Archive of SID

Original Article

The Effect of Intrahippocampal Injection of Ghrelin on Morphine-Induced Amnesia by Passive Avoidance Task in Male Laboratory Rats

Niloufar Darbandi[1], Farzaneh Nazari Serenjeh[2*], Parham Moradi[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran.

[2]Department of Biology, Payame Noor University, Post Box 19395-3697, Tehran, Iran.

Corresponding Author:
Farzaneh Nazari Serenjeh;
Department of Biology, Payame Noor University, Post Box 19395-3697, Tehran, Iran.

Email: nazari_farzaneh@yahoo.com

Received: 14 Mar, 2018
Accepted: 13 May, 2018

Abstract

Background and Objectives: Ghrelin is a peptide hormone, which is secreted by stomach cells and has an important role in the metabolism and energy homeostasis. This hormone crosses the blood-brain barrier and enters the hippocampus, where it affects the learning process and memory. In the present study, the effect of intrahippocampal injection of ghrelin on morphine-induced amnesia was investigated using passive avoidance learning model in experimental male rats.

Methods: In this experimental study, the animals were implanted with cannula in the CA1 region, and morphine was injected subcutaneously and ghrelin was locally injected into the CA1 region. Then, memory retrieval was assessed by a passive avoidance task.

Results: Post-training subcutaneous administration of different doses of morphine (0.5, 2.5, 5, 7.5mg/kg body weight) reduced step-through latency in a dose dependent manner, indicating morphine-induced amnesia. Injection of different doses of ghrelin into the CA1 region together with the effective dose of morphine (dose, 7.5mg/kg body weight) significantly increased memory retrieval compared to the morphine group (dose, 7.5mg/kg body weight).

Conclusion: The findings of this study revealed that injection of ghrelin into the hippocampal region inhibits the morphine-induced amnesia in the passive avoidance learning model; therefore, it can be considered in the improvement of morphine-induced memory impairment.

Keywords: Ghrelin; Morphine; Memory.

www.SID.ir

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره هشتم، آبان ۹۷
صفحه ۱۹ الی ۲۹
Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر تزریق درون هیپوکامپی گرلین بر فراموشی القاشده ناشی از مورفین با مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال در موش بزرگ نر آزمایشگاهی

نیلوفر دربندی[۱]، فرزانه نظری سرنجه[۲*]، پرهام مرادی[۱]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶، ایران.
[۲]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، صندوق پستی ۳۶۹۷- ۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: گرلین یک هورمون پپتیدی است که از سلول‌های معده ترشح می‌شود و نقش مهمی در تنظیم متابولیسم و تعادل انرژی در بدن دارد. این هورمون از سد خونی - مغزی عبور کرده و با ورود به هیپوکامپ، فرآیند یادگیری و حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مطالعه حاضر، اثرات تزریق درون‌هیپوکامپی گرلین بر فراموشی القاشده ناشی از مورفین با مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال موش بزرگ آزمایشگاهی نر بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، حیوانات به‌صورت دو طرفه در ناحیه CA1 کانول‌گذاری شدند و مورفین به‌صورت زیرجلدی و گرلین به‌طور موضعی، به درون ناحیه CA1 تزریق شد. سپس به یادآوری حافظه در یک روش اجتنابی غیرفعال بررسی گردید.

یافته‌ها: تزریق زیرجلدی مقادیر مختلف مورفین (دوز ۷/۵، ۵، ۲/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن) پس از آموزش به‌صورت وابسته به دوز سبب کاهش تأخیر در تغییر مکان شد که نشان‌دهنده فراموشی ناشی از مورفین بود. همچنین تزریق مقادیر مختلف گرلین به داخل ناحیه CA1 همراه با مقدار مؤثر مورفین (دوز ۷/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن)، یادآوری حافظه را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه مورفین (دوز ۷/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن) افزایش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد تزریق گرلین به درون ناحیه هیپوکامپ، فراموشی القاشده ناشی از مورفین را در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال مهار می‌کند؛ بنابراین می‌تواند در بهبود اختلالات حافظه‌ای ناشی از مورفین مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: گرلین؛ مورفین؛ حافظه.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
فرزانه نظری سرنجه؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷- ۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
nazari_farzaneh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۲۳
تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۳

