

## اثر تجویز توأم مورفین و ال- آرژینین در ناحیه CA3 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی موش‌های صحرایی نر

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۲/۲۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** حافظه و یادگیری از عوامل پیچیده مغزی محسوب می‌شوند که نواحی مختلفی از جمله هیپوکامپ را درگیر می‌کنند. عوامل متعددی از جمله نیتریک اکساید و مورفین می‌توانند حافظه و یادگیری را متأثر سازند. هدف این مطالعه بررسی تجویز توأم L-Arginine (پیش‌ساز نیتریک اکساید) و مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی موش‌های صحرایی نر می‌باشد. روش بررسی: موش‌های صحرایی نر پس از بیهوشی عمیق با استفاده از مخلوط کتامین و گزیلازین و کانول‌گذاری دو طرفه در ناحیه CA3 هیپوکامپ به وسیله دستگاه استرئوتاکس، به هفت گروه تقسیم و هر گروه به‌طور جداگانه سرم فیزیولوژی (گروه شاهد)، L-Arginine (۳µg/rat) و L-NAME (۰/۳M)، مورفین (۰/۳M)، مورفین (۱۰mg/rat)، مورفین همراه با L-Arginine (۳µg/rat) یا مورفین همراه با L-NAME را به مدت پنج روز، که آزمایش ماز آبی موریس برای بررسی یادگیری و حافظه انجام می‌شد، دریافت کردند. یک گروه هم‌گروه کنترل بود. یافته‌ها: نتایج نشان داد تجویز دوز ۳µg/rat باعث بهبود یادگیری و حافظه فضایی شده است و تجویز L-NAME (مهارگر نیتریک اکساید) میزان یادگیری و حافظه فضایی را کاهش داده است. تجویز مورفین باعث کاهش یادگیری و حافظه فضایی گردید و تجویز توأم L-NAME و مورفین سبب اختلال بیشتر یادگیری نسبت به گروه دریافت‌کننده مورفین و نه گروه دریافت‌کننده L-NAME به‌تنهایی گردید. نتیجه‌گیری: پیش‌ساز نیتریک اکساید باعث بهبود یادگیری و حافظه شد و مهارگر آن و همچنین مورفین باعث اختلال در این پدیده‌ها گردید و تجویز توأم مهارگر نیتریک اکساید و مورفین باعث اختلال بیشتر یادگیری شد.

**کلمات کلیدی:** یادگیری، حافظه فضایی، هیپوکامپ، مورفین، نیتریک اکساید.

مهشید حسین زاده<sup>۱</sup>

ایران پورابولی<sup>۲\*</sup>

مهدی عباس نژاد<sup>۲</sup>

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

\* نویسنده مسئول: کرمان، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، مجتمع دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی  
تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۲۰۳۲  
email: pouraboli\_i@mail.uk.ac.ir

### مقدمه

آکسون‌های سلول‌های گرانولی‌اند که به سلول‌های هرمی در ناحیه CA3 هیپوکامپ می‌روند و شاخه‌های جانبی تحریکی سلول‌های هرمی ناحیه CA3 به نام مسیر جانبی شافر که به سلول‌های هرمی ناحیه CA1 ختم می‌شوند.<sup>۱</sup> در فیبرهای خزه‌ای CA3 و مسیر پرفورانت جانبی یک شکل از یادگیری و حافظه یافت شده است که گیرنده‌های mu اوپیوئیدی را درگیر می‌کند. گیرنده‌های اپیوئیدی در هیپوکامپ فراوانند و توسط پپتیدهای اپیوئیدی تحریک شده و همراه با گلوتامات از سیناپس‌های فیبر خزه‌ای و مسیر پرفورانت جانبی آزاد می‌شوند و روی تحریک‌پذیری نورون‌ها در این نواحی اثر می‌گذارند. مشخص شده است که اطلاعات ورودی به CA3 از طریق فیبر خزه‌ای و مسیر پرفورانت یک نقش اساسی در ایجاد یادگیری در CA3 دارد. ورودی فیبر خزه‌ای به CA3 در هنگام یادگیری مهم می‌باشد در

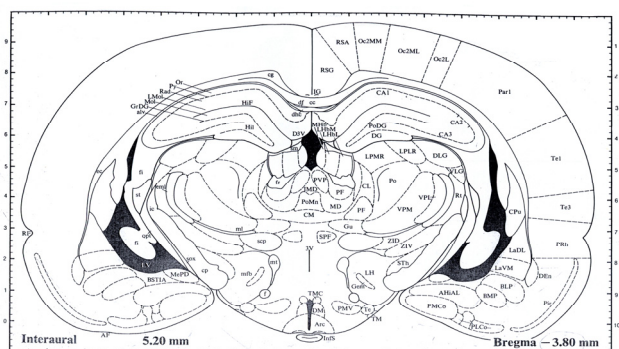
یادگیری Learning توانایی تغییر رفتار بر اساس تجربه و حافظه Memory یعنی توانایی به یاد آوردن وقایع گذشته به صورت خودآگاه یا ناخودآگاه است. یادگیری و حافظه از رفتارهای پیچیده مغزی محسوب می‌شوند که نواحی متعددی را در سیستم عصبی مرکزی درگیر می‌کنند.<sup>۱</sup> قشر مغز، آمیگدال و به‌خصوص هیپوکامپ نقش اساسی در تشکیل و ذخیره‌سازی حافظه فضایی دارند.<sup>۲</sup> مشخص شده که ناحیه CA3 هیپوکامپ نقش مهمی در یادگیری و حافظه فضایی دارد به طوری که مهار آوران‌های تحریکی به CA3 سبب اختلال در این پدیده می‌گردد.<sup>۳</sup> در هیپوکامپ سه مسیر تحریکی اصلی وجود دارد، شامل: مسیر پرفورانت که از سایکولوم به سلول‌های گرانولی در ناف جیروس دندان‌های می‌رود، مسیر فیبرهای خزه‌ای که همان

