تأثیر گیرنده‌های دوپامینی D2 هیپوکامپ پشتی بر روی اثر بهبودبخش نیکوتین روی فراموشی القاء شده با اتانول

مریم‌السادات شاهین[۱]، سیما نصری[۱]، مرتضی پیری[۲*]

۱ـ دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، گروه زیست‌شناسی، اردبیل، ایران

مسئول مکاتبات: biopiri@iauardabil.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۴

چکیده

اتانول و نیکوتین برخی از اثرات خود را از طریق فعال کردن مسیر دوپامینی مزولیمبیک که از ناحیه تگمنتوم شکمی به هسته آکومبنس و هیپوکامپ می‌رود، ایجاد می‌نماید. گیرنده‌های دوپامینی D2 در هیپوکامپ پشتی که یکی از نواحی کلیدی مغز می‌باشد که یادگیری و حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، یافت می‌شود. در این مطالعه، تأثیر گیرنده‌های دوپامینی D2 هیپوکامپ پشتی بر روی اثر نیکوتین بر روی فراموشی القاء شده با اتانول بررسی شده است. در این مطالعه تجربی از ۲۵۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI استفاده شد (۲٤ گروه). حیوان‌ها پس از بیهوشی در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند و کانول گذاری دوطرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی انجام شد. بعد از طی دوره بهبودی هفت روزه، آزمون رفتاری با استفاده از دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال آغاز شد. در این مطالعه اتانول، نیکوتین و سولپیراید (آنتاگونیست گیرنده دوپامینی D2) استفاده شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه ناپارامتری کروسکال ـ والیس و تست مکمل من ـ ویتنی برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. p<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار اختلاف در بین گروه‌ها در نظر گرفته شد. تزریق قبل از آموزش یا قبل از آزمون اتانول حافظه را تخریب می‌کند (P < ۰/۰۰۱). تزریق قبل از آزمون اتانول یا نیکوتین باعث برگشت حافظه تخریبی القاء شده با تزریق قبل از آموزش اتانول شد (P < ۰/۰۰۱). تزریق سولپیراید به ناحیه CA1 اثر اصلاحی نیکوتین بر روی فراموشی اتانول را بلوک می نماید(P < ۰/۰۰۱). از طرف دیگر تزریق قبل از آزمون نیکوتین یا سولپیراید خود به تنهایی اثری بر روی حافظه ندارند (P > ۰/۰۵). نتایج ما در این مطالعه نشان می‌دهد که بلوک گیرنده‌های دوپامینی D2 هیپوکامپ پشتی اصلاح فراموشی اتانول که با نیکوتین القاء شده را کاهش می‌دهد.

کلمات کلیدی: اتانول، نیکوتین، گیرنده دوپامینی D2، هیپوکامپ پشتی، حافظه اجتنابی مهاری

مقدمه

اتانول و نیکوتین هر دو جزء موادی می‌باشند که مورد سوء مصرف قرار می‌گیرند و می‌توانند وابستگی ایجاد نمایند، مصرف این دو ماده گاهی همراه با هم انجام می‌گیرد و اکثر افرادی که سوء مصرف یا وابستگی به الکل دارند معمولاً سیگار هم می‌کشند [۲]. یکی از ویژگی‌های مشترک هر دو ماده اتانول و نیکوتین این است که هر دو ترکیب باعث فعال شدن مسیر مزولیمبیک در مغز شده و رهایش دوپامین را در نواحی هدف مسیر مزولیمبیک نظیر هیپوکامپ افزایش می‌دهند [۱٤، ۱۸، ۲۸]. مطالعات نشان می دهد که اتانول قادر به تخریب حافظه و ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد. یادگیری وابسته به وضعیت پدیده ای است که در آن به یاد آوردن اطلاعات تازه کسب شده تنها در شرایطی صورت می‌گیرد که فرد از لحاظ حسی و فیزیولوژیکی در همان شرایطی قرار گیرد که اطلاعات در همان شرایط کد شده است [۲۳]. داروهایی نظیر مورفین و اتانول که قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشند، اگر تنها در روز آموزش یا روز آزمون بکار روند باعث تخریب حافظه می‌گردند [۱، ۱۸]، اما اگر هم در روز آموزش و هم در روز آزمون حضور داشته باشند با ایجاد شرایط یکسان در روز آموزش و آزمون باعث بهبود مجدد حافظه می‌شوند [۲۳]. بررسی‌ها نشان می‌دهد که اکثر داروهایی که قادر به ایجاد یادگیری وابسته

