مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۸، اردیبهشت ۱۳۹۸، ۱۶۰-۱۴۷

تأثیر تزریق گرلین به درون ناحیه تگمنتوم شکمی بر نقص حافظه ناشی از مورفین در موش صحرایی نر: یک مطالعه تجربی

فرزانه نظری سرنجه[۱]، نیلوفر دربندی[۲]، آتنا یادگاری[۳]، حمیدرضا مومنی[۴]

دریافت مقاله: ۹۷/۷/۷ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۸/۱۴ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۹/۲۸ پذیرش مقاله:۹۷/۱۰/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات متعدد نشان می‌دهد که مورفین سبب اختلال در اعمال شناختی می‌گردد. از طرفی، هورمون گرلین علاوه بر تغذیه، بر فرآیند حافظه و یادگیری نیز اثرگذار است. هدف از مطالعه حاضر، تعیین تأثیر تزریق گرلین به درون ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) بر فراموشی ناشی از مورفین در موش صحرایی نر بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، ۱۰۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۲۰ گرم) به‌طور تصادفی به ۱۳ گروه ۸ تایی شامل سالین، گروه‌های دریافت کننده مورفین (۷/۵-۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گروه‌های دریافت کننده گرلین (۳-۰ نانومول بر میکرولیتر) همراه با دریافت مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) یا سالین تقسیم شدند. سنجش حافظه در دستگاه یادگیری اجتنابی غیرفعال انجام گرفت. در کلیه گروه‌ها بلافاصله پس از آموزش، تزریق سالین یا گرلین به درون ناحیه VTA انجام گرفت. پس از ۵ دقیقه، سالین و یا مورفین به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد آزمون حافظه انجام شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس (یک‌طرفه و دو طرفه) و آزمون تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تزریق مورفین به صورت پس از آموزش، مدت زمان ورود به ناحیه تاریک را در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد ($p<۰/۰۰۱$). هم‌چنین تزریق گرلین به داخل ناحیه VTA فراموشی ناشی از مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را کاهش داد ($p<۰/۰۰۱$). تزریق گرلین به همراه سالین تأثیر معنی‌داری بر به‌خاطرآوری حافظه نداشت ($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج فوق نشان می‌دهد که تزریق گرلین به درون ناحیه VTA از بروز اثر تخریبی مورفین بر حافظه اجتنابی جلوگیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی: گرلین، یادگیری اجتنابی غیر فعال، موش صحرایی نر، مورفین، ناحیه تگمنتوم شکمی

۱- استادیار،گروه زیستشناسی، دانشگاه پیام نور، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
تلفن: ۳۲۶۲۷۲۲۴-۰۸۶، دورنگار: ۳۲۶۲۷۵۴۳-۰۸۶، پست الکترونیکی: N-Darbandi@araku.ac.ir
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۴- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

مقدمه

مطالعات متعدد نشان می‌دهد مصرف مورفین و سایر اوپیوییدها با تغییر عملکرد مدارهای عصبی دخیل در فرآیندهای شناختی سبب نقص حافظه در مدل‌های مختلف سنجش حافظه می‌گردند [۲-۱]. ناحیه تگمنتوم شکمی VTA (Ventral Tgmental Area) که سیستم دوپامینرژیک مزوکورتیکولیمبیک از آن منشاء می‌گیرد، یکی از مهم‌ترین نواحی هدف مورفین جهت بروز اثرات پاداشی است [۴-۳]. این ناحیه علاوه بر اثرات پاداشی مورفین، در تشکیل حافظه‌های وابسته به مورفین نیز نقش دارد [۱].در این رابطه، Zarrindast و همکارانش نشان دادند که تزریق مورفین به درون ناحیه VTA، تثبیت حافظه را در مدل یادگیری اجتنابی کاهش می‌دهد [۵]. از سویی دیگر، مطالعات فارماکولوژیک نشان می‌دهد که علاوه بر سیستم دوپامینی [۵]، گیرنده‌های سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری واقع در ناحیه VTA در میانجی‌گری اعمال شناختی مورفین نقش به‌سزایی دارند [۱، ۶].

از طرف دیگر، مشخص شده است که گرلین به عنوان یک نورومدولاتور در ناحیه VTA در اعمال شناختی نقش دارد [۷]. همچنین، گرلین یک هورمون گوارشی ۲۸ اسیدآمینه‌ای است که از سلول‌های آزاد و به جریان خون وارد می‌شود. گرلین با اثر بر روی گیرنده‌های GHS-R1a (Growth Hormone Secretagogue Receptor) واقع در مدارهای هیپوتالاموسی مغز در تنظیم ترشح هورمون رشد، تنظیم متابولیسم و هومئوستازی انرژی در بدن نقش دارد [۸]. علاوه بر هیپوتالاموس، گیرنده‌های GHS-R1a در نواحی متعدد مغز از جمله هیپوکمپ، کورتکس و ناحیه VTA بیان می‌شوند که بیان‌گر نقش گرلین در سایر عملکردهای فیزیولوژیک سیستم عصبی می‌باشند [۹]. در یک دهه گذشته مطالعات متعددی در مورد اثرات گرلین بر حافظه و یادگیری انجام شده است. مطالعات رفتاری نشان داده است که تزریق موضعی گرلین یا آگونیست‌های گیرنده‌های GHS-R1a به درون نواحی مختلف مغز سبب افزایش حافظه در مدل‌های مختلف سنجش حافظه می‌شود [۱۲-۱۰]. به‌علاوه مشخص شده است که گرلین سبب القاء LTP (Long-Term Potentiation) و تشکیل سیناپس‌های جدید در ناحیه هیپوکمپ می‌گردد [۱۳].

