



A comparison between usual and ultra low doses of morphine combined with forced swim stress, on memory retention in rat

Azam Sadegh, Masoud Fereidoni, Ali Moghimi

Dept. Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 27 Jan 2010

Accepted: 25 April 2010

Abstract

Introduction: Controversial results have been reported about the effect of morphine and stress on learning and spatial memory in rodents. There are very few studies about the effects of ultra low doses of morphine on memory. In this study, effects of acute administration of low and usual doses of morphine on memory formation and retention in the presence and absence of repeated stress were investigated.

Methods: adult male Wistar rats (200-250g) were divided into 3 groups; A) Rats were trained for 4 constitutive days and then intraperitoneally received different doses of morphine (1 μ g/kg, 10 μ g/kg, 100 μ g/kg, 1mg/kg and 10mg/kg) 30 minutes before retention test on the 5th day. B) Animals experienced forced swimming stress 30 minutes before each training session for 4 constitutive days and memory retention was evaluated on the 5th and 12th days. C) Rats were treated like animals in group B and then like group A. In all groups, retention tests were done without any excessive treatment on the 12th day. Escape latency and mean path length from the starting point to the platform on training days were considered as learning parameters, while time spent in the target quadrant on the 5th and 12th days was regarded as retention parameter.

Results: Memory retention was decreased with 1 μ g/kg and 10 mg/kg doses of morphine on the 5th day ($P < 0.001$). Repeated stress led to decreased learning ($P < 0.001$) and retention on the 5th and 12th days ($P < 0.05$). In animals treated with both repeated stress and acute morphine (except for the dose of 1 mg/kg) retention decreased on the 5th day ($p < 0.001$), while retention diminished for all groups on the 12th day.

Conclusion: Morphine at usual dose of 10 mg/kg may cause memory retention impairment, by its inhibitory action on the opioidergic system. Surprisingly, morphine at ultra low dose (1 μ g/kg) has the same effect and the excitatory action of opioidergic system may be responsible for this effect, however it needs further studies. Repeated stress in combination with morphine even at ineffective dosage could cause memory impairment in the Morris water maze, so the presence of both factors, can probably cause additive impairment of memory.

Key words: repeated stress, ultra low dose of morphine, retention, learning and memory, Morris water maze, rat

*Corresponding author e-mail: fereidoni@yahoo.com

Available online at www.phypha.ir/ppj

مقایسه اثر دوزهای بسیار کم با دوزهای موثر متعارف از مورفین توام با استرس شنای اجباری بر به یاد آوری حافظه در موش صحرایی

اعظم صادق، مسعود فریدونی*، علی مقیمی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

پذیرش: ۵ اردیبهشت ۸۹

دریافت: ۷ بهمن ۸۸

چکیده

مقدمه: مورفین و استرس بر یادگیری و حافظه فضایی اثرات متناقض داشته‌اند. تاکنون اثر دوزهای بسیار کم مورفین بر حافظه پرداخته نشده اما در مطالعه حاضر، تجویز حاد دوزهای بسیار ناچیز مورفین با دوزهای متعارف مقایسه و پاسخ‌ها در حضور استرس مکرر هم بررسی شدند.

روش‌ها: موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۲۵۰g-۲۰۰g) بطریق زیر دسته‌بندی شدند، الف) مورفین حاد (تجویز داخل صفاقی دوزهای ۱۰۰µg/kg، ۱۰µg/kg و ۱mg/kg و ۱۰mg/kg)، پس از ۴ روز آموزش، ۳۰ دقیقه قبل از سنجش حافظه در روز ۵ در ماز آبی مورفین تجویز شد. ب) استرس مکرر، ۳۰ دقیقه قبل از آموزش، حیوانات تحت استرس شنای اجباری قرار گرفتند. حافظه در روز ۵ سنجش شد. ج) استرس مکرر-مورفین حاد، ابتدا تیمارها مثل دسته ب و سپس دسته الف دریافت شد. در کلیه حیوانات سنجش حافظه روز دوازدهم بدون دریافت تیمار انجام شد. زمان و مسافت طی شده تا سکو حین جلسات آموزش بعنوان پارامترهای یادگیری و زمان حضور در ربع دایره هدف در روز ۵ و ۱۲ بعنوان پارامتر به یادآوری اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: دوزهای حاد ۱۰µg/kg و ۱۰mg/kg مورفین، کاهش معنی‌دار در به یادآوری ایجاد نمودند ($P<0.001$). استرس مکرر سبب کاهش روند یادگیری ($P<0.001$) و به یادآوری ($P<0.05$) شد. در همه گروه‌های استرس مکرر-مورفین حاد بجز دوز ۱mg/kg، کاهش به یادآوری مشاهده شد ($P<0.001$).

نتیجه‌گیری: دوز معمول ۱۰mg/kg مورفین احتمالاً توسط اثرات مهارى و دوز بسیار ناچیز ۱۰µg/kg احتمالاً توسط اثرات تحریکی اپیوئیدی مخل به یادآوری می‌شود که نیازمند تحقیق مکانیسمی است. اختلال در به یادآوری در همه گروه‌های استرس مکرر-مورفین حاد، جمع اثرات این دو تیمار را پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: استرس مکرر، دوز بسیار ناچیز مورفین، به یادآوری، حافظه و یادگیری، ماز آبی مورفین، موش صحرایی

مقدمه

حافظه و یادگیری در موش‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد که نوع تجویز مورفین و دوز آن و همچنین روش‌های سنجش حافظه و یادگیری و نوع حافظه مورد سنجش در ایجاد نتایج متناقض موثر باشند. گزارشاتی وجود دارد که نشان‌دهنده حضور مسیرها و گیرنده‌های اپیوئیدریژیک در ناحیه CA1 و دیگر مناطق هیپوکامپ رت می‌باشد. اثرات مثبت اپیوئیدها روی انعطاف‌پذیری سیناپسی در هیپوکامپ قبلاً گزارش شده است. همچنین گزارش شده است

نقش سیستم اپیوئیدی در فرآیندهای حافظه و یادگیری سبب انجام آزمایشات زیادی در این زمینه شده است. مطالعات مختلف اثرات مثبت و یا منفی مورفین را بر روی فرآیندهای

fereidoni@yahoo.com
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

را اعمال می‌کند. دوزهای کورتیکوستروئیدی در مغز شناخته شده است: گیرنده‌های مینرالوکورتیکوستروئیدی (MR) که به مقدار زیاد در مناطقی از سیستم لیمبیک مثل هیپوکامپ بیان می‌شوند و گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی که در سراسر مغز بیان می‌شوند [۵].

