مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۶، شمـاره‌ی ۱۱۷، مهر و آبان ۱۳۹۷، صفحات ۱۲۶ تا ۱۳۷

بررسی اثر آگونیست گیرنده 5HT3 هیپوکامپ جانبی بر فراموشی ناشی از مورفین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی

فاطمه دوستی[۱]، دکتر بهاره پاکپور[۲]، دکترمجید نوائیان[۳]

نویسنده‌ی مسئول: دکتر بهاره پاکپور،گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران b-Pakpour@yahoo.com

دریافت: ۹۶/۴/۴ پذیرش: ۹۶/۶/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: *اوپیوئیدها اثرات متنوعی روی اعمال شناختی می‌گذارند و برهمکنشی نیز بین گیرنده‌های سروتونینی و اوپیوئیدی در برخی از ساختارهای مغزی از جمله هیپوکامپ گزارش شده است، بنابراین احتمال وجود برهمکنش عملکردی بین سیستم‌های اوپیوئیدی و سروتونینی در زمینه‌ی کنترل حافظه وجود دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر آگونیست گیرنده‌های 5HT3 بر بازگشت حافظه تخریب شده توسط مورفین بود.*

روش بررسی: *در این آزمایش از ۹۶ راس موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI استفاده شد. این موش‌ها به دوازده گروه هشت‌تایی موش تقسیم شدند که به ترتیب دوزهای مختلف آگونیست رسپتور5-HT3 ، دوزهای مختلف مورفین و تداخل اثر موفین و آگونیست گیرنده5-HT3 را دریافت کردند. مورفین به صورت درون صفاقی تزریق شد و آگونیست گیرنده 5HT3 (M-CHL) (m-Chlorophenylbiguanide hydrochloride) به صورت درون هیپوکامپی. روش حافظه اجتنابی مهاری از نوع step-down برای بررسی حافظه مورد استفاده قرار گرفت.*

یافته ها: *تزریق درون صفاقی مورفین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) منجر به فراموشی شد. تزریق درون هیپوکامپی و قبل از آموزش آگونیست گیرنده 5-HT3 (M-CHL) (۰/۵ نانوگرم بر موش) نیز منجر به تخریب حافظه‌ی کسب شده گردید (P>۰/۵۰) همچنین تزریق درون هیپوکامپی M-Chl ۰/۰۰۵ نانوگرم بر موش) منجر به بازگشت حافظه تخریب شده توسط مورفین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) گردید که معنی‌دار نبود.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد یک اثر سینرژیستیک بین آگونیست گیرنده‌های 5-HT3 با گیرنده‌های اپیوئیدرژیک هیپوکامپ وجود دارد.*

واژگان کلیدی: ***حافظه، آگونیست 5-HT3 مورفین، موش کوچک آزمایشگاهی، حافظه اجتنابی مهاری***

مقدمه

مغز دارای ساختمان پیچیده‌ای بوده و حافظـه و یـادگیری نیز پدیده‌های پیچیده‌ای هستند (۱). به همین دلیل مطالعـه در زمینـه‌ی اسـاس فیزیولـوژیکی مسـیرهای عصـبی حافظـه و یادگیری بسیار به کندی پیش می‌رود. یادگیری را می‌توان به صورت تغییرات رفتاری که در اثر تجربه پدید آمـده، تعریـف کرد. توانایی ذخیره‌سازی و بازخوانی اطلاعات آموختـه شـده

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران.
۲- دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران
۳- دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیارگروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری، تهران

را حافظه گویند. به عبارت دیگر حافظه، عبارت است از ترکیبی از روندهای مختلف اکتساب، تثبیت، ذخیره و به خاطرآوری اطلاعات. بدیهی است که این دو پدیده به یکدیگر وابستگی دارند و باید با هم بررسی شوند (۳و۲).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد هیچ بخشی از مغز به عنوان ذخیره‌ای برای تمام حافظه خدمت نمی‌کند، بلکه انواع خاص حافظه در محل‌های ویژه قرار می‌گیرد (۴). از جمله نواحی مغز که در یادگیری و حافظه دخیل است می توان به بخش‌های میانی لوب گیجگاهی اشاره کرد.

یکی از قسمت‌های اصلی بخش میانی لوب گیجگاهی ناحیه‌ی هیپوکامپ است که در ایجاد چند نوع حافظه دخیل است و نقشی اساسی در پردازش اطلاعات فضایی دارد (۶و۵).

هیپوکامپ، نقش مهمی در حافظه دارد. نظر بر این است که فعالیت هیپوکامپی که نورون‌های کولینرژیک مسیر سپتو هیپوکامپ را درگیر می‌کند با تثبیت حافظه (Consolidation) مرتبط است (۷). همچنین عمل مهاری نورون‌های سروتونرژیک رافه پشتی روی فعالیت کولینرژیک هیپوکامپ، ممکن است با فرآیندهای حافظه‌ای مرتبط باشد. در هیپوکامپ بین نقایص رفتاری و کاهش استیل کولین ترانسفراز، ارتباط بیشتری نسبت به کورتکس وجود دارد و تخریب قسمت‌های خاص هیپوکامپ، برای تخریب حافظه و یادگیری کافی است (۸). این یافته‌ها اشاره به این مطالب دارد که هیپوکامپ یک منطقه‌ی بحرانی برای کنترل فرآیندهای حافظه و یادگیری است.