از طرف دیگر، امروزه اعتیاد به مورفین و سایر اوپیات‌ها یکی از مشکلات حوزه سلامت در سراسر دنیاست. لذا شناسایی مکانیسم‌های عصبی اثرات مورفین بر مغز و یافتن داروهای مؤثر جهت کاهش اثرات جانبی آن از اهمیت زیادی برخوردار است. مطالعات اخیر نشان داده است که گرلین در بروز اثرات پاداشی و حرکتی مورفین در حیوانات آزمایشگاهی دخالت دارد [۱۵-۱۴]. اما علیرغم نقش مثبت گرلین بر حافظه، تاکنون در مورد اثر احتمالی آن بر حافظه وابسته به مورفین، مطالعه‌ای انجام نشده است. لذا با توجه به بیان گیرنده‌های GHS-R1a در ناحیه VTA و اثرات گرلین بر عمل‌کرد این ناحیه [۱۶] و نقش ناحیه VTA در اثرات

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

شناختی مورفین [۱] هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین اثر تزریق گرلین به درون ناحیه VTA بر فرآیند حافظه در موش های تحت تیمار با مورفین بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده زیست شناسی دانشگاه اراک در سال ۹۷- ۱۳۹۶ انجام شد. در این پژوهش از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران تهیه و به حیوان‌خانه دانشگاه اراک منتقل شدند. قبل از شروع آزمایشات و به منظور سازگاری با محیط جدید، حیوانات به مدت یک هفته درشرایط استاندارد آزمایشگاهی (دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، دوره روشنایی– تاریکی ۱۲ ساعته و رطوبت ۵۰-۴۰ درصد) و دسترسی آسان به آب و غذا در قفس‌هایی با جمعیت ۴ سر نگهداری شدند [۱۷]. آزمایشات در بازه زمانی ۹ صبح تا ۱۳ بعداز ظهر انجام شد. تمامی آزمایشات بر پایه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت. علاوه بر این، این مطالعه دارای تأییدیه کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک به شماره ۱۳۹-۱۳۹۷ می‌باشد.

تعداد ۱۰۴ سر موش صحرایی نر به ۱۳ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. هر حیوان در ابتدا با تزریق درون صفاقی مخلوطی از کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شده و در دستگاه استرئوتاکسی (Steoling, USA) قرار گرفت. پس از برداشتن پوست و نسج ناحیه فوقانی سر مکان‌یابی ناحیه VTA بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون انجام شد. مختصات ناحیه VTA به شرح ذیل است: ۵/۳۸- میلی‌متر از برگما به سمت عقب، ۰/۷± میلی‌متر از طرفین شکاف ساژیتال و ۷- میلی‌متر به طرف پایین از سطح از جمجمه [۱۸]. پس از مشخص نمودن محل دقیق نواحی VTA، ناحیه مورد نظر با استفاده از مته دندان‌پزشکی سوراخ و ۲ عدد کانول راهنما که از سر سوزن ۲۲ گیج تهیه شده بود یک میلی‌متر بالاتر از نواحی VTA با کمک سیمان دندان‌پزشکی بر روی جمجمه تثبیت شدند. به این ترتیب میزان تخریب ناحیه VTA هنگام ورود کانول راهنما به حداقل می‌رسید. پس از یک هفته بهبودی، آزمون رفتاری بر روی موش‌ها انجام شد [۱۷].

داروهای استفاده شده در این مطالعه شامل گرلین (Abcam، انگلستان) و مورفین سولفات (داروپخش، ایران) بود و هر دو دارو در سالین استریل ۰/۹ درصد حل شد. گرلین یک‌بار [۱۰] و به درون ناحیه VTA تزریق شد. به این منظور از کانول تزریق که یک میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما بوده و از سر سوزن ۲۷ گیج تهیه شده بود همراه با رابط پلی‌اتیلنی و سرنگ هامیلتون استفاده شد. حجم تزریق به درون ناحیه VTA در هر طرف ۰/۲ میکرولیتر بود که در مدت زمان ۶۰ ثانیه تزریق شد. جهت اطمینان از تزریق کامل دارو به درون ناحیه VTA کانول تزریق ۶۰ ثانیه پس از تزریق دارو از درون کانول راهنما خارج شد. مورفین نیز

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

یک‌بار و به صورت زیر جلدی و ۵ دقیقه پس از گرلین تزریق شد [۱].

جهت بررسی اثر گرلین و مورفین بر حافظه، حیوانات به طور تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند: گروه سالین: در این گروه به هر حیوان بلافاصله پس از آموزش سالین (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت زیر جلدی تزریق شد. گروه‌های مورفین: در این گروه‌ها هر حیوان بلافاصله پس از آموزش مقادیر مختلف مورفین (۷/۵ ، ۵ ، ۲/۵ ، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به صورت زیرجلدی دریافت کردند. گروه‌های گرلین + سالین: در این گروه‌ها به هر حیوان بلافاصله پس از آموزش یکی از مقادیر مختلف گرلین (۳ ، ۱/۵ ،۰/۳ ، ۰ نانو مول بر میکرولیتر) به درون ناحیه VTA تزریق و بعد از ۵ دقیقه سالین (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. گروه‌های گرلین + مورفین: در این گروه‌ها به هر حیوان بلافاصله پس از آموزش یکی از مقادیر مختلف گرلین (۳، ۱/۵، ۰/۳، ۰ نانومول بر میکرولیتر) به درون ناحیه VTA تزریق و بعد از ۵ دقیقه مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. مقادیر گرلین و مورفین بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شد [۱۰، ۱].

