ۴: الف و ب).

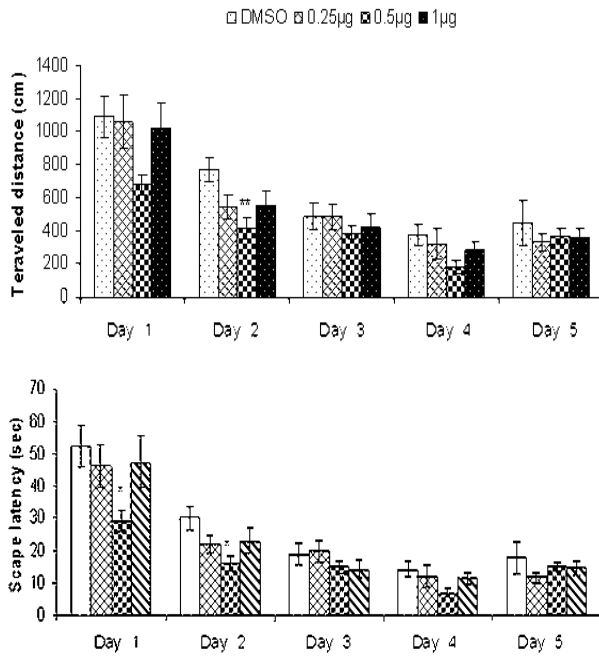
مقادیر مختلف An تزریق شده در ناحیه CA1 هیپوکمپ تغییر معنی‌دار در سرعت شنای حیوانات ایجاد نکرده‌است (شکل ۴: ج) که نشان می‌دهد داروی تزریق شده بر فعالیت‌های حرکتی تأثیری نداشته‌است. تفاوت معنی‌دار در زمان ( $F_{4,33}=14/273, P<0/0001$ ) و مسافت طی شده ( $F_{4,33}=12/789, P<0/0001$ ) توسط حیوان‌ها در طول روزهای آزمون وجود دارد (شکل‌های ۵: الف و ب) که نشان می‌دهد یادگیری ایجاد شده‌است. مقایسه عملکرد روزانه حیوان‌ها در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که An با دوز ۰/۵ µg در روز دوم کاهش معنی‌دار در مسافت طی شده ( $F_{4,33}=4/503, P<0/011$ ) و

شکل ۴- میانگین مسافت طی شده (الف) زمان سپری شده (ب) و سرعت شنا (ج) در روزهای آزمایش. نمودار اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده و زمان سپری شده تا یافتن سکوی پنهان، میان گروه دریافت کننده ۰/۵µl آناسترازول و گروه دریافت کننده ۰/۵µl DMSO (کنترل) را نشان می‌دهد (\*\*P<۰/۰۱) و (\*P<۰/۰۵).

در روز اول و دوم زمان لازم برای یافتن سکوی پنهان ( $F_{4,33}=3/788, P<0/0218$ ) ایجاد کرده‌است (شکل‌های ۶: الف و ب).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که An تزریق شده در ناحیه CA1 هیپوکمپ با دوز ۰/۵ µg اثر تقویتی بر یادگیری و حافظه داشته‌است.