استرس علاوه بر تغییرات در آزادسازی کورتیکوسترون سبب تغییراتی در آزادسازی هورمون‌های دیگر مثل کاتکول‌آمین‌ها، نوروپپتیدها و ... می‌شوند که اینها سبب بروز تغییراتی در خواص الکتریکی، شکل و ظرفیت تکثیر سلول‌ها در مغز می‌شوند [۵].

در مطالعات قبلی نشان داده شده است که دوزهای فوق-العاده ناچیز ($\mu\text{g/kg}$) و معمول (mg/kg) مورفین بر فرآیندهایی از قبیل درد دارای اثر متضاد هستند [۱] همانطور که می‌دانیم فرآیندهای حافظه و یادگیری نقش مهمی در زندگی دارند و همچنین از آنجا که در مورد اثر دوزهای فوق-العاده ناچیز مورفین بر حافظه مطالعه‌ای صورت نگرفته است این پژوهش انجام شد تا به این سوالات پاسخ دهد که تجویز حاد دوزهای فوق‌العاده ناچیز و معمول مورفین چه اثراتی بر توان به یادآوری حافظه دارد؟ همچنین می‌دانیم که استرس یک قضیه آشنا در زندگی می‌باشد. این پژوهش به این سوال پاسخ می‌دهد که اثر دوزهای فوق‌العاده ناچیز و معمول مورفین بر حافظه شکل گرفته ضمن حضور استرس در حین فرآیند یادگیری چیست؟ به عبارتی دیگر آیا استرس و اپیوئیدها هم-جهت بر روی حافظه اثر می‌کنند و یا دارای اثرات ناهمسو هستند؟

مواد و روش‌ها

از موشهای صحرایی نر آلبینو نژاد ویستار با سن تقریبی ۲/۵ ماه و وزن بین ۲۵۰ - ۲۰۰ گرم استفاده شد. تمامی موشها در دمای حدود 20 ± 2 °C و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و در تمام مدت حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام آزمایشات بین ساعت ۹ تا ۱۵ انجام شد. برای هر گروه آزمایش تعداد حداقل ۷ رأس موش استفاده شد [۹، ۱]. کلیه عملیات آزمایشگاهی روی جانوران با رعایت مقررات بین‌المللی اخلاق علمی و حمایت از

که تجویز خوراکی مکرر مورفین، تقویت دراز مدت سیناپسی (LTP) را در ناحیه CA1 افزایش می‌دهد [۹]. تجویز داخل بطنی مورفین در دوزهای 0.5 ، 5 و 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ سی دقیقه قبل از آزمون جستجوگری (Probe test) در مازآبی مورفین و فضای باز (Open field)، اثری بر حافظه ندارد [۶]. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که تجویز مزمن مورفین در دوز 10 mg/kg به اکتساب حافظه (acquisition) در ماز آبی مورفین آسیب می‌زند در حالی که تجویز دوز 3 mg/kg هیچ اثری ندارد [۱۵]. همچنین القاء LTP بعد از تجویز حاد مورفین (1h) در سیناپس مسیر پرفورانت-سلول‌های گرانولی شکنج دنداندار کاهش می‌یابد. در مقابل القاء LTP بعد از تزریق مزمن مورفین افزایش می‌یابد و این نشان می‌دهد که اثر تجویز داخل بطنی حاد و مزمن مورفین بر انعطاف‌پذیری سیناپسی در سیناپس مسیر پرفورانت-سلول گرانول متفاوت می‌باشد [۳].

استرس نیز تعدیل‌کننده توانای فرآیندهای حافظه و یادگیری می‌باشد. استرس، اثرات گوناگونی روی حافظه می‌تواند داشته باشد، باین وجود دلایل کافی برای توضیح این همه اثرات پیچیده وجود ندارد. هرچند که استرس به مقدار زیاد، به عنوان عامل آسیب‌رسان به عملکرد شناختی در نظر گرفته می‌شود، مثال‌ها و آزمایشات زیادی وجود دارد که در آن عملکرد نورونی و شناخت به وسیله استرس تسهیل شده و یا حتی متأثر نشده است [۱۱]. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که قرار گرفتن رت‌های بالغ و پرمات‌ها به صورت مداوم در معرض غلظت‌های زیاد گلوکوکورتیکوئیدها یا موقعیت‌های استرس‌زای متفاوت سبب اختلال عملکرد در ماز آبی مورفین، ماز شعاعی، ماز Y و ماز بارنز می‌شود [۱۳].

عواملی همچون منبع استرس، مدت زمان استرس، شدت استرسور، زمان استرسورها با توجه به مرحله حافظه و نوع یادگیری می‌توانند در اثر استرس بر روی عملکرد نورونی و شناخت دخالت داشته باشند [۱۱، ۱۲].

نشان داده شده است که استرس سبب افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) و در نتیجه افزایش آزادسازی کورتیکوسترون در جوندگان و کورتیزول در انسان می‌شود که به خاطر ماهیت لیپوفیلیک آن به راحتی وارد مغز شده و از طریق جفت شدن با گیرنده‌های خود اثرات خود

بدون یافتن سکو ۶۰ ثانیه سپری شده باشد. سه کارآزمایی دیگر به همین ترتیب صورت می‌گرفت. در هر روز از این چهار روز زمان و مسافت طی شده تا رسیدن به سکو به عنوان پارامترهای ارزیابی روند یادگیری اندازه‌گیری شد. مرحله آزمون جستجوگری (Probe trial) یا Retention test در روز پنجم جهت بررسی دقت در مراحل یادگیری اولیه و همچنین توان به یادآوری انجام می‌گرفت. در این مرحله از آزمایش سکو از ماز خارج شده و حیوان طی یک بلاک (شامل ۴ کارآزمایی) از نقاط مشخص شده توسط کامپیوتر در آب رها شد تا با استفاده از حافظه فضایی بتواند حضور خود را در ربع دایره هدف نشان دهد. مدت زمان سپری شده توسط حیوان در ربع دایره هدف که در طی روزهای آموزش سکو در آن قرار داشت به عنوان پارامتر توان به یادآوری در نظر گرفته شد [۹].