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Darbandi N, **Nazari Serenjeh F, Moradi P. The effect of intrahippocampal injection of ghrelin on Morphine-induced amnesia by passive avoidance task in male laboratory rats. Qom Univ Med Sci J 2018;12(8):19-29. [Full Text in Persian]**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گرلین، یک هورمون پپتیدی ۲۸ اسیدآمینه‌ای است که نخستین‌بار در سال ۱۹۹۹ توسط Kojima و همکاران از سلول‌های معده استخراج گردید و به‌عنوان یک لیگاند درون‌زاد برای گیرنده‌های ترشحی هورمون رشد معرفی شد. امروزه مشخص شده است علاوه بر لوله گوارش، بافت‌های مختلفی مانند کلیه‌ها، جفت، بیضه‌ها، ریه‌ها و سیستم عصبی مرکزی نیز گرلین را ترشح می‌کنند. این هورمون در اعمال فیزیولوژیک متعدد مانند ترشح هورمون رشد، هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH)، آزادسازی پرولاکتین، تعادل انرژی، عملکرد سیستم ایمنی، فعالیت قلبی - عروقی، همچنین رفتار نقش تنظیمی دارد (۱). گیرنده گرلین موسوم به گیرنده هورمون گرلین (GHS-R) متعلق به خانواده گیرنده‌های مرتبط با G- پروتئین بوده و دارای دو فرم GHS-R1a و GHS-R1b می‌باشد (۲). مطالعات نشان داده‌اند میل ترکیبی گرلین به گیرنده‌های GHS-R1a بیشتر است؛ براین اساس تصور می‌شود گیرنده‌های GHS-R1b غیرفعال بوده و تمامی اثرات بیولوژیک شناخته‌شده گرلین مربوط به فعالیت گیرنده GHS-R1a می‌باشد، اما در سال‌های اخیر مشخص شده است گیرنده‌های GHS-R1b در سیگنالینگ گیرنده‌های GHS-R1a نقش تنظیمی مهمی دارند (۱). این گیرنده‌ها علاوه بر بافت‌های مختلف محیطی، در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی، ازجمله نواحی درگیر در فرآیند یادگیری و حافظه مانند هیپوکامپ به میزان بالایی بیان می‌شوند (۳)، این مطلب بیانگر این حقیقت است که گرلین در فرآیندهای شناختی نیز نقش دارد و در تأیید آن نیز نتایج مطالعات پیشین نشان داده‌اند تزریق سیستمیک و یا تزریق مستقیم گرلین و آگونیست‌های آن به درون مغز سبب تقویت حافظه در مدل‌های مختلف سنجش حافظه در حیوانات می‌شود (۸-۳). نتایج مطالعات الکتروفیزیولوژی نیز نشان می‌دهند گرلین می‌تواند سبب القای تقویت طولانی‌مدت (LTP) در هیپوکامپ گردد (۶). تقویت طولانی‌مدت، اساس مولکولی فرآیند یادگیری و حافظه را تشکیل می‌دهد (۹). علاوه بر این، تزریق سیستمیک گرلین می‌تواند نوروژنز و تشکیل خارهای دندریتی در هیپوکامپ را نیز افزایش دهد (۶).

مطالعات فارماکولوژیک نشان داده‌اند مورفین و سایر اوپیوئیدها در فرآیندهای حافظه و یادگیری دخالت دارند (۱۰). همچنین تزریق پیش یا پس از آموزش مورفین به‌صورت وابسته به مقدار و زمان سبب تخریب حافظه و القای فراموشی می‌شود (۱۱). از سویی، مشخص شده است بین گرلین و گیرنده‌های اوپیوئیدی برهمکنش وجود دارد (۱۳،۱۲). همچنین گرلین اثرات مورفین در پاداش و فعالیت حرکتی را میانجیگری می‌کند (۱۵،۱۴). به‌علاوه، گرلین می‌تواند درد التهابی را از طریق برهمکنش با سیستم اوپیوئیدی مهار کند (۱۶). با این وجود، تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای بر روی اثر گرلین بر عوارض ناشی از مورفین بر فرآیندهای حافظه و یادگیری انجام نشده است. یادگیری اجتنابی غیرفعال یکی از مدل‌های یادگیری است که به‌طور گسترده‌ای در مطالعات فارماکولوژیکی، بیوشیمیایی حافظه و یادگیری مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحقیقات پیشین نشان داده‌اند هیپوکامپ در پردازش یادگیری و حافظه در این مدل نقش مهمی دارد (۱۷). از طرفی، گرلین می‌تواند تثبیت حافظه را در این مدل افزایش دهد (۶،۵). لذا با توجه به اثرات گرلین بر روی هیپوکامپ (۶،۸) و نیز برهمکنش میان گرلین و مورفین (۱۶-۱۴)، در مطالعه حاضر اثر تزریق درون‌هیپوکامپی گرلین بر فراموشی القاشده ناشی از مورفین در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم (تهیه‌شده از انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. به‌منظور سازگاری با محیط جدید، حیوانات قبل از انجام جراحی و ورود به آزمون رفتاری، به مدت یک‌هفته در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته، دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد) در حیوانخانه دانشگاه اراک در قفس‌های مخصوص، به‌صورت گروه‌های ۴تایی نگهداری شدند. آزمایش‌ها در زمان معینی از روز (ساعت ۱۲-۹) انجام گرفت و در هرگروه ۸ حیوان قرار داشت که هر حیوان فقط یک‌بار وارد آزمون رفتاری شد.

برای بررسی حافظه از دستگاه اجتنابی غیرفعال استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

این دستگاه از جعبه‌ای از جنس پلکسی‌گلاس تشکیل شده که به‌وسیله یک دیواره به دو قسمت با اندازه یکسان (۳۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر) تقسیم می‌شود. در قسمت وسط این دیواره یک درب گیوتینی با ابعاد ۹×۷ سانتی‌متر وجود دارد که ارتباط بین دو قسمت را برقرار می‌کند. کف و دیواره‌های یک قسمت دستگاه سفید (بخش روشن دستگاه) و قسمت دیگر آن سیاه (بخش تاریک دستگاه) است. در کف قسمت سیاه، میله‌های فولادی با فاصله ۱ سانتی‌متر از هم تعبیه شده که به‌وسیله یک سیم رابط به دستگاه استیمولاتور متصل می‌شوند. از طریق این استیمولاتور و میله‌های فولادی کف دستگاه، شوک الکتریکی مورد نظر به کف پای حیوان منتقل می‌شود.

از کتامین هیدروکلراید و زایلازین به‌عنوان داروهای بیهوشی، به‌صورت درون‌صفاقی استفاده شد. سولفات مورفین از شرکت دارو پخش تهران و گرلین رت از شرکت ابکم انگلستان تهیه گردید. هر دو دارو در نرمال‌سالین (۰/۹٪) حل شدند. مورفین به‌صورت زیرجلدی و گرلین به‌صورت درون‌مغزی تزریق شد و گروه‌های کنترل نیز سالین دریافت کردند.