به وضعیت می‌باشند، قادر به فعال نمودن مسیر پاداش مزولیمبیک بوده و در نتیجه مورد سوء مصرف قرار می-گیرند و می‌توانند وابستگی ایجاد کنند [١٤، ١٥، ١٦]. با توجه به افزایش رهایش دوپامین در نواحی هدف مسیر مزولیمبیک نظیر هیپوکامپ در پاسخ به اکثر داروهایی که یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد می‌نمایند، به نظر می‌رسد که دوپامین نقش کلیدی در یادگیری وابسته به وضعیت بویژه در هیپوکامپ داشته باشد. هیپوکامپ ورودی‌های دوپامینرژیک را از ساختارهای موجود در مزولیمبیک نظیر ناحیه تگمنتوم شکمی دریافت می‌کند [٣]. پیشنهاد شده است که نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی بخش بالارو حلقه عملکردی موجود بین ناحیه تگمنتوم شکمی و هیپوکامپ می‌باشد [١٦] ، که ورود اطلاعات به حافظه درازمدت در هیپوکامپ را تعدیل کرده و تحت تأثیر قرار می‌دهند [٢٤]. دوپامین اثرات خود بر روی حافظه را از طریق دو دسته گیرنده دوپامینی D1 و D2 اعمال می‌نماید. گیرنده‌های گروه D1 شامل گیرنده D1 و D5 و گیرنده‌های گروه D2 که شامل گیرنده D2، D3 و D4 می‌شود [١٢]. فعال شدن گیرنده‌های D1 باعث افزایش آدنوزین مونو فسفات حلقوی در داخل سلول می-گردد، در حالی که فعال شدن گیرنده‌های D2، سطح آدنوزین مونو فسفات حلقوی را کاهش می‌دهد [٢٢]. براساس مطالعات بیوشیمی و فارماکولوژی هر دو نوع گیرنده دوپامینی D1 و D2 در ناحیه CA1 هیپوکامپ شناسایی شده است [١١].

با وجود اینکه مصرف اتانول و نیکوتین گاهاً همراه با هم رخ می‌دهد و این دو ماده اثرات مشترکی بر روی مسیر دوپامینی مزولیمبیک دارند ولی اثر این دو ماده بر روی حافظه و یادگیری عکس همدیگر می باشد. اتانول باعث تخریب حافظه و یادگیری و حافظه در مدل های مختلف یادگیری می‌شود، در حالی که نیکوتین باعث بهبود حافظه در مدل های مختلف یادگیری می‌گردد [١٤، ١٨، ٢٨]. بدلیل همین اثرات متضاد اتانول و نیکوتین بر روی حافظه به نظر می‌رسد که برهمکنش پیچیده‌ای بین اتانول و نیکوتین در زمینه حافظه وجود داشته باشد. گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد که اتانول از طریق اختلال در عملکرد سیستم کولینرژیک باعث القاء فراموشی می‌شود [٢٠]. جالب تر اینکه اثرات اتانول و نیکوتین بر هیپوکامپ نیز عکس همدیگر می‌باشد، به گونه‌ای که نیکوتین باعث تسهیل شکل‌گیری تقویت دراز مدت سیناپسی در هیپوکامپ می‌شود [١٠]، در حالیکه اتانول مانع شکل‌گیری تقویت درازمدت سیناپسی می شود [١٧]. هیپوکامپ بطور طبیعی ورودی‌های کولینرژیک زیادی را از بخش میانی سپتوم و بازوی عمودی و افقی بخش موردب بروکا دریافت می نماید و این ورودی‌های کولینرژیک نقش مثبت در یادگیری، حافظه و فرآیند توجه دارند [٨]. مطالعات نشان می‌دهد که گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین هم در نورون‌های هرمی تحریکی و هم در نورون‌های بینابینی مهاری هیپوکامپ وجود دارد [٥]، بنابراین نیکوتین می‌تواند انتقال پیام‌های تحریکی و مهاری در هیپوکامپ را تعدیل کرده و از این طریق حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار دهد [٥] .

مطالعات پیشین نشان می‌دهد که اتانول قادر به تخریب حافظه اجتنابی مهاری و ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می باشد. همچنین مشخص شده است که تزریق سیستمیک نیکوتین قبل از آزمون قادر به بهبود حافظه اجتنابی مهاری تخریب شده توسط اتانول می باشد. اینکه نیکوتین از طریق تأثیرگذاری بر روی چه ساختار مغزی و چه سیستم نورترانس میتری حافظه تخریب شده با اتانول را اصلاح می‌نماید، سوالی است که این پژوهش دنبال پاسخگویی به آن می‌باشد. با توجه به اهمیت هیپوکامپ پشتی و ناقل عصبی دوپامین در حافظه اجتنابی مهاری و یادگیری وابسته به وضعیت و توجه داشتن به این نکته که یکی از ویژگی های مشترک اتانول و نیکوتین این است که هر دو رهایش دوپامین را در نواحی هدف مسیر مزولیمبیک نظیر هیپوکامپ افزایش می‌دهند، در این مطالعه برای اولین بار تأثیرگیرنده‌های دوپامینی D2 هیپوکامپ پشتی را در

میانجی‌گری اثرات بهبودبخش نیکوتین بر روی فراموشی القاء شده با اتانول مورد بررسی قرار می‌دهیم.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی ۲۵۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI به وزن تقریبی ۲۵–۲۲ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوانخانه تحقیقاتی منتقل شده، در هر قفس ۵ سر موش قرار داده شد. در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت و هر سه روز یکبار قفس موش‌ها تمیز می‌شد. دمای حیوانخانه بین۳ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. قبل از جراحی به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوانخانه تطبیق دهند. موش‌ها در گروه‌های هشت تایی قرار داده شدند و هر حیوان فقط یک بار استفاده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام گرفت. دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال، مدل Step-down، جعبه چوبی به ابعاد (٤٠×۳۰× ۳۰ سانتی‌متر) می‌باشد. کف دستگاه دارای ۲۹ میله فولادی با قطر ۰/۳ سانتی متر می‌باشد که به فاصله ۱ سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفته‌اند، این میله‌ها به دستگاه تحریک‌کننده متصل شده و شوک الکتریکی از طریق این میله‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می‌شود. یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد (٤× ٤× ٤ سانتی‌متر) در قسمت میانی کف دستگاه (روی میله‌های فلزی) قرار گرفته است، که حیوانات هنگام انجام آزمایشات به آرامی در روی این سکو قرار داده می‌شوند.

داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از اتانول، نیکوتین (سیگما) و سولپیراید که به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های D2 دوپامینی عمل می‌نماید (سیگما). نیکوتین ابتدا در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹ درصد استریل حل گردیدند و سپس pH نیکوتین توسط سود ۰/۱ نرمال به محدوده ۷/٤ رسید. سولپیراید نیز در محلول حاملی حل شد که محتوی یک قطره اسید استیک گلاسیال در ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹ بود. دوزهای مورد استفاده دارو، در این تحقیق بر اساس مطالعات Pilot و مطالعات قبلی دکتر زرین‌دست انتخاب شدند [۱، ۹، ۱۲، ۱۳].

روش جراحی و کانول گذاری در ناحیه هیپوکامپ پشتی (CA1): موش‌های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ میلی‌گرم بر کلیوگرم) بعلاوه گزیلزین (۱۰ میلی‌گرم بر کلیوگرم) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند و دو کانول راهنما (اندازه ۲۲) یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، بر اساس اطلس پاکسینوس (۲۰۰۱) قرار داده شد. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی عبارت بود از: ۲– AP = ، ML = ±۱/٦ ، V = –۱/۵ [۲۷]. بعد از قرار دادن کانول در مختصات مورد نظر با استفاده از سیمان دندان پزشکی کانول‌های راهنما در جای خود محکم شدند. پس از جراحی و قبل از تزریق درون مغزی دارو، به حیوان اجازه داده شد ۵ تا ۷ روز دوره بهبودی پس از جراحی را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردند.

آزمون‌های رفتاری: یادگیری احترازی غیرفعال مدل step-down روشی مورد قبول برای بررسی حافظه دراز مدت در موش‌های کوچک آزمایشگاهی می‌باشد [٦]. در این روش، بررسی حافظه در دو روز متوالی و بین ساعت ۸ صبح تا ۲ بعد از ظهر انجام می‌شود. روز اول یا روز آموزش (Training day) شامل آموزش دادن حیوان‌ها در دستگاه می‌باشد و در روز دوم یا روز آزمون (Testing day) میزان حافظه حیوان‌های آموزش دیده بررسی می‌شود.

مرحله آموزش: در روز آموزش هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار می‌گیرد و مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت می‌شود. در صورتی که هر موش بیش از ۲۰ ثانیه روی سکو بماند آن موش حذف می‌شود. بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای موثر بر روی میله

های فولادی شوک الکتریکی به مدت ۱۵ثانیه (۱هرتز، ۰/۵ ثانیه و ٤٥ ولت مستقیم) توسط حیوان دریافت می‌شود.

مرحله آزمون یا بررسی حافظه: جلسه آزمون ٢٤ساعت قبل از آموزش، مشابه آموزش انجام می‌شود. با این تفاوت که حیوانات مورد آزمایش در روز آزمون شوک دریافت نمی‌کنند. مدت زمان توقف موش بر روی سکو در روز آزمون به عنوان معیار حافظه در موش اندازه گیری می‌شود، که حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف cut-off) برابر با ۳۰۰ ثانیه می‌باشد که به عنوان حافظه کامل در نظر گرفته می‌شود.

تزریق درون مغزی دارو: برای تزریق دارو پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن دندانپزشکی شماره ۲۷ که ۹ میلی‌متر طول داشت و به کت دان تیوب نوزاد (شماره ٤) متصل بود، در داخل کانول راهنما شماره ۲۲ قرار داده شد و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۹۰-٦۰ ثانیه تزریق شد. در طول تزریق به حیوان اجازه داده شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

بافت شناسی: پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم، ۰/۵ میکرولیتر رنگ متیلن بلو ۱ درصد به داخل هر کانول تزریق شد، سپس مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شده و محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده می‌شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در همه آزمایش‌ها، زمان توقف حیوان روی سکو به صورت میانه و چارک ثبت گردید. به علت تفاوت‌های خاص زیادی که در پاسخ‌های یادگیری حیوانات وجود داشت، داده‌ها توسط آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) برای داده‌های غیرپارامتریک (Kruskal- wallis) و به دنبال آن برای بررسی جفت گروه‌ها از روش Mann- withy, U-test استفاده گردید. در تمام ارزیابی‌های آماری، حداقل $P<0.05$ معیار معنی‌دار بودن مقایسه بین گروه‌ها بوده است. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها از نرم افزار Sigmaplot استفاده شد.

تیمارهای دارویی و آزمایشهای انجام شده

آزمایش اول ـ اثر اتانول بر حافظه اجتنابی مهاری. در این آزمایش برای بررسی تأثیر اتانول بر روی حافظه از هشت گروه حیوان استفاده شد. چهار گروه اول ۳۰ دقیقه قبل از آموزش مقادیر مختلف اتانول (۰/۸، ۰/٤، ۰/۲، ۰ گرم بر کیلوگرم) و ۳۰ دقیقه قبل از تست، سالین را به صورت درون صفاقی دریافت کردند. چهار گروه باقیمانده قبل از آموزش اتانول (۰/۸ گرم برکیلوگرم) و در روز آزمون مقادیر مختلف اتانول (۰/۸، ۰/٤، ۰/۲، ۰ گرم برکیلوگرم) را دریافت کردند.