در روز دوازدهم نیز همانند روز پنجم در حالی که سکو از حوضچه خارج شده، حیوان طی یک بلاک که شامل ۴ کارآزمایی می‌باشد از نقاط مشخص شده توسط کامپیوتر به درون آب رها شد. در این روز نیز مدت زمان سپری شده توسط حیوان در ربع دایره هدف به وسیله کامپیوتر ثبت و آنالیز شد. برای انجام آزمایش موش‌ها به صورت تصادفی در دسته و گروه‌های آزمایشی ($n=7$) به شرح ذیل قرار گرفتند:

الف: گروه استرس مکرر: ابتدا حیوانات در اتاقک استرس که با آب $17 \pm 1^\circ\text{C}$ پر شده بود به مدت ۵ دقیقه جهت استرس شنا قرار گرفتند. سپس رت‌ها را از محفظه خارج کرده و با حوله خشک کرده و به مدت ۱۵-۵ دقیقه در محیط گرم قرار گرفتند. ۳۰ دقیقه پس از خارج کردن موش‌ها از محفظه، مراحل یادگیری (training) در ماز آبی مورس بر روی آن‌ها انجام شد و پس از آخرین کارآزمایی رت‌ها را با حوله خشک کرده و در یک محیط گرم قرار می‌دهیم. در روز پنجم و همچنین روز دوازدهم بدون اینکه موش‌ها تحت تیمار استرس قرار گیرند، سنجش به‌خاطرآوری (Probe trial) در ماز آبی مورس انجام شد. در گروه شم کنترل حیوانات به مدت چهار روز فقط در محفظه استرس اما بدون آنکه در معرض استرس باشند قرار داده شده و بقیه مراحل مشابه گروه استرس مکرر انجام شد.

ب) مورفین حاد: در این دسته شش گروه سازماندهی شد. مراحل یادگیری در ماز آبی مورس در طی ۴ روز بر روی

حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت. استرس مورد استفاده در این آزمایش استرس شنای اجباری مکرر بود که هر حیوان بطور انفرادی در یک مخزن استوانه‌ای به ابعاد 50 سانتیمتر ارتفاع و 35 سانتیمتر قطر که حاوی 40 سانتیمتر آب $17 \pm 1^\circ\text{C}$ بود، برای ۵ دقیقه در محدوده ساعت ۹ تا ۱۵ وادار به شنا شد. پس از خاتمه حیوان با حوله خشک شده و مورد سنجش‌های بعدی قرار گرفت. استرس شنای اجباری به مدت ۴ روز به عنوان استرس مکرر در نظر گرفته شد [۱].

برای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی از ماز آبی مورس استفاده شد که از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه‌رنگ با قطر داخلی 180cm و ارتفاع 75cm تشکیل شده که با آب $17 \pm 1^\circ\text{C}$ پر شده بود. یک سکوی کوچک از جنس پلکسی-گلاس شفاف با قطر 10cm که یک سانتی‌متر زیر آب است در مرکز ربع دایره جنوب غربی حوضچه قرار گرفت. هر رت به مدت ۵ روز مورد آزمایش قرار گرفت که موقعیت سکو در طول ۴ روز ابتدای آزمایش ثابت بود. مسیر حرکت حیوان از طریق دوربین (Hivision color CCD Camera) ثبت شده و به کامپیوتر انتقال یافته و پارامترهای مختلف از جمله مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو به وسیله نرم‌افزار ردیاب (ساخت شرکت مهار صنعت شرق، ایران) پردازش شد. علایم قابل رویتی از قبیل کامپیوتر، پرده، پنجره و ... در اتاق وجود داشت و حیوان با استفاده از علایم فضایی در خارج ماز، موقعیت سکوی پنهان را پیدا می‌کرد [۹].

روش انجام آزمایش در ماز آبی مورس به این صورت بود که یک روز قبل از شروع آزمایش به منظور آشنایی حیوان با محیط آزمایش، در حالی که در حوضچه آب وجود داشت و سکو مرئی بود، جانور روی سکو قرار داده شد. اگر جانور از سکو پایین می‌آمد، آزمایشگر حیوان را به برگشت به سمت سکو هدایت می‌کرد. سکو در مرکز حوضچه قرار داشت. پس از این مرحله، مرحله یادگیری انجام شد که چهار روز بطول انجامید و حیوان در هر روز طی ۴ کارآزمایی (Trial) تحت آزمایش قرار گرفت. حیوان به صورتی که صورتش رو به دیوار حوضچه بود، از یکی از چهار نقطه (شمال، جنوب، شرق، غرب) در آب رها شد. هر یک از چهار نقطه در هر روز، یک بار استفاده شد و ترتیب آنها به طور تصادفی توسط کامپیوتر تعیین گردید. یک کارآزمایی زمانی تمام می‌شد که موش بر روی سکو رفته و یا

(شکل ۱).

همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که زمان حضور در ربع دایره هدف در گروهی که تحت استرس شنای اجباری مکرر قرار گرفته‌اند در روز پنجم ($P < 0.05$) و در روز دوازدهم ($P < 0.05$) کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (شکل ۲).

