مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره ششم ـ شماره سوم ـ پاییز ۹۱
صفحه ۱٤ الی ۲۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر ال- آرژنین در ناحیه تگمنتوم شکمی بر اثر بهبودبخش نیکوتین بر حافظه

مریم‌السادات شاهین[۱]، مرتضی پیری[۲]، محمدرضا زرین‌دست[۳]

[۱]کارشناس زیست‌شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر ری، تهران، ایران.
[۲]استادیار فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران.
[۳]استاد فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک اکساید سنتاز در ناحیه تگمنتوم شکمی، که یک ناحیه کلیدی از مغز برای میانجی‌گری اثرات رفتاری مورفین و نیکوتین می‌باشد، یافت می‌شود. در این مطالعه اثر ال-آرژنین پیش‌ساز نیتریک اکساید در ناحیه تگمنتوم شکمی بر اثرات نیکوتین روی فراموشی القاشده با مورفین بررسی گردید.

روش بررسی: این مطالعه به‌صورت تجربی روی ۲۵۰ موش صحرایی نر انجام شد. موش‌ها با تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید، به‌علاوه زایلزین بیهوش شدند، سپس در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند. دو کانول نیز در ناحیه تگمنتوم شکمی قرار داده شد. آزمون رفتاری با استفاده از دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال آغاز و میزان تأخیر حیوان در ورود به بخش سیاه به‌عنوان معیار حافظه اندازه‌گیری شد. به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش، روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی به کار برده شد. اختلاف در سطح $p<۰/۰۵$ به‌عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در این بررسی، تزریق پس از آموزش مورفین (۵mg/kg، ۷/۵) یادآوری حافظه را کاهش داد. همچنین تزریق نیکوتین یا ال- آرژنین قبل از آزمون، به‌تنهایی اثری بر روی یادآوری حافظه نداشت. از طرف دیگر، استفاده از مورفین (۷/۵mg/kg)، نیکوتین (۰/۵mg/kg، ۱)، ال- آرژنین (۰/۲۵μg/rat، ۰/۵) یا مقادیر غیرمؤثر ال- آرژنین همراه با مقدار غیرمؤثر نیکوتین باعث برگشت حافظه تخریبی القاشده با تزریق بعد از آموزش مورفین شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد سیستم نیتریک اکساید ناحیه تگمنتوم شکمی، نقش مهمی در اثرات بهبودبخش نیکوتین بر روی فراموشی القاشده با مورفین دارد.

کلید واژه‌ها: ناحیه تگمنتوم شکمی؛ مورفین؛ نیکوتین؛ نیتریک اکساید.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Shahin MS, Piri M, Zarrindast MR. The Effect of L-arginine in the Ventral Tegmenta Area on the Improving Effect of Nicotine on Memory. Qom University of Medical Sciences Journal 2012;6(3): 14-21.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران؛
آدرس پست الکترونیکی: biopiri@iauardabil.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۰

مقدمه

مدل یادگیری اجتنابی مهاری به‌صورت گسترده در مطالعات فارماکولوژیکی، برای بررسی حافظه درازمدت که در ایجاد آن هیپوکامپ یا ساختارهای جانبی مانند استریاتوم نقش دارند، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). شکل‌گیری حافظه یک فرآیند پیچیده است که در آن میانجی‌های عصبی مختلف دخیل می‌باشند (۲).

