نقش گیرنده های گرلینی ناحیه سپتوم میانی در اثرات مورفین بر تثبیت حافظه در یادگیری اجتنابی غیرفعال

سودابه دستجانی فراهانی[۱]، نیلوفر دربندی[۱*]، فرزانه نظری سرنجه[۲]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲) گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱۱ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۹**

چکیده

مقدمه: شواهد نشان می دهد مورفین باعث تخریب حافظه می شود. هم چنین هورمون گرلین در ارتباط با حافظه و یادگیری دخالت دارد و اثرات پاداشی مواد مخدر را میانجی گری می کند. در مطالعه حاضر نقش گیرنده های گرلینی ناحیه سپتوم میانی در اثرات مورفین بر تثبیت حافظه در یادگیری اجتنابی غیرفعال بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۹۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۱۳ گروه(n=۷) شامل گروه های سالین(۱ml/kg)، مورفین(۰/۵-۷/۵mg/kg) و گرلین(۰-۱nmol/µl) به همراه مورفین(۷/۵mg/kg) یا سالین(۱ml/kg) تقسیم شدند. در گروه های دریافت کننده گرلین، بلافاصله پس از آموزش گرلین به درون ناحیه سپتوم میانی تزریق و پس از پنج دقیقه سالین و یا مورفین به صورت زیرجلدی تزریق شد. مرحله آزمون ۲۴ ساعت بعد از آموزش انجام شد. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته های پژوهش: تزریق پس از آموزش مورفین، مدت زمان ورود به ناحیه تاریک را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش و مدت زمان ماندن در اتاق تاریک را افزایش می دهد($P<0.001$). تزریق گرلین به داخل ناحیه MS فراموشی ناشی از مورفین(۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را مهار نمود($P<0.001$). تزریق گرلین به تنهایی تاثیر معنی داری بر به خاطرآوری حافظه نداشت($P>0.05$).

بحث و نتیجه گیری: گرلین قادر است از اثرات تخریبی مورفین بر حافظه و یادگیری در مدل اجتنابی مهاری جلوگیری کرده و احتمالاً ناحیه سپتوم میانی در بروز این اثر دخالت دارد.

واژه های کلیدی: گرلین ، یادگیری اجتنابی غیرفعال، سپتوم میانی، مورفین، موش صحرایی نر

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

Email:N-Darbandi@araku.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

مقدمه

مطالعات نشان می دهد ترکیبات اپیوئیدی مانند مورفین منجر به تغییر بازیابی حافظـــه و فرامـــوشی می شود. تزریق مورفین قبل یا بعد از آموزش حافظه را در مدل های مختلف یادگیری اجتنابی و ماز آبی تخریب می کند(۱).

هسته سپتوم یک ساختار زیر قشری متعلق به سیستم لیمبیک بوده و از دو ناحیه سپتوم جانبی(هسته سپتال جانبی) و سپتوم میانی(هسته سپتوم میانی-باند دیاگونال بروکا) تشکیل شده است. ســـپتوم میانی نورون های کولینرژیک و گابائرژیک بزرگی را به هیپوکامپ ارسال می کند و اهمیت زیادی در یادگیری و حافظه دارد. آسیب به این ناحیه نقص های جدی در حافظه فضایی ایجاد کرده و سبب حذف ریتم تتا هیپوکامپ می شود. سپتوم در پردازش اطلاعات حسی، یادگیری، تثبیت و بازیابی پاسخ اجتنابی غیرفعال، حافظه طولانی مدت، تولید ریتم تتا، اضطراب، استرس، احساسات، تحریک و انگیزه نقش دارد(۲،۳). سپتوم آوران هایی از نواحی هیپوکمپ، آمیگدال، VTA، هیپوتالاموس و لوکوس سرولئـــوس دریـــافت و وابران هایی به مناطق هیپوکمپ، شکنج دندانه ای، هابنـــولار، تالاموس، VTA و هیپوتالاموس ارسال می نماید(۴). انتقال دهنده های عصبی سپتوم شامل استیل کولین، گابا، گلوتامات، دوپامین، هیستامین، سروتونین، اپیوئیدها، گالانین، آدرنالین و کانابینوئیدها است(۲،۵). شواهد نشان می دهد که گیرنده های اپیوئیدی کاپا، دلتا و مو در سراسر منطقه سپتوم بیان شده و آزاد سازی استیل‌کولین را در باند دیاگونال بروکا میانجی گری می کند(۲). سپتوم در فرآیندهای شناختی، پاداش و انگیزه دخالت دارد. نقش عملکردی سپتوم میانی در تنظیم هماهنگ سازی نوسانات لیمبیک و حافظه وابسته به هیپوکامپ بررسی شده است. شواهد متعددی نشان می دهد که اختـــلال در مسیر سپتوهیپوکامپ ممکن است با از دست دادن حافظه و زوال عقل مربوط باشد(۶،۷).

