Physiology and Pharmacology, 18 (2), 224-235
Summer 2014 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of ecstasy microinjection on spatial memory and it's interaction with glutamatergic system in male rats

Akram Abbasian, Homeira Hatami Nemati*, Seyed Mehdi Banan Khojasteh

Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 21 Nov 2013 **Accepted: 24 May 2014**

Abstract

Introduction: Ecstasy is an amphetamine derivative, which its use has been consistently increasing over the past years. Ecstasy interacts with the glutamatergic system and it is known that glutamate receptors have a key role in learning and memory. The aim of this study was to investigate the interaction of ecstasy and glutamatergic system on learning and memory.

Methods: Fifty-six male Wistar rats weighting (250±50 g) were randomly divided into 8 groups, which received injections for 7 consecutive days. Spatial memory was assessed using Morris Water Maze, performed for 5 consecutive days after the treatment period.

Results: The swim speed showed no significant difference among the groups. The mean latency time in finding the hidden platform was increased during test trial in the ecstasy, MK-801 (a glutamate antagonist) and ecstasy + MK-801 groups compared to the control ($P < 0.05$), while it was decreased during test trial in ecstasy, NMDA and ecstasy + NMDA groups compared to the control ($P< 0.05$). The mean latency distance in finding the hidden platform was increased during test trial in ecstasy, MK-801 and ecstasy + MK-801 groups compared to the control ($P < 0.05$), and decreased during test trial in ecstasy, NMDA and ecstasy + NMDA groups compared to the control ($P<0.05$).

Conclusion: Results showed that ecstasy with NMDA treatment attenuated the reduced spatial memory by ecstasy. Ecstasy with MK-801 potentiated the reduced spatial memory by ecstasy.

Key words: Ecstasy, hippocampus, spatial memory, glutamate

* Corresponding author e-mail: homeirahatami@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۸ (۲)، ۲۲۴ – ۲۳۵
تابستان ۱۳۹۳

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بررسی اثرات ریزتزریق اکستازی و تداخل عمل آن با سیستم گلوتاماترژیک بر حافظه فضایی در موش های صحرایی

اکرم عباسیان، حمیرا حاتمی نعمتی*، سید مهدی بانان خجسته
گروه علوم جانوری، دانشکده‌ی علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

دریافت: ۳۰ آبان ۹۲ پذیرش: ۳ خرداد ۹۳

چکیده

مقدمه: اکستازی یک آمفتامین مشتق شده است که به طور وسیعی مورد سوء استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اثرات اکستازی روی سیستم گلوتاماترژیک و نقش محوری گیرنده های گلوتامات در فرآیند حافظه و یادگیری هدف پژوهشی حاضر بررسی تداخل عمل اکستازی با سیستم گلوتاماترژیک روی حافظه و یادگیری می‌باشد.

روش ها: در این مطالعه از ۵۶ سر موش صحرایی نر استفاده شد. سپس با استفاده از جراحی استرئوتاکسی به مدت ۷ روز تزریقات انجام شد. بعد از تزریق با استفاده از ماز آبی موریس طی ۵ روز حافظه فضایی موش های صحرایی نر بررسی شد.

یافته ها: نتایج نشان داد در طی روزهای آموزش میانگین سرعت شنا بین تمامی گروه‌ها تفاوت معنی داری را نشان نداد. با توجه به آنالیز داده های زمان، میانگین مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکو بین گروه اکستازی، آنتاگونیست گلوتامات، گروه اکستازی به همراه آنتاگونیست گلوتامات افزایش یافت ($P<0.05$)، از طرفی بین گروه آگونیست گلوتامات، اکستازی به همراه آگونیست گلوتامات کاهش معنی دار مشاهده شد ($P<0.05$). با توجه به آنالیز داده های مسافت میانگین مسافت طی شده برای رسیدن به سکو بین گروه اکستازی، آنتاگونیست گلوتامات، و گروه اکستازی به همراه آنتاگونیست گلوتامات افزایش نشان داد ($P<0.05$)، بین گروه آگونیست گلوتامات، اکستازی به همراه آگونیست گلوتامات کاهش ($P< 0.05$) معنی دار مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که ارائه آگونیست گلوتامات به همراه اکستازی سبب تخفیف حافظه کاهش یافته، توسط اکستازی و ارائه آنتاگونیست گلوتامات بـه همـراه اکستازی سبب کاهش حافظه توسط اکستازی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اکستازی، هیپوکامپ، حافظه فضایی، گلوتامات

مقدمه

اکستازی یکی از فرآورده های مت آمفتامین ها مـی‌باشـد که منجر به آسیب سلول‌های مغزی می‌شود. محرک روانـی ۳ و ۴- متـیلن دی اکسـی مـت آمفتـامین[1] (MDMA) یـک آمفتامین مشتق شده اسـت کـه بـه طـور وسـیعی مـورد سـوء استفاده قرار می‌گیرد. اکستازی (MDMA) برای اولـین بـار در سال ۱۹۱۴ توسط شرکت مـرک (Merck) آلمـان بـه عنـوان داروی لاغری و کاهنده اشتها ساخته و عرضه شـد. اکسـتازی در بدن اثر دوگانه دارد، بدین ترتیب که از یک طرف به عنـوان آگونیست آمفتامین ها باعث تحریک قسمت‌های مختلف بـدن و بویژه مغز می‌شود و از طرف دیگر بـا ایجـاد تـوهم و از بـین رفتن کنترل فـرد امکـان ایجـاد رفتارهـای پرخطـر را افـزایش می‌دهد [۱، ۱۸].

اکستازی می‌تواند نوروترانسمیتر طبیعی را به مقدار بـیش از اندازه آزاد کند یا مانع بازیافت طبیعـی مـواد شـیمیایی در مغـز

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: homeirahatami@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj
1. 1- 3, 4- Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)