بررسی حافظه با استفاده از روش یادگیری اجتنابی غیر فعال با استفاده از دستگاه Step-through (شرکت برج صنعت - تهران) در دو روز متوالی انجام شد. این دستگاه جعبه‌ای از جنس پلکسی گلاس و دارای دو قسمت سفید و سیاه با ابعاد ۳۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر است که توسط یک درب گیوتینی با یکدیگر مرتبط می‌شوند. در کف قسمت سیاه رنگ میله‌های فولادی تعبیه شده که هنگام روشن شدن دستگاه یک جریان الکتریکی (۵۰ هرتز، یک میلی‌آمپر و به مدت ۳ ثانیه) در آنها برقرار می‌شود [۱۷]. در روز اول یا روز آموزش حیوان در درون بخش روشن دستگاه قرار می‌گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز و حیوان وارد قسمت تاریک می‌شد. حیواناتی که بیشتر از ۱۰۰ ثانیه در قسمت روشن می‌ماندند، از ادامه آزمایش حذف می‌شدند [۱۷]. پس از ۳۰ دقیقه مراحل فوق تکرار می‌شد. با این تفاوت که بلافاصله پس از ورود حیوان به بخش تاریک دستگاه، با استفاده از دستگاه استیمولاتور (شرکت برج صنعت - تهران) به حیوان شوک الکتریکی با شدت ۱ میلی‌امپر و مدت زمان ۳ ثانیه و فرکانس ۵۰ هرتز داده می‌شد. پس از ۲۰ ثانیه حیوان از دستگاه خارج شده و پس از گذشت ۲ دقیقه مرحله دوم آموزش بر روی حیوان شوک گرفته انجام می‌شد. چنان‌چه حیوان قبل از ۱۲۰ ثانیه به قسمت تاریک وارد می‌شد، برای بار دوم شوک دریافت می‌کرد، در غیر این صورت آموزش موفق برایش ثبت می‌شد و بلافاصله تزریق درون VTA گرلین و یا تزریق زیرجلدی سالین و یا مورفین انجام می‌شد. حداکثر دفعات آموزش برای هر حیوان سه مرتبه در نظر گرفته می‌شد [۱۷]. ۲۴ ساعت پس از آموزش، حیوانات وارد مرحله آزمون می‌شدند. در این مرحله همانند روز آموزش حیوان در قسمت روشن دستگاه قرار می‌گرفت و

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

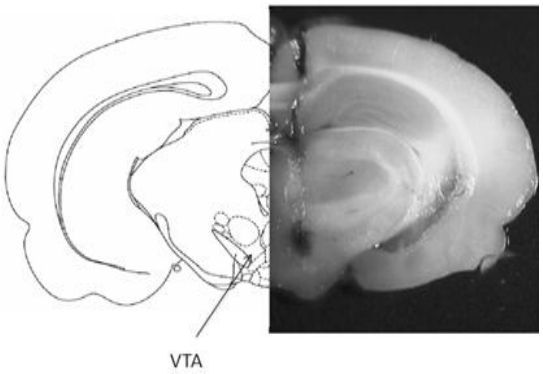
مدت زمان تأخیر ورود به قسمت تاریک Step-Through Latency:(STL) و مدت زمان ماندن در قسمت تاریک (Total Dark Chamber)TDC ثبت می‌شد. بیشترین زمان تأخیر برای ورود به قسمت تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شد [۱۷].

در پایان آزمون رفتاری، به منظور ارزیابی درستی مختصات محل کانول‌گذاری و تزریق دارو، رنگ متیلن بلو به درون ناحیه VTA تزریق شد. سپس مغز حیوانات خارج و به مدت ۱۰ روز در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. تنها داده‌های به دست آمده از حیواناتی که محل کانول‌گذاری آن‌ها صحیح بود (شکل شماره ۱) برای آنالیزهای آماری استفاده شد.

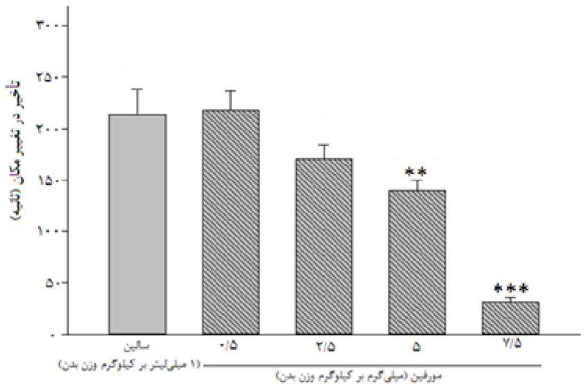
برای تجزیه و تحلیل زمان تأخیر ورود به قسمت تاریک و مدت زمان ماندن در اتاق تاریک به‌عنوان متغیر وابستگی، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. ابتدا به کمک آنالیز مربوطه توزیع نرمال داده‌ها تأیید شد. سپس با توجه به نرمال بودن داده‌ها و این‌که گروه‌های آزمایشی بیشتر از دو گروه بود از آزمون واریانس استفاده شد. جهت تعیین اختلاف بین گروهی از آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. برای تمام محاسبات سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف از میانگین گزارش شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Sigmaplot نسخه ۱۲ انجام شد.

