Physiology and Pharmacology, 11(4), 252 - 260
Winter 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Assessment of the effect of nitric oxide within hippocampal CA1 area on spatial learning and memory in morphine dependent rats

Ali Pourmotabbed[1*], Parychehr Yaghmaei[2], Parviz Imani[2], Seyed Ershad Nedaei[1], Atefeh Touhidi[1]

1. Dept. Physiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
2. Dept. Biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 15 July 2007 **Revised:** 22 Sep 2007 **Accepted:** 17 Oct 2007

Archive of SID

Abstract

Introduction: There are evidences showing the role of nitric oxide in the opiate reward properties. The role of nitric oxide signaling pathway as an intracellular mechanism on augmentation of long term potentiation in hippocampal CA1 area of rats is also confirmed. It has been also reported that oral morphine dependence facilitates formation of spatial learning and memory via activation of NMDA receptors located in hippocampal CA1 area of rats. The effect of nitric oxide within hippocampal CA1 area on the spatial learning and memory processes in morphine dependent rats is unclear.

Methods: 33 N-MRI male rats (250-350 g) were divided into 4 experimental groups. Two cannulae were stereotaxically implanted bilaterally into hippocampal CA1 area. After 5 days recovery, animals received morphine sulfate or sucrose for 30 consecutive days in drinking water. Morris water maze (MWM) studies were performed from day 26 to 30. In this period animals received bilateral intra-hippocampal CA1 injection of 3μg/ 2 μl L-NAME (NOS inhibitor) or 2 μl saline (1 μl/site), 1 min before daily experimentation. Spatial learning and memory parameters were subjected to analysis of variance (ANOVA).

Results: Morphine dependence facilitated spatial learning and memory in rats. This effect was inhibited with local administration of L-NAME in hippocampal CA1 area.

Conclusion: Activation of intracellular NO signaling pathway in the pyramidal cells of hippocampal CA1 area may involve in facilitating spatial learning and memory in morphine dependent rats.

Keywords: Nitric oxide, morphine, hippocampal CA1, spatial learning and memory, rat

* Coresponding Author Email: apourmotabbed@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۱ (۴)، ۲۵۲ – ۲۶۰
زمستان ۱۳۸۶

فیزیولوژی و فارماکولوژی

ارزیابی نقش نیتریک اکساید موجود در ناحیه CA1 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی موشهای صحرایی وابسته به مرفین

علی پورمتعبد[۱*]، پریچهر یغمایی[۲]، پرویز ایمانی[۲]، سید ارشادندایی[۱]، عاطفه توحیدی[۱]
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه
۲. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

دریافت: تیر ۸۶ بازبینی: شهریور ۸۶ پذیرش: مهر ۸۶

چکیده

مقدمه: نقش نیتریک اکساید (NO) در ناحیه CA1 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی موشهای صحرایی وابسته به مرفین مشخص نیست. شواهدی در تایید نقش نیتریک اکساید در فرآیندهای پاداشی اپیوئیدها وجود دارد. نقش مسیر پیامبری NO به عنوان یک مکانیسم داخل سلولی در القاء تقویت طولانی مدت نیز تایید شده است. همچنین گزارش شده که وابستگی خوراکی به مرفین روند یادگیری و حافظه فضایی را با میانجیگری گیرنده‌های NMDA ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی تقویت می‌کند. لذا در مطالعه حاضر نقش NO در این رابطه بررسی شده است.

روش‌ها: در این تحقیق ۳۳ موش صحرایی نر نژاد N-MRI در محدوده وزنی ۳۵۰–۲۵۰ گرم به چهار گروه تقسیم شدند. سپس ناحیه CA1 هیپوکامپ آنها به صورت دو طرفه کانول گذاری شد. بعد از پنج روز بهبود، حیوانات ۳۰ روز مرفین سولفات یا سوکروز را در آب آشامیدنی دریافت کردند. مطالعات ماز آبی موریس از روز ۲۶ تا ۳۰ انجام شد. هر روز یک دقیقه قبل از آزمایش هر حیوان دو میکرولیتر سالین یا ۳ میکروگرم L-NAME (مهارکننده آنزیم نیتریک اکساید سنتاز) در حجم دو میکرولیتر (۱/۵ میکروگرم در حجم یک میکرولیتر در هر طرف) در ناحیه CA1 هیپوکامپ دریافت می‌کرد. شاخصه‌های یادگیری و حافظه فضایی به روش آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شد.

یافته‌ها: وابستگی خوراکی به مرفین یادگیری و حافظه فضایی را در موشهای صحرایی تقویت می‌کند. این اثر با تجویز موضعی L-NAME در ناحیه CA1 هیپوکامپ مهار می‌گردد.

نتیجه‌گیری: فعال شدن مسیر پیامبری داخل سلولی NO در سلولهای پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ در تقویت یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات وابسته به مرفین موثر است.

واژه‌های کلیدی: نیتریک اکساید، مرفین، CA1 هیپوکامپ، موش صحرایی، یادگیری و حافظه فضایی

مقدمه

هیپوکامپ یکی از ساختمانهای عصبی اساسی است که در تشکیل انواع خاصی از حافظه نقش دارد [۵]. گزارش شده تخریب ۲۵٪ و یا بیشتر از ناحیه dorsal هیپوکامپ باعث ایجاد اختلال در فراگیری و همچنین بازیابی حافظه فضایی در ماز آبی موریس می‌شود [۲۳]. گیرنده‌های اپیوئیدی به تعداد فراوان و تراکم بالا در هیپوکامپ موجود بوده و توسط پپتیدهای اپیوئیدی تحریک می‌شوند. این پپتیدها به همراه گلوتامات در سیناپسهای فیبرهای خزه‌ای و مسیر lateral perforant آزاد می‌شوند [۲۳]. از طرف دیگر گزارش شده که اپیوئیدها در تعدیل تحریک پذیری سلولهای پیرامیدال هیپوکامپ نقش دارند، بطوری که تجویز آنتاگونیستهای گیرنده μ اپیوئیدی القا تقویت طولانی مدت (LTP) را در مسیر فیبرهای خزه‌ای به ناحیه CA3 و

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: apourmotabbed@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