در پستانداران، مسیر سروتونرژیک از هسته رافه مغزی شروع می‌شود و فیبرهای سروتونینی صعودی نواحی از مغز را که در یادگیری و حافظه نقش دارند، مثل کورتکس، هیپوکامپ، آمیگدال و سپتوم را عصب دهی می‌کنند (۹). شواهد زیادی حاکی از تراکم بالای گیرنده‌های سروتونرژیک در این ناحیه از مغز است (۱۰). ناحیه‌ی CA1 نیز دارای تراکم فراوان‌تری از گیرنده‌های سروتونرژیک نسبت به قسمت‌های دیگر هیپوکامپ است (۱۰). پیشرفت‌های بیولوژی مولکولی اجازه کلون و توالی‌یابی حداقل ۱۴ گیرنده سروتونینی و انواع آن را داده است که طبق عملکرد (فارماکولوژیکی) ساختاری (مولکولی) و انتقال (سیستم‌های پیام رسانی ثانویه) طبقه‌بندی می شود. سروتونین در پستانداران نقش پیچیده‌ای بر حافظه در مدل‌های مختلف رفتاری دارد (۱۱) . البته یافته‌های متغیری وجود دارد که مقایسه را مشکل می‌کند (۱۳و۱۲). با این وجود، سروتونین توسط گیرنده‌هایش روی حافظه و یادگیری نقش دارد.

اپیوئیدها ترکیباتی هستند که مدارهای مغزی درگیر در حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۵و۱۴). از طرفی آموزش می‌تواند با ایجاد تغییرات مورفولوژیکی و سیناپسی پایدار در مغز باعث یادگیری شود. اخیرا مشخص شده که بین تغییرات ناشی از اپیوئیدها و سیستم‌های مرتبط با یادگیری فضایی در مغز، رابطه وجود دارد. در واقع این پدیده‌ها توسط عوامل عصبی مشابهی بروز کرده و توسط تغییراتی در ساختارهای سیناپسی همراهی می‌شوند. یکی از مهم‌ترین نواحی مغزی که مسئول تغییرات سلولی و مولکولی ناشی از این پدیده‌ها، هیپوکامپ است (۱۶).

گزارش شده که (LTP = Long term potentiation) هیپوکامپ توسط تجویز طولانی مدت مورفین یا هروئین شدیدا دستخوش تغییرات می‌گردد.

گیرنده‌های اپیوئیدی در هیپوکامپ فراوانند و گیرنده‌های μ اپیوئیدی که یکی از سه گیرنده مهم اپیوئیدی هستند و به وفور در ناحیه CA1 هیپوکامپ وجود دارند و مسیرهای آوران به این ناحیه نیز حاوی نوروپپتیدهای اپیوئیدی هستند.

دلیل انجام این مطالعه بررسی نقش گیرنده‌های سروتونینی بر حافظه می‌باشد که کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته است و همچنین بررسی تداخل این سیستم با سیستم اوپیوئیدی هیپوکامپ، تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. از آنجایی که مصرف مورفین منجر به آزادسازی سروتونین از هسته رافه

مـی‌گـردد بـه نظـر مـی‌رسـد کـه ایـن دو سیسـتم اثـرات سینرژیستیکی بر هم دارند که بخش کوچکی از این اثـر را بـر حافظه مورد ارزیابی قرار می‌دهیم.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI به وزن تقریبی ۲۰ تا ۲۵ گـرم کـه از انسـتیتو پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده گردید. حیـوان‌هـا بعـد از انتقال به حیوان خانه‌ی تحقیقاتی در قفس‌های ده‌تایی بـا دوره شبانه روزی طبیعی (۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تـاریکی) و در دمای ۳± ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بـا آب و غـذای کـافی نگهداری شدند و هر سه روز یکبار قفس موش‌ها تمیز شد. به مدت یک هفته به موش‌هـا اجـازه داده شـود کـه خـود را بـا شرایط حیوان خانه‌ی قبل از جراحی وفق بدهند در طول یـک هفته هر روز حیوان‌ها Handling شدند تا در موقع آزمـایش استرس ناشی از گرفتن و کار با آنها وجود نداشـته باشـد. هـر حیوان فقط یک بار استفاده شد و در هر گروه هشـت حیـوان قرار داده شد. تمام آزمایش‌ها در طول روز انجام شدند.

سنجش حافظه: به منظور سنجش حافظه از دسـتگاه یـادگیری احتـرازی غیرفعـال، مـدل Step-down اسـتفاده شـد. ایـن دستگاه یک جعبه چوبی به ابعاد (۴۰×۳۰×۳۰ سـانتی متـر) و کف آن دارای ۲۹ میله‌ی فـولادی بـه فاصـله ۱ سـانتی‌متـر از یکدیگر و با قطر ۰/۳ سانتی‌متر است. این میله‌هـا بـه دسـتگاه تحریک‌کننده متصل شـده و شـوک الکتریکـی از طریـق ایـن میله‌ها به حیوانات مورد آزمـایش وارد گردیـد. یـک سـکوی مکعبی چوبی به ابعاد (۴×۴×۴ سـانتی‌متـر) در قسـمت میـانی کـف دسـتگاه (روی میلـه‌هـای فلـزی) قـرار گرفتـه بـود کـه حیوانات هنگام انجام آزمایشات به آرامی در روی ایـن سـکو قرار داده شدند (۱۸و۱۷).

داروها: در ایـن تحقیـق از آگونیسـت گیرنـده 5HT3 یعنـی M-CHL و مورفین استفاده گردید (Sigma، داروپخش).

