Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۲)، ۲۱۰ – ۲۲۰
تابستان ۱۳۹۰

برهمکنش کلشی سین و نیتریک اکساید ناحیه CA1 در بیان رفتار جستجوی دارو القائی مرفین

سهیلا پورخداداد[۱]، منیژه کرمی[۱*]، محمد رضا جلالی ندوشن[۲]
۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد، تهران
۲. گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران

دریافت: ۲۳ آبان ۸۹ پذیرش: ۲۱ خرداد ۹۰

چکیده

مقدمه: طبق تحقیقات قبلی کلشی سین باعث تخریب نورونی و تضعیف یادگیری می شود. در این تحقیق اثر تزریق کلشی سین داخل CA1 هیپوکامپ و برهمکنش کلشی سین و نیتریک اکساید آن ناحیه بر روی رفتار جستجوی دارو مطالعه شد.

روش ها: از ۲۵۰ موش سفید بزرگ نژاد ویستار (۳۰۰ – ۲۵۰ گرم) استفاده و ناحیه CA1 هیپوکامپ این حیوانات به صورت دو طرفه کانول گذاری شد.کلشی سین (۸– ۲ µg/rat) حین جراحی و پس از تثبیت کانول های CA1، به داخل هسته تزریق گردید. یک هفته پس از بهبودی حیوانات، جریان شرطی سازی به روش غیر طرفدار و به صورت یک برنامه پنج روزه در سه مرحله آشنایی، شرطی سازی و آزمون اجرا شد. در مرحله شرطی سازی، مرفین (۵–۲/۵ mg/kg) به صورت زیر جلدی روزانه یکبار تجویز گردید. L– آرژینین و L-NAME در مرحله آزمون داخل مغزی تزریق شد. رفتارها با سیستم اتوویژن ثبت و داده ها به کمک ANOVA بررسی گردید.

یافته ها: کلشی سین باعث کاهش علائم رفتاری و مرفین باعث تقویت آن ها در حیوانات تحت تجویز کلشی سین شد ولی عوامل نیتریک اکساید جز بر میزان تردد اثر معنی داری را نشان ندادند.

نتیجه گیری: کلشی سین احتمالا به علت کاهش تعداد نورونی ناحیه CA1 رفتار جستجوی دارو را کاهش داد و مرفین به واسطه افزایش سطح دوپامین اثر افزایشی داشت. تاثیر عوامل سیستم نیتریک اکساید نیز محتملا به واسطه دوپامین تحت القائ مرفین حادث گردید.

واژه‌های کلیدی: کلشی سین، CA1 هیپوکامپ، مرفین، رفتار جستجوی دارو، نیتریک اکساید

مقدمه

کلشی سین از *Colchicum autumnale L.* و همچنین از گیاهان متنوع مربوط به خانواده Liliaceae استخراج می شود [۲۸ و ۲]. کلشی سین اولین بار برای درمان نقرس توسط Pedamius Dioscoride در قرن ششم پیشنهاد شد [۱۹].

این ماده دارای ساختار سه حلقه ای مرکب از حلقه بنزنی (حلقهA)، حلقه تروپون متوکسی (حلقهC) و حلقه هفت ضلعی (حلقهB) دارای استامید در موقعیت C7 می باشد [۱۹]. کلشی سین مجموعه ای از اعمال سلولی از جمله میتوز، ترشح، طویل شدن سلول، مورفولوژی و حرکت سلول را تخریب می کند. مکانیسم اصلی عمل کلشی سین مهار پلیمریزاسیون میکروتوبول ها است به این شکل که به توبولین متصل می شود و میکروتوبول ها را دپلیمریزه می کند و باعث تخریب فرایندهای انتقالی وابسته به میکروتوبول ها از جمله جریان

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: karami@shahed.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

Archive of SID

آکسوپلاسمیک سریع می شود [۱۰]. بر اساس مطالعات بیوشیمیایی، روند یادگیری به ویژه انتقال سیگنال نیاز به انتقال پروتئین در سیتوپلاسم دارد [۲]. کلشی سین به عنوان مهار کننده میتوز، با اتصال به توبولین و تخریب جریان آکسوپلاسمیک این روند را به واسطه اثرات نوروتوکسیک مختل می کند [۲۶و۱۷]. این آلکالویید گیاهی می تواند خصوصیات عملکردی سلول های عصبی را تحت الاشعاع قرار دهد. Goldschmiat و Steward گزارش کردند که اضافه شدن مستقیم کلشی سین به داخل هیپوکامپ باعث تخریب سلول های گرانولی و Mossy fiber می شود [۲۷].

هیپوکامپ دارای نقش اساسی در شکل گیری چندین نوع حافظه از جمله حافظه فضایی می باشد. صدمه به تشکیلات هیپوکامپ یا اتصالات آن، یادگیری و حافظه فضایی را مختل می کند [۷]. اثرات تقویتی اپیات ها شناخته و نشان داده شده است که سیستم دوپامینرژیک مزولیمبیک روی اثرات تقویتی آن ها دخالت می کند [۱۱]. Bardo (۱۹۹۸) نشان داد علاوه بر سیستم مزولیمبیک، ساختارهای دیگری شامل هیپوکامپ در پاداش نقش دارند. هیپوکامپ پشتی بالاترین غلظت دوپامین را داراست [۹] که بر طبق شواهد NO در آزادسازی دوپامین دخالت می کند [۱۱]. این پپتیدها به همراه گلوتامات در سیناپس های فیبرهای خزه ای و مسیر lateral perforant آزاد می شوند و در تعدیل تحریک پذیری سلول های پیرامیدال هیپوکامپ نقش دارند [۲۹].