تناقضاتی وجود دارد. در آزمایشی که توسط Skelton و McNamara با ماز آبی موریس انجام شد مشاهده گردید که موش‌های صحرایی که با مورفین حاد داخل صفاقی تیمار شدند مسیر طولانی‌تری را برای یافتن سکو طی کردند که نشان‌دهنده کاهش یادگیری در آنها بوده است. البته در طول روزهای نهایی آزمایش، موش‌های صحرایی مستقیم به سمت سکو شنا می‌کردند.<sup>۱۵</sup> Ragozzino گزارش کرد که تزریق حاد مورفین در سبتموم یا تیغه میانی مغز باعث تخریب حافظه فضایی در موش‌های صحرایی می‌شود.<sup>۱۶</sup> یافته‌هایی هم نشان می‌دهند که اویپوئیدها بر روند شکل‌پذیری سیناپسی شبکه نورونی هیپوکامپ اثر مثبت دارند.<sup>۱۷</sup> در آزمایش دیگری نشان داده شد که تجویز مورفین به‌صورت مزمن و خوراکی به‌خاطر آوری حافظه را در روش احترازی غیر فعال تسهیل می‌کند و این اثر را از طریق گیرنده‌های mu انجام می‌دهد.<sup>۱۸</sup> البته ذکر شده است که اثرات مورفین روی حافظه وابسته به زمان تجویز دارو هم است.<sup>۱۹</sup> در آزمایشی که آمنه رضایوف انجام داد مشاهده کرد که تجویز همزمان L-Arginine داخل صفاقی و مورفین زیر پوستی در آزمایش اجتنابی غیر فعال بر روی حافظه اثر مثبت دارد و تجویز همزمان L-Name داخل صفاقی و مورفین زیر پوستی تشکیل حافظه را مهار می‌کند.<sup>۱۲</sup> در واقع نیتریک اکساید که توسط تحریک گلوتاماتی می‌تواند تولید شود آگزوسیتوز و آزادسازی گلوتامات و دوپامین را از نورون‌های مجاور القا می‌کند و بنابراین تشکیل سیناپسی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.<sup>۲</sup> رضایوف نشان داد که مورفین هم می‌تواند از طریق اثر روی سیستم گلوتاماتی و دوپامینی روی یادگیری و حافظه اثر داشته باش. در مورد تجویز توأم L-Arginine و مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ و اثر آن بر یادگیری و حافظه فضایی مطالعه‌ای صورت نگرفته و با توجه به رهایش نیتریک اکساید در هیپوکامپ و وجود گیرنده‌های اپیوئیدی در این ناحیه از مغز، اثرات تجویز توأم L-Arginine و مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی در این مطالعه بررسی شد.

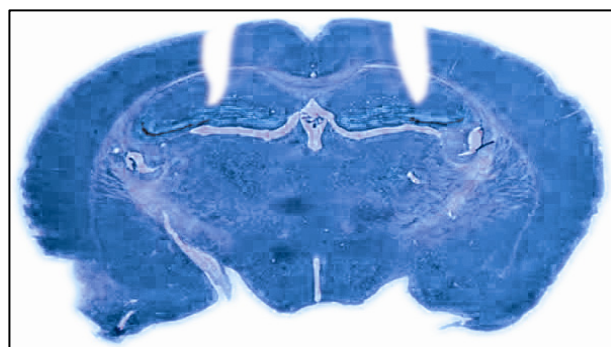
### روش بررسی

این مطالعه تجربی به‌مدت شش ماه در دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. در این آزمایش تعداد ۶۴ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم مورد بررسی قرار گرفتند. حیوانات در هشت گروه هشت‌تایی تقسیم شده و در معرض

