مقاله پژوهشی اصیل

اثر مهار گیرنده‌های کولینرژیک در ناحیه تگمنتوم شکمی بر حافظه وابسته به حالت مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی

نیلوفر دربندی
دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران
دکتر محمدرضا زرین‌دست
گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر آمنه رضایوف[1]
دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران

هدف: در مطالعه حاضر، اثرات تزریق دوطرفه آنتاگونیست‌های سیستم کولینرژیک در ناحیه تگمنتوم شکمی به تنهایی و همراه با مورفین بر به خاطرآوری حافظه و یادگیری وابسته به حالت مورفین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در بررسی شد. **روش:** در این پژوهش تجربی مورفین و سالین به صورت زیرجلدی، و آنتاگونیست‌های سیستم کولینرژیک به صورت داخل ناحیه تگمنتوم شکمی تزریق شده و سپس به خاطرآوری وابسته به حالت در یک روش اجتنابی غیرفعال آموخته شده، مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** تزریق زیرجلدی مورفین (mg/kg ۵) پس از آموزش منجر به خرابی حافظه بازخوانی و ایجاد فراموشی شد ولی تزریق همان دوز مورفین در روز آزمون باعث حافظه (یادگیری) وابسته به وضعیت مورفین گردید. تزریق دوزهای مختلف آتروپین، آنتاگونیست موسکارینی استیل کولین به صورت داخل تگمنتوم شکمی نسبت به گروه شاهد تفاوت معناداری را در بازخوانی حافظه نشان نداد در حالی که تزریق دوزهای مختلف مکامیل‌آمین، آنتاکونیست نیکوتینی استیل کولین این اختلاف را معنادار کرد. در حیواناتی که در روز آموزش مورفین به صورت زیرجلدی و در روز آزمون دوزهای مختلف آتروپین و یا مکامیل‌آمین را به صورت داخل تگمنتوم شکمی، همراه با مورفین به صورت زیرجلدی دریافت کرده بودند، به خاطرآوری حافظه به طور معناداری کاهش نشان داد. **نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های فوق به نظر می‌رسد که یادگیری وابسته به حالت مورفین احتمالاً در ارتباط با فعال‌سازی گیرنده‌های استیل کولینی ناحیه تگمنتوم شکمی باشد.

کلیدواژه‌ها: سیستم کولینرژیک، آتروپین، مکامیل آمین، مورفین، حافظه، یادگیری اجتنابی مهاری، موش بزرگ آزمایشگاهی

مقدمه

مطالعات زیادی حاکی از آن است که مورفین و سایر اپیوئیدها در فرآیندهای حافظه و یادگیری دخالت دارند (ایزکویردو[2]، ۱۹۷۹؛ واکارینو[3]، اولسون[4]، اولسون و کاستین[5]، ۱۹۹۸؛ لو[6]، زنگ[7]، لیو[8]، و سنگ[9]، ۲۰۰۰). مورفین منجر به القاء اثرات فراموشی در مدل‌های مختلف حافظه می‌گردد (اینتروینی[10]، مک‌گاف[11] و باراتی[12]، ۱۹۸۵؛ نیشی‌مورا[13]، شیگی[14] و کانتو[15]، ۱۹۹۰؛ راگوزینو[16] و گولد[17]، ۱۹۹۴). مطالعات قبلی نشان داده است که تزریق پیش یا پس ازآموزش مورفین به‌طور وابسته به دوز و زمان منجر به تخریب حافظه در مدل‌های یادگیری اجتنابی غیرفعال می‌گردد (زرین‌دست و رضایوف، ۲۰۰۴؛ زرین‌دست، فرج‌زاده، رستمی، رضایوف و نورجاه، ۲۰۰۵).

۱- نشانی تماس: دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران.
Email: rezayof@khayam.ut.ac.ir

2- Izquierdo
3- Vaccarino
4- Olson
5- Kastin
6- Lu
7- Zeng
8- Liu
9- Ceng
10- Introini
11- McGaugh
12- Baratti
13- Nishimura
14- Shigi
15- Kaneto
16- Ragozzino
17- Gold

Archive of SID
www.SID.ir

باید خاطرنشان کرد که تزریق پس از آموزش مورفین منجر به کاهش به خاطرآوری حافظه و القاء فراموشی می‌گردد، در حالی که تزریق مجدد مورفین پیش از آزمون به خاطرآوری حافظه را تسهیل می‌نماید. این فرآیند یادگیری وابسته به حالت[1] مورفین نام دارد (زرین‌دست و رضایوف، ۱۳۸۱؛ خاوندگار، همایون و زرین‌دست، ۲۰۰۳؛ زرین‌دست و رضایوف، ۲۰۰۴). این نوع از یادگیری نشان می‌دهد که اطلاعاتی که تحت‌تأثیر دارویی خاص آموخته شده است، تنها زمانی فراخوانی می‌شود که حیوان تحت‌تأثیر همان دارو قرار گیرد (کولپائرت[2]، ۱۹۹۰؛ کارلزون[3]، مندرک[4] و وایز[5]، ۱۹۹۵).

سیستم دوپامینرژیک مزوکورتیکولیمبیک، که از ناحیه تگمنتوم شکمی[6] (VTA) به طرف هسته آکومبنس[7]، آمیگدال، کورتکس پیش‌پیشانی[8] و سایر نواحی مغز جلویی کشیده شده است، در میانجی‌گری اثرات پاداشی مورفین دخالت دارد (اولمستید[9] و فرانکلین[10]، ۱۹۹۷؛ مک‌برایید[11]، مورفی[12] و ایکموتو[13]، ۱۹۹۹). ناحیه تگمنتوم شکمی علاوه بر دخالت در پاداش، در تخریب حافظه القاء شده توسط مورفین در رت ها نیز دخالت دارد (زرین دست و همکاران، ۲۰۰۵). یک حلقه مهم عملی بین هیپوکامپ و VTA وجود دارد که ورود اطلاعات به حافظه طولانی مدت را تنظیم می‌کند (لیسمن[14] و گریس[15]، ۲۰۰۵). علاوه بر آن حدس زده می‌شود که VTA و هیپوکامپ پشتی نواحی مهمی در یادگیری وابسته به پاداش هستند. گرچه شواهد نشان می‌دهد که مورفین فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه VTA را تنظیم می‌کند (کوب[16]، ۱۹۹۲)، اما به نظر می‌رسد که ارتباطات داخلی عملی بین مورفین و سایر عصب‌رسانه[17] از جمله گلوتامات (احمدی، زرین‌دست، حائری روحانی، رضایوف و نوری، ۲۰۰۷)، استیل کولین (رضایوف، نظری سرنجه، زرین دست، سپهری و دلفی، ۲۰۰۷)، گابا (لاویولتی[18]، گالگوز[19]، هنریکسن[20] و وندرکوی[21]، ۲۰۰۴) و نیتریک اکساید (غلامی، زرین‌دست، صحرایی و حائری روحانی، ۲۰۰۳) نیز در میانجی‌گری مراحل یادگیری و پاداش دخالت دارند.