قبل از شروع جراحی، حیوان وزن شد، سپس با تزریق درون‌صفاقی داروی بیهوشی (مخلوط کتامین هیدروکلراید و زایلازین) بیهوش شد. بعد از بیهوشی کامل حیوان، سر موش در دستگاه استریوتاکس ثابت گردید. مختصات ناحیه CA1 براساس اطلس پاکسینوس و واتسون به دست آمد (۳/۳- میلی‌متر از برگما به سمت عقب، ۲± میلی‌متر از طرفین شکاف ساژیتال و ۲/۸± میلی‌متر به طرف پایین از سطح جمجمه) (۱۸). بعد از مشخص‌شدن محل‌های کانول‌گذاری، استخوان جمجمه با استفاده از مته دندانپزشکی سوراخ شد. کانول‌های راهنما به طول ۹ میلی‌متر که از سر سوزن ۲۲ گیج تهیه شده بودند، به‌صورت دوطرفه درون سوراخ‌ها قرار گرفتند و با کمک سیمان دندانپزشکی در جای خود تثبیت شدند. به‌منظور جلوگیری از تخریب نواحی مورد نظر در اثر ورود کانول راهنما، کانول‌های راهنما یک میلی‌متر بالاتر از عمق واقعی قرار گرفتند و بدین‌ترتیب در هنگام تزریق دارو به نواحی موردنظر در زمان آزمایش، سوزن تزریق، یک‌میلی‌متر بلندتر از طول کانول راهنما گذاشته شد و دارو در نواحی مورد نظر تزریق گردید.

پس از یک‌هفته و طی دوره بهبودی، تزریق داروها انجام گرفت. برای تزریق دارو از سرسوزن ۲۷ گیج دندانپزشکی (به طول ۱ میلی‌متر بلندتر از کانول‌های راهنما) استفاده شد. این سر سوزن به‌وسیله لوله پلی‌اتیلن نازکی که به سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتر مرتبط می‌شد به هریک از کانول‌ها ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۶۰ ثانیه تزریق گردید. حدود ۶۰-۳۰ ثانیه پس از پایان تزریق، به‌منظور اطمینان از اینکه دارویی در سرسوزن باقی‌نمانده و کاملاً جذب ناحیه مورد نظر شده باشد، سوزن تزریق در محل تزریق باقی ماند. در پایان آزمایش، به‌منظور اطمینان از درستی مختصات محل جراحی و تزریق دارو، ۱ میکرولیتر محلول ۱٪ آبی متیلن‌بلو به‌صورت دوطرفه تزریق گردید، سپس مغز از جمجمه خارج و جهت تثبیت برای برش‌گیری به مدت ۱۰ روز در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد. برش‌گیری از ناحیه تزریق و بررسی توزیع رنگ در ناحیه هیپوکامپ، بیانگر صحت کانول‌گذاری و تزریق بود. چنانچه کانول‌ها در نواحی مورد نظر قرار داشتند؛ بدان معنی بود که تزریق دارو به‌درستی و در درون ناحیه CA1 صورت گرفته است. لذا داده‌های به‌دست‌آمده از حیوان در روز آزمون، در آنالیز آماری مورد استفاده قرار می‌گرفت و چنانچه کانول‌گذاری به‌درستی انجام نگرفته بود، داده‌های حیوان مورد نظر حذف می‌شد. بررسی حافظه در روش یادگیری اجتنابی غیرفعال طی ۲ مرحله و در ۲ روز متوالی انجام شد. در روز اول به حیوانات در دستگاه، آموزش داده شد و در روز دوم میزان حافظه حیوانات آموزش‌دیده مورد ارزیابی قرار گرفت. در شروع مرحله آموزش، هر حیوان به‌آرامی درون قسمت روشن دستگاه گذاشته شد و بعد از گذشت ۵ ثانیه، درب گیوتینی دستگاه باز و به حیوان اجازه داده شد تا وارد قسمت تاریک شود. مدت زمانی‌که طول می‌کشید تا حیوان از قسمت روشن وارد قسمت تاریک دستگاه شود به‌عنوان زمان تأخیر ثبت گردید. موشی‌که در ورود به بخش تاریک بیش از ۱۰۰ ثانیه تأخیر داشت، از ادامه آزمایش حذف می‌شد. بلافاصله بعد از ورود حیوان به قسمت تاریک، درب گیوتینی بسته و به حیوان اجازه داده می‌شد تا به مدت ۵ ثانیه با محیط مذکور آشنا شود، سپس حیوان به‌آرامی به قفس برگردانده می‌شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، مرحله قبل تکرار می‌شد با این تفاوت که به محض ورود حیوان و بسته‌شدن درب گیوتینی،

www.SID.ir

Archive of SID

شوک الکتریکی به شدت ۱ میلی‌آمپر، به مدت ۳ ثانیه با فرکانس ۵۰ هرتز از طریق میله‌های کف دستگاه به دست و پای حیوان انتقال می‌یافت. با توجه به بسته بودن سقف این قسمت، حیوان نمی‌تواند به‌منظور جلوگیری از دریافت شوک الکتریکی از دستگاه خارج شود (شوک اجتناب‌ناپذیر)؛ بنابراین ۲۰ ثانیه بعد از وارد کردن شوک، حیوان از دستگاه خارج و به قفس جداگانه‌ای منتقل می‌شد. پس از گذشت ۲ دقیقه، مرحله دوم آموزش بر روی حیوان شوک‌گرفته انجام شد. چنانچه حیوان به میزان ۱۲۰ ثانیه در ورود به قسمت تاریک تأخیر داشت، آموزش موفق برایش ثبت می‌گردید، سپس از دستگاه خارج و بلافاصله تزریق پس از آموزش را دریافت می‌کرد؛ درصورتی‌که حیوان در ورود به قسمت تاریک کمتر از ۱۲۰ ثانیه تأخیر داشت، پس از ورود به قسمت تاریک مجدداً به حیوان شوک داده می‌شد و پس از خارج‌کردن حیوان از دستگاه و گذشت ۲ دقیقه، مراحل فوق تکرار می‌شد (حداکثر دفعات آموزش برای هر حیوان ۳ بار درنظر گرفته شد.)

