

## اثر استرس حاد بر یادآوری حافظه شکل گرفته ضمن تجویز دوزهای بسیار ناچیز تا معمول

### مرفین در موش صحرایی

زینب کاوسی<sup>۱</sup>، مسعود فریدونی<sup>۲</sup>، علی مقیمی<sup>۳</sup>

۱. کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم

۲. استادیار فیزیولوژی (علوم اعصاب)، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم

۳. دانشیار فیزیولوژی انسانی حیوانی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم

#### چکیده

**زمینه و هدف:** هیپوکامپ غنی از گیرنده‌های کورتیکوستروئیدی و اپیوئیدی و در حافظه دخیل است. استرس حاد و مورفین هر یک اثرات متفاوتی بر مراحل مختلف حافظه دارند. لذا اثر استرس شنای اجباری حاد بر یادآوری حافظه شکل گرفته ضمن تجویز دوزهای مختلف مورد تحقیق قرار گرفت.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۲۵۰g-۲۰۰g) در سه دسته گروه‌بندی (n=۷) شدند: (۱) گروه‌های مرفین مکرر، ۳۰ دقیقه قبل از هر آموزش در ماز آبی موریس به مدت ۴ روز، مورد تجویز درون صفاقی مرفین (۱۰ mg/kg، ۱۰۰ μg/kg، ۱۰، ۱) قرار گرفته و آزمون یادآوری در روز ۵ انجام گرفت. (۲) گروه استرس حاد، بدون تجویز مرفین ۴ روز آموزش داشته و روز پنجم، ۳۰ دقیقه قبل از آزمون یادآوری، ۵ دقیقه تحت استرس شنا قرار گرفتند. (۳) گروه‌های مرفین مکرر به همراه استرس حاد، ابتدا مشابه گروه ۱ و سپس روز پنجم مشابه گروه ۲ برای آن‌ها عمل شد. روز ۱۲ نیز آزمون مشابه روز ۵ انجام شد اما گروه‌ها هیچ تیماری دریافت نکردند.

**یافته‌ها:** در گروه‌های مرفین مکرر، تنها ۱۰ mg/kg مرفین ظاهراً یادگیری را به‌طور معنی‌داری مختل کرد ( $p < 0.001$ ). اما در روز ۵ و ۱۲ تفاوت معنی‌داری در یادآوری حافظه در تمامی گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. در گروه تیمار شده با مرفین به همراه استرس حاد، تنها ۱۰ mg/kg مرفین کاهش معنی‌داری در یادآوری حافظه در روز ۵ و ۱۲ در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** تجویز مکرر مرفین ۱۰ mg/kg به همراه استرس حاد، اثرات تخریبی استرس بر حافظه را تقویت می‌کند. [م ت ع پ ز، (): -]

**کلیدواژه‌ها:** حافظه، مرفین، استرس، موش صحرایی، ماز

#### مقدمه

هیپوکامپ یکی از نواحی اصلی دخیل در یادگیری و حافظه است. این ناحیه هم پپتیدهای اپیوئیدی و هم گیرنده‌های اپیوئیدی را بیان می‌کند.<sup>۱</sup> سیستم‌های اپیوئیدی در فرایند حافظه نقش دارند. به عنوان مثال  $\beta$ -اندورفین و انکفالین فرایند حافظه را مختل می‌کنند.<sup>۲</sup> هم‌چنین تعداد قابل توجهی از مولکول‌های دخیل در تقویت بلند مدت (Long-Term Potentiation: LTP) هیپوکامپی، به‌وسیله تجویز مکرر اپیوئیدها متأثر می‌شوند. مرفین ممکن است به‌وسیله مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم بر پلاستیسیته سیناپسی تأثیرگذار باشد.<sup>۳</sup> اثر تجویز حاد و مکرر مرفین در انواع مدل‌های یادگیری بررسی شده و نتایج متناقضی به‌دست آمده است.<sup>۴</sup> به هر حال اثرات اپیوئیدها در عملکرد شناختی هنوز جای بحث دارد.<sup>۱</sup> تجویز مکرر مرفین فراگیری را در ماز آبی آهسته‌تر کرده اما یادآوری را مختل نمی‌کند.<sup>۱</sup> هم‌چنین نشان داده شده است که تجویز مکرر مرفین به صورت خوراکی به مدت ۲۵ روز اثرات تسهیلی بر یادگیری و حافظه فضایی در ماز آبی موریس دارد.<sup>۵</sup> نشان داده شده است که تجویز دوز ۱۰ mg/kg مرفین نیم ساعت قبل از آموزش و به مدت ۱۰ روز منجر به تخریب حافظه فضایی در ماز آبی موریس می‌شود. در حالی که تجویز مکرر دوز ۳ mg/kg هیچ تأثیری ندارد.<sup>۶</sup> از سوی دیگر مدارک نشان داده است که ممکن است بین پدیده پاداش اپیوئید و برخی انواع فرایندهای یادگیری و حافظه، ارتباط و همبستگی وجود داشته باشد.<sup>۴</sup> هیپوکامپ غنی از گیرنده‌های

