Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(87): 19-30

The inhibition of Nucleus accumbens cholinergic receptors decreased memory retention in rat

Rezayof A [1], Zarrindast MR [2], Darbandi N[3*]

1- University College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran.

Received:6 May 2014, Accepted: 11 Jun 2014

Abstract

Background: It is well known that morphine influence learning and memory processes. The Nucleus accumbens (N.ac) which has an important role in reward participates in morphine-induced impairment of memory retention. Considering the cholinergic system is involved in the effects of morphine on learning and memory, in the present study, the effects of intra-N.ac injections of acetylcholine receptor antagonists alone or with morphine on memory retention and morphine-induced memory has been investigated in rats.

Materials and Methods: In this original research animals were bilaterally cannulated in the N.ac and a step-through passive avoidance task was used for the assessment of memory retention .

Results: Post-training subcutaneous administration of morphine dose dependently decreased the learning and induced amnesia. The administration of the same dose of morphine as pre-test treatment induced state-dependent learning. Pre-test intra- N.ac administration of atropine, scopolamine and mecamylamine in different doses alone cannot affect on memory retention. While, pretest intra- N.ac injection of these drugs before the administration of morphine dose dependently inhibited morphine state-dependent learning. The level of statistical significance was set at $p<0.05$.

Conclusion: The processes of learning in animals can be affected by morphine and the opioids produce state-dependent learning. Moreover, it can be concluded that inactivation of the muscarinic and nicotinic acethylcoline receptors in the N.ac are involved in mediating morphine state-dependent learning.

Keywords: Atropine, Mecamylamine, Memory, Morphine, Passive avoidance learning, Scopolamine

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran. P. O. Box 38156-8-8349 Arak, Iran
Email: N-Darbandi@araku.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۷، شماره۶ (شماره پیاپی۸۷)، شهریور ۱۳۹۳، ۳۰-۱۹

مهار گیرنده های کولینرژیک هسته آکومبنس باز خوانی حافظه را در موش بزرگ آزمایشگاهی کاهش داد

آمنه رضایوف[۱]، محمد رضا زرین‌دست[۲]، نیلوفر دربندی[۳*]

۱- استاد، گروه فیزیولوژی جانوری، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: مورفین در فرآیندهای حافظه و یادگیری دخالت داشته و هسته آکومبنس با داشتن نقش کلیدی در مسیر پاداش در حافظه القاء شده توسط مورفین شرکت دارد. با توجه به نقش سیستم کولینرژیک در میانجی گری اثرات مورفین بر حافظه و یادگیری، در مطالعه حاضر اثرات تزریق آنتاگونیست‌های سیستم کولینرژیک، آتروپین، اسکوپولامین و مکامیل آمین در هسته آکومبنس به تنهایی و یا همراه با مورفین بر به خاطر آوری حافظه و یادگیری وابسته به حالت مورفین بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پژوهشی اصیل رت‌ها به صورت دوطرفه در هسته آکومبنس کانول گذاری شده و بازخوانی حافظه به روش اجتنابی غیر فعال بررسی شد. سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تزریق زیر جلدی مورفین پس از آموزش به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش بازخوانی حافظه شد، در حالی که تزریق مجدد مورفین در روز آزمون منجر به حافظه وابسته به وضعیت مورفین گردید. تزریق آتروپین، مکامیل آمین و اسکوپولامین در دوزهای مختلف به تنهایی به داخل هسته آکومبنس نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را در بازخوانی حافظه نشان نداند اما تزریق پیش از آزمون این داروها قبل از تزریق مورفین به صورت وابسته به دوز یادگیری وابسته به حالت مورفین را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: حافظه در حیوانات می‌تواند تحت تاثیر مورفین قرار گرفته و اوپیوئیدها قادر به ایجاد یادگیری وابسته به حالت می‌باشند. غیرفعال سازی گیرنده‌های استیل کولینی در هسته آکومبنس در میانجی‌گری یادگیری وابسته به حالت مورفین دخالت دارد.

واژگان کلیدی: آتروپین، مکامیل آمین، حافظه، مورفین، یادگیری اجتنابی مهاری، اسکوپولامین

***نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.

Email:N-Darbandi@araku.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مطالعات زیادی حاکی از آن است که مورفین و سایر اپیوئیدها در فرآیندهای حافظه و یادگیری دخالت دارند(۱، ۲). مورفین منجر به القاء اثرات فراموشی در مدل‌های مختلف حافظه می‌گردد(۳، ۴). مطالعات قبلی نشان داده است که تزریق پیش یا پس ازآموزش مورفین به طور وابسته به دوز و زمان منجر به تخریب حافظه در مدل‌های یادگیری اجتنابی غیرفعال می‌گردد(۵، ۶). باید خاطر نشان کرد که تزریق پس از آموزش مورفین منجر به کاهش به خاطر آوری حافظه و القاء فراموشی می‌گردد، در حالی که تزریق مجدد مورفین پیش از آزمون به خاطر آوری حافظه را تسهیل می‌نماید. این فرآیند یادگیری وابسته به حالت مورفین نام دارد این نوع از یادگیری نشان می‌دهد که اطلاعاتی که تحت تاثیر دارویی خاص آموخته شده است، تنها زمانی فراخوانی می شود که حیوان تحت تاثیر همان دارو قرار گیرد(۵، ۷).