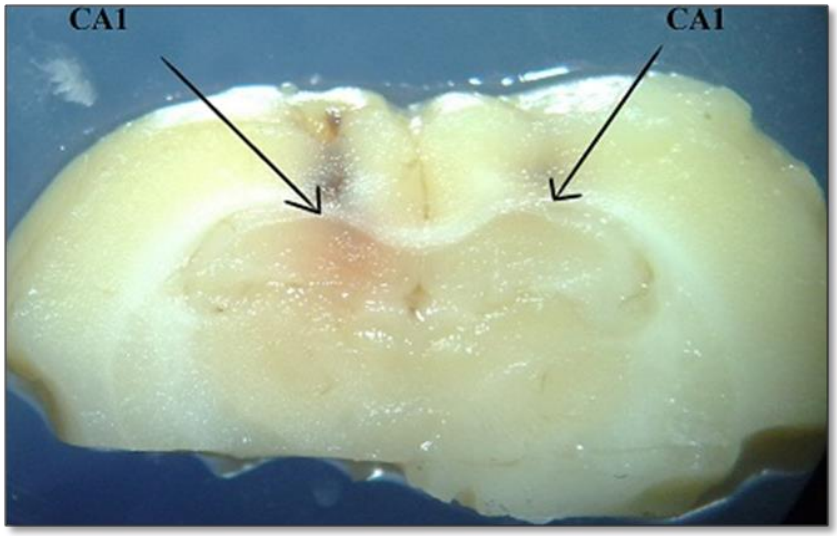
گردد. این اختلال سبب ایجاد یک پیام بسیار تشدید شده می‌گردد و در نهایت مسیرهای ارتباطی را دچار اشکال می‌کند. اکستازی (MDMA) در انسان با کاهش در جنبه های مختلف عملکرد حافظه ای همراه است. بنابراین فرض بر این است که اکستازی (MDMA) با صدمه به پایانه های اعصاب سروتونرژیک پردازش هیپوکامپ را تغییر می‌دهد. نگرانی‌ها بیشتر به علت تغییرات روانی است که پس از قطع استفاده از اکستازی (MDMA) رخ می‌دهد که در درجه اول شامل از دست دادن حافظه است [۲۳]. هیپوکامپ یکی از ساختارهای مغز می‌باشد که در فرآیند یادگیری و حافظه نقش مهمی دارد. مسیر عصبی نفوذی به ناحیه شکنج دندانه ای هیپوکامپ، گلوتاماترژیک می‌باشد و نقش مهمی در ایجاد تقویت طولانی مدت، شکل پذیری سیناپسی و یادگیری و حافظه دارد [۱۴، ۲۹]. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که اختلال در حافظه و یادگیری در مصرف کنندگان منظم اکستازی دیده می‌شود. اختلال در حافظه اولیه در مصرف کنندگان اکستازی ممکن است مربوط به آسیب پذیری هیپوکامپ به دلیل اثرات نوروتوکسیک اکستازی (MDMA) باشد. اختلال در ناحیه هیپوکامپ پس از مصرف اکستازی ممکن 1-3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) است یک عامل خطرناک برای شروع زودتر یا شدیدتر زوال حافظه در سال‌های بعد باشد [۲۲].

اکستازی موجب آزاد سازیدوپامین، سروتونین و نوراپی نفرین می‌شود. مشخص شده اکستازی بر روی سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلفی از جمله سروتونین، دوپامین و گلوتامات تأثیر می‌گذارد. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که مصرف اکستازی موجب افزایش فعالیت گیرنده های گلوتاماتی شده و این امر فعالیت غیر قابل مهار سلول‌های عصبی را به دنبال دارد که در نهایت به صورت افزایش تمایل به جستجوی دارو، خود را نشان می‌دهد [۶]. مصرف مکرر اکستازی سبب هیپرترمی و افزایش درجه حرارت بدن می‌شود که به نوبه خود سبب آزادسازی دوپامین (DA) و سروتونین (5-HT) می‌شود، به علاوه استرس بالا در نتیجه مصرف اکستازی منجر به افزایش سطح گلوتامات در هیپوکامپ می‌شود [۶، ۷].

مطالعات انجام شده بر روی اثرات اکستازی بر روی سیستم گلوتاماترژیک و حافظه نشان می‌دهد که هیپرترمی ایجاد شده توسط اکستازی سبب افزایش غلظت گلوتامات خارج سلولی می‌شود، افزایش گلوتامات سبب فعال شدن گیرنده های NMDA می‌شود که سبب افزایش سطح کلسیم داخل سلولی می‌شود. این افزایش کلسیم منجر به فعال شدن کینازهای متعدد، لیپازها و پروتئازها و در نهایت منجر به ایجاد فرآیند استرس اکسیداتیو و تولید گونه های نیتروژن و اکسیژن واکنشی و تخریب مناطق مختلف مغزی به خصوص هیپوکامپ و اختلال در حافظه می‌شود [۱۳]. مصرف متناوب اکستازی (MDMA) موجب تغییر در بیان رونوشت ژن زیر واحدهای گیرنده AMPA و NMDA گلوتاماترژیک که در مناطقی از مغز در تنظیم یادگیری مربوط به شناخت حافظه نقش دارند می‌گردد.این نتایج پیشنهاد می‌کنند که مت آمفتامین ها سبب تغییر در سطوح زیرواحد های گیرنده های NMDA و AMPA هیپوکامپ و در نتیجه اختلال در حافظه فضائی می‌شوند. شواهدی از اثرات نوروتوکسیسیتی مت آمفتامین ها و اکستازی بر روی هیپوکامپ وجود دارد که شامل آتروفی هیپوکامپ و اختلال در حافظه است. اثرات مضر طولانی مدت مت آمفتامین ها عمدتاً در ارتباط با دوپامین و سروتونین مطرح شده اما در طول دهه گذشته برروی اثرات و تغییرات گلوتامات نیز متمرکز گردیده است [۳۰]. با توجه به اثرات اکستازی روی سیستم گلوتاماترژیک و نقش محوری گیرنده های گلوتامات در فرآیند حافظه و یادگیری هدف پژوهش حاضر بررسی تداخل عمل اکستازی با سیستم گلوتاماترژیک روی حافظه و یادگیری می‌باشد. به عبارتی دیگر سؤال اصلی این است که اثرات تحریک و مهار سیستم گلوتاماترژیک چه تأثیری بر حافظه فضایی موش های صحرایی نر معتاد به اکستازی دارد؟

مواد و روش ها

در مطالعه‌ی حاضر تعداد ۵۶ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی (۵۰±۲۵۰) گرم، از حیوان خانه دانشگاه شهید بهشتی تهران خریداری شد و به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده‌ی علوم دانشگاه تبریز انتقال یافت. موش‌ها به مدت دو هفته برای رسیدن به حالت پایه و رفع استرس در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. در طول دوره



شکل ۱- تأیید بافت‌شناسی ماکروسکوپی به منظور تعیین محل دقیق کانول‌گذاری. ناحیه‌ی CA_1 هیپوکامپ پس از ریز تزریق دوطرفه‌ی رنگ قرمز خنثی در تصویر مشخص است.

آزمایش، دمای محل نگهداری موش‌ها برابر با ۲±۲۲ درجه سانتیگراد بود و همچنین موش‌ها در شرایط سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (۷ صبح تا ۷ شب) در حالی که دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند، نگهداری می‌شدند. کلیه آزمایشات روی حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و ثبت شده بین‌المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

موش‌ها به طور تصادفی به هشت گروه هفت تائی تقسیم شدند: I- گروه کنترل سالم، II- گروه شاهد (سالین)، III- گروه دریافت کننده‌ی اکستازی (MDMA) (۰/۲μg/μL)، IV- گروه دریافت کننده‌ی آگونیست گلوتامات (ان- متیل-د-آسپارتات) (NMDA) (1μg/μL)، V- گروه دریافت کننده‌ی آنتاگونیست گلوتامات (MK-801) (0.1μg/μL)، VI-گروه دریافت کننده‌ی آنتاگونیست گلوتامات (MK-801) (0.1 μg/μL) + آگونیست گلوتامات (NMDA) (1μg/μL)، VII- گروه دریافت کننده‌ی اکستازی (0.2 μg/μL) + آگونیست گلوتامات (1 μg/μL) (MN)، VIII- گروه دریافت کننده‌ی اکستازی (0.2 μg/μL) + آنتاگونیست گلوتامات (0.1 μg/μL) (MM).