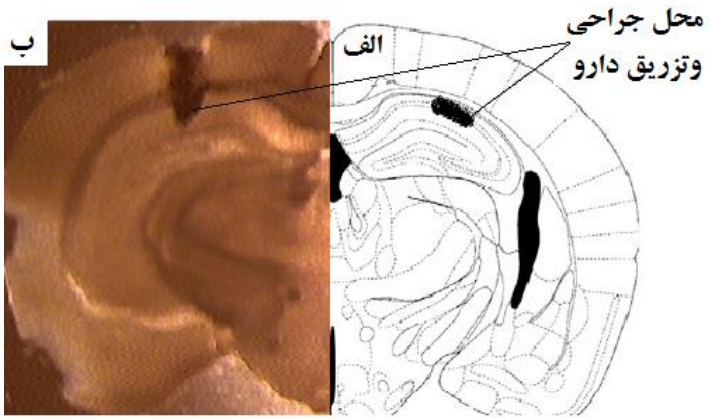
آزمایش دوم ـ اثر نیکوتین بر حافظه اجتنابی مهاری و فراموشی القاء شده با اتانول. در این آزمایش، برای بررسی اثر نیکوتین در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی حافظه تخریب شده با اتانول از هشت گروه حیوان استفاده شد. چهار گروه اول ۳۰ دقیقه قبل از آموزش، سالین را به صورت درون صفاقی و ۵ دقیقه قبل از آزمون مقادیر مختلف نیکوتین (۰/٦ ، ۰/۳ ، ۰/۱، ۰ میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پشتی دریافت کردند. چهارگروه باقیمانده ۳۰ دقیقه قبل از آموزش اتانول (۰/۸ گرم برکیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند و مقادیر مختلف نیکوتین (۰/٦، ۰/۳، ۰/۱، ۰ میکروگرم برموش) را به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پشتی ۵ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

آزمایش سوم ـ اثر سولپیراید بر حافظه اجتنابی مهاری و میانجی گری اثرات بهبود بخش نیکوتین بر فراموشی اتانول. در این آزمایش برای بررسی اثر سولپیراید در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی حافظه از هشت گروه حیوان استفاده شد، چهار گروه اول ۳۰ دقیقه قبل از آموزش، سالین را به صورت درون صفاقی دریافت کردند و در روز

آزمون، مقادیر مختلف سولپیراید (۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰ میکروگرم برموش) را به صورت درون مغزی در ناحیه هیپوکامپ پشتی دریافت داشتند. چهار گروه بعدی در روز آموزش، اتانول (۰/۸ گرم برکیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند و در روز آزمون ابتدا مقادیر مختلف سولپیراید (۰/۲، ۰/۱ ، ۰/۰۵، ۰ میکروگرم برموش) و سپس مقدار موثر نیکوتین (۰/٦ میکروگرم برموش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

نتایج

شکل شماره ۱ مقطع بافتی مربوط به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی که نشان دهنده محل قرار گیری صحیح کانول در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس می‌باشد را نمایش می‌دهد. لازم به ذکر است که تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که محل جراحی آنها در مقایسه با اطلس پاکسینوس صحیح بود، در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت.

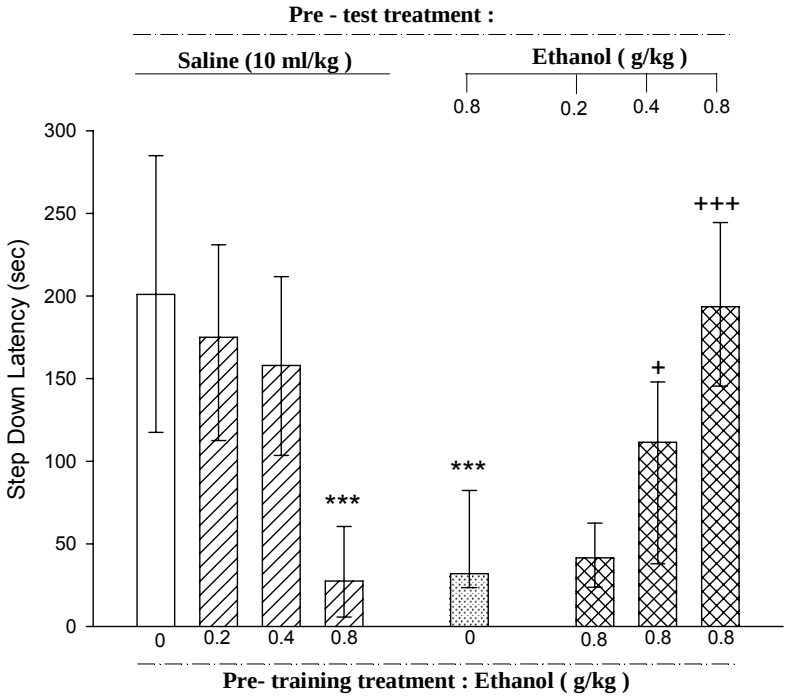


شکل شماره ۱ـ شکل شماتیک بر گرفته از اطلس پاکسینوس که ناحیه CA1 در آن مشخص شده است (الف) و عکس مقطع بافتی مربوط به کانول گذاری در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی (ب) .

