

مقاله پژوهشی

سیناپس های الکتریکی شكنج دندانهای یادگیری وابسته به وضعیت مورفین را تغییر نمی دهند

مریم السادات صدیقی پور، سیامک بهشتی*

گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

پذیرش: ۳ شهریور ۱۴۰۰

دریافت: ۱۶ مرداد ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف: مورفین برخی از اثرات خود را از طریق اتصالات منفذدار انجام می دهد. در این مطالعه، اثر بسته شدن سیناپس های الکتریکی شكنج دندانهای بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین بررسی شد.

روش ها: موش های بزرگ آزمایشگاهی (Rat) نر با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شدند. روش یادگیری اجتنابی غیرفعال برای ارزیابی حافظه استفاده شد. توسط جراحی استرئوتاکسی دو کانول تزریق در شكنج دندانهای کار گذاشته شد. در آزمایشی حیوانات پس از آموزش، دوزهای مختلف مورفین را دریافت کردند و ۲۴ ساعت بعد بازخوانی حافظه ارزیابی شد. در آزمایش دیگر حیوانات پس از آموزش، مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) را دریافت کردند. یک روز بعد، ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دوزهای مختلف مورفین تزریق شد. در آزمایش دیگر در روز آزمون، حیوانات کینین (۱۰۰ میکرومول، ۱ میلی مول و ۱۰ میلی مول) را در شكنج دندانهای دریافت کرده و ۴۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند. در آخرین آزمایش به حیوانات پس از آموزش، مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق شد. سپس در روز آزمون، دوزهای مختلف کینین در شكنج دندانهای و ۱۰ دقیقه بعد مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق شد.

یافته ها: تزریق مورفین پس از آموزش به صورت وابسته به دوز بازخوانی حافظه را تخریب کرد. همچنین مورفین حافظه وابسته به وضعیت ایجاد کرد. بسته شدن سیناپس های الکتریکی در شكنج دندانهای از ایجاد حافظه وابسته به وضعیت مورفین جلوگیری نکرد.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که بسته شدن سیناپس های الکتریکی ناحیه شكنج دندانهای در بازخوانی حافظه القاشده توسط مورفین در روز آزمون تأثیری ندارد.

واژه های کلیدی: سیناپس الکتریکی، شكنج دندانهای، مورفین، یادگیری وابسته به وضعیت

مقدمه

وضعیت مورفین^۱ نام دارد [۴]. این نوع یادگیری نشان می دهد که اطلاعاتی که تحت تأثیر دارویی خاص آموخته شده است تنها زمانی فراخوانده می شود که حیوان تحت تأثیر همان دارو قرار بگیرد. علیرغم اینکه اثرات مورفین بر فرآیند یادگیری و حافظه سال هاست که مشخص شده است اما در مورد مکانیسم اثر مورفین در این فرآیند و چگونگی ایجاد اثرات متناقض فوق اطلاعات زیادی وجود ندارد.

مطالعات متعدد نقش احتمالی سیستم های نوروترانسمیتری مختلف را بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین بررسی

مطالعات نشان داده اند که مورفین و سایر اپیوئیدها در فرآیندهای یادگیری و حافظه دخالت دارند [۱]. مورفین موجب القاء فراموشی در مدل های مختلف حافظه می شود [۲]. نشان داده شده است که تزریق مورفین پیش یا پس از آموزش به طور وابسته به دوز و زمان منجر به بروز اختلال در حافظه در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال می گردد [۳]. باوجود آنکه تزریق پس از آموزش مورفین موجب کاهش به یادآوری حافظه و القاء فراموشی می شود، تزریق مجدد مورفین پیش از آزمون به خاطر آوری حافظه را تسهیل می نماید. این فرآیند یادگیری وابسته به

¹ Morphine state-dependent learning (SDL)

اصفهان پرورش یافتند استفاده شد. حیوانات به صورت چهارتایی در دمای محیطی ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری و با غذای آماده تولیدی شرکت بهرپور تغذیه شدند. در هر گروه آزمایش ۶ تا ۸ سر موش مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌ها در زمان مشخصی از روز (بین ۱۴-۸) انجام گرفت و حیوانات پس از جراحی به صورت انفرادی در قفس نگهداری می‌شدند و هر حیوان تنها یک بار مورد آزمایش قرار گرفت. برای حفظ و نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی از راهنماهای موسسه ملی سلامت استفاده شده است.

جراحی استرئوتاکس و کاشت کانول در ناحیه‌ی شکنج دندانهای

به منظور تزریق داروها در شکنج دندانهای نیاز به کاشت کانول در این ناحیه است، بنابراین حیوانات طبق پروتکل زیر تحت جراحی استرئوتاکس قرار گرفتند. جهت بیهوشی از مخلوطی از کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم) که به صورت داخل صفاقی^۵ تزریق می‌شدند استفاده گردید. بعد از بی‌هوشی کامل، موهای سر حیوان تراشیده شد. درحالی که میله افقی ۳/۳ میلی متر زیر صفر افقی قرار داشت، با تنظیم میله‌های گوشی و میله نگه‌دارنده دندان‌های پیشین، سر حیوان در سطح افقی تنظیم و ثابت شد. ناحیه تراشیده شده با الکل و بتادین ضدعفونی شد. به وسیله تیغ جراحی پوست روی جمجمه را از ناحیه بین دو چشم تا ابتدای استخوان پس سری شکاف داده و بافت‌های زیر پوست برداشته شد و سپس روی استخوان با پنبه پاک شده تا محل برگما مشخص شود. مطابق با اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات شکنج دندانهای بدین صورت به دست آمد: مختصات قدامی-خلفی ۳/۸- میلی متر، مختصات جانبی ۲/۴ میلی متر و مختصات پشتی-شکمی ۳ میلی متر. با استفاده از مته دستی یک سوراخ ایجاد گردید. سپس با استفاده از یک سوزن استریل به آرامی منتهای سوراخ گردید تا مانعی برای ورود کانول وجود نداشته باشد، سپس مطابق مختصات جلویی عقبی و میانی جانبی به سطح سوراخ ایجاد شده راهنما گردید و از سطح جمجمه به آرامی به طول ۲ میلی متر پایین برده شد (یک میلی متر بالاتر از نقطه‌ی موردنظر که این یک میلی متر هنگام تزریق به وسیله‌ی