نتایج

شکل (۱) مکان تزریق دارو به درون ناحیه VTA را در مقایسه با موقعیت مکانی ناحیه VTA بر روی اطلس پاکسینوس و واتسون نشان می‌دهد. شکل مذکور نشان می‌دهد که کانول‌گذاری و در نتیجه تزریق دارو به درون ناحیه VTA به درستی انجام شده است.



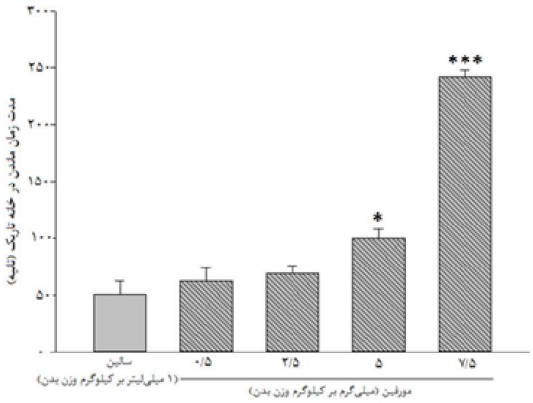
شکل ۱- برش بافتی تهیه شده از ناحیه تگمنتوم شکمی (سمت راست) در مقایسه با موقعیت مکانی این ناحیه بر روی اطلس پاکسینوس و واتسون (سمت چپ).



نمودار ۱- اثر تزریق مقادیر مختلف مورفین پس از آموزش بر تأخیر در ورود به اتاق تاریک (STL) در گروه‌های آزمایشی. هر ستون بیان‌گر میانگین ± انحراف از میانگین مربوط به ۸ سر موش صحرایی نر است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey . $p<۰/۰۵$* و $p<۰/۰۵$ اختلاف معنی‌دار با گروه سالین.***

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های آزمون رفتاری گروه‌های آزمایشی نشان داد که تزریق زیرجلدی مورفین (۷/۵، ۵، ۲/۵ ، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به‌طور وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار زمان ورود به اتاق تاریک (STL) [F(۴و۳۵)=۲۳/۷۸, P<۰/۰۰۱] (نمودار۱) و افزایش معنی‌دار کل مدت زمان توقف در اتاق تاریک [F(۴و۳۵) =۷۱/۲۵۰,P<۰/۰۰۱] (نمودار۲) نسبت به گروه کنترل شده است. این نتایج نشان دهنده کاهش یادگیری در مدل اجتنابی مهاری و القاء فراموشی توسط مورفین است.



نمودار ۲- اثر تزریق مقادیر مختلف مورفین پس از آموزش بر مدت زمان ماندن حیوانات در اتاق تاریک (TDC) در گروه‌های آزمایشی. هر ستون بیان‌گر میانگین ± انحراف از میانگین مربوط به ۸ سر موش صحرایی نر است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. *p<۰/۰۵ و **p<۰/۰۰۱ *** اختلاف معنی‌دار با گروه سالین.

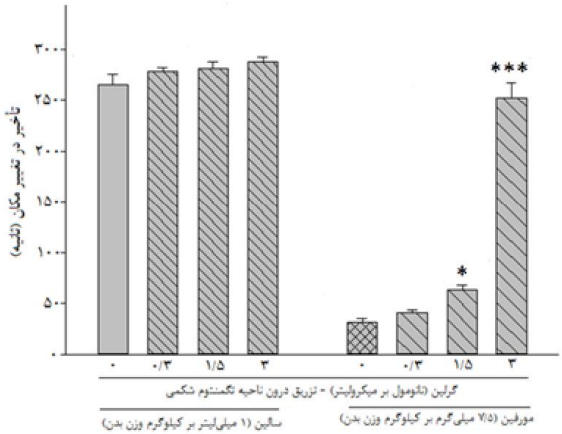
نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های آزمون رفتاری گروه‌های آزمایشی نشان داد تزریق پس از آموزش گرلین (۳، ۱/۵، ۰/۰۳ نانو مول بر میکرولیتر) ۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت وابسته به دوز از تخریب حافظه ناشی از مورفین جلوگیری می‌کند. آزمون مکمل Tukey نشان داد در این گروه‌ها تأخیر در ورود به اتاق تاریک نسبت به گروه کنترل سالین-مورفین به‌طور معنی‌داری افزایش [P<۰/۰۰۱، F(۳و ۲۴) =۱۷۵/۰۶] (نمودار۳) و کل مدت زمان توقف در اتاق تاریک به‌طور معنی‌داری کاهش [۴۵/۵۷۱, P<۰/۰۰۱ = F(۳و ۲۴)] (نمودار۴) می‌یابد.

آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های گرلین- سالین با گروه کنترل سالین-سالین در تأخیر در ورود به اتاق تاریک [F(۳و ۲۴)=۲/۰۴۷، p>۰/۰۵] (نمودار۳) و کل مدت زمان توقف در اتاق تاریک [p>۰/۰۵، F(۳و۲۴)=۲/۶۲۱] (نمودار۴) نشان نداد. این به معنی آن است که گرلین به تنهایی هیچ تأثیر معنی‌داری بر به‌خاطرآوری حافظه ندارد.