کورتیکوستروئیدی است و در خاتمه یافتن پاسخ استرس از طریق فیدبک منفی گلوکوکورتیکوئیدها بر محور (Hypothalamic - Pituitary - Adrenal) HPA شرکت می‌کند. نشان داده شده که در هیپوکامپ موش صحرایی، کورتیکوسترون‌ها عملکردهای متابولیک، فیزیولوژیک و ژنومیک نوروها را تنظیم می‌کنند.<sup>۷</sup> مطالعات انسانی و حیوانی نشان داد که استرس حاد و گلوکوکورتیکوئیدها دارای اثرات متناقضی بر مراحل مختلف حافظه می‌باشند. در حالی که آن‌ها فراگیری و تثبیت حافظه را تقویت کرده، اما بازیابی حافظه فضایی را تخریب می‌کنند. مکانیسم‌های دخیل در اثرات تخریب استرس بر بازیابی حافظه به‌خوبی درک نشده است.<sup>۸-۱۱</sup> مشخص شده است که اثرات گلوکوکورتیکوئیدها بر مرحله بازیابی حافظه خیلی سریع‌تر از آن است که به‌وسیله عمل ژنومیک و از طریق گیرنده‌های داخل سلولی میانجی‌گری شود. بنابراین ممکن است یک مکانیسم غیرژنومیک در ایجاد این نوع پاسخ‌ها نقش داشته باشد.<sup>۹</sup> هرچند مکانیسم چنین اثرات سریع غیرژنومیک گلوکوکورتیکوئیدها به‌خوبی درک نشده است، اما گیرنده‌های غشایی گلوکوکورتیکوئیدها که متفاوت از هر دو گیرنده‌ی گلوکوکورتیکوئیدی و مینرالوکورتیکوئیدی است، روی غشاء سیناپسی شناسایی شده است.<sup>۹،۱۲</sup> وجود اثر گیرنده‌های اپیوئیدی و نیز اثرات مشاهده شده استرس در حافظه و هیپوکامپ، سوء مصرف اپیوئیدهای آگروژن و تداخل آن با استرس در زندگی انسان، اثرات ترکیبی هر دو عامل بر شکل-

۳۵cm قطر که حاوی ۴۰ cm آب  $1^{\circ}\text{C} \pm 16$  بود، برای ۵ دقیقه وادار به شنا شدند. پس از خاتمه حیوان با حوله خشک شده و مورد سنجش های بعدی قرار گرفت.<sup>۱۶</sup>

گروه های آزمایش و تجویز دارو: گروه ها هر کدام متشکل از ۷ حیوان در سه دسته تنظیم شدند: الف) دسته مرفین مکرر (گروه های کنترل و دوزهای ۱۰mg/kg و ۱mg/kg، ۱۰۰g/kg، ۱g/kg، ۱۰g/kg، مرفین)، که در چهار روز آموزش تزریق مرفین ۳۰ دقیقه قبل از شروع آموزش روزانه به صورت درون صفاقی صورت گرفت و بدون تیمار در روز ۵ و ۱۲ یادآوری حافظه به وسیله ماز آبی مورفین سنجش شد. ب) دسته استرس حاد (گروه - های کنترل و استرس حاد)، که ۴ روز آموزش را بدون تیمار اضافه طی نموده و فقط در روز ۵، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش تحت استرس شنای اجباری قرار گرفتند. ج) دسته مرفین مکرر - استرس حاد، در این گروه ها تیمار مرفین با دوزهای مذکور در روزهای آموزش و سپس یک جلسه استرس در روز ۵ انجام شد. در کلیه گروه ها مسافت و زمان طی شده برای یافتن سکو در روزهای آموزش ثبت شد. در روز ۵، زمان حضور در ربع دایره هدف ثبت گردید. در روز ۱۲ نیز آزمونی مشابه روز ۵ برای تمام گروه ها انجام شد با این تفاوت که گروه ها هیچ نوع تیمار و آموزشی دریافت نکردند.

تجزیه و تحلیل داده ها: نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  ارائه شدند. تجزیه تحلیل های آماری با نرم افزار Instat Graphpad صورت گرفت. اثر بخشی تیمارها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) بررسی شده و به دنبال آن آزمون مقایسه میانگین ها با Post test Tukey و با حداقل سطح معنی داری  $p < 0.05$  برآورد شدند.

### یافته ها

۱- نتایج گروه های مرفین مکرر: مقایسه زمان صرف شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در روزهای آموزش بین گروه کنترل و گروه های مرفین مکرر با دوزهای مختلف: در گروه کنترل و گروه های مرفین مکرر به جز دوز معمول مرفین مکرر (۱۰mg/kg) زمان صرف شده (شکل الف) و مسافت طی شده (نمودار ب) برای رسیدن به سکو روز به روز به طور معنی - داری کاهش یافته است ( $p = 0.00074$ ) و ( $p = 0.00638$ ). این داده ها نشان می دهد حیوان موقعیت سکو را در طی روزهای آموزش یاد گرفته است. بین گروه کنترل و مرفین مکرر (۱۰mg/kg) تفاوت معنی داری در زمان و مسافت رسیدن به سکو وجود دارد ( $p = 0.00022$ ). به نحوی که ظاهراً به نظر می رسد این دوز مرفین روند آموزش را به کلی مختل کرده و مسافت و زمان رسیدن به سکو را در روزهای آموزش به شدت افزایش داده است (نمودار ۱). مقایسه زمان صرف شده به وسیله حیوان در ربع دایره هدف در روز ۵ و ۱۲ بین گروه کنترل و گروه های مرفین مکرر با دوزهای مختلف: تفاوت معنی داری در زمان صرف شده به وسیله حیوان در ربع دایره هدف بین گروه کنترل و گروه های مرفین مکرر در روز ۵ (نمودار الف) و ۱۲ (نمودار ب) مشاهده نشد. بنابراین تجویز این دوزهای مرفین در طی روند یادگیری تأثیری بر یادآوری حافظه کوتاه مدت (روز ۵) و بلند مدت (روز ۱۲) نداشته است (نمودار ۲).