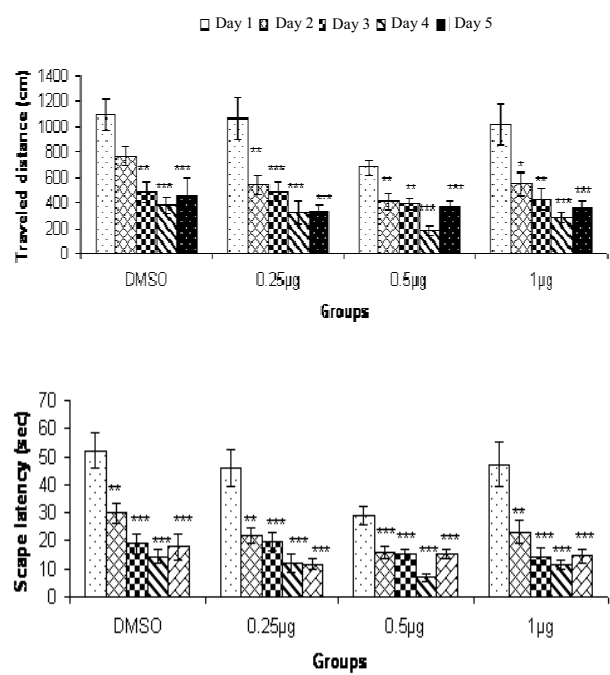
مقایسه عملکرد گروه‌های دریافت کننده An در آزمایش سکوی آشکار (روز پنجم) با عملکرد گروه کنترل در مسافت طی شده ( $F_{4,33}=0/3348, P<0/8003$ ) و زمان سپری شده ( $F_{4,33}=0/5524, P<0/6509$ ) تا یافتن سکوی پنهان اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهد (شکل ۶: ب). بنابراین An در فعالیتهای انگیزشی و دیداری حیوان اختلال ایجاد نکرده‌است. نتایج آزمایش سکوی پنهان نشان می‌دهد که دو تزریق



**شکل ۶-** مقایسه مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب) در روزهای یکسان آزمایش در بین گروه‌های مختلف. گروه دریافت‌کننده آناسترازول با دوز  $0.5\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$  در مقایسه با گروه کنترل در مسافت طی شده در روز دوم و زمان سپری شده در روز اول و دوم اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد ( $P < 0.01$ ) و ( $P < 0.05$ ). آزمایش سکوی آشکار اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده و زمان سپری شده تا یافتن سکوی آشکار نشان نمی‌دهد (روز پنجم).

به گروه کنترل شده‌است. اما در سرعت شنا ( $P < 0.0003$ ), تفاوت معنی‌دار در زمان ( $T = 2/384$ ) اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهد (شکل ۷: ج). مسافت طی شده ( $T = 25/127, P < 0.0001$ ) توسط حیوان‌ها در طول روزهای آزمون وجود دارد (شکل ۸: الف و ب) که نشان می‌دهد یادگیری در همه گروه‌ها ایجاد شده‌است. مقایسه عملکرد روزانه حیوان‌ها نشان می‌دهد که تزریق EV+An باعث افزایش معنی‌دار در مسافت طی شده ( $T = 6/813, P < 0.0059$ ) و زمان لازم برای یافتن سکوی پنهان ( $T = 9/457, P < 0.0014$ ) شده‌است (شکل ۹: الف و ب).