نیتریک اکساید به‌عنوان یک میانجی عصبی گازی شکل، بعد از فعال‌شدن گیرنده NMDA توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از ال- آرژنین ساخته می‌شود (۳). مطالعات نشان می‌دهند نیتریک اکساید در تقویت درازمدت سیناپسی (LTP)، تغییر شکل سیناپسی و به‌تبع آن در حافظه و یادگیری نقش دارد (۴). مدل‌های مختلف یادگیری از جمله یادگیری حرکتی (۵)، یادگیری اجتنابی غیرفعال (۶) و حافظه فضایی (۷)؛ تحت تأثیر سیستم نیتریک اکساید قرار دارند. مورفین و نیکوتین جزء داروهایی هستند که مورد سوءمصرف قرار می‌گیرند، و هر دو بر روی حافظه و یادگیری در مدل‌های مختلف یادگیری تأثیر می‌گذارند. در مطالعات پیشین، برهم‌کنش متقابل بین مورفین و نیکوتین در زمینه اثر ضد دردی (۸)، کاتالپسی و ترجیح مکان شرطی‌شده مشخص گردیده است (۹). همچنین این مطالعات نشان داده‌اند داروهایی مانند مورفین که مورد سوءمصرف قرار می‌گیرند می‌توانند یادآوری حافظه را تغییر داده و باعث القای فراموشی و یادگیری وابسته به وضعیت شوند (۱۰)، گزارشهای متعدد نشان می‌دهند تزریق سیستمیک مورفین قبل یا بعد از آموزش باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری شده و تزریق مجدد مورفین قبل از آزمون نیز بازگشت حافظه تخریب‌شده توسط مورفین روز آموزش را در پی دارد (۱۲،۱۱). این پدیده، یادگیری وابسته به وضعیت خوانده می‌شود. یادگیری وابسته به وضعیت پدیده‌ای است که در آن یادآوری اطلاعاتی که جدیداً کسب شده‌اند؛ تنها هنگامی امکان‌پذیر است که حیوان از لحاظ حسی و فیزیولوژیک در همان شرایطی قرار گیرد که در هنگام کدبندی اطلاعات قرار داشته است (۱۳). لذا این احتمال وجود دارد که اپیوئیدهای درون‌زاد مغز، نقش تعدیل‌کننده در تثبیت و یادآوری اطلاعات داشته باشند، همچنین احتمال وجود یادگیری وابسته به وضعیت درون‌زاد نیز مطرح می‌شود (۱۴). از طرف دیگر، افزایش رهایش دوپامین از ناحیه تگمنتوم شکمی ویژگی مشترک بسیاری از داروهای اعتیادآور از جمله مورفین و نیکوتین است (۱۵). ورودی‌های دوپامینرژیک که از ناحیه تگمنتوم شکمی وارد هیپوکامپ می‌شوند (۱۶)، مراحل مختلف شکل‌گیری حافظه را در هیپوکامپ تعدیل کرده و تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۷). میزان رهایش دوپامین از نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی در نواحی هدف توسط ورودی‌های تحریکی و مهاری که به این ناحیه وارد می‌شوند، کنترل می‌گردد (۱۸). اصلی‌ترین ورودی‌های تحریکی به ناحیه تگمنتوم شکمی، نورون‌های گلوتاماترژیک بوده که از بخش میانی قشر پرفرونتال منشأ می‌گیرند (۱۹). مطالعات قبلی نشان داده‌اند گیرنده‌های NMDA ناحیه تگمنتوم شکمی، نقش مهمی در اصلاح حافظه تخریب‌شده با مورفین توسط نیکوتین دارند؛ به‌گونه‌ای‌که تزریق آنتاگونیست گیرنده NMDA به ناحیه تگمنتوم شکمی در روز آزمون جلوی بازگشت حافظه توسط نیکوتین روز آزمون را می‌گیرد. با توجه به اینکه نیتریک اکساید بعد از فعال‌شدن گیرنده‌های NMDA تولید شده و بعد از تولید نیز باعث رهایش دوپامین و گلوتامات می‌شود (۲۰)، و با درنظر داشتن اینکه مورفین، نیکوتین و نیتریک اکساید هر سه یادگیری و حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهند، لذا در این مطالعه برای اولین بار نقش نیتریک اکساید در ناحیه تگمنتوم شکمی در میانجی‌گری اثرات نیکوتین بر روی یادگیری وابسته به وضعیت مورفین بررسی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰g-۲۰۰ (تهیه‌شده از انستیتو پاستور ایران و پژوهشکده علوم شناختی تهران ـ ایران) استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه تحقیقاتی پژوهشکده علوم شناختی منتقل شدند و در هر قفس ۵ سر موش قرار داده شد. در طول آزمایش آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها گذاشته شد و هر ۳ روز یک‌بار قفس آنها تمیز می‌شد. دمای حیوان‌خانه بین ۲۲±۳°c متغیر بود. قبل از جراحی به‌مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد خود را با شرایط حیوان‌خانه تطبیق دهند. در طول یک هفته به‌منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوان‌ها بررسی شدند. در این مطالعه از هر حیوان فقط یک‌بار استفاده شد، و حیوان‌ها در گروه ۸ تایی قرار گرفتند. همچنین همه آزمایشها در طول روز انجام گردید.

دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری غیرفعال (Inhibitory Passive Avoidanse Apparatus)، مدل Step-Through، از جعبه‌ای تشکیل‌شده که به‌وسیله دیواره‌ای به ۲ قسمت با اندازه یکسان (با ابعاد ۳۰×۲۰×۲۰cm) تقسیم می‌شود.

درون دیواره بین دو قسمت، درب کشویی به ابعاد ۷×۹cm تعبیه شده است، که می‌توان در موقع لزوم آن را باز کرد. این دستگاه دارای بخش سفید رنگی است که کف و دیواره‌های آن از جنس پلکسی گلاس غیرشفاف ساخته شده است، همچنین فاقد هرگونه سقف بوده و توسط نور غیرمستقیم فلورسنت آفتابی روشن می‌شود. بخش دیگر دستگاه نیز سیاه‌رنگ بوده که در کف دارای میله‌های فولادی با فاصله ۱cm می‌باشد، این میله‌ها توسط سیم رابطی به دستگاه تحریک‌کننده متصل می‌شوند و بدین طریق عمل انتقال شوک الکتریکی به حیوانات مورد آزمایش را ممکن می‌سازند. آزمایش باید در اتاق نسبتاً تاریک و بدون سر و صدا انجام شود.

داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند: از مورفین، نیکوتین و ال- آرژنین که بلافاصله قبل از آزمایش داروهای مورفین و ال- آرژنین در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹٪ استریل حل شد و pH نیکوتین بعد از حل‌شدن در سرم فیزیولوژیک ۰/۹٪، توسط سود ۰/۱ نرمال به محدوده ۷/۴ رسید. موش‌های صحرایی توسط تزریق کتامین هیدروکلراید (۵۰mg/kg) به‌علاوه زایلزین (xylazine) (۴mg/kg) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی، حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند. دو کانول راهنما (۲۲G) به‌صورت دوطرفه، ۲m بالاتر از محل تزریق براساس اطلس پاکسینوس و واتسون (سال ۱۹۹۷) قرار داده شدند. (مختصات ناحیه تگمنتوم شکمی برابر AP=-۴/۸، ML=±۰/۹، V=۶/۸ می‌باشد). بعد از قراردادن کانول‌ها در مختصات مورد نظر با استفاده از سیمان دندانپزشکی کانول‌های راهنما در جای خود محکم شدند. برای جلوگیری از بسته‌شدن کانول‌های راهنما طی آزمایش، در داخل آنها کانول‌های (۲۷G) قرار داده شد. پس از جراحی و قبل از تزریق درون مغزی دارو، به حیوان اجازه داده شد ۷-۵ روز دوره بهبودی پس از جراحی (Recovery) را به‌منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری‌کرده تا به حالت عادی خود برگردد. روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه در موش‌های صحرایی در ۲ روز متوالی انجام شد. روز اول یا روز آموزش (Training Day) شامل آموزش‌دادن حیوان‌ها در دستگاه بود، و روز دوم یا روز آزمون (Testing Day)، میزان حافظه حیوان‌های آموزش‌دیده بررسی گردید. در روش اجتنابی مهاری مدل Step-through، هر حیوان به‌آرامی در بخش روشن دستگاه قرار گرفت، به‌مدت ۵s به حیوان اجازه داده شد به‌منظور آشنایی با محیط در این قسمت بماند. پس از گذشت ۵ ثانیه درب کشویی بازشده، و به حیوان اجازه داده شد از این قسمت وارد قسمت سیاه دستگاه شود، بلافاصله بعد از ورود حیوان به خانه سیاه با بستن درب کشویی، حیوان از دستگاه خارج شده و به‌آرامی به قفس برگردانده شد. موش‌هایی که در این مرحله بیشتر از ۱۲۰s در ورود به بخش تاریک تأخیر داشتند از ادامه آزمایش حذف شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه حیوان دوباره به بخش سفید دستگاه منتقل شده و بعد از ۵ ثانیه درب کشویی باز شد تا وارد بخش تاریک شود. با ورود حیوان به بخش تاریک، درب کشویی پشت سر حیوان بسته شد، و حیوان تحریک الکتریکی با شدت ۱mA و به مدت ۳ ثانیه، که توسط دستگاه تحریک‌کننده به میله‌های فولادی کف بخش تاریک منتقل می‌شد، دریافت کرد. ۲۰ ثانیه پس از پایان تحریک، حیوان از دستگاه خارج‌شده و به قفس مربوطه منتقل گردید. پس از گذشت ۲ دقیقه، مرحله دوم آموزش روی حیوان شوک گرفته، انجام شد. در این مرحله نیز موش مانند دفعات قبل به خانه سفید دستگاه انتقال یافت و درب کشویی باز شده و میزان تأخیر ورودش به بخش تاریک دستگاه ثبت گردید. تأخیر ۱۲۰ ثانیه‌ای در ورود به بخش سیاه دستگاه به‌عنوان یادگیری موفق (Successful Learning) برای حیوان ثبت شد. حیوان از دستگاه خارج شده و بلافاصله تزریق پس از آموزش (Post-training) را دریافت کرد. در صورت تأخیر کمتر از ۱۲۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک پس از ورود، درب کشویی دستگاه پشت سر حیوان بسته شده و حیوان برای بار دوم شوک دریافت کرد. پس از خارج کردن حیوان از دستگاه و سپری شدن ۲ دقیقه، حافظه حیوان همانند دوره قبل دوباره امتحان شد. در صورت کسب یادگیری موفق، حیوان از دستگاه خارج شده و تزریق بعد از آموزش را نیز دریافت کرد. حداکثر آموزش برای هر موش ۳ بار در نظر گرفته شد. هنگام بررسی حافظه در جلسه آزمون که ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش انجام گرفت، تحریک الکتریکی اعمال نشد. برای بررسی حافظه، هر موش پس از دریافت تزریق قبل از آزمون، همانند روز اول در بخش روشن دستگاه قرار داده شد، سپس درب کشویی بعد از ۵ ثانیه باز شد.

زمان تأخیر حیوان در ورود به بخش تاریک دستگاه به‌عنوان معیاری برای بررسی میزان حافظه در نظر گرفته شد. بیشترین مقدار تأخیر برای ورود به بخش تاریک که به‌عنوان حافظه کامل شناخته می‌شود، ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد. برای تزریق دارو از کانول (۲۷G) دندانپزشکی به‌طول ۱۵mm و ۲mm بزرگتر از کانول راهنما به‌منظور دسترسی دقیق به ناحیه تگمنتوم شکمی و جلوگیری از آسیب آن استفاده گردید. این سر سوزن به کت‌دان تیوپ (Cat Down Tupe) نوزاد (شماره۴) متصل بود. برای تزریق نیز از سرنگ هامیلتون ۲µl استفاده شد. در مرحله تزریق پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن ۲۷G دندانپزشکی در داخل کانول راهنما ۲۲G قرار داده شد، و در هر کانول ۰/۳µl دارو در مدت ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق گردید (این زمان به‌منظور کسب اطمینان از ورود دارو به مغز و جلوگیری از خروج آن از کانول راهنما در نظر گرفته می‌شود). مجموع حجم تزریق درون مغزی به هر موش ۰/۶µl بود. در طول تزریق به حیوان اجازه داده شد؛ بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند. پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم با تزریق رنگ متیلن بلو ۱٪ (۰/۳µl) به داخل هر دو کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شد و درون فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شد، و محل ورود کانول به مغز به‌وسیله میکروسکوپ لوپ بررسی گردید. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه‌شده؛ از اطلس پاکسینوس و واتسون استفاده شد. پس از کسب اطمینان از محل قرارگیری کانول‌ها در نواحی مورد نظر؛ اطلاعات حاصل از حیوان مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در تمامی آزمایشها، میزان تأخیر ورود حیوان به خانه سیاه در روز آزمون به‌عنوان ملاک حافظه در نظر گرفته شد، سپس نمره هرگروه به‌صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد (Mean±S.E.M) ثبت گردید. همچنین تعداد آموزش هر حیوان در روز آموزش ثبت شد. به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش، روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی به کار برده شد. اختلاف در سطح $p<۰/۰۵$ به‌عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری نیز از نرم‌افزارSPSS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزارSigma Plot استفاده گردید.