زمان حضور در ربع دایره هدف در روز پنجم در گروهی که تحت تجویز حاد دوز بسیار ناچیز $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ قرار گرفته بودند ($P < 0.05$) و در گروهی که تحت تجویز دوز معمول $10 \text{mg}/\text{kg}$ قرار گرفته بودند ($P < 0.001$) کاهش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (شکل ۳-A). اما زمان حضور در ربع دایره هدف در روز دوازدهم در بین گروهها با دوزهای مختلف مورفین تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت (شکل ۳-B).

در گروه‌هایی که تحت تیمار استرس شنای اجباری در حین روزهای آموزش قرار گرفتند و در روز پنجم تجویز دوزهای مختلف مورفین صورت گرفت، زمان حضور در ربع دایره هدف در روز پنجم در دوز $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0.01$)، دوز $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0.05$) و دوز $10 \text{mg}/\text{kg}$ ($P < 0.001$) کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند، در حالی که زمان حضور در ربع دایره هدف در روز پنجم در دوز $1 \text{mg}/\text{kg}$ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت (شکل ۴-A). زمان حضور در ربع دایره هدف در روز دوازدهم در گروه‌های مذکور در دوز $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0.01$)، دوز $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0.05$)، دوز $10 \text{mg}/\text{kg}$ ($P < 0.05$) و دوز $10 \text{mg}/\text{kg}$ ($P < 0.001$) کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند (شکل ۴-B).

بحث

در این آزمایش نشان داده شد که تجویز حاد دوزهای $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (دوز بسیار ناچیز) و $10 \text{mg}/\text{kg}$ (دوز معمول) مورفین در مقایسه با گروه کنترل سبب آسیب به قدرت یادآوری حافظه می‌شوند، درحالی که دوزهای $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ، $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ و $10 \text{mg}/\text{kg}$ تفاوت معناداری با گروه شم‌کنترل

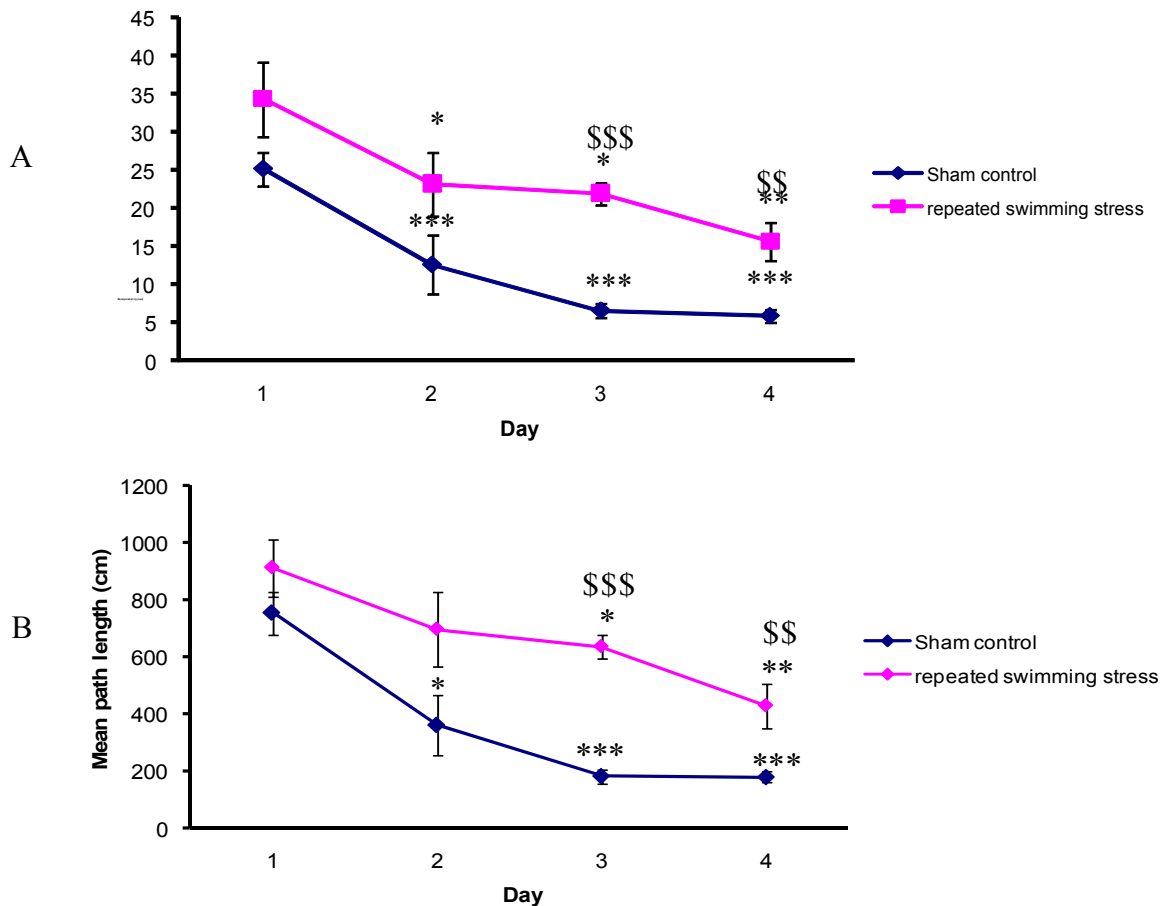
حیوانات انجام شد و در روز پنجم، تجویز سالیین و یا هر یک از دوزهای مورفین ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ، $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ، $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ، $1 \text{mg}/\text{kg}$ و $10 \text{mg}/\text{kg}$) در گروه‌های شش‌گانه به صورت داخل صفاقی انجام شد و ۳۰ دقیقه بعد سنجش حافظه در ماز آبی موریس، در حالی که سکو برداشته شده بود انجام شد. در روز دوازدهم نیز بدون این که رت‌ها تحت تیمار قرار گیرند، سنجش حافظه همانند روز پنجم در حالی که سکو از حوضچه خارج شده انجام شد.