NO به عنوان نوروترنسمیتر تعداد زیادی از اعمال بیولوژیک از جمله یادگیری و حافظه را واسطه گری می کند [۳۰و ۳]. نشان داده شده است که نیتریک اکساید به عنوان پیامبر برگشتی در LTP دخالت دارد. اگر مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز (NOS) بر روی نورون های پس سیناپسی اثر داده شود القا LTP مهار می گردد. این امر نشان می دهد که نیتریک اکساید در نورون پس سیناپسی توسط NOS تولید می شود، آنگاه در فضای سیناپسی انتشار می یابد و بر روی ترمینال های پیش سیناپسی اثر می گذارد و به عنوان یک پیامبر برگشتی در القا LTP ایفای نقش می کند [۱۶و ۱]. در مطالعات قبلی مشخص شد که ایجاد وابستگی غذائی به مرفین باعث القا LTP تشدید شده در ناحیه CA1 هیپوکامپ و تقویت روند یادگیری و حافظه فضایی موش های تحت تیمار با مرفین می شود [۲۲]. از آنجاکه نقش نیتریک اکساید هیپوکامپ در القای اثرات پاداشی مانند شرطی سازی مکانی با مرفین محتمل می باشد در این تحقیق سعی شد تا با تزریق دو طرفه کلشی سین به داخل CA1 هیپوکامپ مقدم بر جریان شرطی سازی با مرفین تاثیر این عامل نوروتوکسیک موثر بر کاهش نورونی بر جریان مذکور و نیز تداخل نیتریک اکساید ناحیه CA1 هیپوکامپ با کلشی سین بر روی رفتار جستجوی دارو تحت القای مرفین در مدل شرطی بررسی شود.

مواد و روش ها

در این آزمایش از موش های سفید بزرگ نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰- ۲۵۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد استفاده گردید حیوانات به صورت دسته های ۴ تایی در قفس های استاندارد با سیکل تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگه داری شدند. حیوانات طی تمام مراحل به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

داروهای استفاده شده در این آزمایش شامل سولفات مرفین (خرید از شرکتTEMAD، ایران با مجوز رسمی وزارت بهداشت) و L- آرژینین (از شرکت سیگما، USA) و N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) (USA Biochemical Inc.,) و کلشی سین (از شرکت مرک کشور آلمان) و کتامین –زایلزین (از سازمان دامپزشکی کشور، تهران) می باشد. مرفین به صورت زیر جلدی و کتامین- زایلزین به صورت داخل صفاقی (به ازای وزن هر موش) تزریق شد. غلظت های مورد نظر از کلشی سین و L-آرژینین و L-NAME در سرم فیزیولوژیک استریل به طور تازه تهیه شده و در روز جراحی و یا تست به صورت دو طرفه به داخل ناحیه CA1 هیپوکامپ تزریق گردید.

حیوانات توسط کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلزین (۲۰mg/kg) بیهوش می شدند. سپس حیوان در دستگاه استرئوتاکس قرار می گرفت. یک برش در سطح جمجمه ایجاد، دو سوراخ در جمجمه طبق اطلس پاکسینوز به مختصات ۳/۸- :AP و L:±۱/۸ و ۳ :V ایجاد می شد. کانول های راهنما ساخته شده از سر سوزن g ۲۱ مطابق مختصات نصب می شدند و در حالیکه حیوان در دستگاه مقید بود تزریق دو

www.SID.ir

Archive of SID

طرفه کلشی سین انجام می شد. عمل تزریق بـه داخـل ناحیـه CA1 هیپوکامپ توسط کانول تزریق کـه از سـر سـوزن g ۲۷ دندانپزشکی ساخته می شد صورت می گرفت. اطراف کانول ها در سطح جمجمه توسط سیمان دندانپزشکی و یـک عـدد پـیچ عینک محکم می گردید.

برای شرطی سازی حیوانات از یک روش غیر طرفدار یا بی طرف مشتمل بر سه روز شرطی سـازی اسـتفاده شـد. دسـتگاه شرطی سازی، محفظه ای از جنس چوب و بـه رنـگ سـفید در ابعاد ۶۰×۳۰×۳۰ سانتی متر است که در خط وسط، دارای یـک دیواره کشویی است، در سطوح ثابت دو قسمت شـرطی کننـده این دستگاه، به کمک نوار چسب سیاه، نقوش هندسی متفـاوتی برای ایجاد حس متفاوت تعبیه و طراحی شده و حیوانات با ایـن دستگاه در روز آشنایی آشنا شدند. در این روز، هر حیـوان ابتـدا وزن گردید، سپس در حالی که دیـواره حایـل، ۱۲ سـانتی متـر بالاتر از کف محفظه ثابت شده بود، آزادانه به مـدت ۱۵ دقیقـه بین دو قسمت شرطی کننـده حرکـت کـرد تـا مشـخص شـود نسبت به این محفظه حالت غیر طرفدار دارد یا خیر. اگر حیـوان ترجیح مشخصی به یکی از دو قسمت داشـت، حـذف و توسـط حیوان مناسب دیگر جایگزین می گردید.