موش‌ها به صورت عمیق با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۵mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting, USA) در موقعیت جمجمه مسطح مستقر گردیدند. پوست ناحیه سر به حداقل میزان برش داده شده، پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و بر اساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس، ناحیه مربوط به CA_1 هیپوکامپ در سطح جمجمه به صورت دوطرفه مشخص گردید (AP= -۳/۸; ML= ±۲/۲; DV= +۲/۷) و کانول‌گذاری انجام شد (کانول راهنما سرسرنگ شماره ۲۳). کانول ها با کمک پیچ عینک و اکریل دندانپزشکی به جمجمه فیکس شدند. برای باز نگهداشتن کانول یک سیم مسی در داخل کانول قرار داده شد. تا زمان به هوش آمدن موش‌ها در درجه حرارت کنترل شده قرار گرفتند. بعد از پایان جراحی حداقل ۷ روز به موش‌ها استراحت داده شد تا بهبود یابند و استرس جراحی از بین برود و سپس آزمایش‌های مربوطه انجام شد.

برای تزریق داروها در کانول ها از سرنگ همیلتون ۱۰ میکرولیتری و لوله پلی اتیلن استفاده شد. یک کانول نازک‌تر به عنوان کانول تزریقی (سر سرنگ دندانپزشکی شماره ۲۷) به طول حدود ۲ میلی متر بلندتر از کانول راهنما تهیه شده (در ضمن در تمامی منابع مربوط به جراحی استریوتاکسی کانول تزریق ۲ میلی متر بلندتر از کانول راهنما تهیه می‌شود تا تزریق دارو دقیقاً روی منطقه مورد نظر صورت پذیرد و مشکلی از نظر تخریب بافتی گزارش نشده است.) و از یک طرف به یک لوله نازک پلی اتیلن وصل گردید و سر دیگر لوله پلی اتیلن به سرنگ همیلتون وصل شد. تزریقات به حجم ۱

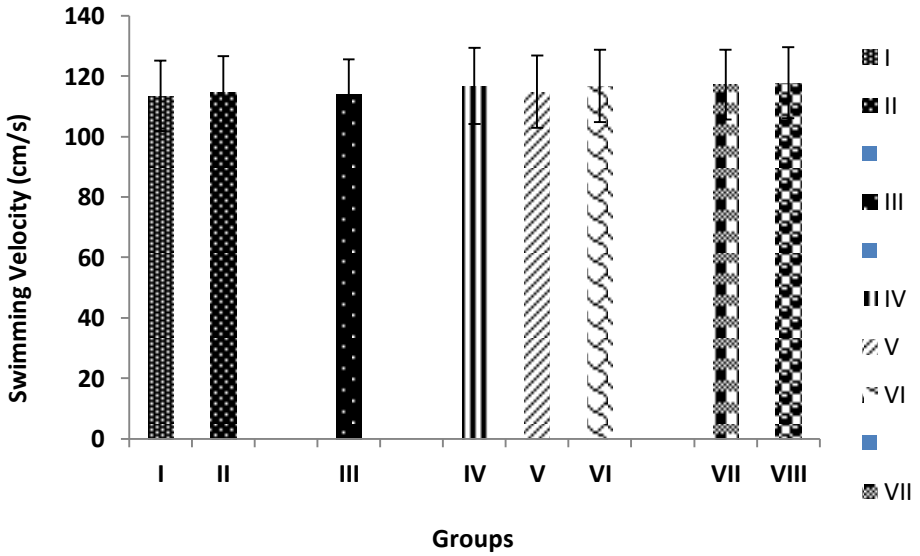
میکرولیتر و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه در هر کانول صورت گرفت (داروها به مدت ۷ روز تزریق گردید).

پس از اتمام دوره‌ی تیمار، از هر یک از گروه‌های آزمایشی یک موش به صورت تصادفی انتخاب گردید. حیوانات رنگ قرمز خنثی را به منظور تعیین محل دقیق کانول‌گذاری به صورت ریز تزریق دریافت نمودند و پس از بیهوشی، سر آن‌ها با استفاده از گیوتین جدا شد و بافت مغز آن‌ها پس از شست و شو با سالین نرمال در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت و برای تأیید بافت‌شناسی ماکروسکوپیک به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل گردید (شکل ۱). جهت ارزیابی اثرات تخریبی ریز تزریق سم اتیدیوم بروماید و جهت ارزیابی اثر مواد بر حافظه و یادگیری فضایی روش ماز آبی موریس مورد استفاده قرار گرفت. این دستگاه از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ (به قطر ۱۳۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر) با یک سکوی پنهان به قطر ۱۰ سانتی متر تشکیل شده است. ۲۴ ساعت پس از اتمام دوره تیمار، هر موش به مدت ۵ روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) از ۴ ربع حوضچه به طور تصادفی تحت آزمایش قرار گرفت. فضای اطراف حوضچه با ۴ جهت اصلی شمال، جنوب، شرق و غرب مشخص شد تا ۴ موقعیت آلترناتیو برای شروع سنجش ماز آبی موریس فراهم شود. به هر موش ۶۰ ثانیه اجازه شنا برای یافتن سکو داده شد. اگر موش در پایان ۶۰ ثانیه موفق به یافتن سکو نمی‌شد از آب خارج می‌گردید و بر روی سکو قرار داده می‌شد. در پایان هر تجربه موش‌ها به مدت ۱۵ ثانیه بر روی سکو استراحت کردند. زمان سپری شده برای یافتن سکو و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو، به عنوان پارامترهای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی ثبت گردید. لازم به ذکر است که سرعت شنای حیوانات نیز به عنوان شاخصه‌ای از توانایی حرکتی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت (سنجش ماز آبی موریس همیشه در فاصله قبل از ظهر انجام می‌گرفت).

