مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۹، شماره٤، زمستان ۱۳۸۵، ۲۵۹-۲۵۰
تاریخ دریافت: ۸۵/۱/۲۲، تاریخ پذیرش: ۸۵/۹/۳۰

بررسی اثر مرفین و فعالیت بدنی برغلظت گلوتامات شکنج دندانه ای هیپوکامپ در رت های سالم و تحت تیمار مرفین: یک تحقیق میکرودیالیز

*[۱]دکتر حمید عزیزی ملک آبادی، [۲] دکتر حجت الله علائی، [۳] دکتر شهربانو عریان

چکیده

هدف

فعالیت بدنی از طریق مکانیسم هایی که هنوز ناشناخته اند فعالیت مغز را افزایش می دهد. تحقیقات مختلف نشان داده است که ورزش و فعالیت بدنی نقل وانتقال ناقلان عصبی مغز را دستخوش تغییرمی سازد. همچنین یافته های جدید نشان می دهد که ناقل عصبی گلوتامات در وابستگی به مرفین نقش دارد. بر این اساس اثر فعالیت بدنی با تردمیل بر تغییرات غلظت ناقل عصبی گلوتامات از شکنج دندانه ای هیپوکامپ در رت های سالم و وابسته به مرفین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

تعداد ۲۸ سرموش صحرایی نر سالم با وزن تقریبی g ۲۵۰ انتخاب و در چهارگروه : کنترل، مرفین، فعالیت بدنی، مرفین همراه با فعالیت بدنی گروه بندی گردید. برای ایجاد وابستگی به مرفین از تزریق درون صفاقی محلول مرفین با دوزهای افزایشی به ترتیب: سه روز اول mg/kg ۱۰، سه روز دوم mg/kg ۲۰ و سه روز سوم mg/kg ۴۰ استفاده شد. تمرین دویدن رت ها روی تردمیل، در یک دورهٔ ده روزه (دو ساعت در روز، با سرعت m/min ۱۲ و شیب ۱۵ درجه) برای گروههای فعالیت بدنی و مرفین همراه با فعالیت بدنی انجام گرفت. در مرحله میکرودیالیز، رتها به دقت وزن کشی شده و با تزریق درون صفاقی کلرال هیدرات ۱۰٪ (mg/kg ۴۵۰) بیهوش شده و پس از قرارگیری در دستگاه استرئوتاکس مخصوص رت و برداشتن پوست سر و مشخص شدن نقاط برگما (bregma) و لامبدا (lambda) و مختصات شکنج دندانه ای هیپوکامپ بر سطح جمجمه، نقطه مورد نظر با مته دندانپزشکی سوراخ شده و با دقت بسیار پراب میکرودیالیزدر موقعیت مورد نظر قرارداده شد. در ادامه مایع مغزی- نخاعی مصنوعی(aCSF) (شامل: NaCl، KCl، $MgCl_2$، Na_2HPO_4، NaH_2PO_4، $CaCl_2$ وگلوکز) با پمپ تزریق پرفوزیون و با سرعت µl/min ۲ وارد پراب شده و خروجی پراب در ویال های شماره گذاری شده جمع آوری شد. ابتدا خروجی ساعت اول دور ریخته می شد (تخلیه ساعت اول) و پس ازآن هر۲۰ دقیقه خروجی پراب در یک ویال جمع آوری شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در نهایت اندازه گیری گلوتامات با روشHPLC و با استفاده از شناساگر فلوئورسانس انجام شده و نتایج به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت.

نتایج

یافته ها نشان دادکه در زمان های نمونه گیری پس از تخلیه ساعت اول، در مقایسه میانگین تغییرات غلظت گلوتامات شکنج دندانه ای (DG) گروههای آزمایشی، بین گروه مرفین همراه با فعالیت بدنی با سایر گروهها افزایش معنی دار وجود دارد ($p <$ ۰/۰۵). در مقایسه گروه کنترل با گروههای مرفین و فعالیت بدنی در هیچ یک از زمانهای نمونه گیری تفاوت معنی دار مشاهده نشد ($p >$ ۰/۰۵).

نتیجه گیری

شاید بتوان گفت که مرفین با تغییرات پایدار در نقل و انتقال سیناپسهای گلوتاماترژیک، غلظت خارج سلولی آن را افزایش می دهد. در مقابل فعالیت بدنی با افزایش ناقلان گلوتاماتی مقادیر خارج سلولی آن را کاهش می دهد. شگفت اینکه تیمار مرفین همراه با فعالیت بدنی احتمالا از طریق همکاری (سینرژیسم) وتقویت اثر یکدیگر، سبب افزایش غلظت گلوتامات خارج سلولی ناحیه شکنج دندانه ای می شوند.

کلمات کلیدی: فعالیت بدنی، گلوتامات، میکرودیالیز، مرفین، شکنج دندانه ای.

۱- استادیار گروه علوم تجربی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاداسلامی واحد خوراسگان، اصفهان
* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۱-۷۷۲۸۹۸۱ ، malekabadi2004@yahoo.com
۲- استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، اصفهان
۳- استاد گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحدعلوم و تحقیقات، تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

به منظور پیشگیری و کاهش اثرات پایدار مواد اعتیاد آور بر فرایندهای حافظه و یادگیری، روشهای درمانی و داروهای گوناگون پیشنهاد شده است. در این میان ورزش و فعالیت بدنی، یکی از مفیدترین و مناسب ترین روشها می باشد که با برنامه ریزی منظم می توان اثر آن را تقویت نمود. نقش درمانی ورزش در درمان مبتلایان به افزایش فشار خون، افسردگی، بی اشتهایی عصبی و اعتیاد و وابستگی دارویی گزارش شده است (۱). مشخص شده که مصرف دراز مدت مواد اعتیاد آور سبب تحلیل و کوچک شدن سلول های عصبی و چروکیده شدن دندریت ها وکاهش رشته های انتقالی درون آکسون آنها درمسیرهای درگیر در فرایند اعتیاد می گردد. ورزش این اثرات مخرب راکنترل و یا حتی معکوس می سازد (۳،۲). مشخص شده است که ناقل عصبی گلوتامات میل به بازگشت و گرایش بی درنگ به مواد اعتیاد آور را افزایش می دهد. این عملکرد پیش از این برای دوپامین و تحت اثر کوکائین به اثبات رسیده است (۴). با تحریک نورون های گلوتاماترژیک ناحیه هیپوکامپ مغز در موش های آزمایشگاهی، رفتار جستجوی دیوانه وار برای یافتن کوکائین مشاهده شد. البته در تحریک هیپوکامپ علاوه بر گلوتامات، دوپامین نیز از مدار ناحیه تگمنتوم شکمی(VTA) به هسته اکومبانس (NA) رها می شود (۵). قسمت هایی از مغز با مدارهای پیچیده نورونی که در فرایندهای اعتیاد، حافظه و یادگیری شرکت دارند، شامل: هیپوکامپ، قشر مخ،آمیگدال و جسم مخطط می باشند(۶). پیچیدگی قابلیت انعطاف پذیری که در این مدارها روی می دهد، به وسیله فاکتور نسخه برداریCREB که اثرات رفتاری بسیار متفاوتی را در این نواحی مغزی القا می سازد قابل توجیه است (۶). به نظر می رسد درک و شناخت بیشتر سازش و انطباقی که در سطوح سلولی و ملکولی در این مدارهای عصبی درگیر اتفاق می افتد، بتواند در جهت تقویت فرایند حافظه و یادگیری از یک سو و تعدیل اثرات منفی مواد اعتیاد آور از سوی دیگر سودمند باشد. جان هاپکینز، نخستین حلقه ارتباطی میان اعتیاد دارویی و حافظه بلند مدت را شناسایی و آن را پروتئین Homer نامید. این پروتئین به گیرنده های گلوتاماتی از نوع متابوتروپیک متصل شده و سبب تسهیل در باز شدن طولانی مدت آنها می گردد و از این طریق باعث حفظ و تقویت حافظه دراز مدت و یا وابستگی دراز مدت به دارو (اعتیاد دارویی) می شود (۷).