گرلین یک هورمون پپتیدی است که از ۲۸ اسید آمینه تشـــکیل شـــده است و عمدتاً توسط معده تولید می گردد، اگر چه در بسیاری از بافت های محیطی و مرکزی از جمله روده، شش، قلب، پانکراس، کلیه، بیضه، هیپوفیز و هیپوتالاموس نیز بیان می شود. فرم آسیله گرلین به عنوان لیگاند طبیعی گیرنده ترشح هورمون رشد(GHSR1) شناخته شده است. گرلین در تحریک اشتها، تنظیم ترشح هورمون رشد، تنظیم ترشح اسید معده، تحریک و تنـــظیم ترشحات غدد درون ریز و برون ریز پانکراس(۱۰-۸)، هم چنین با اثر بر هیپوکامپ و آمیگدال در تسهیل یادگیری، حافظه و برانگیختگی احساسات دخالت دارد(۱۱،۱۲). با استفاده از مجموعه ای جامع از آزمون های رفتاری نشان داده شده است که گرلین باعث افزایش پلاستیسیته هیپوکامپ و به دنبال آن منجر به بهبود یادگیری و حافظه می شود. علاوه بر این حذف گرلین در موش ها منجر به کاهش تراکم نورونی هیپوکامپ و اختلال در حافظه می شود که با تزریق داخل صفاقی گرلین بهبود می یابد(۸،۱۳).

تحقیـــقات نشان می دهد مـــصرف گستـــرده فرآورده های اپیوئیدی برای کاهش درد از یک سو و بروز تحمل و وابستگی به آن از سوی دیگر محققان را در چند دهه گذشته به انجام پژوهش های زیادی برای شناخت اثرات ناشی از مصرف این مواد بر کارکردهای دستگاه عصبی واداشته است. مورفین می تواند بر روی حافظه و یادگیری تأثیر منفی گذاشته و باعث بروز مشکلاتی در حافظه شود(۱۴). تحقیقات نشان داده است که گرلین می تواند به عنوان یک ماده موثر برای درمان اختلالات حافظه مورد استفاده قرار گیرد. گرلین افزایش پلاستیسیته سیناپسی را با افزایش انشعابات دندریتی و افزایش نورون های هیپوکمپ و تحریک آن ها انجام می دهد(۱۳). از طرف دیگر ثابت شده است که ناحیه سپتوم نقـــش کلیـــدی در حافظه و یادگیری دارد. فعال سازی سپتوم میانی باعث افزایش شلیک هم زمان سلول های هرمی در هیپوکمپ و ضایعات سپتوم میانی منجر به اخـــتلال حافظـــه می شود. مـــطالعات ایمونوهیستوشیمیایی بیان گیرنده های گرلینی در ناحیه سپتوم میانی را تایید نموده است(۱۵). علی رغم مطالعات انجام شده در رابطه با نقش ناحیه سپتوم میانی و گرلین هر یک به تنهایی بر فرآیند حافظه و یادگیری، تا کنون نقش احتمالی گیرنده های گرلینی این ناحیه از مغز بر فراموشی ناشی از مورفین بررسی نشده است. لذا در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

مطالعه حاضر نقش ناحیه گیرنده های گرلینی ناحیه سپتوم میانی در اثرات گرلین بر نقص حافظه ناشی از مورفین در مدل یادگیری اجتنابی مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری: در این مطالعه آزمایشگاهی پژوهشی اصیل از تعداد ۹۱ سر رت های نر نژاد ویستار(تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم و سن ۹ هفته استفاده شد. این حیوانات به صورت گروه های 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)، دمای۲±۲۲ درجه سانتی گراد بود و آزمایش ها در زمان معینی از روز (ساعت ۱۲-۹) انجام می گرفت. هفت حیوان در هر گروه تجربی قرار داشت و هر حیوان فقط یک بار آزمایش می شد. تمامی آزمایش ها طبق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت.

دستگاه بررسی حافظه: برای بررسی حافظه از دستگاه اجتنابی غیرفعال استفاده شده است. این دستگاه از جعبه ای از جنس پلکسی گلاس تشکیل شده است که توسط یک دیواره به دو قسمت با اندازه یکسان (۳۰×۲۰×۲۰cm) تقسیم می شود. در قسمت وسط این دیواره یک درب گیوتینی با ابعاد ۷×۹ cm وجود دارد که ارتباط بین دو قسمت را برقرار می کند. کف و دیواره های یک قسمت دستگاه سفید(بخش روشن دستگاه) و قسمت دیگر آن سیاه(بخش تاریک دستگاه) است. در کف قسمت سیاه میله های فولادی با فاصله ۱cm از هم تعبیه شده که توسط یک سیم رابط به دستگاه استیمولاتور متصل می شوند. از طریق این استیمولاتور و میله های فولادی کف دستگاه شوک الکتریکی مورد نظر به کف پای حیوان منتقل می شود(۱۶).

داروها: از کتامین هیدروکلراید و زایلزین به عنوان داروهای بیهوشی و به صورت درون صفاقی استفاده گردید. سولفات مورفین از شرکت دارو پخش تهران و گرلین رت از شرکت ابکم انگلستان تهیه شدند. هر دو دارو در نرمال سالین(۰/۹ درصد) حل شد. مورفین به صورت زیرجلدی(۱۶) و گرلین به صورت درون مغزی تزریق شد(۱۶). گروه های کنترل نیز سالین دریافت نمودند.

روش جراحی و کانول گذاری: جهت جراحی و کانول گذاری در ناحیه سپتوم میانی ابتدا هر موش بر اساس وزن به وسیله تزریق درون صفاقی مخلوطی از کتامین(۵۰ mg/kg) وزایلزین(۵ mg/kg) بیهوش شد. مختصات سپتوم میانی بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون(۱۷) به دست آمد(۱/۲ به سمت جلو از برگما، ۰/۱ میلی متر در طرف راست شکاف ساژیتال و ۶/۵ میلی متر به طرف پایین از سطح جمجمه). در سطح جمجمه محل کانول گذاری توسط مته دندان پزشکی تا پرده مننژ سوراخ شد. کانول راهنما به طول ۱/۱ سانتی متر از سر سوزن ۲۲ گیج تهیه شده و حدود ۱ میلی متر بالاتر از ناحیه مورد نظر به کمک آکریل دندان پزشکی ثابت شد. برای جلوگیری از بسته شدن کانول راهنما قبل از تزریق، سرسوزن های دندان پزشکی به شماره ۳۰ گیج که به اندازه طول کانول راهنما بریده می شد، در داخل آن قرار گرفت(۱۶).