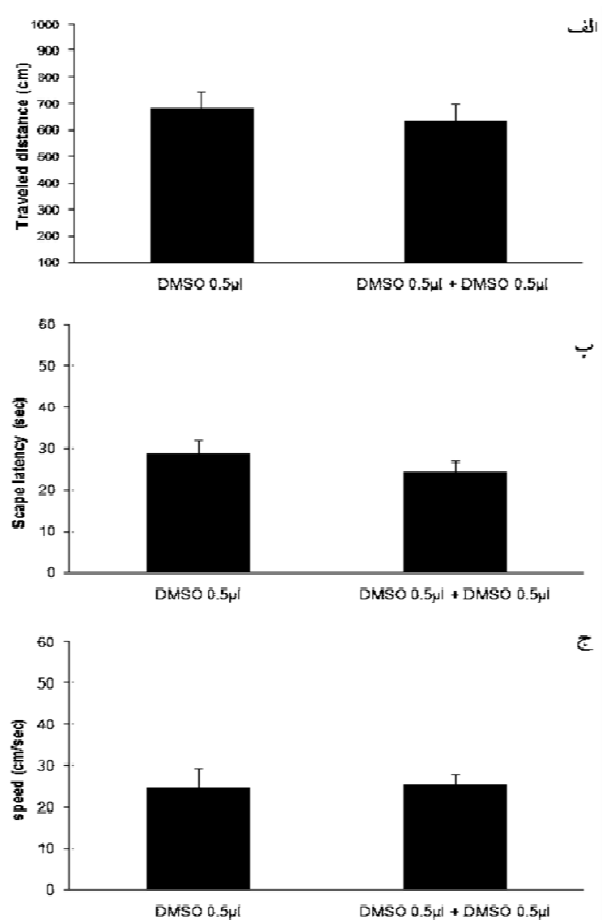
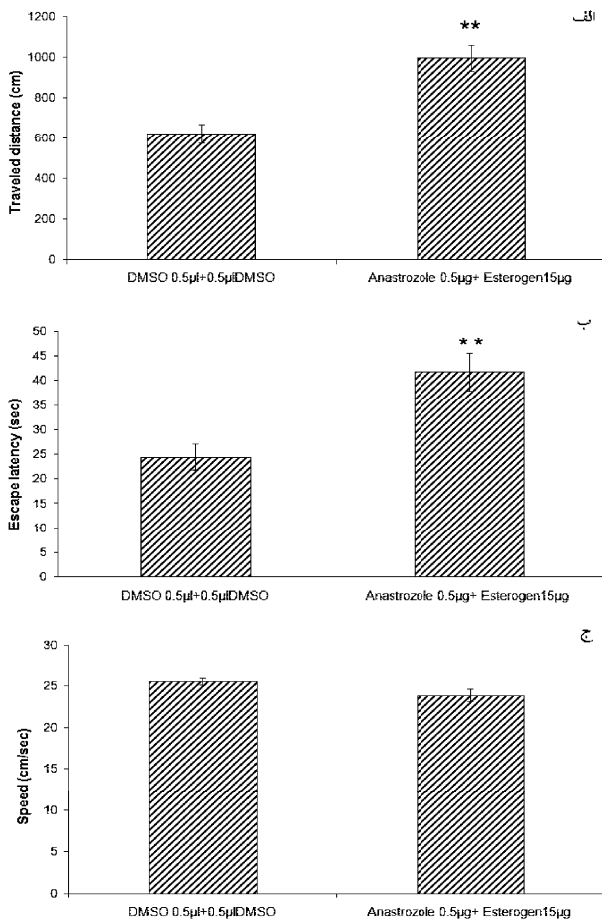
مقایسه عملکرد گروه دریافت‌کننده و استرادیول در آزمایش سکوی آشکار (روز پنجم) با عملکرد گروه کنترل در مسافت طی شده ( $T = 0/6898, P < 0.5138$ ) و زمان سپری شده ( $T = 0/6250, P < 0.5459$ ) تا یافتن سکوی پنهان اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهد (شکل ۹: ب). بنابراین EV در فعالیت‌های انگیزشی و دیداری حیوان اختلال ایجاد نکرده‌است.



**شکل ۵-** مقایسه یادگیری در گروه‌های دریافت‌کننده آناسترازول و گروه کنترل. مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب). نمودارها نشان می‌دهند که تمام گروه‌ها راه یافتن سکوی پنهان را یاد گرفته‌اند. اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب) تا یافتن سکوی پنهان در میان همه گروه‌ها وجود دارد. ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ )

متوالی DMSO هر کدام به حجم  $0.5\mu\text{l}$  میکرولیتر به فاصله ۵-۷ دقیقه به موش‌های صحرایی، در مقایسه با گروهی که یک تزریق DMSO به حجم  $1\mu\text{l}$  دریافت کرده‌اند، اختلاف معنی‌دار در زمان لازم ( $T = 1/025, P < 0.3095$ ) مسافت طی شده ( $T = 0/5324, P < 0.5951$ ) و سرعت حیوان تا یافتن سکوی پنهان ایجاد نمی‌کند.