هر دو دارو بلافاصله قبل از تزریق در سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹ درصد حل شدند.

جراحی روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیـه هیپوکامـپ پشتی (CA1): موش‌های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریـق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ میلی‌گـرم بـر کیلـوگرم) و زایلـزین (۱۰ میلی‌گرم بـر کیلـوگرم) بیهـوش شـدند. بعـد از بیهوشـی حیوانات در دستگاه استریو تاکسی قرار داده شدند و دو کانول راهنما (انـدازه‌ی ۲۲) یـک میلـی‌متـر بـالاتر از محـل تزریـق، براساس اطلس پاکسینوس قرار داده شد.

مختصـات ناحیـه CA1 هیپوکامـپ پشـتی عبـارت بـود از : AP=-2 ، ML = ± 1/6 ، V=-1/5 (۱۹). بعد از قرار دادن کانول در مختصات مورد نظر با استفاده از سیمان دنـدان پزشکی کانول‌های راهنما در جای خود محکم شدند .

پس از جراحی و قبل از تزریق درون مغـزی دارو، بـه حیـوان اجازه داده شد ۵ تا ۷ روز دوره بهبودی پس از جراحی را بـه منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمـالی توسـط جراحـی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردند.

آزمـون‌هـای رفتـاری: یـادگیری احتـرازی غیرفعـال مـدل Step-down روشـی مـورد قبـول بـرای بررسـی حافظـه درازمدت در موش‌های کوچک آزمایشگاهی مـی‌باشـد (۲۰). در این روش بررسی حافظه در دو روز متوالی و بین ساعت ۸ صبح تا ۲ بعد از ظهـر انجـام شـد. روز اول یـا روز آمـوزش (Training day) شامل آموزش دادن حیوان‌هـا در دسـتگاه بـود و در روز دوم یـا روز آزمـون (Testing day) میـزان حافظه حیوان‌های آموزش دیده بررسی شد.

مرحله‌ی آموزش: در روز آموزش هر حیـوان بـه آرامـی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظـه قـرار گرفـت و مـدت زمان توقف روی سـکو (قبـل از پـایین امـدن) ثبـت شـد. در صورتی که هر موش بـیش از ۲۰ ثانیـه روی سـکو بمانـد آن موش حذف می‌شود. بلافاصله بعـد از پـایین آمـدن مـوش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای موش بر روی میلـه‌هـای

فولادی شوک الکتریکی به مدت ۱۵ ثانیه (۱ هرتز ۱۵ ثانیه و ۴۵ ولت مستقیم) توسط حیوان دریافت شد.

مرحله‌ی آزمون یا بررسی حافظه: جلسه آزمون ۲۴ ساعت بعد از آموزش مشابه آزمون انجام شد، با این تفاوت که حیوانات مورد آزمایش در روز آزمون شوک دریافت نمی‌کردند. مدت زمان توقف موش بر روی سکو در روز آزمون به عنوان معیار حافظه در موش اندازه گیری شد. حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف Cut-off) برابر با ۳۰۰ ثانیه بود که به عنوان حافظه‌ی کامل در نظر گرفته شد.

تزریق درون مغزی دارو: برای تزریق دارو از کانول ۲۷ گیج دندانپزشکی به طول ۹ میلی‌متر استفاده شد. این سر سوزن به کت‌دان تیوپ نوزاد اندازه‌ی ۴ متصل شد. مراحل تزریق به این ترتیب بود که بعد از برداشتن سیم داخل کانول سر سوزن ۲۷ دندانپزشکی را داخل کانول ۲۲ قرار داده و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر از دارو را به مدت ۶۰ تا ۹۰ ثانیه تزریق گردید. در مجموع به هر موش ۱ میکرولیتر دارو درون مغزی تزریق شد. در طول تزریق به حیوان اجازه داده می‌شود بدون هیچ استرسی آزادنه حرکت کند.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده:

آزمایش اول: بررسی تاثیر تزریق قبل از آموزش M-CHL بر روی حافظه اجتنابی مهاری در موش کوچک

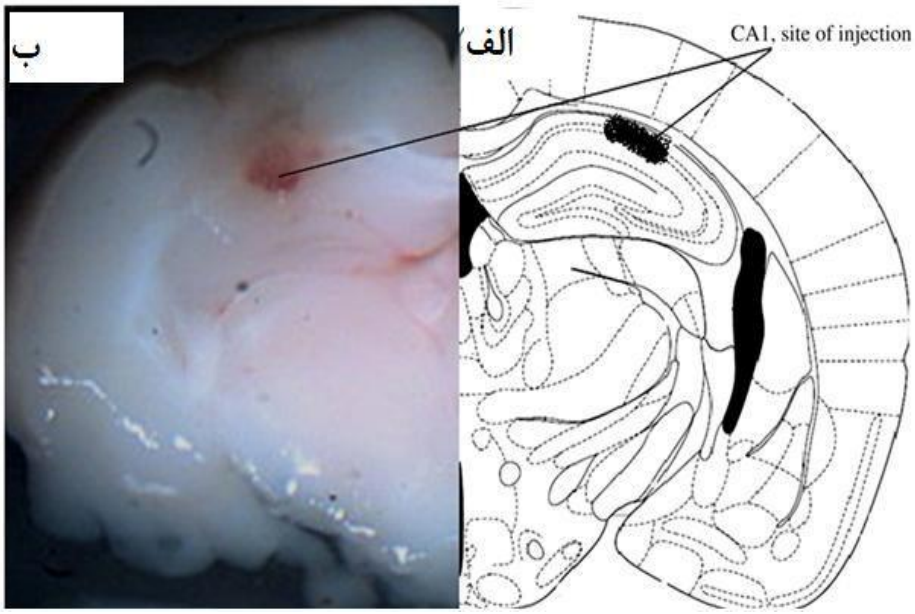
آزمایشگاهی: گروه اول شامل هشت موش (به عنوان گروه کنترل) ۵ دقیقه پیش از آموزش سالین و گروه‌های دوم و سوم و چهارم هر گروه شامل هشت موش هر یک M-CHL را به ترتیب با دوزهای ۰/۰۰۵، ۰/۰۵، ۰/۵ نانوگرم بر موش درون هیپوکامپی دریافت کردند.