مواد و روش کار

حیوانات و شرایط نگهداری : در این تحقیق ، از موش های صحرایی نر نژاد wistar با نام علمی Ratus morvegicus alvivius و با میانگین وزن ۲۵۰ گرم استفاده شد. رت ها در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی (حیوانخانه) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تکثیر و پرورش یافتند. دلیل انتخاب جنس نر برای جلوگیری از اثرات احتمالی سیکل قاعدگی جنس ماده بر نتایج آزمایش بود. در مرحلهٔ عملی میکرودیالیز، تعداد ۲۸ سر موش، در چهار گروه تقسیم بندی شده و در شرایط یکسان (دما ۲۵ °C -۲۰ ، رطوبت ۷۰-۴۰٪ ، نوردهی ۱۲ ساعته و آب و غذا) نگهداری شدند. پیش از شروع آزمایش حیوانات در گروههای پنج تایی در قفس های فلزی نگه داری شدند.گروه بندی رت ها به شرح زیر انجام شد:
گروه اول (کنترل) : رت های این گروه تنها در حیوانخانه و درون قفس های فلزی نگهداری شده و آب و غذا به صورت اختیاری دریافت کردند (بدون تیمار).
گروه دوم (مرفین) : رت های این گروه محلول مرفین را با تزریق درون صفاقی (IP) و با ترتیب دوز افزایشی : سه روز اول ۱۰ mg/kg ، سه روز دوم ۲۰ mg/kg و سه روز سوم ۴۰ mg / kg دریافت کردند (تیمار افزایشی مرفین) .
گروه سوم (فعالیت بدنی) : رت های این گروه بر روی دستگاه مخصوص رت (Rat Treadmill) و به صورت دویدن اجباری برای مدت ۱۰ روز متوالی، روزانه ۲ ساعت مداوم، با سرعت ۱۲ متر در دقیقه و شیب ۱۵ درجه تحت تعلیم قرار گرفتند (۸) .
گروه چهارم (مرفین همراه با فعالیت بدنی) : رت های این گروه هر بار۲۰ دقیقه قبل از فعالیت بدنی، مرفین دریافت کردند (تعامل مرفین با فعالیت بدنی).
مرحلهٔ میکرودیالیز و اندازه گیری گلوتامات در هیپوکامپ: به منظور بررسی اثر تعامل مرفین و فعالیت بدنی بر

Archive of SID

www.SID.ir

تغییرات غلظت گلوتامات در رت های سالم و تحت تیمار مرفین، از تکنیک میکرودیالیزاستفاده شد. بر این اساس از شکنج دندانه ای هیپوکامپ رت های مورد آزمایش نمونه گیری به عمل آمده و با روش کروماتوگرافی HPLC اندازه گیری مقدار گلوتامات در مایع مغزی- نخاعی استخراجی انجام گرفت. در نهایت با تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده، تاثیر دویدن با تردمیل بر تغییرات غلظت گلوتامات در رت های سالم و تحت تیمار مرفین مورد بررسی قرار گرفت.

پیش از شروع مرحله عملی میکرودیالیز ، ابتدا مقدمات کار به دقت فراهم می شد. به طوری که همه محلول های لازم به ویژه aCSF تهیه شده، داروی بیهوشی، لوله های اپندروف (ویال)، سرنگ هامیلتون، آب مقطر دو بار تقطیر و بالشتک دمایی روی میز کار در کنار دستگاه استرئوتاکس قرار داده می شد. سپس طبق برنامه تدوین شده هر بار یک رت از یکی از گروههای آزمایشی انتخاب شده و پس از وزن کشی دقیق با دوز مشخص از کلرال هیدارت (۴۵۰ mg / kg) به صورت درون صفاقی بیهوش می شد. پس از اطمینان از بیهوشی رات، توسط ماشین برقی موهای سر و جمجمه به دقت تراشیده شده و پوست سر از روی سطح بالایی جمجمه با قیچی چیده و با پنبه و پنس سطح جمجمه توسط پنبه تمیز می شد تا خطوط اتصال قطعات جمجمه به ویژه خطوط ایجاد کننده نقاط لامبدا و برگما کاملا نمایان شوند. سپس رت را به دستگاه استرئوتاکس انتقال داده و سر حیوان در دستگاه ثابت و بی حرکت می شد. برای اطمینان از تراز بودن سطح جمجمه، میله نگهدارنده (holder) را در دو نقطه لامبدا و برگما به ترتیب ثابت کرده و اعداد مربوط به ارتفاع یا عمق(vertical) ثبت شده و با یکدیگر مقایسه می شدند. برابر بودن این اعداد نشان دهنده تراز بودن سطح جمجمه برای شروع عمل میکرودیالیز است. برای تعیین محل دقیق شکنج دندانه ای هیپوکامپ (DG) با استفاده از راهنمای اطلس مغز رت (پاکسینوس)، از نقطه مبدا یعنی برگما و با دقت کامل نقطه مورد نظر بر روی جمجمه مشخص و علامت گذاری شده و با مته دندانپزشکی به طوری که به پرده های مننژ و بافت مغز آسیب نرساند، استخوان جمجمه سوراخ می شد. پس از سوراخ شدن جمجمه و اطمینان از دقیق بودن مختصات هسته مورد نظر به دلیل اینکه از روش پراب گذاری مستقیم و بدون استفاده از لوله راهنما و کار گذاشتن و ثابت نمودن آن توسط سیمان دندانپزشکی استفاده شد، برای تنظیم دقیق دستگاه در موقعیت مورد نظر از یک پراب کار کرده و مصرف شده، که ابعاد آن دقیقا با پراب های سالم یکسان بود برای تنظیم مختصات هسته استفاده می شد، به طوری که در لحظه آخر که باید پراب به داخل مغز فرستاده می شد پراب کارکرده با پراب اصلی جایگزین می شد. برای جلوگیری از خطای چشم این کار با دقت و در زیر نورچراغ مطالعه و با کمک ذره بین چشمی انجام می گرفت. سپس پراب اصلی با لوله های رابط به سرنگ هامیلتون پر از محلول aCSF که در پمپ تزریق قرار داده شده ، وصل می شد. قبل از این عمل لوله رابط پلاستیکی کاملا هواگیری می شود، تا ذره ای حباب در آن وجود نداشته باشد (حباب مانع از انتشار و جریان مایع در پراب می شد). دستگاه پمپ تزریق با مشخصات سرنگ هامیلتون مورد استفاده (Hamilton 500 µL) و میزان خروج µL/min ۲ تنظیم و روشن می شد. پس از اطمینان از سلامت پراب و مشاهده خروج مایع از لوله خروجی آن، لوله رابط خروجی به پراب وصل می شد و تا یک ساعت پس از قرارگرفتن پراب در مغز رت مایع مغزی نخاعی جمع آوری شده به عنوان تخلیه ساعت اول دور ریخته می شد. به دلیل اینکه تغییرات ایجادی در غلظت ناقلان عصبی موجود در مایع استخراجی ساعت اول مربوط به ورود پراب و آسیب دیدگی بافت مغز به دنبال آن است. پس از تخلیه مایع استخراجی ساعت اول، به مدت یک ساعت و هر ۲۰ دقیقه یک ویال با شماره های مشخص از۱ تا ۳ مایع خروجی پراب را جمع آوری می کردند. ویال های جمع آوری شده به سرعت به دمای ۲۰- درجه سانتی گراد فریزر آزمایشگاه انتقال می یافت و پس از جمع آوری ویال های رت های هر گروه همه نمونه ها به دمای ۷۰- درجه سانتی گراد انتقال داده می شد. همچنین در حین عمل میکرودیالیز برای تنظیم دمای بدن رت بیهوش از سوند مقعدی و بالشتک دمایی با دمای تنظیم شده ۳۷ درجه سانتی گراد در زیر بدن حیوان استفاده می شد. برای تنظیم دقیق زمانهای ۲۰ دقیقه ای از ساعت مخصوص با کرنومتر معکوس شمار قابل تنظیم و زنگ دار استفاده می شد.