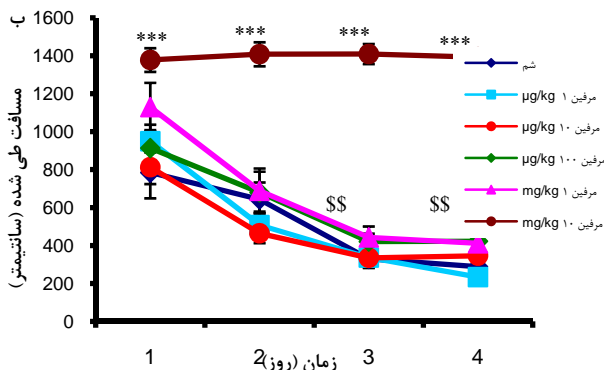
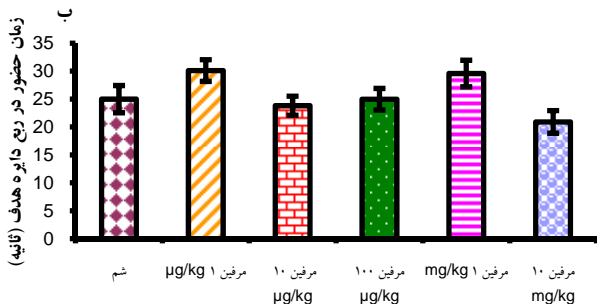
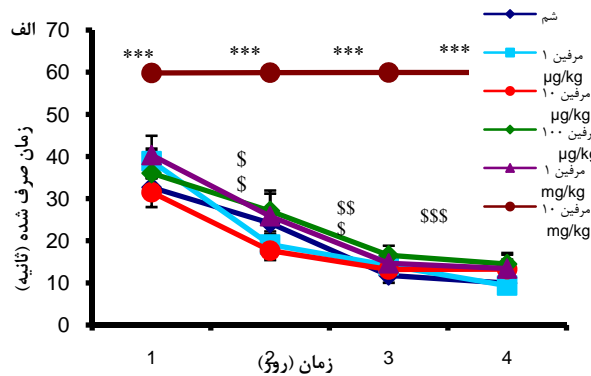
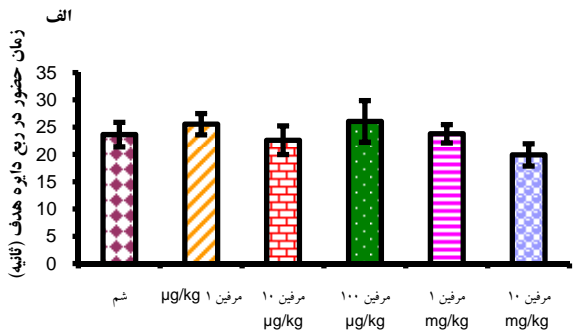
گیری و یادآوری حافظه را مورد سؤال قرار می دهد. لذا در این تحقیق اثر تجویز مکرر دوزهای بسیار ناچیز تا دوز معمول مرفین حین فرایند یادگیری در ماز آبی مورفین و اثر استرس حاد شنای اجباری هنگام یادآوری حافظه شکل گرفته مطالعه شده است.

### روش کار

در این مطالعه تجربی تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات به تعداد ۳-۴ سر در هر قفس قرار گرفته و در معرض چرخه نور- تاریکی ۱۲ ساعته و درجه حرارت کنترل شده محیط ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) نگهداری می شدند. تمام آزمایشات بین ساعت ۱۰ تا ۱۴ انجام می شدند و حیوانات دسترسی کافی به آب و غذا داشتند. آزمایشات تحت مقررات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت.<sup>۱۳،۱۴</sup> تمامی مراحل تکثیر و پرورش و انجام آزمایشات در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