حیوانات آشنایی داده شده، طی سه روز بعـد شـرطی شـدند که این مرحله شامل دو جلسـه شـرطی سـازی در هـر روز بـه فاصله ۶ ساعت، اولی صبح و بعدی بعد ازظهر بود و طـی ایـن جلسات، یک بار تزریق زیر جلدی دارو (مرفین تحت مقادیر ۵، ۲/۵ میلی گرم بر کیلو گرم) و بار دیگر تزریق زیر جلدی سالین انجام می شد. حیوانات تحت آزمایش با ایـن روش، در روز اول شرطی سازی، صبح مرفین و بعد از ظهر سـالین، و در روز بعـد، صبح سالین و بعد از ظهر مرفین، و روز بعـد مجـددا ماننـد روز اول صبح مرفین و بعد از ظهر سالین دریافت می کردند. طـول مدت هر جلسه شـرطی سـازی (پـس از دریافـت مـرفین و یـا سالین) ۴۵ دقیقه بود. روز آخر یا روز آزمون شرایطی ماننـد روز آشنایی ایجاد می شد و هر حیوان بدون مرفین ولی در صـورت نیاز پس از تزریق داخل مغـزی L-NAME و L- آرژینـین در دوز هـای مختلـف (۰/۳ ،۱ ،۳ µg/rat) آزمـون مـی شـد (۱۵ دقیقه). زمان توقف در دو قسمت شرطی کننده توسـط سیسـتم اتوویژن ثبت می شد و برای هر حیوان کـه در قسـمتی خـاص شرطی شده بود (مـرفین را در آن قسـمت دریافـت مـی کـرد) تفاوت زمان توقف در این قسمت طی ۱۵ دقیقه آزمـون نسـبت به میزان توقف در آن سمت طی آشنایی به عنوان زمـان تغییـر در ترجیح مکانی بر حسب ثانیه محاسبه می شد. در روز آزمـون رفتارهـای جسـتجوی دارو شـامل بـو کشـیدن(Snifing) و ایستادن (Rearing) و تردد بـین دو قسـمت دسـتگاه شـرطی کننده (Compartment entering) سنجش گردید زیـرا سـه شاخصه فوق نشانگرهای اصلی مکانیسم هـای حرکتـی بـرای روند جستجوی دارو در نظر گرفته می شوند [۱۳و۱۸و۲۳].

کلیه داده ها به کمک آنالیز واریانس ANOVA یک طرفه و در صورت نیاز سه طرفه بررسی شد. آزمون LSD بـه منظـور بررسی بیشتر انجام گرفت و $p< 0.05$ معنا دار تلقی گردید.

یافته ها

اثر کلشی سین بر علائم رفتاری: جـدول (۱) پاسـخ کلشـی سـین (۱،۲،۴،۶،۸ µg/rat) را در بـروز علائـم هـایی ماننـد بـو کشیدن، ایستادن و میزان تردد به دو قسـمت دسـتگاه شـرطی کننده نشان می دهد.

الف) اثر کلشی سین در بروز رفتار بو کشیدن:

آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که کلشی سین اثر معنی داری بر رفتار بو کشیدن دارد. $\{F_{5/30}=1.97 ، p< 0.01\}$ بررسی بیشتر با آزمون LSD نشان می دهد که کلشی سین در دوز ۲ µg/rat نسبت به کنترل اثر معنی داری بر روی این رفتار دارد.

ب) اثر کلشی سین بر رفتار ایستادن: آنـالیز واریـانس یـک طرفه نشان می دهد که کلشی سین اثر معنی داری بر رفتار بـو کشـیدن دارد $\{F_{5/30} =1.88, p< 0.01\}$. بررسـی بیشـتر بـا آزمون LSD بیان گر آن است که کلشـی سـین ۸ µg/rat اثـر معنی داری نسبت به گروه کنترل دارد.

ج) اثر کلشی سین بر رفتار حرکتی حیوانات تحت آزمـایش در ورود به هریک از دو بخش دسـتگاه شـرطی سـازی: آنـالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که کلشـی سـین اثـر معنـی داری دارد $\{F_{5/30}= 1.57 ,p< 0.01\}$. بررسـی بیشـتر نشـان می دهد که این ماده در ۶ µg/rat اثر معنی دار نشان می دهد.

اثر مرفین در بیان نشان های رفتاری موش شرطی شده ای که قبلا تحت تزریق داخـل هیپوکـامپی (CA1) کلشـی سـین

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- علائم رفتاری القاء شده به وسیله کلشی سین. داده ها با LSD مورد آزمون بیشتر واقع شده و $p< 0.05$* است

کلشی سین (µg/rat)	بو کشیدن (No./15min)	ایستادن (No./15min)	میزان تردد به دو قسمت دستگاه شرطی کننده (No./15min)
0	7.45 ± 0.55	28.40± 2.04	18.75 ± 1.62
1	7.00± 1.87	25.75 ± 5.51	19.00 ± 3.89
2	2.66 ± 1.20*	27.33 ± 6.88	20.66 ± 6.22
4	4.00 ± 1.00	28.50 ± 9.50	18.00 ± 3.00
6	5.75 ± 1.79	17.75 ± 3.47	9.50 ± 3.06*
8	7.33 ± 2.84	15.25 ± 4.58*	12.25 ± 3.63