تزریق درون مغزی: برای تزریق دارو حیوان به آرامی توسط دست گرفته شد. سر سوزن ۳۰ گیج از کانول راهنما خارج شده و به کمک سر سوزن دندان پزشکی ۲۷G (۱ میلی متر بلندتر از کانول راهنما)، رابط پلی اتیلن و سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتری تزریقات مرکزی انجام شد. برای اطمینان از باز بودن مسیر کانول راهنما هنگام تزریق ابتدا باز بودن مسیر کانول با یک سر سوزن دندان پزشکی ۲۷G به طول کانول راهنما بررسی، سپس کانول تزریق به آرامی درون کانول راهنما قرار گرفت و مقدار ۱ میکرولیتر دارو از طریق کانول تزریق در مدت ۶۰ ثانیه به ناحیه سپتوم میانی تزریق شد. در طول مدت تزریق سعی می‌شد استرس کمی به حیوان وارد شود. برای اطمینان از جذب کامل دارو به درون ناحیه مغزی مورد نظر و جلوگیری از انتشار آن به دیگر نواحی کانول تزریق با یک تاخیر ۳۰ تا ۶۰ ثانیه ای از کانول راهنما خارج می‌شد.

در پایان آزمایش به منظور اطمینان از درستی مختصات محل جراحی و تزریق دارو، ۱ میکرولیتر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

محلول ۱ درصد آبی متیلن بلو به صورت درون مغزی تزریق شد. سپس حیوانات با استفاده از دوز بالای کلروفرم کشته شده و مغز آن ها از جمجمه خارج و جهت تثبیت برای برش گیری به مدت ۱۰ روز در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد. برش گیری از ناحیه تزریق و بررسی توزیع رنگ در ناحیه سپتوم میانی بیانگر صحت کانول گذاری و تزریق بود. چنان چه کانول ها در نواحی مورد نظر قرار داشتند داده های به دست آمده از حیوان در روز آزمون، در آنالیز آماری مورد استفاده قرار می گرفت(۱۶).

یادگیری اجتنابی غیرفعال به روش step-through

بررسی حافظه در روش یادگیری اجتنابی غیرفعال طی دو مرحله و در دو روز متوالی انجام می شود. روز اول مرحله آموزش دادن حیوانات در دستگاه می باشد. در روز دوم میزان حافظه حیوانات آموزش دیده مورد ارزیابی قرار می گیرد. در شروع مرحله آموزش، هر حیوان به آرامی در درون قسمت روشن دستگاه قرار می گیرد. بعد از گذشت ۵ ثانیه درب گیوتینی دستگاه باز و به حیوان اجازه داده می شد تا وارد قسمت تاریک شود. مدت زمانی که طول می کشد حیوان از قسمت روشن وارد قسمت تاریک دستگاه شود به عنوان زمان تاخیر ثبت می شود. موشی که در ورود به بخش تاریک بیش از صد ثانیه تاخیر داشت از ادامه آزمایش حذف می شد. بلافاصله بعد از ورود حیوان به قسمت تاریک درب گیوتینی بسته شده و به حیوان اجازه داده می شد تا به مدت ۵ ثانیه با محیط مذکور آشنا شود. سپس حیوان به آرامی به قفس برگردانده می شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه مرحله قبل تکرار می شد با این تفاوت که به محض ورود حیوان و بسته شدن درب گیوتینی، شوک الکتریکی به شدت ۱ میلی آمپر و به مدت ۳ ثانیه با فرکانس ۵۰ هرتز از طریق میله های کف دستگاه به دست و پای حیوان منتقل می شد. با توجه به بسته بودن سقف این قسمت، حیوان نمی تواند به منظور جلوگیری از دریافت شوک الکتریکی از دستگاه خارج شود(شوک اجتناب ناپذیر). ۲۰ ثانیه بعد از وارد کردن شوک حیوان از دستگاه خارج شده و به قفس جداگانه ای منتقل می شد. پس از گذشت ۲ دقیقه مرحله دوم آموزش بر روی حیوان شوک گرفته انجام می شد. چنان چه حیوان به میزان ۱۲۰ ثانیه در ورود به قسمت تاریک تاخیر داشت آموزش موفق برایش ثبت می گردید و از دستگاه خارج شده و بلافاصله تزریق پس از آموزش را دریافت می کرد. در صورتی که حیوان در ورود به قسمت تاریک کمتر از ۱۲۰ ثانیه تاخیر داشت، پس از ورود به قسمت تاریک مجدداً به حیوان شوک داده می شد. پس از خارج کردن حیوان از دستگاه و گذشت ۲ دقیقه مراحل فوق تکرار می شد. حداکثر دفعات آموزش برای هر حیوان سه بار در نظر گرفته می شد(۱۶).

مرحله آزمون ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش و بدون تحریک الکتریکی انجام می شد. در این مرحله همانند روز آموزش حیوان در قسمت روشن دستگاه قرار می گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز شده و زمان تاخیر حیوان برای ورود به قسمت تاریک STL و کل مدت زمان ماندن حیوان در قسمت تاریک TDC به عنوان معیاری برای میزان به یادآوری حافظه ثبت می شد. بیشترین زمان تاخیر برای ورود به قسمت تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می شد(۱۶).