تیمارهای دارویی و آزمایشهای انجام‌شده

آزمایش اول: در این آزمایش برای بررسی تأثیر مورفین بر روی حافظه از هفت گروه حیوان استفاده شد. گروه اول بلافاصله پس از آموزش و ۳۰ دقیقه قبل از تست، سالین را به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند. به سه گروه دیگر مقادیر مختلف مورفین (۲/۵mg/kg، ۵، ۷/۵) بلافاصله پس از آموزش به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. سه گروه باقیمانده نیز مورفین (۷/۵mg/kg) را پس از آموزش، و مقادیر (۲/۵mg/kg، ۵، ۷/۵) را قبل از آزمون دریافت کردند. در روز آزمون ۲۴ ساعت پس از آموزش، میزان حافظه اجتنابی مهاری گروه‌های مختلف حیوانی بررسی و اندازه‌گیری شد.

آزمایش دوم: در این آزمایش برای بررسی اثر نیکوتین بر روی حافظه تخریب‌شده با مورفین از پنج گروه حیوان استفاده شد. گروه اول بلافاصله پس از آموزش، سالین را به‌صورت درون صفاقی و ۳۰ دقیقه قبل از آزمون، سالین را به‌صورت زیرجلدی دریافت کردند. بقیه گروه‌ها پس از آموزش، مورفین (۷/۵mg/kg) را به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند و در روز آزمون ۳۰ دقیقه قبل از تست، مقادیر مختلف نیکوتین (۰mg/kg، ۰/۱، ۰/۰۵، ۱) به‌صورت زیرجلدی به آنها تزریق شد.

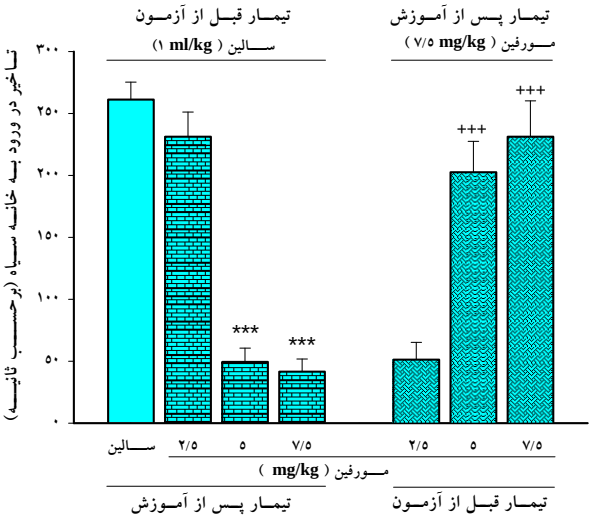
آزمایش سوم: در این آزمایش برای بررسی اثر ال- آرژنین در ناحیه تگمنتوم شکمی بر روی حافظه از هشت گروه حیوان استفاده گردید، چهار گروه اول بلافاصله بعد از آموزش، سالین را به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند و در روز آزمون، مقادیر مختلف ال-آرژنین (۰µg/rat، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵) به‌صورت درون مغزی در داخل ناحیه تگمنتوم شکمی به آنها تزریق شد. به چهار گروه باقیمانده در روز آموزش، مورفین (۷/۵mg/kg) به‌صورت درون صفاقی تزریق شد و در روز آزمون ۵ دقیقه قبل از تست، مقادیر مختلف ال- آرژنین (۰µg/rat، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵) را به‌صورت درون مغزی در داخل ناحیه تگمنتوم شکمی دریافت کردند.

آزمایش چهارم: در این آزمایش برای بررسی اثر ال- آرژنین به‌همراه نیکوتین بر روی حافظه از ۹ گروه حیوان استفاده شد، گروه اول بلافاصله بعد از آموزش و قبل از آزمون، سالین را دریافت کردند. هشت گروه باقیمانده بلافاصله بعد از آموزش، مورفین (۷/۵mg/kg) را به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند.

به یک گروه از این موش‌ها نیز در روز آزمون سالین داده شد، سه گروه مقادیر مختلف ال- آرژنین (۰/۰۳μg/rat، ۰/۰۶، ۰/۱۲) را به‌تنهایی، یک گروه نیکوتین (۰/۱mg/kg) را به‌تنهایی و سه گروه دیگر باقیمانده مقادیر مختلف ال- آرژنین (۰/۰۳μg/rat، ۰/۰۶، ۰/۱۲) را به‌همراه نیکوتین (۰/۱mg/kg) دریافت کردند.