آزمایش دوم: بررسی تاثیر تزریق قبل از آموزش مورفین بر روی حافظه اجتنابی مهاری در موش کوچک آزمایشگاهی: گروه اول شامل هشت موش (به عنوان گروه کنترل) ۳۰ دقیقه پیش از آموزش سالین و گروه‌های دوم و سوم و چهارم هر گروه شامل هشت موش هر یک مورفین را به ترتیب با دوزهای ۵ ،۲/۵ ، ۱/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی دریافت کردند.

آزمایش سوم: بررسی تاثیر تزریق درون صفاقی قبل از آموزش دوزهای مختلف مورفین و تزریق درون هیپوکامپی قبل از آموزش دوز غیر موثر (۰/۰۰۵ نانوگرم بر موش) M-CHL بر روی حافظه اجتنابی مهاری در موش کوچک

آزمایشگاهی: گروه اول شامل هشت موش (به عنوان گروه کنترل) ۳۰ دقیقه پیش از آموزش سالین و گروه‌های دوم و سوم و چهارم هرگروه شامل هشت موش هر یک مورفین را به ترتیب با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی دریافت کرده و هر چهار گروه ۵ دقیقه پیش از آموزش دوز ۰/۰۰۵ نانوگرم بر موش M-CHL را به صورت درون هیپوکامپی دریافت کردند.

بافت شناسی: پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم، ۰/۵ میکرولیتر رنگ متیلن بلو ۱ درصد به داخل هر کانول تزریق شد، سپس مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده و در درون فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شده و محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده از اطلس پاکسینوس استفاده گردید. در شکل یک مقطع بافتی مربوط به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی نشان داده شده است. این شکل نشان دهنده‌ی محل قرارگیری صحیح کانول در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس است. لازم به ذکر است که تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که محل جراحی آنها در مقایسه با اطلس پاکسینوس صحیح بوده، در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱) .



*شکل ۱: الف) شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس که ناحیه **CA1** در آن مشخص شده است، ب) عکس مقطع بافتی مربوط به کانول گذاری در ناحیه **CA1** هیپوکامپ پشتی است.*

تجزیه و تحلیل آماری: در همه‌ی آزمایش‌ها، زمان توقف حیوان روی سکو به صورت میانگین و انحراف معیار ثبت گردید و نمره هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد (انحراف معیار ± میانگین) ثبت گردید. برای تعیین بود و نبود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایش، روش تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون توکی به کار رفت. اختلاف در سطح P<۰/۰۵ معنادار تلقی شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

آزمایش اول: اثر تزریق قبل از آموزش آگونیست رسپتور 5-HT3 یعنی M-CHL در پاسخ اجتنابی مهاری آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق قبل از آموزش M-CHL حافظه اجتنابی مهاری را تغییر می‌دهد F(3,28)=4.27, P<۰/۰۱ .

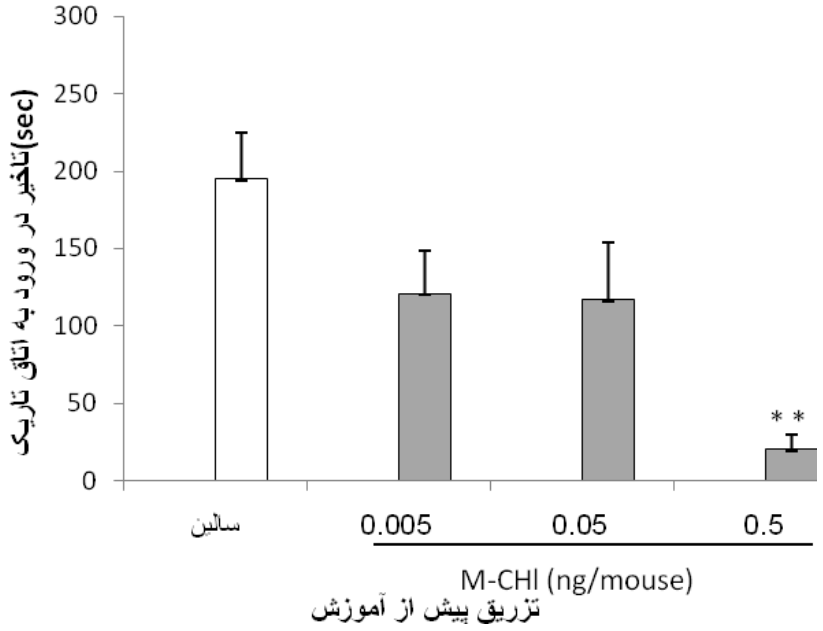
آنالیز مکمل توکی نشان داد که تزریق قبل از آموزش و درون هیپوکامپی M-CHL (۵ نانوگرم بر موش ng/mouse) تاخیر در پایین آمدن از سکو اصطلاحا میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد به طور معنی‌دار کاهش داد (نمودار ۱).