Archive of SID
www.SID.ir

همچنین در مسیر lateral perforant به ناحیه CA3، بلوک نموده و همزمان یادگیری در ماز آبی را مختل می‌نماید [۲۳]. گیرنده‌های NMDA در نواحی مختلف مغز به صورت گسترده‌ای پراکنده شده اند. بطور کلی تراکم این گیرنده‌ها در هسته‌های قاعده‌ای جانبی آمیگدال بالا بوده اما بیشترین تراکم آنها در ناحیه CA1 هیپوکامپ گزارش شده است [۹]. همچنین گزارش شده تجویز MK-801 در مقادیری که باعث بلوک LTP هیپوکامپی می‌شود، می‌تواند کارآیی موشهای صحرایی را در ماز شعاعی مختل نماید [۹]. از طرف دیگر مطالعات گذشته پیشنهاد می‌دهند که عملکرد متقابل بین گیرنده‌های NMDA، مرفین و پپتیدهای اپیوئیدی در شکل‌گیری حافظه حائز اهمیت می‌باشد [۹]. به هر حال فعال شدن گیرنده‌های NMDA باعث ورود یون کلسیم به درون سلول پیرامیدال هیپوکامپ شده و به نظر می‌رسد قسمتی از روند تثبیت حافظه ناشی از افزایش کلسیم درون سلولی باشد [۷]. اما افزایش کلسیم درون سلولی از چه طریقی باعث شکل‌گیری حافظه می‌شود؟ چندین سیستم آنزیمی حساس به کلسیم معرفی شده‌اند که می‌توانند به عنوان مکانیسمهای درون سلولی افزایش کارآیی سیناپسی در نظر گرفته شوند. این مکانیسمهای احتمالی شامل پروتئازها، فسفاتازها (نظیر کلسی نورین)، فسفولیپازها و پروتئین کینازها می‌باشند [۷]. در این بین بیشترین توجه معطوف تسلسلهای فسفوریلاسیون وخصوصا پروتئین کینازها [۷] شامل PKC [۲۱]، پروتئین کیناز وابسته به کمپلکس کلسیم-کالمودولین [۱۸]، PKA [۲۵]، پروتئین تیروزین کیناز [۲۱] می‌باشد. شاید در این میان بیشترین نقش را بتوان به کمپلکس کلسیم-کالمودولین نسبت داد، چرا که گزارش شده تزریق این کمپلکس به درون نورونهای پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ باعث القا تقویت سیناپسی می‌شود. کلسیم-کالمودولین آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) را فعال می‌کند [۱۸]. لذا نیتریک اکساید (NO) می‌تواند در فرآیند تقویت متاثر از کلسیم-کالمودولین نقش داشته باشد [۱۸]. در مطالعات قبلی ما مشخص شد که ایجاد وابستگی خوراکی به مرفین باعث القا LTP تشدید شده در ناحیه CA1 هیپوکامپ [۲۶] و تقویت روند یادگیری و حافظه فضایی موشهای صحرایی [۱] می‌شود که در هر دو مورد AP5 اثرات ایجاد شده را آنتاگونیزه نمود [۲ و ۲۶]. از آنجا که مکانیسم یا مکانیسمهای درون سلولی حاصل از فعال شدن گیرنده‌های NMDA ناشی از وابستگی خوراکی به مرفین مشخص نیست، لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی نقش نیتریک اکساید در این رابطه طراحی گردید.

مواد و روشها

در این تحقیق از موشهای صحرائی نر نژاد N-MRI در محدوده وزنی ۳۵۰- ۲۵۰ گرم، تهیه شده از موسسه رازی کرج استفاده شد. حیوانات در قفسهای ۲ تایی با سیکل تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته و در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد قرار داشتند. حیوانات به استثناء زمان آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. در هر سری آزمایش ۷ تا ۱۰ سر حیوان مورد استفاده قرار گرفت.

برای تزریق دارو در ناحیه CA1 هیپوکامپ، کانول راهنما در داخل جمجمه حیوان قرار داده شد. به این منظور، حیوانات توسط داروی کتامین (۷۰ mg/kg) و زایلازین (۴ mg/kg) (داخل صفاقی) بیهوش می‌شدند [۳۲]. سپس موی سر موشها چیده شده و حیوانات در داخل دستگاه استریوتاکس قرار داده می‌شدند، و کانولهای راهنما در فاصله ۰/۷ میلیمتری بالای ناحیه CA1 هیپوکامپ با استفاده از سرسوزن شماره ۲۲ و بر طبق اطلس پاکسینوس [۲۴] در مختصات ۳/۸ میلیمتر پایین تر از برگما، ۲/۲± میلیمتر از خط وسط و ۲/۵ میلیمتر از سطح جمجمه قرار داده می‌شد. اطراف کانول فوق در سطح جمجمه با استفاده از سیمان دندانپزشکی و یک عدد پیچ عینک محکم گردید. در طی روزهای آزمایش، هر روز یک دقیقه قبل از شروع آزمایشها در ماز آبی موریس، تزریق از طریق کانول راهنما و توسط سرنگ هامیلتون ۱ میکرولیتری که متصل به ۱۵ سانتی متر لوله پلی اتیلن و کانول تزریق بود انجام می‌شد. کانول تزریق از سر سرنگ دندانپزشکی شماره ۲۷ ساخته شده بود و طوری بریده شده بود که هنگامی که در داخل کانول راهنما قرار می‌گرفت ۰/۷ میلیمتر از سر کانول بیرون بیاید و مواد به راحتی در محل مورد نظر تزریق و منتشر شود (یک میکرولیتر در هر طرف در مدت ۳۰ ثانیه). پس از تزریق، سرنگ به مدت یک دقیقه در محل تزریق باقی می‌ماند تا مایع بطور کامل به فضاهای بافتی نفوذ کند، سپس کانول به آرامی از محل خارج می‌شد.