جدول ۲- تاثیر مرفین در بروز رفتارهای جستجوی دارو. حیوانات یک هفته قبل با کلشی سین µg/rat ۲ در ناحیه هیپوکامپ مواجه شدند. داده ها با LSD مورد آزمون بیشتر واقع شده و $p < 0.05$* و $p< 0.01$** است

کلشی سین 2µg/rat دوزهای مرفین (mg/kg)	بو کشیدن (No./15min)	ایستادن (No./15min)	میزان تردد به دو قسمت دستگاه شرطی کننده (No./15min)
0	10.00 ± 2.04	25.00 ± 1.58	17.75 ± 1.75
2.5	13.5 ± 1.50	46.00 ± 9.00*	37.50 ± 1.50**
5	9.50 ± 0.50	26.00 ± 2.00	25.00 ± 00

جدول۳- تاثیر مرفین در بروز رفتارهای جستجوی دارو. حیوانات یک هفته قبل کلشی سین µg/rat ۸ را در ناحیه هیپوکامپ دریافت کردند.

کلشی سین 8µg/rat دوزهای مرفین (mg/kg)	بو کشیدن (No./15min)	ایستادن (No./15min)	میزان تردد به دو قسمت دستگاه شرطی کننده (No./15min)
0	14.5 ± 3.17	21.00 ± 7.52	27.75 ± 12.26
2.5	5.50 ± 2.50	12.50 ± 10.50	12.00 ± 5.00
5	8.66 ± 2.90	12.33 ± 3.17	17.00 ± 4.16

µg/rat ۲ به عنوان عامل تخریب (Lesion) قرار گرفته است: جدول (۲) پاسخ مرفین (mg/kg ۵، ۲/۵) را در بروز علائم بو کشیدن و ایستادن و میزان تردد به هر دو بخش دستگاه شرطی کننده نشان می دهد.

الف) اثر مرفین بر رفتار بو کشیدن: آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که مرفین در بروز علائم بو کشیدن اثر معنی داری ندارد ($p >0.05$).

ب) اثر مرفین بر رفتار ایستادن: آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که مرفین اثر معنی داری بر رفتار ایستادن دارد $\{F_{2/15}=8.02 , p< 0.01\}$. آنالیز بیشتر نشان می دهد که

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- اثر L- آرژینین بر رفتارهای جستجوی دارو در حیوانات تحت Lesion با کلشی سینµg/rat ۲. این حیوانات یک هفته قبل کلشی سین را داخل مغزی دریافت کردند و در جریان شرطی سازی مرفین (mg/kg) ۵ به آن ها تجویز شد و سرانجام در روز آزمون تحت تزریق مستقیم L - آرژینین قرار گرفته اند.

کلشی سین 2µg/rat مرفین(mg/kg) 5 L-Arg (0/3,1,3 mg/kg)	بو کشیدن (No./15min)	ایستادن (No./15min)	میزان تردد به دو قسمت دستگاه شرطی کننده (No./15min)
0	11.25 ± 1.60	36.25 ± 6.25	27.75 ± 4.64
0.3	14.50 ± 0.50	32.50 ± 6.50	26.00 ± 8.00
1	6.50 ± 1.50	54.50 ± 17.50	31.50 ± 9.50
3	8.50 ± 0.50	29.00 ± 7.00	22.50 ± 2.50

جدول ٥- اثر L-NAME بر رفتارهای جستجوی دارو در حیوانات تحت Lesion با کلشی سینµg/rat ۲. به این حیوانات یک هفته قبل کلشی سین به صورت داخل مغزی تزریق شد و در جریان شرطی سازی مرفین (mg/kg) ۵ گرفتند و سرانجام در روز آزمون تحت تزریق مستقیم L-NAME واقع شدند. داده ها با LSD مورد آزمون بیشتر واقع شده و $p< 0.01$** است.

کلشی سین 2µg/rat مرفین(mg/kg) 5 L-Arg (3 mg/kg) L-NAME (0/3,1,3 mg/kg)	بو کشیدن (No./15min)	ایستادن (No./15min)	میزان تردد به دو قسمت دستگاه شرطی کننده (No./15min)
0	8.50 ± 0.50	26.00 ± 2.00	20.50 ± 4.50
0.3	14.50 ± 0.50	63.00 ± 1.00	44.50 ± 1.50**
1	15.00 ± 5.56	46.33 ± 14.51	31.66 ± 3.38
3	15.50 ± 0.50	33.00 ± 1.00	41.50 ± 0.50**

این اثر در ۲/۵ mg/kg معنی دار است.

ج) اثر مرفین بر رفتار حرکتی حیوانات تحت آزمایش در ورود به هریک از دو بخش دستگاه شرطی سازی: آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که مرفین در بروز این رفتار اثر معنی داری دارد. $\{F_{2/15}=16.57, p< 0.001\}$ آنالیز های متعاقب نشان می دهد که این اثر در ۲/۵ mg/kg دارو ایجاد می شود.

اثر مرفین در بیان نشان های رفتاری موش شرطی شده که قبلا تحت تزریق داخل هیپوکامپی (CA1) کلشی سین µg/rat ۸ به عنوان عامل تخریب (Lesion) قرار گرفته است: جدول (۳) آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که مرفین در دوزهای مختلف در بروز علائم رفتاری اثر معنی داری نشان نمی دهد ($p>0.05$).