آزمایش دوم: اثر تزریق قبل از آموزش مورفین در پاسخ اجتنابی مهاری: آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق قبل از آموزش مورفین حافظه اجتنابی مهاری را تغییر می‌دهد F(3,28)=9.538, P<۰/۰۰۱. آنالیز مکمل توکی نشان داد که تزریق قبل از آموزش و درون صفاقی مورفین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تاخیر در پایین آمدن از سکو اصطلاحا میزان حافظه را در ۲٤ ساعت بعد کاهش داد (نمودار ۲).

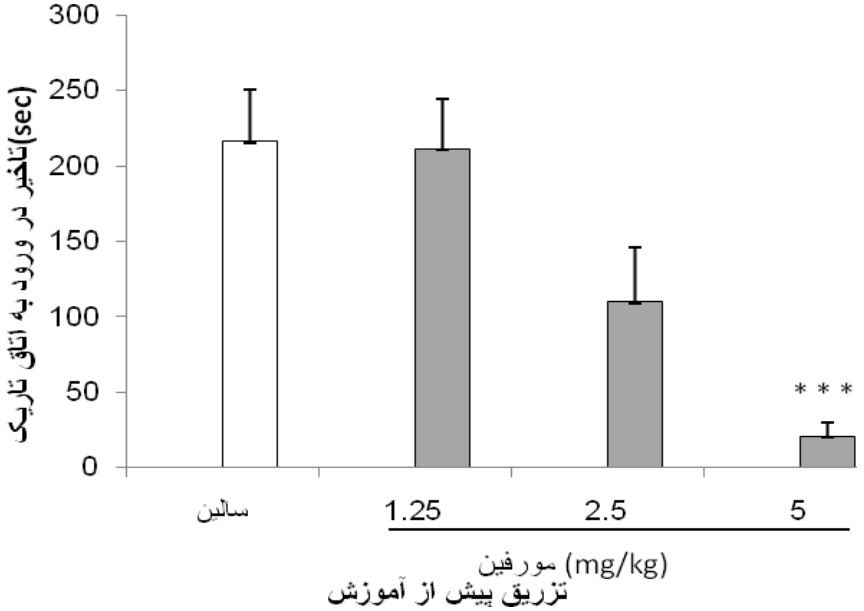
آزمایش سوم: بررسی تاثیر تزریق درون هیپوکامپی قبل از آموزش هم‌زمان دوز غیرموثر (M-CHL) ۰/۰۰۵ نانوگرم بر موشng/mouse و تزریق قبل از آموزش دوزهای مختلف مورفین (۵، ۲۵/۵، ۱/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

آنالیز مکمل توکی نشان داد که تزریق هم‌زمان دوز غیرموثر M-ChI (۰/۰۰۵ نانوگرم بر موش) همراه

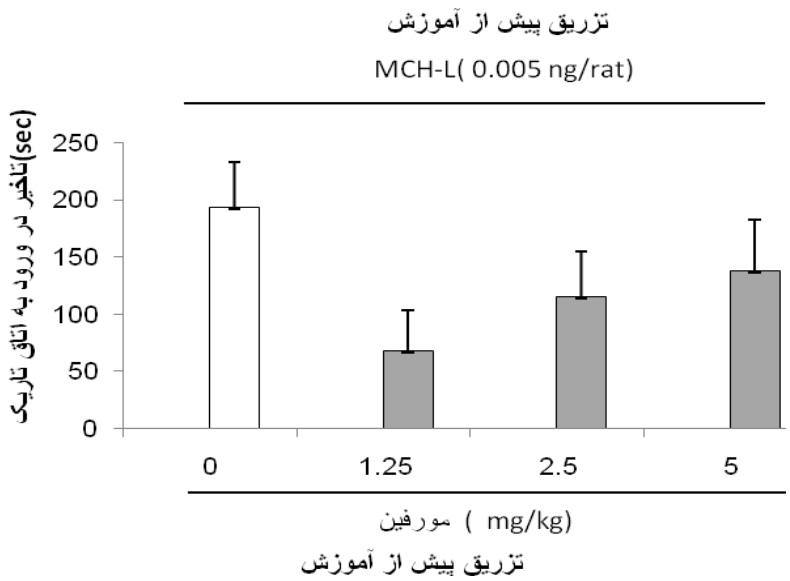
با تزریق دوز غیرموثر مورفین (۱/۲۵ میلیگرم بر کیلوگرم) منجر به تخریب حافظه‌ی اجتنابی در روز آزمون می‌شود که البته این تخریب معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار ۳).



*نمودار ۱: اثر قبل از آموزش آگونیست رسپتور **5-HT3** یعنی **M-CHL** بر حافظه اجتنابی مهاری. هر ستون نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد مربوط به **8** موش در هر گروه است ۰/۰۱ >**P** در مقایسه با گروه سالین است.*



*نمودار ۲: اثر قبل از آموزش مورفین بر حافظه اجتنابی مهاری . هر ستون نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد مربوط به **8** موش در هر گروه است ۰/۰۰۱ >**P** در مقایسه با گروه سالین است.*



نمودار ۳ : اثر قبل از آموزش مورفین بر حافظه اجتنابی مهاری . هر ستون نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد مربوط به ۸ موش در هر گروه است.