ج) استرس مکرر - مورفین حاد: در این دسته شش گروه جای گرفتند. در این گروه‌ها ۳۰ دقیقه پس از در معرض استرس قرار دادن حیوانات، مراحل یادگیری در ماز آبی موریس بر روی آن‌ها انجام شد. این کار به مدت چهار روز انجام شد. در روز پنجم تجویز دوزهای مورد نظر مورفین ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ، $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ، $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ و $1 \text{mg}/\text{kg}$) در زیر گروه‌های ۵-۱ به صورت داخل صفاقی صورت گرفت و ۳۰ دقیقه بعد مرحله Probe test انجام شد. در روز دوازدهم بدون این که رت‌ها تحت تیمار قرار گیرند، سنجش حافظه در ماز آبی موریس همانند روز پنجم انجام شد.

در گروه شم‌کنترل تمام مراحل فوق انجام گرفت اما حیوانات در محفظه استرس بدون در معرض قرارگیری بوده و در روز پنجم نیز به جای تیمار دارویی، فقط سالیین دریافت کردند. داده‌ها توسط آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین Student-Newman-Keuls مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. در این تحقیق از نرم افزار Instat Graphpad استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که استرس شنای اجباری مکرر، زمان و مسافت طی شده تا رسیدن به سکو را در روزهای آموزش در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد (شکل ۱-A و ۱-B). همچنین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و استرس مکرر در روزهای سوم ($P < 0.001$) و چهارم ($P < 0.01$) آموزش وجود داشت. در این روزها زمان و مسافت طی شده تا سکو در گروه استرس مکرر بطور قابل توجهی بیشتر از گروه کنترل بود



شکل ۱- اثر استرس شنای اجباری مکرر بر زمان رسیدن به سکو (A) و مسافت طی شده تا رسیدن به سکو در روزهای آموزش (B). استرس مکرر در روزهای یادگیری منجر به کاهش روند یادگیری شده است. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده است. ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ در ارتباط با روز اول از همان گروه)، ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$ نسبت به روز مشابه از گروه کنترل) ($n=7$).

تجویز حاد اپیوئیدها از طریق گیرنده‌های جفت شده با پروتئین-های Gi/o، می‌تواند سبب مهار کنداکتانس کلسیم، فعال شدن کنداکتانس پتاسیم و مهار آدنیلیل سیکلاز شوند که همه این‌ها سبب اعمال اثرات مهاری بر سلول می‌شود. مهار آدنیلیل سیکلاز، سبب مهار cAMP و در نتیجه سبب مهار PKA می‌شود [۱۴]. PKA از طریق فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون پروتئین‌ها و هدایت وزیکولهای میانجی به سمت ناحیه فعال سبب افزایش اگزوسیتوز و آزادسازی میانجی شود [۷]. پس مهار PKA، مانع وقایع مذکور و کاهش آزادسازی نوروترانسمیترهایی از قبیل گلوتامات، استیل کولین و... می‌شود که مجموعاً این عوامل می‌توانند روی فعالیت نورونی تأثیر گذاشته و سبب آسیب در توان یادآوری حافظه شکل گرفته می‌شود. همچنین پیشنهاد شده که سیستم کولینرژیک، در اثرات مورفین روی حافظه موثر می‌باشد. مطالعاتی نشان می‌دهند که آگونیست‌های اپیوئیدی از قبیل مورفین و اندومورفین، تمایل

نداشتند و این دوزهای مورفین نتوانسته بود تأثیر معنی‌داری بر توان به یادآوری حافظه شکل گرفته باشد (شکل A-۳)، در حالی که در روز دوازدهم هیچ یک از گروه‌های تیمار شده با مورفین تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشتند (شکل B-۳). از آنجا که در این آزمایش تجویز دوزهای حدواسط به صورت حاد نتوانسته بود سبب آسیب به توان به یادآوری حافظه شود (شکل A-۳)، می‌توان گفت که احتمالاً مکانیسم اثر دوز $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ بر روی حافظه با مکانیسم اثر دوز $10 \text{mg}/\text{kg}$ متفاوت می‌باشد.

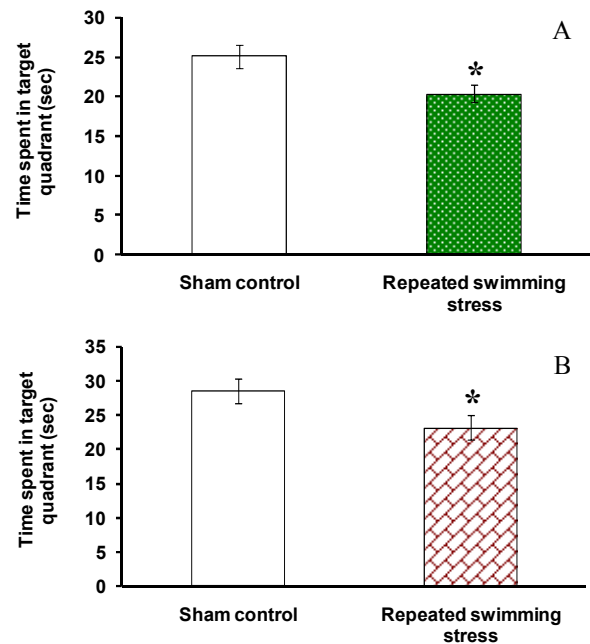
از آنجا که این ادعا وجود دارد که LTD و LTP در مکانیسم‌های یادگیری و حافظه درگیر هستند، این احتمال وجود دارد که مورفین انعطاف‌پذیری سیناپسی را به وسیله مکانیسم‌های مستقیم و غیر مستقیم متأثر کند [۱۴]. همان‌طور که نتایج نشان داد، دوز $10 \text{mg}/\text{kg}$ مورفین به صورت حاد، سبب آسیب به توان به یادآوری حافظه می‌شود.

و تداخل آن با حافظه در هیپوکامپ پیشنهاد می‌گردد. از آنجا که در زمان حضور در ربع دایره هدف در روز دوازدهم در بین گروه‌هایی که تحت تیمار دوزهای مختلف مورفین در روز پنجم قرار گرفته‌اند در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود می‌توان گفت که اثرات حاد یک تجویز مورفین تدریجاً برطرف شده، بطوری که اثرات دوزهای 10 mg/kg و $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ مورفین که سبب اختلال در یادآوری حافظه در روز پنجم شده بودند، در روز دوازدهم از بین رفته و این دوزها تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشتند (شکل B-۳). بنابراین تجویز دوزهای منفرد مورفین اثرات درازمدتی بر حافظه شکل گرفته نداشته و تأثیر آن محدود به زمان بکارگیری دارو بوده است.