اثر عوامل نیتریک اکساید در بیان نشان های رفتاری موش های شرطی شده با مرفین که قبلا تحت تزریق داخل هیپوکامپی CA1 کلشی سین ۲µg/rat به عنوان عامل تخریب(Lesion) واقع شده اند: جدول (۴) اثر L- آرژینین (µg/rat ۳ و۱ و ۰/۳) را در بروز علائم رفتاری نمونه های تحت تخریب کلشی سین µg/rat ۲ که با مرفین شرطی شده اند نشان می دهد:

الف) اثر L- آرژینین بر رفتار بو کشیدن: آنالیز واریانس یک طرفه اثر معنی داری در بروز این رفتار نشان نمی دهد ($p>0.05$).

ب) اثر L- آرژینین بر رفتار ایستادن: آنالیز واریانس یک طرفه اثر معنی داری در بروز این رفتار نشان نمی دهد ($p>0.05$).

ج) اثر L- آرژینین بر رفتار حرکتی حیوانات تحت آزمایش در ورود به هریک از دو بخش دستگاه شرطی سازی: آنالیز

www.SID.ir

Archive of SID

جدول٦- اثر L- آرژینین بر رفتارهای موش هایی که قبلا تحت Lesion باکلشی سینµg/rat ۸ قرار داشته انـد. و در جریـان شـرطی سازی مرفین (mg/kg) ۵ به آن ها تزریق شد و سرانجام در روز آزمون تحت تزریق مستقیم L - آرژینین قرار گرفته اند.

کلشی سین 8µg/rat مرفین(5(mg/kg L-Arg(0.3,1,3 mg/kg)	بو کشیدن (No./15min)	ایستادن (No./15min)	میزان تردد به دو قسمت دستگاه شرطی کننده (No./15min)
0	8.66 ± 2.90	12.33 ± 3.17	17.00 ± 4.16
0.3	13.00 ± 5.00	23.50 ± 0.50	23.00 ± 5.00
1	9.33 ± 4.91	43.66 ± 23.31	26.66 ± 13.86
3	12.33 ± 6.35	39.33 ± 6.64	32.66 ± 4.66

جدول۷- اثر L-NAME بر رفتارهای موش هایی که قبلا تحت Lesion باکلشی سین µg/rat ۸ قرار داشته انـد. و در جریـان شـرطی سازی مرفین (mg/kg) ۵ به آن ها تزریق شد و سرانجام در روز آزمون تحت تزریق مستقیم L-NAME قرار گرفته اند

کلشی سینµg/rat8 مرفین(5mg/kg) L-Arg(3 mg/kg) L-NAMA(0/3,1,3 mg/kg)	بو کشیدن (No./15min)	ایستادن (No./15min)	میزان تردد به دو قسمت دستگاه شرطی کننده (No./15min)
0	12.33 ± 6.35	39.33 ± 6.64	32.66 ± 4.66
0.3	13.00 ± 1.73	41.33 ± 15.34	40.33 ± 5.45
1	8.33 ± 3.84	33.00 ± 7.09	28.33 ± 6.35
3	15.33 ± 5.20	46.33 ± 10.08	35.66 ± 6.38

واریانس یک طرفه اثر معنـی داری در بـروز ایـن رفتـار نشـان نمی دهد ($p>0.05$).

جدول (۵) اثـر L-NAME (µg/rat ۳و۱و۰/۳) را در بـروز علائم رفتاری موش های تحت تخریب با کلشی سـین µg/rat ۲ را نشان می دهد که که با مـرفین شـرطی شـده انـد: آنـالیز واریانس یک طرفه اثر معنی داری در بروز رفتارهای ایستادن و بو کشیدن نشان نمی دهد. اما L-NAME در بـروز رفتارهـای جستجوی دارو و میزان تردد بین دو قسمت شـرطی کننـده در دسـتگاه اثـر معنـی داری را نشـان مـی دهـد. {$p<0.001$ و$F_{3/20}= 10.41$}

اثر عوامل نیتریک اکساید در بیان نشان های رفتاری موش های شرطی شده ای که قبلا تحت تزریق داخل CA1 کلشـی سین µg/rat ۸ به عنوان عامل تخریب (Lesion) قرار گرفتـه اند: آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که L– آرژینـین و L-NAME اثر معنی داری بر روی رفتارهـای جسـتجوی دارو نداشته اند ($p> 0.05$) (جداول ۷و۶).

برهمکنش کلشی سین و نیتریک اکساید در CA1 در بیان نشان های رفتاری موش های شرطی با مرفین:

آنالیز واریانس سه طرفه نشان می دهد که کلشـی سـین و نیتریک اکساید در CA1 در بیان نشـان هـای رفتـاری مـوش هـــای شـــرطی شـــده بـــا مـــرفین بـــرهمکنش دارنـــد ($F_{Drug*Dose}$ (2,54)=74.2, p< 0.0001). آنالیز Post hoc پس از اجرای این تحلیل در مورد داده های بـه دسـت آمـده از نمونه های تحت تخریب کلشی سین به تنهـائی بـا داده هـای حاصل از آزمایش حیوانات تحت تخریب کلشی سین که بـرای شرطی سازی مرفین را دریافت کردنـد و سـرانجام آن دسـته از داده ها که مربوط به حیوانـات تحـت تخریـب کلشـی سـین و شرطی شده با مرفین بوده که پیش از آزمون با تزریق مسـتقیم L– آرژینین مواجه شدند حاکی از آن است که پاسخ های نمونه های مواجه شده با کلشی سین اعم از کلشی سین ۲ و ۸ میکرو گرم در مقایسه با پاسخ هـای القـائی مـرفین پـس از تخریـب کلشی سینی و نیز پاسخ های تـوام ایـن دو در مواجـه بـا L –

www.SID.ir

Archive of SID

آرژینین ۹۵ (*p<0.05) تا ۹۹ (***p<0.0001) درصد اختلاف نشان می دهند که این امر می تواند تائیدی جدی برای نشان دادن برهمکنش این عوامل به شمار آید.