Archive of SID
www.SID.ir

به طور معمول مراحل بیهوشی تا پایان میکرودیالیز در صورتی که مشکلی در حین آزمایش پیش نمی آمد در حدود ۳ تا ۴ ساعت طول می کشید. در این مدت همواره میزان هوشیاری جانور ارزیابی می شد. در پایان عمل میکرودیالیز ابتدا با دقت تمام ، پراب از مغز و سوراخ جمجمه خارج می شد و در محلول الکل اتیلیک ۷۰٪ (به مدت ۵ دقیقه) قرار داده می شد تا اگر بافت مغزی به غشای دیالیزی چسبیده است جدا شود. پس از آن پراب در محلول آب مقطر دو بار تقطیر قرار داده می شد و سرنگ ها میلتون حاوی aCSF تخلیه و پر از آب مقطر دو بار تقطیر شده و پمپ تزریق طوری تنظیم می شد تا به مدت یک شبانه روز و میکرودیالیز رت بعدی آب از روی غشای پراب جریان داشته باشد و از مسدود شدن غشای دیالیزی جلوگیری شود. برای تشخیص ویال ها از یکدیگر تک تک آنها علامت گذاری و شماره گذاری شده و زمان اندازه گیری و تاریخ اندازه گیری و شماره رت مورد آزمایش بر روی پلاستیک حاوی ویال های هر رت مشخص می شد. با برش گیری مقاطع مغزی و رنگ آمیزی ناحیه قرارگیری پراب در مغز می توان به صحت عمل میکرودیالیز و نمونه گیری از نقطه مورد نظر پی برد. برای این منظور رت بیهوش را پس از عمل میکرودیالیز، به پشت خوابانده و با ایجاد یک برش طولی- میانی در پوست ناحیه شکم و برشهای دیگر در سطح شکمی دستها و پاها، پوست از ناحیه سینه ای کنار زده می شد. سپس با چیدن دنده های دو طرف قفسه سینه برداشته می شد تا قلب و عروق خونی آن پدیدار گردند. به کمک پنس گیره دار شریان آئورت پشتی که خون رسانی نواحی پائین بدن را انجام می دهد بسته و بلافاصله سر سرنگ مخصوص را وارد بطن چپ و آئورت بالا رو نموده و با پنس دیگر موقعیت قرارگیری آنرا تثبیت کرده و به سرعت با قیچی نوک تیز دهلیز راست را برش داده تا خون برگشتی وارد قلب نشود. بی درنگ محلول آب نمک و پس از آن محلول فرمالین ۱۰٪ با فشار به داخل آئورت بالا رو و نهایتا مغز تزریق می شد. به دلیل خروج کامل خون و جایگزین شدن فرمالین به جای آن، بافت مغز کاملا شفاف می شود. پس از تزریق فرمالین به وسیله دستگاه گیوتین سرحیوان را جدا کرده و به دقت مغز از کاسه سر (جمجمه) بیرون آورده می شد. پس از خارج کردن مغز، آن را درون ظرف پلاستیکی مخصوص در محلول فرمالین نگهداری کرده تا پس از فیکس شدن کامل با دستگاه برش گیری، محدوده پراب گذاری شده مغز برش گیری و رنگ آمیزی گردد تا در صورت درست بودن محل قرارگیری پراب، صحت نمونه گیری تایید شود. در مرحله برش گیری هریک از مغزهای فیکس شده ای را که در فرمالین نگهداری شده بود در دستگاه منجمدکننده برش گیری قرار داده و برشهای ۶۰ μm از محدوده قرارگیری پراب در مغز تهیه می شد. بلافاصله پس از آن برشها با قلم موئین به محلول رینگر نمکی و از آنجا به محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار و در نهایت محلول ژلاتین ۰/۵٪ انتقال می یافت. پس از آن برش های مناسب و خوب را به روی لام منتقل کرده و پس از خشک شدن مراحل رنگ آمیزی روی آنها انجام می گرفت. برای رنگ آمیزی برش های مغزی به دست آمده به ترتیب زیر عمل می شد:

قراردادن لام های حاوی برش در محلول « کرزیل ویوله » به مدت ۵ دقیقه، شستشو با آب مقطر، قراردادن لام های حاوی برش در الکل های ۷۶٪، ۹۶٪ و ۱۰۰٪ به ترتیب هر بار به مدت ۳ دقیقه، قرار دادن لام های حاوی برش در کلروفرم به مدت ۵ دقیقه (در صورت پر رنگ بودن برش ها باید مرحله ۳ تکرار شود)، قرار دادن نمونه ها در گزیلین به مدت ۱۰ دقیقه (۳ تا ۱۰ دقیقه).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به دست آمده از مرحله میکرودیالیز و اندازه گیری گلوتامات با کمک روش آماری آنالیز واریانس (ANOVA) وآزمون آماری t-test برای مقایسه چندگانه تجزیه و تحلیل شد. تفاوت ها تا سطح $p < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد. در تجزیه و تحلیل اصلی توسط آنالیز واریانس (ANOVA)، گروههای موردآزمایش متغیرهای مستقل و تغییرات غلظت گلوتامات متغیر وابسته در نظر گرفته شد.