کرده‌اند. علیرغم تمام این مطالعات، مکانیسم دقیق یادگیری وابسته به وضعیت به‌خوبی شناخته نشده است. مشخص شده است که علاوه بر سیستم‌های نوروترانسمیتری مربوط به سیناپس‌های شیمیایی ارتباط بین سلولی از طریق اتصالات منفذدار مغز نیز در فرآیند یادگیری و حافظه دخالت دارد [۵]. این اتصالات در نواحی مختلف مغز مابین انواع سلول‌های مغزی وجود دارند. مطالعات نشان داده‌اند که نورون‌ها بیشترین ارتباط خود را از طریق اتصالات منفذدار با نورون‌های دیگر برقرار می‌کنند و نه با سلول‌های گلیا. با این وجود نشان داده شده است که برخی از انواع اتصالات منفذدار مابین نورون‌ها و آستروسیت‌ها نیز در اعمال شناختی مغز دارای اهمیت هستند. اتصالات منفذدار بین نورون‌ها را سیناپس الکتریکی می‌نامند [۶].

نشان داده شده است که نورون‌های نواحی مختلف مغز توسط سیناپس‌های الکتریکی که عمدتاً اتصالات منفذدار^۲ تشکیل شده از کانکسین (Cx) ۳۶ بین نورون‌ها هستند، با یکدیگر ارتباط دارند [۷]. از طرفی مطالعات اخیر نشان می‌دهند که اتصالات منفذدار مغز در واسطه‌گری برخی از اثرات مورفین دخالت دارند. برای مثال سوزوکی و همکارانش نشان دادند که اتصالات منفذدار نخاع موش در اثرات ضد دردی مورفین دخالت دارند به طوری که بسته شدن آن‌ها موجب کاهش معنی‌دار اثرات فوق می‌شود [۸]. همچنین بسته شدن اتصالات منفذدار در ناحیه CA₁ هیپوکمپ موجب از بین رفتن یادگیری وابسته به وضعیت مورفین شد [۹]. با توجه به اینکه نواحی مختلف مغز از جمله شکنج دندانهای و آمیگدال در فرآیند بازخوانی حافظه توسط مورفین در موش‌ها دخالت دارند و از طرفی اتصالات منفذدار در اثرات مورفین دخیل هستند، هدف مطالعه حاضر بررسی اثر بسته شدن سیناپس‌های الکتریکی ناحیه شکنج دندانهای بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی^۴ نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم که در حیوان خانه دانشگاه

² Gap junction

³ Connexin

⁴ Rat

⁵ Intraperitoneal

آزمایش‌های رفتاری انجام‌شده در گروه‌های آزمایش الف- بررسی اثر مورفین بر ایجاد فراموشی

در این آزمایش گروه‌های مختلف بلافاصله پس از آموزش به ترتیب سالین (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم) و یا دوزهای مختلف مورفین (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) را به صورت زیر پوستی دریافت کردند و ۲۴ ساعت بعد بازخوانی حافظه ارزیابی شد.

ب- بررسی اثر مورفین در به خاطر آوری حافظه

در این آزمایش همه گروه‌ها بلافاصله پس از آموزش، مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) را به صورت زیر پوستی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد (در روز آزمون) ۳۰ دقیقه قبل از آزمون به گروه‌های مختلف دوزهای مختلف مورفین (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر پوستی تزریق شد.

ج- بررسی اثر تزریق کینین (مهارکننده اتصالات منفذدار تشکیل‌شده از کانکسین ۳۶) در ناحیه شکنج دندانهای بر به خاطر آوری حافظه

در این آزمایش در روز آزمون ابتدا حیوانات دوزهای مختلف کینین (۱۰۰ میکرومول، ۱ میلی مول و ۱۰ میلی مول) را به صورت داخل شکنج دندانهای (دوطرفه) دریافت کرده و ۴۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند.

د- بررسی اثر تزریق کینین (مهارکننده اتصالات منفذدار تشکیل‌شده از کانکسین ۳۶) در ناحیه شکنج دندانهای همراه با مورفین بر به خاطر آوری حافظه

در این آزمایش به کلیه حیوانات پس از آموزش مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر پوستی تزریق شد. گروه کنترل در روز آزمون ابتدا سالین (۱ میکرولیتر به ازای هر موش) به صورت درون شکنج دندانهای (دوطرفه) و ۱۰ دقیقه بعد مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر پوستی دریافت کردند. سایر گروه‌ها در روز آزمون ابتدا دوزهای مختلف کینین (۱۰۰ میکرومول، ۱ میلی مول و ۱۰ میلی مول) را به صورت داخل شکنج دندانهای و ۱۰ دقیقه بعد مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) را به صورت زیر پوستی دریافت

سرنگ تزریق جبران می‌شد). مقداری پودر داکسی سایکلین در سطح مجسمه اطراف کانول ریخته شد تا از عفونت احتمالی جلوگیری شود. کانول راهنما و پیچ‌های عینک به وسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح مجسمه ثابت شد. پیچ‌ها و تمام سطح مجسمه با سیمان پوشانده شد. به حیوان سالین (۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم) گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و استریل تزریق شد تا از بازیابی آب اطمینان حاصل شود. یک درپوش استریل^۶ برای جلوگیری از آلودگی داخل هر کانول قرار داده شد. بعد از اتمام جراحی، حیوان از دستگاه استروئیتاکس خارج شد و جهت بهبود و از بین رفتن استرس جراحی، یک هفته به موش‌ها استراحت داده شد و بعد از طی این مدت مورد آزمایش قرار گرفتند.