حالی که ورودی مسیر پرفورانت به این ناحیه در به یاد آوردن وقایع آموخته شده نقش دارد.<sup>۴</sup> یکی از مولکول‌هایی که در حافظه و یادگیری نقش مهمی دارد نیتریک اکساید است که مولکولی قابل انتشار می‌باشد و به‌عنوان یک پیامبر داخل سلولی عمل می‌کند.<sup>۵</sup> مشخص شده است که در هیپوکامپ نیتریک اکساید (NO) به‌عنوان یک پیامبر رتروگرا عمل می‌کند که به‌صورت پس سیناپسی ساخته شده و روی پایانه‌های پیش سیناپسی عمل می‌کند.<sup>۶</sup> این مولکول در اعمال شناختی حیوان و در تشکیل حافظه و یادگیری نقش کلیدی دارد.<sup>۷،۸</sup> نواحی تولید کننده نیتریک اکساید شامل نورون‌ها، اندوتلیوم عروق، نورون‌های پیش عروقی و احتمالاً آستروسیت‌ها هستند.<sup>۹</sup> نیتریک اکساید توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) از L-Arginine ساخته می‌شود که در این عمل نیتروژن گوانیدینی آرژینین اکسید شده و NO و سیترویلین آزاد می‌شود.<sup>۷،۹</sup> پس L-Arginine از ترکیباتی است که حافظه و یادگیری را در موش‌های صحرایی افزایش داده و L-NAME که مهارگر سنتز نیتریک اکساید است باعث اختلال در حافظه و یادگیری می‌شود.<sup>۱۰</sup> Plech نشان داد که تجویز محیطی و داخل بطنی L-Arginine باعث بهبود حافظه و یادگیری در آزمایش اجتنابی غیر فعال می‌شود.<sup>۱۱</sup> برخی دیگر هم نشان دادند که تجویز داخل صفاقی L-NAME قبل از آزمایش اجتنابی غیر فعال، یادگیری را سرکوب می‌کند.<sup>۱۲</sup> در آزمایشی که Bohme با استفاده از ماز شعاعی هشت بازویی انجام داد مشاهده کرد که استفاده سیستمیک از مهارگر NOS قادر به بلوکه کردن LTP هیپوکامپ است و یادگیری فضایی را کم می‌کند.<sup>۵</sup> اویپوئیدها ترکیبات دیگری هستند که مدارهای مغزی درگیر در حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار می‌دهند.<sup>۱۳،۱۴</sup> به‌دلیل آنکه در CA3 هیپوکامپ گیرنده‌های mu اویپوئیدی که یکی از سه گیرنده مهم اویپوئیدی هستند فراوانند و مسیرهای آوران به این ناحیه نیز حاوی نوروپپتیدهای اویپوئیدی‌اند لذا ثابت شده است که گیرنده‌های mu اویپوئیدی در CA3 هیپوکامپ باعث تغییراتی در یادگیری و حافظه فضایی در موش‌های صحرایی می‌گردند.<sup>۴</sup> به‌طور مثال مشخص شده است که آنتاگونیست‌های گیرنده mu اویپوئیدی یادگیری که وابسته به مسیر فیبرهای خزه‌ای به CA3 است یا مسیر پرفورانت جانبی به CA3 می‌باشد را مختل می‌کنند و باعث اختلال یادگیری فضایی در ماز آبی موریس می‌شوند.<sup>۴</sup> در مورد مصرف حاد اویپوئیدها و به‌خصوص مورفین و اثر آن بر حافظه و یادگیری



شکل ۲: محل CA3 هیپوکامپ بر اساس اطلس پاکسینوس ۱۹۹۹



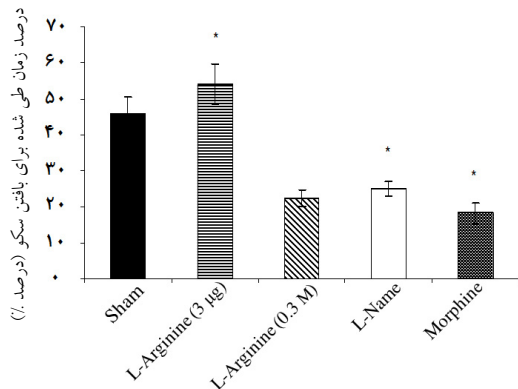
شکل ۱: محل کانول‌ها در ناحیه CA3 هیپوکامپ

هر کانول صورت گرفت. تزریق داروها با فاصله پنج دقیقه از هم در هر کانول صورت گرفت. پس از انجام آزمایش‌ها برای تایید محل کانول‌ها، حیوانات کشته شده و مغز آنها از مجسمه خارج و به مدت دو روز در فرمالین ۲۰٪ فیکس می‌شدند. سپس با تهیه اسلاید به روش ارتعاشی برش‌های ۱۵۰ میکرونی از مغز تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی نیسل، برش‌ها با اطلس پاکسینوس مطابقت داده می‌شدند. به علاوه در گروهی از موش‌ها به علت هزینه بالای رنگ‌آمیزی نیسل قبل از کشتن، از طریق کانول‌ها رنگ متیلن بلو به همان حجم دارو تزریق می‌شد و پس از کشتن حیوانات و قرار دادن مغزها در محلول فرمالین ۲۰٪ برش‌هایی از مغز تهیه می‌شد و محل کانول‌ها بررسی می‌گردید. داده‌های حیواناتی که محل کانول‌ها منطبق با موقعیت مورد نظر نبود حذف می‌شدند (شکل‌های ۱ و ۲).

ماز آبی موریس و روش ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی: ماز آبی موریس از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ با قطر داخلی ۱۴۰cm و ارتفاع ۸۰cm تشکیل شده که تا ارتفاع ۳۵cm با آب درجه ۱۹-۲۱ درجه پر می‌شود. یک سکوی کوچک از جنس پلکسی گلاس مشکی رنگ با قطر ۱۰cm که یک سانتی‌متر زیر آب است در حوضچه قرار می‌گیرد. هر موش به مدت پنج روز مورد آزمایش قرار می‌گرفت. موقعیت سکو در طول چهار روز ابتدای آزمایش برای آموزش یادگیری فضایی ثابت بود اما در روز پنجم برای بررسی تثبیت حافظه فضایی از ماز خارج می‌شد و مسیر حرکت حیوان از طریق یک دوربین مدار بسته به کامپیوتر انتقال یافته و پارامترهای مختلف از جمله میانگین مدت زمان لازم برای یافتن سکو و سرعت شنا کردن حیوان در طی روزهای آموزش (چهار روز) و درصد زمان طی شده توسط حیوان در ربع دایره هدف در روز پنجم به وسیله