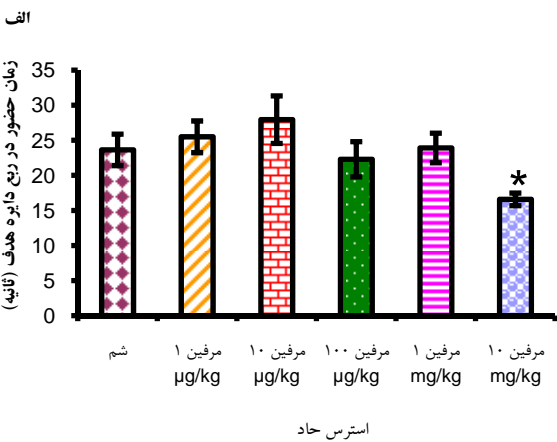
آزمون ماز آبی مورفین: ماز آبی از یک استخر دایره ای شکل به قطر ۱۵۰cm و ارتفاع ۸۰cm تشکیل شده است. قطر سکو ۱۰cm می باشد. دیوارها، کف استخر و سکو، به رنگ سیاه است. اشکال و وسایل خارج مازی در اتاق استفاده شد. استخر با آب  $1^{\circ}\text{C} \pm 23$  پر شد، به طوری که سکو ۱/۵ cm زیر سطح آب قرار داشت. از سیستم ردیاب کامپیوتری (ساخت شرکت مهار صنعت شرق) و دوربین دیجیتال (Color CCD camera, Hivision) برای ثبت اطلاعات استفاده شد. استخر توسط سیستم ردیاب به چهار ربع (کنترل، جنوب، شرق و غرب) تقسیم شد. در چهار روز اول آزمایشات، سکو در یک ربع قرار داده شد.<sup>۵</sup>

روش آزمایش: به منظور آشنایی حیوانات با شرایط محیط آزمایش، استخر با آب پر شد، به طوری که سکو مرئی در مرکز حوضچه وجود داشت و هر حیوان ۶۰ ثانیه روی سکو قرار می گرفت. هر گاه حیوان از سکو وارد آب می شد، دوباره روی آن قرار داده می شد. روز بعد از مرحله آماده - سازی حیوان، آزمون فراگیری انجام می شد که از ۱۶ آزمون تشکیل شده است، ۴ آزمون در هر روز و به مدت ۴ روز متوالی. موش ها از هر ۴ موقعیت (که به طور تصادفی توسط کامپیوتر مشخص می شد) داخل آب رها می شدند و به آن ها اجازه داده می شد که برای جستجوی سکو مخفی به مدت ۶۰ ثانیه شنا کنند.<sup>۵،۱۵</sup> اگر موش ها سکو را بعد از ۶۰ ثانیه پیدا نکردند، به سمت سکو هدایت می شدند و به آن ها اجازه داده می شد که ۳۰ ثانیه روی سکو بمانند. زمان سپری شده و طول مسیر طی شده برای رسیدن به سکو مخفی توسط سیستم ردیاب ثبت می شد. در روز بعد از آزمون فراگیری، حیوانات یک آزمون جستجو، به منظور بررسی دقت و صحت یادگیری اولیه انجام دادند که در آن سکو برداشته شد. این مرحله دارای چهار آزمون است. زمان حضور در ربع دایره هدف ثبت می گردید.<sup>۵</sup> این آزمون، مرحله یادآوری حافظه کوتاه مدت نیز نامیده می شود. در روز ۱۲ نیز این آزمون را می توان به منظور بررسی یادآوری حافظه بلندمدت، تکرار کرد.<sup>۱۵</sup> استرس شنای اجباری: هر حیوان به طور انفرادی در یک مخزن استوانه ای به ابعاد ۵۰cm ارتفاع و

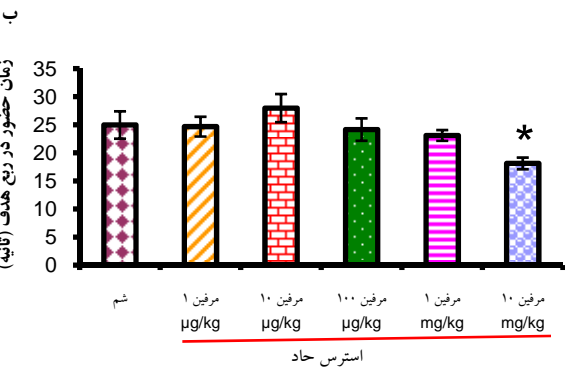


نمودار (۲) مقایسه زمان صرف شده بوسیله میوان در ربع دایره هدف در روز ۵ (الف) و ۱۲ (ب) بین گروه کنترل و گروه‌های مورفین مکرر. تجویز این دوزهای مورفین در طی روند یادگیری تأثیری بر زمان حضور میوان در ربع دایره هدف نداشته‌اند. نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است (n=۷).

نمودار (۱) مقایسه زمان صرف شده (الف) و مسافت طی شده (ب) برای رسیدن به سکو در روزهای آموزش بین گروه کنترل و گروه‌های مورفین مکرر با دوزهای (۱ µg/kg، ۱۰ µg/kg، ۱۰۰ µg/kg، ۱ mg/kg، ۱۰ mg/kg). روند یادگیری در گروه کنترل آهنگان مشاهده است که زمان صرف شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو روز به روز به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. تنها دوز ۱۰ mg/kg مورفین مکرر سبب افزایش زمان صرف شده و مسافت طی شده برای یافتن سکو در مقایسه با گروه کنترل در روزهای مشابه شد. نتایج به صورت Mean ± SEM بیان شده است. ( $p < 0.001$ ،  $***$  نسبت به (روزهای مشابه با گروه کنترل)، ( $p < 0.01$ ،  $SS$  نسبت به روز اول گروه کنترل)، (n=۷).