چگونگی تزریق داروها و حلال آن‌ها در ناحیه شکنج دندانهای

به منظور تزریق دارو در ناحیه شکنج دندانهای هیپوکمپ یک سر لوله پلی اتیلنی به سرسوزن شماره ۲۷ و سر دیگر آن به سرنگ هامیلتون ۲ میکرو لیتری متصل می‌گردید. قبل از پر کردن با دارو ابتدا توسط اتانول داخل لوله و سرسوزن به طور کامل ضد عفونی شده و سپس توسط آب مقطر دو بار تقطیر شده از اتانول پاک می‌شد. داخل لوله از آب مقطر دو بار تقطیر پر می‌شد به نحوی که فقط ۲ سانتی متر از انتهای متصل به سرسوزن شماره ۲۷ خالی باقی بماند. این کار برای انتقال فشار اعمال شده توسط پیستون سرنگ هامیلتون ضروری است زیرا مایع قابلیت متراکم شدن ندارد و فشار وارده را منتقل می‌کند. سپس لوله از دارو یا حلال آن پر می‌شد و آنگاه سرسوزن شماره ۲۷ پس از برداشتن پوشش کانول راهنما سمت راست، در داخل آن قرار داده شده و ماده مورد نظر با سرعت تقریبی ۰/۵ میکرو لیتر در یک دقیقه به حیوان تزریق شد. کانول تزریق یک دقیقه پس از اتمام تزریق در محل باقی ماند تا مایع به طور کامل به فضاهای بافتی نفوذ کند سپس به آرامی خارج گردید. سپس سرسوزن تزریق وارد کانول راهنمای سمت چپ گردید و مطابق مرحله قبل تزریق انجام شد و برای تزریق به حیوانات دیگر قبل از هر تزریق سرسوزن تزریق با الکل ۷۰ درصد به خوبی ضد عفونی شد.

⁶ Stylet

روش‌های آماری مورد استفاده

تحلیل نتایج حاصل از آزمایش‌های رفتاری در بین گروه‌های مختلف با استفاده از روش آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه^{۱۰} صورت گرفت و سپس برای بررسی جفت گروه‌ها از آزمون متعاقب توکی-کرامر^{۱۱} استفاده شد. در نهایت داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار برای هر گروه نشان داده شدند. در تمام موارد $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن محاسبه گردید. برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار گراف پد پریزم^{۱۲} استفاده شد.

یافته‌ها

تحلیل بافت‌شناسی

پس از اتمام آزمایش حیوانات با کلروفرم به صورت استنشاقی کشته شدند و مغز آن‌ها خارج و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد. در نهایت مغزها برش داده شده و محل کانول‌ها بررسی شد (شکل ۱).

اثر تزریق پس از آموزش مورفین بر بازخوانی حافظه

تزریق پس از آموزش مورفین به طور معنی‌داری باعث کاهش مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاقک تاریک، افزایش تعداد دفعات ورود به اتاقک تاریک و افزایش مدت زمان سپری‌شده در اتاقک تاریک شد (نمودار ۱). داده‌های دوز- پاسخ نشان دادند که مورفین پارامترهای حافظه را به صورت وابسته به دوز تحت تأثیر قرار می‌دهد.

تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق پس از آموزش مورفین تأثیر معنی‌داری بر کاهش مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاقک تاریک دارد ($F_{3,4} = 23/13, p < 0.0001$). آزمون متعاقب توکی-کرامر نشان داد که مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاقک تاریک در گروه دریافت‌کننده دوز ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد ($p < 0.0001$).

کردند. کلیه گروه‌ها ۳۰ دقیقه پس از آخرین تزریق مورد آزمون قرار گرفتند.

روش یادگیری اجتنابی غیرفعال

در این روش یادگیری، حیوان یاد می‌گیرد که برای دوری از شوک الکتریکی به کف پا تمایل ذاتی خود در رفتن به اتاقک تاریک را سرکوب نماید. این آزمون در دو روز انجام می‌گیرد: روز آموزش^۷ و روز آزمون^۸.

الف- روز آموزش

نیم ساعت قبل از شروع آزمون حیوانات در اتاق آزمایش قرار گرفتند تا به شرایط اتاق عادت کنند. هر حیوان در اتاقک روشن دستگاه قرار داده شد، پس از گذشت ۵ ثانیه در کشویی باز شد و بلافاصله بعد از ورود حیوان به اتاقک تاریک در کشویی بسته شد و بعد از ۲۰ ثانیه حیوان به آرامی به قفس برگردانده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه حیوان دوباره به اتاقک روشن منتقل شده و در کشویی باز شد. با ورود حیوان به بخش تاریک، در کشویی بسته شده و حیوان تحریک الکتریکی به شدت ۱/۲ میلی آمپر و مدت ۳ ثانیه دریافت کرد. ۲۰ ثانیه بعد حیوان به قفس منتقل شد. پس از گذشت ۲ دقیقه مرحله دوم آموزش تکرار شد و مدت زمان تأخیر حیوان برای ورود به اتاقک تاریک^۹ دستگاه ثبت گردید. زمان یادگیری موفق^{۱۲۰} ثانیه در نظر گرفته شد. حداکثر آموزش برای هر موش جهت مشخص کردن میزان عملکرد دستگاه و موش‌ها سه بار در نظر گرفته شد و نتایج آماری در صورتی مورد بررسی قرار گرفتند که بین تعداد آموزش‌ها در روز آموزش هیچ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

ب- روز آزمون

در این روز حیوان ابتدا در اتاقک روشن پشت به درب گیوتین قرار داده شد و ۲۰ ثانیه بعد درب گیوتین بازگردید و مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاقک تاریک، تعداد ورود به اتاقک تاریک و مدت زمان توقف در اتاقک تاریک برحسب ثانیه ثبت گردید. کلیه حیوانات تا ۶۰۰ ثانیه مانیتور می‌شدند و پس از این زمان به قفس خود بازگردانده می‌شدند.