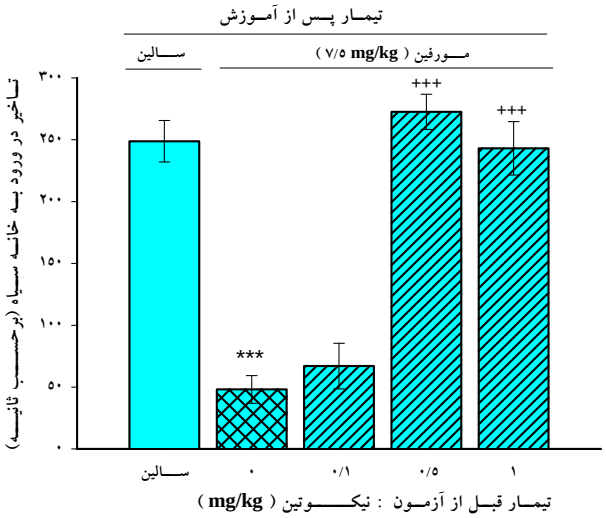
یافته‌ها

آزمایش اول: آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد تزریق پس از آموزش مورفین حافظه را تغییر می‌دهد ($p<0/001$). انجام آزمون مکمل توکی نیز مشخص نمود تزریق پس از آموزش مورفین (۵mg/kg، ۷/۵)، تأخیر در ورود به خانه سیاه و یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش می‌دهد. به‌علاوه، به‌کار بردن مورفین قبل از آزمون قادر به بهبود حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش می‌باشد ($p<0/001$). آزمون مکمل توکی نشان داد مورفین (۵mg/kg، ۷/۵) قادر به بازگرداندن حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش است (نمودار شماره ۱).



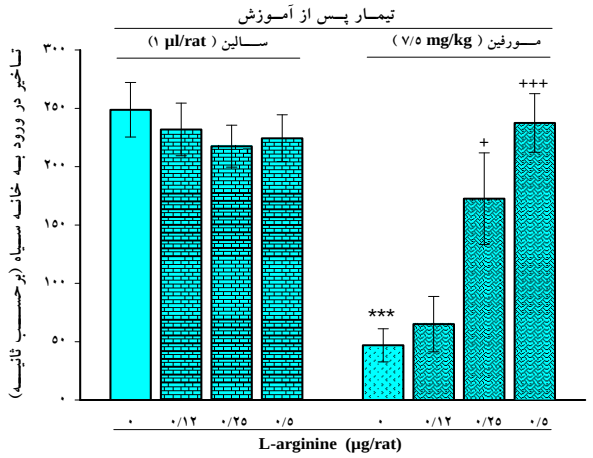
نمودار شماره ۱: تزریق مورفین بعد از آموزش باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود که این تخریب در دوزهای (۵mg/kg، ۷/۵) از لحاظ آماری معنی‌دار است. همچنین تزریق قبل از آزمون مورفین به موش‌های که در روز آموزش نیز تحت تأثیر مورفین بوده‌اند باعث بازگشت حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش می‌شود که این برگشت حافظه در دوزهای (۵mg/kg، ۷/۵) از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد. نتایج به‌صورت (Mean±S.E.M) برای ۸ سر حیوان است. ***p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین/سالین و +++p<۰/۰۰۱ در مقایسه با مورفین/سالین می‌باشد.

آزمایش دوم: آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد تزریق نیکوتین در روز آزمون به موش‌هایی که در روز آموزش تحت تأثیر مورفین قرار داشتند باعث تغییر حافظه می‌شود ($p<0/001$). نتایج آزمون مکمل توکی نیز مشخص نمود دوزهای (۰/۵mg/kg، ۱) نیکوتین به‌صورت معنی‌داری حافظه تخریب‌شده با مورفین را اصلاح می‌کند (نمودار شماره ۲).



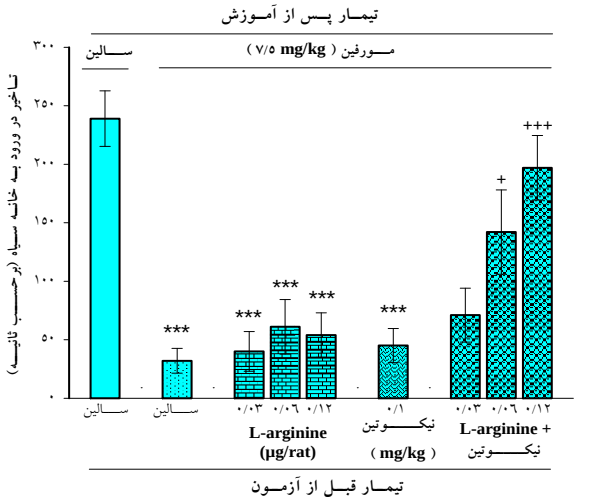
نمودار شماره ۲: تزریق نیکوتین (۰/۵mg/kg، ۱) به موش‌هایی که در روز آموزش مورفین دریافت کرده‌اند، به‌صورت معنی‌داری حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش را به حالت عادی برمی‌گرداند. نتایج به‌صورت (Mean±S.E.M) برای ۸ سر حیوان است. ***p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین/سالین و +++p<۰/۰۰۱ در مقایسه با مورفین/سالین می‌باشد.