Archive of SID
www.SID.ir

مدل ماز آبی موریس (MWM) یک مدل اختصاصی برای بررسی یادگیری و حافظه وابسته به هیپوکامپ می‌باشد [۶]. این روش با توجه به توانائی هایش برای تفکیک نقص‌های ایجاد شده در تشکیلات حافظه از نقص‌های حسی، حرکتی، هیجانی و بازیابی، نسبت به دیگر روش‌های مطالعه نوروشیمیایی یادگیری و حافظه مزایای بیشتری دارد [۲۲]. MWM از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ با قطر داخلی ۱۴۰cm و ارتفاع ۸۰cm تشکیل شده که تا ارتفاع ۳۵cm با آب ۲±۲۰ سانتیگراد پر شده بود. یک سکوی کوچک از جنس پلکسی گلاس شفاف با قطر ۱۰ cm که یک سانتی متر زیر آب است در مرکز ربع دایره جنوب غربی حوضچه قرار گرفت. هر موش به مدت ۵ روز و هر روز یک بلوک (هر بلوک شامل ۴ کارآزمایی) مورد آزمایش قرار می‌گرفت که موقعیت سکو در طول ۴ روز ابتدای آزمایش ثابت بود. در هر کارآزمایی حیوان به طوری که صورتش رو به دیوار حوضچه باشد، از یکی از چهار نقطه (شمال، جنوب، شرق یا غرب) در آب رها می‌شد. هر یک از چهار نقطه شروع در هر بلوک یک بار استفاده می‌شد و ترتیب آنها به صورت تصادفی توسط کامپیوتر تعیین می‌گردید. یک کارآزمایی زمانی تمام می‌شد که موش بر روی سکو رفته و یا بدون یافتن سکو ۶۰ ثانیه سپری شده باشد. سه کارآزمایی دیگر به همین ترتیب صورت می‌گرفت. یک فرستنده نور مادون قرمز به موش متصل شده و مسیر حرکت حیوان از طریق یک دوربین مدار بسته که نور مادون قرمز را ردیابی می‌کرد به کامپیوتر انتقال می‌یافت. در طی چهار روز اول، از ویژگیهای مدت زمان لازم (escape latency) و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان و سرعت شنای حیوانات به عنوان شاخصه‌های یادگیری فضایی استفاده شد. بر این اساس چنانچه حیوانات در روز آخر آموزش نسبت به روز اول بتوانند سکوی پنهان در آب را در طی مدت زمان و مسافت کمتری پیدا نمایند روند یادگیری فضایی در آنها مثبت ارزیابی می‌شود. مرحله probe trial: آزمایشات روز پنجم جهت بررسی دقت و صحت یادگیری اولیه انجام می‌گرفت. در این مرحله از آزمایش، سکو از حوضچه خارج شده و حیوان طی یک بلاک (شامل ۴ کارآزمایی) اما فقط از یکی از نقاط فوق الذکر (که توسط کامپیوتر تعیین می‌شد) در آب رها می‌گردید. مدت زمان سپری شده توسط حیوان در ربع دایره هدف (ربع دایره‌ای که در طی روزهای آموزش سکو در آن قرار داشت) بوسیله کامپیوتر ثبت و آنالیز می‌گردید. بدیهی است چنانچه فرآیند تثبیت حافظه فضایی اتفاق افتاده باشد حیوانات باید بیشترین حضور را در ربع دایره‌ای داشته باشند که در روزهای آموزش سکو در آن قرار داشت (ربع دایره هدف) [۱ و ۲].

آزمایشها در اتاق نیمه تاریک انجام می‌شد که علائم قابل روئیتی از قبیل کامپیوتر، قفسه ها، ساعت، پرده ها، پنجره‌ها و... در آن وجود داشت و حیوان با استفاده از علائم خارج مازی، موقعیت سکوی پنهان را پیدا کرد.

در گروههای وابسته، ایجاد وابستگی به مرفین با الگوی زیر انجام گرفت: مرفین سولفات (تماد ایران) به ترتیب ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی گرم در میلی لیتر، هر یک به مدت ۴۸ ساعت و ۰/۴mg/ml در طی روزهای بعد تا روز ۳۰ ام در آب آشامیدنی حیوان اضافه می‌شد. به منظور پوشانیدن طعم تلخ مرفین سولفات، سوکروز (۴۰ gr/lit) به آب آشامیدنی اضافه شد. در طی مطالعات مقدماتی، مقدار متوسط دریافت آب و بنابراین مرفین سولفات در بالاترین دوز (۰/۴mg/ml) اندازه‌گیری شد که $۱۳۷\pm۲ mg\ kg^{-1}day^{-1}$ بود. حیوانات گروه شاهد بطور مشابه فقط تحت تجویز خوراکی سوکروز (۴۰ gr/lit) به مدت ۳۰ روز قرار گرفتند [۴].

حیوانات پس از عملیات کانول گذاری و طی دوره بهبودی به مدت ۵ روز، بطور تصادفی در ۴ گروه تقسیم شدند: ۱- گروه سوکروز-سالین: موشهای این گروه در آب آشامیدنی خود سوکروز دریافت می‌کردند و در هر طرف ناحیهCA1 هیپوکامپ آنها یک میکرولیتر سرم فیزیولوژی تزریق می‌شد. ۲- گروه سوکروز-L-NAME: حیوانات این گروه در آب آشامیدنی خود سوکروز دریافت می‌کردند و در هر طرف ناحیه CA1 هیپوکامپ، ۱/۵ میکروگرم L-NAME (مهار کننده غیر انتخابی آنزیم NOS) در حجم کل ۱ میکرولیتر سالین (جمعا ۳ میکروگرم L-NAME در حجم کل ۲ میکرولیتر در دو طرف) تزریق می‌شد [۱۶]. ضمنا در مطالعات مقدماتی از دوزهای مختلف (۳-۰/۵ میکروگرم) L-NAME استفاده شد که بهترین پاسخ در دوز ۱/۵ میکروگرم حاصل شد. ۳- گروه مرفین-سالین: حیوانات این گروه در آب آشامیدنی خود مرفین دریافت می‌کردند و در هر طرف ناحیهCA1 هیپوکامپ یک میکرولیتر سرم فیزیولوژی تزریق می‌شد. ۴- گروه مرفین-L-NAME: موشهای این گروه در آب آشامیدنی خود مرفین سولفات دریافت

Archive of SID
www.SID.ir

می‌کردند و در هر طرف ناحیه CA1هیپوکامپ ۱/۵میکروگرم L-NAME در حجم یک میکرولیتر تزریق می‌شد. لازم به ذکر است که تعداد ۱۱ سر موش در گروههای مختلف به علل مرگ و میر و یا کنده شدن کانول‌ها در مراحل مختلف حذف شدند.