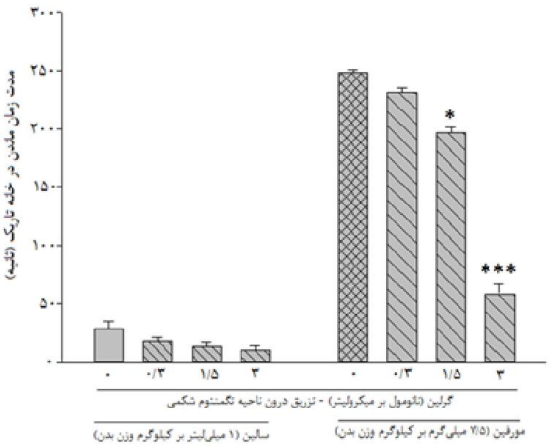
هم‌چنین آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه اختلاف معنی‌داری را بین اثرات گرلین-سالین و گرلین-مورفین بر بازخوانی حافظه نشان داد [F(۱و ۵۶)=۱/۲۵, P<۰/۰۰۱، نوع تیمار]; [F(۳و ۵۶)=۱۹۹/۳۰, P<۰/۰۰۱، مقدار دارو F(۳و ۵۶) =۹۱/۵۳, P<۰/۰۰۱] ، تداخل تیمار × مقدار دارو].

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]



نمودار ۳- اثرات تزریق گرلین پس از آموزش همراه با سالین و یا مورفین بر تأخیر در ورود به اتاق تاریک (STL) در گروه‌های آزمایشی. هر ستون بیان‌گر میانگین ± انحراف از میانگین مربوط به ۸ سر موش صحرایی نر است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. $p<۰/۰۵$ * و $p<۰/۰۰۱$ *** اختلاف معنی‌دار با گروه سالین- مورفین.



نمودار ۴- اثرات تزریق گرلین پس از آموزش به تنهایی یا همراه با مورفین بر مدت زمان ماندن حیوانات در اتاق تاریک (TDC) در گروه‌های آزمایشی. هر ستون بیانگر میانگین ± انحراف از میانگین مربوط به ۸ سر موش صحرایی نر است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. $p<۰/۰۵$ * و $p<۰/۰۰۱$ *** اختلاف معنی‌دار با گروه سالین- مورفین.

بحث

این مطالعه برای نخستین بار به مطالعه اثر تزریق گرلین به درون ناحیه تگمنتوم شکمی بر فراموشی ناشی از مورفین در موش‌های صحرایی نر با استفاده از روش اجتنابی غیر فعال پرداخته است. داده‌های به دست آمده از مطالعه حاضر بیان‌گر آن است که تزریق زیرجلدی مورفین پس از آموزش به‌صورت وابسته به دوز سبب کاهش زمان ورود به اتاق تاریک و افزایش زمان ماندن در این اتاق در روز آزمون می‌شود که نشان دهنده اثر تخریبی مورفین بر حافظه است (فراموشی ناشی از مورفین). بیشترین کاهش حافظه ناشی از مورفین در دوز ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن مشاهده شد و به همین دلیل برای ادامه مطالعه انتخاب شد. تزریق پس از آموزش گرلین به درون ناحیه تگمنتوم شکمی قبل از تزریق دوز مؤثر مورفین از اثر تخریبی مورفین جلوگیری نمود و مانع از بروز فراموشی در روز آزمون گردید.

در تأیید مطالعه حاضر، مشخص شده است که تزریق سیستمیک مورفین سبب اختلال در مراحل مختلف حافظه در روش یادگیری اجتنابی غیر فعال می‌شود [۱۹]. شواهد نشان می‌دهد که نواحی مزوکورتیکولیمبیک مغز مانند ناحیه هیپوکمپ و ناحیه VTA در شکل‌گیری حافظه نقش مهمی دارند [۴- ۳] و مورفین با تغییر فعالیت و ساختار این نواحی سبب فراموشی و نقص حافظه می‌شود [۲]. هم‌چنین نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که مورفین با فعال نمودن گیرنده‌های مو (μ) اوپیوییدی [۱۹] سبب تغییر رهایی

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

نوروترانسمیترهای دخیل در تشکیل حافظه مانند گلوتامات [۲۰]، استیل کولین [۲۱] و دوپامین [۲۲] در نواحی مغزی مرتبط با حافظه و یادگیری می‌گردد. علاوه بر این، مورفین با اثرات اکسیداتیو خود سبب کاهش سیناپس‌های تحریکی در هیپوکمپ می‌شود [۲۳]. کاهش LTP [۲۴] و نوروژنز [۲۵] در هیپوکمپ از دیگر اثرات مخرب مورفین بر روند تشکیل حافظه و یادگیری است.

ارتباط میان گرلین و فعالیت‌های شناختی نخستین بار توسط Carlini و همکارانش با تزریق درون بطنی گرلین و بررسی اثرات آن بر حافظه و یادگیری اجتنابی گزارش شد [۱۰]. پس از آن Heiman و همکارانش نشان دادند که گرلین و گیرنده‌های آن در تشکیل حافظه فضایی در ماز آبی موریس نقش دارند [۲۶]. Diano و همکارانش نیز نشان دادند که گرلین تراکم و تعداد سیناپس‌ها را در هیپوکمپ افزایش می‌دهد [۱۳]. گرلین هم‌چنین رهایی گلوتامات در هیپوکمپ را افزایش داده و باعث فعال شدن مولکول‌های حافظه‌ای مانند CREB (cAMP response element binding protein) می‌شود [۲۷]. مطالعات انجام شده با استفاده از تکنیک تخریب ژن بیان‌کننده گرلین و یا گیرنده‌های آن نشان می‌دهد که گرلین در یادگیری‌های وابسته به هیپوکمپ نقش اساسی و مهمی دارد [۲۶].