دوره‌های نور- تاریکی ۱۲ ساعته و درجه حرارت کنترل شده محیط (۲۵±۲) نگهداری می‌شدند و همه حیوانات دسترسی کافی به آب و غذا داشتند. گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه کنترل (فقط کانول‌گذاری شد)، گروه شاهد (دریافت‌کننده حلال داروها یعنی سرم فیزیولوژی) و گروه‌های دریافت‌کننده L-Arginine (۳μg/rat) L-Arginine، Arginine (۰/۳M)، L-NAME (۰/۳M) (تهیه شده از شرکت دارویی سیگما آمریکا)، مورفین (۱۰mg/rat) (تهیه شده از شرکت داروپخش)، مورفین و L-Arginine (۳μg/rat) L-Arginine و L-NAME (۰/۳M) L-NAME و مورفین و مورفین بودند.<sup>۲۰</sup> در طی پنج روز ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی با ماز آبی موریس، در تمام گروه‌ها ۳۰ دقیقه قبل از قرار گرفتن در ماز آبی، تزریق داخل مغزی داروها صورت می‌گرفت. در تمام گروه‌ها n=۸ بود. برای کانول‌گذاری دوطرفه در ناحیه CA3 هیپوکامپ حیوانات با مخلوط کتامین و گزیلازین به طریق داخل صفاقی (۷۸mg/kg کتامین و ۳mg/kg گزیلازین) بیهوش و در دستگاه استرنوتاکسیک قرار گرفتند و دو کانول راهنما با قطر ۰/۷ میلی‌متر از جنس فولاد زنگ نزن به طور دوطرفه در ناحیه CA3 هیپوکامپ با مختصات (AP=۳/۵، ML=±۳/۸ و DV=۲/۷ از سخت شامه) قرار داده شد.<sup>۴</sup> برای جلوگیری از ورود گرد و غبار یا خروج مایع مغزی نخاعی برای هر کانول درپوشی از جنس فولاد زنگ نزن با قطری کمتر از کانول به کار برده شد. پس از جراحی، حیوانات هفت روز دوره بهبودی را طی کردند و سپس یادگیری و حافظه فضایی آنها با ماز آبی موریس ارزیابی شد.<sup>۲۱</sup> برای تزریق دارو در کانول‌ها از سرنگ هاملتون ۱۰ میکرولیتری و لوله پلی اتیلن ۲۵cm و سرسوزن شماره ۲۷ استفاده شد و تزریقات با حجم ۱μl به مدت دو دقیقه در

یادگیری این دو گروه نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (نمودار ۱).  
 ب) درصد زمان طی شده در ربع هدف در مرحله Probe trial: انجام تست prob در روز پنجم نشان داد که حافظه فضایی گروهی که L-Arginine را با دوز ۰/۳M دریافت کرده بود تغییر نکرد اما گروهی که L-Arginine را با دوز ۳μg/rat دریافت کرده بود درصد زمان بیشتری را در ربع دایره هدف نسبت به گروه شاهد طی کرده است ( $p < 0/01$ )، بنابراین حافظه فضایی این گروه نسبت به شاهد بهبود یافته است. از طرفی گروه‌های دریافت‌کننده L-NAME یا مورفین نسبت به گروه شاهد درصد زمان کمتری را در ربع دایره هدف سپری کرده‌اند ( $p < 0/002$ ). این نتیجه نشان‌دهنده کاهش حافظه فضایی این گروه‌ها نسبت به گروه شاهد است (نمودار ۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تجویز L-NAME یا مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ باعث کاهش یادگیری و حافظه فضایی می‌شود ولی L-Arginine با دوز ۳μg/rat باعث بهبود یادگیری و حافظه فضایی می‌شود.  
 ۲- اثر تجویز توأم مورفین با L-Arginine و یا L-NAME در ناحیه CA3 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی همان‌طور که در ابتدای نتایج ذکر شد، L-Arginine با دوز ۳μg/rat بر یادگیری و حافظه فضایی موثر بود ولی دوز ۰/۳M آن اثری نداشت لذا برای تجویز توأم از دوز موثر آن یعنی ۳μg/rat استفاده شد.

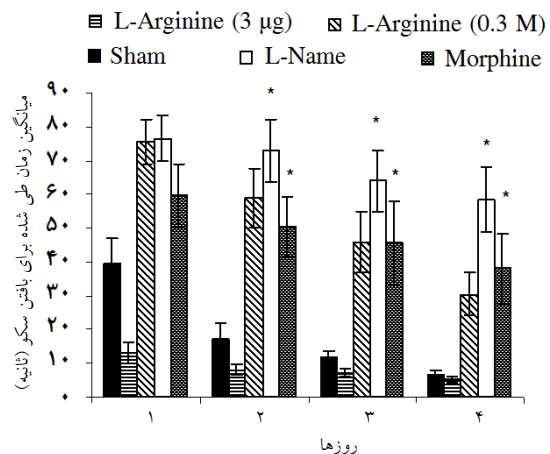


نمودار ۲: درصد زمان طی شده در ربع هدف در روز پنجم در گروه شاهد (sham) و گروه‌های دریافت‌کننده L-Arginine با دوزهای ۰/۳M و ۳μg/rat، L-Name با دوز ۰/۳M و مورفین با دوز ۱۰μg/rat، گروه‌های دریافت‌کننده مورفین، L-Arginine و L-Name با دوز ۳μg/rat اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد دارند. گروه دریافت‌کننده L-Arginine درصد زمان بیشتری را در ربع هدف طی کرده و گروه‌های دریافت‌کننده L-Name و مورفین درصد زمان کمتری را در ربع هدف شنا کردند (در مقایسه با شاهد).  $N=8$ ,  $p < 0/05$