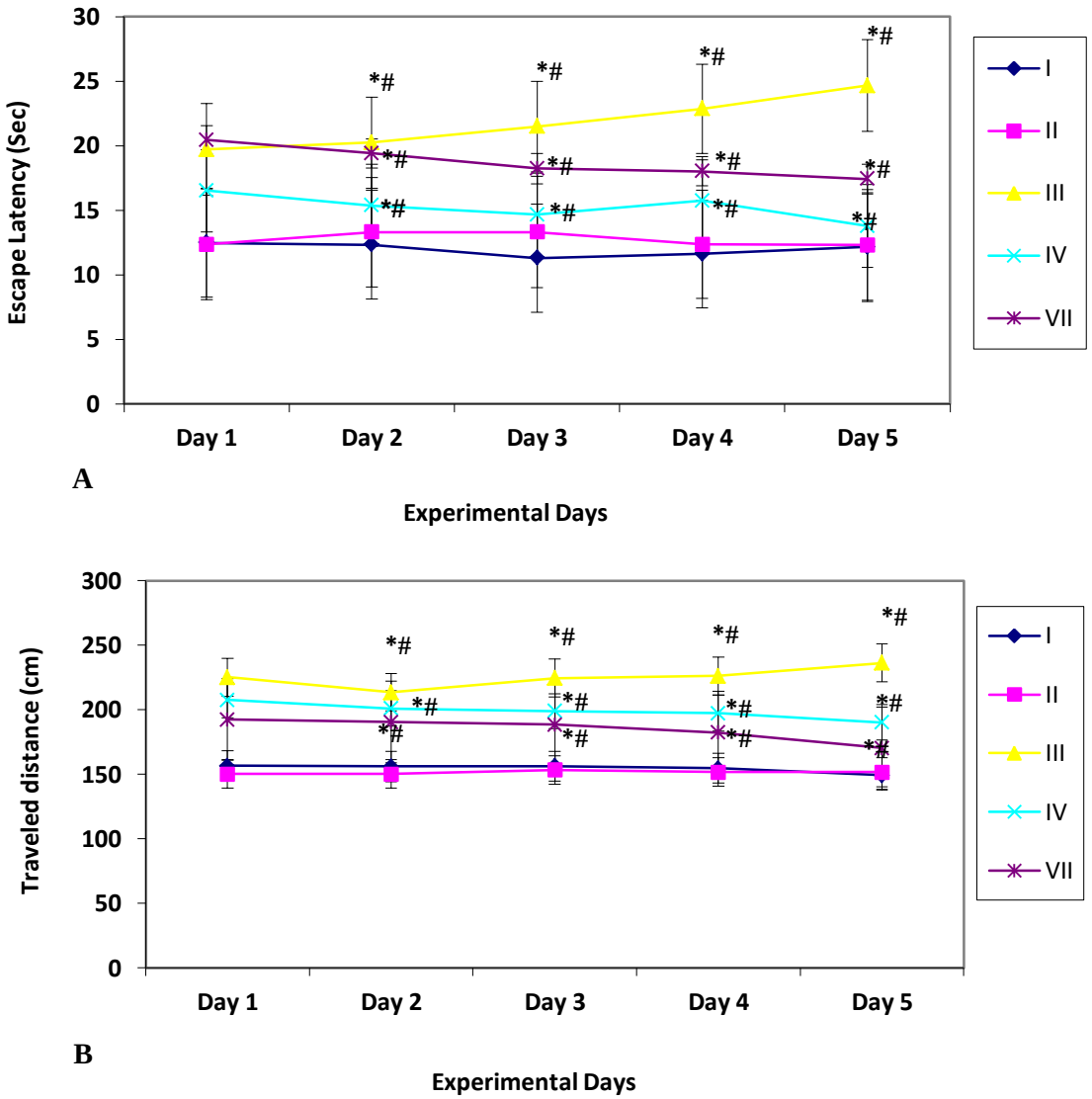
داده های مربوط به سرعت شنا، مدت زمان یافتن سکو، مسافت شنا، به صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین (Mean±S.E.M) ارائه گردید و اختلاف معنی دار توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، با آزمون تعقیبی Tukey بوسیله نرم افزار SPSS-16 مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت‌ها در سطح (P< ۰/۰۵) معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

برای بررسی فرآیند یادگیری و حافظه فضایی در طی روزهای آزمایش، نتایج آماری حاصل از میانگین سرعت شنا، میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو و میانگین مسافت



شکل ۲- مقایسه‌ی میانگین سرعت شنای حیوانات طی روزهای آموزش بین تمامی گروه‌های مورد آزمایش. گروه‌ها: I (کنترل سالم)، II (سالین)، III (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی)، IV (گروه دریافت کننده‌ی آگونیست گلوتامات) (NMDA)، V (گروه دریافت کننده‌ی آنتاگونیست گلوتامات) (MK-801)، VI (گروه دریافت کننده‌ی آگونیست گلوتامات + آنتاگونیست گلوتامات)، VII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی + آگونیست گلوتامات) و VIII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی + آنتاگونیست گلوتامات). نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین بیان شده است (در هر گروه، n=۷).



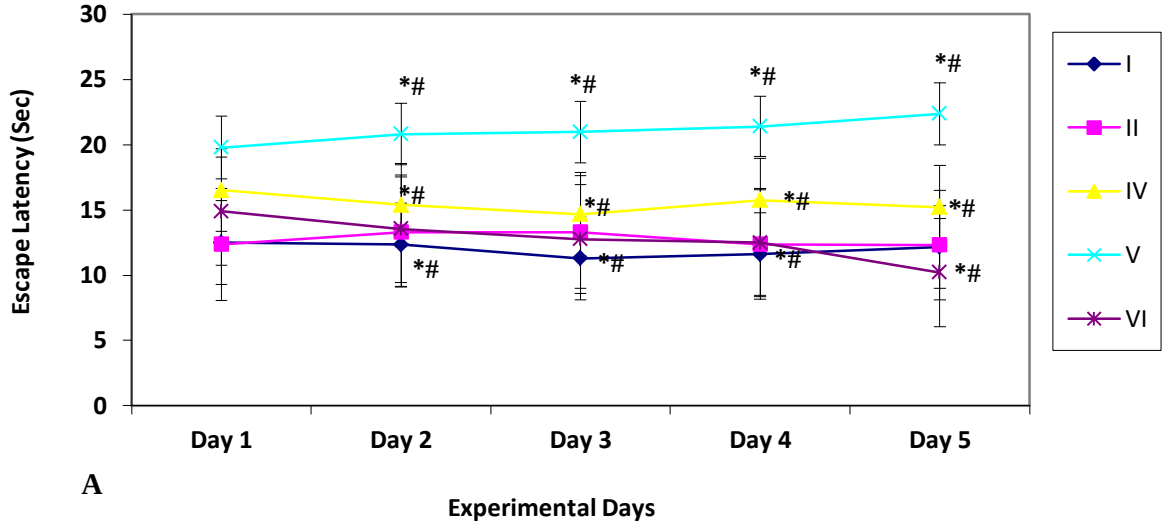
شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین مدت زمان سپری شده (A) و مسافت طی شده (B) برای رسیدن به سکو طی روزهای آموزش. نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی در هر روز با حروف * و # نشان داده شده است. * بیانگر میزان اختلاف معنی دار بین گروه های I (کنترل) و III (اکستازی)، IV (آگونیست گلوتامات) و VII (اکستازی + آگونیست گلوتامات) (P<۰/۰۵);# بیانگر میزان اختلاف معنی دار بین گروه های III (اکستازی) و IV (آگونیست گلوتامات) و VII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی + آگونیست گلوتامات) (P<۰/۰۵) می‌باشد (در هر گروه، n=۷).

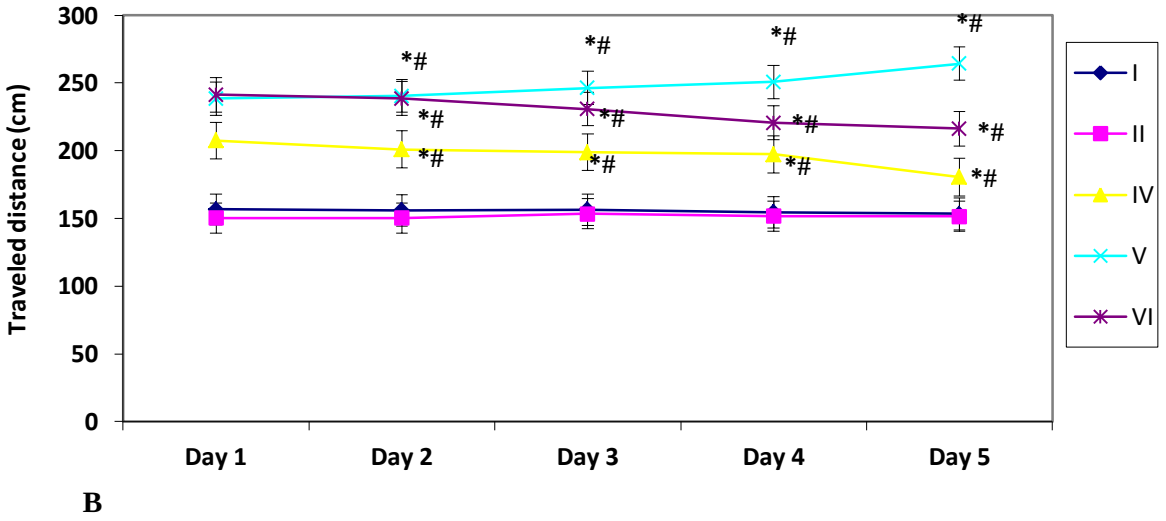
طی شده برای رسیدن به سکو در حیوانات گروه‌های مختلف طی روزهای آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت.