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که استرس مکرر سبب کاهش روند یادگیری در مقایسه با گروه کنترل می‌شود (شکل ۱). همچنین استرس مکرر سبب کاهش زمان حضور در ربع دایره هدف در روز پنجم می‌شود که نشان‌دهنده اثرات تخریبی استرس مکرر بر روی توان یادآوری حافظه می‌باشد (شکل A-۲)، به صورتی که حتی در روز دوازدهم نیز اثرات تخریبی استرس بر روی حافظه همچنان قابل مشاهده می‌باشد (شکل B-۲).

نشان داده شده است که استرس مکرر و سطوح زیاد گلوکوکورتیکوئیدها نورون‌ها را در شکنج دنداندار متوقف کرده و بقاء سلول را به خطر می‌اندازد. همچنین استرس مکرر، در ناحیه CA3 سبب آتروفی دندریتهای رأسی نورون‌های هرمی می‌شود [۱۱]. پس احتمالاً استرس مکرر از طریق آسیب و کاهش نورون‌ها در ناحیه هیپوکامپ سبب آسیب به یادگیری و قدرت یادآوری حافظه می‌شود. از طرفی مشخص شده که گلوکوکورتیکوئیدها سبب القاء تغییراتی در هموستاز کلسیم می‌شوند که این عمل ممکن است در آسیب به عملکرد سیناپسی در هیپوکامپ و در نتیجه یادگیری نقش داشته باشد [۲].

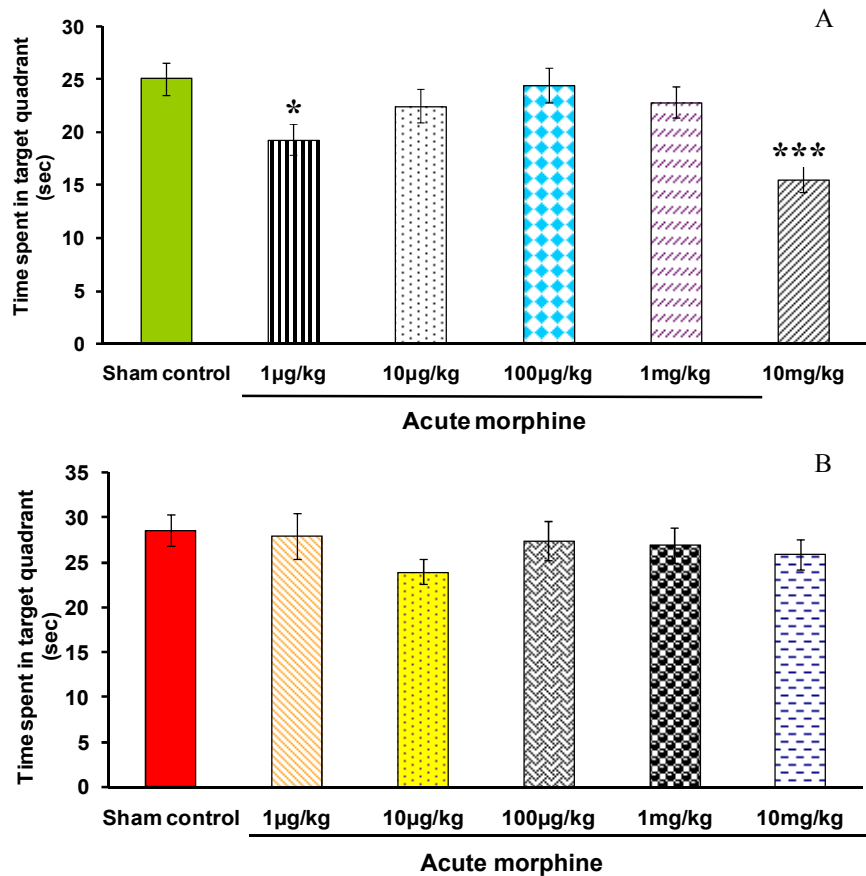
یکی از برجسته‌ترین خصوصیات هیپوکامپ در رت، وجود سلول‌های مکانی می‌باشد که این‌ها نورون‌هایی هستند که زمانی که حیوان در یک موقعیت ویژه در فضا قرار می‌گیرد، از خود فعالیت الکتریکی نشان می‌دهند. مشخص شده است که برای اینکه یک حافظه ضمنی خاص در جمعیتی از سلول‌های مکانی ذخیره شود، این سلول‌ها باید با یک سرعت خاص تحریک



شکل ۲- مقایسه زمان حضور در ربع دایره هدف در روز پنجم (A) و دوازدهم (B) در دو گروه کنترل و استرس مکرر. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده است. ($n=7$) (* $P<0.05$)

زیادی برای گیرنده‌های اپیوئیدی μ دارند که فعالیت کولینرژیک را در هیپوکامپ مهار می‌کنند. به صورت نرمال، گیرنده‌های اپیوئیدی μ و δ موجود بر روی پایانه‌های کولینرژیک، تحت مهار تونیک سیستم اپیوئیدی قرار دارند. پیشنهاد می‌شود که آسیب در یادآوری حافظه که به وسیله تجویز حاد مورفین در این پژوهش ایجاد گردید حداقل قسمتی مرتبط با کاهش آزادسازی استیل‌کولین هیپوکامپی باشد [۴].