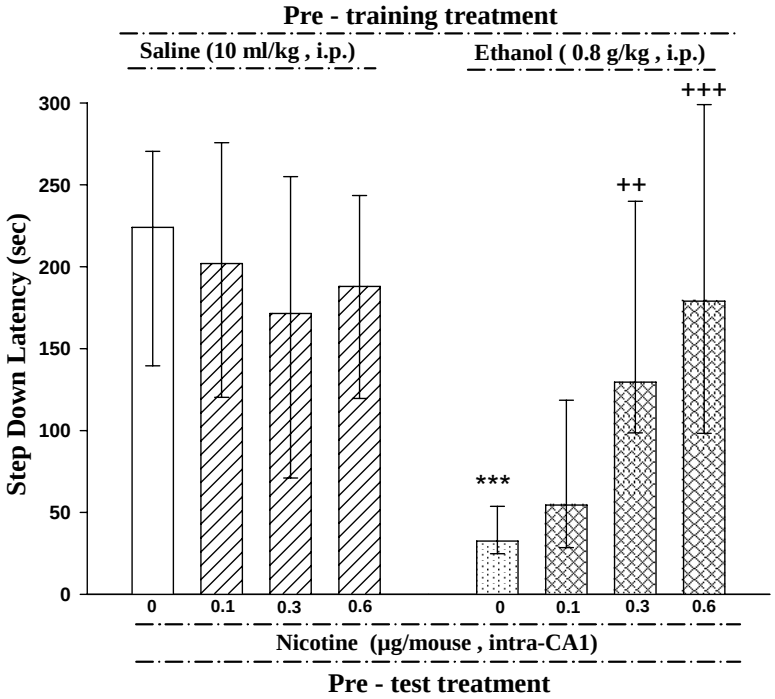
آزمایش اول ـ نتایج تزریق پس از آموزش و قبل از آزمون اتانول بر روی حافظه اجتنابی مهاری در موش-های سوری. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تزریق قبل از آموزش اتانول (۰/۸ گرم بر کیلوگرم) به تنهایی باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌گردد (P < ۰/۰۰۱، H (۳) = ۱۸/۷۸ ، ANOVA) (نمودار ۱ ـ پانل چپ)، بعلاوه تزریق اتانول (۰/۸ و ۰/٤ گرم بر کیلوگرم) قبل از آزمون به موش‌هایی که در روز آموزش نیز تحت تأثیر اتانول (۰/۸ گرم بر کیلوگرم) بوده اند، قادر به بهبود حافظه تخریب شده با اتانول روز آموزش می‌باشد (P < ۰/۰۰۱، H (۳) = ۱۹/۳٦ ، ANOVA) (نمودار ۱ ـ پانل راست).

آزمایش دوم ـ نتایج تزریق نیکوتین بر حافظه اجتنابی مهاری و حافظه اجتنابی مهاری تخریب شده با اتانول. تزریق قبل از آزمون نیکوتین (۰/٦، ۰/۳، ۰/۱، ۰ میکروگرم بر موش) به ناحیه هیپوکامپ پشتی موش‌هایی که در روز آموزش سالین دریافت کرده‌اند، اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری ندارد (P > ۰/۰۵، H(۳) = ۰/۸۳، ANOVA) (نمودار ۲ـ پانل چپ)، از طرف دیگر تزریق نیکوتین (۰/٦ و ۰/۳ میکروگرم بر موش) به موش‌هایی که در روز آموزش تحت تأثیرمقدار موثر اتانول (۰/۸ گرم بر کیلوگرم) بوده‌اند، باعث اصلاح حافظه تخریب شده با اتانول روز آموزش می‌گردد (P < ۰/۰۰۱ ، H (۳) = ۱٦/۵۹ ، ANOVA) (نمودار ۲ ـ پانل راست).

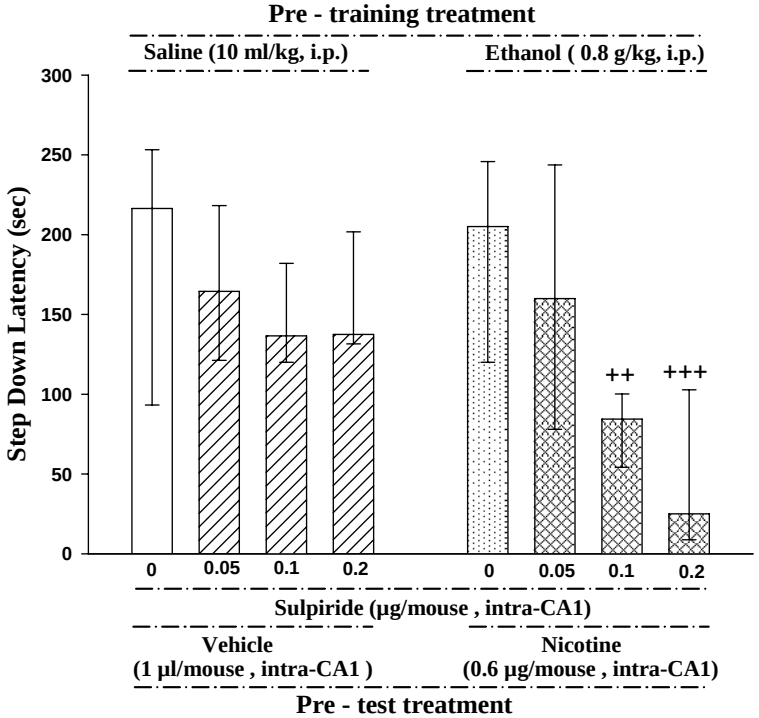
آزمایش سوم ـ اثر سولپیراید بر حافظه اجتنابی مهاری و میانجی گری اثرات بهبود بخش نیکوتین بر فراموشی اتانول. آزمون آماری نشان داد که تزریق قبل از آزمون آنتاگونیست گیرنده D1 دوپامینی (سولپیراید) به ناحیه هیپوکامپ پشتی موش‌هایی که در روز آموزش سالین دریافت کرده اند، به تنهایی اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری ندارد (ANOVA ، H (۳) = ۲/۰۶ ، P> ۰/۰۵) (نمودار ۳ ـ پانل چپ)، اما تزریق سولپیراید (۰/۲ و ۰/۱ میکروگرم بر موش) در روز آزمون قبل از نیکوتین (۰/۶ میکروگرم بر موش) می‌تواند جلوی اثرات بهبودبخش نیکوتین بر روی فراموشی القاء شده با اتانول را بگیرد (ANOVA ، H (۳) = ۱۶/۱۱ ، P < ۰/۰۰۱) (نمودار ۳ ـ پانل راست).