تزریق دو طرفه داخل هیپوکمپی  $0.5\mu\text{l}$  از دوز  $1\mu\text{g}$  استرادیول والرات و ۷-۵ دقیقه بعد از آن تزریق دو طرفه داخل هیپوکمپی  $0.5\mu\text{l}$  از دوز  $0.5\mu\text{g}$  آناسترازول و مشاهده نتایج حاصل از آن، نشان می‌دهد که آناسترازول نتوانسته است اثر تخریبی ناشی از تزریق استروژن در CA1 بر یادگیری و حافظه فضایی را تغییر دهد. همانطور که در (شکل ۷: الف و ب) مشاهده می‌شود تزریق استرادیول والرات و آناسترازول باعث افزایش در مسافت پیموده شده ( $T = 5/175, P < 0.0076$ )، و زمان لازم برای یافتن سکوی پنهان نسبت



**شکل ۸-** مقایسه یادگیری در گروه‌های دریافت کننده آناسترازول + استرادیول والرات و گروه کنترل. مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب). شکل‌ها نشان می‌دهند که تمام گروه‌ها راه یافتن سکوی پنهان را یاد گرفته‌اند. اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب) تا یافتن سکوی پنهان در میان همه گروه‌ها وجود دارد. ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ )

**شکل ۷-** میانگین مسافت طی شده (الف) زمان سپری شده (ب) و سرعت شنا (ج) در روزهای آزمایش. نمودار اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده و زمان سپری شده تا یافتن سکوی پنهان، میان گروه دریافت کننده  $0.5\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$  آناسترازول +  $15\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$  استرادیول والرات و گروه دریافت کننده  $0.5\mu\text{l}$  DMSO +  $0.5\mu\text{l}$  DMSO (کنترل) را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ ).

## بحث

نسبت به گروه کنترل کاهش دهد. این یافته با گزارشات پیشین که نشان می‌دهند غلظت‌های بالای استرادیول در ارتباط با کاهش یادگیری در ماز آبی می‌باشند هماهنگ است [۱۷، ۳۱]. اثرات داخل سلولی هورمون‌های استروئیدی به خوبی شناخته شده‌اند. در کنار گیرنده‌های استروژنی شناخته شده ( $ER\alpha$ ) گیرنده جدیدتری تحت عنوان ( $ER\beta$ ) شناخته شده است. این گیرنده‌ها در انسان به وسیله ژن‌های مجزا در کروموزوم ۶ ( $ER\alpha$ ) و کروموزوم ۱۴ ( $ER\beta$ ) بیان می‌شوند. این گیرنده‌های هسته‌ای استروژن اگزون‌های یکسانی دارند و همولوگی زیادی در ناحیه کد کننده مربوط به منطقه متصل شونده به DNA و لیگاند نشان می‌دهند. علی‌رغم این خصوصیات اتصالی و فعال شدن متقابل، گیرنده‌های  $\alpha$  و  $\beta$  تفاوت‌های بارزی دارند [۷]. آنالیز میل اتصالی گیرنده‌ها در حالت اشباع مشخص می‌کند

در این مطالعه موش‌های صحرایی درمان شده با دوزهای مختلف استرادیول والرات [۱، ۲/۵، ۵، ۱۰ و  $15\mu\text{g}$ ] مورد آزمایش قرار گرفتند. در گروه درمان شده با  $15\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$  استرادیول عملکرد فضایی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. از آنجایی که تغییر معنی‌داری بین عملکرد گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی در روز پنجم (سکوی آشکار) دیده نمی‌شود و اینکه تغییر معنی‌داری در سرعت شنا دیده نمی‌شود. به این نکته دلالت دارد که عوامل تحریک کننده حسی و هیجانی نتایج ما را مختل نکرده‌اند. استرادیول والرات می‌تواند یادگیری را در ماز آبی موریس