آزمایش سوم: آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد بین گروه‌هایی که مقادیر مختلف ال- آرژنین را در حضور سالین دریافت کرده‌اند، با گروه‌هایی که مقادیر مختلف ال- آرژنین را در حضور مورفین دریافت کرده‌اند، تفاوت معنی‌داری وجود دارد [برای مورفین به‌عنوان فاکتور اول ($p<0/001$)، برای مقادیر مختلف ال- آرژنین به‌عنوان فاکتور دوم ($p<0/001$)]. به‌علاوه، تحلیل واریانس یک‌طرفه مشخص نمود تزریق ال- آرژنین قبل از آزمون به حیواناتی که در روز آموزش سالین دریافت کرده‌اند، اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری ندارد ($p>0/05$). از طرف دیگر، آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست مکمل توکی نشان داد به کار بردن ال- آرژنین (۰/۲۵μg/rat، ۰/۵) قبل از آزمون، باعث برگشت معنی‌دار حافظه تخریب‌شده با مورفین می‌شود (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: تزریق ال- آرژنین به‌داخل ناحیه تگمنتوم شکمی قبل از آزمون به‌تنهایی اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری ندارد. اما تزریق درون مغزی ال- آرژنین به‌داخل ناحیه تگمنتوم شکمی حیواناتی که در روز آموزش مورفین دریافت کرده‌اند، حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش را اصلاح می‌کند، که این اثر ال- آرژنین در دوزهای (۰/۲۵µg/rat، ۰/۵) از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد. نتایج به‌صورت (Mean±S.E.M) برای ۸ سر حیوان است. ***p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین/سالین و +++p<۰/۰۰۱، +p<۰/۰۵ گروه مورفین/سالین می‌باشد.

آزمایش چهارم: تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست مکمل توکی مشخص نمود تزریق مقادیر غیرمؤثر ال- آرژنین (۰/۰۳µg/rat، ۰/۰۶، ۰/۱۲) به‌همراه دوز غیرمؤثر نیکوتین (۰/۱mg/kg) به‌صورت معنی‌داری باعث برگشت حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش می‌شود (p<۰/۰۰۱) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ٤: تزریق مقادیر کم ال- آرژنین و نیکوتین به ناحیه تگمنتوم شکمی قبل از آزمون اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری تخریب‌شده با مورفین ندارد. اما تزریق دوزهای بی‌اثر ال- آرژنین به ناحیه تگمنتوم شکمی به‌همراه دوز بی‌اثر نیکوتین به‌صورت سینرژیک باعث برگشت حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش می‌شود. نتایج به‌صورت (Mean±S.E.M) برای ۸ سر حیوان است. ***p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین/سالین و +++p<۰/۰۰۱ ، +p<۰/۰۵ در مقایسه با مورفین/سالین می‌باشد.

بحث

داروهای مورد سوءمصرف مانند مورفین و نیکوتین به‌صورت محیطی استفاده می‌شوند و در پاسخ به مصرف آنها، میزان فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی افزایش یافته و باعث رهایش بیشتر دوپامین در هسته آکومبنس، آمیگدال و هیپوکامپ می‌شود (۱۲،۱۱). نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد تزریق پس از آموزش مورفین باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود. نتایج این مطالعه نیز همسو با مطالعاتی است که نشان می‌دهند تزریق پس یا پیش از آموزش مورفین باعث تخریب حافظه در مدل‌های مختلف یادگیری از جمله یادگیری اجتنابی مهاری می‌شود (۲۱). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد تزریق پیش از آزمون مورفین به حیواناتی که در روز آموزش نیز مورفین دریافت کرده‌اند باعث بهبود حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش می‌گردد، این پدیده یادگیری وابسته به وضعیت نامیده می‌شود، در یادگیری وابسته به وضعیت برای به یادآوری اطلاعاتی که اخیراً کسب شده، جاندار باید در همان شرایطی قرار گیرد که اطلاعات در آن شرایط ثبت شده است (۱۴). همچنین مکانیسم واقعی یادگیری وابسته به وضعیت مشخص نمی‌باشد، اما مطالعات قبلی نشان داده‌اند سیستم‌های نورترانسمیتری مختلف از جمله دوپامین، گلوتامات، استیل کولین، هیستامین، گابا، نیتریک اکساید و کانابینوئیدها در یادگیری وابسته به وضعیت مورفین تا حدودی دخیل هستند (۱۲،۱۱). از طرف دیگر، مطالعات نشان داده‌اند بین سیستم نیتریک اکساید با مورفین و نیکوتین برهمکنش وجود دارد. مورفین بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز را تنظیم می‌کند (۲۲) و نیکوتین به‌واسطه افزایش رهایش گلوتامات و فعال نمودن گیرنده‌های NMDA باعث افزایش تولید نیتریک اکساید می‌شود. شواهد فوق نشان می‌دهند این احتمال وجود دارد که در زمینه یادگیری اجتنابی غیرفعال در ناحیه تگمنتوم شکمی، بین این سیستم‌ها نیز برهمکنش صورت گیرد. لذا در این مطالعه ابتدا اثر نیکوتین بر روی یادگیری وابسته به وضعیت مورفین بررسی شد، سپس اثر تزریق پیش از آزمون ال- آرژنین (پیش‌ساز نیتریک اکساید، که به‌عنوان آگونیست نیتریک اکساید عمل می‌کند) در ناحیه تگمنتوم شکمی در میانجی‌گری اثرات نیکوتین بر روی یادگیری وابسته به وضعیت مورفین بررسی گردید. همسو با مطالعات پیشین، نتایج مطالعه حاضر نشان داد تزریق نیکوتین در روز آزمون باعث بهبود حافظه