¹⁰ One-Way ANOVA

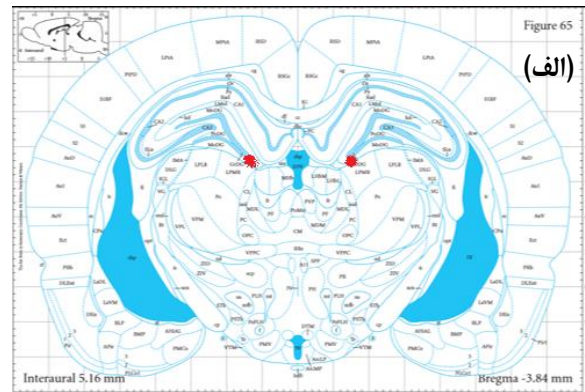
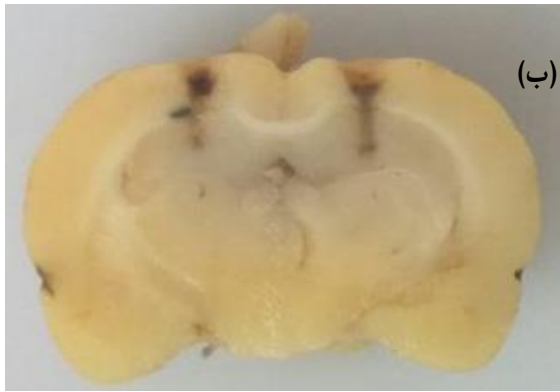
¹¹ Tukey-Kramer

¹² Graph Pad Prism

⁷ Training day

⁸ Test day

⁹ Step- through latency



شکل ۱- برش کرونال مغز موش بزرگ آزمایشگاهی در موقعیت ۳/۸۴- از برگما (الف) تصویر شماتیک برش کرونال بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (ب) نمونه برش کرونال مغز موش بزرگ آزمایشگاهی در موقعیت شکنج دندانهای.

اثر تزریق پیش از آزمون کینین (مسدودکننده اتصالات منفذدار) در ناحیه شکنج دندانهای بر بازخوانی حافظه

تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق پیش از آزمون کینین در ناحیه شکنج دندانهای به تنهایی اثر معنی داری بر مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاقک تاریک ($F_{2,13} = 1/88$)، تعداد دفعات ورود به اتاقک تاریک ($F_{2,13} = 0/65$) و مدت زمان سپری شده در اتاقک تاریک نداشت ($F_{2,13} = 0/59$) (داده ها نشان داده نشده است).

اثر تزریق پیش از آزمون کینین (مسدودکننده اتصالات منفذدار) در ناحیه شکنج دندانهای بر حافظه وابسته به وضعیت مورفین

تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق کینین در ناحیه شکنج دندانهای اثر معنی داری بر مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاقک تاریک ($F_{2,13} = 1/35$)، تعداد دفعات ورود به اتاقک تاریک ($F_{2,13} = 0/85$) و مدت زمان توقف شده در اتاقک تاریک ($F_{2,13} = 0/78$) در حیوانات دریافت کننده پس از آموزش و پیش از آزمون مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) ندارد (نمودار ۳).

بحث

مطالعات متعدد مشخص کرده اند که یادگیری و حافظه به وسیله اپیوئیدها و آنتاگونیستهای آنها تحت تأثیر قرار

تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تعداد ورود به اتاقک تاریک نیز به صورت معنی داری افزایش می یابد ($p < 0/05$)، $F_{2,13} = 4/78$). آزمون متعاقب توکی-کرامر نشان داد که تعداد ورود به اتاقک تاریک با تزریق مورفین در گروه دریافت کننده دوز ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد ($p < 0/05$). تحلیل واریانس یک طرفه همچنین نشان داد که مدت زمان توقف در اتاقک تاریک در گروه های دریافت کننده مورفین به صورت معنی داری افزایش می یابد ($p < 0/01$)، $F_{2,13} = 4/41$). آزمون متعاقب توکی-کرامر نشان داد که مدت زمان توقف در اتاقک تاریک در گروه های دریافت کننده دوز (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد ($p < 0/05$).

اثر تزریق پس از آموزش و پیش از آزمون مورفین بر بازخوانی حافظه

تزریق پیش از آزمون مورفین (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم؛ زیر پوستی)، اثر تزریق پس از آموزش مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) را بر تخریب حافظه از بین برد (نمودار ۲). تحلیل واریانس یک طرفه همراه با آزمون متعاقب توکی نشان داد تزریق پس از آموزش و پیش از آزمون مورفین به ترتیب باعث افزایش و کاهش معنی دار و وابسته به دوز مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاقک تاریک ($p < 0/05$) $F_{2,13} = 2/91$ و مدت زمان توقف در اتاقک تاریک شد ($p < 0/05$) $F_{2,13} = 3/82$.

می گیرند [۴]. نشان داده شده است که مورفین می تواند بر اکتساب اطلاعات جدید و نیز نگهداری اطلاعات آموخته شده تأثیر قابل توجهی داشته باشد، به نحوی که یادگیری و حافظه را تسهیل و یا برعکس تخریب کند. این اثر دوگانه مورفین به این بستگی دارد که تیمار مورفین در کدامیک از مراحل چندگانه یادگیری و حافظه صورت می گیرد [۱۰].