تیمارهای دارویی و طراحی آزمایشات انجام گرفته: جهت انجام این مطالعه ۹۱ سر موش صحرایی نر به طور تصادفی به ۱۳ گروه تقسیم شدند. در هر گروه از ۷ سر حیوان استفاده گردید.

آزمایش اول(بررسی اثر تزریق پس از آموزش مورفین بر به خاطرآوری حافظه): در این آزمایش، ۵ گروه حیوان مورد استفاده قرار گرفت. یک گروه از حیوانات بلافاصله پس از آموزش، سالین(۱ ml/kg) و چهار گروه دیگر مقادیر مختلف مورفین(۷/۵ mg/kg، ۵، ۲/۵، ۰/۵) را به صورت زیرجلدی دریافت نمودند. تمامی گروه ها ۲۴ ساعت بعد وارد مرحله آزمون شدند. مقادیر مورفین بر اساس مطالعات قبلی انتخاب گردید(۱۶).

آزمایش دوم(بررسی اثر تزریق پس از آموزش گرلین به تنهایی به درون ناحیه سپتوم میانی بر به خاطرآوری حافظه): در این آزمایش، از چهار گروه حیوان استفاده شد. حیوانات بلافاصله پس از آموزش، مقادیر مختلف گرلین(۱ nmol/µl، ۰/۳، ۰/۱، ۰) را به صورت درون مغزی دریافت نمودند. ۵ دقیقه پس از آن سالین (۱ml/kg) به صورت زیرجلدی تزریق شد. تمامی گروه ها ۲۴ ساعت بعد وارد مرحله آزمون شدند. مقادیر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

گرلین به صورت آزمایشی و در مقایسه با مطالعات قبلی انتخاب گردید(۱۶).

آزمایش سوم(بررسی اثر تزریق پس از آموزش گرلین همراه با مورفین بر به‌خاطرآوری حافظه): این آزمایش بر روی چهار گروه از حیوانات انجام شد. حیوانات بلافاصله پس از آموزش، مقادیر مختلف گرلین (۱ nmol/µl، ۰/۳، ۰/۱، ۰) را به صورت درون مغزی دریافت نمودند. ۵ دقیقه پس از آن مورفین(۷/۵mg/kg) به صورت زیرجلدی تزریق شد. تمامی گروه ها ۲۴ ساعت بعد وارد مرحله آزمون شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها: داده ها بر اساس میانگین (Mean) و انحراف معیار استاندارد(S.E.M) ثبت می گردید. آنالیزهای آماری بر اساس آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و دوطرفه با استفاده از زمان تاخیر ورود حیوان به قسمت تاریک به عنوان فاکتور وابستگی، انجام شده است. جهت تعیین اختلاف معنی دار بین گروه ها از آزمون تعقیبی توکی(Tukey) استفاده گردید و اختلاف $P<0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودارها نیز از Sigmaplot نسخه ۱۲ استفاده شد.

یافته های پژوهش

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه داده های آزمون رفتاری گروه های آزمایشی نشان داد تزریق زیرجلدی مورفین در دوزهای(۷/۵ mg/kg، ۵، ۲/۵، ۰/۵) ۵ دقیقه بعد از آموزش به طور وابسته به دوز باعث کاهش زمان ورود به اتاق تاریک[$F(4, (STL)$ $31)=15.82, P<0.001$] و افزایش معنی دار کل مدت زمان توقف در اتاق تاریک(TDC)(جدول شماره ۱) [$F(4, 31)=19.26, P<0.001(STL)$] می شود. این نتایج نشان دهنده کاهش یادگیری در مدل اجتنابی و القای فراموشی است. آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه تاخیر در تغییر مکان اختلاف معنی داری را بین گروه های گرلین-سالین و گرلین-مورفین نشان داد[$F(1, 56)=722.38, P<0.001$]، نوع تیمار[$F(3, 56)=20.04, P<0.001$]، مقدار دارو[$F(3, 56)=21.35, P<0.001$]، تداخل تیمار×مقدار دارو]. هم چنین آنالیز مکمل آماری نشان داد که هیچ اختلاف معنی داری بین گروه های گرلین-سالین با گروه کنترل سالین-سالین دیده نشد[$F(3, 24)=0.593, P<0.05$]. علاوه بر آن تزریق پس از آموزش گرلین(۱ nmol/µl، ۰/۳، ۰/۱)، پنج دقیقه قبل از تزریق مورفین(۷/۵ mg/kg) به صورت وابسته به دوز از تخریب حافظه ناشی از مورفین جلوگیری کرد[$F(3, 24)=36.00, P<0.001$] (نمودار شماره ۱). آزمون مکمل Tukey نشان می دهد در این گروه تاخیر در ورود به اتاق تاریک به طور معنی داری افزایش می یابد که به معنی بهبود حافظه است.