تخریب‌شده با مورفین روز آزمون می‌شود (۱۱). به‌عبارت دیگر، نیکوتین قادر به تقلید عملکرد مورفین در روز آزمون است. مطالعات نشان داده‌اند مورفین و نیکوتین اثرات مشابه زیادی را در بدن ایجاد می‌کند، همچنین مشخص شده نیکوتین مانند مورفین می‌تواند نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی را فعال کند (۲۳). دوپامین یکی از میانجی‌های عصبی مهمی است که حافظه اجتنابی مهاری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که مورفین و نیکوتین در روز آزمون به‌واسطه افزایش رهایش دوپامین باعث بهبود حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش شوند. همچنین مشخص شده است که نیکوتین به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم در ناحیه تگمنتوم شکمی باعث فعال‌ترشدن نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود. در روش مستقیم نیکوتین به‌واسطه فعال نمودن گیرنده‌های نیکوتینی روی نورون‌های دوپامینرژیک، رهایش دوپامین را افزایش می‌دهد، اما در روش غیرمستقیم نیکوتین به‌واسطه آزادسازی گلوتامات، فعال‌شدن گیرنده‌های NMDA و در نهایت تولید نیتریک اکساید باعث فعال‌شدن نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود (۲۴). یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد تزریق قبل از آزمون ال- آرژنین، پیش‌ساز نیتریک اکساید که به‌عنوان آگونیست نیتریک اکساید عمل می‌کند به‌تنهایی اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری ندارد، اما می‌تواند حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش را اصلاح کند، جالب‌تر اینکه به کاربردن همزمان مقادیر غیرمؤثر ال- آرژنین با مقدار غیرمؤثر نیکوتین به‌صورت سینرژیک باعث بهبود حافظه اجتنابی مهاری می‌شود، این مشاهدات نشان‌دهنده برهمکنش بین سیستم نیکوتینی و نیتریک اکسایدی در زمینه حافظه اجتنابی مهاری در ناحیه تگمنتوم شکمی می‌باشد. مطالعه احمدی و همکارانش نشان داد در روی نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی، گیرنده‌های NMDA وجود دارد و تزریق NMDA به ناحیه تگمنتوم شکمی به‌واسطه تحریک این نورون‌های دوپامینرژیک و افزایش رهایش دوپامین باعث بهبود حافظه تخریب‌شده با مورفین روز آموزش می‌شود، درحالی‌که تزریق MK-801 (آنتاگونیست گیرنده NMDA) به‌واسطه مهار نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی، از بهبود حافظه تخریب‌شده توسط مورفین روز آموزش توسط نیکوتین روز آزمون جلوگیری می‌کند (۱۲،۱۱). Lisman و Grace در سال ۲۰۰۵ پیشنهاد نمودند یک حلقه عملکردی بین هیپوکامپ و ناحیه تگمنتوم شکمی وجود دارد که اطلاعات ورودی به حافظه درازمدت را تنظیم می‌کند. قوس بالا روی حلقه بین ناحیه تگمنتوم شکمی و هیپوکامپ از نورون‌های دوپامینرژیک تشکیل شده است که از ناحیه تگمنتوم شکمی شروع شده و به هیپوکامپ ختم می‌شود، قوس پایین‌رو شامل هسته آکومبنس و پالیدیوم شکمی است (۲۵). همچنین مشخص شده است فعال‌شدن قوس بالا روی این حلقه عملکردی باعث تقویت یادگیری و حافظه در مدل‌های مختلف یادگیری از جمله یادگیری اجتنابی مهاری می‌شود. مدارک موجود نشان می‌دهد تولید نیتریک اکساید بعد از فعال‌شدن گیرنده‌های NMDA باعث تحریک آزادسازی گلوتامات می‌شود. همچنین نیتریک اکساید کارایی گلوتامات را از طریق القای تقویت درازمدت سیناپسی افزایش می‌دهد (۲۷،۲۶،۳). بنابراین، می‌توان گفت نیتریک اکساید در ناحیه تگمنتوم شکمی در میانجی‌گری اثرات گلوتامات آزادشده توسط نیکوتین، در تحریک نورون‌های دوپامینرژیک نقش مهمی برعهده دارد. با در نظر گرفتن مجموعه یافته‌های فوق می‌توان بیان داشت بخشی از فعال‌شدن نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی توسط نیکوتین، به‌واسطه رهایش گلوتامات در پاسخ به فعال‌شدن گیرنده‌های پیش‌سیناپسی نیکوتین و به تبع آن تولید نیتریک اکساید انجام می‌گیرد؛ زیرا مهار سیستم نیتریک اکساید می‌تواند مانع بهبود حافظه با نیکوتین روز آزمون شود.

نتیجه‌گیری

در راستای مطالعات قبلی، نتایج این مطالعه نشان داد مورفین قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد، و تزریق نیکوتین در روز آزمون به موش‌هایی که در روز آموزش مقدار مؤثر مورفین را دریافت کرده‌اند، باعث بهبود حافظه اجتنابی مهاری تخریب‌شده با مورفین روز آموزش می‌شود. همچنین سیستم نیتریک اکساید ناحیه تگمنتوم شکمی نقش مهمی در میانجی‌گری اثر بهبودبخش نیکوتین بر حافظه تخریب‌شده با مورفین دارد، که به‌احتمال زیاد سیستم نیتریک اکساید به‌واسطه فعال نمودن نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم، این اثر را اعمال می‌کند.

References:

1. Izquierdo I, McGaugh JL. Behavioural Pharmacology and Its Contribution to the Molecular Basis of Memory Consolidation. Behav Pharmacol 2000 Nov; 11(7-8):517-34.

2. Izquierdo I. Effect of Naloxone and Morphine on Various Forms of Memory in the Rat: Possible Role of Engogenous Opiate Mechanisms in Memory Consolidation. Psychopharmacol 1979 Nov; 66(2):199-203.

3. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. Pharmacol Rev 1991 Jun; 43(2):109-42.