نتایج

در این قسمت نتایج مرحله میکرودیالیز و اندازه گیری ناقل عصبی «گلوتامات» در نمونه های مایع مغزی نخاعی به دست آمده ازشکنج دندانه ای(DG) هیپوکامپ رتهای مورد آزمایش(در زمانهای متوالی پس از تخلیه مایع مغزی نخاعی جمع آوری شده در ساعت اول پس از پراب گذاری و میکرودیالیز) ارائه می شود. غلظت گلوتامات مایع استخراجی با روش HPLC و توسط شناساگر فلوئورسانس اندازه گیری

Archive of SID

www.SID.ir

شده و پس از تجزیه و تحلیل آماری به صورت نمودار خطی ارائه گردیده است. به منظور سهولت بررسی نتایج ، ارزیابی در فواصل زمانی بیست دقیقه ای(اول ، دوم و سوم) و پس از تخلیه ساعت اول انجام شده است.

بررسی تغییرات غلظت گلوتامات در بیست دقیقه اول

نتایج نشان می دهدکه در بیست دقیقه اول نمونه گیری پس از تخلیه ساعت اول، در مقایسه میانگین نتایج تغییرات غلظت گلوتامات درگروههای موردآزمایش، بین گروه کنترل وگروه مرفین همراه با فعالیت بدنی، تفاوت معنی دار وجود دارد ($p < ۰/۰۵$)، ولی با گروههای دیگرتفاوت معنی دار وجود ندارد ($p> ۰/۰۵$). همچنین در مقایسه گروههای تحت تیمار، بین گروه مرفین همراه با فعالیت بدنی با گروه مرفین وگروه فعالیت بدنی تفاوت معنی دار وجود دارد ($p < ۰/۰۵$) (جدول۱، شکل۱) .

بررسی تغییرات غلظت گلوتامات در بیست دقیقه دوم

نتایج نشان می دهد که در بیست دقیقه دوم (چهل دقیقه پس از تخلیه)، در مقایسه میانگین نتایج تغییرات غلظت گلوتامات درگروههای مورد آزمایش، فقط بین گروه کنترل باگروه مرفین همراه با فعالیت بدنی تفاوت معنی دار وجود دارد($p < ۰/۰۵$) و با سایرگروهها تفاوت معنی دار وجود ندارد ($p> ۰/۰۵$). همچنین بین گروه مرفین همراه با فعالیت بدنی باگروه مرفین وگروه فعالیت بدنی تفاوت معنی دار وجود دارد ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۱) (شکل۱).

بررسی تغییرات غلظت گلوتامات در بیست دقیقه سوم

نتایج نشان می دهد که در بیست دقیقه سوم (یک ساعت پس از تخلیه)، در مقایسه میانگین نتایج تغییرات غلظت گلوتامات درگروههای مورد آزمایش، فقط بین گروه کنترل با گروه مرفین همراه با فعالیت بدنی، تفاوت معنی دار وجود دارد($p < ۰/۰۵$) و با سایرگروهها تفاوت معنی دار وجود ندارد ($p> ۰/۰۵$). از سوی دیگر، بین گروه مرفین همراه با فعالیت بدنی با گروه مرفین و گروه فعالیت بدنی تفاوت معنی دار وجود دارد ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۱، شکل۱).

اثر فعالیت بدنی بر غلظت گلوتامات شکنج دندانه ای

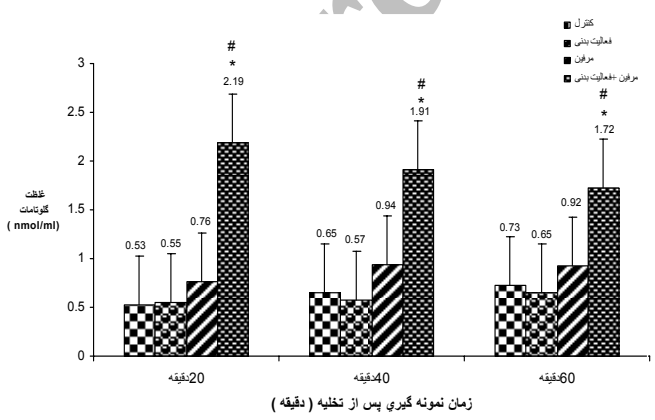
با توجه به نتایج مربوط به سه زمان نمونه گیری بیست دقیقه ای، مشاهده می شود که تیمار فعالیت بدنی، غلظت گلوتامات را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می دهد ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد ($p > ۰/۰۵$) (جدول۱ ، شکل۱) .

اثر مرفین بر غلظت گلوتامات شکنج دندانه ای

نتایج نشان می دهد که تیمار مرفین، غلظت گلوتامات را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می دهد. هر چند این افزایش در هیچیک از زمانهای نمونه گیری از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد ($p > ۰/۰۵$) (جدول ۱، شکل ۱) .

اثرتعامل مرفین با فعالیت بدنی بر غلظت گلوتامات شکنج دندانه ای

نتایج نشان می دهدکه تعامل مرفین با فعالیت بدنی، غلظت گلوتامات را در مقایسه با گروه کنترل و همچنین گروههای مرفین و فعالیت بدنی، در هر سه زمان اندازه گیری به طور معنی دار افزایش می دهد ($p < ۰/۰۵$) (جدول۱، شکل۱). در هر سه زمان بیست دقیقه ای نمونه گیری پس از تخلیه ساعت اول، در مقایسه میانگین گروه کنترل (اول) با گروه مرفین(دوم) و گروه فعالیت بدنی(سوم) تفاوت معنی دار مشاهده نشد ($p> ۰/۰۵$). درحالی که بین گروه کنترل با گروه مرفین با فعالیت بدنی(چهارم) تفاوت معنی دار مشاهده شد ($p< ۰/۰۵$). همچنین بین گروه مرفین با فعالیت بدنی(چهارم) و گروههای مرفین(دوم) و فعالیت بدنی(سوم) نیز تفاوت معنی دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). ولی بین گروه مرفین با گروه فعالیت بدنی تفاوت معنی دار مشاهده نشد ($p> ۰/۰۵$) .