شواهد فارماکولوژیک نشان می‌دهد که سیستم کولینرژیک در اثرات مورفین بر حافظه دخالت دارد (جعفری، زرین‌دست و جهانگیری، ۲۰۰۶). تزریقات مرکزی و محیطی آگونیست‌های سیستم کولینرژیک باعث تقویت حافظه و یادگیری می‌شوند، در حالی که تزریق آنتاگونیست‌های آن یا تخریب سیستم کولینرژیک منجر به تخریب حافظه می‌گردد (پاور[22]، وازدارجنوا[23] و مک‌گاف[24]، ۲۰۰۳؛ وندراستای[25] و همکاران، ۲۰۰۶). رهایش استیل کولین در سیناپس‌های ناحیه تگمنتوم شکمی منجر به تحریک فعالیت نورون‌های دوپامینی می‌گردد (گربا[26]، مونرو[27] و کوکینیدیزا[28]، ۲۰۰۰).

جالب توجه آن است که علی‌رغم حضور گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتینی در ناحیه مزولیمبیک و تداخل فعالیت این گیرنده‌ها در عملکرد سیستم دوپامینرژیک کورتیکومزولیمبیک تا کنون هیچگونه مطالعه‌ای بر روی عملکرد گیرنده‌های کولینرژیک در القاء اثرات مورفین در فرآیندهای حافظه و یادگیری انجام نشده است. هدف مطالعه حاضر بررسی مکانیسم‌های موسکارینی و نیکوتینی ناحیه VTA بر یادگیری وابسته به حالت مورفین است.

روش

حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری

در این پژوهش از رت‌های نر نژاد ویستار[29] (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) با محدوده وزنی ۲۵۰- ۲۲۰ گرم استفاده شد. این حیوانات به صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری و برای عادت کردن به محیط جدید حدود یک هفته قبل از شروع

1- State-dependent
2- Colpaert
3- Carlezone
4- Mendrek
5- Wise
6- Ventral Tegmental Area
7- Nucleus Accumbens
8- pre frontal cortex
9- Olmstead
10- Franklin
11- McBride
12- Murphy
13- Ikemoto
14- Lisman
15- Grace
16- Koob
17- neurotransmitter
18- Laviolette
19- Gallegos
20- Henriksen
21- Van der Kooy
22- Power
23- Vazdarjanova
24- McGaugh
25- Van der Staay
26- Greba
27- Munro
28- Kokkinidisa
29- Wistar

Archive of SID
www.SID.ir

آزمایش، به حیوان‌خانه منتقل شدند. محل نگهداری حیوانات دارای دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی هفت صبح) و دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد بود، و آزمایش‌ها در زمان معینی از روز انجام می‌گرفت. هشت حیوان در هر گروه تجربی قرار داشت و هر حیوان فقط یک بار آزمایش می‌شد.

دستگاه سنجش حافظه

دستگاه سنجش حافظه از جنس پلکسی‌گلاس و دارای دو سمت مجزا یکی به رنگ سیاه (۳۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر) و دیگری به رنگ سفید (۳۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر) است که توسط یک در گیوتینی (۹×۷ سانتی‌متر) واقع در دیواره میانی این دو بخش به یکدیگر راه دارند. در کف بخش سیاه رنگ میله‌های فلزی به قطر ۲/۵ میلی‌متر و در فواصل ۱ سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفته است. هنگامی که دستگاه روشن می‌شود یک جریان الکتریکی به مدت ۳ ثانیه و شدت ۱ میلی‌آمپر در میله‌های فلزی برقرار می‌شود.

داروها

از کتامین هیدروکلراید و زایلزین به عنوان داروهای بیهوشی و به صورت درون صفاقی استفاده شد. سولفات مورفین از شرکت تماد ایران و آتروپین و مکامیل‌آمین از شرکت سیگما، آمریکا تهیه شدند. تمامی داروها در نرمال سالین (۰/۹ درصد) حل شده، مورفین به صورت زیرجلدی (5mg/kg) و داروهای دیگر به صورت درون‌مغزی (1µl/rat) تزریق شد. در گروه‌های شاهد نرمال سالین (2ml/kg) تزریق می‌شد.

روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه تگمنتوم شکمی

ابتدا هر موش بر اساس وزن به وسیله تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (50mg/kg) وزایلزین (5mg/kg) بیهوش شد مختصات ناحیه VTA بر اساس اطلس پاکسینوس[1] و واتسون[2] به دست آمد (۴/۸ میلی‌متر به سمت عقب از برگما، ۰/۹ میلی‌متر در طرفین شکاف ساژیتال و ۸ میلی‌متر به طرف پایین از سطح جمجمه). در سطح جمجمه محل کانول‌گذاری توسط مته دندانپزشکی تا پرده مننژ سوراخ شد. کانول‌های راهنما به طول ۱۳ میلی‌متراز سرسوزن ۲۳ گیج تهیه شده و به صورت دو طرفه در محل‌های سوراخ شده، حدود ۲ میلی‌متر بالاتر از ناحیه تگمنتوم شکمی به کمک آکریل دندانپزشکی ثابت شد. برای جلوگیری از بسته شدن کانول راهنما قبل از تزریق، سر سوزن-های دندانپزشکی به شماره ۳۰ گیج که به اندازه طول کانول راهنما بریده می‌شد، در داخل آن قرار می‌گرفت.

روش تزریق درون مغزی

پس از یک هفته و طی شدن دوره بهبودی، برای تزریق دارو حیوان به آرامی توسط دست گرفته می‌شد. سر سوزن ۳۰ گیج از کانول راهنما خارج شده و به کمک سر سوزن دندانپزشکی ۲۷ گیج (که ۲ میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما بریده شده بود)، رابط پلی‌اتیلن و سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتری تزریقات مرکزی انجام می‌شد. مقدار ماده تزریق شده در هر طرف ۰/۵ میکرولیتر (در مجموع ۱ میکرولیتر در هر سر حیوان) و به مدت ۶۰ ثانیه بود. برای اطمینان از جذب کامل دارو از طریق کانول تزریق به داخل ناحیه مغزی مورد نظر، کانول تزریق با تأخیر ۳۰ تا ۶۰ ثانیه‌ای پس از تزریق خارج می‌شد.