مرحله آزمون، ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش و بدون تحریک الکتریکی انجام شد. در این مرحله همانند روز آموزش، حیوان در قسمت روشن دستگاه قرار گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز شده و زمان تأخیر حیوان برای ورود به قسمت تاریک STL (Step-Through Latency) و کل مدت زمان ماندن حیوان در قسمت تاریک TDC (Total Dark Chamber) به‌عنوان معیاری برای میزان به یادآوری حافظه ثبت گردید. بیشترین زمان تأخیر برای ورود به قسمت تاریک، ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در این آزمایش، حیوانات بلافاصله پس از آموزش، سالین را به‌صورت درون‌مغزی (۱ میکرولیتر به‌صورت درون‌هیپوکامپی) دریافت کردند و ۵ دقیقه پس از تزریق درون‌مغزی نیز مقادیر مختلف مورفین را به میزان ۷/۵، ۵، ۲/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن به‌صورت زیرجلدی دریافت کردند. تمامی گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد وارد مرحله آزمون شدند.

در این آزمایش، حیوانات بلافاصله پس از آموزش، مقادیر مختلف گرلین را (با دوز ۳، ۰/۳، ۰/۰۳ و ۰ نانومول برمیکرولیتر) به‌صورت درون‌هیپوکامپی دریافت کردند. ۵ دقیقه پس از آن، سالین (با دوز ۱میلی‌لیتر برکیلوگرم وزن بدن) به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. تمامی گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد وارد مرحله آزمون شدند. در این آزمایش، حیوانات بلافاصله پس از آموزش، مقادیر مختلف گرلین را (با دوز ۳، ۰/۳، ۰/۰۳ و ۰ نانومول برمیکرولیتر) به‌صورت درون‌مغزی دریافت کردند، سپس ۵ دقیقه پس از آن، مورفین (به میزان ۷/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن) به‌صورت زیرجلدی تزریق گردید. تمامی گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد وارد مرحله آزمون شدند.

داده‌ها براساس میانگین±انحراف معیار ثبت و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، آزمون واریانس یک‌طرفه و دوطرفه با استفاده از زمان تأخیر ورود حیوان به قسمت تاریک (به‌عنوان فاکتور وابستگی) و آزمون تعقیبی توکی (جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها) تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p<0/05$ در نظر گرفته شد. نمودارها به کمک Sigmaplot نسخه ۱۲ ترسیم شدند.

یافته‌ها

براساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های آزمون رفتاری گروه‌های آزمایشی، تزریق زیرجلدی مورفین (به میزان ۷/۵، ۵، ۲/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم)، به‌طور وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار زمان ورود به اتاق تاریک

[$F(۴ و ۳۲)=۲۵/۱۳۹, p<۰/۰۰۱$(STL)] (نمودار شماره ۱) و افزایش معنی‌دار کل مدت زمان توقف در اتاق تاریک

[$F(۴ و ۳۲)=۶۸/۳۷۰ p<۰/۰۰۱$] (نمودار شماره ۲) نسبت به گروه کنترل شد. این نتایج نشان‌دهنده کاهش یادگیری در مدل اجتنابی مهاری و القا فراموشی بود. همچنین تزریق پس از آموزش گرلین (به میزان ۳، ۰/۳، ۰/۰۳ و ۰ نانومول برمیکرولیتر) ۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین (به میزان ۷/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن) به‌صورت وابسته به دوز از تخریب حافظه ناشی از مورفین جلوگیری کرد. براساس آزمون مکمل توکی نیز در این گروه‌ها نسبت به گروه کنترل، تأخیر در ورود به اتاق تاریک به‌طور معنی‌داری افزایش داشت.

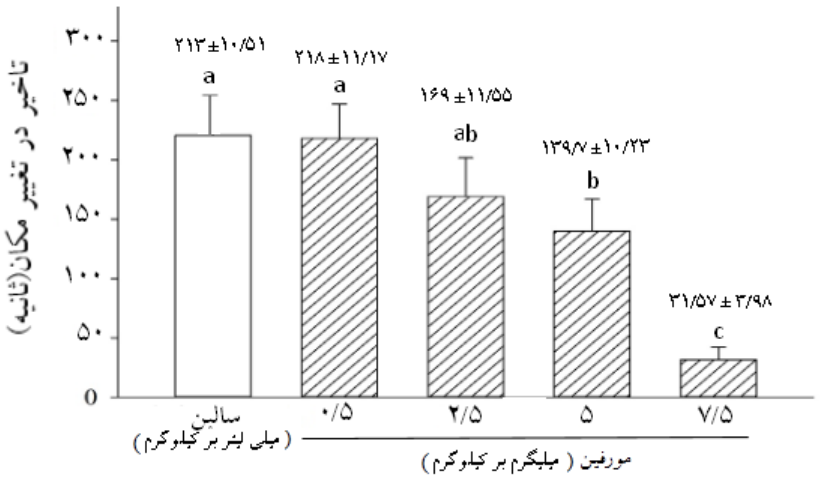
[$F(۳ و ۲۸)=۴۴/۴۱۳, p<۰/۰۰۱$] (نمودار شماره ۳) و کل مدت زمان توقف در اتاق تاریک به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد [$F(۳ و ۲۸)=۷۶/۰۳۰, p<۰/۰۰۱$] (نمودار شماره ۴) که به‌معنی بهبود حافظه بود.