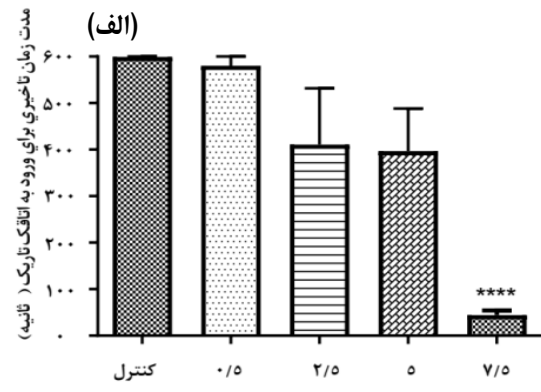
نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق زیر جلدی مورفین بلافاصله پس از آموزش به صورت وابسته به دوز بازخوانی حافظه را در روز آزمون مهار می کند. در این ارتباط مشخص شده است که تزریق مورفین پیش از آموزش، پس از آموزش و نیز پیش از آزمون بازخوانی حافظه را در روش یادگیری اجتنابی غیرفعال مهار می کند [۳].

نتایج ما همچنین نشان داد که تزریق پیش از آزمون مورفین باعث بازخوانی حافظه تخریب شده تحت تأثیر تزریق پس از آموزش مورفین و القاء حافظه وابسته به وضعیت مورفین گردید. در این ارتباط مطالعات متعدد نشان داده اند که مورفین یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد می کند [۱۱].

برای شناخت مکانیسم دقیق یادگیری وابسته به وضعیت مورفین لازم است نقش نواحی از مغز که در این پدیده دخالت دارند مشخص شود. یکی از نواحی هیپوکمپ که در تشکیل حافظه در روش یادگیری اجتنابی غیرفعال اهمیت دارد شکنج دندانه ای است.

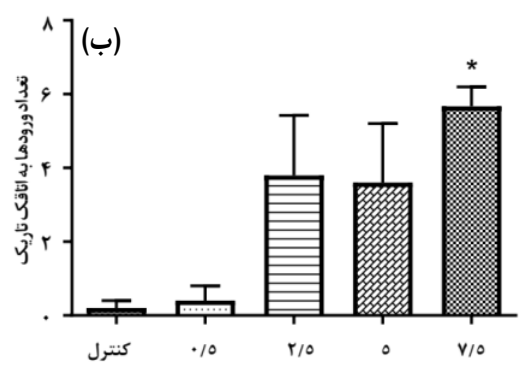
در سال های اخیر مشخص شده است که مورفین برخی از اثرات خود را در دستگاه عصبی مرکزی از طریق تأثیر احتمالی بر باز و بسته شدن اتصالات منفذدار مغز انجام می دهد. برای مثال تزریق داخل نخاعی کاربنوکسولون، مسدودکننده اتصالات منفذدار اثر ضد دردی مورفین را در آزمون صفحه داغ کاهش داد [۱۲]. همچنین تزریق داخل صفاقی کاربنوکسولون اثر ضد درد مورفین را در آزمون فرمالین افزایش داد [۱۳]. از طرفی تزریق پیش از آزمون کاربنوکسولون در ناحیه CA_1 هیپوکمپ همراه با تزریق زیر جلدی مورفین در گروه هایی که پس از آموزش مورفین دریافت کرده بودند به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش معنی دار یادگیری وابسته به وضعیت مورفین شد [۹].

اتصالات منفذدار نورونی در لایه پلی مورف شکنج دندانه ای موش وجود دارد [۱۴]. اتصالات منفذدار آکسواکسونیک در سلول های دانه دار شکنج دندانه ای نیز مشاهده شده است. این



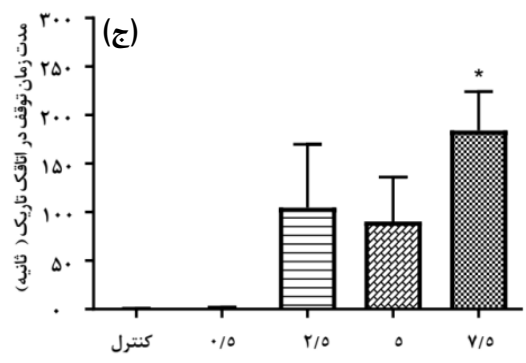
مورفین (میلی گرم بر کیلوگرم؛ زیر پوستی) سالین (زیر پوستی)

پس از آموزش



مورفین (میلی گرم بر کیلوگرم؛ زیر پوستی) سالین (زیر پوستی)

پس از آموزش



مورفین (میلی گرم بر کیلوگرم؛ زیر پوستی) سالین (زیر پوستی)

پس از آموزش

نمودار ۱- اثر تزریق مورفین (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم؛ زیر پوستی) بلافاصله پس از آموزش بر (الف) مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاقک تاریک (ب) تعداد دفعات ورود حیوان به اتاقک تاریک و (ج) مدت زمان توقف حیوان در اتاقک تاریک در روز آزمون. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده اند. آزمون آماری استفاده شده تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون متعاقب توکی-کرامر می باشد. * تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل با $p < 0.05$ ؛ **: تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل با $p < 0.0001$.**