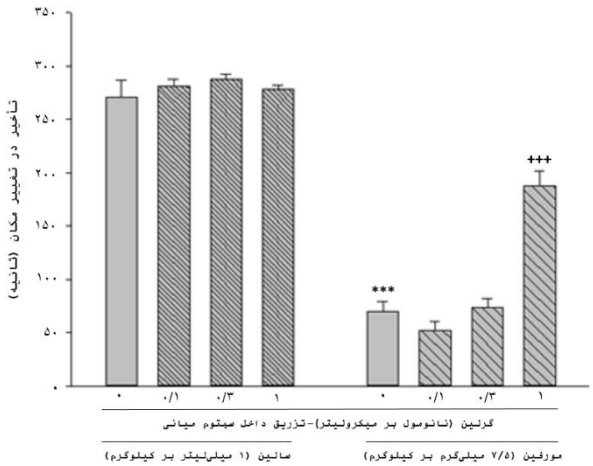
آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه مدت زمان توقف در اتاق تاریک اختلاف معنی داری را بین گروه های گرلین-سالین و گرلین-مورفین نشان داد[$F(1, 56)=818.32, P<0.001$]، نوع تیمار[$F(3, (STL)$ $56)=25.77, P<0.001$]، مقدار دارو[$F(3, 56)=21.23, P<0.001$]، تداخل تیمار×مقدار دارو]. هم چنین آنالیز مکمل آماری نشان داد که هیچ اختلاف معنی داری بین گروه های گرلین-سالین با گروه کنترل سالین-سالین دیده نشد[$F(3, 24)=0.347, P<0.05$]. علاوه بر آن تزریق پس از آموزش گرلین پنج دقیقه قبل از تزریق مورفین(۷/۵ mg/kg) به صورت وابسته به دوز از تخریب حافظه ناشی از مورفین جلوگیری کرد[$F(3, 24)=33.20, P<0.001$](نمودار شماره ۲). آزمون مکمل Tukey نشان می دهد در این گروه مدت زمان ماندن در اتاق تاریک به طور معنی داری کاهش می یابد که به معنی بهبود حافظه است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

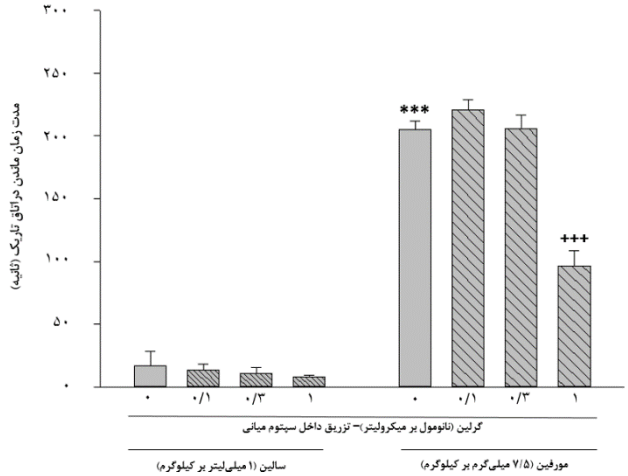
[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

جدول شماره ۱. اثر تزریق مقادیر مختلف مورفین پس از آموزش بر میزان تاخیر در تغییر مکان(STL و مدت زمان ماندن در خانه تاریک(TDC). ۵ گروه حیوان در این آزمایش به کار رفت. گروه اول سالین(۱ml/kg) و چهار گروه بعدی مورفین(۷/۵ mg/kg، ۲/۵،۵، ۰/۵) را به صورت زیرجلدی بلافاصله پس از آموزش دریافت نمودند. هر ستون بیانگر میانگین±خطای استاندارد مربوط به ۷ سر رت در هر گروه است. P<0.01 ** و P<0.001 * در مقایسه با گروه سالین می باشد.**

گروه / زمان(ثانیه)	سالین (۱ ml/kg)	مورفین (۰/۵ mg/kg)	مورفین (۲/۵ mg/kg)	مورفین (۵ mg/kg)	مورفین (۷/۵ mg/kg)
تاخیر در تغییر مکان(STL)	۲۱/۶۵±۲۵۸/۲۹	۲۴۱/۲۴±۴۳/۶۷	۲۱۷/۲۰±۸۶/۰۴	۱۳۸/۱۴±۵۷/۴۶**	۶۹/۱۷±۴۲/۲۴***
زمان ماندن در اتاق تاریک(TDC)	۳۳/۱۹±۲۸/۵۷	۴۳/۱۸±۸۵/۴۲	۵۲/۱۵±۸۵/۰۸	۱۱۷/۱۲±۲۹/۴۵**	۲۰۷/۱۶±۷۱/۶۸***



نمودار شماره ۱. اثر تزریق مقادیر مختلف گرلین پس از آموزش به‌تنهایی یا همراه با مورفین بر تاخیر در ورود به اتاق تاریک(STL) در گروه های آزمایشی. هر ستون نمایان‌گر میانگین±خطای استاندارد مربوط به ۷ سر رت در هر گروه می باشد. P<0.001 * در مقایسه با گروه سالین-سالین و P<0.001 +++ در مقایسه با گروه سالین-مورفین می باشد.**



نمودار شماره ۲. اثرات تزریق گرلین پس از آموزش به تنهایی یا همراه با مورفین بر مدت زمان ماندن حیوانات در اتاق تاریک(TDC) در گروه های آزمایشی. هر ستون نمایانگر میانگین±خطای استاندارد مربوط به ۷ سر رت در هر گروه می باشد. P<0.001 * در مقایسه با گروه سالین-سالین و P<0.001 +++ در مقایسه با گروه سالین-مورفین می باشد.**

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

بحث و نتیجه‌گیری

داده‌های به دست آمده از مطالعه حاضر بیانگر آن است که تزریق زیرجلدی مورفین پس از آموزش به صورت وابسته به دوز سبب کاهش زمان ورود به اتاق تاریک و افزایش زمان ماندن در این اتاق در روز آزمون می شود که نشان دهنده اثر تخریبی مورفین بر حافظه است(فراموشی ناشی از مورفین). بیشترین کاهش حافظه ناشی از مورفین در دوز ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر هم چنین نشان داد تزریق مقادیر مختلف گرلین به صورت درون مغزی در ناحیه سپتوم میانی پس از آموزش به تنهایی تغییرات معنی داری را در تاخیر ورود حیوان از یک بخش به بخش دیگر دستگاه اجتنابی ایجاد نکرد. در حالی که تزریق گرلین ۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین فراموشی ناشی از مورفین را بهبود بخشیده و سبب ایجاد تغییرات معنی داری در روند بهبود حافظه می شود.