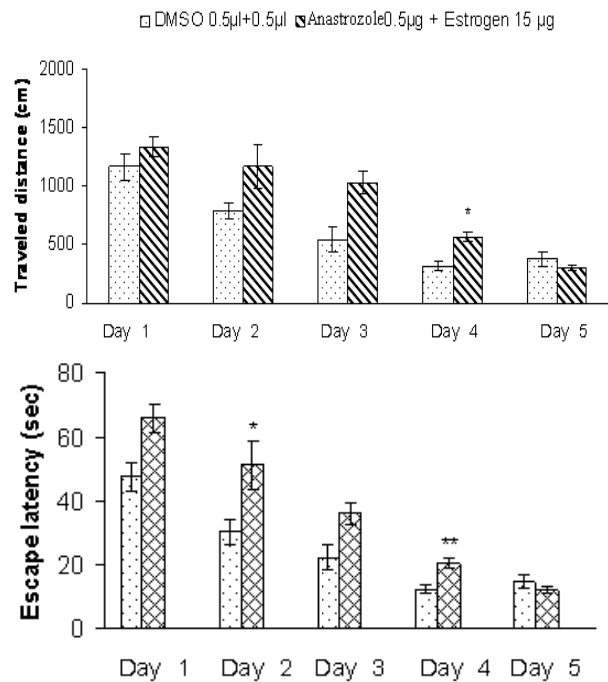
باشد.

Packard و همکارانش نشان دادند که تزریق استروژن به داخل هیپوکمپ پس از مرحله آموزش در موش‌های نر و موش‌های ماده که تخمدان آنها برداشته شده بود، باعث افزایش یادآوری در MWM می‌شود [۳۸، ۴۰]. نتایج این آزمایش با یافته‌های ما تناقض دارد. این اختلاف در نتایج می‌تواند به علت تفاوت در زمان تزریق و یا پروسه آزمایش باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تزریق آناسترازول با دوز  $0.5\mu\text{g} / 0.5\mu\text{l}$  توانسته است باعث کاهش معنی‌دار در مسافت طی شده و زمان سپری شده تا رسیدن حیوان به سکوی پنهان شود. این نتایج بر این نکته دلالت دارند که آناسترازول عملکرد فضایی را بهبود می‌بخشد. اما در روز پنجم آزمایش (سکوی آشکار) اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های مورد آزمایش وجود ندارد که نشان می‌دهد تغییرات مشاهده شده را نمی‌توان به تحریکات حسی و هیجانانگیزی ناشی از پروسه آزمایش نسبت داد.

گروه دریافت‌کننده آناسترازول با دوز  $0.5\mu\text{g} / 0.5\mu\text{l}$  علاوه استرادیول والرات  $15\mu\text{g} / 0.5\mu\text{l}$  افزایش معنی‌داری در مسافت طی شده و زمان سپری شده تا یافتن سکوی پنهان نشان می‌دهد در حالیکه تغییر معنی‌داری در روز پنجم دیده نمی‌شود. مطالعات ما نشان می‌دهد که EV باعث تخریب یادگیری و حافظه می‌شود. اما آناسترازول یادگیری و حافظه را بهبود می‌بخشد در حالیکه آناسترازول بر اثر تخریبی بی‌تأثیر است. پس می‌توان پنداشت که آناسترازول از طریق مهار تولید استروژن در هیپوکمپ باعث افزایش یادگیری و حافظه فضایی می‌شود.

بسیاری از اثرات بیولوژیک آندروژن‌ها به تبدیل موضعی این استروئیدها به استروژن نیاز دارد [۴]. این تبدیل به واسطه آنزیم استروژن سنتاز (آروماتاز) به انجام می‌رسد. تستوسترون و آندروستندیون دو آندروژنی هستند که در مغز مهره داران یافت می‌شوند و می‌توانند به ترتیب به استرادیول و استرون تبدیل شوند. جنبه‌های مختلف عملکرد جنسی، جنس مذکر به وسیله آندروژن‌های گنادی تنظیم می‌شوند. القاء رفتارهای خاص جنس نر، پس خوراند منفی تستوسترون بر آزاد شدن هورمون‌های LH و FSH به تبدیل تستوسترون به استرادیول و در ادامه اتصال استرادیول به گیرنده استروژن نیاز دارد [۳۰]. اهمیت این پروسه



شکل ۹- مقایسه مسافت طی شده (الف) و زمان سپری شده (ب) در روزهای یکسان آزمایش در بین گروه‌های مختلف. گروه دریافت‌کننده آناسترازول با دوز  $0.5\mu\text{g} / 0.5\mu\text{l} + 15\mu\text{g} / 0.5\mu\text{l}$  استرادیول والرات در مقایسه با گروه کنترل در مسافت طی شده و زمان سپری شده در روز چهارم اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد ( $*P < 0.05$  و  $**P < 0.01$ ). آزمایش سکوی آشکار اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده و زمان سپری شده تا یافتن سکوی آشکار نشان نمی‌دهد (روز پنجم).