نمودار۱ـ آثار تزریق پیش از آموزش و پیش از آزمون اتانول بر حافظه اجتنابی مهاری. داده‌ها به صورت میانه ± چارک نشان داده شده است.
***P< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین/ سالین و + P < ۰/۰۵ ، +++ P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با سالین/ اتانول می‌باشد.



نمودار ۲ـ آثار تزریق قبل از آزمون نیکوتین بر حافظه اجتنابی مهاری و حافظه اجتنابی مهاری تخریب شده با اتانول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. داده‌ها به صورت میانه ± چارک نشان داده شده است. ***P< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین/ سالین و ++P < ۰/۰۱ و +++P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با اتانول/ سالین می‌باشد.



نمودار ۳ ـ اثر سولپیراید بر حافظه اجتنابی مهاری و میانجی گری اثر اصلاحی نیکوتین بر فراموشی القاء شده با اتانول. داده ها به صورت میانه ± چارک نشان داده شده است . ++P < ۰/۰۱ و +++P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با اتانول / نیکوتین می باشد.

بحث

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق قبل از آموزش یا قبل از آزمون اتانول باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود. نتایج ما همسو با مطالعات پیشین می‌باشند که نشان می‌دهند که اتانول قادر به تخریب حافظه در مدل‌های مختلف یادگیری می‌باشد [۱۸، ۲۱]. شواهد موجود نشان می‌دهد که اتانول بواسطه کاهش رهایش استیل کولین و مهار تقویت دراز مدت سیناپسی در هیپوکامپ باعث تخریب حافظه می‌شود. همچنین مشخص شده است که اتانول تعادل بین ناقل‌های عصبی تحریکی و مهاری را در هیپوکامپ مختل می‌نماید به گونه‌ای که فعالیت گیرنده‌های NMDA کاهش یافته و فعالیت گیرنده‌های گابا افزایش می‌یابد [۷]. مطالعات ما همچنین نشان می‌دهد که تزریق اتانول در روز آزمون به موش هایی که در روز آموزش نیز تحت تأثیر اتانول بوده‌اند قادر به اصلاح فراموشی القاء شده با اتانول روز آموزش می‌باشد. این پدیده یادگیری وابسته به وضعیت نامیده می‌شود. در یادگیری وابسته به وضعیت برای به یادآوری اطلاعاتی که اخیراً کسب شده جاندار باید در همان شرایطی قرار گیرد که اطلاعات در آن شرایط ثبت شده است [۱٤، ۱۵، ۱٦، ۱۸، ۲۸]. گزارشات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد اتانول جوندگان و انسان قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد [۱۸]. علاوه بر اتانول [۱۸]، مورفین [۲۸]، کانابینوئیدها [۱۵] و اسکوپولامین [۱] نیز قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد. مکانیسم واقعی یادگیری وابسته به وضعیت مشخص نمی‌باشد، اما مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سیستم‌های نورترانسمیتری مختلف از جمله دوپامین، گلوتامات، استیل‌کولین و نیتریک‌اکساید در یادگیری وابسته به وضعیت مورفین، کانابینوئیدها، اتانول و اسکوپولامین تا حدودی دخیل می‌باشند [۱، ۱۱، ۲٦].