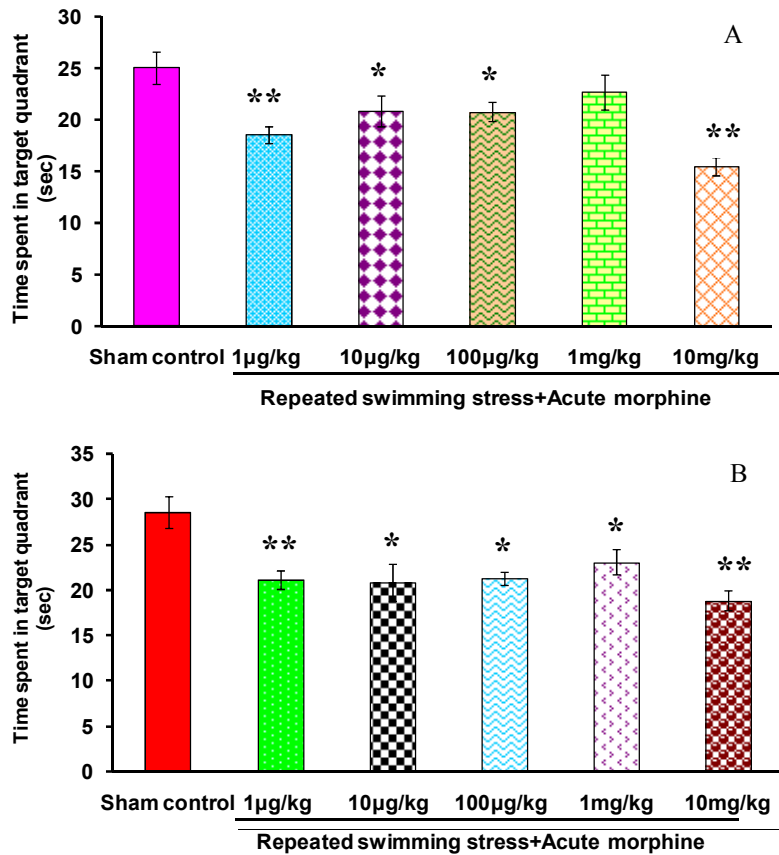
در مطالعات قبلی نشان داده شده است که دوز معمول مورفین (10 mg/kg) دارای اثرات مهاری و ضدردی و دوز بسیار ناچیز مورفین ($1\text{ }\mu\text{g/kg}$) مورفین دارای اثرات تحریکی و پردردی می‌باشد [۱۰]. از طرف دیگر ذکر شده است که اثرات تحریکی مورفین از طریق جفت شدن گیرنده با پروتئین‌های تحریکی Gs و اثرات مهاری مورفین از طریق جفت شدن گیرنده با پروتئین‌های مهاری Gi/o میانجی‌گری می‌شود [۱]. اما در این آزمایش نشان داده شد که دوزهای 10 mg/kg و $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ مورفین، هر دو سبب اختلال در به یادآوری حافظه می‌شوند. این اثر به دلیل عملکرد مهاری اپیوئیدی برای دوز 10 mg/kg قابل فهم است اما این که دوز $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ مورفین به کمک چه مکانیسمی سبب آسیب به حافظه می‌شود، نیازمند مطالعه بیشتر است. بنابراین بررسی اثر تحریک فعالیت حاد Gs



شکل ۳- مقایسه زمان حضور در ربع‌دایره هدف در بین گروه‌ها با دوزهای مختلف مورفین و گروه کنترل در روز پنجم (A) و روز دوازدهم (B). فقط دوزهای ۱ μg/kg و ۱۰ mg/kg مورفین در روز پنجم روی یادآوری اثر مخرب داشته‌اند. نتایج به صورت Mean ± SEM بیان شده است. (* P<0.05, ***P<0.001) (n=7).

شوند که برای انجام این عمل انعطاف‌پذیری نورونی مورد احتیاج می‌باشد. استرس با اثر بر روی انعطاف‌پذیری نورونی، مانع از آن می‌شود که این سلول‌های مکانی بتوانند با آن سرعت خاص تحریک شوند که عدم تحریک آنها سبب آسیب به حافظه می‌شود [۸]. اثرات تخریبی استرس بر روی حافظه در روز ۱۲ همچنان وجود دارد (شکل B-۲). این نشان از اثر عمیق استرس در فرآیند یادگیری در روزهای آموزش می‌باشد که مانع از شکل‌گیری حافظه فضایی شده است. حال که معلوم شد هم تجویز حاد دوزهای بسیار ناچیز مورفین و دوز معمول آن و از طرفی استرس مکرر قادر به اختلال در حافظه هستند، به بررسی تداخل اثر توأم آن‌ها در حافظه پرداخته‌ایم. در قسمت قبل نشان داده شد که دوزهای ناچیز ۱۰ μg/kg و ۱۰۰ μg/kg مورفین بی‌اثرند، ولی دوز ناچیز ۱ μg/kg مورفین سبب اختلال در توان به‌یادآوری می‌شود (شکل ۳) اما زمانی که ابتدا حیوان را تحت استرس شنای اجباری مکرر قرار داده و سپس مورفین به آنها تجویز شد، دوزهای ۱۰ μg/kg و

۱۰۰ μg/kg نیز می‌توانند سبب اختلال در توان به‌یادآوری حافظه در روز پنجم شوند (شکل A-۴). لذا حضور استرس می‌تواند سبب تغییر اثرات مورفین در ایجاد اختلال در قدرت به‌یادآوری حافظه شود. از طرف دیگر قبلاً مشخص شد که تجویز حاد دوزهای فوق‌العاده ناچیز و معمول مورفین در روز پنجم، هیچ تأثیری در قدرت به‌خاطرآوری در روز دوازدهم آزمایش نداشت، (شکل B-۳). شاید به این دلیل که مورفین هفت روز پس از تجویز، تدریجاً متابولیزه و یا دفع شده و اثرش در به‌خاطرآوری کاهش یافته و سرانجام از بین رفته است. اما استرس مکرر حین یادگیری سبب تغییر و بلکه ابقاء اثرات مورفین بر به‌یادآوری شده است، طوریکه در تمام دوزهای مورفین در حیوانات استرس دیده، در روز ۱۲ اختلال در به‌یادآوری مشاهده شد (شکل B-۴). در این میان مشاهده می‌شود که در عدم حضور استرس، تجویز دوز ۱ mg/kg مورفین در روز ۵ و ۱۲ تأثیری بر به‌یادآوری ندارد (شکل ۳). در حضور استرس، این دوز در روز پنجم نتوانست اختلالی در به‌یادآوری