سیستم دوپامینرژیک مزوکورتیکولیمبیک که از ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) به طرف هسته آکومبنس (Nucleus Accumbens-N.ac) ، آمیگدال، کورتکس پیش‌پیشانی (pre frontal cortex) و سایر نواحی مغز جلویی کشیده شده است در میانجی گری اثرات پاداشی مورفین دخالت دارد(۸، ۹). شکمی‌ترین بخش استریاتوم هسته آکومبنس نام دارد که گاهی تحت عنوان استریاتوم شکمی (ventral striatum) نیز نامیده می‌شود. هسته آکومبنس از طرف فوقانی جانبی در ارتباط با هسته دمدار و از طرف داخلی در ارتباط با هسته‌های سپتال بوده و به دو بخش مرکزی و قشری تقسیم می‌شود(۱۰). نواحی قشری این هسته در ارتباط با نواحی زیر قشری لیمبیک از جمله پالیدوم شکمی، هیپوتالاموس جانبی و ناحیه تگمنتوم شکمی است. در حالی که بخش مرکزی به طور وسیع در ارتباط با عقده‌های قاعده‌ای مغز، هسته‌های تالاموسی و ماده سیاه می‌باشد. بنابراین می‌توان چنین بیان نمود که بخش مرکزی این هسته بیشتر مربوط به اعمال حرکتی است، در حالی که بخش قشری در ارتباط با مکانیسم‌های احشایی و انگیزشی می‌باشد(۱۰). به نظر می‌رسد که بخش قشری این هسته در تنظیم مثبت اکتساب حافظه، حداقل در مدل‌های حافظه وابسته به هیپوکامپ دخالت دارد. تخریب این بخش، به کمک الکترولیت‌ها منجر به نقص در مرحله اکتساب حافظه در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در مدل مازشعاعی می‌گردد. در دهه اخیر مطالعات وسیع الکتروفیزیولوژی ونوروسایکولوژی موید این نظریه است که هسته آکومبنس در سیستم پاداش و لذت دخالت بسزایی دارد(۱۰).

هسته آکومبنس آوران‌هایی را از تشکیلات هیپوکامپ، آمیگدال، هسته‌های تالاموسی میانی و قشر پیش پیشانی میانی دریافت می‌کند که این آوران‌ها بر روی نورون‌های خاردار آکومبنس همگرا می‌شوند این آوران‌های گلوتاماترژیک در بسیاری از رفتارهای هدفمند که به هسته آکومبنس نسبت داده می‌شود، از جمله رفتار جستجوی دارو دخالت دارند(۱۱).

هسته آکومبنس ورودی‌های دوپامینرژیک زیادی را از ناحیه تگمنتوم شکمی دریافت می‌کند. مسیر دوپامینرژیک لیمبیک از VTA شروع شده و به بخش قشری هسته آکومبنس و استریاتوم شکمی میانی ختم می‌شود. این مسیر تحت تاثیر داروهای اعتیادآور مختلفی از جمله کوکائین، آمفتامین، هروئین، مورفین، نیکوتین و الکل قرار دارد. هم‌چنین مطالعات زیادی نشان می‌دهد که مسیر دوپامینی مزولیمبیک علاوه بر اعمال داروهای اعتیادآور، با پاداش، تقویت و جنبه‌هایی از اسکیزوفرنی در ارتباط است(۱۱). اوپیوئیدها با مهار نورون‌های رابط گابائرژیک، نورون‌های دوپامینی مزولیمبیک را فعال کرده و در نتیجه آزادسازی دوپامین در هسته آکومبنس را افزایش می‌دهند. این فعال شدن منجر به ایجاد سرخوشی و پاداش می‌گردد(۱۲). یک حلقه مهم عملی بین هیپوکامپ و VTA وجود دارد که ورود اطلاعات به حافظه طولانی مدت را تنظیم می‌کند(۱۲). شواهد نشان می‌دهد که ارتباطات داخلی عملی بین مورفین و سایر نوروترنسمیترها از جمله دوپا مین، گلوتامات، استیل کولین، گابا و نیتریک اکساید نیز در میانجی‌گری مراحل یادگیری و پاداش دخالت دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

شواهد فارماکولوژیک نشان می‌دهد که سیستم کولینرژیک در اثرات مورفین بر حافظه دخالت دارد(۱۲). شواهد فارماکولوژیک نشان می‌دهد که سیستم کولینرژیک در اثرات مورفین بر حافظه دخالت دارد. تزریقات مرکزی و محیطی آگونیست‌های سیستم کولینرژیک باعث تقویت حافظه و یادگیری می‌شوند، در حالی که تزریق آنتاگونیست‌های آن و یا تخریب سیستم کولینرژیک منجر به تخریب حافظه می‌گردد(۱۳، ۱۴).

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 فرایندهای حافظه و یادگیری انجام نشده است. هدف مطالعه حاضر بررسی مکانیسم‌های موسکارینی و نیکوتینی ناحیه هسته آکومبنس بر یادگیری وابسته به حالت مورفین است.

مواد روش‌ها

در این مطالعه پژوهشی اصیل از رت‌های نر نژاد ویستار (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) با محدوده وزنی۲۵۰- ۲۲۰ گرم استفاده شد. در راستای انجام این تحقیق کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مد نظر قرار گرفته شد. این حیوانات به صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری و برای عادت کردن به محیط جدید حدود یک هفته قبل از شروع آزمایش، به حیوانخانه منتقل شدند. محل نگهداری حیوانات دارای دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی هفت صبح)، 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 بارآزمایش می‌شد.