شکل ۱: نمودار ستونی مقایسه میانگین تغییرات غلظت گلوتامات شکنج دندانه ای هیپوکامپ در زمان های نمونه گیری پس از تخلیه ساعت اول به روش میکرودیالیز در گروههای مورد آزمایش.

www.SID.ir

جدول ۱: مقایسه میانگین تغییرات غلظت گلوتامات (nmol /ml) در نمونه های میکرودیالیز به دست آمده از شکنج دندانه ای هیپوکامپ در گروههای مورد آزمایش، در زمانهای مختلف پس از تخلیه ساعت اول.

زمان نمونه گیری پس از تخلیه / گروه آزمایشی	۲۰ دقیقه اول	۲۰ دقیقه دوم	۲۰ دقیقه سوم
کنترل	۰/۵۳±۰/۰٤	۰/٦٥±۰/۰٦	۰/۷۳±۰/۰۸
مرفین	۰/۷٦±۰/۰۹	۰/۹٤±۰/۱۱	۰/۹۲±۰/۰۷
فعالیت بدنی	۰/۵۵±۰/۰٤	۰/۵۷±۰/۰۹	۰/٦٥±۰/۰۷
مرفین با فعالیت بدنی	۲/۱۹±۰/۲۷ *	۱/۹۱±۰/۲۵ *	۱/۷۲±۰/۱۹ *

بحث و نتیجه گیری

در این قسمت به بحث و تفسیر نتایج مرحله میکرودیالیز و اندازه گیری ناقل عصبی گلوتامات در نمونه های به دست آمده از مایع مغزی- نخاعی رت های مورد آزمایش در زمانهای متوالی(بیست دقیقه ای) پس از تخلیه ساعت اول پرداخته می شود، و نتایج به دست آمده با دستاوردها و گزارشات ارائه شده توسط محققان دیگر مقایسه و بررسی می گردد. در بررسی نتایج، اثر تیمارهای مختلف مرفین، فعالیت بدنی و مرفین همراه با فعالیت بدنی برغلظت گلوتامات ناحیه شکنج دندانه ای هیپوکامپ مورد ارزیابی قرار می گیرد.

بررسی اثرتیمار مرفین بر غلظت گلوتامات شکنج دندانه ای هیپوکامپ

در مقایسه میانگین نتایج تغییرات غلظت گلوتامات بین گروه کنترل (بدون تیمار) و گروه مرفین، مشاهده شده که مصرف مزمن مرفین، غلظت گلوتامات مایع مغزی نخاعی به دست آمده از شکنج دندانه ای هیپوکامپ را افزایش می دهد، هر چندکه افزایش مشاهده شده از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد($p > ۰/۰۵$) (جدول ۱، شکل۱). مشاهده شد که بیشترین مقدار گلوتامات مربوط به بیست دقیقه دوم و کمترین مقدار آن مربوط به بیست دقیقه اول پس از تخلیه می باشد (شکل ۱). به این معنی که پس از یک ساعت تخلیه نمونه جمع آوری شده، به تدریج میزان رهایی گلوتامات در سیناپس های مربوطه (در محل تجمع سلولهای عصبی شکنج دندانه ای هیپوکامپ) تحت تاثیر مرفین بیشتر می شود. به عبارت دیگر مرفین، مقدار گلوتامات را در سیناپس گلوتاماترژیک افزایش می دهد. لازم به ذکر است که تخلیه ساعت اول به این دلیل انجام شد که در اثر جراحی مغز و پراب گذاری در موقعیت مورد نظر، سلولهای آسیب دیده یا تحریک شده فعالیت طبیعی نداشته و نقل و انتقالات سیناپسی آنها دستخوش تغییرات ناگهانی و غیر معمول می شود.گزارش ها بیانگرآن است که پس از گذشت این زمان استرس و تحریک ناشی از عمل میکرودیالیز از بین رفته و می توان به نمونه گیری اصلی پرداخت و به نتایج به دست آمده با اطمینان استناد کرد (۸). در تایید نتایج تحقیق حاضر،گزارش شده است که مصرف مکرر اوپیات ها (نظیر مرفین)، سازشها و انطباق های نورونی را در نواحی مختلف مغزی مانندآمیگدال قاعده ای جانبی، هسته لوکوس سرولئوس و هسته قاعده ای پایانه های مخطط و همچنین سیستم های ناقلان عصبی گلوتاماترژیک، نورآدرنرژیک و ... القا می کند (۹). از سوی دیگر گزارش شده است که سوء مصرف اوپیات ها، سبب تغییرات سازشی دراز مدت در فرایندهای چندگانه نقل و انتقال سیناپسی می شود و احتمالا سیستم گلوتاماترژیک یک نقش کلیدی در ایجاد وابستگی و تحمل مواد اوپیاتی ایفا می کند که مکانیسم های آن تا کنون ناشناخته مانده است (۱۰). مشخص شده است که در مدت ترک مصرف مرفین میزان برداشت و اخذ گلوتامات در اجسام سیناپسی هیپوکامپ به طور معنی داری افزایش نشان می دهد (تا ۷۰٪ بیشتر از رتهای تحت تیمار مزمن مرفین). این افزایش احتمالا به علت افزایش تعداد ناقلان گلوتاماتی در دوره ترک مصرف می باشد. به عبارت دیگر مصرف مزمن مرفین از طریق کاهش در تعداد ناقلان گلوتاماتی در سیناپس های گلوتاماترژیک هیپوکامپ، غلظت سیناپسی گلوتامات را بالا برده و تاثیرگلوتامات برگیرنده های پس سیناپسی اش را طولانی تر می سازد (۱۰، ۱۱). در همین ارتباط، شواهد و مدارک فزاینده ای وجود دارد که نشان می دهد، ترکیبات اوپیوئیدی به طور معنی داری نقل و انتقال سیناپس های گلوتاماترژیک و انعطاف پذیری نورونی را در هیپوکامپ تغییر می دهند (۱۲). علاوه براین نقش گیرنده های اوپیوئیدی از نوع مو (mu) نیز در این زمینه به اثبات رسیده