کامپیوتر ثبت و آنالیز می‌گردید. <sup>۱۸</sup> اطلاعات ثبت شده توسط کامپیوتر با روش آماری آنالیز واریانس (ANOVA) دوطرفه و یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شد. همچنین از تست tukey جهت تعیین گروه‌هایی که با هم اختلاف معنی‌دار داشتند استفاده شد. در کلیه آزمایش‌ها حداقل سطح معنی‌داری تفاوت‌ها  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد و داده‌ها در کلیه نمودارها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است.

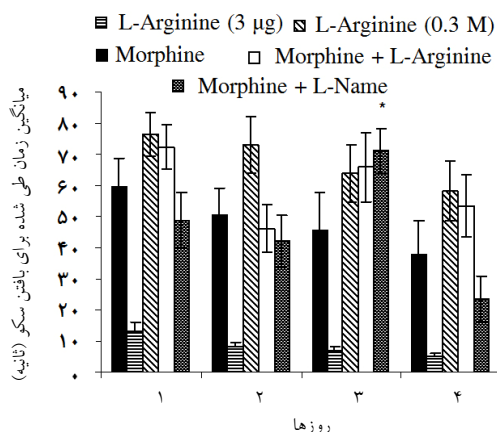
## یافته‌ها

۱- اثر تجویز L-Arginine، L-NAME و مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی. از آنجایی‌که با بررسی سرعت شنا کردن حیوانات، هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف و گروه شاهد مشاهده نشد از مطرح کردن نتایج مربوط به سرعت شنا کردن خودداری کردیم. از طرفی با بررسی نتایج به‌دست آمده هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و کنترل مشاهده نشد بنابراین از ذکر نتایج گروه کنترل هم خودداری کردیم.  
 الف) میانگین زمان لازم برای یافتن سکو در طی یادگیری فضایی: نتایج نشان داد که گروه‌های دریافت‌کننده L-NAME با  $p < 0/001$  و یا مورفین با  $p < 0/001$  در روزهای دوم، سوم و چهارم آموزش زمان بیشتری را برای یافتن سکو نسبت به گروه شاهد تلف کرده‌اند. بنابراین



نمودار ۱: میانگین زمان طی شده برای یافتن سکو در روزهای آموزش در گروه شاهد (sham) و گروه‌های دریافت‌کننده L-Arginine با دوزهای ۰/۳M و ۳μg/rat، L-Name با دوز ۰/۳M و مورفین با دوز ۱۰μg/rat. در روزهای ۲ و ۳ و ۴ گروه‌های دریافت‌کننده مورفین و L-Name اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دارند و زمان بیشتری برای یافتن سکو شنا کردند.  $N=8$ ,  $p < 0/05$

Quing در آزمایش خود نشان داد که تزریق داخل بطنی L-NAME در آزمایش ماز آبی مورس ۳۰ دقیقه قبل از هر آزمایش یادگیری و حافظه را در موش‌های صحرایی در آزمایش اجتنابی غیر فعال و در آزمایش ماز آبی مورس مختل می‌کند.<sup>۱۱</sup> Vanaja هم گزارش کرد که L-NAME حافظه و یادگیری را در موش‌های صحرایی مختل می‌کند.<sup>۱۲</sup> Koyla هم در آزمایش خود نشان داد که مهار NOS هیپوکامپی با تزریق داخل صفاقی L-NAME یادگیری را در ماز آبی مورس کمتر می‌کند. ضمناً L-Name در مرحله امتحان هم اثر گذاشته و باعث نقص حافظه می‌شود.<sup>۲۲</sup> گروهی از محققین نشان دادند که L-Arginine، پیش‌ساز سنتز نیتریک اکساید، تثبیت حافظه و یادگیری را افزایش می‌دهد. Quing نشان داد که L-Arginine حافظه و یادگیری را در آزمایش ماز شعاعی در موش‌های صحرایی بهبود می‌بخشد.<sup>۱۱</sup> Vanaja هم گزارش کرد که L-Arginine اجرای آزمایش ابقا حافظه را در موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد و افزایش دوز این دارو اثر بهتری روی حافظه دارد. یعنی در روندهای حافظه و یادگیری هر چه غلظت نیتریک اکساید در مغز بالاتر رود اثر تقویتی آن بیشتر است.<sup>۱۳</sup> Telegdy و Kokavszky نشان دادند که ال-آرژینین تزریق شده به صورت داخل بطنی تثبیت حافظه را در آزمایش اجتنابی غیر فعال بهبود می‌بخشد اما بازیابی آن را در موش‌های صحرایی متاثر نمی‌کند.<sup>۱۱</sup> مکانیسم اثر NO بر یادگیری و حافظه بدین صورت است که نیتریک اکساید می‌تواند آزادسازی گلوتامات و دوپامین را از نورون‌های مجاور القا کند و بنابراین تسهیل سیناپسی را تحت تاثیر قرار دهد.<sup>۲۲</sup> در فرم‌های یادگیری، سیگنال ترانس داکشن NO شامل فعال شدن گیرنده جفت شده با گوانیل سیکلاز می‌باشد. نتیجه این عمل افزایش cGMP است که این افزایش باعث شروع آبشارهای فسفریلاسیون توسط پروتئین کینازها و در نتیجه فعال شدن فاکتورهای نسخه‌برداری می‌شود و از این طریق NO می‌تواند روی تشکیل حافظه نقش داشته باشد. در هیپوکامپ، یادگیری و حافظه توسط تحریک مکرر فیبرهای گلوتاماترژیک آوران که وابسته به فعال شدن گیرنده‌های گلوتاماتی نوع NMDA پس سیناپسی می‌باشند ایجاد می‌شود. این گیرنده‌ها با سنتز NO وابسته به کلسیم-کالمودولین در ارتباط می‌باشند. در واقع جریان یون کلسیم از طریق کانال‌های گیرنده NMDA با تشکیل NO همراه است. سپس از آنجایی که NO در محیط‌های آبی و چربی قابل انتشار می‌باشد می‌تواند به عنوان یک