ازکتا مین هیدروکلراید و زایلزین به عنوان داروهای بیهوشی و به صورت درون صفاقی استفاده شد. سولفات مورفین از شرکت تماد ایران و آتروپین، اسکوپولامین و مکامیل آمین از شرکت سیگما، آمریکا تهیه شدند. تمامی داروها در نرمال سالین (۰/۹ درصد) حل شده، مورفین به صورت زیر جلدی (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و داروهای دیگر به صورت درون مغزی تزریق شد. در گروه‌های کنترل تزریق نرمال سالین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) صورت گرفت.

جهت جراحی و کانول گذاری در ناحیه هسته آکومبنس ابتدا هر موش بر اساس وزن به وسیله تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) وزایلزین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شد. مختصات ناحیه N.ac بر اساس اطلس پاکسینوس (Paxinos) و واتسون (Watson) به دست آمد (۱ میلی‌متر به سمت جلو از برگما، ۱ میلی‌متر در طرفین شکاف ساژیتال و ۵/۵ میلی‌متر به طرف پایین از سطح جمجمه). در سطح جمجمه محل کانول گذاری توسط مته دندانپزشکی تا پرده مننژ سوراخ شد. کانول‌های راهنما به طول ۱۳ میلی‌متر از سرسوزن ۲۳ گیج تهیه شده و به صورت دو طرفه در محل‌های سوراخ شده، حدود ۲ میلی‌متر بالاتر از ناحیه مورد نظر به کمک آکریل دندانپزشکی ثابت شد. برای جلوگیری از بسته شدن کانول راهنما قبل از تزریق، سر سوزن‌های دندانپزشکی به شماره ۳۰ گیج که به اندازه طول کانول راهنما بریده می‌شد، در داخل آن قرار گرفت.

پس از یک هفته و طی شدن دوره بهبودی، برای تزریق دارو حیوان به آرامی توسط دست گرفته شد. سر سوزن ۳۰ گیج از کانول راهنما خارج شده و به کمک سر سوزن دندانپزشکی ۲۷ گیج (که ۲میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما بریده شده بود)، رابط پلی اتیلن و سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتری تزریقات مرکزی انجام شد. 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 تاخیر ۳۰ تا ۶۰ ثانیه ای پس ازتزریق خارج شد.

در پایان آزمایش برای ارزیابی صحت عملیات و درستی مختصات محل جراحی و تزریق، مقدار۱ میکرولیتر

www.SID.ir

Archive of SID

از محلول ۱ درصد آبی متیلن بلو به صورت دو طرفه تزریق شده، مغز حیوان از جمجمه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۱۰روز ثابت شد. برش گیری در ناحیه تزریق و برسی توزیع رنگ در فضای هسته آکومبنس بیان‌گر میزان صحت کانول گذاری بود. داده‌های حیواناتی که محل کانول گذاری آنها خارج از ناحیه هسته آکومبنس بود از آنالیزها حذف شد.

دستگاه سنجش حافظه از جنس پلکسی گلاس و دارای دو سمت مجزا یکی به رنگ سیاه (۳۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر) و دیگری به رنگ سفید (۳۰×۲۰×۲۰سانتی‌متر) است که توسط یک درب 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.

یادگیری اجتنابی غیر فعال به روش «گذر از یک بخش دستگاه به بخش دیگر» (Step through) 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(۵).

۱ – در روز آموزش هر موش با احتیاط در درون بخش سفید دستگاه قرار گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی بالا رفت. مدت زمانی که طی شد تا موش وارد خانه سیاه شود، ثبت گردید. حیواناتی که بیش از ۱۰۰ ثانیه در خانه سفید باقی می‌ماندند از آزمایش حذف شدند. زمانی که حیوان با ۴ پا وارد خانه سیاه شد درب گیوتینی پایین آمده و حیوان به قفس خود برگردانیده می‌شد. ۳۰ دقیقه بعد دو باره حیوان در خانه سفید قرار می‌گرفت و پس از ۵ ثانیه درب 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 درب 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 غیر فعال 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 درب گیوتینی بالا می‌رفت و مدت زمان تاخیر 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 Cut off ۳۰۰ ثانیه بود.

آزمایش‌های انجام شده در این پژوهش عبارتند از:

۱- آزمایش اول: اثر تزریق مورفین پس از آموزش و قبل از آزمون بر روی حافظه اجتنابی مهاری: در یک گروه آزمایشی حیوانات مورد نظر به ترتیب پس از آموزش، سالین (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم) و یا دوزهای مختلف مورفین (۷/۵، ۵، ۲/۵، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت زیر جلدی دریافت نمودند. به کلیه گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد، ۳۰ دقیقه قبل از آزمون سالین (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم) تزریق شد. در گروه آزمایشی دیگر به حیوانات مورد نظر به ترتیب پس از آموزش، مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی تزریق و ۲۴ ساعت بعد، ۳۰ دقیقه قبل از آزمون سالین (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم) و یا دوزهای مختلف مورفین را (۷/۵، ۵، ۲/۵، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی دریافت نمودند.