Archive of SID

www.SID.ir

است (۱۳). Vorel و همکاران ، نقش احتمالی سیستم گلوتاماترژیک را در ایجاد اشتیاق به مصرف کوکائین مطرح کردند (۱۴). به هر حال، همانگونه که نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد، تیمار مزمن مرفین میزان گلوتامات خارج سلولی را افزایش می دهد. در تایید این نتیجه،گزارش شده است که مصرف اوپیاتها موجب افزایش معنی دار در غلظت گلوتامات خارج سلولی در بسیاری از نواحی مغز می شود که ممکن است این افزایش، نقل و انتقالات عصبی را تحت تاثیر خود قرار دهد (۱۵-۱۷). از طرف دیگر، گزارش شده است که جابه جایی ناقل گلوتاماتی GLT_1 به پایانه های عصبی و سطح بیان ژنی القا شده آن، ممکن است به طور چشمگیری، مقدار گلوتامات اضافی فضای سیناپسی را برای حفظ و برقراری عملکرد طبیعی سیناپس، انتقال دهد. در حقیقت نیاز به GLT_1 در حفظ فعالیت نورونهای کشت یافته در برابر مقدار زیاد غلظت گلوتامات خارج سلولی به اثبات رسیده است (۱۸، ۱۹). شاید بیشتر ناقلان GLT_1 در زمان تیمار مزمن مرفین به صورت ذخیره سیتوپلاسمی در سیتوپلاسم نورون غیرفعال شده و در زمان ترک مصرف به سطح سلولی مهاجرت نموده و فعالیت خود را در برداشتن گلوتامات اضافی از شکاف سیناپسی از سر می گیرند. در تحقیق دیگر، علایی و همکاران نیز نشان دادند که مصرف مزمن مرفین، غلظت گلوتامات را در ناحیه تگمنتوم شکمی به طور معنی داری افزایش می دهد (۲۰) . در مقابل برخی گزارشها نشان می دهند که مرفین غلظت گلوتامات را کاهش می دهد. برای مثال گزارش شده است که تیمار مزمن مرفین، رهایی گلوتامات را در هسته آکومبانس (NAc)، کاهش می دهد. در این رابطه Martin و همکاران، و Rogers و همکاران فرضیه توقف نقل و انتقال سیناپس گلوتاماترژیک در هسته آکومبانس را در اثر مصرف مزمن مرفین مطرح کردند (۲۱). بر اساس این فرضیه، یافته ها نشان می دهند که ضعف و ناتوانی اراده اشخاص مصرف کننده مخدرها (اوپیاتها) می توانند با آسیب دیدگی « ناحیه زیر حدقه ای پیشانی » از قشر پیش پیشانی که بیشتر آورانهای گلوتاماتی هسته آکومبانس را تامین می کند، در ارتباط باشد. این کاهش یافتگی نقل و انتقال گلوتاماتی هم جهت با افزایش یافتگی رهایی GABA، بایستی تحریک پذیری نورونی را در هسته آکومبانس متوقف سازد (۲۲). این اثرات موزون تیمار مزمن مرفین روی نقل و انتقال سیناپسی با واسطه GABA و گلوتامات، بایستی برخی از تغییراتی را که علاوه بر خصوصیات پاداش دهنده اوپیوئیدها، در مدت انتقال به « اعتیاد دارویی» ایجاد می شود در برگیرد (۲۳). تصور می شود که افزایش میزان خود مصرفی مرفین در رتها به این دلیل باشد که رتها برای مهار نورونهای اکومبانس خود تلاش می کنند و مصرف مزمن مرفین احتمالا چنین مهاری را تسهیل می کند (۲۴، ۲۵). به دلیل اینکه افزایش پاداش در رابطه با « وابستگی اوپیاتی »، باید از هر دو پدیده «حساسیت » و « تحمل » ناشی شده باشد، برای تعیین اینکه اثرات مشاهده شده دقیقا به کدام پدیده مربوط می باشد به تحقیقات بیشتری نیاز است. به هر حال روشن شده است که، مصرف مزمن مرفین با تنظیم کاهشی بیان ژن گیرنده اوپیاتی مو (mu)، تحریک بیان ژن های نزدیک بی واسطه، به افزایش سطوح cAMP منجر می شود. cAMP در سر راه فرایندهای شیمیایی متعددی قرار دارد که هموستازی سلول را کنترل می کنند. از طرفی ممکن است افزایش سطوح cAMP تحت کنترل CREB باشد (۲۶) و شاید تا اندازه ای بیان ژن CREB نیز تحت کنترل فعالیت گیرنده گلوتاماتی(NMDA) قرار داشته باشد (۲۷-۲۹). بنابراین، مهار نقل و انتقال گلوتامات با واسطه گیرنده NMDA که با توجه به نتایج تحقیقات اخیر مطرح شده است ممکن است به عنوان یک مکانیسم جبرانی عمل کند که سرانجام سنتز CREB را کاهش داده و افزایش سطوح cAMP را ازطریق مصرف مزمن مرفین القا کند. در نتیجه می توان گفت: مصرف مزمن مرفین، نقل و انتقال گلوتاماترژیک را هم در پیش سیناپس و هم در پس سیناپس کاهش می دهد (۲۱). لازم به ذکر است که اثر مرفین تا یک هفته پس از قطع مصرف باقی می ماند، که این دوام نه به دلیل باقی ماندن مرفین در مدت آزمایشات است، بلکه بایستی به دلیل تغییرات درازمدت در ویژگیهای گیرنده هایNMDA در انطباق های عصبی شناخته شده برای دوام طولانی پس از قطع مصرف باشد. با مصرف مزمن مرفین، ممکن است اثرات پیش سیناپسی غالب شوند، در حالی که با قطع مصرف طولانی مدت کاهش اثرات پیش سیناپسی به وجود می آید (۳۰). با توجه به

Archive of SID
www.SID.ir

این یافته ها می توان گفت: مصرف مزمن مرفین در هیپوکامپ از طریق کاهش بیان ژن گیرنده های اوپیوئیدی مو (mu)، مهار نقل و انتقال با واسطه گیرنده NMDA و همچنین کاهش ناقلان گلوتاماتی (به ویژه GLT_1)، نقل و انتقال سیناپس گلوتاماترژیکی را کاهش می دهد (رهایی گلوتامات به شکاف سیناپسی را افزایش داده و برداشت آن را از سیناپس کاهش می دهد) (۳۱).

بررسی اثر فعالیت بدنی بر غلظت گلوتامات شکنج دندانه ای هیپوکامپ

در این قسمت با توجه به مطالب گفته شده قبلی به بررسی اثر فعالیت بدنی بر سیستم گلوتاماترژیک هیپوکامپ و نقل و انتقال گلوتامات در شکنج دندانه ای آن پرداخته می شود. در قسمت نتایج مرحله میکرودیالیز مشاهده شد که گروه فعالیت بدنی (گروه سوم) در قیاس با گروه کنترل (گروه اول)، غلظت گلوتامات خارج سلولی را کاهش می دهد که از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد($p > ۰/۰۵$) (جدول ۱، شکل ۱). در تایید این موضوع، گزارش شده است که در مقایسه بین رتهای دونده ای که به مدت ۶ هفته با تردمیل فعالیت بدنی داشته اند با رت های کنترل (بدون فعالیت بدنی)، سطح گلوتامات مغزی کاهش می یابد (۳۲). در توجیه این اثر فعالیت بدنی می توان گفت که فعالیت بدنی طولانی مدت سبب افزایش آمونیاک در مغز می شود و به دلیل سمی بودن آمونیاک و برای جلوگیری از مسمومیت ناشی از افزایش مغزی آن، مکانیسم بیوسنتز گلوتامین فعال می شود تا غلظت آمونیاک مغز را کاهش دهد. بنا بر اهمیت موضوع توضیح مختصری در این رابطه ارائه می شود. یافته ها نشان می دهند که گلوتامات رها شده در شکاف سیناپسی به وسیله ناقلان گلوتاماتی [پروتئین های با شش یا هشت ناحیه غشا گذر که با صرف انرژی، گلوتامات را هم جهت بایونهای سدیم (Na^+) و خلاف جهت با یونهای هیدروکسیل(OH^-) و پتاسیم (K^+) انتقال می دهند] برداشته می شوند. این عمل به وسیله نورون ها و سلولهای گلیال صورت می گیرد. سپس گلوتامات به وسیله آنزیم گلوتامین سنتاز به گلوتامین تبدیل می شود وگلوتامین ایجاد شده ازطریق مسیر برگشت به سلولهای گلوتاماترژیک باز می گردد و در این سلولها به کمک آنزیم گلوتامیناز به گلوتامات تبدیل می شود.