نمودار ۳- میانگین زمان طی شده برای یافتن سکو در روزهای آموزش در گروه‌های دریافت‌کننده مورفین با دوز  $10 \mu\text{g}/\text{rat}$ ، L-Arginine با دوز  $3 \mu\text{g}/\text{rat}$ ، L-Name با دوز  $3 \text{M}$ ، مورفین و L-Arginine (به طور توأم) و مورفین و L-Name به طور توأم. گروه دریافت‌کننده مورفین و L-Name در روز سوم اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه دریافت‌کننده مورفین نشان داد و زمان بیشتری را برای یافتن سکو نسبت به گروه دریافت‌کننده مورفین طی کرده است.

N=8,  $p < 0.05$  L-Arg = L-Arginine, Mor = Morphine

میانگین زمان لازم برای یافتن سکو در طی یادگیری فضایی: بر اساس نتایج به دست آمده مشاهده شد که گروه دریافت‌کننده L-NAME و مورفین به صورت توأم در روز سوم آموزش زمان بیشتری را برای یافتن سکو نسبت به گروه دریافت‌کننده مورفین تلف کرده است که حاکی از کاهش یادگیری این گروه نسبت به گروه دریافت‌کننده مورفین می‌باشد ( $p=0$ ). (نمودار ۳). بنابراین از آنجا که اثر تجویز مهارگر تولید NO یعنی L-NAME همراه با مورفین توانسته است اختلال بیشتری در یادگیری نسبت به تجویز جداگانه اینها ایجاد کند لذا می‌توان گفت که به احتمال زیاد اثرات اینها جمع شده است و باعث تشدید اختلال یادگیری گردیده است.

## بحث

۱- اثر نیتریک اکساید در ناحیه CA3 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی  
نتایج این مطالعه نشان داد که L-NAME (مهارگر NOS) با مهار سنتز نیتریک اکساید یادگیری و حافظه فضایی را در موش‌های صحرایی در آزمایش ماز آبی مورس کاهش داده است. از طرفی L-Arginine یادگیری و حافظه فضایی را در موش‌های صحرایی بهبود داده است.

حافظه را در موش‌هایی که با تجویز دارو در آنها فراموشی القا شده بود تسهیل می‌کند و این پدیده وابسته به زمان و دوز دارو است.<sup>۱۹</sup> مکانیسم اثر تجویز حاد مورفین بر تخریب روندهای یادگیری و حافظه، در اثر وابستگی سیستم اویپوئیدی با سیستم کولینرژیکی است. بدین ترتیب که اویپوئیدها از جمله مورفین که تمایل بالایی برای گیرنده‌های mu اویپوئیدی دارند در پایانه‌های کولینرژیکی در هیپوکامپ وجود دارند و اتصال مورفین به این گیرنده‌ها باعث مهار آزادسازی استیل کولین می‌گردد. استیل کولین از میانجی‌های عصبی مهمی است که باعث افزایش یادگیری و حافظه می‌شود بنابراین مهار آزادسازی این ترکیب باعث ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه فضایی می‌گردد.<sup>۲۰، ۲۱</sup> همان‌طور که قبلاً گفته شد در هیپوکامپ گیرنده‌های اویپوئیدی از جمله مورفین بسیار زیاد هستند. اتصال مورفین به این گیرنده‌ها باعث می‌شود که این گیرنده‌ها به G- پروتئین‌های نوع Gi/o متصل و آدنیلیل سیکلاز را مهار کنند. فعال شدن Gi با این مکانیسم باعث اختلال در یادگیری و حافظه در موش‌ها می‌شود.<sup>۱۲</sup>

۳- اثر تجویز توأم نیتریک اکساید و مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی

در این مطالعه نشان داده شد که تجویز توأم مورفین و L-NAME باعث ایجاد اختلال بیشتر در یادگیری نسبت به گروه دریافت‌کننده مورفین به‌تنهایی گردیده است. به عبارت دیگر اثر مهار تولید NO و اثر مورفین در اختلال یادگیری با هم جمع شده است. در حالی که اثر تجویز توأم اینها بر اختلال یادگیری نسبت به گروه دریافت‌کننده L-NAME به‌تنهایی معنی‌دار نیست که این نتیجه اخیر می‌تواند بیانگر این باشد که احتمالاً بخشی از اثرات مورفین بر اختلال یادگیری از طریق مهار کردن تولید NO می‌باشد. در مورد اثر تجویز توأم مورفین مرکزی و نیتریک اکساید بر یادگیری و حافظه نتایجی در دست نیست. در یک آزمایشی که در این زمینه انجام شده است آمنه رضایوف نشان داد که تجویز L-NAME داخل صفاقی به‌تنهایی قبل از آزمایش اجتنابی غیر فعال هیچ اثری روی یادگیری و حافظه نداشته است. اما تجویز همزمان L-NAME داخل صفاقی و مورفین زیرپوستی باعث کاهش یادگیری و حافظه شده است.<sup>۱۲</sup> در واقع زمانی که L-NAME با مورفین به‌طور توأم تجویز شوند باعث کاهش رهایی گلوتامات و دوپامین شده و در نتیجه باعث مهار یادگیری و حافظه می‌شوند. همان‌طوری که می‌دانید این دو میانجی عصبی اثر افزایشی روی

مولکول سیگنالی داخل سلولی سریع روی تشکیلات سیناپسی اثر بگذارد.<sup>۶</sup> در مورد L-Arginine، این مولکول از طریق تحریک آرژنین وازوپرسین (AVP) هم می‌تواند اثراتش را اعمال کند، که این اثرات توسط cGMP میانجیگری می‌شود. سپس AVP از طریق تحریک گیرنده‌های V1 وازوپرسین مرکزی روی حافظه اثر مثبت می‌گذارد.<sup>۱۱</sup>

۲- اثر مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ بر یادگیری و حافظه فضایی

نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ باعث کاهش یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات شد. مورفین باعث نقص‌های شناختی می‌شود و استفاده از اویپوئیدها به‌ویژه مورفین یادگیری و حافظه را تحت تأثیر قرار داده و می‌تواند نورون‌زایی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی بالغ را نیز تحت تأثیر قرار دهد به طوری که مصرف مورفین به‌صورت حاد نورون‌زایی را تقویت و مصرف مزمن مورفین آن را مهار می‌کند.<sup>۱۳</sup> در واقع استفاده از اویپوئیدها باعث ایجاد چرخه‌های معیوبی در سیستم‌های وابسته به یادگیری و حافظه در مغز می‌شود.<sup>۳۳</sup> در مورد اثر حاد مورفین روی یادگیری و حافظه با قطعیت هنوز نظری بیان نشده است. مشاهده شده است که تجویز مورفین به‌صورت زیرپوستی قبل از آزمایش، اکتساب حافظه را در مسیرهای مختلفی مثل ماز Y- شکل و آزمایشات اجتنابی فعال و غیر فعال مهار می‌کند.<sup>۱۹، ۲۱، ۲۴</sup> به‌علاوه مشاهده شده است که تجویز سیستمیک مورفین حاد باعث ایجاد نقص در یادگیری فضایی در آزمایش ماز آبی موریس می‌شود.<sup>۱۶، ۲۵</sup> در آزمایشی که McNamara و Skelton انجام دادند مشاهده شد موش‌هایی که به‌صورت داخل صفاقی با مورفین حاد تیمار شده‌اند در ماز آبی موریس مسیر طولانی‌تری را برای پیدا کردن سکو طی می‌کردند و تمایل داشتند تا در روزهای اولیه آزمایش مسیر بیشتری را شنا کنند اما در طول روزهای نهایی آزمایش مستقیماً به سمت سکو شنا می‌کردند.<sup>۱۵</sup> ولی در مطالعات دیگر نشان داده شد که اگرچه مورفین اکتساب موفقیت را در آزمایش ماز آبی موریس آهسته می‌کند اما از ترجیح مکانی جلوگیری نمی‌کند.<sup>۱۵</sup> در این آزمایش مشاهده شد که تزریق مورفین در ناحیه CA3 هیپوکامپ باعث کاهش یادگیری و حافظه فضایی شده است که با نتایج فوق مطابقت دارد. البته هنوز برای مورفین یک نقش دوگانه در نظر گرفته می‌شود و گفته شده که اثرات مورفین روی یادگیری و حافظه وابسته به زمان تجویز دارو نیز هست به طوری که گفته شده تجویز مورفین قبل از آزمایش، بازیابی

هیپوکامپ نسبت به تجویز مورفین به تنهایی اختلال بیشتری در یادگیری ایجاد می‌کند و ممکن است بخشی از اثرات مورفین بر اختلال یادگیری ناشی از مهار ره‌ایش NO باشد. سپاسگزاری: نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از خانم دکتر مجلسی و آقای دکتر شیبانی به‌واسطه راهنمایی‌ها و مساعدت‌های بی‌دریغشان در انجام این مطالعه اعلام می‌دارند.