در پایان آزمایش برای ارزیابی صحت عملیات و درستی مختصات محل جراحی و تزریق، مقدار ۱ میکرولیتر از محلول ۱ درصد آبی متیلن بلو به صورت دوطرفه تزریق شده، سپس مغز حیوان از جمجمه خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ به مدت ۱۰روز ثابت می شد. برش گیری در ناحیه تزریق و بررسی توزیع رنگ در فضای تگمنتوم شکمی بیانگر میزان صحت کانول-گذاری بود. داده‌های حیواناتی که محل کانول‌گذاری آنها خارج از ناحیه تگمنتوم شکمی بود از آنالیزها حذف می‌شد.

یادگیری اجتنابی غیرفعال به روش step through

روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه در موش‌های آزمایشگاهی در دو روز پشت سر هم انجام می‌شود. روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوانات در دستگاه می‌باشد، روز دوم یا روز آزمون شامل بررسی یا تست میزان حافظه حیوانات آموزش دیده است (احمدی و همکاران، ۲۰۰۷؛ زرین-دست، عیدی، عیدی و عریان، ۲۰۰۲).

1- Paxinos 2- Watson

Archive of SID
www.SID.ir

۱ - در روز آموزش هر موش با احتیاط در درون بخش سفید دستگاه قرار می‌گرفت و پس از ۵ ثانیه در گیوتینی بالا می‌رفت. مدت زمانی که طی می‌شد تا موش وارد خانه سیاه شود، ثبت می‌گردید. حیواناتی که بیش از ۱۰۰ ثانیه در خانه سفید باقی می‌ماندند از آزمایش حذف می‌شدند. زمانی که حیوان با ۴ پا وارد خانه سیاه می‌شد، در گیوتینی پایین آمده و حیوان به قفس خود برگردانیده می‌شد. ۳۰ دقیقه بعد دوباره حیوان در خانه سفید قرار می‌گرفت و پس از ۵ ثانیه در گیوتینی بالا رفته و مدت زمانی که طول می‌کشید تا حیوان وارد خانه سیاه شود ثبت می‌گردید. اما این بار بلافاصله پس از ورود کامل حیوان به خانه سیاه و پایین آوردن در گیوتینی با روشن کردن استیمولاتور، تحریک الکتریکی به مدت ۳ ثانیه به پاهای موش وارد می‌شد. با توجه به بسته بودن سقف این بخش، موش نمی‌تواند از شوک الکتریکی اجتناب کند (شوک اجتناب-ناپذیر). پس از ۲۰ ثانیه موش ازاین محیط خارج و به قفس نگهداری منتقل می‌گردید. دو دقیقه بعد این مراحل تکرار می‌شد. اگر حیوان قبل از ۱۲۰ ثانیه وارد خانه سیاه می‌شد برای بار دوم تحریک الکتریکی (با شدت کمتر) دریافت می‌کرد، در غیر این صورت یادگیری اجتنابی غیرفعال در حافظه موش شکل گرفته بود، لذا حیوان به قفس مربوطه منتقل می‌شد.

۲ - آزمون حافظه ۲۴ ساعت بعد از جلسه آموزش انجام می‌شد. به این ترتیب که موش‌ها به صورت جداگانه و به ترتیب در خانه سفید قرار می‌گرفتند، پس از ۵ ثانیه در گیوتینی بالا می‌رفت و مدت زمان تأخیر آنها در ورود به خانه سیاه ثبت می‌شد. در این مرحله هیچ‌گونه شوک الکتریکی به حیوان وارد نمی‌شد و حداکثر زمان برای توقف موش در خانه سفید یا زمان سقف[1] ۳۰۰ ثانیه بود.

آزمایش های انجام شده

آزمایش اول - اثر مورفین در ایجاد فراموشی: گروه‌های آزمایشی مورد نظر به ترتیب پس از آموزش، سالین (۱ ml/kg) و یا دوزهای مختلف مورفین (۰/۵، ۲/۵،۵ mg/kg) را به صورت زیرجلدی دریافت نمودند. کلیه گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد، ۳۰ دقیقه قبل از آزمون سالین (۱ ml/kg) به صورت زیرجلدی دریافت کردند.

آزمایش دوم - اثر مورفین در باز خوانی حافظه (حافظه وابسته به وضعیت مورفین): در این آزمایش همه گروه‌ها بلافاصله پس از آموزش مورفین (۵mg/kg) را به صورت زیرجلدی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد (در روز آزمون) ۳۰ دقیقه قبل از آزمون به گروه شاهد سالین (۱ ml/kg) و به سایر گروه‌ها دوزهای مختلف مورفین (۵ mg/kg، ۲/۵، ۰/۵) به صورت زیرجلدی تزریق شد.

آزمایش سوم - اثر تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده استیل کولین به تنهایی بر به خاطرآوری حافظه: در این آزمایش در روز آموزش به کلیه حیوانات بلافاصله پس از آموزش سالین (۱ ml/kg) به صورت زیرجلدی تزریق شد. در روز آزمون ابتدا حیوانات دوزهای مختلف آتروپین (۳µl/rat، ۲، ۱، ۰) یا مکامیل آمین (۳،۲µl/rat، ۱، ۰) را به صورت داخل تگمنتوم شکمی دریافت نموده، ۵ دقیقه پس از آن سالین (۱ ml/kg) به صورت زیرجلدی تزریق و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند.