$$\text{Glutamate + ATP + NH4+} \underset{\text{Glutaminase}}{\overset{}{\rightleftharpoons}} \text{ADP + Pi + Glutamine}$$

مشاهده می شود که در مسیر سنتز گلوتامین از گلوتامات، مولکولهای آمونیاک (NH_4^+) مصرف می شوند. این همان مکانیسم محافظتی است که پس از افزایش آمونیاک مغزی متعاقب فعالیت بدنی فعال می شود. از سوی دیگر در این مکانیسم، فعالیت شدید ناقلان گلوتاماتی نیز قابل ملاحظه است زیرا که برای حذف آمونیاک سمی در سلولهای عصبی به گلوتامات بیشتری نیاز است که باید به وسیله ناقلان از شکاف سیناپسی برداشته شود. با توجه به این موضوع، فعالیت بدنی، از یک طرف برداشته شدن گلوتامات را از شکاف سیناپس گلوتاماترژیک هیپوکامپ به وسیله ناقلان گلوتاماتی (نظیر GLT_1) افزایش می دهد و از سوی دیگر سطح بیان ژنهای سازنده این ناقلان را بالا می برد (۳۲، ۳۳). البته با توجه به تاثیر مثبت فعالیت بدنی بر یادگیری ساده ای نظیر احترازی غیر فعال (۳۱)، شاید بتوان گفت که احتمالا تاثیر فعالیت بدنی بر هیپوکامپ، بیشتر از طریق اثر برفرایندهای نورون زایی در ناحیه شکنج دندانه ای، تقویت و استحکام سیناپسهای درگیر در فرایند یادگیری و افزایش سطوح عوامل تغذیه کننده عصبی نظیر BDNF و کمتر از مسیر گلوتاماترژیک اعمال شده است. شاید فعالیت بدنی با افزایش تعداد و سطح بیان ژنهای ناقلان گلوتاماتی، سرعت نقل انتقال سیناپس را در سیناپسهای گلوتاماترژیک افزایش داده و اثری عکس اثر مرفین به دنبال دارد.

بررسی اثرتیمار مرفین همراه با فعالیت بدنی برغلظت گلوتامات شکنج دندانه ای هیپوکامپ

نتایج نشان می دهد که در هر سه زمان نمونه گیری مایع مغزی نخاعی شکنج دندانه ای هیپوکامپ به روش میکرودیالیز پس از تخلیه ساعت اول، تیمار مرفین همراه با فعالیت بدنی (گروه چهارم) در مقایسه با گروه کنترل، مقادیر گلوتامات را به طور معنی دار افزایش می دهد ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۱) (شکل ۱). البته بیشترین مقدار این افزایش در بیست دقیقه اول مشاهده می شود و به تدریج مقدار گلوتامات در بیست دقیقه دوم و سوم کاهش می یابد (شکل ۱). به نظر می رسد با گذشت زمان اثر کاهنده ورزش بر اثر افزاینده مرفین برتری می یابد و سیر

Archive of SID

www.SID.ir

نزولی گلوتامات در گروه تعامل مرفین با فعالیت بدنی مشاهده می شود. شاید بتوان گفت که بین مصرف مزمن مرفین و فعالیت بدنی (درست بیست دقیقه پس از مصرف مرفین)، نوعی اثر تقویت کننده و تعامل مثبت وجود دارد. به طوری که اثر مرفین در افزایش غلظت خارج سلولی (سیناپسی) گلوتامات به شدت تقویت می شود (درمقایسه با گروه مرفین). در توجیه این موضوع به نظر می رسد مرفین مکانیسم بیوسنتز گلوتامین را که با فعالیت بدنی فعال می شود تا با مسمومیت آمونیاکی مغز مقابله کند و در نتیجه آن غلظت گلوتامات مغز کاهش می یابد(۳۳،۳۲)، معکوس می سازد. سیر صعودی که با گذشت زمان درغلظت گلوتامات گروههای دیگر (اول، دوم و سوم) مشاهده می شود یک روند طبیعی است و در تحقیقات مشابه بالاترین غلظت، زمان ۲۰ دقیقه سوم (یک ساعت پس از تخلیه) گزارش شده است (۲۰،۸). از سوی دیگر باید تاثیر استرس بی حرکتی(درگروه کنترل وگروه مرفین) و استرس حرکتی(گروه فعالیت بدنی و تعامل مرفین با فعالیت بدنی) در ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی نظیر نقل و انتقالات ناقلان عصبی مغز را مورد توجه قرار داد. البته لازم به یادآوری است که در مورد هر فرایند مغزی، عوامل و مسیرهای متعددی درگیر هستند و نباید از نقش سایر عوامل نظیر: ناقلان عصبی (دوپامین، استیل کولین، GABA و نوراپی نفرین)، عوامل تغذیه کننده نورونها (BDNF ، IGF-I ، NGF)، اندورفین ها، کانابینوئیدها و در تاثیر همزمان مرفین و ورزش بر فرایندهای پیچیده یادگیری ، حافظه و اعتیاد غافل شد (۳۴-۳۶). به هر حال، تحقیقات در این زمینه ادامه دارد. با این وجود تا این زمان روشن نشده است که مکانیسم اصلی درگیر در این فرایندها کدام است و برای دستیابی به این مقصود به تحقیقات گسترده تری نیاز است.