نتایج گروه استرس حاد: تفاوت معنی‌داری در زمان صرف شده به وسیله حیوان در ربع دایره هدف بین گروه کنترل و گروه استرس حاد در روز ۵ و ۱۲ مشاهده نشد. بنابراین استرس شای اجباری حاد در روز پنجم پس از یادگیری، تأثیری بر یادآوری حافظه کوتاه مدت (روز ۵) و بلندمدت (روز ۱۲) نداشته است.



نتایج گروه‌های مورفین مکرر به همراه استرس حاد: زمان حضور حیوان در ربع دایره هدف در گروه تیمار شده با مورفین مکرر (۱۰ mg/kg) و سپس استرس حاد در مقایسه با گروه کنترل در روز ۵ (نمودار الف) و ۱۲ (نمودار ب) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p=0/0354$ ) و ( $p=0/0189$ ). به نظر می‌رسد در این گروه مورفین مکرر زمینه را برای القاء اثرات تخریبی استرس حاد بر یادآوری حافظه فراهم کرده است. زیرا در این مورد نه استرس حاد و نه مورفین ۱۰ mg/kg به تنهایی اثری نداشتند، با این حال تفاوت معنی‌داری در روز ۵ (نمودار الف) و روز ۱۲ (نمودار ب) بین گروه کنترل و گروه‌هایی که ابتدا تحت تیمار دوزهای (۱ µg/kg، ۱۰ µg/kg، ۱۰۰ µg/kg، ۱ mg/kg) مورفین مکرر و سپس استرس حاد قرار گرفته‌اند، مشاهده نشد (نمودار ۳).

نمودار (۳) مقایسه زمان صرف شده بوسیله میوان در ربع دایره هدف در روز ۵ (الف) و ۱۲ (ب) بین گروه‌هایی که تمت تیمار دوزهای مختلف مورفین طی روند

می‌یابد. این ناحیه، بخش مهمی از سیستم پاداش است که با اثرات داروهای مخدر، جفت می‌شود. اپیوئیدها آزادسازی دوپامین در هسته آکومبیس را به وسیله فعال کردن رسپتورهای  $\mu$  اپیوئیدی در تگمنتال شکمی و هسته آکومبیس افزایش می‌دهند.<sup>۱۸</sup> احتمالاً مورفین به رسپتورهای  $\mu$  روی اینترنورون‌های گاباژیک متصل می‌شود و با مهار آن‌ها، نورون‌های دوپامینژیک را مهارزدایی می‌کند که این عمل منجر به افزایش آزادسازی دوپامین در هسته آکومبیس می‌گردد.<sup>۱۹</sup> بنابراین تجویز مورفین در دوزهای بالا اثرات پاداشی اعمال می‌کند. شاید بخشی از اثر رفتاری حیوان در صرف نظر کردن از دریافت پاداش (سکو) ناشی از القاء احساس پاداش توسط نورون‌های دوپامینژیک در حیوان باشد. بنابراین قابل قبول به نظر می‌رسد که حیوان به دنبال یافتن سکو نبوده و به شای خود ادامه دهد. تحقیقات قبلی نشان داده است که تجویز دوز  $10 \text{ mg/kg}$  مورفین نیم ساعت قبل از آزمون و به مدت ۱۰ روز منجر به تخریب حافظه فضایی و اختلال عملکرد حیوان در ماز آبی موریس می‌شود.<sup>۶</sup> این حداقل در بخش روند یادگیری تأیید بر نتایج ما فراهم می‌آورد، اگر چه در بخش به یاد آوری ما شاهد اختلال معنی‌داری نبودیم که دلیل احتمالی آن مطرح شد.

نتیجه به دست آمده از این آزمایش‌ها نشان داد که در گروه استرس حاد، استرس‌شنای اجباری حاد هیچ اختلالی در روند یادآوری در روز ۵ و ۱۲ ایجاد نمی‌کند. نشان داد شده است که در رت‌هایی که ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش یادآوری در ماز آبی شوک پا دریافت کردند، زمان حضور در ربع هدف نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است.<sup>۲۰</sup> در تفسیر این نتیجه این طور ذکر شده است که تخریب بازبایی حافظه وابسته به زمان است. به طوری که ۳۰ دقیقه بعد از اعمال استرس غلظت گلوکوکورتیکوئیدها به بیشترین مقدار خود می‌رسد. بنابراین احتمالاً بخشی از این اختلال ایجاد شده وابسته به فعالیت گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی می‌باشد.<sup>۲۱</sup> در بررسی دیگری نشان داده شد که ارائه استرس محدودسازی حاد، کمی قبل از آزمایش یادآوری، بازبایی حافظه را در بلندمدت در آزمون احترازی مهار می‌کند.<sup>۹</sup> نتایج ما با این یافته‌ها در تناقض است. شاید این تفاوت مربوط به نوع استرس به کار رفته در آزمایشات باشد. از طرفی چون در خود ماز آبی، شنا انگیزه لازم برای یافتن سکو را فراهم می‌نماید، استرس‌شنای چند دقیقه قبل، همراه با شنا در ماز آبی، احتمالاً از نظر ایجاد انگیزه برای یافتن سکوی یادگرفته شده در یک راستا قرار می‌گیرند و اگر این‌جا استرس اثر اختلال آوری در یادآوری داشته است، این هم راستا بودن انگیزشی، اثر اختلال استرس را می‌پوشاند. نتایج این پژوهش نشان داد که در گروه‌هایی که در روزهای آموزش دوزهای  $1 \text{ mg/kg}$  و  $10 \text{ mg/kg}$  و  $100 \text{ mg/kg}$  مورفین دریافت و سپس در روز ۵ تحت استرس‌شنای اجباری حاد قرار گرفته‌اند، مدت زمان حضور حیوان در ربع دایره هدف در مقایسه با گروه کنترل در روز ۵ و ۱۲ تفاوت معنی‌داری ندارد. اما زمان حضور حیوان در ربع دایره هدف در روز ۵ در گروه تیمار شده با مورفین مکرر  $10 \text{ mg/kg}$  در روزهای آموزش و سپس استرس حاد (در روز ۵) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۳). مطالعات قبلی نشان داده است که LTP