۲- آزمایش دوم: اثر تزریق قبل از آزمون آتروپین بر به خاطر آوری حافظه در حضور یا عدم حضور مورفین: در یک گروه آزمایشی حیوانات مورد نظر به ترتیب

www.SID.ir

Archive of SID

پس از آموزش، سالین (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی دریافت نمودند. در روز آزمون ابتدا حیوانات سالین (۱ μg/rat) و یا دوزهای مختلف آتروپین (μg/rat ۱، ۰/۷۵، ۰/۵) را به صورت داخل هسته آکومبنس دریافت کرده، ۵ دقیقه پس از آن به کلیه گروه‌ها سالین (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی تزریق و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند. در گروه آزمایشی دیگر حیوانات مورد نظر به ترتیب پس از آموزش، مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیرجلدی دریافت نمودند. در روز آزمون ابتدا حیوانات سالین (۱ μg/rat) و یا دوزهای مختلف آتروپین (μg/rat ۱، ۰/۷۵، ۰/۵) را به صورت داخل هسته آکومبنس دریافت کرده، ۵ دقیقه پس از آن به کلیه گروه‌ها مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی تزریق و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند.

۳- آزمایش سوم: اثر تزریق قبل از آزمون اسکوپولامین بر به خاطر آوری حافظه در حضور یا عدم حضور مورفین: در یک گروه آزمایشی حیوانات مورد نظر به ترتیب پس از آموزش، سالین (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) به صورت زیرجلدی دریافت نمودند. در روز آزمون ابتدا حیوانات سالین (۱ μg/rat) و یا دوزهای مختلف اسکوپولامین (μg/rat ۱، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵) را به صورت داخل هسته آکومبنس دریافت کرده، ۵ دقیقه پس از آن به کلیه گروه‌ها سالین (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی تزریق و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند. در گروه آزمایشی دیگر حیوانات مورد نظر به ترتیب پس از آموزش، مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیرجلدی دریافت نمودند. در روز آزمون ابتدا حیوانات سالین (۱ μg/rat) و یا دوزهای مختلف اسکوپولامین (μg/rat ۱، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵) را به صورت داخل هسته آکومبنس دریافت کرده، ۵ دقیقه پس از آن به کلیه گروه‌ها مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی تزریق و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند.

۴- آزمایش چهارم: اثر تزریق قبل از آزمون مکامیل آمین بر به خاطر آوری حافظه در حضور یا عدم حضور مورفین: در یک گروه آزمایشی حیوانات مورد نظر به ترتیب پس از آموزش، سالین (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) به صورت زیرجلدی دریافت نمودند. در روز آزمون ابتدا حیوانات سالین (۱ μg/rat) و یا دوزهای مختلف مکامیل آمین (μg/rat ۱، ۰/۷۵، ۰/۵) را به صورت داخل هسته آکومبنس دریافت کرده، ۵ دقیقه پس از آن به کلیه گروه‌ها سالین (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی تزریق و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند. در گروه آزمایشی دیگر حیوانات مورد نظر به ترتیب پس از آموزش، مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیرجلدی دریافت نمودند. در روز آزمون ابتدا حیوانات سالین (۱ μg/rat) و یا دوزهای مختلف مکامیل آمین (μg/rat ۱، ۰/۷۵، ۰/۵) را به صورت داخل هسته آکومبنس دریافت کرده، ۵ دقیقه پس از آن به کلیه گروه‌ها مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر جلدی تزریق و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند.

در کلیه آزمایش‌های انجام شده به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی، از روش تحلیل واریانس (ANOVA) یک عاملی به دنبال آن از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید و سطح معنی داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری و رسم نمودارها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و Sigmaplot نسخه ۱۰ استفاده شد.

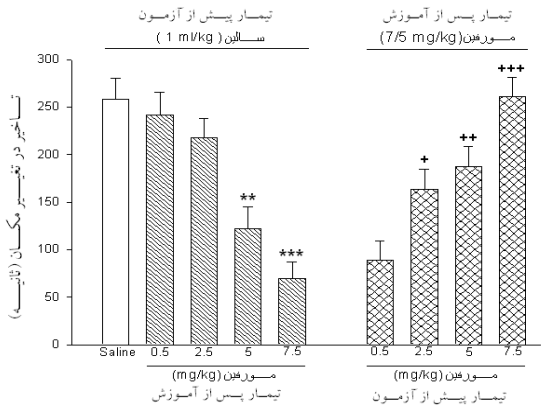
یافته‌ها

اثر تزریق مورفین پس از آموزش و قبل از آزمون بر روی حافظه اجتنابی مهاری: همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، در مقایسه با گروه کنترل (سالین-سالین)، در سایر گروه‌ها تزریق زیر جلدی مورفین (۷/۵، ۵، ۲/۵، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از آموزش به طور وابسته به دوز منجر به خرابی حافظه و ایجاد فراموشی شده است. نمودار ۱ هم‌چنان نشان می‌دهد در حیواناتی که تحت تاثیر تزریق پس از آموزش مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) حافظه تخریب شده است (فراموشی ناشی از