همسو با مطالعه حاضر تحقیقات نشان می دهد تزریق پیش یا پس از آموزش مورفین به صورت وابسته به دوز باعث تخریب حافظه در مدل های مختلف یادگیری از جمله یادگیری اجتنابی می شود(۲۰-۱۶). مطالعات متعددی مکانیسم اثرات مورفین بر حافظه را مورد بررسی قرار داده است. سیستم گلوتامینرژیک نقش حیاتی در یادگیری و حافظه دارد. فعال سازی گیرنده NMDA منجر به افزایش سطح کلسیم داخل سلولی و ایجاد آبشاری از وقایع می شود که منجر به افزایش فعالیت سیناپسی در هیپوکامپ و پتانسیل طولانی مدت می شود(۲۱). احتمالاً مورفین با اثر بر گیرنده های اپیوئیدی که به طور گسترده ای در هیپوکامپ بیان شده و از سوی دیگر با اثر بر آوران های دوپامینرژیک از ناحیه تگمنتوم شکمی و دیگر مناطق مغز به هیپوکامپ، منجر به افزایش رهایش دوپامین و مهار آزادسازی گلوتامات می شود(۲۲). یافته ها نشان می دهد مورفین از طریق مسیرهای سیگنالینگ انواع گونه های فعال اکسیژن، استرس شبکه اندوپلاسمی و اتوفاژی منجر به اختلال سیناپسی در هیپوکامپ می شود(۲۳). افـــزایش ROS می تواند پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی را ایجاد کند و به DNA و پروتئین ها آسیب رسانده و باعث مرگ سلول شود. ROS با فعال کردن عامل رونویسی NF-κB موجب رونویسی طیف وسیعی از سیتوکین ها، کموکینازها و دیگر واسطه های التهابی می شود. نتیجه این امر فعال سازی رونویسی از چندین ژن درگیر در آپاپتوز هم چون Bax، انتشار سیتوکروم c از میتوکندری و متعاقب آن فعال سازی کاسپازها به آپاپتوز است(۲۴). گزارش شده است که تجویز مورفین می تواند از بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز جلوگیری کند. نتایج نشان داد که اختلال در تشکیل حافظه ناشی از مورفین از طریق جلوگیری از فعالیت NO بوده و در این اثر مکانیسم نورون های دوپامینرژیک درگیر است(۲۰). نشان داده شده است که مورفین به صورت وابسته به دوز بیان ژن های درگیر در فرآیند حافظه را در هیپوکامپ تغییر می دهد(۲۵). هم چنین نشان داده شده است که مقادیر مختلف مورفین اثرات متفاوتی بر فعال شدن گیرنده های مو اوپیوییدی دارد(۲۶). بنا بر این می توان نتیجه گرفت که اثرات متفاوت مقادیر مختلف مورفین بر حافظه در مطالعه حاضر ناشی از اثرات متفاوت دوزهای مختلف مورفین بر بیان ژنی و مسیرهای سیگنالینگ است.

در تایید نتایج حاضر در رابطه با گرلین، مطالعات قبلی ما نشان داده است تزریق گرلین به درون ناحیه تگمنتوم شکمی، اثرات تخریبی مورفین بر حافظه را در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال مهار نموده هم چنین تزریق گرلین به ناحیه CA1 هیپوکامپ قبل از تزریق مورفین مانع از اثر فراموشی مورفین می شود(۱۹-۱۶). گرلین ممکن است با اثرات تحریک کنندگی نوروژنز در ناحیه هیپوکامپ به شکل گیری حافظه کمک کند. تزریق گرلین به طور مستقیم به هیپوکامپ از مسیر PLC-PKC، کانال های پتاسیمی را مهار و فعالیت های عصبی و انتقال سیناپسی را تنظیم می‌کند. فعال شدن مسیر ERK1/2 توسط گرلین می تواند مرگ سلول را مهار و منجر به بهبود تراکم سیناپسی و تولید و حفظ پتانسیل طولانی مدت شود(۲۷). مطالعات قبلی بر روی گرلین نشان دهنده تعامل بین این هورمون و سیستم گلوتاماترژیک است. گرلین در سطح پیش سیناپسی احتمالاً با افزایش کلسیم باعث آزاد شدن گلوتامات از سیناپتوزوم های هیپوکامپی و فعال شدن گیرنده های NMDA می شود(۲۸). تزریق درون هیپوکامپی گرلین