شکل ۴- زمان حضور در ربع دایره هدف در بین گروه‌هایی که تحت تأثیر استرس مکرر حین یادگیری و سپس تحت تیمار با دوزهای مختلف حاد مورفین در روز پنجم قرار گرفته‌اند، روز پنجم (A)، روز دوازدهم (B). تمام دوزها به‌جز دوز ۱mg/kg مورفین در روز پنجم در به‌یادآوری اختلال ایجاد کرده‌اند، که این اثر در روز ۱۲ مشمول تمام دوزهای مورفین شده است. نتایج به صورت Mean ± SEM بیان شده است. ($n=7$) (***) $P<0.001$, (***) $P<0.01$, (*) $P<0.05$.

که اثرات یکدیگر را خنثی کرده‌اند. به صورتی که اولاً در عدم حضور استرس، این دوز بی‌اثر می‌باشد (شکل ۳) و ثانیاً در حضور استرس مکرر، علیرغم اثر استرس در تقویت اثرات مخرب سایر دوزهای حاد مورفین بر به یادآوری، برای این دوز حداقل در روز پنجم بی‌اثر بوده است (شکل ۴-A). پس بطور خلاصه می‌توان گفت که در این گروه‌ها، استرس از طریق مکانیسم‌هایی که در قسمت قبل بیان شد از قبیل تأثیر بر روی سلول‌های مکانی، نورونز و ... سبب تغییر اثرات تخریبی مورفین بر حافظه می‌شود.

سپاسگزاری

از گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد که در تامین هزینه این پژوهش همکاری داشتند کمال قدردانی به عمل می‌آید.

داشته باشد (شکل ۴-A)، اما مشاهده شد که این دوز مورفین در روز دوازدهم در حضور استرس سبب اختلال در به یادآوری می‌شود (شکل ۴-B) که علت آن نیاز به بحث و مطالعه بیشتری دارد. چون دوز ۱ mg/kg حد واسط دوزهای بسیار ناچیز میکرونی و معمول میلی گرمی می‌باشد و در روز پنجم و دوازدهم در عدم حضور استرس و برخلاف سایر دوزها در روز پنجم در حضور استرس اختلال معنی‌داری در به یادآوری حافظه ایجاد نکرد (شکل ۳ و شکل ۴-A) می‌توان احتمال داد که مکانیسم اثر دوزهای بسیار ناچیز میکرونی و معمولی میلی-گرم بر ایجاد اختلال در حافظه متفاوت می‌باشد و دوز ۱ mg/kg به عنوان دوز حدواسط بین این دو مکانیسم اثر، نه از مکانیسم دوزهای معمول در محدوده میلی گرم و نه از مکانیسم دوزهای بسیار ناچیز در محدوده میکرونی برای اثر بر یادگیری و حافظه بهره‌مند است یا اگر آن مکانیسم‌ها مطرح باشند برای این دوز هر دو مکانیسم عمل می‌کنند، به نحوی

References

- [1] Fereidoni M, Javan M, Semnani S, Ahmadiani A, Chronic forced swim stress inhibits ultra-low dose morphine-induced hyperalgesia in rats. *Behav Pharmacol* 18 (2007) 667–672.
- [2] Garcia R, Stress, Hippocampal Plasticity, and Spatial Learning. *Synapse* 40 (2001) 180–183.
- [3] Ito Y, Tabata K, Makimura M & Fukuda, Acute and chronic intracerebroventricular morphine infusions affect long-term potentiation differently in the lateral perforant path. *Pharmacol Biochem Behav* 70(2001), 353-358.
- [4] Jafari MR, Zarrindast MR, Djahanguiri B, Influence of cholinergic system modulators on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physio Behav* 88 (2006) 146–151.
- [5] Joēls M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen P J, Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 28 (2007) 72–96.
- [6] Kahvec N, Gulec G & Ozluk K, Effects of intracerebroventricularly-injected morphine on anxiety, memory retrieval and locomotor activity in rats: Involvement of vasopressinergic system and nitric oxide pathway *Pharmacol Biochem Behav* 85(2006) 859-867.
- [7] Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, *Principles of Neural Science*, 4 Ed. New York: McGraw-Hill Companies, 2000, p 1248-79.
- [8] Kim JJ, Lee HJ, Welday AC, Song, E, Cho J, Sharp PE, et al, Stress-induced alterations in hippocampal plasticity, place cells, and spatial memory. *PNAS*, 104 (2007) 18297–18302.
- [9] Pourmotabbed A, Tahmasian M, Shahi M, Darabkhani HK, Fathollahi Y, Facilitating effects of morphine dependence on spatial learning and memory in rat. *DARU* 15(2007) 156-161.
- [10] Powell K, Abul-Husn N, Jhamandas A, Olmstead M, Beninger R, Jhamandas K, Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia, tolerance, and reward in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 300 (2002) 588-596.
- [11] Sandi C, Pinelo-Nava MT, Stress and Memory: Behavioral Effects and Neurobiological Mechanisms. *Neural Plast* 2007 (2007) 1-20.
- [12] Schwabe L, Wolf OT & Oitzl MS, Memory formation under stress: Quantity and quality. *Neurosci Biobehav Rev* 34(2010) 584-591.
- [13] Vasconcellos APS, Tabajara AS, Ferrari C, Rocha E, Dalmaç C, Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiol Behav* 79(2003) 143-149.
- [14] Williams JT, Christie MJ, Manzoni O, Cellular and Synaptic Adaptations Mediating Opioid Dependence. *Physiol Rev* 81 (2001) 299-343.
- [15] Zheng XG, Xin-Wang L, Xiao-Yan Y & Nan S, Effects of scopolamine and physostigmine on acquisition of morphine-treated rats in morris water maze performance. *Acta pharmacol sin* 23(2002) 477-480.