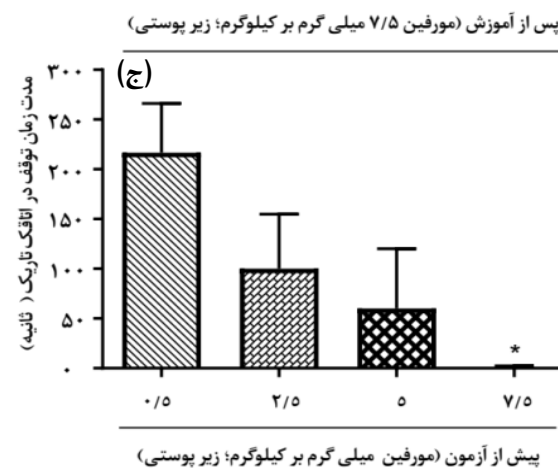
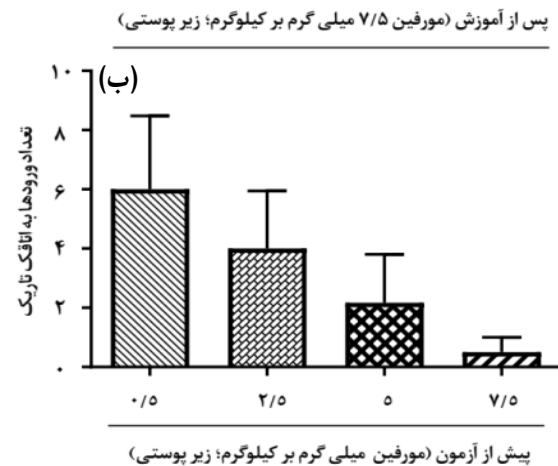
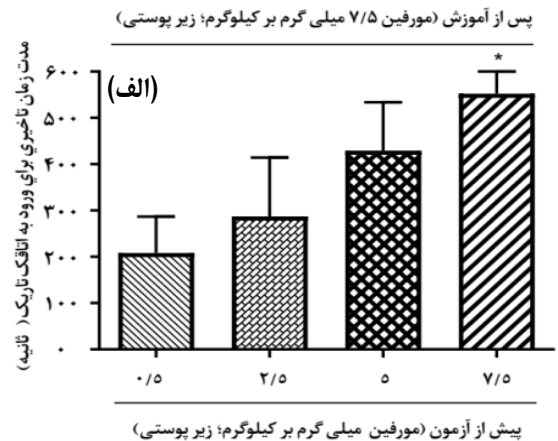
اتصالات منفذدار در تولید نوسانات بسیار سریع (بالای ۷۰ هرتز) دخالت دارند [۱۵]. مشخص شده است که گیرنده‌های مورفین نیز در ناحیه شکنج دندانه‌ای به میزان زیاد بیان می‌شوند. گیرنده‌های مو و دلتای مورفین به‌طور ترجیحی در زیر جمعیت‌های مشخصی از نورون‌های رابط گاباآرژیک که مشخص شده سلول‌های دانه‌دار را مهار می‌کنند قرار دارند و در سلول‌های دانه‌دار به مقدار کمی وجود دارند [۱۶].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بسته شدن سیناپس‌های الکتریکی شکنج دندانه‌ای توسط تزریق پیش از آزمون کینین همراه با تزریق زیر جلدی مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) در گروه‌هایی که مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) را پس از آموزش دریافت کرده بودند تأثیر معنی‌داری در یادگیری وابسته به وضعیت مورفین ندارد.

نشان داده شده است که بازخوانی حافظه همراه مورفین در روش ترجیح مکانی شرطی شده همراه با فعال شدن نورون‌های دانه‌دار شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ است [۱۷]. همچنین پیشنهاد شده است که شکنج دندانه‌ای در کد گذاری و بازخوانی حافظه فضایی می‌تواند دخالت داشته باشد [۱۸]. از این رو این امکان وجود دارد که شکنج دندانه‌ای در یادگیری وابسته به وضعیت مورفین نیز دخالت داشته باشد.

مدل‌های عملکرد هیپوکمپ پیشنهاد می‌کند که اطلاعات حسی که از طریق سلول‌های دانه‌دار شکنج دندانه‌ای از قشر انتورینال به هیپوکمپ می‌رسند در مدارهای ناحیه CA_3 کدگذاری می‌شوند و می‌توانند از طریق مسیر شافر جانبی که نواحی CA_1 و CA_3 را به هم متصل می‌کنند بازخوانی شوند.

در دستگاه عصبی مرکزی اثرات اصلی مورفین از طریق گیرنده‌های مو اپیوئیدی اعمال می‌شود [۱۹]. همان‌گونه که ذکر شد این گیرنده‌ها در شکنج دندانه‌ای به‌وفور بیان می‌شوند. اثر اولیه فعال شدن گیرنده مو تقویت تحریک‌پذیری سلول‌های اصلی در قشر باستانی از طریق یک مکانیسم رفع مهار است. در این ارتباط نشان داده شده است که آگونیست‌های گیرنده‌های مو و دلتا در لایه مولکولی شکنج دندانه‌ای تحریک‌پذیری را افزایش می‌دهند و فرآیند LTP را تسهیل می‌کنند [۲۰]. همچنین یک دوز واحد از مورفین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) باعث افزایش دامنه اسپایک‌های جمعیتی در شکنج دندانه‌ای می‌شود. گزارش شده است که مورفین با مهار انتقال گاباآرژیک باعث افزایش انتقال سیناپسی تحریکی در ناحیه شکنج دندانه‌ای



نمودار ۲- اثر تزریق مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم؛ زیر پوستی) پس از آموزش و پیش از آزمون (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم؛ زیر پوستی) بر (الف) مدت زمان تأخیری برای ورود به اتاق تاریک (ب) تعداد دفعات ورود حیوان به اتاق تاریک و (ج) مدت زمان توقف حیوان در اتاق تاریک در روز آزمون. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند. آزمون آماری استفاده شده تحلیل واریانس یک‌طرفه می‌باشد. *: تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه دریافت کننده پیش از آزمون مورفین (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) با $p < 0.05$.

هیپوکمپ می‌شود [۲۱] همچنین گزارش شده است که LTP مسیر پرفورانت جانبی به سلول‌های شکنج دندان‌های به‌وسیله نالوکسون (آنتاگونیست گیرنده مو) مهار می‌شود. مشخص شده که مسدود کردن گیرنده‌های GABA_A، اثر نالوکسون را در مهار LTP از بین می‌برد که نشان می‌دهد اپیوئیدهای اندوژن با کاهش مهار ناشی از GABA_A، LTP را افزایش می‌دهند [۲۲]. در عین حال گزارش شده است که انتقال گابارژیک در شکنج دندان‌های در مرحله بازخوانی حافظه در روش یادگیری اجتنابی غیرفعال نقشی ندارد [۲۳]. اپیوئیدهای انتخابی گیرنده‌های مو و دلتا به‌طور مستقیم سلول‌های دانه‌دار شکنج دندان‌های را هیپرپلاریزه می‌کنند [۲۴]. به نظر می‌رسد بازخوانی حافظه در روز آزمون تحت تأثیر مورفین، از طریق تأثیر احتمالی مورفین در شکنج دندان‌های نباشد و نواحی دیگر مغزی از جمله CA₁ یا CA₃ هیپوکمپ و یا آمیگدال در این مسئله نقش داشته باشند که نیازمند مطالعات تکمیلی است.