www.SID.ir

Archive of SID

بین گروه‌های گرلین – سالین با گروه کنترل سالین – سالین در مقدار STL [F(۳و۲۸)=۰/۲۹, p>۰/۰۵] و TDC (نمودار شماره ۴) [F (۳و۲۸)=۰/۲۹, p>۰/۰۵] (نمودار شماره ۳)، هیچ اختلاف معنی‌داری دیده نشد؛ این بدین معنی است که گرلین به‌تنهایی هیچ تأثیر معنی‌داری بر یادآوری حافظه ندارد.

آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه، اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های گرلین – سالین و گرلین – مورفین نشان داد [F(۱ و ۵۶)=۲۱۶/۰۱, p<۰/۰۰۱، نوع تیمار] [F(۳ و ۵۶)=۶/۵۹, p<۰/۰۰۱، مقدار دارو] [F(۳ و ۵۶)=۲/۳۹, p>۰/۰۵، تداخل تیمار×مقدار دارو].

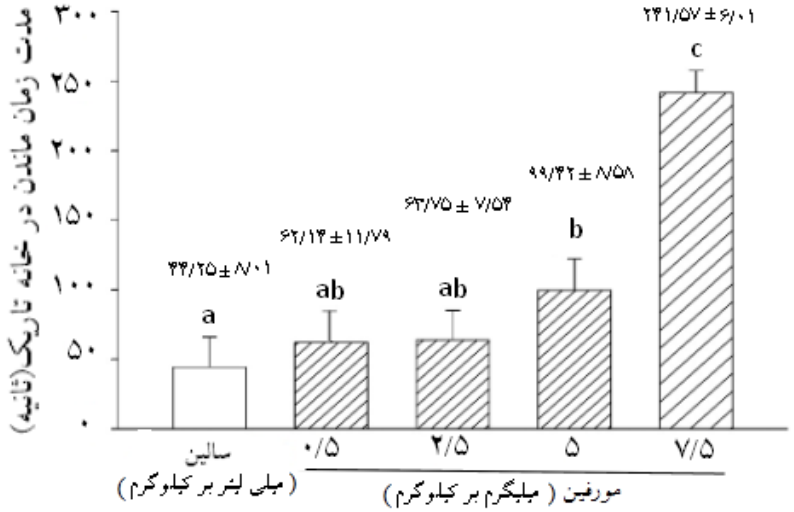


نمودار شماره ۱: اثرات تزریق مقادیر مختلف مورفین پس از آموزش بر روی حافظه اجتنابی مهاری.

اثر تزریق مقادیر مختلف مورفین پس از آموزش بر تأخیر در ورود به اتاق تاریک (STL) در گروه‌های آزمایشی.

هر ستون بیانگر میانگین ± انحراف معیار مربوط به ۸ سر رت در هرگروه است.

آنالیز واریانس یک‌طرفه، میانگین با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

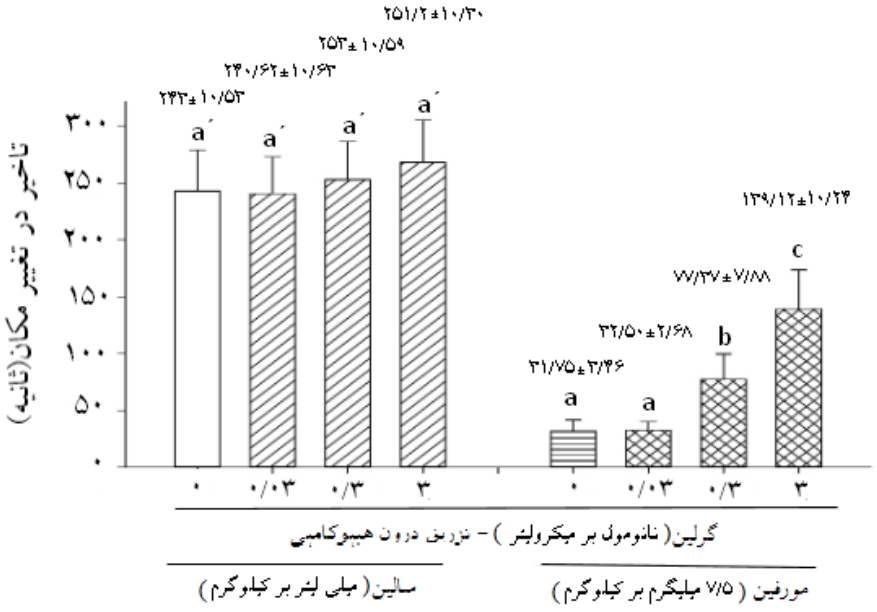


نمودار شماره ۲: اثر تزریق مقادیر مختلف مورفین پس از آموزش بر مدت زمان ماندن حیوانات در اتاق تاریک (TDC) در گروه‌های آزمایشی.