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق پس از آموزش گرلین به درون ناحیه VTA، ۵ دقیقه قبل از تزریق زیر جلدی مورفین، به صورت وابسته به مقدار سبب تاخیر در ورود به ناحیه تاریک و کاهش مدت زمان ماندن در خانه تاریک گردید که نشان دهنده مهار فراموشی ناشی از مورفین و بهبود حافظه است. مطالعات قبلی که در آن‌ها اثرات گرلین بر نقص حافظه القایی در مدل‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است، نتایج حاصل از این تحقیق را تأیید می‌کند. در این رابطه Santos و همکارانش نشان دادند که گرلین قادر است اختلال حافظه و تغییرات سیناپسی که به دنبال تزریق پروتئین آمیلوئید بتا ایجاد می‌شود را بهبود بخشد [۲۸]. Moon و همکارانش نیز نشان دادند که گرلین از طریق کاهش مرگ نورونی و مهار تخریب فیبرهای کولینرژیک در ناحیه هیپوکمپ، نقص حافظه ایجاد شده توسط پروتئین آمیلوئید را کاهش می‌دهد [۲۹]. هم‌چنین مشاهده شده است که نقص حافظه ایجاد شده ناشی از بیماری‌های نورودژنراتیو مانند صرع [۳۰] و بیماری‌های متابولیک مانند دیابت [۳۱] نیز توسط گرلین بهبود می‌یابد. به‌علاوه نشان داده شده است که تزریق سیستمیک و حاد آنتاگونیست گیرنده‌های GHS-R1a ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین را که یک نوع الگوی یادگیری است، در موش های سوری [۳۲] و صحرایی کاهش می‌دهد که ناشی از کاهش رهایی دوپامین در هسته اکومبنس توسط آنتاگونیست گیرنده های گرلینی می‌باشد [۳۳].

مطالعات میکرودیالیز و الکتروفیزیولوژیک نشان می‌دهد که در ناحیه VTA، گرلین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده عصبی برای نورون‌های دوپامینی عمل می‌کند [۳۴]. در ناحیه

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

VTA گیرنده‌های گرلین و D1 دوپامینی به‌صورت همزمان بیان می‌شوند و فعال شدن گیرنده‌های GHSR1a در نورون‌هایی که گیرنده‌های GHSR1a و دوپامینی را با هم بیان می‌کنند، سیگنالینگ گیرنده‌های دوپامینی را تقویت کرده و سبب افزایش میزان AMP حلقوی القاء شده توسط گیرنده‌های دوپامینی می‌گردد [۳۴]. تزریق گرلین به درون ناحیه VTA سبب تحریک خروجی‌های دوپامینرژیک [۱۶] و افزایش رهایی دوپامین در نواحی هدف آن مانند هسته اکومبنس می‌شود [۳۵]. از سویی، یک حلقه عملکردی مهم میان ناحیه تگمنتوم شکمی و هیپوکمپ وجود دارد که ورود اطلاعات به حافظه طولانی مدت را تنظیم می‌کند [۳۶]. فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه VTA سبب القاء تقویت طولانی مدت LTP در هیپوکمپ و افزایش تثبیت حافظه می‌گردد [۳۷]. از آنجایی که فعال شدن VTA سبب تقویت حافظه هیپوکمپی می‌شود [۳۷-۳۶] و فعالیت گیرنده‌های دوپامینی اثرات تخریبی مورفین در مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال را مهار می‌کند [۳۹-۳۸]، احتمالاً تزریق گرلین به درون ناحیه VTA از طریق مکانیسم تقویت دوپامینی اثر تخریبی مورفین را مهار می‌نماید. در تأیید این مکانیسم، نشان داده شده است که تزریق آنتاگونیست گیرنده‌های دوپامینی، اثر گرلین بر حافظه جایابی شیء را مهار می‌کند که نشان دهنده نقش مهم دوپامین در میانجی‌گری اثرات شناختی گرلین [۴۰] و تأیید کننده مکانیسم پیشنهادی در تحقیق حاضر است.

گیرنده‌های گرلینی علاوه بر بیان پس‌سیناپسی به‌صورت پیش‌سیناپسی و بر روی پایانه‌های آکسونی ورودی‌های گلوتاماترژیک ناحیه VTA نیز بیان می‌شوند [۱۶]. علاوه بر اثرات مستقیم، گرلین نورون‌های دوپامینی VTA را به صورت غیرمستقیم و با افزایش رهایی پیش‌سیناپسی گلوتامات نیز فعال می‌کند [۱۶]. به‌علاوه، گرلین پلاستیسیته سیناپسی در VTA را تغییر داده و سیناپس‌های تحریکی به سوی نورون‌های دوپامینی را افزایش می‌دهد [۱۶]. از آن‌جایی که تغییرات سیناپسی در شکل‌گیری حافظه و یادگیری نقش مهمی دارند، تأثیر مثبت گرلین بر این روند می‌تواند در اثرات مهاری آن بر فراموشی مورفین نقش داشته باشد.

نتایج حاصل از تزریق گرلین به درون ناحیه VTA به همراه سالین، نشان داد که تزریق پس از آموزش گرلین به درون ناحیه VTA به تنهایی اثری بر یادگیری اجتنابی نداشته است. این در حالی است که مطالعات قبلی نشان داده است که گرلین سبب افزایش حافظه در این روش می‌شود [۱۰]. این تضاد در نتایج احتمالاً به علت تفاوت در روش مطالعه، مقدار و ناحیه تزریق گرلین و نژاد حیوانات مورد مطالعه می‌باشد.