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

بیان زیرواحد گیرنده گلوتاماتی را در ناحیه CA1 و شکنج دندانه ای هیپوکامپ افزایش داده و هم چنین از اثرات آنتاگونیست اختصاصی گیرنده گلوتاماتی جلوگیری می نماید(۲۸). گرلین می تواند از فراموشی ناشی از تزریق آنتاگونیست NMDA پس از آموزش در موش های صحرایی جلوگیری نماید. تزریق داخل بطنی گرلین می تواند منجر به افزایش زمان تاخیر در یادگیری اجتنابی و بهبود حافظه شود(۲۱). فعالیت NOS نیز با تزریق درون مغزی گرلین افزایش می یابد. فعال سازی NOS و گلوتامات موجب جلوگیری از فراموشی ناشی از مورفین می گردد(۲۰،۲۷،۲۹). مشخص شده است گیرنده های D1 بر روی پایانه های آکسونی ورودی های گلوتامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی بیان می شوند و فعال شدن گیرنده های GHSR1a در نورون هایی که گیرنده های GHSR1a و گیرنده های دوپامینی را با هم بیان می کنند، سیگنالینگ گیرنده های دوپامینی را تقویت و سبب افزایش میزان cAMP القاء شده توسط گیرنده های دوپامینی می گردد(۳۰). گرلین با افزایش نسبت Bcl-2/Bax، از انتشار سیتوکروم C جلوگیری کرده و با مهار فعال سازی کاسپاز ۳ به جلوگیری از آپاپتوز مغز کمک می کند.

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد گرلین قادر است از اثرات تخریبی مورفین بر حافظه و یادگیری در مدل اجتنابی مهاری جلوگیری کرده و ناحیه سپتوم میانی در بروز این اثر دخالت دارد.

پیشنهادات تحقیقاتی: بررسی نقش سایر گیرنده های موجود در ناحیه سپتوم میانی در اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین هم چنین اندازه گیری و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و شاخص های استرس اکسیداتیو در نورون های ناحیه سپتوم میانی.

سپاسگزاری

این تحقیق حاصل پایان نامه دانشجویی است و در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست شناسی دانشگاه اراک و با حمایت مالی حوزه‌ی معاونت پژوهشی و فناوری این دانشگاه انجام شده است(طرح تحقیقاتی با شماره ۹۷/۱۰۲۹۶). در این خصوص از مسئولین مربوطه تشکر به عمل می‌آید.

کد اخلاق: IR.ARAKMU.REC.1397.215

References

1. Ghasemzadeh Z, Rezayof A. Role of hippocampal and prefrontal cortical signaling pathways in dextromethorphan effect on morphine-induced memory impairment in Rats. Neurobiol Learn 2016; 128: 23-32. doi.10.1016/j.nlm.2015.11.015.

2. Khakpai F, Nasehi M, Haerirohani A, Eidi A, Zarrindast MR. Septo hippocampo septal loop and memory formation. Bas Clin Neurosci 2013; 4:5-23.

3.Muller C, Remy S. Septo hippocampal interaction. Cell Tis Res 2018; 373: 565-75. doi.10.1007/s00441-017-2745-2.

4. Felten DL, Obanion MK, Summo M. Netters atlas of neuroscience. 3th ed. Elsevier Publication. 2016; P.421-61.

5. Hajizadehmoghaddam A, Bigdellu R, Fatemitabatabaei SR, Roohbakhsh A. Cannabinoid system of the lateral septum in the modulation of anxiety like behaviors in Rats. Arch Iran Med 2013; 16: 711-6. doi.0131612/AIM.006.

6. Matsuyama N, Uwano T, Hori E, Ono T, Nishijo H. Reward contingency modulates neuronal activity in Rat septal nuclei during elemental and configural association tasks. Front Behave Neurosci 2011; 5:1-17. doi.10.3389/fnbeh.2011.00026.

7. Tsanov M. Differential and complementary roles of medial and lateral septum in the orchestration of limbic oscillations and signal integration. Eur J Neurosci 2017; 48:2783-94. doi.10.1111/ejn.13746.

8. Muller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. Mol Metab 2015; 4:437-60 doi.10.1016/j.molmet.2015.03.005.

9. Delporte C. Structure and physiological actions of ghrelin. Scientifica2013; 1-25. doi:10.1155/2013/518909.

10. Gasco V, Beccuti G, Marotta F, Benso A, Granata R, Broglio F, Ghigo E. Endocrine and metabolic actions of ghrelin. Endocr Dev 2010; 17:86-95. doi. 10.1159/000262531.

11. Carlini VP, Perez MF, Salde E, Schioth HB, Ramirez OA, Barioglio SR. Ghrelin induced memory facilitation implicates nitric oxide synthase activation and decrease in the threshold to promote LTP in hippocampal dentate gyrus. Physiol Behave