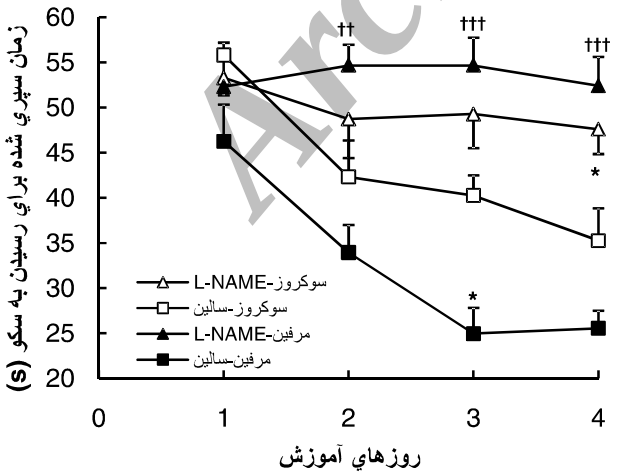
پس از انجام آزمایشات و در روز سی ام، یک میکرولیتر متیلن بلو در کانولها تزریق می‌شد، سپس هر حیوان با تجویز دوز بسیار زیاد داروی بیهوشی کشته می‌شد (لذا نکات اخلاقی به طور کامل رعایت شد)، سپس مغز آنها خارج گشته و پس از فیکس شدن در محلول فرمالین ۱۰٪ جهت تایید محل تزریق برش داده و رنگ آمیزی می‌شد. تنها نتایج حاصل از نمونه هایی که محل کانول در آنها تایید می‌شد در بررسی‌های آماری مورد استفاده قرار می‌گرفت.

نتایج با آزمون آنالیز واریانس یکطرفه One-way ANOVA; variable: day و دو طرفه Two-way ANOVA with repeated measure; variable: experimental groups, day مورد بررسی قرار گرفت و در مواقعی که اختلاف معنی دار بود، آزمون Tukey انجام گردید. P<0.05 به عنوان معیار معنی دار بودن اختلاف بین گروههای مورد آزمایش در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

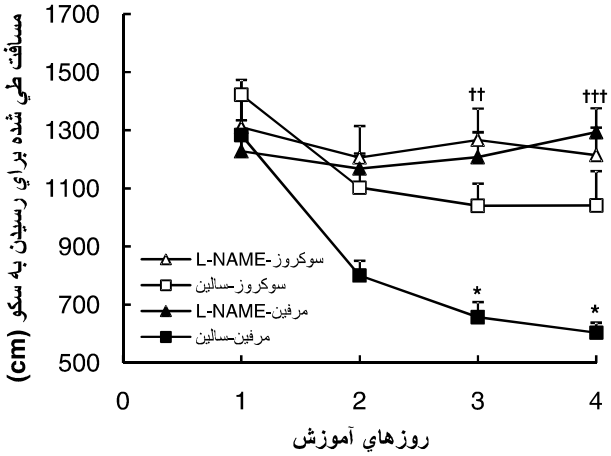
برای بررسی فرآیند یادگیری در طی روزهای آموزش، نتایج حاصل از میانگین زمان سپری شده برای رسیدن به سکو (escape latency)، میانگین مسافت طی شده برای رسیدن به سکو و میانگین سرعت شنای حیوانات در روزهای آموزش مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بطور کلی در شاخصه میانگین زمان سپری شده برای رسیدن به سکو در بین روزهای آموزش در گروههای سوکروز–L-NAME [$F_{(3,27)}$=0.9486, P=0.4310] و مرفین–L-NAME [$F_{(3,21)}$=0.1848, P=0.9055] تفاوتی وجود ندارد. اما در گروه سوکروز–سالین [$F_{(3,21)}$=8.2638, P=0.0008] و مرفین–سالین [$F_{(3,18)}$=13.3617, P=0.0000] بین روزهای آموزش تفاوت وجود دارد. تفاوت مذکور در گروه سوکروز–سالین بین روز اول با روزهای دوم (P<0.05)، سوم (P<0.01) و چهارم (P<0.001) آموزش معنی دار است. همچنین در گروه مرفین–سالین نیز تفاوت بین روز اول با روزهای دوم (P<0.05)، سوم و چهارم (P<0.001) آموزش معنی دار است. همچنین بررسی نتایج حاصل از میانگین زمان لازم برای رسیدن به سکو نشان داد که بطور کلی بین گروههای آزمایش [$F_{(3,29)}$=19.5909, P=0.0000]، روزهای آزمایش [$F_{(3,87)}$=12.5533, P=0.0000] و برهمکنش گروهها و روزها [$F_{(9,87)}$=3.0998, P=0.0028] تفاوت وجود دارد. آنالیز Post hoc نشان داد این تفاوت بین گروههای سوکروز–سالین و مرفین–سالین در روز سوم (P<0.05) معنی دار است. همچنین تفاوت بین گروههای مرفین–سالین و مرفین–L-NAME در روزهای دوم (P<0.01)، سوم و چهارم (P<0.001) معنی دار است. از طرف دیگر این تفاوت بین گروههای سوکروز–سالین و سوکروز–L-NAME در روز چهارم (P<0.05) معنی دار است. اما تفاوت بین گروههای سوکروز–L-NAME و مرفین–L-NAME درهیچکدام از روزهای آموزش معنی دار نیست (شکل ۱).