با توجه به اینکه مطالعه حاضر تنها به بررسی رفتاری اثر گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین پرداخته است، عدم بررسی لازم جهت شناخت مکانیسم اثر گرلین در مهار فراموشی ناشی از مورفین از جمله محدودیت‌های مطالعه

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

حاضر می‌باشد. لذا مطالعات مولکولی و میکرودیالیز جهت تعیین دقیق مکانیسم مهار فراموشی ناشی از مورفین توسط گرلین پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج حاضر از تحقیق فوق نشان می‌دهد که گرلین اثرات تخریبی مورفین بر حافظه را در مدل یادگیری اجتنابی مهار می‌کند و ناحیه تگمنتوم شکمی در این بروز این اثر نقش دارد. بنابراین گرلین می‌تواند در درمان اختلالات حافظه‌ای ناشی از مصرف مورفین مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه اراک و در قالب طرح پژوهشی به شماره ۹۷/۴۰ در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست شناسی این دانشگاه انجام شده است، در این خصوص از مسئولین مربوطه تشکر به عمل می‌آید.

References

[1] Rezayof A, Darbandi N, Zarrindast MR. Nicotinic acetylcholine receptors of the ventral tegmental area are involved in mediating morphine-state-dependent learning. *Neurobiol Learn Mem* 2008; 90(1): 255- 60.

[2] Kutlu MG, Gould TJ. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory contributions to development and maintenance of addiction. *Learn Mem* 2016; 23(10): 515-33.

[3] Kim J, Ham S, Hong H, Moon C, Im HI. Brain reward circuits in morphine Addiction. *Mol cells* 2016; 39(9): 645- 53.

[4] Fields HL, Margolis EB. Understanding opioid reward. *Trends Neurosci* 2015; 38(4): 217-25.

[5] 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(1): 100-6.

[6] Ahmadi S, Zarrindast MR, Nouri M, Haeri-Rohani A, Rezayof A. N-Methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area are involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 88(3): 352-8.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

[7] Beheshti S, Aslani N. Local injection of d-lys-3-GHRP-6 in the rat amygdala, dentate gyrus or ventral tegmental area impairs memory consolidation. *Neuropeptides* 2018; 67: 20-26.

[8] Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem* 2012; 51(2): 119-28.

[9] Albarran-Zeckler RG, Sun Y, Roy G. Smith. Physiological roles revealed by ghrelin and ghrelin receptor deficient mice. *Peptides* 2011; 32(11): 2229-35.

[10] Carlini VP, Monzon ME, Varas MM, Cragnolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(5): 739-43.

[11] Kajbaf F, Ahmadi R, Fatemi Tabatabaie R, Safarpoor E. Effect of intrahippocampal ghrelin agonist administration on passive avoidance learning and anxiety in rats. *Pak J Biol Sci* 2012; 15(22): 1063-8.

[12] Toth K, Laszlo K, Lukacs E, Lenard L. Intraamygdaloid microinjection of acylated-ghrelin in fluences passive avoidance learning. *Behav Brain Res* 2009; 202: 308-11.

[13] Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci* 2006; 9(3): 381-8.

[14] Engel JA, Nylander I, Jerlhag E. A ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonist attenuates the rewarding properties of morphine and increases opioid peptide levels in reward areas in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2015; 25(12): 2364-71.

[15] Sustkova-Fiserova M, Jerabek P, Havlickova T, Kacer P,Krsiak M. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. *Psychopharmacology* 2014; 231(14): 2899-908.

[16] Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, et al. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 2006; 116 (12): 3229-39.

[17] Nazari-Serenjeh F, Rezayof A. Cooperative interaction between the basolateral amygdala and ventral tegmental area modulates the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 10(40): 54-61.

[18] Paxinos G, WatsonC. The rat brain in stereotaxic coordinates 6th ed. 2007; San Diego: Elsevier Academic Press. pp. 115-17.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

[19] Zhu W, Pan ZZ. Mu-opioid-mediated inhibition of glutamate synaptic transmission in rat central amygdala neurons. *Neuroscience* 2005; 133(1): 97-103.

[20] Guo M, Xu NJ, Li YT, Yang JY, Wu CF, Pei G. Morphine modulates glutamate release in the hippocampal CA1 area in mice. *Neurosci Lett* 2005; 381(1-2): 12-5.

[21]Taraschenko OD, Rubbinaccio HY, Shulan JM, Glick SD, Maisonneuve IM. Morphine-induced changes in acetylcholine release in the interpeduncular nucleus and relationship to changes in motor behavior in rats. *Neuropharmacology* 2007; 53(1): 18-26.

[22] Kitanaka J, Kitanaka N, Hal FS, Fujii M, Goto A, Kanda Y, et al. Memory impairment and reduced exploratory behavior in mice after administration of systemic morphine. *J Exp Neurosci* 2015; 11(9): 27-35.

[23] Cai Y, Yang L, Hu G, Chen X, Niu F, Yuan L. Regulation of morphine-induced synaptic alterations: Role of oxidative stress, ER stress, and autophagy. *J Cell Biol* 2016; 215(2): 245-58.

[24] Pu L, Bao GB, Xu NJ, Ma L, Pei G. Hippocampal be restored by re-exposure to opiates. *J. Neurosci* 2002; 22(5): 1914-21.

[25] 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(13): 7579-84.

[26] Heiman JU, Davis JF, Tracy AL, Moore RJ, Zigman JM, Clegg D. Mice lacking the ghrelin receptor (GHS-R -/-) exhibit impaired hippocampal-dependent learning. *Appetite* 2007; 49(1); 297-300.