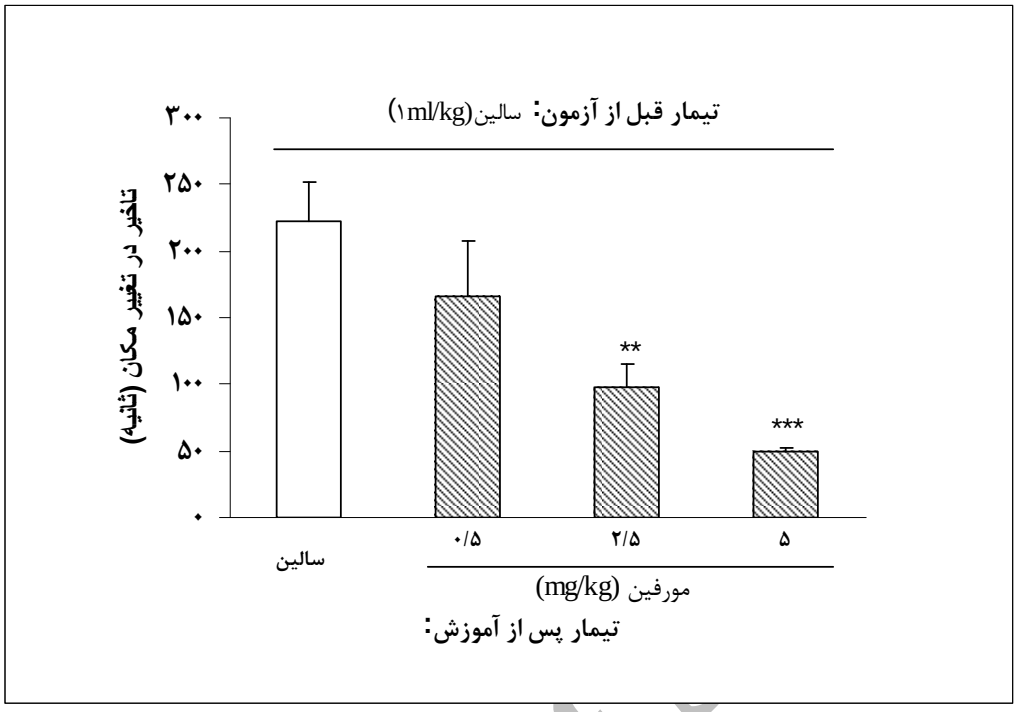
آزمایش چهارم - اثرتزریق آنتاکونیست‌های گیرنده استیل کولین همراه با مورفین بر به خاطرآوری حافظه: در این مرحله به کلیه حیوانات پس از آموزش مورفین (۵mg/kg) به صورت زیرجلدی تزریق شد. گروه‌های شاهد در روز آزمون ابتدا سالین (۱µl/rat) به صورت درون مغزی و سپس مورفین (۵mg/kg) به صورت زیرجلدی دریافت کردند. سایر گروه‌ها در روز آزمون، ابتدا دوزهای مختلف آتروپین یا مکامیل‌آمین را به صورت درون مغزی و ۵ دقیقه بعد مورفین (۵mg/kg) را به صورت زیرجلدی دریافت نمودند. کلیه گروه‌ها ۳۰ دقیقه پس از آخرین تزریق مورد آزمون قرار گرفتند.

تحلیل آماری

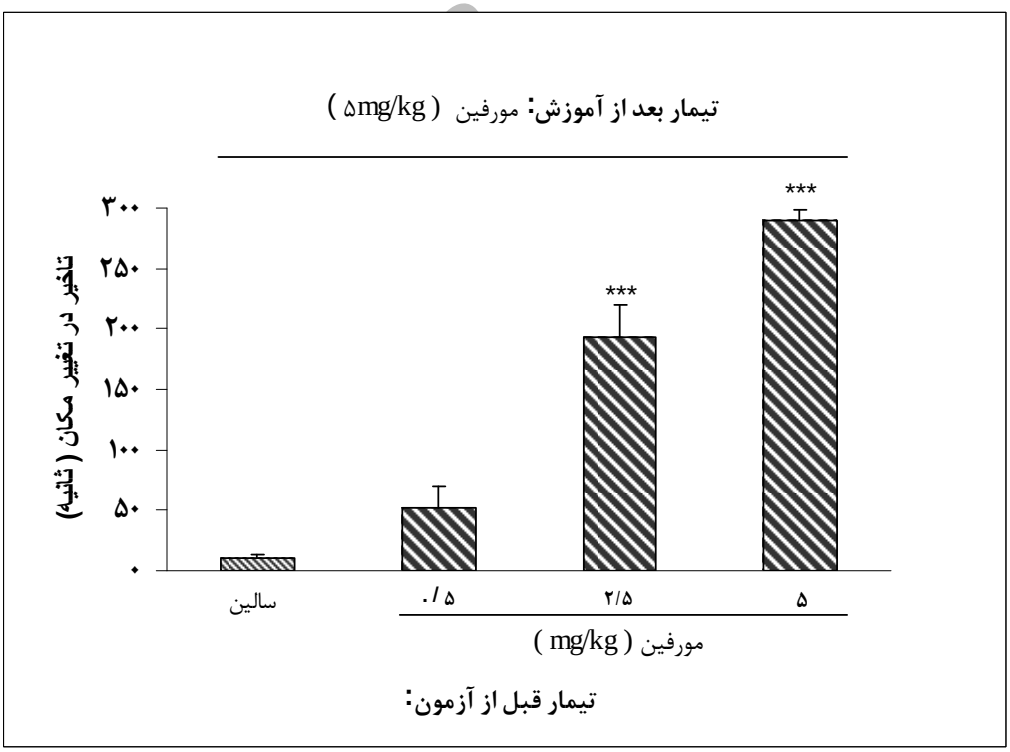
در آزمایش‌های انجام شده به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایش، از روش تحلیل واریانس[2] (ANOVA) یک‌طرفه و دوطرفه، و به دنبال آن از آزمون تعقیبی توکی[3] استفاده گردید و اختلاف با $p<۰/۰۵$ به عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و INSAT استفاده شد.