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، سرعت شنای حیوانات تفاوت معنی داری را بین گروه های آزمایش در طی آزمون ماز آبی موریس نشان نداد. سرعت شنای هر حیوان به منظور کنترل تفاوت در عملکرد ماز آبی موریس مورد بررسی قرار گرفت.

شاخصه‌ی زمان سپری شده برای رسیدن به سکو (escape latency) و مسافت طی شده برای یافتن سکو طی ۵ روز آزمون ماز آبی موریس در شکلهای ۳ و ۴ و ۵ نمایش داده شده است.

براساس نتایج حاصل از بررسی آماری، زمان سپری شده برای رسیدن به سکو بین تمامی گروه‌ها در روز اول تفاوت معنی داری را نشان نداد. زمان سپری شده برای رسیدن به سکو در روز دوم و سوم و چهارم و پنجم آموزش، بین گروه-های III (گروه دریافت کننده اکستازی (MDMA))،IV (آگونیست گلوتامات) و VII (گروه دریافت کننده اکستازی + آگونیست گلوتامات) تفاوت معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۳-A). تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که در روزهای دوم و سوم و چهارم و پنجم آموزش، گروه III (گروه دریافت

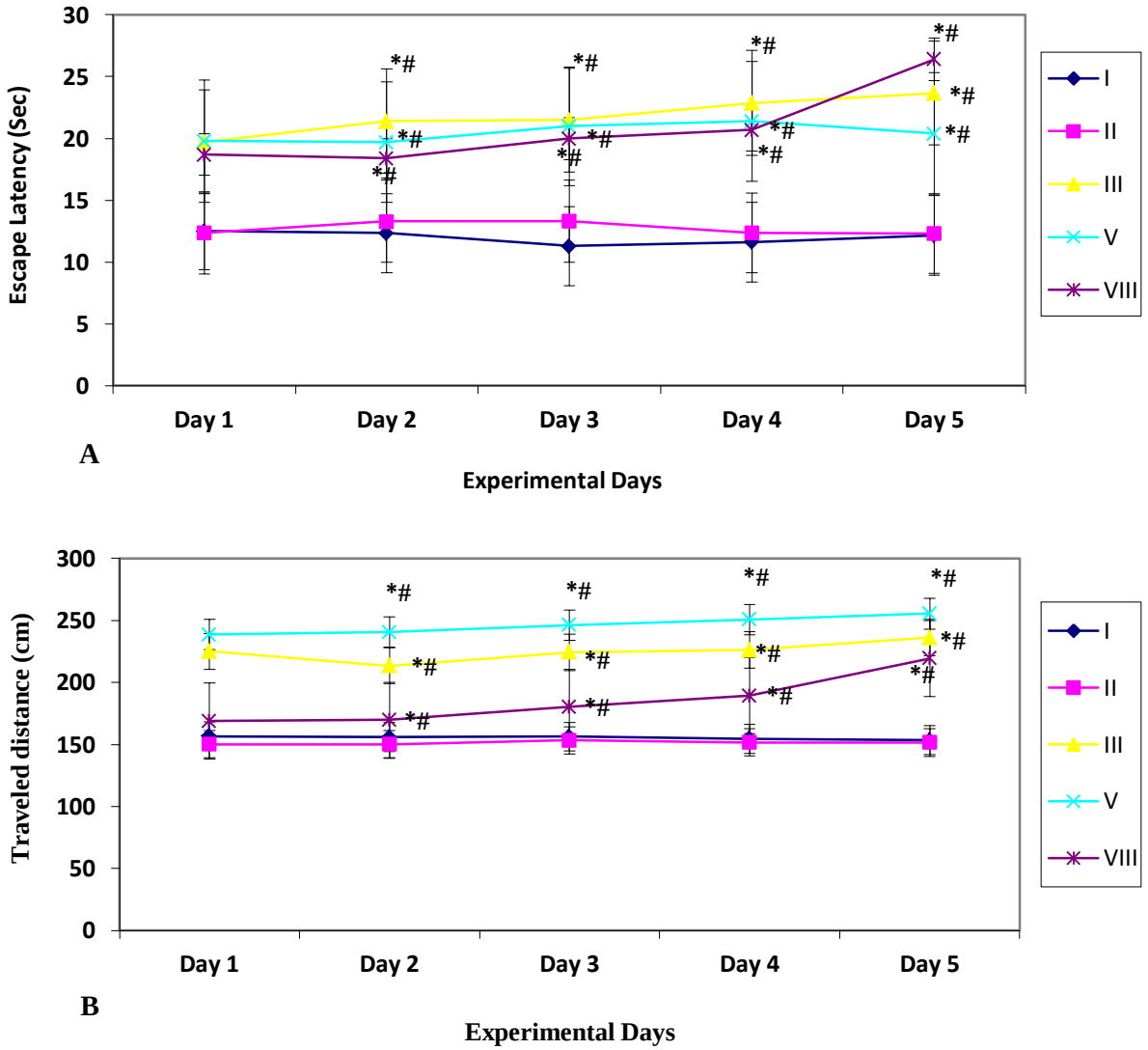




شکل ٤- مقایسه‌ی میانگین مدت زمان سپری شده (A) و مسافت طی شده (B) برای رسیدن به سکو طی روزهای آموزش. نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی در هر روز با حروف *و # نشان داده شده است. * بیانگر میزان اختلاف معنی دار بین گروه های I (کنترل) و IV (آگونیست گلوتامات)، V (آنتاگونیست گلوتامات) و VI (گروه دریافت کننده‌ی آگونیست گلوتامات + آنتاگونیست گلوتامات) (P<۰/۰۵)؛# بیانگر میزان اختلاف معنی دار بین گروه های IV (آگونیست گلوتامات)، V (آنتاگونیست گلوتامات) و VI (گروه دریافت کننده‌ی آگونیست گلوتامات + آنتاگونیست گلوتامات) (P<۰/۰۵) می باشد (در هر گروه، n=۷).