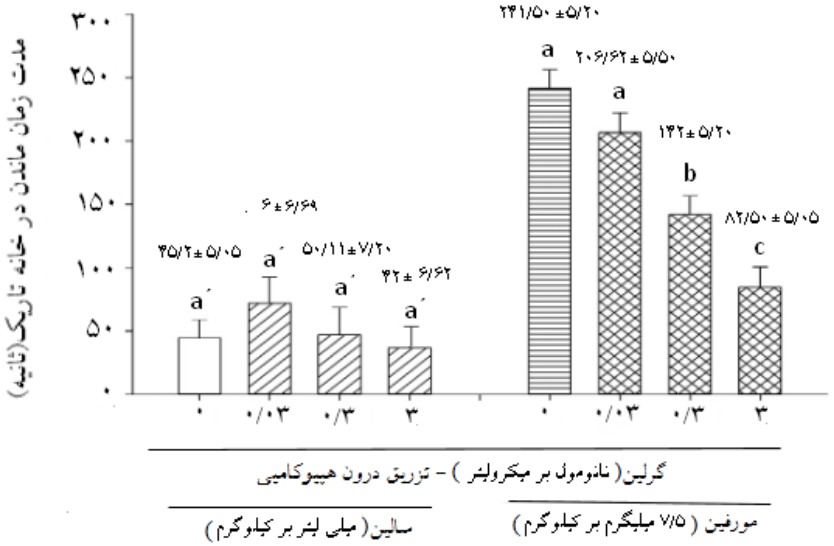
هر ستون بیانگر میانگین ± انحراف معیار مربوط به ۸ سر رت در هرگروه است.

آنالیز واریانس یک‌طرفه، میانگین با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. سطح معنی‌داری، p<۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

www.SID.ir



نمودار شماره ۳: اثرات تزریق گرلین پس از آموزش به تنهایی یا همراه با مورفین بر تأخیر در ورود به اتاق تاریک (STL)، در گروه‌های آزمایشی.
هر ستون بیانگر میانگین ± انحراف معیار مربوط به ۸ سر رت در هرگروه است.
آنالیز واریانس یک‌طرفه، میانگین با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵>p در نظر گرفته شده است.



نمودار شماره ٤: اثرات تزریق گرلین پس از آموزش به تنهایی یا همراه با مورفین بر مدت زمان ماندن حیوانات در اتاق تاریک (TDC) در گروه‌های آزمایشی.
هر ستون بیانگر میانگین ± انحراف معیار مربوط به ۸ سر رت در هرگروه است.
آنالیز واریانس یک‌طرفه، میانگین با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. سطح معنی‌داری، ۰/۰۵>p در نظر گرفته شده است.

بحث

مورفین یک داروی ضددرد قوی است که به میزان گسترده جهت تسکین درد مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). باوجود اثرات مثبت مورفین در درمان درد، مطالعات نوروبیولوژیک نشان می‌دهد مورفین بر فرآیندهای یادگیری و حافظه اثر مخرب دارد (۱۰) و سبب القای فراموشی در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال می‌شود (۱۱). در راستای این تحقیقات، نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد تزریق زیرجلدی مورفین بلافاصله پس از آموزش به‌صورت وابسته به دوز، زمان ورود به اتاق تاریک (STL) را در روز آزمون، کاهش و مدت زمان توقف در اتاق تاریک را نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

به گروه کنترل افزایش می‌دهد و سبب القای فراموشی می‌شود. شواهد فارماکولوژیک متعدد نشان می‌دهند داروها، هورمون‌ها و سیستم‌های نوروترانسمیتری متعددی در اثرات مورفین بر حافظه دخالت دارند (۲۳-۲۰). همان‌طورکه در مقدمه ذکر گردید پپتید گرلین اساساً یک هورمون تنظیم‌کننده اشتها بوده و در هومئوستازی انرژی در بدن دخالت دارد. مطالعات اخیر نشان داده است گرلین به‌عنوان یک مولکول تنظیم‌کننده حافظه عمل کرده و پلاستیسیته سیناپسی و تشکیل سیناپس‌های جدید در هیپوکامپ را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۶). با این وجود، علیرغم تأثیر گرلین در بروز اثرات القایی مورفین در تحریک فعالیت حرکتی، افزایش ترجیح مکان شرطی‌شده و افزایش رهایی دوپامین در هسته اکومبنس (۱۵،۱۴)، تاکنون در مورد نقش گرلین بر روی اثرات مورفین بر یادگیری و حافظه، مطالعه‌ای صورت نگرفته است؛ لذا با توجه به برهمکنش میان گرلین و مورفین (۱۵،۱۴)، همچنین اثرات مورفین (۲۴) و گرلین بر نوروفیزیولوژی هیپوکامپ (۶)، در این مطالعه تأثیر تزریق درون‌هیپوکامپی گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر تزریق گرلین به‌درون ناحیه CA1 (۵ دقیقه قبل از تزریق)، مقدار مؤثر مورفین که به تنهایی سبب القا فراموشی می‌شود، توانست زمان ورود به اتاق تاریک (STL) در روز آزمون را افزایش و مدت زمان توقف در اتاق تاریک را نسبت به گروه مورفین کاهش دهد که نشان‌دهنده مهار اثر فراموشی ناشی از مورفین و بهبود حافظه بود. علاوه بر آن، تزریق پس از آموزش گرلین به درون ناحیه CA1 به تنهایی اثری بر به‌خاطرآوری حافظه در روز آزمون نداشت. این نتایج تأییدکننده مطالعات پیشین است که نشان دادند گرلین قادر است نقص حافظه ناشی از بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی یا مصرف داروها را بهبود بخشد (۲۵،۴). مکانیسم دقیق چگونگی اثرات گرلین بر افزایش حافظه مشخص نشده است، اما نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهند مکانیسم‌های سلولی و مولکولی متعددی در تأثیر افزایش گرلین بر تشکیل حافظه دخالت دارند. Ghersi و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش دادند گرلین از طریق فعال کردن سیستم گلوتاماترژیک در هیپوکامپ، تثبیت حافظه را تقویت می‌کند.