1- cut off
2- Analysis of Variance
3- Tukey

Archive of SID
www.SID.ir

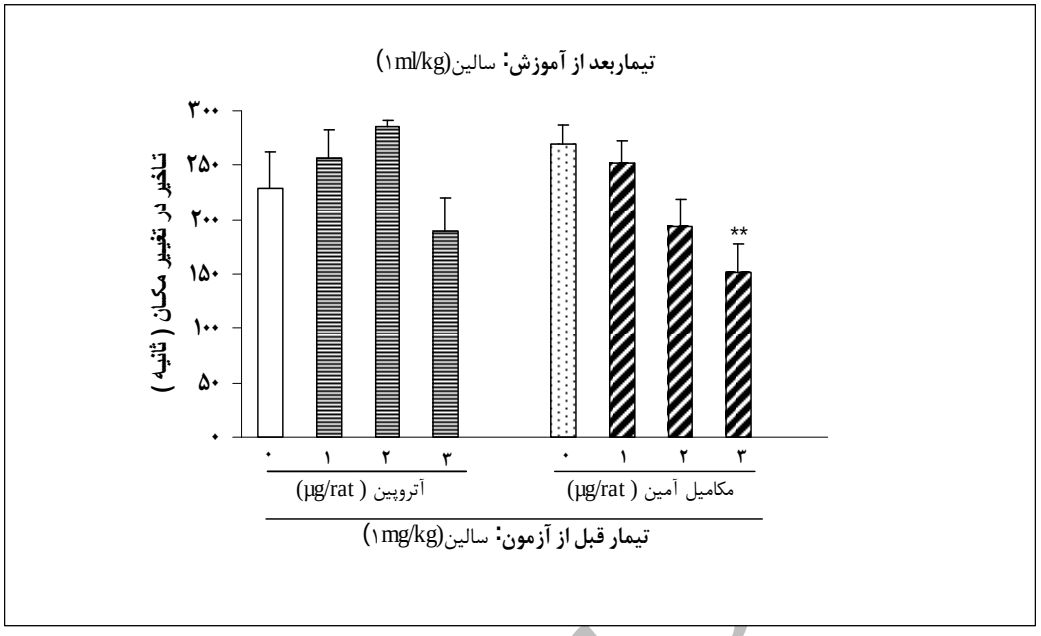


شکل ۱- فراموشی ناشی از تزریق مورفین در حیواناتی که ناحیه تگمنتوم شکمی آنها به صورت دوطرفه کانول‌گذاری شده است. داده‌ها بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین بیان شده است. $p<۰/۰۱$** و $p<۰/۰۰۱$*** اختلاف معنادار با گروه شاهد سالین/سالین.

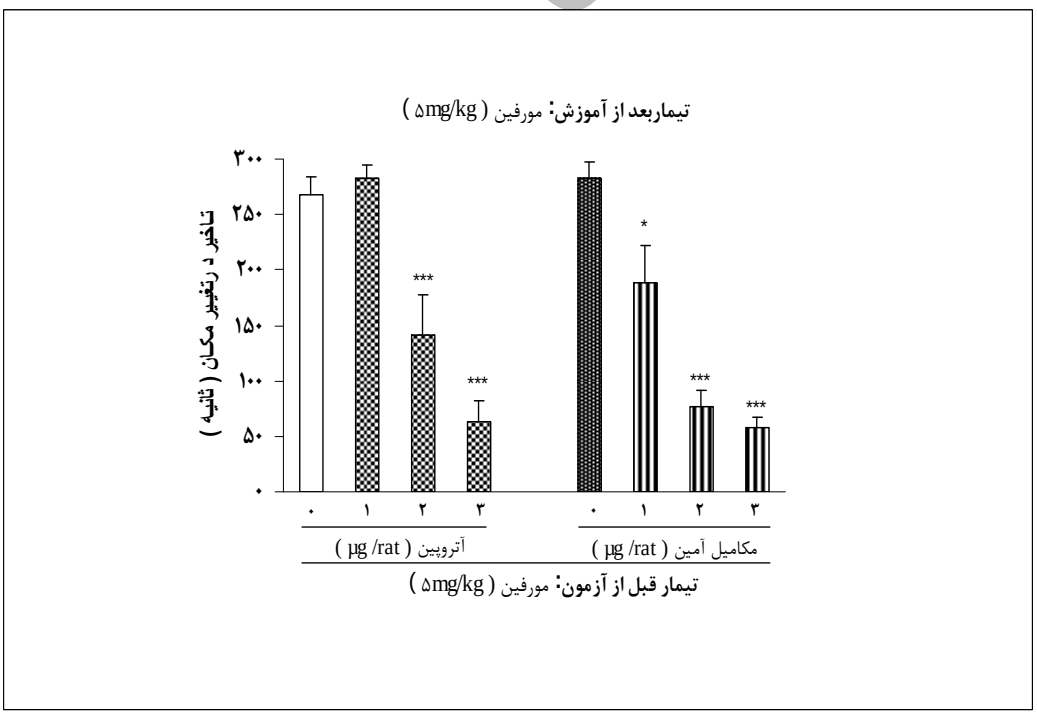


شکل ۲- به خاطرآوری حافظه ناشی از تزریق مورفین، $p<۰/۰۰۱$*** اختلاف معنادار با گروه شاهد مورفین/سالین.

www.SID.ir



شکل ۳- اثرات تزریق دوطرفه آتروپین یا مکامیل‌آمین در ناحیه تگمنتوم شکمی به تنهایی بر به خاطرآوری حا فظه، ** $p<۰/۰۱$ اختلاف معنادار با گروه شاهد سالین/سالین.



شکل ۴- اثرات تزریق دوطرفه آتروپین یا مکامیل آمین در ناحیه تگمنتوم شکمی همراه با مورفین بر به خاطرآوری حا فظه، * $p<۰/۰۱$ و *** $p<۰/۰۰۱$ اختلاف معنادار با گروه شاهد مورفین/مورفین.

www.SID.ir

یافته‌ها

اثر مورفین در ایجاد فراموشی

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، در مقایسه با گروه شاهد (سالین- سالین)، در سایر گروه‌ها تزریق زیرجلدی مورفین (۵ mg/kg، ۲/۵، ۰/۵) پس از آموزش به‌طور وابسته به دوز منجر به خرابی حافظه و ایجاد فراموشی شده است [$F_{(۳،۲۸)}$=۱۰/۷۹ ،p<۰/۰۰۱].

اثر مورفین در بازخوانی حافظه (حافظه وابسته به وضعیت مورفین)

شکل ۲ نشان می‌دهد در حیواناتی که تحت تأثیر تزریق پس از آموزش مورفین (۵mg/kg) حافظه تخریب شده است (فراموشی ناشی از مورفین)، تزریق زیرجلدی پیش از آزمون مورفین (۵ mg/kg، ۲/۵، ۰/۵) در مقایسه با گروه شاهد به طور وابسته به دوز منجر به بازخوانی حافظه می‌شود که این بیانگر حافظه وابسته به وضعیت مورفین است. حداکثر بازخوانی حافظه در دوز ۵mg/kg مورفین مشاهده شد [p<۰/۰۰۰۱، $F_{(۳،۲۸)}$=۶۲/۸].

آثار تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده استیل کولین به تنهایی بر به‌خاطرآوری حافظه:

در این آزمایش گروهی از حیوانات که در روز آزمون دوزهای مختلف آتروپین (آنتاگونیست گیرنده موسکارینی استیل کولین) را به صورت داخل تگمنتوم شکمی دریافت کرده بودند، نسبت به گروه شاهد تفاوت معناداری را در بازخوانی حافظه نشان ندادند [$F_{(۳،۲۸)}$=۲/۴ ،p>۰/۰۵].