بطور کلی بین میانگین مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در بین روزهای آموزش در گروه سوکروز–L-NAME [$F_{(3,27)}$=0.5488, P=0.6532] و مرفین–L-NAME [$F_{(3,21)}$=0.3914, P=0.7604] تفاوت معنی داری مشاهده نمی‌شود. اما این تفاوت در گروه سوکروز–سالین [$F_{(3,21)}$=3.6722, P=0.0285] و مرفین–سالین [$F_{(3,18)}$=18.5295, P=0.0000] معنی دار است. تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد تفاوت مذکور در گروه سوکروز–



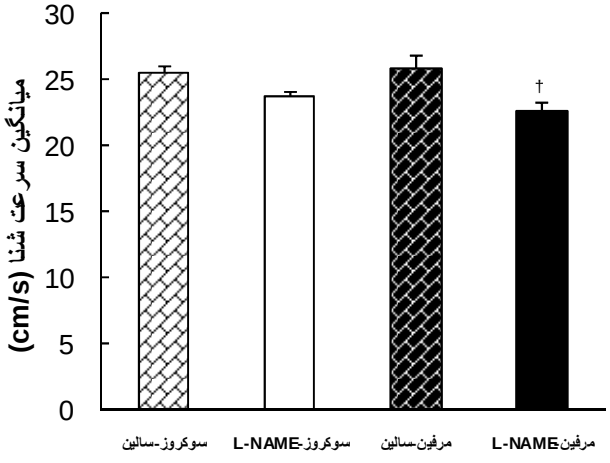
شکل ۱– مقایسه زمان سپری شده برای رسیدن به سکو (Escape latency) در چهار گروه مورد مطالعه در طی روزهای آموزش (۱۰-۷ =n) P<0.05 * نسبت به گروه سوکروز–سالین و ††P<0.01 و †††P<0.001 نسبت به گروه مرفین–سالین

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- مقایسه مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در چهار گروه مورد مطالعه در طی روزهای آموزش (n= ۷-۱۰). P<0.05 *نسبت به گروه سوکروز-سالین و P<0.01†† و P<0.001††† نسبت به گروه مرفین-سالین

سالین بین روز اول با روزهای سوم و چهارم (P<0.05) آموزش معنی دار است. این تفاوت در گروه مرفین-سالین بین روز اول با روزهای دوم، سوم و چهارم (P<0.001) آموزش معنی دار است. از طرف دیگر بررسی نتایج حاصل از میانگین مسافت طی شده برای رسیدن به سکو نشان داد که بطور کلی تفاوت بین گروههای آزمایش [$F_{(3,29)}$=8.6472, P=0.0002]، روزهای آزمایش [$F_{(3,87)}$=10.7287, P=0.0000] و برهمکنش گروهها و روزها [$F_{(9,87)}$=3.2467, P=0.0019] وجود دارد. آنالیز Post hoc نشان داد این تفاوت بین گروههای سوکروز-سالین و مرفین-سالین در روزهای سوم و چهارم معنی دار (P<0.05) است. همچنین تفاوت بین گروههای مرفین-سالین و مرفین-L-NAME در روزهای سوم (P<0.01) و چهارم (P<0.001)



شکل ۳- مقایسه میانگین سرعت شنای حیوانات در چهار گروه آزمایش در طی روزهای آموزش (n= ۷-۱۰). P<0.05 † نسبت به گروه مرفین-سالین

معنی دار است. اما تفاوت بین گروههای سوکروز-L-NAME و مرفین-L-NAME در هیچکدام از روزهای آموزش معنی دار نیست (شکل۲).

میانگین سرعت شنای حیوانات در مجموع چهار روز آموزش با یکدیگر مقایسه شد. نتایج نشان می‌دهد که کاهش سرعت معنی داری (P<0.05) در گروه مرفین-L-NAME نسبت به گروه مرفین-سالین وجود دارد (شکل۳).

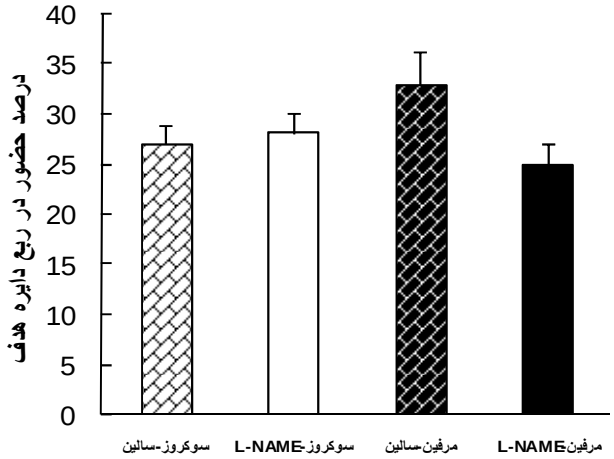
به منظور بررسی روند تثبیت حافظه، درصد حضور حیوانات در ربع دایره هدف (ربع دایره‌ای که در طی روزهای آموزش سکو در آن قرار داشت) در مرحله probe trial بررسی شد. نتایج نشان داد هر چند درصد حضور حیوانات در ربع دایره هدف در گروه مرفین-سالین بیشتر از سایر گروهها می‌باشد، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار نیست (شکل۴).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مهار آنزیم NOS در ناحیه CA1 هیپوکامپ، یادگیری و حافظه فضایی در موشهای صحرایی نر وابسته به مرفین را در مدل ماز آبی موریس سرکوب می‌کند.

در این تحقیق، وابستگی به مرفین با تجویز خوراکی ایجاد شد. در این روش مرفین به آب آشامیدنی حیوانات اضافه می‌شود. ایجاد پدیده وابستگی در این روش در تجربیات قبلی اثبات شده است [۱ و ۲].

نتایج حاصل از گروه سوکروز-سالین نشان دهنده ایجاد



شکل ۴- مقایسه درصد حضور حیوانات در ربع دایره هدف در مرحله Probe trial در گروههای مورد مطالعه (n= ۷-۱۰)

www.SID.ir

یادگیری فضایی در این گروه است، زیرا کاهش معنی داری در زمان پیدا کردن سکوی پنهان در آب و مسافت طی شده برای رسیدن به آن در روز چهارم آموزش نسبت به روز اول ایجاد شد. این نتایج موافق تجربیات قبلی است و نشان دهنده توانایی حیوانات برای یادگیری فضایی در ماز آبی موریس می‌باشد [۱ و ۲ و ۲۲]. البته این اثر می‌تواند ناشی از تجویز سوکروز باشد. اما به هر حال با توجه به اینکه کلیه گروههای آزمایش سوکروز دریافت نموده و تحت کانول گذاری مشابه قرار گرفته اند، لذا می‌توان اثر کانول گذاری و تجویز سوکروز را توسط اطلاعات حاصل از گروه حاضر خنثی نموده و از این گروه به عنوان شاهد سایر گروهها استفاده نمود.