که ۱۷-بتا استرادیول میل بالاتری به گیرنده  $\alpha$  دارد و گیرنده فعال شده  $\alpha$  به عنوان فعال‌کننده نسخه برداری از ناحیه CA1 عمل می‌کند. در حالیکه گیرنده  $\beta$  نسخه برداری را مهار می‌کند [۴۱]. هر دو گیرنده به صورت گسترده‌ای در مغز بیان می‌شوند اما با اینکه همپوشانی دارند از نظر کمیتی در هر ناحیه و در هر جنس تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند [۷]. گمان می‌رود که اختلاف در میل اتصالی و خصوصیات فعال‌کننده متقابل گیرنده‌های  $\alpha$  و  $\beta$  اساس مولکولی تخریب وابسته به استروژن در حافظه و یادگیری فضایی باشد.

فرضیه دیگر که نتایج ما را توجیه می‌کند این است که استرادیول انتشار گلوتامات را افزایش می‌دهد. با توجه به این فرضیه با افزایش میزان انتشار گلوتامات به محدوده گسترده‌تر EPSP تأخیری وابسته به گیرنده‌ای NMDA در ناحیه CA1 با فعال شدن گیرنده‌های NMDA خارج از محل سیناپس و در مجاورت سیناپس‌های فعال شده و یا در سیناپس‌های مجاور ایجاد می‌شود [۲۳]. بر طبق این تئوری، تغییرات ساختمانی ناشی از اثر استروژن در هیپوکمپ می‌تواند عامل کاهش یادگیری و حافظه

- Neurosci* 111 (1997) 267–74.
- [7] Beyer C. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol* 199 (1999) 379–90.
- [8] Boon WC, Diepstraten J, Burg Jvd, Margaret EE, Evan J, Buuse M. Hippocampal NMDA receptor subunit expression and watermaze learning in estrogen deficient female mice. *Mol Brain Res* 140 (2005) 127–32.
- [9] Choi J, Silverman I. The relationship between testosterone and route learning strategies in human. *Brain Cogn* 50 (2002) 116–20.
- [10] Debonnel G, Bergeron R, Montigny C. Potentiation by dehydroepiandrosterone of the neuronal response to N-methyl-d-aspartate in the CA3 region of the rat dorsal hippocampus: an effect mediated via sigma receptors. *J Endocrinol* 150 (1996) 33–42.
- [11] Edinger KL, Lee B, Frye CA. Mnemonic effects of testosterone and its 5alpha-reduced metabolites in the conditioned fear and inhibitory avoidance tasks. *Pharmacol Biochem Behav* 78 (2004) 559–68.
- [12] Elissa JC, Janice MJ. Acute administration of estrogen and progestrone impairs the acquisition of the spatial Morris water maze in ovariectomized rats. *Horm Behav* 38 (2000) 234–42.
- [13] Flood JF, Farr SA, Kaiser FE. Age-related decrease of plasma testosterone in SAMP8 mice: replacement improves age-related impairment of learning and memory. *Physiol Behav*. 57 (1995) 669–73.
- [14] Flood JF, Roberts E. Dehydroepiandrosterone sulfate improves memory in aging mice. *Brain Res* 118 (1988) 178–81.
- [15] Furukuwa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, Suzuki K, Tanabe N, et al. Hippocampal cytochrome P450 synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1619 (2003) 301–16.
- [16] Galea LAM, Kavaliers M, Ossenkopp KP, Hampson E. Gonadal hormone levels and spatial learning performance in the Morris water maze in male and female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Horm Behav* 29 (1995) 106–25.
- [17] Gelea LAM, Wide JK, Paine TA, Holmes MM, Floresco SB, Ormerod BK. High levels of estradiol disrupt conditioned place preference learning, stimulus response learning and reference memory but have no effects on working memory. *Behav Brain Res* 126 (2001) 115–26.
- در این است که تقریباً در همه مهره‌داران دیده می‌شود [۴]. آروماتاز و گیرنده‌های استروژن در هیپوکمپ شناسایی شده‌اند [۲۲]. مطالعات متعددی بیان می‌کنند که گیرنده NMDA نقش مهمی در یادگیری و حافظه دارد [۵۰]. این نقش تحت تأثیر استروژن و سایر هورمون‌های استروئیدی جنسی قرار می‌گیرد [۴]. مطالعات دیگری نشان داده‌اند که استروژن بر بیان زیر واحدهای گیرنده NMDA اثر می‌کند و از آن طریق بر حافظه و یادگیری مؤثر است [۵۰].
- از داده‌های ما می‌توان نتیجه گرفت که اثر استروژن بر بیان زیر واحدهای گیرنده NMDA مهاری است. بنابراین عدم حضور استروژن در گروه‌های دریافت کننده آروماتاز بیان زیر واحدهای NR2A NMDA (NR1 و NR2B) که در یادگیری و حافظه مهم هستند، را تغییر می‌دهد [۸].
- به طور خلاصه به نظر می‌رسد که آناسترازول (مهارکننده آروماتاز) با مهار سنتز استرادیول والرات سبب بهبود یادگیری می‌شود ولی نمی‌تواند مانع اثر تخریبی استرادیول والرات تزریقی به ناحیه CA1 هیپوکمپ بر یادگیری و حافظه فضایی شود.