www.SID.ir

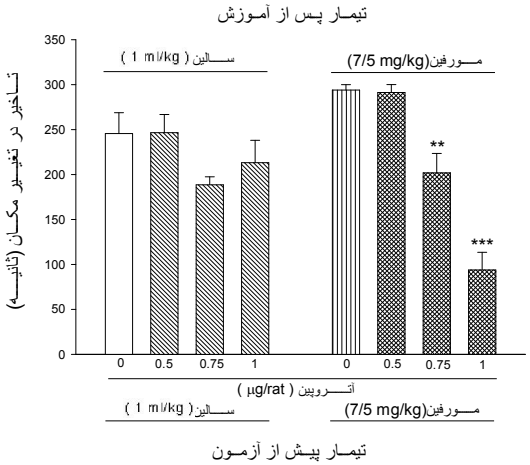
Archive of SID

مورفین)، تزریق زیر جلدی پیش از آزمون مورفین (۷/۵، ۵، ۲/۵، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه کنترل به طور وابسته به دوز منجر به بازخوانی حافظه می‌شود که این بیان‌گر حافظه وابسته به وضعیت مورفین است. حداکثر باز خوانی حافظه در دوز ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین مشاهده شد.



نمودار ۱. اثرات تزریق مورفین پس از آموزش و قبل از آزمون بر روی حافظه اجتنابی مهاری
هر ستون نمایانگر میانگین±خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه است. p <۰/۰۱ ** و p <۰/۰۰۱ * در مقایسه با گروه سالین - سالین. p <۰/۰۵ + ، p <۰/۰۰۱ ++ و p <۰/۰۰۰۱ +++ در مقایسه با گروه مورفین - سالین مرتبط می باشد.**

اثر تزریق قبل از آزمون آتروپین بر به خاطر آوری حافظه در حضور یا عدم حضور مورفین: گروه‌های آزمایشی، تیمارهای انجام شده و نتایج اثر تزریق قبل از آزمون مقادیر مختلف آتروپین در ناحیه هسته آکومبنس به تنهایی و یا در حضور مورفین بر به خاطر آوری حافظه در نمودار ۲ نشان داده شده است. آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه اختلاف معنی‌داری را بین اثرات آتروپین به تنهایی و همراه با مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در به خاطر آوری حافظه نشان می‌دهد. هم‌چنین آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های سالین - آتروپین با گروه کنترل سالین - سالین دیده نشد. علاوه بر آن تزریق پیش از آزمون آتروپین در گروه‌های مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) - مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، منجر به کاهش به خاطر آوری حافظه شد.

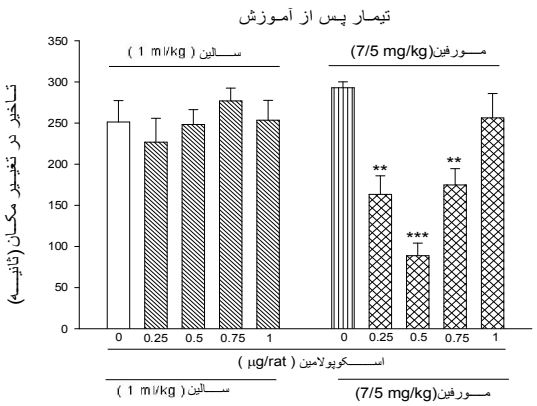


نمودار ۲. اثرات تزریق آتروپین قبل از آزمون به تنهایی یا همراه با مورفین بر روی حافظه اجتنابی مهاری
هر ستون نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه می باشد. p <۰/۰۱ ** و p <۰/۰۰۱ * در مقایسه با گروه مورفین _ مورفین است.**

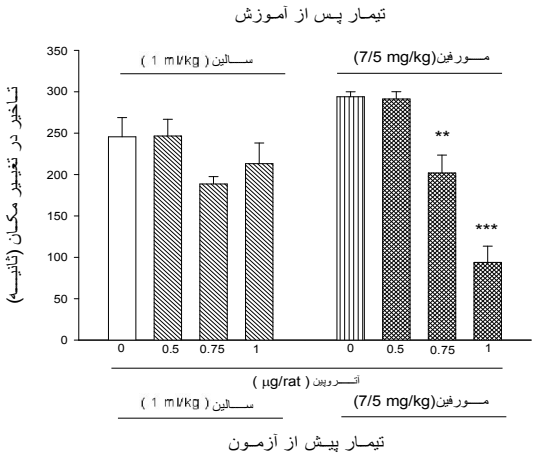
اثر تزریق قبل از آزمون اسکوپولامین بر به خاطر آوری حافظه در حضور یا عدم حضور مورفین: گروه‌های آزمایشی، تیمارهای انجام شده و نتایج اثر تزریق قبل از آزمون مقادیر مختلف اسکوپولامین در ناحیه هسته آکومبنس به تنهایی و یا در حضور مورفین بر به خاطر آوری حافظه در نمودار ۳ نشان داده شده است. آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه اختلاف معنی‌داری را بین اثرات اسکوپولامین به تنهایی و همراه با مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در به خاطر آوری حافظه نشان می‌دهد. هم‌چنین آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های سالین - اسکوپولامین با گروه کنترل سالین - سالین دیده نشد. علاوه بر آن تزریق پیش از آزمون اسکوپولامین در گروه‌های مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) - مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، منجر به کاهش به خاطر آوری حافظه شد.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳ . اثرات تزریق اسکوپولامین قبل از آزمون به تنهایی یا همراه با مورفین بر روی حافظه اجتنابی مهاری
هر ستون نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه می باشد. $p < ۰/۰۱$ ** و $p < ۰/۰۰۱$ * در مقایسه با گروه مورفین - مورفین است.**