کننده اکستازی) در مقایسه با گروهIV (گروه دریافت کننده آگونیست گلوتامات) و گروه VII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی+آگونیست گلوتامات) زمان بیشتری را برای پیدا نمودن کرده است. همچنین مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکو در طی روزهای دوم و سوم و چهارم و پنجم بین گروه V (گروه دریافت کننده‌ی آنتاگونیست گلوتامات) در مقایسه با گروه هایIV و گروه VI افزایش یافته (شکل ۴-A)، در حالی که در طی این روزهای آموزش مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکو بین گروه III (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی) و V (گروه دریافت کننده‌ی آنتاگونیست گلوتامات) و گروه VIII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی + آنتاگونیست گلوتامات)کاهش یافته است (شکل ۵-A). نتایج تقریباً مشابهی در شاخصه‌ی مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در طی روزهای آموزش دیده می‌شود (شکل ۳-B) (شکل ۴-B) (شکل ۵-B).

نتایج به دست آمده از بررسی آماری نشان داد که شاخصه‌ی مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان نیز در طی روزهای آموزش در تمامی گروه‌های آزمایشی تفاوت



شکل ۵- مقایسه‌ی میانگین مدت زمان سپری شده (A) و مسافت طی شده (B) برای رسیدن به سکو طی روزهای آموزش. نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی در هر روز با حروف *و #نشان داده شده است. * بیانگر میزان اختلاف معنی دار بین گروه های I (کنترل) و III (اکستازی)، V (آنتاگونیست گلوتامات) و VIII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی + آنتاگونیست گلوتامات) (P<۰/۰۵)؛ # بیانگر میزان اختلاف معنی دار بین گروه های III (اکستازی)، V (آنتاگونیست گلوتامات) و VIII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی + آنتاگونیست گلوتامات) (P<۰/۰۵) می‌باشد (در هر گروه، n=۷).

معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۵)؛ با این حال، در روزهای دوم و سوم و چهارم و پنجم، گروه III (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی) در مقایسه با گروه IV (گروه دریافت کننده‌ی آگونیست گلوتامات) و گروه VII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی + آگونیست گلوتامات) مسافت بیشتری را برای رسیدن به سکوی پنهان سپری کرده است (شکل ۳-B).

گروه‌های IV (آگونیست گلوتامات) (NMDA) و VI (گروه دریافت کننده آگونیست گلوتامات + آنتاگونیست گلوتامات) مسافت کوتاه‌تری را در مقایسه با گروهV (آنتاگونیست گلوتامات) را طی نموده‌اند (شکل ۴- B).

همچنین گروه VIII (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی + آنتاگونیست گلوتامات) در مقایسه با گروه های III (گروه دریافت کننده‌ی اکستازی) و گروه V (گروه آنتاگونیست گلوتامات) مسافت زیادی را برای رسیدن به سکوی پنهان طی کرد (شکل ۵-B).

در رابطه با مقایسه‌ی عملکرد گروه‌های کنترل سالم (I و II) با سایر گروه‌ها بررسی آماری نتایج نشان داد که در کلیه‌ی روزهای آموزش تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مذکور مشاهده نشد (شکل ۳ و ۴ و ۵). این یافته‌ها نشان می‌دهند که اختلال عملکرد حافظه و یادگیری فضایی که با ریزتزریق

اکستازی توسط آگونیست گلوتامات بهبود می‌یابد در حالی این اختلال و کاهش حافظه‌ی ایجاد شده توسط آنتاگونیست گلوتامات کاهش می‌یابد.

بحث

در بررسی حاضر تأثیر تزریق داخل هیپوکامپی اکستازی و نیز تأثیر ریز تزریق آگونیست و آنتاگونیست گلوتامات و تداخل اثر اکستازی با سیستم گلوتاماترژیک بر روی تغییرات حافظه فضایی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که ریزتزریق اکستازی به تشکیلات هیپوکامپی (CA_1)، باعث تخریب روند یادگیری و حافظه فضایی در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم می‌شود. همچنین ریزتزریق آگونیست گلوتامات، اختلالات یادگیری و حافظه ناشی از ریزتزریق اکستازی را بهبود می‌بخشد، در حالی که ریزتزریق آنتاگونیست به همراه اکستازی سبب کاهش حافظه فضایی می‌شود. همچنین ریزتزریق آگونیست سبب بهبود حافظه فضایی در حالی که تزریق آنتاگونیست سبب کاهش حافظه فضایی می‌شود.

به طور کلی مطالعات انجام شده بر روی مدل‌های حیوانی و انسان‌ها نشان داده‌اند که اکستازی سبب اختلال در عملکردهای شناختی و کاهش حافظه می‌شود [۱۸].

مطالعات متعدد نشان می‌دهند که اکستازی در دراز مدت (هفته تا ماه) سبب اختلال در حافظه و فرآیندهای شناختی می‌شود. این امر منجر به این پیشنهاد شد که اکستازی یک عامل خطرناک برای شروع زودتر یا کاهش شدید حافظه‌ی وابسته به سن در سال‌های بعد است. در واقع مصرف سنگین و طولانی اکستازی با کاهش و اختلال حافظه اولیه همراه است [۱۲].

تحقیق حاضر نشان داد که تزریق اکستازی به صورت مستقیم به تشکیلات هیپوکامپ (ناحیه CA_1)، عملکرد یادگیری و حافظه‌ی فضایی وابسته به هیپوکامپ را دچار اختلال می‌کند (شکل ۳). نتایج مطالعه حاضر مبنی بر اختلال حافظه فضایی با تزریق اکستازی، با نتایج به دست آمده از مطالعات انجام گرفته توسط Varkes و همکاران در سال ۲۰۰۵، Wareing و همکاران در سال ۲۰۰۱ است که نشان دادند اکستازی سبب کاهش حافظه‌ی فضائی می‌شود [۱۵]. مطالعه انسانی انجام گرفته توسط Morgan در سال ۱۹۹۸ نشان داد که در میان مصرف کنندگان اکستازی در مقایسه با افرادی که اکستازی مصرف نکرده‌اند حافظه به طور قابل توجهی کاهش یافته است [۳]. مطالعات آزمایشگاهی بر روی موش و میمون نشان داده است که اکستازی سبب آسیب نورون‌های سروتونرژیک می‌شود، نورون های سروتونرژیک برای عملکرد حافظه در مناطق مختلف مغزی به ویژه هیپوکامپ که نقش مهمی در حافظه دارد، می ماند [۱۷]. تحقیق انجام شده نیز نشان داد که اکستازی سبب کاهش حافظه می‌شود که تائیدی بر یافته های قبلی است. بررسی آماری نتایج میانگین سرعت شنا برای رسیدن به سکوی پنهان نشان داد که بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۲).