## References

- Ganong WF. Review of Medical Physiology. 19<sup>th</sup> ed. Norwalk, CT: Appleton & Lange; 1999.
- Kandel ER: Principles of neural science. 4<sup>th</sup> ed. Norwalk, CT: Appleton & Lange; 1991.
- Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 2002; 78: 637-47.
- Meilandt WJ, Barea-Rodriguez E, Harvey SA, Martinez JL Jr. Role of hippocampal CA3 mu-opioid receptors in spatial learning and memory. *J Neurosci* 2004; 24: 2953-62.
- Böhme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, et al. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 9191-4.
- Christelle LM, Garthwaite B. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 2003; 23: 1941-48.
- Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience* 2003; 119: 679-87.
- Zou B, Zhang Z, Xiao H, Li A. Effect of aluminum on long-term potentiation and its relation to L-arg-NO-pathway in hippocampal CA3 area of rats. *J Tongji Med Univ* 1998; 18: 193-6.
- Bhardwaj A, Northington FJ, Koehler RC, Stiefel T, Hanley DF, Traystman RJ. Adenosine modulates N-methyl-D-aspartate-stimulated hippocampal nitric oxide production in vivo. *Stroke* 1995; 26: 1627-33.
- Paul V, Reddy L, Ekambaram P. Prevention of picrotoxin convulsions-induced learning and memory impairment by nitric oxide increasing dose of L-arginine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75: 329-34.
- Plech A, Klimkiewicz T, Maksym B. Effect of L-arginine on memory in rats. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 987-92.
- Rezayof A, Amini R, Rassouli Y, Zarrindast MR. Influence of nitric oxide on morphine-induced amnesia and interactions with dopaminergic receptor agents. *Physiol Behav* 2006; 88: 124-31.
- Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7579-84.
- Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnian 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.
- McNamara RK, Skelton RW. Pharmacological dissociation between the spatial learning deficits produced by morphine and diazepam. *Psychopharmacology (Berl)* 1992; 108: 147-52.
- Motamedi F, Ghasemi M, Davoodi F, Naghdi N. Comparison of learning and memory in morphine dependent rats using different behavioral models. *Iranian J Pharmaceutical Res* 2003; 2: 225-30.
- Xie CW, Lewis DV. Endogenous opioids regulate long-term potentiation of synaptic inhibition in the dentate gyrus of rat hippocampus. *J Neurosci* 1995; 15: 3788-95.
- Pourmoteabed A, Tahmasian M, Shahi M, Karami Darabkhani H, Fathollahi Y. Effect of morphine dependency on learning and spatial memory in male rats. *Iranian J Physiol & Pharmacol* 1384; 9: 127-37.
- Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 2004; 497: 197-204.
- Karami M, Zarrindast MR, Sepehri H, Sahraei H. Role of nitric oxide in the rat hippocampal CA1 area on morphine-induced conditioned place preference. *Eur J Pharmacol* 2002; 449: 113-9.
- Li Z, Wu CF, Pei G, Xu NJ. 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.
- Koylu EO, Kanit L, Taskiran D, Dageci T, Balkan B, Pogun S. Effects of nitric oxide synthase inhibition on spatial discrimination learning and central DA2 and mACh receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81: 32-40.
- Jafari MR, Zarrindast MR, Djahanguiri B. Influence of cholinergic system modulators on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physiol Behav* 2006; 88: 146-51.
- Spain JW, Newsom GC. Chronic opioids impair acquisition of both radial maze and Y-maze choice escape. *Psychopharmacology (Berl)* 1991; 105: 101-6.
- Pu L, Bao GB, Xu NJ, Ma L, Pei G. Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *J Neurosci* 2002; 22: 1914-21.
- Shiigi Y, Takahashi M, Kaneto H. Facilitation of memory retrieval by pretest morphine mediated by mu but not delta and kappa opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1990; 102: 329-32.

## The effect of co-administration of morphine and L-Arginine in hippocampal CA3 area on spatial learning and memory in male rats

Received: April 07, 2009 Accepted: May 10, 2009

### Abstract

Hoseinzadeh M.<sup>1</sup>  
Pouraboli I.<sup>2\*</sup>  
Abbasnejad M.<sup>1</sup>

1- Master of Science in Physiology  
2- Department of Biology, School of Science, Shaheed Bahonar University, Kerman

**Background:** Learning and memory are the complicated agents of central nervous system that various regions of brain can be involved in these phenomena, especially regions like hippocamp. Various agents like nitric oxide and morphine can influence learning and memory. About the effects of morphine with other components there was not clear reports so in this study the effect of co-administration of L-Arginine (precursor of nitric oxide) and morphine in hippocampal CA3 area on spatial learning and memory in male rats was investigated.

**Methods:** Male rats were deeply anaesthetized with ketamine and xylazine and cannula were implanted bilaterally in CA3 of hippocampus by using stereotaxic technique. Then male rats were used in seven groups that received saline, L-Arginine (0/3M), L-Arginine (3µg/rat), L-NAME (0/3M), morphine (10mg/rat), L-Arginine (3µg/rat) with morphine or L-NAME with morphine for five days that they were trained in morris water maze to evaluate spatial learning and memory. There was a control group too.

**Results:** Our results showed that L-Arginine (3µg/rat) improved spatial learning and memory. L-NAME (inhibitor of nitric oxide) decreased spatial learning and memory in male rats. Injection of morphine also decreased spatial learning and memory in male rats. Co-administration of L-NAME and morphine decreased learning more than morphine individually in male rats.

**Conclusion:** We concluded that precursor of nitric oxide improved learning and memory in male rats and inhibitor of it and morphine impaired this phenomena and co-administration of inhibitor of nitric oxide and morphine also impaired learning in rats.

**Keywords:** Learning, spatial memory, hippocampus, morphine, nitric oxide.

\* Corresponding author: Dept. of Biology, Shaheed Bahonar University of Kerman, School of Science, Kerman, IRAN  
Tel: +98-341-3222032  
email: pouraboli\_i@mail.uk.ac.ir