در بخش بعدی این مطالعه تأثیر نیکوتین بر حافظه تخریب شده با اتانول مورد بررسی قرار گرفت نتایج ما نشان می‌دهد که تزریق نیکوتین در روز آزمون به ناحیه هیپوکامپ پشتی به مانند اتانول روز آزمون قادر به اصلاح فراموشی القاء شده با اتانول روز آموزش می‌باشد. به بیان دیگر نیکوتین در هیپوکامپ پشتی قادر به تقلید اثر اتانول در روز آزمون می‌باشد. نتایج ما همسو با مطالعات پیشینی می‌باشد که نشان می‌دهند که نیکوتین در ناحیه تگمنتوم شکمی، هسته آکومبنس و هیپوکامپ قادر به اصلاح حافظه تخریب شده با مورفین و کانابینوئیدها نیز می باشد [۱٤-۱٦, ۲۸]. گزارشات متعدد نشان می‌دهد که مهار کننده‌های استیل کولین استراز یا داروهایی که گیرنده‌های نیکوتینی یا موسکارینی استیل‌کولین را فعال می‌نمایند باعث بهبود حافظه در مدل‌های مختلف یادگیری می‌شوند، در حالی که آنتاگونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی و موسکارینی باعث تخریب حافظه می‌شوند [۱]. بنابراین می‌توان انتظار داشت که نیکوتین بواسطه فعال کردن گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین در هیپوکامپ و افزایش رهایش استیل کولین، دوپامین و سایر ناقل‌های عصبی کلیدی در پدیده یادگیری و حافظه باعث بهبود حافظه تخریب شده با اتانول شده است. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهند که آگونیست‌های استیل کولین نظیر نیکوتین و مهار کننده‌های استیل کولین استراز که پایداری استیل کولین را در فضای سیناپسی افزایش می‌دهند، اثر بهبودبخش بر روی حافظه اجتنابی مهاری دارند، در حالی که آنتاگونیست‌های استیل کولین باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شوند [۱]. با توجه به اینکه برگشت حافظه طی پدیده‌ای بنام یادگیری وابسته به وضعیت انجام می‌گیرد و لازمه ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت وجود شرایط یکسان در روز آموزش و آزمون می‌باشد، می‌توان بیان داشت که اتانول و نیکوتین در روز آموزش و آزمون شرایط یکسانی را با مکانیسم‌های مختلف ایجاد نموده‌اند. در این زمینه مقبول‌ترین فرضیه این است که در روز آموزش اتانول سطح دوپامین را در هیپوکامپ بالا برده و در روز آزمون نیکوتین این کار را در هیپوکامپ انجام داده است. نتایج مطالعه پیشین ما نشان می‌دهد که آپومورفین

که آگونیست گیرنده دوپامینی D1 و D2 می‌باشد، قادر به تقلید و تقویت اثر بهبود بخش نیکوتین بر روی حافظه تخریب شده با اتانول می‌باشد. این یافته نشان می‌دهد که نیکوتین بواسطه افزایش رهایش دوپامین در هیپوکامپ پشتی اثرات بهبودبخش خود بر حافظه را اعمال می‌نماید، اما این که دوپامین یا آپومرفین بواسطه اثر بر روی گیرنده‌های دوپامینی D1 یا D2 اثر اصلاحی بر حافظه را اعمال می‌نمایند، مشخص نمی‌باشد. لذا در بخش بعدی این مطالعه نقش گیرنده‌های دوپامینی D2 در میانجی گری اثرات بهبود بخش نیکوتین بر روی فراموشی القاء شده با نیکوتین مورد بررسی قرار گرفت. اگر گیرنده‌های دوپامینی D2 در برگشت حافظه توسط نیکوتین دخیل باشند، مهار این گیرنده‌ها جلوی اثرات بهبودبخش نیکوتین بر روی فراموشی القاء شده با اتانول را می‌گیرد. بدین منظور از آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های D2 دوپامینی یعنی سولپیراید استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد با وجود اینکه تزریق قبل از آزمون سولپیراید به تنهایی تأثیری بر حافظه اجتنابی مهاری در هیپوکامپ پشتی ندارد ولی می‌تواند اثر بهبود بخش نیکوتین بر روی فراموشی القاء شده با اتانول را در هیپوکامپ مهار نماید. این یافته نشان می‌دهد که نیکوتین بخشی از اثرات بهبود بخش خود بر روی حافظه را بواسطه فعال‌تر کردن گیرنده‌های دوپامینی D2 انجام می‌دهد. نتایج بدست آمده در این تحقیق همسو با مطالعات پیشینی می باشد که نشان می‌دهد گیرنده‌های دوپامینی D2 می‌تواند فراموشی القاء شده و یادگیری وابسته به وضعیت القاء شده با داروهایی نظیر مورفین و کانابینوئیدها [۱۹، ۲۵] را تحت تأثیر قرار دهد. با وجود اینکه این پژوهش به روشنی نشان می‌دهد که بخشی از اثرات بهبودبخش نیکوتین بر فراموشی القاء شده با اتانول بواسطه گیرنده‌های دوپامینی D2 میانجی-گری می‌شود ولی هنوز این سوال باقی می‌ماند که مهار گیرنده‌های دوپامینی D2 چگونه باعث این کار می‌شود. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد که فعال شدن گیرنده‌های دوپامینی D2 باعث افزایش رهایش استیل کولین در هیپوکامپ می‌شود، در حالی که مهار گیرنده‌های دوپامینی D2 رهایش استیل‌کولین در هیپوکامپ را کاهش می‌دهد [٤]. با توجه به شواهد زیادی که نشان می‌دهند که داروهایی که اثر استیل کولین را تقویت می‌نمایند باعث بهبود حافظه می‌شوند، در حالی که داروهایی که سیستم استیل‌کولینی را تضعیف می‌نمایند عملکرد حافظه را تخریب می‌نمایند [۱]، می‌توان انتظار داشت مهار گیرنده-های دوپامینی D2 بواسطه کاهش رهایش استیل کولین اثر بهبود بخش نیکوتین بر حافظه را خنثی کرده است. با توجه به شواهدی که نشان می‌دهند که نیکوتین رهایش استیل‌کولین در هیپوکامپ را افزایش می‌دهد [۱۸]، می-توان انتظار داشت که آنتاگونیست گیرنده‌های دوپامینی D2 بواسطه کاهش رهایش استیل کولین، افزایش رهایش استیل کولین توسط نیکوتین را خنثی کرده و جلوی اثرات بهبودبخش نیکوتین بر حافظه را گرفته است.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اتانول قادر به تخریب حافظه و ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد. همچنین مشخص شد که تزریق نیکوتین در روز آزمون باعث بهبود فراموشی القاء شده با اتانول می‌شود. اصلی-ترین یافته این پژوهش این است که نیکوتین بواسطه و فعال کردن گیرنده‌های دوپامینی D2 اثر بهبودبخش خود بر فراموشی القاء شده با اتانول را اعمال می‌نماید. به گونه‌ای که مهار گیرنده‌های دوپامینی D2 جلوی اثرات بهبود بخش نیکوتین بر حافظه را می‌گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای دکتر مجید نوائیان که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1- Azami, N.S., M. Piri, S. Oryan, M. Jahanshahi, V. Babapour, M.R. Zarrindast (2010), Involvement of dorsal hippocampal alpha-adrenergic receptors in the effect of scopolamine on memory retrieval in inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(4): 455-62.