بحث

در بخش اول این مطالعه اثـر آگونیسـت گیرنـده 5HT3 یعنی M-CHL بر روی یـادگیری احتـرازی غیرفعـال مـورد بررسی قرار گرفته و در بخش دوم اثر مورفین بر روی حافظه بررسـی شـد و سـپس تـداخل سیسـتم‌هـای اپیوئیـدرژیک و سروتونرژیک مورد آزمایش قرار گرفـت. مطالعـات مـا نشـان می‌دهد که تزریق درون هیپوکامپی آگونیست گیرنده 5-HT3 منجر به تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهاری مـی‌شـود. نتـایج مـا همسـو بـا مطالعـات قبلـی مـی‌باشـد بـرای مثـال ناصـحی و همکارانش نشان دادند که تزریق درون هیپوکـامپی آگونیسـت رسپتور 5-HT3 (M-CHL) و تزریـق آنتاگونیسـت 5-HT3 یعنـــی (y-25130) و آگونیســـت 5-HT4 (RS67333) و آنتاگونیست 5-HT4 (RS23597) منجر بـه تخریـب حافظـه اجتنابی مهاری می‌شود (۲۱). همچنین در سایر مطالعات نشان داده شده که کـاهش دادن سـروتونین مغـز منجـر بـه تخـرب حافظه شکل گرفته شده می‌شـود (۲۲). در مقابـل در مطالعـه دیگری نیز نشان داده شده که افزایش سروتونین مغز منجر بـه بهبود حافظه می‌شود (۳). این نتایج نشان‌دهنده‌ی نقش بسـیار متفاوت 5HT روی حافظه است (۲۲). این نتایج متفـاوت در مورد اثر سروتونین مربوط به نقش‌های متفاوت سروتونین بـه خاطر وجود گیرنده‌های پیش یا پس سیناپسی آن اسـت (۲۳) و به همـین دلیـل روی حافظـه تـاثیرات متفـاوتی دارد (۲۴). گیرنده‌های 5-HT3 در مغز هم روی نواحی پیش سیناپسی و هم پس سیناپسی قـرار دارنـد (۲۵). بنـابراین آگونیسـت‌هـای 5-HT3 (M-CHL) از طریق تاثیر روی گیرنـده‌هـای پـیش سیناپسی منجر بـه تخریـب حافظـه مـی‌شـوند. در حـالی کـه آنتاگونیست 5HT3 (y-25130) از طریق گیرنده‌هـای پـس سیناپسی عمل می‌کنند و منجر به تخریـب حافظـه مـی‌شـوند (۲۶) . از این رو نقش سروتونین بر روی حافظه تحـت تـاثیر عوامل مختلفـی از جملـه گونـه مـورد آزمـایش، نـوع تسـت رفتاری، نـواحی مختلـف مغـز، زمـان آمـوزش و نـوع دارو و بسیاری از عوامل دیگـر قـرار دارد (۲۷). نتـایج مـا در بخـش بعدی این مطالعه در رابطـه بـا تـاثیر تزریـق قبـل از آمـوزش مورفین بر روی حافظه اجتنابی مهاری نشان داد که تزریق قبل

از آموزش مورفین حافظه اجتنابی مهاری را تغییر می‌دهد. همچنین آنالیز مکمل توکی نشان داد تزریق قبل از آموزش و درون صفاقی مورفین تاخیر در پایین آمدن از سکو اصطلاحا میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش داد. همسو با آزمایشات ما رضایف در آزمایش اجتنابی غیرفعال روی موش‌های سوری، نشان داد که تجویز زیرپوستی مورفین به صورت حاد یادگیری را مختل می‌کند (۲۸). از طرف دیگر یانگ و همکاران در آزمایش ماز آبی موریس نشان دادند که تزریق مورفین به صورت داخل صفاقی باعث تقویت تشکیل ارتباطات سیناپسی می‌شود (۲۹).