## منابع

- [1] Ball M. the female sex cycle as a factor in learning in the rat. *Am J Physiol* 78 (1926) 533–6.
- [2] Balthazart J, Foidart A. Brain aromatase and the control of male sexual behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44 (1993) 521–40.
- [3] Balthazart J, Cornil CA, Taziaux M, Charlier TD, Bajllien M, Ball GF. Rapid changes in production and behavioral action of estrogen. *Neuroscience* 138 (2006) 783–91.
- [4] Balthazart J, Baillien M, Charlier T, Cornil C, Ball G. Multiple mechanisms control brain aromatase activity at the genomic and non-genomic level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86 (2003) 367–79.
- [5] Balthazart J. Androgen and estrogen action in the preoptic area and activation of copulatory behavior in quail. *Physiol Behav*. 48 (1990) 599–609.
- [6] Berry B, Berry R, Gallagher M. Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampaldependent task. *Behav*

- (1975) 127–31.
- [33] Mccarthy MM. Functional significance of steroid modulation of GABAergic neurotransmission: analysis at the behavioral, cellular, and molecular levels. *Horm Behav* 29 (1995) 131–40.
- [34] Naftolin F, Maclusky NJ. Aromatase in the central nervous system. *Cancer Res* 42 (1982) 3274–3276.
- [35] Naftolin F. Sex steroids and the brain. *Gynecol Endocrinol* 24 (2008) 533-4.
- [36] Naghdi N, Nafisy N, Majlessi N. The effects of intra-hippocampal testosterone and flutamide on spatial localization in Morris water maze. *Brain Res* 897 (2001) 44–51.
- [37] Naghdi N, Oryan S, Etemadi R. The study of spatial memory in adult male rats with injection of testosterone enanthate and flutamide into the basolateral nucleus of the amygdale in Morris water maze. *Brain Res* 972 (2003) 1–8.
- [38] Packard MG. Intra-hippocampal estradiol infusion enhances memory in ovariectomized rats. *Neuroreport* 8 (1997) 3009–13.
- [39] Packard MG, Kohlmaier JR, Alexander GM. Post-training intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic systems. *Behav Neurosci* 110 (1996) 626–32.
- [40] Packard MG. Post-training estrogen and memory modulation. *Horm Behav* 34 (1998) 126–39.
- [41] Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson JA, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER<sub>α</sub> and ER<sub>β</sub> at AP1 sites. *Science* 277 (1997) 1508–1510.
- [42] Pereyra FV, Arancibia SR, Castio ALDel, Rivas SS. Modulation of short-term and long-term memory by steroid sexual hormones. *Life Sci* 56 (1995) 225–60.
- [43] Poucet B, Save E, Lenck-Santini P-P. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev Neurosci* 11 (2000) 95–111.
- [44] Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff E, Martin SJ, Bridge H, et al. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2 (1999) 898–905.
- [45] Rubinow DR, Schmidt PJ. Androgens, brain, and behavior. *Am J Psych* 153 (1996) 947–58.
- [46] Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-lorence S, et al. Aromatase [18] Goudsmit C, Kimura D. The relationship between testosterone levels and cognitive ability patterns. *Psychoneuroendocrinology* 16 (1991) 323–34.