تشکر و قدردانی

از همکاری مسؤلین محترم گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و به خصوص آقای دکترسید محمود حسینی و سرکار خانم دکتر رجائی و آقای صیادی، همچنین مسوولین محترم دانشگاه جندی شاپوراهواز به ویژه آقای دکترعلیرضا سرکاکی و آقای باهوشی که در انجام این تحقیق مساعدت نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Stellar G. R., Stellar E., The neurobiology of motivation and reward, Springer-Verlag, New York, 1985, 962-963.
2. Furst D. M., Germone K., 1993, Negative addiction in male and female runners and exercisers, Percept. Motor Skill, 77:192-4.
3. Sell E. H., Christensen N. J., 1989, The Effect of physical training on physical, mental, and social conditions in drug and/or alcohol addicts, Ugeskrift Laeger, 14;151:2064-7.
4. Jennifer L., Cornsh Peter W., Kalivas, 2000, Glutamate transmission in the nucleus accumbans mediates relaps in cocaine addiction, J. Neurosci., 20RC89:1-5.
5. Sulzer D., Myra P., LingLin J., Geldwert D., Suzann N., Haber, Toshiaki Hattori H., Rayport S., 1998, Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro, J. Neurosci., 18:4588-4602.
6. Nestler E. J., 2002, Common molecular and cellular substrates of addiction and memory, Neurobiol. Learn Mem., 78:637-47.
7. Hopkins J., 1997, Protein strengthens link between addiction and long-term memory, Nature, 27:1-2.
8. Ahmadiasl N., Alaei H., Hanninen O., 2003, Effect of exercise on learning, memory and levels of epinephrine in rats hippocampus, J. Sport Sci. Med., 2:106-109.
9. Biegler R., McGregor A., Krebs J. R., Healy S. D., 2001, A larger hippocampus is associated with longer-lasting spatial memory, P. Natl. Acad. Sci. USA., 98: 6941–6944.
10. Nan-Jie Xu, Lan Bao, Hua-Ping Fan, Guo-Bin Bao, Lu Pu, Ying-Jin Lu, Chun-Fu Wu, Xu Zhang, Gang Pei, 2003, Morphine withdrawal increases glutamate uptake and surface expression of glutamate transporter GLT1 t Hippocampal Synapses, J. Neurosci., 23:4775-4784.
11. Nestler E. J., 2001, Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction, Nat. Rev. Neurosci., 2:119-128.
12. Haas H. L., Ryall R. W., 1980, Is excitation by enkephalins of hippocampal neurones in the rat due to presynaptic facilitation or to disinhibition?, J. Physiol., 308: 315–330.

Archive of SID
www.SID.ir

13. Isaacson R. L., Lanthorn T. H., 1981, Hippocampal involvement in the pharmacologic induction of withdrawal-like behaviors, Fed. Proc., 40:1508–1512.
14. Luciano D. S., Vander A. J., Sherman J. H., Human Function & Structure, International Student Edition, Mc Graw Hill, Auckland., 1978, 335-6.
15. Sepulveda M. J., Hernandez L., Rada P., Tucci S., Contreras E., 1998, Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study, Pharmacol. Biochem. Behav., 60:255–262.
16. Zhang T., Feng Y., Rockhold R. W., Ho I. K., 1994, Naloxone-precipitated morphine withdrawal increases pontine glutamate levels in the rat, Life Sci., 55: 25–31.
17. Aghajanian G. K., Kogan J. H., Moghaddam B., 1994, Opiate withdrawal and increases glutamate aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study, Brain Res., 636:126–130.
18. Wang G. J., Chung H. J., Schnuer J., Pratt K., Zable A. C., Kavanaugh M. P., Rosenberg P. A., 1998, High affinity glutamate transport in rat cortical neurons in culture, Mol. Pharmacol., 53: 88–96.
19. Wang G. J., Chung H. J., Schnuer J., Lea E., Robinson M. B., Potthoff W. K., Aizenman E., Rosenberg P. A., 1998, Dihydrokainate-sensitive neuronal glutamate transport is required for protection of rat cortical neurons in culture against synaptically released glutamate, Eur. J. Neurosci., 10:2523–2531.
20. Alaei H., Huotari M., Piepponen P.T., Ahtee L., Hanninen O., Mannisto P. T., 2003, Morphine releases glutamate through AMPA receptors in the Ventral Tegmental Area: A microdialysis study in the conscious rats, MGIRI, 225-231.
21. Martin G., Przewlocki R., Siggins G. R., 1999, Chronic morphine treatment selectively augments metabotropic glutamate receptor-induced inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in nucleus accumbens, J. Pharmacol. Exp. Ther., 288:30-35.
22. Chieng B., Williams J. T., 1998, Increased opioid inhibition of GABA release in nucleus accumbens during morphine withdrawal, J. Neurosci., 18:7033-7039.
23. Koob G. F., Sanna P. P., Bloom F. E., 1998, Neuroscience of addiction, Neuron, 21:467-476.
24. Carrera M. R. A., Schulteis G., Koob G. F., 1999, Heroin self-administration in dependent wistar rats: increased sensitivity to naloxone, Psychopharmacology (Berl), 144:111-120.
25. Shippenberg T. S., Heidbreder C., Lefevour A., 1996, Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics, Eur. J. Pharmacol., 299:33-39.
26. Lane-Ladd S. B., Pineda J., Boundy V. A., Pfeuffer T., Krupinski J., Aghajanian G. K., Nestler E. J., 1997, CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence, J. Neurosci., 17:7890-7901.
27. Morgan P. F., Linnoila M., 1991, Regional induction of c-fos mRNA by NMDA: a quantitative in-situ hybridization study, Neuro Report, 2:251-254.
28. Szekely A. M., Costa E., Grayson D. R., 1990, Transcriptional program coordination by N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptor stimulation in primary cultures of cerebellar neurons, Mol. Pharmacol. 38:624-633.
29. Cole A. J., Saffen D. W., Baraban J. M., Worley P. F., 1989, Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation, Nature, 340:474-476.
30. Gottmann K., Mehrle A., Gisselmann G., Hatt H., 1997, Presynaptic control of subunit composition of NMDA receptors mediating synaptic plasticity, J. Neurosci., 17:2766-2774.
۳۱. عزیزی ملک آبادی، حمید. علائی، حجت الله، عریان، شهربانو. بررسی اثرات تمرین بدنی(دویدن روی تردمیل)بر یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال در موش های صحرایی نر وابسته به مرفین، مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۸، شماره۴، ۱۳۸۴، ۲۵۲-۲۶۲.
32. Guezennec C. Y., Abdelmalki A., Serrurier B., Merino D., Bigard X., Berthelot M., Pierard C., Peres M., 1998, Effects of prolonged exercise on brain ammonia and amino acids, Int. J. Sports Med.,19:323-7.
33. Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M., Principles of Neural Science. Fourth Edition, Mc Graw Hill, 2000, 1231.
34. Auclair N., Otani S., Soubrie P., Crepel F., 2000, Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons, J. Neurophysiol., 83: 3287-3293.
35. Gonzalez S., Fernandez-Ruiz J. J., Sparpaglione V., Parolaro D., Ramos J. A., 2002, Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB_1receptor binding and mRNA levels, Drug Alcohol Depend., 66: 77-84.
36. Welch S., Eads M., 1999, Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems, Brain Res., 848:183-19.

Archive of SID
www.SID.ir