همچنین گرلین در سطح پیش‌سیناپسی، رهایی گلوتامات در سیناپس‌ها و در سطح پس‌سیناپسی، جریان سیناپسی در سطح گیرنده‌ها NMDA (N-methyl-D-aspartate) را افزایش می‌دهد (۲۶). Riberio و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ نشان دادند تعداد زیادی از گیرنده‌های GHS-R1a گرلین در هیپوکامپ، در سیناپس‌های گلوتاماترژیک بیان می‌شوند و فعال‌شدن این گیرنده‌ها سبب افزایش حضور گیرنده‌ها α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionicacid) AMPA) در سیناپس‌های تحریکی هیپوکامپ می‌شود (۲۷). گلوتامات، مهم‌ترین نوروترانسمیتر تحریکی در سیستم عصبی بوده و فعالیت گیرنده‌های آن نیز نقش مهمی در تغییرات سیناپسی و فرآیند یادگیری دارند (۲۸). Carlini و همکاران نشان دادند تزریق گرلین به‌درون هیپوکامپ سبب افزایش فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (NOS) و در نتیجه افزایش مقدار نیتریک اکسید (NO) در هیپوکامپ می‌شود (۵). شواهد متعدد نقش NO در یادگیری و حافظه را تأیید کرده است (۲۹). از طرفی، نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهند افزایش فعالیت سیستم گلوتاماترژیک و میزان NO قادر است فراموشی ناشی از مورفین را مهار کند (۲۳،۲۲). از سویی دیگر، مطالعات مولکولی نشان داده است گرلین فسفریلاسیون مولکول CREB (cAMP response element binding protein)، را به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم دخیل در پلاستیسیته سیناپسی و یادگیری در هیپوکامپ افزایش می‌دهد (۳۰). قاسم‌زاده و همکاران نشان دادند تزریق پس از آموزش، مقدار مؤثر مورفین در تخریب حافظه و میزان فسفریلاسیون CREB را کاهش می‌دهد (۳۱). بنابراین این احتمال وجود دارد که گرلین از طریق افزایش میزان فسفریلاسیون CREB و فعال کردن آن، اثر تخریبی مورفین بر یادگیری را مهار کند. لذا با توجه به مطالعات پیشین به‌نظر می‌رسد اثر مهاری گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین به‌علت اثرات تحریکی گرلین بر فعالیت سیستم گلوتاماترژیک هیپوکامپ و راه‌اندازی وقایع مولکولی است که سبب تقویت انتقال سیناپسی، فعالیت نورونی، پلاستیسیته سیناپسی و تشکیل سیناپس‌های جدید در این ناحیه می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

در تأیید این مکانیسم پیشنهادی، Goshadrou و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند تزریق گرلین به‌درون ناحیه بطن‌های جانبی، فراموشی ناشی از تزریق محیطی MK-801 (آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA) را بهبود می‌بخشد (۷). علاوه بر این، باید توجه داشت گرلین دارای خاصیت حفاظت نورونی بوده و بر این اساس مانع از آسیب نورون‌های هیپوکامپ در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۲).این در حالی است که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در تغییرات شناختی ناشی از مورفین ایفا می‌کند. در حقیقت، مصرف مورفین گونه‌های اکسیزن فعال را در هیپوکامپ افزایش می‌دهد که در نهایت، از طریق وقایع آبشاری سبب کاهش سیناپس‌های تحریکی و درمقابل باعث افزایش سیناپس‌های مهاری در این ناحیه می‌شود. این تغییرات سیناپسی، احتمالاً در اثرات تخریبی مورفین بر یادگیری نقش دارند (۲۴). به‌علاوه، نشان داده شده است گرلین با کاهش آپوپتوز نورون‌های هیپوکامپ، اختلال حافظه ایجادشده در موش‌های دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین را بهبود می‌بخشد (۳۳). همچنین مشخص شده است گرلین اختلال حافظه ناشی از تزریق پروتئین بتا – آمیلوئید در هیپوکامپ را از طریق کاهش مرگ نورونی و تخریب فیبرهای کولینرژیک بهبود می‌بخشد (۲۵). بنابراین، این احتمال وجود دارد که اثر مهاری گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین به‌علت خاصیت حفاظت نورونی و ضدالتهابی گرلین باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد تزریق گرلین به درون ناحیه هیپوکامپ، فراموشی القاشده ناشی از مورفین را در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال مهار می‌کند؛ بنابراین می‌تواند در بهبود اختلالات حافظه‌ای ناشی از مورفین مورد توجه قرار گیرد. هرچند، تعیین مکانیسم دقیق این اثر نیازمند بررسی و مطالعات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارشناسان و مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه اراک تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. Physiol Rev 2005;85(2):495-522. PubMed

2. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. Science 1996;273(5277):974-7. PubMed

3. Ferrini F, Salio C, Lossi L, Merighi A. Ghrelin in central neurons. Curr Neuropharmacol 2009;7(1):37-49. PubMed

4. Babri S, Amani M, Mohaddes G, Mirzaei F, Mahmoudi F. Effects of intrahippocampal injection of ghrelin on spatial memory in PTZ-induced seizures in male rats. Neuropeptides 2013;47(5):355-60. PubMed