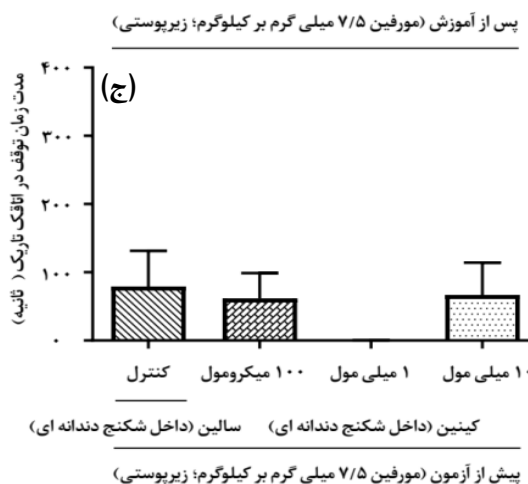
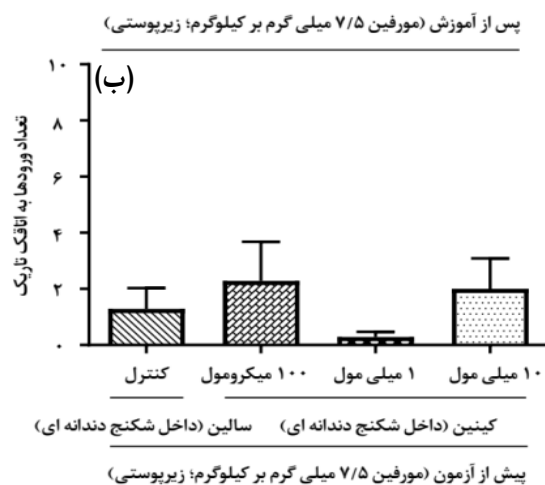
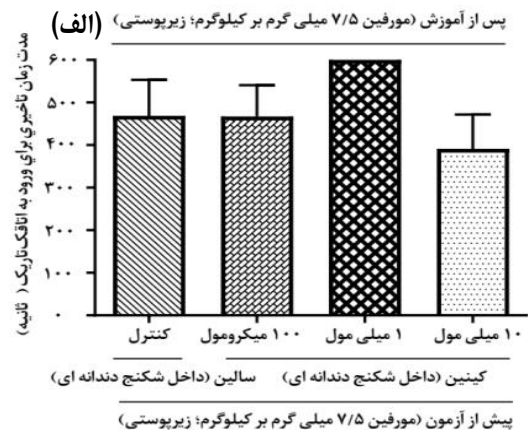
نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که تزریق کینین به‌تنهایی در ناحیه شکنج دندان‌های ۴۰ دقیقه پیش از آزمون تأثیر معنی‌داری بر بازخوانی حافظه در روش یادگیری اجتنابی غیرفعال ندارد. بر این اساس ظاهراً باز شدن سیناپس‌های الکتریکی شکنج دندان‌های تأثیری بر بازخوانی حافظه در این روش یادگیری ندارد و احتمالاً نواحی دیگر مغزی از این نظر اهمیت بیشتری دارند که نیازمند مطالعات تکمیلی است.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که بسته شدن سیناپس‌های الکتریکی شکنج دندان‌های توسط کینین در روز آزمون تأثیری بر بازخوانی حافظه نداشته و یادگیری وابسته به وضعیت مورفین را متأثر نمی‌سازد. به نظر می‌رسد این نوع یادگیری با ارتباط بین سلولی از طریق سیناپس‌های الکتریکی شکنج دندان‌های رابطه‌ای ندارد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه خانم مریم السادات صدیقی پور مصوب دانشکده علوم و فن آوری‌های زیستی دانشگاه اصفهان می‌باشد و با حمایت مالی دانشگاه اصفهان انجام شده است. نویسندگان از حمایت مرکز فوق کمال تشکر را دارند.



نمودار ۳- اثر تزریق پیش از آزمون کینین (۱۰۰ میکرومول، ۱ میلی مول و ۱۰ میلی مول) در شکنج دندان‌های توأم با تزریق مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم؛ زیرپوستی) پس از آموزش و پیش از آزمون بر (الف) مدت زمان تاخیری برای ورود به اتاقک تاریک (ب) تعداد دفعات ورود حیوان به اتاقک تاریک و (ج) مدت زمان توقف حیوان در اتاقک تاریک در روز آزمون. مقادیر به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند. آزمون آماری استفاده شده تحلیل واریانس یک‌طرفه می‌باشد.

ملاحظات مالی

این مطالعه از طریق پژوهانه اختصاص یافته به پایان نامه کارشناسی ارشد از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان پشتیبانی مالی شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

م.ص: انجام مطالعه، نگارش مقاله و تحلیل آماری؛ س.ب: ایده، طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله.