گیرنده های NMDA در نواحی مختلف مغز به صورت گسترده ای پراکنده شده‌اند. به طور کلی تراکم این گیرنده‌ها در هسته های قاعده ای – جانبی آمیگدال بالا بوده، اما بیشترین تراکم آنها در ناحیه ی CA_1 هیپوکامپ گزارش شده است [۱۰]. اولین بار Morris و همکارانش ارتباط بین گیرنده های NMDA، هیپوکامپ و حافظه و یادگیری را بیان کردند. آنها وظایف رفتاری وابسته به هیپوکامپ موش های صحرائی را با استفاده از ماز آبی موریس مورد بررسی قرار دادند. فعالیت گیرنده NMDA هیپوکامپ و شکل پذیری وابسته به گیرنده NMDA برای حافظه فضایی بسیار مهم است [۲۶]. نتایج مطالعه حاضر با بررسی که توسط Kornhuber و همکارانش در سال ۱۹۸۹ انجام شد که نشان دادند گیرنده های NMDA سبب بهبود حافظه در مغز انسان می‌شود هم خوانی دارد. نقش NMDA در حافظه فضائی عمدتاً در مدل‌های حیوانی مانند میمون ثابت شده است [۸]. از بررسی‌های دیگر که با این مطالعه هم سو می‌باشد می‌توان به نتایج حاصل از تحقیق Benvenga و Spaulding در سال ۱۹۸۸ و همچنین Butel Man در سال ۱۹۸۹ ثابت کرد که MK-801 (آنتاگونیست غیر رقابتی گیرنده NMDA) سبب اختلالات وابسته به دوز یادگیری و حافظه می‌شود اشاره کرد [۸]. Amrick و Bennet در سال ۱۹۸۷، Willetts وBalster در سال ۱۹۸۹، Turski در سال ۱۹۹۰ ثابت کردند

که MK-801 (آنتاگونیست گیرنده NMDA) سبب کاهش حافظه فضایی می‌شود [۲۶]. همچنین مطالعه Ton و همکاران که در سال ۱۹۹۰با استفاده از تست ماز آبی موریس ثابت کردند که آگونیست گیرنده های NMDA سبب بهبود حافظه فضایی می‌شوند در حالی که آنتاگونیست ها نتیجه کاملاً عکس دارند با نتایج این تحقیق مشابه است [۱۱].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ریزتزریق آگونیست گلوتامات اختلالات به وجود آمده در عملکرد یادگیری و حافظه فضایی ناشی از اکستازی را بهبود می‌بخشد. آگونیست گلوتامات مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان را به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۳، گروه‌های IV و VII). تفاوت معنی‌داری در میانگین سرعت شنا در طی روزهای آموزش بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد (شکل ۲)؛ بدین معنی که کاهش زمان سپری شده و مسافت طی شده برای یافتن سکو به دلیل اثر آگونیست گلوتامات بر روی سرعت شنا نمی‌باشد.

نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که تزریق آگونیست گلوتامات به همراه اکستازی سبب کاهش حافظه‌ی فضایی می‌شود، به طوری که آنتاگونیست گلوتامات مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان را به طور معنی داری افزایش داد (شکل ۵، گروه های V و VIII).

گلوتامات فراوان‌ترین اسید آمینه تحریکی در سیستم عصبی مرکزی است و قادر به ایجاد آسیب عصبی در انواع الگوهای تجربی است. این امر منجر به این فرضیه شده که گلوتامات می‌تواند نقش مهمی در نوروتوکسیسیتی ناشی از اکستازی داشته باشد [۷]. اکستازی غلظت خارج سلولی گلوتامات را در هیپوکامپ افزایش می‌دهد، این افزایش وابسته به افزایش اولیه سروتونین و گیرنده های وابسته به آن است. مصرف مکرر اکستازی سبب هیپرترمی و افزایش درجه حرارت بدن می‌شود که به نوبه خود سبب آزادسازی دوپامین (DA) و سروتونین (5-HT) می‌شود، به علاوه استرس بالا در نتیجه مصرف اکستازی منجر به حاضر تأثیر تزریق داخل افزایش سطح گلوتامات در هیپوکامپ می‌گردد [۲۷]. یافته‌های این بررسی تا حدود زیادی در توافق با نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته توسط Nash و Yamamoto در سال ۱۹۹۲ است که اثر تجویز مکرر مت آمفتامین و اکستازی را بر روی غلظت خارج سلولی گلوتامات در موش صحرائی را بررسی کردند. مشاهده شد که مت آمفتامین ها غلظت خارج سلولی گلوتامات را در هیپوکامپ افزایش می‌دهند که به نوبه خود سبب اختلال در یادگیری و حافظه می‌شود [۲۶]. مطالعه مشابه دیگری با این تحقیق در سال ۲۰۰۶ توسط Sharma انجام شد که ثابت کرد استرس سبب افزایش غلظت بافتی گلوتامات در هیپوکامپ می‌شود. بنابراین این احتمال وجود دارد که هیپرترمی به افزایش غلظت خارج سلولی گلوتامات ناشی از اکستازی در هیپوکامپ و اختلال در حافظه کمک می‌کند [۱۱]. مطالعات دیگری که در این رابطه انجام شده نشان می‌دهند که مت آمفتامین ها سبب تغییر در سطوح زیر واحدهای گیرنده های NMDA و AMPA هیپوکامپ و در نتیجه اختلال در حافظه فضائی می‌شوند. شواهدی از اثرات نوروتوکسیسیتی مت آمفتامین ها و اکستازی برروی هیپوکامپ وجود دارد که شامل آتروفی هیپوکامپ و اختلال در حافظه است. اثرات مضر طولانی مدت مت آمفتامین ها عمدتاً در ارتباط با دوپامین و سروتونین مطرح شده اما در طول دهه گذشته برروی اثرات و تغییرات گلوتامات نیز متمرکز گردیده است [۲۷]. از بررسی‌های دیگر که با یافته‌ی این مطالعه هم سو می‌باشد می‌توان به نتایج مطالعه ای اشاره کرد که در آن Schmidt و Hofmann در سال ۱۹۹۶ گزارش دادند که آمفتامین های جایگزین می‌توانند عملکرد سیستم گلوتاماترژیک را افزایش دهند که به نوبه‌ی خود سبب افزایش گونه‌های نیتروژن می‌شود. مصرف اکستازی سبب هیپرترمی می‌شود که این امر افزایش غلظت گلوتامات خارج سلولی را به همراه دارد، افزایش گلوتامات با فعال کردن گیرنده های NMDA سبب افزایش سطح کلسیم داخل سلولی می‌شود. این افزایش کلسیم منجر به فعال شدن کینازهای متعدد، لیپازها و پروتئازها و در نهایت منجر به ایجاد فرآیند استرس اکسیداتیو و تولید گونه های نیتروژن و اکسیژن واکنشی می‌شود [۲۶].

باید در نظر داشت که اگرچه گلوتامات به عنوان یک نوروترانسمیتر تحریکی اثرات تقویتی بر روی حافظه دارد، ولی افزایش غلظت گلوتامات خارج سلولی در اثر مصرف اکستازی و فعال شدن گیرنده های NR_1، تولید گونه های باز فعال اکسیژن و نیتروژن و افزایش کلسیم داخل سلولی به دنبال

مصرف اکستازی اثرات منفی بر روی حافظه و یادگیری دارد. به عبارت دیگر اکستازی با به هم زدن تعادل این نوروترانسمیتر سبب تخریب بافتی و تغییر حافظه فضایی می‌شود.