قسمت دیگری از نتایج این مطالعه نشان داد که مهار آنزیم NOS در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه سوکروز–L-NAME یادگیری را سرکوب می‌نماید. به طوری که تفاوت معنی داری بین زمان و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو بین روزهای آموزش در گروه مذکور وجود ندارد. از طرف دیگر مقایسه پارامترهای فوق الذکر بین دو گروه سوکروز–سالین و سوکروز L-NAME نشان می‌دهد که در روزهای دوم، سوم و چهارم آموزش میزان یادگیری توسط تجویز L-NAME کاهش یافته است. این کاهش در روز چهارم در مورد خصیصه زمان لازم برای یافتن سکو کاملاً معنی دار است. این نتایج بر نقش سیستم نیتریک اکساید در ناحیه CA1 هیپوکامپ در فرآیند یادگیری فضایی دلالت دارد. در تایید یافته‌های این بخش از تحقیق، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند نیتریک اکساید بر اعمال شناختی حیوان دلالت دارد و مطرح کننده ارتباط و درگیری سیستم نیتریک اکساید در تقویت طولانی مدت (LTP) هیپوکامپی، تغییر شکل پذیری سیناپسی و متعاقب آن یادگیری و حافظه می‌باشد [۸ و ۱۸]. در همین رابطه نتایج مطالعه‌ای نشان داد که با مهار آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در شرایط invivo یادگیری معیوب می‌شود [۳]. همچنین مشخص شده که تزریق پس سیناپسی کلسیم–کالمودولین به درون نورونهای هرمیCA1 باعث القا تقویت سیناپسی می‌شود. کلسیم–کالمودولین آنزیم نیتریک اکساید سنتاز را برای تولید نیتریک اکساید فعال می‌کند و NO در تقویت متاثر از کلسیم–کالمودولین نقش دارد [۱۸]. از طرف دیگر بررسی مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف در مرحله probe trial نشان داد که تجویز L-NAME در روند تثبیت این نوع حافظه در ناحیه CA1 هیپوکامپ نقش ندارد. در رابطه با عدم تاثیر مهار NOS در مرحله probe trial، باید گفت که اگر چه بیشتر مطالعات نشان می‌دهند که مهار NOS باعث ایجاد اختلال در شکل‌گیری یادگیری فضایی در ماز آبی موریس می‌شود، ولی این اثرات ماهیت گذرایی دارد و عملکرد حیوانات در مرحله probe trial تحت تاثیر مهار NOS قرار نمی‌گیرد. بنابراین به نظر می‌رسد که NO در شکل‌گیری یادگیری موثر باشد و تاثیری بر تثبیت حافظه ندارد [۸].

همچنین بخش دیگری از نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ایجاد وابستگی خوراکی به مرفین (در گروه مرفین–سالین) سبب تقویت یادگیری و حافظه فضایی در موشهای صحرایی می‌شود، بطوری که زمان لازم و مسافت طی شده برای یافتن سکو در روز چهارم آموزش نسبت به روز اول کاهش معنی داری را در این گروه نشان می‌دهد. از طرف دیگر تجویز مرفین سبب کاهش معنی داری در میانگین زمان پیدا کردن سکوی پنهان و مسافت طی شده برای یافتن آن در مقایسه با گروه سوکروز–سالین در روزهای آموزش شد، همچنین در روز پنجم (probe trial) حیوانات زمان بیشتری را در ربع دایرهٔ هدف نسبت به تمام گروههای آزمایش سپری کردند هر چند که این افزایش زمان از لحاظ آماری معنی دار نبود. این نتایج با نتایج مطالعات قبلی ما [۱ و ۲ و ۲۶] و محققین دیگر [۱۳ و ۲۷ و ۲۸] در شرایط in vivo و in vitro مطابقت دارد و موید اثر مثبت وابستگی خوراکی به مرفین بر فرآیندهای یادگیری و حافظه فضایی می‌باشد.

از طرف دیگر نتایج قسمت اصلی تحقیق حاضر نشان می‌دهد که مهار آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در ناحیه CA1 هیپوکامپ توسط L-NAME، اثرات وابستگی به مرفین بر فرآیندهای یادگیری و حافظه فضایی را از بین می‌برد. به طوری که در شاخصه‌های زمان لازم و مسافت طی شده برای یافتن سکو بین روزهای آموزش در گروه مرفین–L-NAME تفاوت آماری وجود ندارد. از طرف دیگر زمان و مسافت طی شده برای یافتن سکو در گروه مرفین–L-NAME نسبت به گروه مرفین–سالین در تمام روزهای آموزش به طور معنی داری بیشتر است. اثر تجویز L-NAME در مرحله probe trial نیز به طور جزیی دیده می‌شود. در این رابطه باید گفت که شواهد زیادی در تأیید