بحث

تشکیلات هیپوکامپ جز اصلی سیستم های یادگیری مغز به شمار می آیند [۲۵]. هیپوکامپ به طور خاص با حافظه نزدیک ارتباط دارد. اگر این ساختار به طور دو طرفه تخریب شود، اشکال جدی در حافظه مربوط به حوادث اخیر ایجاد و یادگیری وقایع و مهارت‌های جدید مختل می‌گردد [۴]. ارتباطات هیپوکامپ، رفتار الکتریکی نورون‌های آن و نتایج تحقیقاتی که از تحریک و یا تخریب آن به ویژه مسیرهای مربوط به ناحیهٔ CA1 به دست آمده، به خوبی گواه این مطلب است.

در این تحقیق، تاثیر کلشی سین، مرفین و نیتریک اکساید در ناحیه CA1 هیپوکامپ بر بروز علائم رفتاری از قبیل ایستادن، بو کشیدن و میزان تردد بین دو قسمت شرطی کننده در روز آزمون در مدل شرطی مورد بررسی قرار گرفت. از کلشی سین به عنوان عامل تخریب کننده ناحیه CA1 استفاده شد. جدول مربوط به تزریق کلشی سین به تنهایی به داخل CA1 هیپوکامپ نشان می دهد که کلشی سین در بعضی دوزها باعث کاهش دسته ای از رفتارهای جستجوی دارو می شود (اثرات معنی دار در دوزهای مختلف ۸ µg/rat، ۶، ۲). این اثرات با نتایج تحقیقات قبلی مبنی بر آنکه کلشی سین باعث کاهش حافظه فضایی می شود مطابقت دارد. کلشی سین به عنوان عامل تخریب کننده میکروتوبول شناخته شده که جریان آکسوپلاسمیک نورون ها را مهار می کند و انتقال سیناپسی را کاهش می دهد [۱۰،۱۱،۳۱]. در مطالعات دیگری نشان داده شده که تخریب میکروتوبول ها با تزریق مزمن کلشی سین باعث کاهش وابسته به دوز یادگیری می شود [۲]. از آنجا که فرایند یادگیری به حضور پروتئین های سیگنال [۲] و سلامت سیستم توبولین به منظور بروز جریان آکسوپلاسمیک طبیعی [۱۷،۲۶] وابسته است به نظر می رسد که کلشی سین می تواند کسب یادگیری را از طریق تخریب فعالیت استیل کولین ترانسفراز قشری کاهش دهد [۱۵]. احتمالا کلشی سین در حیوانات تحت مطالعه تیم حاضر باعث تخریب نورون های CA1 هیپوکامپ و یا تخریب سیستم پروتئینی آنزیمی و توبولینی در گیر در انتقالات سیناپسی شده و در نتیجه بر روند یادگیری تاثیر منفی بر جای گذاشته و باعث کاهش رفتارهای جستجوی دارو گردیده است. چرا که فرایند شرطی سازی یک جریان ساده یادگیری و مبتنی بر سلامت جریانات اکسوپلاسمیک است [۱۲]. طبق شواهد موجود در اثر کلشی سین سلول‌های گرانولی شکنج دندانه‌ای در موش های بالغ به طور قابل توجهی آسیب می‌بینند. در غلظت های بالا، کلشی سین اثرات نوروتوکسیک بر روی دیگر نورون‌ها نیز دارد [۶]. شواهد همچنین نشان دهنده آن است که تخریبات القا شده توسط کلشی سین در شکنج دندانه ای به طور کامل از بیان پاسخ شرطی القا شده توسط کوکائین جلوگیری می کند [۸].

بخش دیگری از نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در موشهایی که دوز های مختلف کلشی سین را قبلا دریافت کردند و سپس تحت شرطی سازی با مرفین قرار گرفتند بهبود و تقویت علائم و رفتارها حاصل شد. مرفین در حیواناتی که قبلا دوز ۲µg/rat کلشی سین را دریافت کردند رفتارها را نسبت به گروه کنترل افزایش داد. این امر نشان می دهد که مرفین باعث تقویت حافظه فضایی شده است. این نتایج با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد که حکایت از آن دارد که تزریق زیر جلدی مرفین علائم رفتاری را افزایش می دهد [۳۲]. برای بیان مکانیسم احتمالی این اثرات می توان در نظر داشت که گیرنده های NMDA نقش ثابت شده ای در فرآیند شکل پذیری سیناپسی، 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 می شود [۲۰]. برخی شواهد حاکی از آن است که مرفین می تواند از طریق تحریک گیرنده µ اپیوئیدی، کلسیم آزاد درون سلولی را افزایش داده و نهایتا منجر به هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول و تشکیل اینوزیتول و متعاقب آن آزادسازی کلسیم از ذخایر درون سلول شود.