- [19] Hampson E. Variations in sex-related cognitive abilities across the menstrual cycle. *Brain Cogn* 14(1990) 26-43.
- [20] Hampson E. Spatial cognition in humans: possible modulation by androgens and estrogens. *J Psychol Neurosci* 20 (1995) 397–404.
- [21] Hiltunen M, Iivonen S, Soininen H. Aromatase enzyme and Alzheimer's disease. *Minerva Endocrinol* 31 (2006) 61–73.
- [22] Hojo Y, Hattori T-A, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H-T, et al. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017<sub>α</sub> and P450 aromatase localized in neuros. *PANS* 101 (2004) 865–70.
- [23] Jahr CE. Drooling and stuttering, or do synapses whisper? *Trends Neurosci* 26 (2003) 7–9.
- [24] Janowsky JS, Oviatt SK, Orwoll ES. Testosterone influences spatial cognition in older men. *Behav Neurosci* 108 (1994) 325–32.
- [25] Jarvik LF. Human intelligence: sex differences. *Acta Genet Med Gemellol* 34 (1998) 183–98.
- [26] Joseph R, Hess S, Birecree E. Effect of hormone manipulations and exploration on sex differences in maze learning. *Behav Biol* 24 (1978) 364–77.
- [27] Kerr JE, Allore RJ, Beck SE, Handa RJ. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger RNA in the rat hippocampus. *Endocrinology* 136 (1995) 3213–3221.
- [28] Kerr JE, Beck SE, Handa RJ. Androgens selectively modulate c-fos messenger RNA induction in the rat hippocampus following novelty. *Neuroscience* 74 (1996) 757–66.
- [29] Kransoff A, Weston LM. Puberal status and sex differences: actively and maze behavior in rats. *Dev Psychobiol.* 9 (1976) 261–9.
- [30] Lephart ED. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Rev* 22 (1996) 1–26.
- [31] Liisa AM, Tiffany T-Y, Jesse A, Alasdair M. High level of estradiol impairs spatial performance in the Morris water maze and increase “depressive like” behaviors in the female meadow vole. *Physiol Behav* 77 (2002) 217–25.
- [32] Maxwell JW, Caroake JW, Biddle AP. Sex differences in the comprehension of spatial orientation. *J Psychol* 91

- testosterone levels are associated with cognitive performance in older women and men. *Horm Behav* 41 (2002) 259–66.
- [50] Zamani MR, Levy WB, Desmond NL. Estradiol increased delayed, Nmethyl d-aspartate receptor-mediated excitation in the hippocampal CA1 region. *Physiol Behav* 77 (2002) 217–25.
- [51] Zamani MR, Desmond NL, Levy WB. Estradiol modulates long-term synaptic depression in female rat hippocampus. *J Neurophysiol* 84 (2000) 1800–8.
- cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15 (1994) 342–55.
- [47] Sternbach H. Age-associated testosterone decline in men: clinical issues for psychiatry. *Am J Psych* 155 (1998) 203–18.
- [48] Williams CL, Barnett AM, Meck WH. Organizational effects of early gonadal secretion on sexual differentiation in spatial memory. *Behav Neurosci* 104 (1990) 84–97.
- [49] Wolf OT, Kirschbaum C. Endogenous estradiol and