در حالت فیزیولوژیکی و طبیعی بدن، گلوتامات با شیوه اگزوسیتوز تنظیم شده به میزان لازم وارد شکاف سیناپسی می‌گردد، ولی اکستازی با اثر بر وزیکولار ترانسپورتر سبب آزادسازی ناگهانی گلوتامات و تهی شدن وزیکول های سیناپسی گلوتاماترژیک می‌شود. مشخص شده گلوتامات در مقادیر کم، سبب افزایش حافظه و یادگیری می‌شود (با اثر بر گیرنده های NMDA) ولی در مقادیر زیاد به عنوان یک ترکیب نوروتوکسیک مطرح بوده و از طریق سیگنالینگ کلسیم سبب تخریب مکانیسم‌های مربوط به فرآیند حافظه و یادگیری می‌شود. در مطالعه حاضر دوز انتخابی آگونیست گلوتامات اثر افزایشی بر روی حافظه دارد. مصرف بلند مدت اکستازی سبب تخریب نورون های گلوتاماترژیک و تضعیف حافظه می‌گردد.

سپاسگزاری

مقاله‌ی حاضر مستخرج از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد بوده و بدین-وسیله از معاونت پژوهشی محترم دانشگاه تبریز در تأمین اعتبار لازم قدردانی می‌گردد.

References

[1] Anneken JH, Gudelsky GA, MDMA produces a delayed and sustained increase in the extracellular concentration of glutamate in the rat hippocampus. ***Neuropharmacology*** 63 (2012) 1022-1027.

[2] Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay MR, Morris GM, Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. ***Nature*** 378 (1995) 182-186.

[3] Bertogilo LJ, Carobrez AP, Anexiolytic – like effects of NMDA/glycine–B receptor ligands are abolished during the elevated plus – maze trial 2 in rats. ***Psychopharmacology*** 170 (2003) 335-342.

[4] Bhattachary S, Powell JH, Recreational use 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) or ecstasy: evidence for cognitive impairment. ***Psychol Med*** 31 (2001) 647-658.

[5] Broening HW, Morford LL, Inman-Wood SL, Fukumura M, Vorhees CV., 3,4–Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) – inducted learning and memory impairments depend on the age of exposure during early development. ***J Neurosci*** 21 (2001) 3228-3235.

[6] Capela AR, Ruscher K, Lautenschlager M, Freyer D, Ecstasy – induced cell death in cortical neuronalcaltures is serotonin 2a–receptor–dependent and potentiated under hyperthermia. ***Neuroscience*** 139 (2006) 1069-1081.

[7] Capela JP, Carmo H, Remião F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F, Molecular and cellular mechanisms of ecstasy – induced neurotoxicity: An overview. ***Mol Neurobiol*** 39 (2009) 210-271.

[8] Duncan GE, Miyamoto S, Leipzing JN, Lieberman JA, Comparison of brain metabolic activity patterns induced by Ketamine, MK-801 and amphetamine in rats: support for NMDA – receptor involvement in reseponses to subanesthetic dose of Ketamine. ***Brain Res*** 843 (1999) 171-183.

[9] Engin E, Treit D, Dickson CT, Adxiolytic – and antidepressant – like properties of Ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. ***Neuroscience*** 161 (1999) 359-369.

[10] Kelly AE, Schiltz CA, Landry CF, Neural systems recruited by drug – and food – related cues: studies of gene activation in corticolimbic regions. ***Physiol Behave*** 86 (2005) 11-14.

[11] Kindlundh-Högberg AM, Blomqvist A, Malki R, Schiöth HB., Extensive neuroadoptive changes in cortical gene – transcript expressions of the glutamate system in response to repeated intermittent MDMA administration in adolescent rats. ***BMC Neurosci*** 1 (2008) 1-10.

[12] Kuypers KP, Ramaekers JG, Acute dose MDMA (75mg) impairs spatial memory for location but leaves

contextual processing of visuospatial information unaffected. ***Psychopharmacology*** 189 (2007) 557-563.

[13] Malberg JE, Sabol KE, Seiden LS, Co – administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat**.** ***J Pharmacol Exp Ther*** 278 (1996) 258-267.

[14] Martinez Turrillas R, Moyano S, Del Rio J, Frechilla D, Differential effects of 3, 4 – methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. ***Neurosci Lett*** 402 (2006) 126-130.

[15] Morton J, Ecstasy: pharmacology and neurotoxicity. ***Curr Opin Pharmacol*** 5 (2005)79-86.

[16] Moyano S, Rio JD, Frechilla D, Acute and chronic effects of MDMA on molecular mechanisms implicated in memory formation in rat hippocampus: surface expression of CaMKII and NMDA receptor subunits. ***Pharmacol Biochem Behav*** 82 (2005) 190-199.

[17] Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S, NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. ***Nat Rev Neurosci*** 5 (2004) 361-372.

[18] Olive MF, Cleva RM, Kalivas PW, Malcolm RJ, Glutamatergic medication for the treatment of drug and behavioral addictions. ***Pharmacol Biochem Behav*** 100 (2012) 801-810.

[19] O´Shea E, Escobedo I, Orio L, Sanchez V, Navarro M, Green AR, Colado MI., Elevation of ambient room temperature has differential effects on MDMA – induced 5-HT. and dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rats. ***Neuropsychopharmacology*** 30 (2005) 1312-1323.

[20] Panos JJ, Rademacher DJ, Renner SL, Steinpreis RE, The rewarding properties of NMDA and MK-801 (Dizocilpine) as indexed by the conditioned place preference paradigm. ***Pharmacol Biochem Behav*** 64 (1999) 591-595.

[21] Parrott AC, Recreational ecstasy/MDMA, the serotonin syndrome, and serotonergic neurotoxicity. ***Pharmacol Biochem Behav*** 71 (2002) 837-844.

[22] Parrott AC, Lasky J, Ecstasy (MDMA) effects upon mood and cognition: before, during and after a Saturday night dance. ***Psychopharmacology*** 139 (1998) 261-268.

[23] Parrott AC, Lees A, Garnham N J, Jones M, Wesnes K, Cognitive performance in recreational users of MDMA or ecstasy: evidence for memory deficits. ***J Psychopharmacol*** 12 (1998) 79-83.

[24] Piechal A, Blecharz-Klin K, Wyszogrodzka E, Kołomańska P, Rok-Bujko P, Krząścik P, Kostowski W, Widy-Tyszkiewicz E, Filip M, Stefański R., Neontal serotonin (5-HT) depletion does not affect spatial learning and memory in rats. ***Pharmacol Rep*** 64 (2012) 266-274.

[25] RenatoM, Moghaddam B, Effects of repeated treatment with amphetamine or phencyclidine on working memory in the rat. ***Behav Brain Res*** 134 (2002) 267-274.

[26] SchmidtC, Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. ***J Pharmacol Exp Ther*** 240 (1987) 1-7.

[27] Shirayama Y, Hashimoto K, Iyo M, Watanabe K, Higuchi T, Minabe Y, IYOM, 3, 4 – Methylenedioximethamphetamine (MDMA, ecstasy) induced egr-1 mRNA in rat brain: pharmacological manipulation. ***Eur J Pharmacol*** 402 (2000) 215-222.

[28] Steffeah HA, Witter M, Moser MB, Moser EI, Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. ***Neuron*** 45 (2005) 301-313.

[29] Thompson VB, Heiman J, Chambers JB, Benoit SC, Buesing WR, Norman MK, Norman AB, Lipton JW, Long term behavioral consequences of prenatal MDMA exposure. ***Physiol Behav*** 96 (2009) 593-601.

[30] Wareing M, Fisk JE, Murphy PN, Working memory deficits in current and previous users of MDMA (ecstasy). ***Br J Psychol*** 91(2000) 181-188.