همچنین در آزمایش اجتنابی غیرفعال هم که زرین‌دست روی موش‌های سوری انجام داد مشاهده شد که تزریق زیرپوستی مورفین به صورت حاد بازیابی حافظه را مختل می‌کند (۳۰). در تحقیق دیگری زرین‌دست و همکاران نشان دادند که تزریق مورفین در ناحیه‌ی تگمنتال شکمی به صورت حاد در موش‌های سوری در آزمایش اجتنابی غیرفعال باعث تخریب بازیابی حافظه می‌گردد (۳۱). در آزمایشی دیگر که توسط مک نامارا و اسکلتون با ماز آبی موریس انجام شد مشاهده گردید که موش‌های صحرایی که با تزریق حاد مورفین داخل صفاقی تیمار شدند مسیر طولانی‌تری را برای یافتن سکو طی کردند که نشان دهنده‌ی کاهش یادگیری در آنها بوده است (۳۲). در بخش بعدی این مطالعه به بررسی تداخل بین سیستم‌های اپیوئیدرژیک و سروتونرژیک پرداختیم و تاثیرات این دو سیستم را روی هم بررسی کردیم. یکی از علل توجیه‌کننده تخریب روندهای حافظه و یادگیری در اثر تجویز حاد مورفین وابستگی سیستم اپیوئیدی با سیستم کولینرژیکی است. آگونیست‌های اپیوئیدی مثل مورفین تمایل بالایی برای گیرنده‌های μ اپیوئیدی دارند و با اتصالشان به این گیرنده‌ها باعث مهار فعالیت کولینرژیکی در هیپوکامپ و کاهش رهایی استیل کولین در بسیاری از نواحی مغزی می‌شوند. مشاهده شده که گیرنده‌های μ اپیوئیدی در پایانه‌های کولینرژکی وجود دارند و اتصال مورفین به این گیرنده‌ها باعث مهار سیستم کولینرژیکی می‌شود. از آنجایی که استیل کولین یکی از میانجی‌های موثر در بهبود یادگیری و حافظه می‌باشد، در نتیجه مهار رهایی آن توسط اپیوئیدها اثر منفی روی حافظه و یادگیری ایجاد می‌کند (۳۳). از آن جایی که گفته شد گیرنده‌های اپیوئیدی از طریق سیستم کولینرژیکی عمل می‌کند و سیستم سروتونین نیز از مسیرهای کولینرژیک و گلوتامانرژیک عمل می‌کند (۳۵ و ۳۴). با توجه به آزمایشات انجام یافته در تحقیق حاضر وقتی دوز غیرموثر آگونیست 5-HT3 (M-CHL) به هیپوکامپ موش تزریق می‌شود و هم‌زمان با آن حیوان دوز غیرموثر مورفین را به صورت درون صفاقی دریافت می‌کند حافظه اجتنابی مهاری تخریب می‌شود. به نظر می‌رسد که از آنجایی که این دو سیستم از نظر مکانیسم عمل مشابه هم هستند اثر یکدیگر را تقویت کرده و منجر به تخریب حافظه در موش شوند.

از طرف دیگر مشاهده شده که هسته رافه منبع تولید سروتونین می‌باشد، خروجی‌هایی را به سمت نخاع و دیگر قسمت‌ها دارد که این خروجی‌ها منجر به تولید مرفین و اثرات ضد دردی آن می‌شوند که این مورفین تولید شده احتمالا منجر به تقویت اثر دوز غیرموثر مورفین و تخریب حافظه شده است .این نتیجه نشان دهنده‌ی برهمکنش موثر بین سیستم‌های سروتونینی و اپیوئیدی می‌باشد.

نتیجه گیری

در نهایت اینگونه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در ناحیه CA1 هیپوکامپ گیرنده‌های سروتونینی و اپیوئیدی وجود دارند که می‌توانند اثر یکدیگر را تقویت کنند و اثر سینرژیستیک با هم دارند. البته با توجه به اینکه در گزارشات متفاوت نقش سروتونین بر حافظه به خوبی مشخص نشده و نتایج متناقضی نشان داده شده این تناقضات به خاطر عوامل مختلف مغز، زمان آموزش و نوع دارو و ... دارد. در این

آزمایش نیز احتمالا دوزهای مختلف دارو در تداخل با دوز موثر مورفین تاثیرات متفاوتی دارد که در نمودار نشان داده شده است.

تشکر و قدر دانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی خانم فاطمه دوستی با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1396.89 و عنوان: نقش آگونیست 5- HT3 هیپوکامپ جانبی بر فراموشی ناشی از مورفین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی، می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی به انجام رسیده است.

References

1- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of neural science: McGraw-hill New York; 2000.

2- Wang JH, Ko GY, Kelly PT. Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *J Clin Neurophysiol.* 1997; 14: 264-93.

3- Meneses A, Perez-Garcia G. 5-HT 1A receptors and memory. *Neuro Sci Biobehav Rev.* 2007; 31: 705-27.

4- Kandel ER. Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. *Principles of neural Sci.* 1991; 1009-31.

5- Morris R, Garrud P, Rawlins J, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982; 297: 681-3.

6- Teyler TJ. Memory: electrophysiological analogs. Learning and memory A biological view: Academic Press, Inc San Diego; 1991. p. 299-327.

7- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev.* 1992; 99: 195.

8- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993; 361: 31.

9- Shahrivar T, Moazedi AA, Rasekh AR, Almasi-Turk S, Roozbehi A. The effects of intrahippocampus injection of progesterone on passive avoidance learning and memory in adult male rats. *Iran South Med J.* 2014; 17: 524-32.

10- Baskys A, Remington G. Brain mechanisms and psychotropic drugs: CRC Press; 1996.

11- Lee EH, Lin W, Chen H-Y, Shiu W, Liang K. Fluoxetine and 8-OH-DPAT in the lateral septum enhances and impairs retention of an inhibitory avoidance response in rats. *Physiol Behav.* 1992; 51: 681-8.

12- Frazer A, Maayani S, Wolfe BB. Subtypes of receptors for serotonin. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1990; 30: 307-48.

13- Pazos A, Palacios J. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* 1985; 346: 205-30.

14- Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the

adult rat hippocampus. Proceedings of the *National Academy Sci.* 2000; 97: 7579-84.

15- Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnanian S, Shafizadeh M. Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 2003; 965: 108-13.

16- Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2002; 78: 637-47.

17- Nasehi M, Yavari SA, Zarrindast MR. Synergistic effects between CA1 mu opioid and dopamine D1-like receptors in impaired passive avoidance performance induced by hepatic encephalopathy in mice. *Psychopharmacol.* 2013; 227: 553-66.

18- Nasehi M, Jamshidi-Mehr M, Khakpai F, Zarrindast M-R. Possible involvement of CA1 5-HT1B/1D and 5-HT2A/2B/2C receptors in harmaline-induced amnesia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014; 125: 70-7.