5. Carlini VP, Perez MF, Salde E, Schioth HB, Ramirez OA, de Barioglio SR. Ghrelin induced memory facilitation implicates nitric oxide synthase activation and decrease in the threshold to promote LTP in hippocampal dentate gyrus. Physiol Behav 2010;101(1):117-23. PubMed

6. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. Nat Neurosci 2006;9(3):381-8. PubMed

7. Goshadrou F, Kermani M, Ronaghi A, Sajjadi S. The effect of ghrelin on MK-801 induced memory impairment in rats. Peptides 2013;44:60-5. PubMed

8. Wang J, Ni J, Dong J, Sun X, Li L, Lv Y. Ghrelin increases hippocampal recombination activating gene expression and spatial memory performance in mice. Neuroreport 2013;24(13):712-17. PubMed

www.SID.ir

Archive of SID

9. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. Nature 1993;361(6407):31-39. PubMed

10. Borbely E, Scheich B, Helyes Z. Neuropeptides in learning and memory. Neuropeptides 2013;47(6):439-50. PubMed

11. Zarrindast MR, Ardjmand A, Rezayof A, Ahmadi S. The time profile of morphine effect on different phases of inhibitory avoidance memory in rat. Arch Iran Med 2013;16(1):34-37. PubMed

12. Kawahara Y, Kaneko F, Yamada M, Kishikawa Y, Kawahara H, Nishi A. Food reward-sensitive interaction of ghrelin and opioid receptor. Neuropharmacology 2013;67:395-402. PubMed

13. Skibicka KP, Shirazi RH, Hansson C, Dickson SL. Ghrelin interacts with neuropeptide Y Y1 and opioid receptors to increase food reward. Endocrinology 2012;153(3):1194-205. PubMed

14. Engel JA, Nylander I, Jerlhag E. A ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonist attenuates the rewarding properties of morphine and increases opioid peptide levels in reward areas in mice. Eur Neuropsychopharmacol 2015;25(12):2364-71. PubMed

15. Sustkova-Fiserova M, Jerabek P, Havlickova T, Kacer P, Krsiak M. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. Psychopharmacology 2014;231(14):2899-908. PubMed

16. Sibilia V, Lattuada N, Rapetti D, Pagani F, Vincenza D, Bulgarellia I, et al. Ghrelin inhibits inflammatory pain in rats: involvement of the opioid system. Neuropharmacology 2006;51(3):497-505. PubMed

17. Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. Trends Neurosci 2006;29(9):496-505. PubMed

18. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxi ccoordinates.; San Diego: Academic Press; 2007.Link

19. Fields HL. The doctor's dilemma: opiate analgesics and chronic pain. Neuron 2011;69(4):591-94. PubMed

20. Darbandi N, Rezayof A, Zarrindast MR. Modulation of morphine state-dependent learning by muscarinic cholinergic receptors of the ventral tegmental area. Physiol Behav 2008;94(4):604-10. PubMed

21. Mesripour A, Hajhashemi V, Rabbani M. Metyrapone and mifepristone reverse recognition memory loss induced by spontaneous morphine withdrawal in mice. Basic Clin Pharmacol Toxico 2008;102(4):377-81. PubMed

22. Rezayof A, Amini R, Rassouli Y, Zarrindast MR. Influence of nitric oxide on morphine-induced amnesia and interactions with dopaminergic receptor agents. Physiol Behav 2006;88(1-2):124-31. PubMed

23. Ardjmand A, Rezayof A , Zarrindast MR. Involvement of central amygdala NMDA receptor mechanism in morphine state-dependent memory retrieval. Neurosci Res 2011;69(1):25-31. PubMed

24. Cai Y, Yang L, Hu G, Chen X, Niu F, Yuan L, et al. Regulation of morphine-induced synaptic alterations: ole of oxidative stress, ER stress, and autophagy. J Cell Biol 2016;24;215(2):245-58. PubMed

25. Moon M, Choi JG, Nam DW, Hong HS, Choi YJ, Oh MS, et al. Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid-β1-42 oligomer-injected mice. J Alzheimers Dis 2011;23(1):147-59. PubMed

26. Ghersi MS, Gabach LA, Buteler B, Vilcaes AA, Schiöth HB, Perez MF, et al. Ghrelin increases memory consolidation through hippocampal mechanisms dependent on glutamate release and NR2B-subunits of the NMDA receptor. Psychopharmacology 2015; 232(10):1843-57. PubMed

27. Ribeiro LF, Catarino T, Santos SD, Benoist M,van Leeuwen Jf, Esteban JA, et al. Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA 2014;111(1):149-58. PubMed

28. Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. Behav Brain Res 2003;140(1-2):1-47. PubMed

www.SID.ir

Archive of SID

29. Paul V, Ekambaram P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. Indian J Med Res 2011;133(5):471-78. PMC

30. Cuellar JN, Isokawa M. Ghrelin-induced activation of cAMP signal transduction and its negative regulation by endocannabinoids in the hippocampus. Neuropharmacology 2011:60(6),842-51. PubMed

31. Ghasemzadeh Z, Rezayof A. Role of hippocampal and prefrontal cortical signaling pathways in dextromethorphan effect on morphine-induced memory impairment in rats. Neurobiol Learn Mem 2016;128:23-32. PubMed

32. Frago LM, Baquedano E, Argente J, Chowen JA. Neuroprotective actions of ghrelin and growth hormone secretagogues. Front Mol Neurosc 2011;4:23. PubMed

33. Ma LY, Zhang DM, Tang Y, Lu Y, Zhang Y, Gao Y, et al. Ghrelin-attenuated cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabeticrats. Alzheimer Dis Assoc Disord 2011;25(4):352-63. PubMed

www.SID.ir