یادگیری و سپس استرس ماد در روز پنجم قرار گرفته‌اند با گروه کنترل. زمان حضور حیوان در ربع دایره هدف در گروه تیمار شده با مورفین مکرر  $10 \text{ mg/kg}$  به همراه استرس ماد در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  ارائه شده است ( $p < 0.05$ ), (\*), ( $n=7$ ).

## بحث

به طور خلاصه نتایج نشان دادند که تجویز مکرر دوزهای بسیار ناچیز تا معمول مورفین به جز دوز  $10 \text{ mg/kg}$  در روزهای آموزش، روند یادگیری را مختل نکرد. تجویز مکرر دوزهای بسیار ناچیز تا معمول مورفین و هم چنین تیمار استرس‌شنای اجباری حاد هیچ اختلالی در یادآوری ایجاد نکردند، اما زمانی که حیوانات در روزهای آموزش دوز  $10 \text{ mg/kg}$  مورفین را دریافت کرده و در روز ۵ تحت استرس‌شنای اجباری حاد قرار گرفتند، یادآوری حافظه مختل شد. اثر مورفین در انواع مدل‌های یادگیری بررسی شده و نتایج متناقضی به دست آمده است. از سوی دیگر مدارک نشان داده است که ممکن است بین پدیده پاداش اپیوئید و برخی انواع فرایندهای یادگیری و حافظه، ارتباط و همبستگی وجود داشته باشد.<sup>۴</sup> مطالعات انسانی و حیوانی نشان داد که استرس حاد و گلوکوکورتیکوئیدها دارای اثرات متفاوتی بر مراحل مختلف حافظه می‌باشند.<sup>۱۱-۸</sup> تأثیرات دوزهای بسیار ناچیز مورفین با دوزهای معمول آن در درد و بی‌دردی متفاوت و معما گونه بوده است.<sup>۱۶</sup> تحقیقات چندانی در زمینه اثرات ترکیبی تجویز مکرر دوزهای بسیار ناچیز تا دوزهای معمول مورفین به همراه استرس بر روی روند یادگیری و حافظه صورت نگرفته است، در این تحقیق تأثیر استرس‌شنای اجباری حاد بر یادآوری در حافظه شکل گرفته ضمن تجویز دوزهای مختلف مورفین مورد واکاوی قرار گرفته است. نتایج این تحقیقات نشان داد که در گروه دوزهای مورفین مکرر ( $1 \text{ mg/kg}$  و  $100 \text{ mg/kg}$ ،  $10$ ،  $1$ )، هیچ تفاوت معنی‌داری در زمان و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در روزهای آموزش و زمان حضور حیوان در ربع دایره هدف در روز ۵ و ۱۲ در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد. بنابراین در ابتدا این طور می‌توان نتیجه گرفت که این دوزهای مورفین از توان کافی برای اثربخشی بر روند یادگیری و یادآوری حافظه برخوردار نبوده‌اند، زیرا در گروه تیمار شده با دوز  $10 \text{ mg/kg}$  مورفین مکرر، زمان و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در روزهای آموزش افزایش یافته و تفاوت بسیار زیاد و معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. به نحوی که به نظر می‌رسد احتمالاً مورفین ( $10 \text{ mg/kg}$ ) روند یادگیری را به کلی مختل کرده است. اما از آنجایی که در روز ۵ و ۱۲ تفاوت معنی‌داری در زمان حضور حیوان در ربع دایره هدف در مقایسه با گروه کنترل دیده نمی‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که حیوان موقعیت سکو را در روزهای آموزش یاد گرفته و به خاطر سپرده است. به عبارت دیگر احتمالاً دوز  $10 \text{ mg/kg}$  مورفین باعث شده حیوان از همان روزهای اول نیازی برای یافتن سکو حس نکند. زیرا در آزمون ماز آبی موریس، رسیدن به سکو خود، به عنوان پاداش در نظر گرفته می‌شود. همان‌طور که می‌دانیم سیستم دوپامینژیکي مزوآکومبیس در مسیر پاداش نقش دارد.<sup>۱۷</sup> مزولیمبیک، سیستم دوپامینژیکي است که از ناحیه تگمنتال شکمی منشأ گرفته و به هسته آکومبیس خاتمه

استرس حاد و نه مرفین مکرر ( $10\text{mg/kg}$ ) هر کدام به تنهایی فاقد این اثر بودند (شکل ۲).