در حالی که در گروه دیگر تفاوت معناداری بین گروه شاهد (سالین- سالین) و گروه‌هایی که در روز آزمون دوزهای مختلف مکامیل آمین (آنتاگونیست گیرنده نیکوتینی استیل کولین) را به صورت داخل تگمنتوم شکمی دریافت کرده بودند مشاهده شد [$F_{(۳،۲۸)}$=۶/۱ ،p<۰/۰۱]. اگرچه تنها دوز بالای مکامیل آمین (۳µl/rat) توانست فراموشی ایجاد نماید (شکل ۳).

آثار تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده استیل کولین همراه با مورفین بر به‌خاطرآوری حافظه

در مقایسه گروه شاهد (مورفین- مورفین) با حیواناتی که در روز آموزش مورفین به صورت زیرجلدی و در روز آزمون دوزهای مختلف آتروپین به صورت داخل تگمنتوم شکمی را همراه با مورفین به صورت زیرجلدی دریافت کرده بودند، به خاطرآوری حافظه به طور معناداری کاهش نشان می‌داد [$F_{(۳،۲۸)}$=۲۰/۱ ،p<۰/۰۰۰۱].

همچنین مقایسه گروه شاهد (مورفین- مورفین) با سایرگروه‌ها که در روز آزمون مکامیل آمین را به صورت داخل تگمنتوم شکمی همراه با مورفین به صورت زیرجلدی دریافت نموده بودند، کاهش معناداری در به خاطرآوری حافظه نشان داد [$F_{(۳،۲۸)}$=۳۰/۴ ،p<۰/۰۰۱].

بحث

در مطالعه حاضر از روش یادگیری اجتنابی غیرفعال به روش step through یا گذر از یک بخش دستگاه به بخش دیگر که نشان‌دهنده حافظه طولانی‌مدت است، استفاده شد. داده‌های حاصل نمایانگر آن است که تزریق زیرجلدی مورفین پس از آموزش به طور وابسته به دوز منجر به از بین رفتن حافظه در روز آزمون می‌شود (فراموشی ناشی از مورفین). حداکثر کاهش حا فظه در دوز ۵mg/kg مورفین دیده شد. همچنین نتایج حاصل نشان می‌دهد که تزریق پیش از آزمون مورفین باعث به خاطرآوری حافظه در مقایسه با گروه شاهد و القاء حافظه وابسته به حالت مورفین می‌گردد. در تأیید مطالعه حاضر، مطالعات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد مورفین به طور وابسته به دوز و زمان بر به خاطرآوری حافظه اثر دارد (نیشیمورا[1] و همکاران، ۱۹۹۰؛ بروینزاسلات[2] و کولپائرت[3]، ۱۹۹۹).

همان‌گونه که در قسمت مقدمه اشاره شد، مطالعات متعددی نقش احتمالی سیستم‌های عصب‌رسانه‌ای مختلف را بر

1- Nishimura 2- Bruins Slot
3- Colpaert

Archive of SID
www.SID.ir

یادگیری وابسته به حالت مورفین مورد بررسی قرار داده‌اند. با این وجود مکانیسم دقیق یادگیری وابسته به حالت هنوز به خوبی شناخته نشده است و نیازمند بررسی‌های بیشتر جهت روشن نمودن نواحی از مغز است که در این پدیده دخالت دارند. به نظر می‌رسد که ناحیه تگمنتوم شکمی یکی از این نواحی کلیدی باشد (زرین‌دست و همکاران، ۲۰۰۵). شواهد حاکی از آن است که سیستم کولینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی در میانجی‌گری پاداش مورفین دخالت دارد (رضایوف و همکاران، ۲۰۰۷). علاوه بر آن فعال‌سازی گیرنده‌های موسکارینی، باعث تحریک فعالیت نورون‌های دوپامنیرژیک در ناحیه تگمنتوم شکمی می‌شود (بازیل[1] و همکاران، ۲۰۰۲). مطالعات زرین‌دست و همکارانش نشان داده است که تزریق سیستمی نیکوتین قبل از آزمون منجر به از بین رفتن فراموشی القاء شده توسط تزریق پیش از آموزش مورفین در موش‌های سوری (زرین‌دست، نوری، خلیل‌زاده و عسکری، ۲۰۰۶) و رت‌ها (احمدی و همکاران، ۲۰۰۷) می‌گردد.

تحریک گیرنده‌های نیکوتینی به خصوص آنهایی که در VTA قرار دارند، آزاد شدن دوپامین را در هسته آکومبنس افزایش می‌دهد (کلارک[2]، فو[3]، جاکوبوویک[4]، فیبیگر[5]، ۱۹۸۸). لذا برآن شدیم تا تأثیر مهار گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتینی استیل کولین را در ناحیه تگمنتوم شکمی بر یادگیری وابسته به حالت مورفین مورد ارزیابی قرار دهیم.

نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد که اشغال گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین در ناحیه تگمنتوم شکمی به واسطه تزریق پیش از آزمون آتروپین، به طور وابسته به دوز از ایجاد حافظه وابسته به حالت مورفین جلوگیری می‌کند که احتمالاً نشان‌دهنده دخالت گیرنده‌های موسکارینی VTA در پاسخ مورفین می‌باشد. در تأیید مطالعه حاضر، تزریق داخل VTA آتروپین منجر به مهار خود تحریکی (رادا[6]، مارک[7]، یئومانس[8] و هوبل[9]، ۲۰۰۰) همچنین کاهش پاداش ناشی از تحریک مغز می‌گردد (یئومانس و باپتیستا[10]، ۱۹۹۷). این امر نشان‌دهنده آن است که گیرنده‌های موسکارینی ناحیه VTA در اثرات پاداشی سیستم مزوکورتیکولیمبیک دخالت داشته و از آنجا که یادگیری وابسته به حالت نوعی یادگیری وابسته به پاداش نیز می‌باشد (زرین‌دست و رضایوف، ۲۰۰۴)، مهار گیرنده‌های مزبور توانسته است با مهار سیستم پاداش، این نوع یادگیری را نیز تحت تأثیر قرار دهد.