نمودار ۴. اثرات تزریق مکامیل آمین قبل از آزمون به تنهایی یا همراه با مورفین بر روی حافظه اجتنابی مهاری
هر ستون نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه می باشد. $p < ۰/۰۵$ * و $p < ۰/۰۰۱$ * در مقایسه با گروه مورفین _ مورفین است.**

اثر تزریق قبل از آزمون مکامیل آمین بر به خاطر آوری حافظه در حضور یا عدم حضور مورفین: گروه‌های آزمایشی، تیمارهای انجام شده و نتایج اثر تزریق قبل از آزمون مقادیر مختلف مکامیل آمین در ناحیه هسته آکومبنس به تنهایی و یا در حضور مورفین بر به خاطر آوری حافظه در نمودار ۴ نشان داده شده است. آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه اختلاف معنی‌داری را بین اثرات مکامیل آمین به تنهایی و همراه با مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در به خاطر آوری حافظه نشان می‌دهد. هم‌چنین آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های سالین - مکامیل آمین با گروه کنترل سالین - سالین دیده نشد.علاوه بر آن تزریق پیش از آزمون مکامیل آمین در گروه‌های مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) - مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، منجر به کاهش به خاطر آوری حافظه شد.

بحث

داده‌های حاصل نمایان‌گر آن است که تزریق زیر جلدی 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 ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین دیده شد. هم‌چنین نتایج حاصل نشان می‌دهد که تزریق پیش از آزمون مورفین باعث به خاطر آوری حافظه در مقایسه با گروه کنترل و القاء حافظه وابسته به حالت مورفین می‌گردد. علاوه بر آن تزریق مقادیر مختلف آتروپین، اسکوپولامین و مکامیل آمین به تنهایی به داخل هسته آکومبنس در حیواناتی که پس از آموزش سالین دریافت کرده بودند، تاثیر معنی‌داری در باز خوانی حافظه نداشت. اما تزریق همان مقادیر در ناحیه هسته آکومبنس به همراه تزریق زیرجلدی مورفین در حیواناتی که پس از آموزش تزریق مورفین داشتند به طور معنی‌داری بازخوانی حافظه را کاهش داده و منجر به القاء فراموشی شد.

در تائید مطالعه حاضر، مطالعات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد مورفین به طور وابسته به دوز و زمان بر به خاطرآوری حافظه اثر دارد(۴). مطالعات متعددی نقش احتمالی سیستم‌های نورترانسمیتری مختلف را بر یادگیری وابسته به حالت مورفین مورد بررسی قرارداده‌اند. با این

www.SID.ir

Archive of SID

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. شواهد حاکی از آن است که سیستم کولینرژیک ناحیه مزولیمبیک در میانجی گری پاداش مورفین دخالت دارد. مطالعات زرین دست و همکاران نشان داده است که تزریق سیستمیک نیکوتین قبل از آزمون منجر به از بین رفتن فراموشی القاء شده توسط تزریق پیش از آموزش مورفین در موش‌های سوری می‌گردد(۱۵). هم‌چنین تحریک گیرنده‌های نیکوتینی آزاد شدن دوپامین را در هسته آکومبنس افزایش می‌دهد(۱۶).

نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌تواند توسط تحقیقاتی تائید شود که نشان می‌دهند، تزریق کارباکول(آگونیست غیراختصاصی استیل کولین) به سابیکولوم شکمی منجر به افزایش ترشح دوپامین در هسته آکومبنس می‌گردد. این اثر بواسطه تزریق هم‌زمان آتروپین کاهش می‌یابد(۱۷). آتروپین قادر به مهار آزادسازی دوپامین ناشی از نیکوتین می‌باشند(۱۸). اسکوپولامین بلوک کننده غیر اختصاصی گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین بوده و هنگامی که به صورت پیش یا پس از آموزش تزریق گردد دارای اثرات مخرب بر مراحل اکتساب و تثبیت حافظه است(۱۹). نتایج تحقیقات نشان داده است که اشغال گیرنده‌های موسکارینی پس از آموزش در هسته آکومبنس هم‌چنین دارای اثرات مخرب بر مراحل تثبیت حافظه است که بیشتر مقادیر پایین اسکوپولامین دارای این اثرات می‌باشند. این اثرات وابسته به مقدار، احتمالا به واسطه اعمال متفاوت دارو بر گیرنده‌های موسکارینی نوع هترو یا اتو می‌باشد.

اسکوپولامین با اشغال هتروسپتورها که بر روی نورون‌های هدف کلینرژیک در هسته آکومبنس قرار گرفته‌اند منجر به جلوگیری از انتقال پیام موسکارینی می‌شوند(۱۴). علاوه بر آن اشغال اتورسپتورها با اسکوپولامین منجر به افزایش آزادسازی استیل کولین از نورون‌های کولینرژیک در این هسته می‌گردد(۲۰). ظاهرا هتروسپتورها نسبت به اسکوپولامین حساسیت بالاتری داشته و لذا مقادیر پایین دارو باعث بلوک این گیرنده‌های موسکارینی روی نورون‌های هدف کولینرژیک شده در حالی که مقدارهای بالاتر دارو به دلیل بلوک اتورسپتورهای موسکارینی منجر به افزایش رهایش استیل کولین می‌گردد که سپس این استیل کولین آزاد شده روی گیرنده‌های نیکوتینی که به واسطه اسکوپولامین بلوک نمی‌شوند، اثر می‌گذارد(۲۱).