فهرست منابع

- [1] Classen W, Mondadori C, Facilitation or inhibition of memory by morphine: a question of experimental parameters. *Experientia* 40 (1984) 506-509.
- [2] Izquierdo I, Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology* 66 (1979) 199-203.
- [3] Zarrindast MR, Ardjmand A, Rezayof A, Ahmadi S, The time profile of morphine effect on different phases of inhibitory avoidance memory in rat. *Arch Iran Med* 16 (2013) 34-37.
- [4] Nishimura M, Shiigi Y, Kaneto H, State dependent and/or direct memory retrieval by morphine in mice. *Psychopharmacology* 100 (1990) 27-30.
- [5] Beheshti S, Zeinali R, Esmaeili A, Rapid upregulation of the hippocampal connexins 36 and 45 mRNA levels during memory consolidation. *Behav Brain Res* 320 (2017) 85-90.
- [6] Alvarez-Maubecin V, García-Hernández F, Williams JT, Van Bockstaele EJ, Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 20 (2000) 4091-4098.
- [7] Allison DW, Wilcox RS, Ellefsen KL, Askew CE, Hansen DM, Wilcox JD, Sandoval SS, Eggett DL, Yanagawa Y, Steffensen SC, Mefloquine effects on ventral tegmental area dopamine and GABA neuron inhibition: A physiologic role for connexin-36 GAP junctions. *Synapse* 65 (2011) 804-813.
- [8] Suzuki M, Narita M, Nakamura A, Suzuki T, Role of gap junction in the expression of morphine-induced antinociception. *Eur J Pharmacol* 535 (2006) 169-171.
- [9] Beheshti S, Hosseini SA, Noorbakhshnia M, Eivani M, Role of hippocampal CA1 area gap junction channels on morphine state-dependent learning. *Eur J Pharmacol* 745 (2014) 196-200.
- [10] Slot LB, Colpaert F, Opiate states of memory: receptor mechanisms. *J Neurosci* 19 (1999) 10520-10529.
- [11] Zarrindast M-R, Rezayof A, Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 497 (2004) 197-204.
- [12] Kamalpour M, Fereidoni M, Moghimi A, Effects of intrathecal carbenoxolone treatment on nociception and analgesia in rat. *Balkan Med J* 31 (2014) 164-172.
- [13] Nassiri-Asl M, Hosseini S-S, Zangivand A-A, Rahimi-Baghdashti H, Safdari F, Carbenoxolone, a gap junction blocker, enhances antinociceptive effects of morphine in formalin test in mice. *Pharmacologyonline* 2 (2011) 185-192.
- [14] Kosaka T, Neuronal gap junctions in the polymorph layer of the rat dentate gyrus. *Brain Res* 277(1983) 347-351.
- [15] MacVicar BA, Dudek FE, Electrotonic coupling between granule cells of rat dentate gyrus: physiological and anatomical evidence. *J Neurophysiol* 47 (1982) 579-592.
- [16] Drake CT, Chavkin C, Milner TA, Opioid systems in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163 (2007) 245-263.
- [17] Rivera PD, Raghavan RK, Yun S, Latchney SE, McGovern MK, García EF, Birnbaum SG, Eisch AJ, Retrieval of morphine-associated context induces cFos in dentate gyrus neurons. *Hippocampus* 25 (2015) 409-414.
- [18] Tronel S, Charrier V, Sage C, Maitre M, Leste-Lasserre T, Abrous DN, Adult-born dentate neurons are recruited in both spatial memory encoding and retrieval. *Hippocampus* 25 (2015) 1472-1479.
- [19] Adams JU, Paronis CA, Holtzman SG, Assessment of relative intrinsic activity of mu-opioid analgesics in vivo by using beta-funaltrexamine. *J Pharmacol Exp Ther* 255 (1990) 1027-1032.
- [20] Bramham CR, Sarvey JM, Endogenous activation of mu and delta-1 opioid receptors is required for long-term potentiation induction in the lateral perforant path: dependence on GABAergic inhibition. *J Neurosci* 16 (1996) 8123-8131.
- [21] Akaishi T, Saito H, Ito Y, Ishige K, Ikegaya Y, Morphine augments excitatory synaptic transmission in the dentate gyrus through GABAergic disinhibition. *Neurosci Res* 38 (2000) 357-363.
- [22] Xie CW, Lewis DV, Depression of LTP in rat dentate gyrus by naloxone is reversed by GABA A blockade. *Brain Res* 688 (1995) 56-60.
- [23] Shahidi S, Komaki A, Mahmoodi M, Lashgari R, The role of GABAergic transmission in the dentate gyrus on acquisition, consolidation and retrieval of an inhibitory avoidance learning and memory task in the rat. *Brain Res* 1204 (2008) 87-93.
- [24] Piguet P, North RA, Opioid actions at mu and delta receptors in the rat dentate gyrus in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 266 (1993) 1139-1149.

Research paper

Electrical Synapses of the dentate gyrus do not change morphine state-dependent learning

Maryamalsadat Sedighipour, *Siamak Beheshti

Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 7 August 2021

Accepted: 25 August 2021

Abstract

Background and aims: Morphine exerts some of its effects via gap junctions. In this study, the effect of blocking the electrical synapses of the dentate gyrus was evaluated on morphine state-dependent learning.

Methods: Male rats weighing 200-250g were used. The passive avoidance task was used to evaluate memory. Two guide cannulas were implanted in the dentate gyrus, stereotaxically. In an experiment, animals received different doses of morphine, post-training and 24 hours later memory retrieval was evaluated. In another experiment, animals received morphine (7.5 mg/kg), post-training. One day later, 30 min before the test, different doses of morphine was injected. In another experiment, animals received quinine (100 μ M, 1mM and 10mM) in the test day and 40 min later memory retrieval was evaluated. In the last experiment, animals were injected with morphine (7.5 mg/kg), post-training. In the test day, different doses of quinine and 10 min later morphine (7.5 mg/kg) were injected.

Results: Post-training injection of morphine (0.5, 2.5, 5, 7.5 mg/kg) impaired memory retrieval dose-dependently. Also, morphine induced a state-dependent memory. Blocking the electrical synapses of the dentate gyrus did not prevent the development of morphine state-dependent memory.

Conclusion: It seems that closing of the electrical synapses of the dentate gyrus does not affect memory retrieval induced by morphine on the test day.

Keywords: Electrical synapse, Dentate gyrus, Morphine, State-dependent learning

Please cite this article as follows:

Sedighipour M, Beheshti S, Electrical Synapses of the dentate gyrus do not change morphine state-dependent learning. *Iran J Physiol Pharmacol* 5 (2021) 78-87.

*Corresponding author: s.beheshti@sci.ui.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-5128-8935)