[27] Cuellar JN, Isokawa M. Ghrelin-induced activation of cAMP signal transduction and its negative regulation by endocannabinoids in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2011; 60(6): 842-51.

[28] Santos W, Stark R, Rial D, Silva HB, Bayliss JA, Lemus MB, et al. Acyl ghrelin improves cognition, synaptic plasticity deficits and neuroinflammation following amyloid beta (Abeta1-40) administration in mice. *J Neuroendocrinol* 2017; 29(5).

[29] Moon M, Choi JG, Nam DW, Hong HS, Choi YJ, Oh MS, et al. Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid-β1-42 oligomer-injected mice. *J Alzheimers Dis* 2011; 23(1): 147-59.

[30] Babri S, Amani M, Mohaddes G, Mirzaei F, Mahmoudi F. Effects of intrahippocampal injection of ghrelin on spatial memory in PTZ-induced seizures in male rats. *Neuropeptides* 2013; 47(5): 355-60.

[31] Ma LY, Zhang DM, Tang Y, Lu Y, Zhang Y, Gao Y, et al. Ghrelin-attenuated cognitive dysfunction in

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

the nucleus accumbens. *Addict Biol* 2007; 12(1):6-16.

[36] Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 2005; 46(5): 703-13.

[37] Jay TM. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol* 2003; 69(6): 375-90.

[38] Azizbeigi R, Ahmadi S, Babapour V, Rezayof A, zarrindast MR. Nicotine restores morphine-induced memory deficit through the D1 and D2 dopamine receptor mechanisms in the nucleus accumbens. *J Psychopharmacol* 2011; 25(8): 1126-33.

[39] Castellano C, Cestari V, Cabib S, Puglisi-Allegra S. The effects of morphine on memory consolidation in mice involve both D1 and D2 dopamine receptors. *Behav neural Biol* 1994; 61(2): 156-61.

[40] Jacoby SM, Currie PJ. SKF 83566 attenuates the effects of ghrelin on performance in the object location memory task. *Neurosci Lett* 2011; 504(3): 316- 20.

streptozotocin-induced diabeticrats. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2011; 25(4): 352-63.

[32] Wellman PJ, Clifford PS, Rodriguez AJ. Ghrelin and ghrelin receptor modulation of psychostimulant action. *Front Neurosci* 2013; 25: 7-171.

[33] Jerabek P, Havlickova T, Puskina N, Charalambous C, Lapka M, Kacer P, et al. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats. *Neurochem Int* 2017; 110: 101-13.

[34] Jiang H, Betancourt L, Smith RG. Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol* 2006; 20 (8): 1772-85.

[35] Jerlhag E, Egecioglu E, L. Dickson S, Douhan A, Svensson L, Engel JA. Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]

The Effect of Intra-ventral Tegmental Area Injection of Ghrelin on Morphine-Induced Amnesia in Male Rats: An Experimental Study

F. Nazari-serenjeh[1], N. Darbandi[2], A. Yadegary[3], H. R. Momeni[4]

Received: 29/09/2018 Sent for Revision: 05/11/2018 Received Revised Manuscript: 19/12/2018 Accepted: 02/01/2019

Background and Objectives: Extensive evidence shows that morphine impairs cognitive functions. On the other hand, ghrelin is a gastrointestinal hormone that affects learning and memory process. The purpose of the current study was to evaluate the effect of intra-ventral tegmental area (VTA) injection of ghrelin on morphine-induced amnesia in male rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 104 male Wistar rats (220-250 g) were randomly divided into 13 groups (n=8 for all groups) including: saline, morphine treated groups (0.5-7.5 mg/kg), ghrelin treatd groups (0-3 nmol/µl) plus morphine (7.5 mg/kg) or saline. Memory was measured in a step-through type inhibitory avoidance apparatus. All groups received intra-ventral tegmental area (intra-VTA) injection of saline or ghrelin immediately after training. After 5 mins saline or morphine was injected subcutaneously. Testing phase was done 24 hrs after training. Data were analyzed using one-way and two-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison test.

Results: The results showed that post-training administration of morphine significantly reduced step-through latency compared with the saline group ($p<0.001$). Intra-VTA injection of ghrelin also reduced morphine-induced amnesia (7.5 mg/kg) ($p< 0.001$). Ghrelin plus saline administration had no significant effect on memory retrieval ($p>0.05$).

Conclusion: The results indicate that intra-VTA injction of ghrelin prevents the disrupting effects of morphine on avoidance memory.

Key words: Ghrelin, Inhibitory avoidance learning, Male rat, Morphine, Ventral tegmentum area

Funding: This study was funded by University of Arak.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences approved the study. (1397.139).

How to cite this article: Nazari-serenjeh F, Darbandi N, Yadegary A, Momeni HR. The Effect of Intra-ventral Tegmental Area Injection of Ghrelin on Morphine-Induced Amnesia in Male Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18 (2): 147-60. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Biology, Payam-e-Noor University (PNU), Tehran, Iran, ORCID: 0000-0001-7278-3655
2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran, ORCID: 0000-0001-8886-8745
(Corresponding Author): Tel: (086) 32627224, Fax: (086) 32627543, E-mail: N-Darbandi@araku.ac.ir
3- MSc Student of Animal Physiology, Dept. of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran, ORCID: 0000-0001-8593-386X
4- Associate Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran, ORCID: 0000-0002-1361-5771

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1398.18.2.6.4]