Archive of SID

www.SID.ir

نقش نیتریک اکساید در خواص پاداشی ناشی از اپیوئیدها وجود دارد [۳۱]. همچنین گزارشاتی وجود دارد که فعال شدن گیرنده‌های NMDA و مسیرهای پیامبری متعاقب آن نقش کلیدی در تحمل، وابستگی و ترک اعتیاد اپیوئیدی بازی می‌کند [۱۰ و ۲۹]. از طرف دیگر گزارش شده که تحمل به مرفین در ناحیهCA1 هیپوکامپ به فعالیت سیستم نیتریک اکساید وابسته است [۱۹]. همچنین گیرنده‌های NMDA نقش ثابت شده‌ای در فرآیند شکل پذیری سیناپسی بطور کلی، و همچنین شکل پذیری سیناپسی مرتبط با اپیوئیدها و فرآیندهای درگیر با یادگیری و حافظه دارند. بطوری که فعال شدن گیرنده μ اپیوئیدی سبب ورود کلسیم از طریق کانال گیرنده NMDA می‌شود [۲۹]. برخی شواهد حاکی از آن است که مرفین می‌تواند از طریق تحریک گیرنده μ اپیوئیدی، کلسیم آزاد درون سلول را افزایش داده و نهایتا منجر به هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول و تشکیل اینوزیتول و متعاقب آن آزاد سازی کلسیم از ذخایر درون سلول شود. بدیهی است که افزایش کلسیم درون سلولی ناشی از مرفین می‌تواند سبب فعال سازی انواعی از تسلسلهای پیامبر ثانویه وابسته به کلسیم، نظیر فعال سازی کیناز وابسته به کلسیم گردد. در این رابطه مشخص شده که پروتئین کیناز II وابسته به کلسیم-کالمودولین (CaMkII) در تنظیم سیگنالینگ گیرنده‌های اپیوئیدی درگیر است. Lou و همکاران در تحقیقی نشان دادند که تیمار حاد و مزمن با مرفین می‌تواند به طور مؤثری فعالیت CaMkII در هیپوکامپ را تعدیل نماید. مهار CaMkII تحمل به مرفین را کاهش می‌دهد. این پروتئین کیناز نقش مهمی در فسفوریلاسیون گیرنده‌های اپیوئیدی دارد [۲۰]. از طرفی CaMkII سبب فعال شدن NOS و افزایش تولید نیتریک اکساید می‌گردد. NO می‌تواند به عنوان یک پیامبر پس نورد در تقویت طولانی مدت هیپوکامپی عمل نماید و یا با اثر موضعی بر نورونهای پس سیناپسی با نیتروزیله کردن و یا اکسید نمودن مستقیم پروتئین‌ها در تقویت سیناپسی ناشی از کلسیم-کالمودولین سهیم باشد. همچنین CaMKII در طی فرآیند القا LTP با تحریک سنتز NO سبب فسفوریلاسیون گیرنده‌های AMPA می‌شود [۱۸]. از طرف دیگر بیان شده که تجویز آنتاگونیست گیرنده NMDA با ممانعت از تشکیل NO مانع تولید cGMP در مغز شده و نهایتا باعث تخریب حافظه می‌شود [۱۴].

نتایج بخش دیگری از مطالعات حاضر در رابطه با سرعت شنای حیوانات نشان داد که وابستگی به مرفین تاثیر معنی داری بر سرعت شنای حیوانات ندارد. همچنین مهار آنزیم NOS در ناحیه CA1 نیز به خودی خود بر این فرآیند بی تاثیر است اما مهار آنزیم مذکور در حیوانات وابسته سرعت شنا را کاهش داد.

بی اثر بودن تجویز مرفین بر فعالیتهای حرکتی حیوانات قبلا نیز در مطالعه‌ای که با تجویز داخل بطنی مرفین انجام شده [۱۵] و همچنین در تجربیات قبلی ما که با ایجاد وابستگی خوراکی به مرفین همراه بوده [۲] گزارش شده است. در صورتیکه برخی مطالعات دیگر نشان می‌دهند که تجویز دوزهای بالای مرفین (۵۰mg/kg, i.p. و ۲۰)، باعث افزایش فعالیت حرکتی می‌شود [۳۰] و برخی مطالعات نیز کاهش فعالیت حرکتی را در اثر تجویز مرفین نشان می‌دهد. تناقض در نتایج حاصله به سادگی قابل توضیح نیست ولی ممکن است بر اثر تفاوت در دوز و یا فواصل زمانی تجویز مرفین باشد [۱۵]. از طرف دیگر سیستم نیتریک اکساید در ناحیه CA1 هیپوکامپ به خودی خود تاثیر معنی داری بر فعالیتهای حرکتی ندارد، لازم به ذکر است که تجویز L-NAME به هسته آکومبنس [۱۱] و یا تگمنتوم شکمی [۱۲] نیز تاثیری بر فعالیت حرکتی حیوانات ندارد. اما تجویز آن به طور توأم با مرفین می‌تواند فعالیتهای حرکتی و سرعت شنا را در حیوانات تضعیف نماید که به نظر می‌رسد این اثر ناشی از تداخل عمل L-NAME با اثرات ناشی از مرفین در مهار فرآیندهای حرکتی حیوانات باشد [۱۲ و ۱۷]. این اثر همچنین ممکن است ناشی از اثر مهار NOS و تداخل آن با مرفین در کاهش ترشح دوپامین باشد [۳۰]. بنابراین به نظر می‌رسد در کاهش فعالیت‌های حرکتی در حیوانات گروه مرفین-L-NAME نسبت به گروه مرفین-سالین، سیستم دوپامینرژیک دخیل باشد.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان دهنده آن است که وابستگی خوراکی به مرفین، یادگیری و حافظه فضایی در موشهای صحرایی را تقویت می‌کند، ولی تاثیر معنی داری بر فعالیتهای حرکتی حیوانات ندارد. از آنجا که این اثرات تقویتی با کاربرد موضعی L-NAME در ناحیه CA1 هیپوکامپ مهار گردید، بنابر این سیستم نیتریک اکساید می‌تواند در تقویت یادگیری فضایی ناشی از مرفین در موشهای صحرایی موثر باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی

این مقاله موضوع قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب حوزه معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد که بدینوسیله از حمایت مالی مسئولین حوزه مذکور نهایت تشکر را دارد.

منابع

[۱] پورمتعبد علی، طهماسیان مسعود، شاهی مریم، کرمی دارابخانی حسین، فتح الهی یعقوب، اثر وابستگی به مرفین بر یادگیری و حافظه فضایی در موش صحرایی نر. فیزیولوژی و فارماکولوژی ۹ (۲) (۱۳۸۴) ۱۲۷ تا ۱۳۷.

[۲] پورمتعبد علی، ندایی سید ارشاد، محرابی نسب انتظار، ارزیابی نقش گیرنده‌های NMDA موجود در ناحیه CA1 هیپوکامپ بر اثرات وابستگی خوراکی به مرفین در یادگیری و حافظه فضایی موش صحرایی. فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۰ (۲) (۱۳۸۵) ۱۱۵ تا ۱۲۳.

[۳] کرمی منیژه، صحرایی هدایت، زرین دست محمد رضا، سپهری حوری، تاثیر تحریک آنزیم نیتریک اکساید سینتاز در هسته مرکزی آمیگدالا بر شرطی شدن القایی مرفین در موش آزمایشگاهی. مجله پزشکی کوثر ۹ (۱۳۸۳) ۹۵ تا ۱۰۰.