بدیهی است که افزایش کلسیم درون سلولی ناشی از مرفین می تواند سبب فعالسازی آبشار گونه ی پیامبر ثانویه وابسته به کلسیم، نظیر فعال سازی کیناز وابسته به کلسیم گردد [۲۲]. همچنین طبق شواهد داروهای مخدر با تحریک

www.SID.ir

Archive of SID

گیرنده های μ باعث آزادسازی دوپامین از انتهای نورون های دوپامینی تگمنتوم شکمی می شوند و انشعابات این نورون ها به هیپوکامپ [۱۱] و هسته اکومبنس می رسد بنابراین افزایش سطح دوپامین به دلیل تجویز مکرر مرفین برای شرطی سازی می تواند یکی از محتمل ترین مکانیسم های تقویت کننده رفتارها در این مطالعه در نظر گرفته شود. همچنین تحقیقات نوروفارماکولوژی نشان داده که تزریق مکرر مرفین منجر به افزایش فرایندهای پاداشی می شود که سیستم دوپامینرژیک نقش مهمی را در فعالیت های پاداشی وابسته به مرفین بازی می کند [۵]. همچنین Packard و White (۱۹۹۱) نقش سیستم دوپامینرژیک را در تعدیل فرایندهای حافظه هیپوکامپ نشان دادند [۲۱]. بعلاوه شواهد نشان می دهد که NO یک ترانسمیتر برگشتی است که با تقویت سیگنال های نورون های پیش سیناپسی، باعث افزایش آزادسازی دوپامین می شود [۳۳،۲۴]. بنابراین مرفین می تواند با تاثیر مثبت بر سطح خارج سلولی دوپامین در منطقه تحت تجویز کلشی سین باعث تقویت و تشدید سیگنال های نورون های موثر در بیان رفتارهای جستجوی دارو شود.

در این تحقیق برای بررسی نقش NO در منطقه مغزی تحت مطالعه در رفتارهای جستجوی دارو در حیواناتی که قبلا کلشی سین را دریافت کردند و سپس با مرفین شرطی شدند از تزریق داخل هسته ای L–آرژنین به عنوان پیش ساز NO و از L-NAME به عنوان مهار کننده NOS استفاده شد. این تحقیق نشان داد تغییر سیستم نیتریک ارژیک بر روی رفتارهای جستجوی دارو به جز بر میزان تردد در این حیوانات تاثیر معنی داری نداشته است. در تحقیقات قبلی نشان داده شده که L– آرژنین در دوزهای بالای (۱۰۰ mg/kg) و L-NAME هم در دوزهای بالا (۲۰mg/kg) رفتارهای حرکتی را افزایش می دهد [۳۲]. تجویز L-NAME به هسته اکومبنس و یا تگمنتوم شکمی تاثیری بر فعالیت حرکتی حیوانات نداشته است [۵]. تزریق L– آرژنین و L-NAME به همراه مرفین در بروز رفتارهای حرکتی اثر خاصی را نشان نمی دهد [۵]. در مطالعه حاضر تاثیر افزایشی مهارکننده آنزیم نیتریک اکساید سینتاز بر فعالیت حرکتی در دوزهای بالا و پائین مشاهده شد که این پدیده نیاز به مطالعات بیشتر را یادآور می شود و آنچه در حال حاضر می توان بیان کرد آن است که احتمالا این روند به یک مکانیسم دوپامینی وابسته است. اینکه مهار آنزیم مولد نیتریک اکساید در نتیجه پیش تزریق مقادیر کم و زیاد مهارگر تردد را افزایش می هد احتمالا به اثرات دوگانه سیستم نیتریک اکساید بر حرکات به طور وابسته به سایر سیستم های عملکردی مانند سیستم دوپامینی بر می گردد. طبق شواهد قبلی NO ممکن است یک پیامبر نورونی باشد که آزادسازی دوپامین را در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش واسطه گری می کند [۱۱] ولی خارج کردن سیستم آنزیمی مولد نیتریک اکساید و بروز افزایش در حرکات می تواند این احتمال را که ال–آرژنین به تنهائی و به واسطه مسیرهای دیگر بر روند حرکتی وابسته به دوپامین تاثیر گذارد تقویت می نماید. این بخش از نتایج به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

با تشکر و قدردانی از معاونت محترم پژوهشی دانشکده علوم پایه و دانشگاه که هزینه های مالی پژوهش حاضر را در قالب پژوهانه در اختیار ما قرار دادند.

References

[1] Arancio O, Kiebler M, Lee C.J, Lev-Ram V, Tsien R.Y, Kandel E.R, Hawkins R.D, Nitric Oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce Long-Term Potentiation in cultured hippocampal neurons. ***By cell press*** 87(1996) 1025-1035.

[2] Bensimon G, Chermat R, Microtubule disruption and cognitive defects: effect of colchicine on learning behaviour in rats. ***Pharmacol Biochem Be*** 38(1991) 141-145.

[3] Bon C.L, Garthwaite J, On the role of nitric oxide in hippocampal Long-Term Potentiation. ***J neurosci*** 23 (25) (2003) 1941-1948.

[4] Carpenter MB, Core text of neuroanatomy, forth ed., ***Williams and Wilkins***, New York (1991) 361-389.

[5] Gholami A, Zarrindast M.R, Sahraei H, Haerri-Rohani A, Nitric oxide within the ventral tegmental area is

www.SID.ir

Archive of SID

involved in mediatin morphine reward. ***Eur J Pharmacol*** 458 (2003) 119-128.