همچنین تزریق دو طرفه آتروپین به داخل VTA در یک روش وابسته به مقدار از ترجیح مکانی القا شده توسط مورفین ممانعت می‌کند (نظری‌سرنجه، رضایوف ،رسولی و زرین‌دست، ۱۳۸۵). علاوه بر آن مهار گیرنده‌های موسکارینی ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی نیز توسط آتروپین، از ترجیح مکانی القا شده توسط مورفین ممانعت می‌نماید که به نظر می‌رسد این اثر با کاهش یادگیری وابسته به پاداش میانجی‌گری می‌شود (ذات‌علی، زرین‌دست، رضایوف، حائری‌روحانی و رضوی موحد، ۱۳۸۴).

علاوه بر آن، نتایج حاضر نشان می‌دهد که تزریق قبل از آزمون آتروپین به داخل VTA به تنهایی اثری بر به خاطرآوری حافظه ندارد. در تأیید آن، در موش‌های سوری که پس از آموزش، سالین و قبل از آزمون، آتروپین دریافت کرده‌اند تغییر معناداری بر ضبط حافظه در روش اجتنابی مهاری step-through دیده نشده است (بوکسیا[11]، بلک[12]، آکوستا[13] و باراتی[14]، ۲۰۰۳).

در بخش دیگر این مطالعه، تأثیر تزریق قبل از آزمون مکامیل آمین، بر به خاطرآوری حافظه مورد ارزیابی قرار گرفت. در حیواناتی که پس از آموزش سالین و قبل از آزمون تزریق داخل تگمنتوم شکمی مکامیل آمین داشتند در مقایسه با گروه شاهد سالین- سالین مدت زمان تأخیر step-through به طورمعناداری کاهش نشان داد. البته باید خاطر نشان کرد که تنها دوز بالاتر مکامیل آمین (۳µl/rat) توانست منجر به القای فراموشی شود.

1- Basile
2- Clarke
3- Fu
4- Jakubovic
5- Fibiger
6- Rada
7- Mark
8- Yeomans
9- Hoebel
10- Baptista
11- Boccia
12- Blake
13 Acosta
14- Baratti

Archive of SID
www.SID.ir

علاوه بر آن تزریق پیش از آزمون دوزهای مختلف مکامیل‌آمین به صورت داخل تگمنتوم شکمی همراه با تزریق زیرجلدی مورفین (5mg/kg) در گروه‌هایی که پس از آموزش مورفین (5mg/kg) دریافت کرده بودند منجر به کاهش معناداری در یادگیری وابسته به حالت مورفین شد. نتایج مشابه نشان می‌دهد که اشغال گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین در VTA از طریق مکامیل‌آمین نه تنها منجر به مهار ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین می‌گردد (رضایوف و همکاران، ۲۰۰۷) بلکه باعث کاهش اثرات الکل بر سیستم دوپامینی مزولیمبیک نیز می‌شود (بلومکویست[1]، نیسبرندت[2]، انگل[3] و سودرپالم[4]، ۱۹۹۳). علاوه بر آن آگونیست گیرنده‌های نیکوتینی باعث تسهیل اثرات تقویتی و پاداشی می‌شوند و مکامیل‌آمین به عنوان آنتاگونیست، واکنش‌های رفتاری القا شده توسط نیکوتین را متوقف می‌کند (ناکاهارا[5]، ۲۰۰۴). همچنین مکامیل‌آمین آزاد شدن دوپامین توسط نیکوتین را در هسته آکومبنس مهار می‌کند (نیسل[6]، نومیکوس[7] و سونسون[8]، ۱۹۹۴). با توجه به یافته‌های فوق به نظر می‌رسد که یادگیری وابسته به حالت مورفین احتمالاً در ارتباط با فعال‌سازی گیرنده‌های استیل کولینی ناحیه تگمنتوم شکمی باشد.

در انتها می‌توان از دشواری‌های روش‌شناختی تحقیق حاضر به موارد زیر اشاره نمود: از آنجایی که در تحقیق حاضر از موش‌های نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۲۰ استفاده می‌شد، تهیه حیوان با این محدوده وزنی نیاز به دقتی خاص داشت. همچنین با توجه به آنکه ناحیه VTA بسیار کوچک می‌باشد، در هنگام کانول‌گذاری دقت فراوان لازم بود تا کانول‌ها به طور دقیق در این ناحیه قرار گیرند.

پیشنهادها

گرچه نتایج فوق مؤید آن است که گیرنده‌های کولینرژیک ناحیه VTA نقش مهمی در یادگیری وابسته به حالت مورفین دارند، ولی برای بیان دقیق‌تر آن می‌توان از مطالعات ایمونوهیستوشیمی و ایمونوبلات به‌منظور تعیین نوع گیرنده‌ها و تعیین پروتئین‌های دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی استفاده نمود. علاوه بر آن می‌توان اثر سایر سیستم‌های عصب‌رسانه‌ای ناحیه تگمنتوم شکمی، به خصوص آنهایی را که با سیستم اوپیوئیدی در تداخل هستند، بر این نوع یادگیری مورد ارزیابی قرار داد.

سپاسگزاری

از زحمات فراوان کارشناسان و مسؤولین آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران بسیار تشکر می‌گردد.

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۲/۱۹؛ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۷/۶

1- Blomqvist
2- Nissbrandt
3- Engel
4- Soderpalm
5- Nakahara
6- Nisell
7- Nomikos
8- Svensson

منابع

زرین‌دست، م. ر.، و رضایوف، آ. (۱۳۸۱). افزایش حساسیت به مورفین و یادگیری وابسته به حالت القا شده توسط آن. *تازه‌های علوم شناختی*، ۴(۳)، ۱۱-۱.

نظری‌سرنجه، ف.، رضایوف، آ.، رسولی، ی.، و زرین‌دست، م. ر. (۱۳۸۵). نقش گیرنده‌های موسکارینی ناحیه تگمنتوم شکمی در اکتساب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی. *تازه‌های علوم شناختی*، ۳۲، ۱۰-۱.

ذات‌علی، ه.، زرین‌دست، م. ر.، رضایوف، آ.، حائری روحانی، ع.، و رضوی موحد، س. (۱۳۸۴). دخالت گیرنده‌های موسکارینی هیپوکامپ پشتی بر اکتساب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی. *تازه‌های علوم شناختی*، ۷، ۲۱-۱۲.

Archive of SID
www.SID.ir

Ahmadi, S. H., Zarrindast, M. R., Haeri-Rohani, A., Rezayof, A., & Nouri, M. (2007). Nicotine Improves Morphine-Induced Impairment of Memory: Possible Involvement of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in the Nucleus Accumbens. *Development neurobiology, 67*, 1118-1127.