هم‌چنین برخی تحقیقات نشان داده است که اسکوپولامین دارای اثرات مخرب بر حافظه در متدهای مختلف یادگیری است. تزریق بلافاصله پس از آموزش آن در مقادیرکم منجر به اختلال در مراحل تثبیت حافظه می‌گردد(۲۲). علاوه بر اثرات فراموشی ناشی از تزریق اسکوپولامین به نظر می‌رسد که این دارو حداقل هنگامی که به شکل سیستمیک تزریق می‌گردد دارای اثرات اضطراب زایی و افزایش فعالیت حرکتی نیز می‌باشد. البته افزایش فعالیت حرکتی آن با اثرات فراموشی و اضطراب زایی آن قابل توجیه نبوده و احتمالا با دوره‌های شبانه روزی درارتباط می‌باشد(۲۳). مکانیسم‌های فیزیولوژیک در تغییرات هسته آکومبنس وابسته به زمان تزریق دارو و نوع آن می‌باشد.

نتایج حاصل از تزریق مکامیل آمین در این پژوهش در توافق با یافته‌های دیگری است که نشان می‌دهد مکامیل آمین منجر به اختلال در توانایی یادگیری می‌گردد(۲۴). تزریق مکامیل آمین در ناحیه CA۱ هیپوکامپ پشتی(۲۵) و به داخل تگمنتوم شکمی(۲۶) منجر به کاهش ترجیح مکان شرطی شده می‌شود. تحقیقات هم‌چنین نشان داده است که مکامیل آمین اعمال مرکزی نیکوتین از جمله رهایش دوپامین را مهار می‌نماید(۲۷). احتمالا مکامیل آمین کاهش رهایش دوپامین القاء شده توسط نیکوتین را از طریق مهار بازجذب دوپامین در هسته آکومبنس میانجی گیری می‌کند(۲۷). مکامیل آمین هم‌چنین افزایش دوپامین خارج سلولی القاء شده توسط اتانل را درهسته آکومبنس مهار می‌نماید. تزریق پس از آموزش نیکوتین و یا آنتاگونیست

www.SID.ir

Archive of SID

نیکوتینی، مکامیل آمین قادر است تا بر یادگیری و عادت اثر بگذارد که بستگی به نوع دارو، مقدار آن، زمان تزریق و چگونگی و روش اندازه‌گیری رفتار دارد. نیکوتین به طور وابسته به مقدار دارای اثرات افزایش دهنده حافظه بوده، در صورتی که آنتاگونیست آن به طور وابسته به مقدار منجر به خراب شدن حافظه و القاء فراموشی است هم‌چنین مشخص شده است که تزریق مکامیل آمین در هسته آکومبنس پس از آموزش منجر به افزایش فعالیت حرکتی حیوان در روز آزمون می‌گردد. به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های دیگری غیر از فراموشی در فعالیت آنتاگونیست‌های گیرنده‌های کولینرژیک دخالت دارد. احتمالا این اثرات ناشی از اثر این داروها برتغییرات هیجانی و برانگیزاننده باشد(۲۷).

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به کوچک بودن هسته مورد نظر و مشکل بودن کانول گذاری در این ناحیه اشاره نمود. علاوه بر آن گرچه نتایج فوق موید آن است که گیرنده‌های کولینرژیک هسته آکومبنس نقش مهمی در یادگیری وابسته به حالت مورفین دارند ولی برای بیان دقیق‌ترآن می‌توان از مطالعات ایمونوهیستوشیمی و ایمونوبلات به منظور تعیین نوع گیرنده‌ها و تعیین پروتئین‌های دخیل در مسیرهای پیام رسانی استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

از نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد که مهار گیرنده‌های نیکوتینی و موسکارینی استیل کولین در هسته آکومبنس توسط تزریق مقادیر مختلف مکامیل آمین، آتروپین و اسکوپولامین در این ناحیه به همراه تزریق زیر جلدی مورفین در حیواناتی که پس از آموزش مورفین دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری باز خوانی حافظه را کاهش داده و منجر به القاء فراموشی شد. لذا به نظر می‌رسد که گیرنده‌های کولینرژیک موجود در ناحیه مزولیمبیک بر عملکرد سیستم دوپامینرژیک مزوکورتیکولیمبیک اثر داشته و تداخل عمل این دو در القاء ااثرات مورفین در فرایندهای حافظه و یادگیری دخالت دارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان نامه دکتری با عنوان بررسی دخالت گیرنده‌های کولینرژیک ناحیه مزولیمبیک در یادگیری وابسته به حالت مورفین است که در دانشکده علوم دانشگاه تهران به انجام رسیده است. بدین منظور از زحمات فراوان کارشناسان و مسئولین آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Rezayof A, Sardari M, Zarrindast M-R, Nayer-Nouri T. Functional interaction between morphine and central amygdala cannabinoid CB1 receptors in the acquisition and expression of conditioned place preference. Behavioural brain research. 2011;220(1):1-8.
2. Lu L, Zeng S, Liu D, Ceng X. Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats. Neuroscience letters. 2000;291(3):191-5.
3. Ardjmand A, Rezayof A, Zarrindast M-R. Involvement of central amygdala NMDA receptor mechanism in morphine state-dependent memory retrieval. Neuroscience research. 2011;69(1):25-31.
4. Darbandi N, Rezayof A, Zarrindast M-R. Modulation of morphine state-dependent learning by muscarinic cholinergic receptors of the ventral tegmental area. Physiology & behavior. 2008;94(4):604-10.
5. Zarrindast M-R, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. European journal of pharmacology. 2004;497(2):197-204.
6. Zarrindast M-R, Farajzadeh Z, Rostami P, Rezayof A, Nourjah P. Involvement of the ventral tegmental area (VTA) in morphine-induced memory retention in morphine-sensitized rats. Behavioural brain research. 2005;163(1):100-6.
7. Khavandgar S, Homayoun H, Zarrindast MR. The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-