19- Zarrindast MR, Nasehi M, Piri M, Bina P. Anxiety-like behavior induced by histaminergic agents can be prevented by cannabinoidergic WIN55,212-2 injected into the dorsal hippocampus in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010; 94: 387-96.

20- Pakpour B JK, Bashiri Z, Navaeian M, Piri M. Influence of arachidonylcy clopropylamide (ACPA) on muscimol state-dependent memory in step-down passive avoidance test in mice. *J Zanjan Uni Med Sci.* 2013; 42: 853-7.

21- Nasehi M, Kafi F, Khakpai F, Zarrindast M-R. Involvement of the serotonergic system of the ventral hippocampus (CA3) on amnesia induced by ACPA in mice. *Behav Brain Res.* 2015; 286: 356-63.

22- Meneses A. Stimulation of 5-HT 1A, 5-HT1 B, 5-HT 2A/2C, 5-HT 3 and 5-HT 4 receptors or 5-HT uptake inhibition: short-and long-term memory. *Behav Brain Res.* 2007; 184: 81-90.

23- Meneses A. A pharmacological analysis of an associative learning task: 5-HT1 to 5-HT7 receptor subtypes function on a Pavlovian/instrumental autoshaped memory. *Learn Mem.* 2003; 10: 363-72.

24- Perez-Garcia G, Meneses A. Memory formation, amnesia, improved memory and reversed amnesia: 5-HT role. *Behav Brain Res.* 2008; 195: 17-29.

25- Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, Gschaidmeier H, Fischer W. The neuronal 5-HT 3 receptor network after 20 years of research—evolving concepts in management of pain and inflammation. *Europ J Pharmacol.* 2007; 560: 1-8.

26- Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felsöci M. Serotonin receptors-from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res.* 2011; 60: 15.

27- Navaeian M, Piri M, Pakpour B. Influence of WIN55, 212-2 on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *J Kurdistan Univ Med Sci.* 2011; 16: 84-94.

28- Rezayof A, Amini R, Rassouli Y, Zarrindast M-R. Influence of nitric oxide on morphine-

induced amnesia and interactions with dopaminergic receptor agents. *Physiol Behav.* 2006; 88: 124-31.

29- Yang Y, Zheng X, Wang Y, et al. Stress enables synaptic depression in CA1 synapses by acute and chronic morphine: possible mechanisms for corticosterone on opiate addiction. J Neuro Sci. 2004; 24: 2412-20.

30- Zarrindast MR, Bananej M, Khalilzadeh A, Fazli Tabaei S, Haeri Rohani A, Rezayof A. Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiol Learn Mem.* 2006; 86: 286-92.

31- Zarrindast MR, Farajzadeh Z, Rostami P, Rezayof A, Nourjah P. Involvement of the ventral tegmental area (VTA) in morphine-induced memory retention in morphine-sensitized rats. Behav Brain Res. 2005; 163: 100-6.

32- McNamara RK, Skelton RW. Pharmacological dissociation between the spatial learning deficits produced by morphine and diazepam. *Psychopharmacol.* 1992; 108: 147-52.

33- Li Z, Wu C, Pei G, Xu N. Reversal of morphine-induced memory impairment in mice by withdrawal in morris water maze: possible involvement of cholinergic system. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001; 68: 507-13.

34- Cassel JC. .9-Experimental studies on the role (s) of serotonin in learning and memory functions. Handbook of Behavioral Neuroscience. 2010; 21: 429-47.

35- Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 2001; 294: 1030-8.

The Effect of 5HT3 Agonist Receptor of the Lateral Hippocampal on Amnesia Induce by Morphine in Mice

Doosti F[1], Pakpour B[1], Navaeian M[2]

[1]Dept. of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran

[2]Dept. of Biology, Islamic Azad University, Shahr-e- Rey Branch, Tehran, Iran

Corresponding Author: Pakpour B, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran

E-mail: b-Pakpour@yahoo.com

Received: 25 Jun 2017 **Accepted:** 5 Sep 2017

Background and Objective: It has been shown that the opioidergic system exerts widespread effects on cognitive functions. Interactions between opioid and serotonin receptors have been reported in some brain structures such as the dorsal hippocampus, thus a functional interaction between opioids and serotonin seems possible concerning memory control. The purpose of this study was to assess the effects of CA1 5-HT3 receptor agonist on memory acquisition deficit induced by morphine.

Materials and Methods: In this study, we used 96NMRI mice. These mice were divided into twelve equal groups that received different doses of 5-HT3recepto ragonist, different doses of morphine and a combination of morphine and serotonin 5-HT3 receptor agonist. Morphine was injected into the peritoneum, while 5-HT3 receptor agonist M-Chlorophenylbiguanide (M-chl) was administered via intra-hippocampal injection. A step-down passive avoidance test was used for the evaluation of memory.

Results: Pre-training intra-peritoneal administration of morphine (5 mg/kg) induced amnesia. Moreover, pre-training intra-CA1 administration of 5-HT3 receptor agonist (M-Chl) (0.5 ng/mouse) impaired memory acquisition. Furthermore, intra-CA1 injection of M-Chl (0.005ng/mouse) reversed impairment of memory acquisition induced by morphine (5 mg/kg).

Conclusion: The results demonstrated the existence of a synergistic effect between hippocampal 5-HT3 receptor agonists and opioidergic receptors.

Keywords: Memory; 5-HT 3 agonist; Morphine; Mice; Passive avoidance