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

2010; 101: 117-23. doi. 10.1016/j.physbeh.2010.04.026
12. Beheshti S, Aslani N. Local injection of d-lys3-GHRP6 in the rat amygdala dentate gyrus or ventral tegmental area impairs memory consolidation. Neuropeptides 2018; 67: 20-6. doi. 10.1016/j.npep.2017.11.002.
13. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, Silva ID, Horvath B, et al. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. Nat Neurosci 2006; 9:381-8. doi.10.1038/nn1656.
14. Gholami M, Sadegh M. [Assessing the effect of drug tolerance due to chronic administration of morphine and salicylate on synaptic plasticity]. Torbat Heydariyeh Uni Med Sci 2017; 5: 61-71. (Persian)
15. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the Rat and the Mouse brain. J Comp Neurol 2006; 494: 528-48. doi. 10.1002/cne.20823.
16. Darbandi N, Nazariserenjehyadegary A, Momeni, HR. [The effect of iintra ventral tegmental area injection of ghrelin on morphine induced amnesia in male Rats]. JRUMS 2019; 18: 147-60. (Persian)
17. Paxinos G, Watson C. The Rat brain in stereotaxic coordinates. 3th ed. Acad San Diego Publication. 2007; P.231-9.
18. Nazariserenjeh F, Darbandi N, Majidpour S, Moradi P. Ghrelin modulates morphine nicotine interaction in avoidance memory involvement of CA1 nicotinic receptors. Brain Res 2019; 1720: 146315. doi. 10.1016/j.brainres.2019.146315.
19. Darbandi N, Nazariserenjeh F, Moradi P. [The effect of intra hippocampal injection of ghrelin on morphine- induced amnesia in inhibitory avoidance task]. Qom Uni Med Sci J 2018; 12:19-29. (Persian). doi. 10.29252/qums.12.8.19.
20. Rezayof A, Amini R, Rassouli Y, Zarrindast MR. Influence of nitric oxide on morphine induced amnesia and interactions with dopaminergic receptor agents. Physiol Behav 2006; 88: 124 -31. doi.10.1016/j.physbeh.2006.03.017.
21.Goshadrou F, Kermani M, Ronaghi A, Sajjadi S. The effect of ghrelin on MK801 induced memory impairment in rats. Peptides 2013; 44: 60-5. doi. 10.1016/j.peptides.2013.03.022.
22.Guo M, Xu NJ, Li YT, Yang JY, Wu CF, Pei G. Morphine modulates glutamate release in the hippocampal CA1 area in Mice. Neurosci Lett 2005; 381: 12-5. doi. 10.1016/j.neulet.2005.01.071.
23. Cai Y, Yang L, Hu G, Chen X, Niu F, Yuan L, et al. Regulation of morphine induced synaptic alterations role of oxidative stress ER stress and autophagy. J Cell Biol 2016; 215: 245-58. doi.10.1083/jcb.201605065.
24. Mohamed HM, Mahmoud AM. Chronic exposure to the opioid tramadol induces oxidative damage, inflammation and apoptosis, and alters cerebral monoamine neurotransmitters in Rats. Biomed Pharmacother 2019; 110: 239-47. doi.10.1016/j.biopha.2018.11.141.
25. Rouhani F, Khodarahmi P, Naseh V. NGF and BDNF and Arc mRNA expression in the hippocampus of Rats after administration of morphine. Neurochem Res 2019; 44: 2139-46. doi.10.1007/s11064-019-02851-z.
26. Wang H, Burns L. Naloxones pentapeptide binding site on filamin A blocks Mu opioid receptorGs coupling and CREB activation of acute morphine. Plos One 2009; 4: 4282. doi. 10.1371/journal.pone.0004282.
27. Mandal A, Prabhavalkar K, Bhatt L. Gastrointestinal hormones in regulation of memory. Peptides 2018; 102: 16–25. doi: 10.1016/j.peptides.2018.02.003.
28. Ghersi MS, Gabach LA, Buteler F, Vilcaes AA, Schioth HB, Perez MF, Barioglio SR. Ghrelin increases memory consolidation through hippocampalmechanisms dependent on glutamate release and NR2B subunitsof the NMDA receptor. Psychopharmacology 2015; 232: 1843-57. doi.10.1007/s00213-014-3817-6.
29. Ardjmand A, Rezayof A, Zarrindast MR. Involvement of central amygdala NMDA receptor mechanism in morphine state dependent memory retrieval. Neurosci Res 2011; 69: 25-31. doi. 10.1016/j.neures.2010.09.005.
30. Jerlhag E, Engel JA. Ghrelin receptor antagonism attenuates nicotine induced locomotor stimulation accumbal dopamine release and conditioned place preference in Mice. Drug Alcohol Dep 2011; 117: 126-31. doi.10.1016/j.drugalcdep.2011.01.010.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]

The Role of Middle Septal Ghrelin Receptors in the Effects of Morphine on Memory Consolidation in Passive Avoidance Learning

Dastjanifarahani S[1], Darbandi N[1], Nazariserenjeh F[2]*

(Receive: November 2, 2019 Accepted: February 8, 2020)

Abstract

Introduction: Evidence indicates that morphine impairs memory process. Ghrelin hormone has been linked to learning and memory processes and modulates reward properties of addictive drugs. In this study we examined the role of middle septal ghrelin receptors in the effects of morphine on memory consolidation in passive avoidance learning.

Materials & Methods: In this experimental study, 91 male Wistar rats were randomly divided into 13 (n=7) groups: saline (1ml/kg), morphine (0.5- 7.5 mg/kg), ghrelin (0- 1 nmol/µl) plus morphine (7.5 mg/kg) or saline (1ml/kg). In ghrelin treated groups animals received intra- medial Septum injection of ghrelin immediately after training and 5 min later saline or morphine was injected subcutaneously. Testing phase was done 24 h after training. Data were analyzed using ANOVA analysis followed by Tukey multiple comparison test. *Ethics code:* IR.ARAKMU.REC.1397.215

Findings: Post-training administration of morphine reduced step-through latency and increased Total dark chamber compared with saline group ($p< 0.001$). Intra- medial Septum injection of ghrelin inhibited morphine-induced amnesia ($p< 0.001$). Administration of ghrelin alone had no significant effect on memory retrieval ($P > 0.05$).

Disscution & Conclusions: Ghrelin is able to prevent the deleterious effects of morphine on memory and learning in the inhibitory avoidance model and the medial septal region may be involved in this effect.

Keywords: Ghrelin, Inhibitory avoidance learning, Medial septum, Morphine, Male rat

1. Dept of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
2. Dept of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
**Corresponding author Email: N-Darbandi@araku.ac.ir*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-30]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.3.1]