Basile, A. S., Fedorova, I., Zapata, A., Liu, X., Shippenberg, T., & Duttaroy, A. (2002). Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99*, 11452–11457.

Blomqvist, O., Nissbrandt, H., Engel, J. A., & Soderpalm, B. (1993). The mesolimbic dopamine-activating effects of ethanol are antagonized by mecamylamine. *European Journal of Pharmacology, 249*, 207-213.

Boccia, M. M., Blake, M. G., Acosta, G. B., & Baratti, C. M. (2003). Atropine, an anticholinergic drug, impairs memory retrieval of a high consolidated avoidance response in mice. *Neuroscience Letters , 45*, 97-100.

Bruins Slot, L. A., & Colpaert, F. C. (1999). Opiates states of memory: receptor mechanisms. *Journal of Neuroscience, 19*, 10520-10529.

Carlezone, J. R., Mendrek, A., & Wise, R. A. (1995). MK-801 disrupts the expression but not the development of bromocriptine sensitization: A state-dependency interpretation. *Synapse, 20*, 1-9.

Clarke, P. B., Fu, D. S., Jakubovic, A., & Fibiger, H. C. (1988). Evidence that Mesolimbic dopaminergic activation underlines the locomotor stimulant action of nicotine in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 246*, 701-708.

Colpaert, F. C. (1990). Amnesic trace locked into the benzodiazepine state of memory. *Psychopharmacology, 102*, 28-36.

Gholami, A., Zarrindast, M. R., Sahraei, H., & Haerri-Rohani, A. (2003). Nitric oxide within the ventral tegmental area is involved in mediating morphine reward. *Eurpean Journal of Pharmacology, 458*, 119-128.

Greba, Q., Munro, L. J., & Kokkinidisa, L. (2000). The involvement of ventral tegmental area cholinergic muscarinicreceptors in classically conditioned fear expression as measured withfear-potentiated startle. *Brain Research, 870*, 135-141.

Introini, I. B., McGaugh, J. L., & Baratti, C. M. (1985). Pharmacological evidence of a central effect of naltrexone, morphine, and beta-endorphin and a peripheral effect of met- and leu-enkephalin on retention of an inhibitory response in mice. *Behavioral and Neural Biology, 44*, 434-446.

Izquierdo, I. (1979). Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: Possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology, 69*, 199-203.

Jafari, M. R., Zarrindast, M. R., & Djahanguiri, B. (2006). Influence of cholinergic system modulators on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physiology & Behavior, 88*, 146-151.

Khavandgar, S., Homayoun, H., & Zarrindast, M. R. (2003). The effect of l-NAME and l-arginine on impairment of memory formation and statedependent learning induced by morphine in mice. *Psychopharmacology, 167*, 291-296.

Koob, G. F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences, 13*, 177-184.

Laviolette, S. R., Gallegos, R. A., Henriksen, S. J., & van der Kooy, D. (2004). Opiate state controls bi-directional reward signaling via GABAA receptors in the ventral tegmental area. *Nature Reviews Neuroscience, 7*, 160-169.

Lisman, J. E., & Grace, A. A. (2005). The Hippocampal-VTA-Loop: Review Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. *Neuron, 46*, 703–713.

Lu, L., Zeng, S., Liu, D., & Ceng, X. (2000). Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats. *Neuroscience Letters, 291*, 191-195.

McBride, W. J., Murphy, J. M., & Ikemoto, S. (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behavioral Brain Research, 101*, 129-152.

Nakahara, D. (2004). Influence of nicotine on brain reward systems: study of intracranial self-stimulation. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1025*, 489-490.

Nisell, M., Nomikos, G. G., & Svensson, T. H. (1994). Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Synapse, 16*, 36-44.

Nishimura, M., Shigi, Y., & Kaneto, H. (1990). State-dependent and/or direct memory retrieval by morphine in mice. *Psychopharmacology, 100*, 27-30.

Olmstead, M. C., & Franklin, B. J. (1997). The development of a conditioned place preference to

Archive of SID
www.SID.ir

morphine: effects of lesions of various CNS sites. *Behavioral Neuroscience, 111*, 1313-1323.

Power, A. E., Vazdarjanova, A., & McGaugh, J. L. (2003). Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory, 80*, 178–193.

Rada, P. V., Mark, G. P., Yeomans, J. J., & Hoebel, B. G. (2000). Acetylcholine release in ventral tegmental area by hypothalamic self-stimulation, eating, and drinking. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 65*, 375-379.

Ragozzino, M. E., & Gold, P. E. (1994). Task-dependent effects of intra-amygdala morphine injections: attenuation by intra-amygdala glucose injections. *Journal of Neuroscience, 14*, 7478-7485.

Rezayof, A., Nazari-Serenjeh, F., Zarrindast, M. R., Sepehri, H., & Delphi, L. (2007). Morphine-induced place preference: Involvement of cholinergic receptors of the ventral tegmental area. *European Journal of Pharmacology, 562*, 92-102.

Vaccarino, A. L., Olson, G. A., Olson, R. D., & Kastin, A. J. (1998). Endogenous opiates. *Peptides, 20*, 1527-1574.

van der Staay, F. J., Bouger, P., Lehmann, O., Lazarus, C., Cosquer, B., Koenig, J., Stump, V., & Cassel, J. C. (2006). Long-term effects of immunotoxic cholinergic lesions in the septum on acquisition of the cone-field task and noncognitive measures in rats. *Hippocampus, 16*(12), 1061-1079.

Yeomans, J., & Baptista, M. (1997). Both nicotinic and muscarinic receptors in ventral tegmental area contribute to brain-stimulation reward. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 57*, 915-921.

Zarrindast, M. R., Eidi, M., Eidi, A., & Oryan, S. (2002). Effects of histamine andopioid systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *European Journal of Pharmacology, 452*, 193–197.

Zarrindast, M. R., Farajzadeh, Z., Rostami, P., Rezayof, A., & Nourjah, P. (2005). Involvement of the ventral tegmental area (VTA) in morphine-induced memory retention in morphine-sensitized rats. *Behavioral Brain Research , 163*, 100-106.

Zarrindast, M. R., Nouraei, N., Khalilzadeh, A., & Askari, E. (2006). Influence of acute and sub-chronic nicotine pretreatment on morphine state-dependent learning. *Behavioral Brain Research, 173*, 268-273.

Zarrindast M. R., & Rezayof, A. (2004) Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *European Journal of Pharmacology, 497*, 197-204.

Archive of SID

www.SID.ir