www.SID.ir

Archive of SID

dependent learning induced by morphine in mice. Psychopharmacology. 2003;167(3):291-6.
8. Rezayof A, Darbandi N, Zarrindast M-R. Nicotinic acetylcholine receptors of the ventral tegmental area are involved in mediating morphine-state-dependent learning. Neurobiology of learning and memory. 2008; 90(1): 255-60.
9. Almasi-Nasrabadi M, Javadi-Paydar M, Mahdavian S, Babaei R, Sharifian M, Norouzi A, et al. Involvement of NMDA receptors in the beneficial effects of pioglitazone on scopolamine-induced memory impairment in mice. Behavioural brain research. 2012; 231(1): 138-45.
10. Lopez J, Almaguer W, Perez H, Frey J, Bergado J. Opposite effects of shell or core stimulation of the nucleus accumbens on long-term potentiation in dentate gyrus of anesthetized rats. Neuroscience. 2008; 151(2): 572-8.
11. Zhou W, Liu H, Zhang F, Tang S, Zhu H, Lai M, et al. Role of acetylcholine transmission in nucleus accumbens and ventral tegmental area in heroin-seeking induced by conditioned cues. Neuroscience. 2007;144(4):1209-18.
12. Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. Neuron. 2005;46(5):703-13.
13. Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. Neurobiology of learning and memory. 2003;80(3):178-93.
14. Van der Staay FJ, Bouger P, Lehmann O, Lazarus C, Cosquer B, Koenig J, et al. Long-term effects of immunotoxic cholinergic lesions in the septum on acquisition of the cone-field task and noncognitive measures in rats. Hippocampus. 2006;16(12):1061-79.
15. Zarrindast M-R, Nouraei N, Khallilzadeh A, Askari E. Influence of acute and sub-chronic nicotine pretreatment on morphine state-dependent learning. Behavioural brain research. 2006; 173(2):268-73.
16. Clarke P, Fu DS, Jakubovic A, Fibiger HC. Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1988; 246(2): 701-8.
17. Moss S, Sharott A, Goodhead LH, Mitchell SN. Role of muscarinic receptors in the activation of the ventral subiculum and the consequences for dopamine release in the nucleus accumbens. European journal of pharmacology. 2003;460(2):117-25.
18. Alijanpour S, Rezayof A, Zarrindast MR. Dorsal hippocampal cannabinoid CB1 receptors mediate the interactive effects of nicotine and ethanol on passive avoidance learning in mice. Addiction biology. 2013;18(2):241-51.
19. Da Silva AL, da Silva Martins B, de Moura Linck V, Herrmann AP, Mai N, Nunes DS, et al. MK801-and scopolamine-induced amnesias are reversed by an Amazonian herbal locally used as a “brain tonic”. Psychopharmacology. 2009;202(1-3):165-72.
20. Fadda P, Robinson L, Fratta W, Pertwee RG, Riedel G. Scopolamine and MK801-induced working memory deficits in rats are not reversed by CBD-rich cannabis extracts. Behavioural brain research. 2006;168(2):307-11.
21. Cheng L-L, Chen X-N, Wang Y, Yu L, Kuang X, Wang L-L, et al. Z-ligustilide isolated from Radix< i> Angelicae sinensis</i> ameliorates the memory impairment induced by scopolamine in mice. Fitoterapia. 2011; 82(7): 1128-32.
22. Schildein S, Huston J, Schwarting RK. Injections of tacrine and scopolamine into the nucleus accumbens: Opposing effects of immediate vs delayed posttrial treatment on memory of an open field. Neurobiology of learning and memory. 2000;73(1):21-30.
23. Mena-Segovia J, Winn P, Bolam J. Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. Brain research reviews. 2008; 58(2):265-71.
24. Hiramatsu M, Watanabe E. Dynorphin A (2-13) improves mecamylamine-induced learning impairment accompanied by reversal of reductions in acetylcholine release in rats. Neuropeptides. 2006;40(1):47-56.
25. Rezayof A, Zatali H, Haeri-Rohani A, Zarrindast M-R. Dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors are involved

www.SID.ir

Archive of SID

in mediating morphine reward. Behavioural brain research. 2006; 166(2):281-90.
26. Rezayof A, Nazari-Serenjeh F, Zarrindast M-R, Sepehri H, Delphi L. Morphine-induced place preference: involvement of cholinergic receptors of the ventral tegmental area. European journal of pharmacology. 2007; 562(1): 92-102.
27. Lana D, Cerbai F, Di Russo J, Boscaro F, Giannetti A, Petkova-Kirova P, et al. Hippocampal long term memory: Effect of the cholinergic system on local protein synthesis. Neurobiology of learning and memory. 2013;106:246-57.

www.SID.ir