[4] Badawy AA, Evans CM, Evans M, Production of tolerance and physical dependence in the rat by simple administration of morphine in drinking water. ***Br J Pharmacol*** 75 (1982) 485-491.

[5] Baker KB, Kim JJ, Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. ***Learn Memory*** 9 (2) (2002) 58-65.

[6] Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C, Task solving by procedural strategies in the Morris water maze. ***Physiol Behav*** 78 (2003) 785-793.

[7] Bliss TVP, Collingridge GL, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. ***Nature*** 361 (1993) 31-39.

[8] Blokland A, Vente J, Prickaerts J, Local inhibition of hippocampal nitric oxide synthase dose not impair place learning in the Morris water escape task in rats. ***Eur J Neurosci*** 11 (1999) 223-232.

[9] Castellano C, Cestari V, Ciamei A, NMDA receptors and learning and memory processes. ***Curr Drug Targets*** 2 (2001) 273-283.

[10] Gabra BH, Afify EA, Daabees TT, Abou Zeit-Har MS, The role of the NO/NMDA pathways in the development of morphine withdrawal induced by naloxone in vitro. ***Pharmacol Res*** 51 (2005) 319-327.

[11] Gholami A, Haerri-Rohani A, Sahraei H, Zarrindast MR, Nitric oxide mediation of morphine induced place preference in the nucleus accumbens of rat. ***Eur J Pharmacol*** 449 (2002) 269-277.

[12] Gholami A, Zarrindast MR, Sahraei H, Haerri-Rohani A, Nitric oxide within the ventral tegmental area is involved in mediating morphine reward. ***Eur J Pharmacol*** 458 (2003) 119-128.

[13] Harrison JM, Allen RG, Pellegrino MJ, Williams JT, Manzoni OJ, Chronic morphine treatment alters endogenous opioid control of hippocampal mossy fiber synaptictransmission. ***J Neurophysiol*** 87 (2002) 2464-2470.

[14] Jafari-Sabet M, Zarrindast MR, Rezayat M, Rezayof A, Djahanguiri B, The influence of NMDA receptor antagonist on morphine state–dependent memory of passive avoidance in rat. ***Life Sci*** 78 (2005) 157-163.

[15] Kahveci N, Gulec G, Ozluk K, Effects of intracerebroventricularly-injected morphine on anxiety, memory retrieval and locomotor activity in rats: Involvement of vasopressinergic system and nitric oxide pathway. ***Pharmacol Biochem Be*** 85 (2006) 859-867.

[16] Karami M, Zarrindast MR, Sepehri H, Sahraei H, Role of nitric oxide in the rat hippocampal CA1 area on morphine-induced conditioned place preference. ***Eur J Pharmacol*** 449 (2002)113-119.

[17] Kivastik T, Rutkauskaite J, Zhakovsky A, Nitric oxide synthesis inhibition attenuates morphine-induced place preference. ***Pharmacol Biochem Be*** 53 (1996) 1013-1015.

[18] Ko GY, Kelly PT, Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. ***Neuroscience*** 16 (1999) 6784-6794.

[19] Langroudi RM, Khoshnoodi MA, Abadi NY, Effect of cyclosporine A on morphin-induced place conditioning in mice: involvement of nitric oxide. ***Eur J Pharmacol*** 507 (1-3) (2005) 107-115.

[20] Lou L, Zhou T, Wang P, Pei G, Modulation of ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II activity by acute and chronic morphine administration in rat

Archive of SID

www.SID.ir

M, Kazemnejad A, Dependence on morphine leads to a prominent sharing among the different mechanisms of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. ***Brain Res*** 963 (1-2) (2003) 93-100.

[28] Shiigi Y, Takahashi M, Kaneto H, Facilitation of memory retrieval by pretest morphine mediated by mu but not delta and kappa opioid receptors. ***Psychopharmacology*** 102 (1990) 329-332.

[29] Yukihiro N, Toshitaka N, Opiate physical dependence and N-methyl-D-aspartate recptors. ***Eur J Pharmacol*** 500 (2004) 121-128.

[30] Zarrindast MR, Gholami A, Sahraei H, Haeri-Rohani A, Role of nitric oxide in the acquisition and expression of apomorphine- or morphine-induced locomotor sensitization. ***Eur J Pharmacol*** 482 (2003) 205-213.

[31] Zarrindast MR, Karami M, Sepehri H, Sahraei H, Influence of nitric oxide on morphine induced conditioned place preference in the rat centeral amygdale. ***Eur J Pharmacol*** 453 (2002) 81-89.

[32] Zimmer MB, Goshgarian HG, GABA, not glycine, mediates inhibition of latent respiratory motor pathways after spinal cord injury. ***Exp Neurol*** 203 (2) (2007) 493-501.

hippocampus: differential regulation of α and β isoforms. ***Mol Pharmacol*** 55 (3) (1999) 557-563.

[21] Mac Donald JF, Kotecha SA, LU WY, Jackson MF, Convergence of PKC-dependent kinase signal cascades on NMDA receptors. ***Curr Drug Targets*** 2 (2001) 299-312.

[22] Mc Namara RK, Skelton RW, The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. ***Brain Res Rev*** 18 (1993) 33-49.

[23] Meilandt WJ, Barea-Rodriguez E, Harvey SAK, Martinez JR, Role of Hippocampal CA3 μ-Opioid Receptors in Spatial Learning and Memory. ***J Neurosci*** 24 (12) (2004) 2953-2962.

[24] Paxinos G, Watson C, editors. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1986.

[25] Poser S, Storm DR, Role OF Ca^{2+}-stimulated adenylyl cyclase in LTP and memory formation. ***Int J Dev Neurosci*** 19 (2001) 387-394.

[26] Pourmotabbed A, Motamedi F, Fathollahi Y, Mansouri FA, Semnanian S, Involvement of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels on augmentation of long-term potentiation in hippocampal CA1 area of morphine dependent rats. ***Brain Res*** 804 (1998) 125-134.

[27] Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnanian S, Shafizadeh

Archive of SID

www.SID.ir