[6] Goldschmidt R.B, Steward O, Comparison of the neurotoxic effects of colchicine, the vinca alkaloids, and other microtubule poisons. ***Brain Res*** 486 (1989) 133-140.

[7] Good M, Spatial memory and hippocampal function: Where are we now? ***Psicológica*** 23 (2002) 109-138.

[8] Hernández-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Pérez-Villaba A, Arcusa A, Barcia J.A, Trejo J.L, Canales J.J, The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. ***Neurobiol Learn Mem*** 90 (3) (2008) 553-9.

[9] Ishikawa K, Ott T, McGauge J.L, Evidence for dopamine as a transmitter in dorsal hippocampus. ***Brain Res*** 232 (1982) 222-226.

[10] James K.A, Austin L, The binding in vitro of colchicine to axoplasmic proteins from chicken sciatic nerve. ***Biochem*** 117 (1970) 773-777.

[11] Karami M, Zarrindast M.R, 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.

[12] Kandel E.R, Hawkins R.D, Broadwell R.D, Judd L.L, Murphy D.C, Neuroscience, memory and language. ***Library of congress, Washington*** (1995) 45-58.

[13] Kepecs A, Uchida N, Mainen Z.F, Rapid and precise control of sniffing during olfactory discrimination in rats. ***Neurophysiol*** 98 (2007) 205-213.

[14] Kimura M, Saji M, Protective effect of a low dose of colchicine on the delayed cell death of hippocampal CA1 neurons following transient forebrain ischemia. ***Brain Res*** 774 (1997) 229-33.

[15] Kumar A, Seghal N, Naidu P.S, Padi S.S, Goyal R, Colchicines-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type. ***Pharmacol Rep*** 59(3) (2007) 274-83.

[16] Meilandt W.J, Barea-Rodriguez E, Harvey S.A, Martinez J.R, Role of hippocampal CA3 μ-opioid receptors in spatial learning and memory. ***Neurosci*** 24 (12) (2004) 2953- 2962.

[17] Nakayama A, Sawada T, Involvement of microtubule integrity in memory impairment caused by colchicines. ***Pharmacol Biochem Be*** 71 (2002) 119-138.

[18] Neubert J.K, Rossi H.L, Pogar J, Jenkins A.C, Caudle R.M, Effects of mu- and kappa-2 opioid receptor agonists on pain and rearing behaviors. ***Behav Brain Funct*** (2007) 3:49.

[19] Niel E, Scherrmann J.M, Colchicine today. ***Joint Bone Spine*** 73 (2006) 672-678.

[20] Noda Y, Nabeshima T, Opiate physical dependence and N-methyl-D-aspartate recptors. ***Eur J Pharmacol*** 500 (2004) 121-128.

[21] Packard M.G, White N.M, Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by post training intra cerebral injection of dopamine agonists. ***Behav. Neurosci*** 105(1991) 295-306.

[22] Pourmotabbed A, Yaghmaei P, Parviz Imani P, Nedaei S.E, Touhidi A, Assessment of the effect of nitric oxide within hippocampal CA1 area on spatial learning and memory in morphine dependent rats. ***Physiol Pharmacol*** 11(4) (2008) 252-260.

[23] Sahraei H, Faghih-Monzavi Z, Fatemi S.M, Pashaei-Rad S, Salimi S.H, Kamalinejad M, Effects of Papaver rhoeas extract on the acquisition and expression of morphine-induced behavioral sensitization in mice. ***Phytother Res*** 20(9) (2006) 737-41.

[24] Segieth J, Pallotta M, Pearce B.R, Whitton P.S, Regulation of hippocampal dopamine release by nitric oxide in the rat. ***Br. J. Pharmacol*** 119 (1996) 180.

[25] Squire L.R, Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. ***Psychol Rev*** 99(2) (1992) 195-231.

[26] Steward O, Goldschmidt R.B, Sutula T.H, Neurotoxicity of colchicine and other tubulin-binding agents: A selective vulnerability of certain neurons to the disruption of microtubules. ***Life Sci*** 35(1984) 43-51.

[27] Sutula T.H, Goldschmidt R, Steward O, Mechanisms of colchicine neurotoxicity in the dentate gyrus: dissociation of seizures and cell death. ***Exp Neurol*** 81(1983) 683-69.

[28] Tilson H.A, Peterson N.J, Colchicine as an investigative tool in neurobiology. ***Toxicology*** 461(1987) 159-173.

[29] Toyoda M, Saito H, Matsuki N, Nitric oxide but not carbon monoxide is involved in spatial learning of mice. ***Jpn.j.Pharmacol*** 71 (1996) 205-211.

[30] Yamada K, Noda Y, Nakayama S, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima T, Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in

www.SID.ir

Archive of SID

the rat brain. ***Brit J Pharmacol*** 115 (1995) 852-858.

[31] Yu Z, Cheng G, Hu B, Mechanism of colchicine impairment on learning and memory and protective effect of CGP36742 in mice. ***Brain Res*** 750 (1997) 53-58.

[32] Zarrindast M.R, Gholami A, Sahraei H, Haeri-Rohan A, Role of nitric oxide in the acquisition and eexpression apomorphine- or morphine-induced locomotor sensitization. ***Eur J Pharmacol*** 482 (2003) 205-213.

[33] Zhu X.Z , Luo L.G, Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. ***J Neurochem*** 59(3) (1992) 932-5.

www.SID.ir