به عنوان نتیجه کلی هر چند دوز معمول مرفین ( $10\text{mg/kg}$ ) به تنهایی ظاهراً روند یادگیری را مختل می‌کند اما در یادآوری حافظه نقشی ندارد. بنابراین حیوانات در روزهای آموزش موقعیت سکو را یاد گرفته و به خاطر سپرده‌اند. در نتیجه می‌توان گفت که این اختلال مشاهده شده در روند یادگیری ممکن است ظاهری بوده و مربوط به مکانیسم‌های دیگر از جمله مسیر پاداش و اثر دوپامین باشد. احتمالاً دوز معمول مرفین ( $10\text{mg/kg}$ ) منجر به ایجاد اثر پاداشی در حیوان شده است و حیوان انگیزه لازم برای رسیدن به سکو (به عنوان پاداش در ماز آبی) نداشته و لذا یادگیری بدون مراجعه به سکو انجام می‌شود. زمانی که این دوز مکرر مرفین با استرس شای اجباری حاد همراه می‌شود می‌تواند عملاً منجر به آسیب در به یاد آوردن حافظه گردد. بنابراین احتمالاً مرفین مکرر می‌تواند زمینه را برای القاء اثرات تخریبی استرس فراهم نماید. در حالی که دوزهای فوق العاده ناچیز مرفین اثری بر روند یادگیری و حافظه در این مجموعه آزمایشات ندارند، چه زمانی که این دوزها به تنهایی استفاده شوند و چه زمانی که با استرس حاد همراه گردند. لذا پیشنهاد ما این است که می‌توان با بررسی بافتی ناحیه هیپوکامپ و بررسی بیان ژن‌های مهم در این ناحیه از جمله CREB، CamkII و گیرنده‌های غشایی گلوکوکورتیکوئیدی، نتایج قطعی تری در این زمینه به دست آورد.

#### سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه با عنوان "بررسی اثر استرس بر یادآوری در حافظه شکل گرفته ضمن تجویز دوزهای بسیار ناچیز تا معمول مرفین در رت نروژی سفید نژاد ویستار (*Rattus norvegicus albinus*)" با کد ۲۰۱۲۰۳۳ در دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی استخراج شده است.

#### References

- Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y. Effects of morphine dependence on the performance of rats in reference and working versions of the water maze. *Physiol Behav* 2008; 93(3): 622-7.
- Ukai M, Watanabe Y, Kameyama T. Effects of endomorphins-1 and -2, endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonists, on spontaneous alternation performance in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 395(3): 211-5.
- Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnani S and Shafizadeh M. Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res* 2003; 965(1-2): 108-13.
- Motamedi F, Ghasemi M, Davoodi FG and Naghdi N. Comparison of learning and memory in morphine dependent rats using different behavioral models. *Iran J Pharm Res* 2003; 2(4): 225-30.
- Pourmotabbed A, Tahmasian M, Shahi M, et al. Facilitating effects of morphine dependence on spatial learning and memory in rat. *Daru* 2007; 15(3): 156-61.
- Zheng XG, Li XW, Yang XY and Sui N. Effects of scopolamine and physostigmine on acquisition of

در هیپوکامپ به طور معنی‌داری به وسیله تجویز مکرر مرفین تغییر می‌کند که نشان دهنده تغییر در عملکرد هیپوکامپ بعد از تجویز مکرر اپیوئیدها می‌باشد. بعد از تیمار مکرر اپیوئیدها ظرفیت LTP در هیپوکامپ به طور معنی‌داری در طی حذف دارو کاهش می‌یابد. این امر نشان می‌دهد که اپیوئیدها تغییراتی را در پلاستیسیته نورونی ایجاد می‌کند.<sup>۱۰،۲۱</sup> علاوه بر آن تحقیقات قبلی نشان داده که استرس حاد از طریق گیرنده‌های غشایی گلوکوکورتیکوئیدها اثرات سریع خود را اعمال کرده و منجر به تخریب به خاطر آوردن حافظه می‌شود.<sup>۹،۲۰</sup> لذا تحقیقات نشان داده‌اند که از یک طرف حذف مرفین مکرر باعث کاهش LTP می‌شود و از طرف دیگر استرس حاد از طریق گیرنده‌های غشایی گلوکوکورتیکوئیدها منجر به تخریب یادآوری حافظه می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مرفین مکرر می‌تواند زمینه را برای ایجاد اثرات تخریبی استرس بر یادآوری کوتاه مدت (در روز ۵) فراهم نماید که نتایج ما نیز مؤید همین امر است (شکل الف-۳). این وقتی بیشتر تأیید می‌شود که ذکر شود در همین مورد نه استرس حاد و نه مرفین مکرر  $10\text{mg/kg}$  به تنهایی اثری نداشتند (شکل ا). علاوه بر این در گروه تیمار شده با دوز  $10\text{mg/kg}$  مرفین در روزهای آموزش و سپس استرس شای اجباری حاد در روز پنجم، زمان حضور در ربع دایره هدف در روز ۱۲ در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ب-۳). این اثر بلندمدت در ایجاد اختلال در به یادآوری ممکن است با توضیح فوق‌الذکر قابل توجه باشد. از طرفی گلوکوکورتیکوئیدها هم چنین می‌توانند با کمک مکانیسم‌های وابسته به گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی اثرات تأخیری و بلندمدت ایجاد کنند<sup>۹</sup> همان‌طور که می‌دانیم این گیرنده‌ها از طریق اتصال به DNA و سنتز پروتئین عمل می‌کنند. علاوه بر این تجویز بلندمدت مرفین عصب‌زایی را در هیپوکامپ رت بالغ کاهش می‌دهد.<sup>۲۱</sup> بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در این گروه اثر مرفین مکرر به منظور القاء اثر تخریبی استرس حاد به نحوی بوده است که در روز ۱۲ نیز، کاهش حضور در ربع دایره هدف مشاهده شد (شکل ب-۳). این زمانی است که در مورد مشابه نه