4. Zorumski CF, Izumi Y. Modulation of LTP Induction by NMDA Receptor Activation and Nitric Oxide Release. Prog Brain Res 1998;118:173-82.

5. Yanagihara D, Kondo I. Nitric Oxide Plays a Key Role in Adaptive Control of Locomotion in Cat. Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Nov 12;93(23):13292-7.

6. Qiang M, Chen YC, Wang R, Wu FM, Qiao JT. Nitric Oxide Is Involved in the Formation of Learning and Memory in Rats: Studies Using Passive Avoidance Response and Morris Water Maze Task. Behav Pharmacol 1997 Jun; 8(2-3):183-7.

7. Okere CO, Kaba H, Higuchi T. Formation of an Olfactory Recognition Memory in Mice: Reassessment of the Role of Nitric Oxide. Neuroscience 1996 Mar; 71(2):349-54.

8. Biala G, Weglinska B. On the Mechanism of Cross-tolerance Between Morphine and Nicotine-induced Antinociception: Involvement of Calcium Channels. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2006 Jan; 30(1):15-21.

9. Zarrindast MR, Samadi P, Haeri-Rohani A, Moazami N, Shafizadeh M. Nicotine Potentiation of Morphine-induced Catalepsy in Mice. Pharmacol Biochem Behav 2002 May; 72(1-2):197-202.

10. Khajehpour L, Rezayof A, Zarrindast MR. Involvement of Dorsal Hippocampal Nicotinic Receptors in the Effect of Morphine on Memory Retrieval in Passive Avoidance Task. Eur J Pharmacol 2008 Apr 28;584(2-3):343-51.

11. Ahmadi S, Zarrindast MR, Nouri M, Haeri-Rohani A, Rezayof A. N-Methyl-D-aspartate Receptors in the Ventral Tegmental Area are Involved in Retrieval of Inhibitory Avoidance Memory by Nicotine. Neurobiol Learn Mem 2007 Oct; 88(3):352-8.

12. Ahmadi S, Zarrindast MR, Haeri-Rohani A, Rezayof A, Nouri M. Nicotine Improves Morphine-induced Impairment of Memory: Possible Involvement of N-methyl-D-aspartate Receptors in the Nucleus Accumbens. Dev Neurobiol 2007 Jul; 67(8):1118-27.

13. Shulz DE, Sosnik R, Ego V, Haidarliu S, Ahissar E. A Neuronal Analogue of State-dependent Learning. Nature 2000 Feb 3;403(6769):549-53.

14. Colpaert FC, Koek W, Bruins Slot LA. Evidence That Mnesic States Govern Normal and Disordered Memory. Behav Pharmacol 2001 Dec; 12(8):575-89.

15. Pierce RC, Kumaresan V. The Mesolimbic Dopamine System: The Final Common Pathway for the Reinforcing Effect of Drugs of Abuse? Neurosci Biobehav Rev 2006;30(2):215-38.

16. Gasbarri A, Verney C, Innocenzi R, Campana E, Pacitti C. Mesolimbic Dopaminergic Neurons Innervating the Hippocampal Formation in the Rat: A Combined Retrograde Tracing and Immunohistochemical Study. Brain Res 1994 Dec 30;668(1-2):71-9.

17. Wittmann BC, Schott BH, Guderian S, Frey JU, Heinze HJ, Duzel E. Reward-related FMRI Activation of Dopaminergic Midbrain Is Associated with Enhanced Hippocampus-dependent Long-term Memory Formation. Neuron 2005 Feb 3;45(3):459-67.

18. Wonnacott S, Sidhpura N, Balfour DJ. Nicotine: From Molecular Mechanisms to Behaviour. Curr Opin Pharmacol 2005 Feb; 5(1):53-9.

19. Carr DB, Sesack SR. Projections from the Rat Prefrontal Cortex to the Ventral Tegmental Area: Target Specificity in the Synaptic Associations with Mesoaccumbens and Mesocortical Neurons. J Neurosci 2000 May 15;20(10):3864-73.

20. West AR, Galloway MP. Inhibition of Glutamate Reuptake Potentiates Endogenous Nitric Oxide-facilitated Dopamine Efflux in the Rat Striatum: An in Vivo Microdialysis Study. Neurosci Lett 1997 Jul 11;230(1):21-4.

21. Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine State-dependent Learning: Sensitization and Interactions with Dopamine Receptors. Eur J Pharmacol 2004 Aug 23;497(2):197-204.

22. Cuellar B, Fernandez AP, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Bentura ML, et al. Up-regulation of Neuronal NO Synthase Immunoreactivity in Opiate Dependence and Withdrawal. Psychopharmacology (Berl) 2000 Jan; 148(1):66-73.

23. Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of Nicotine on the Nucleus Accumbens and Similarity to Those of Addictive Drugs. Nature 1996 Jul 18;382(6588):255-7.

24. Picciotto MR. Nicotine as a Modulator of Behavior: Beyond the Inverted U. Trends Pharmacol Sci 2003 Sep; 24(9):493-9.

25. Lisman JE, Grace AA. The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information Into Long-term Memory. Neuron 2005 Jun 2;46(5):703-13.

26. Schulman H. Nitric Oxide: A Spatial Second Messenger. Mol Psychiatry 1997 Jul; 2(4):296-9.

27. Steckler T, Oliveira AF, Van Dyck C, Van Craenendonck H, Mateus AM, Langlois X, et al. Metabotropic Glutamate Receptor 1 Blockade Impairs Acquisition and Retention in a Spatial Water Maze Task. Behav Brain Res 2005 Oct 14;164(1):52-60.