- morphine-treated rats in Morris water maze performance. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23(5): 477-80.
- Kim JJ, Lee HJ, Han JS and Packard MG. Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J Neurosci* 2001; 21(14): 5222-8.
- Sandi C, Woodson JC, Haynes VF, et al. Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 2005; 57(8): 856-64.
- Rashidy-Pour A, Vafaei AA, Taherian AA, et al. Verapamil enhances acute stress or glucocorticoid-induced deficits in retrieval of long-term memory in rats. *Behav Brain Res* 2009; 203(1): 76-80.
- Pakdel R, Rashidy-Pour A. Glucocorticoid-induced impairment of long-term memory retrieval in rats: An interaction with dopamine D2 receptors. *Neurobiol Learn Mem* 2006; 85(3): 300-6.
- Roosendaal B, Okuda S, de Quervain DJ and McGaugh JL. Glucocorticoids interact with emotion-induced

- noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 2006; 138(3): 901-10.
12. Sajadi AA, Samaei SA, Rashidy-Pour A. Intra-hippocampal microinjections of anisomycin did not block glucocorticoid-induced impairment of memory retrieval in rats: An evidence for non-genomic effects of glucocorticoids. *Behav Brain Res* 2006; 173(1): 158-62.
  13. Zimmermann M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand* 1986; 128(Suppl. 554): 221-33.
  14. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16(2): 109-10.
  15. Patil SS, Sunyer B, Hoger H and Lubec G. Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behav Brain Res* 2009; 198(1): 58-68.
  16. Fereidoni M, Javan M, Semnani S and Ahmadiani A. Chronic forced swim stress inhibits ultra-low dose morphine-induced hyperalgesia in rats. *Behav Pharmacol* 2007; 18(7): 667-72.
  17. Lubbers ME, van den Bos R, Spruijt BM. Mu opioid receptor knockout mice in the Morris water maze: A learning or motivation deficit? *Behav Brain Res* 2007; 180(1): 107-11.
  18. Yoshida Y, Koide S, Hirose N, et al. Fentanyl increases dopamine release in rat nucleus accumbens: involvement of mesolimbic mu- and delta-2 opioid receptors. *Neurosci* 1999; 92(4): 1357-65.
  19. Mathon DS, Vanderschuren LJ, Ramakers GM. Reduced psychostimulant effects on dopamine dynamics in the nucleus accumbens of  $\mu$ -opioid receptor knockout mice. *Neuroscience* 2006; 141(4): 1679-84.
  20. Roozendaal B. Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem* 2002; 78(3): 578-95.
  21. Pu L, Bao G-B, Xu NJ, et al. Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *J Neurosci* 2002; 22(5): 1914-21.

## Acute stress effects on retention of formed memory during ultra low to usual doses of morphine administration in rat

Zeinab Kavooosi,<sup>1</sup> Masoud Fereidoni,<sup>2</sup> Ali Moghimi<sup>3</sup>

**Introduction:** Hippocampus is enriched by corticosteroids and opioid receptors and involved in memory. Acute stress and morphine have different effects on various phases of memory processing. So the effects of acute forced swimming stress on retention related to memory which is formed during administration of different morphine doses are studied in this research.

**Materials and methods:** Adult male Wistar rats (200-250g) were grouped (n=7) into 3 categories: 1- Groups of repeated morphine, morphine doses of (1, 10, 100 $\mu$ g/kg and 1, 10mg/kg) were injected intraperitoneally (i.p.) 30 min prior to each of 4 days training in Morris water maze and retention test were done at 5<sup>th</sup> day. 2- Acute stress group which were trained for 4 days without morphine treatment and were exposed to 5 minutes swimming stress 30 min prior to the retention test on the 5<sup>th</sup> day. 3- Groups of repeated morphine accompanying with acute stress which initially treated like category 1 and then 2 at 5<sup>th</sup> day. On the 12<sup>th</sup> day, the test was the same as the 5<sup>th</sup> day without any treatment for all groups.

**Results:** In the category of repeated morphine injection, only the morphine at the dose level of 10mg/kg significantly impaired learning ( $p < 0.001$ ). Besides on 5<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days a significant difference was not found on retention for all groups in comparison with control group. For category of repeated morphine accompanying with acute stress just morphine (10mg/kg) showed significant retention impairment on the 5<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days in contrast to the control group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The administration of repeated morphine (10mg/kg) accompanying with acute stress augments the impairment effects of stress on memory.

**Key words:** Memory, morphine, stress, rat, maze

1. MSc of Animal Physiology, School of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Assistant professor of Physiology (Neuroscience), School of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Associate professor of human and Animal Physiology, School of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.