2- Batel, P., F. Pessione, C. Maitre, B. Rueff (1995), Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction*, 90(7): 977-80.

3- Gasbarri, A., M.G. Packard, E. Campana, C. Pacitti (1994), Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Research Bulletin*, 33(4): 445-52.

4- Imperato, A., M.C. Obinu, G.L. Gessa (1993), Stimulation of both dopamine D1 and D2 receptors facilitates in vivo acetylcholine release in the hippocampus. *Brain Res*, 618(2): 341-5.

5- Jones, S., J.L. Yakel (1997), Functional nicotinic ACh receptors on interneurones in the rat hippocampus. *Journal of Physiology*, 504 (Pt 3): 603-10.

6- Kameyama, T., T. Nabeshima, T. Kozawa (1986), Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method. Suitability for experimental amnesia models. *Journal of Pharmacological Methods*, 16(1): 39-52.

7- Kenney, J.W., Gould T.J. (2008), Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Molecular Neurobiology*, 38(1):101-21.

8- Levin, E.D., A. Bradley, N. Addy, N. Sigurani (2002), Hippocampal alpha 7 and alpha 4 beta 2 nicotinic receptors and working memory. *Neuroscience*, 109(4): 757-65.

9- Mahmoodi, G., S. Ahmadi, A. Pourmotabbed, S. Oryan, M.R. Zarrindast (2010), Inhibitory avoidance memory deficit induced by scopolamine: Interaction of cholinergic and glutamatergic systems in the ventral tegmental area. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(1): 83-90.

10- Nakauchi, S., R.J. Brennan, J. Boulter, K. Sumikawa (2007), Nicotine gates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region via the activation of alpha2* nicotinic ACh receptors. *European Journal of Neuroscience*, 25(9): 2666-81.

11- Nasehi, M., M. Piri, N. Jamali-Raeufy, M.R. Zarrindast (2010), Influence of intracerebral administration of NO agents in dorsal hippocampus (CA1) on cannabinoid state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Physiology and Behavior*, 100(4): 297-304.

12- Nasehi, M., M. Piri, M. Nouri, D. Farzin, T. Nayer-Nouri, M.R. Zarrindast (2010), Involvement of dopamine D1/D2 receptors on harmane-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. *European Journal of Pharmaco*logy, 634(1-3): 77-83.

13- Pakpour, B., S. Ahmadi, T. Nayer-Nouri, S. Oryan, M.R. Zarrindast (2010), Inhibitory avoidance memory deficit induced by scopolamine: interaction with glutamatergic system in the nucleus accumbens. *Behavioral Pharmacology*, PubMed PMID: 20926947.

14- Piri, M., M. Nasehi, M. Asgariyan, M.R. Zarrindast (2012), Influence of nitric oxide agents in the dorsal hippocampus of mice on anxiogenic-like effect induced by histamine. *Pharmacology Biochemistry* and *Behavior*, 102(3): 391-9.

15- Piri, M., M.R. Zarrindast (2011), Modulation of WIN55, 212-2 state-dependent memory by alpha2-adrenergic receptors of the dorsal hippocampus. *Archives of Iran Medicine*, 14(6):389-95.

16- Piri, M., M.R. Zarrindast (2011), Nitric oxide in the ventral tegmental area is involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neuroscience*, 175: 154-61.

17- Pyapali, G.K., D.A. Turner, W.A. Wilson, H.S. Swartzwelder (1999), Age and dose-dependent effects of ethanol on

the induction of hippocampal long-term potentiation. *Alcohol*, 19(2):107-11.

18- Raoufi, N., M. Piri, A. Moshfegh, M.S. Shahin (2012), Nicotine improves ethanol-induced impairment of memory: possible involvement of nitric oxide in the dorsal hippocampus of mice. *Neuroscience*.

19- Rezayof, A., P. Habibi, M.R. Zarrindast (2011), Involvement of dopaminergic and glutamatergic systems of the basolateral amygdala in amnesia induced by the stimulation of dorsal hippocampal cannabinoid receptors. *Neuroscience*.

20- Rezayof, A., K. Sharifi, M.R. Zarrindast, Y. Rassouli (2008), Modulation of ethanol state-dependent learning by dorsal hippocampal NMDA receptors in mice. *Alcohol*, 42(8): 667-74.

21- Rezayof, A, Zare-Chahoki A, Zarrindast MR, Y. Rassouli (2010), Inhibition of dorsal hippocampal nitric oxide synthesis potentiates ethanol-induced state-dependent memory in mice. *Behavioral Brain Research*, 209(2): 189-95.

22- Sealfon, S.C., C.W. Olanow (2000), Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends of Neuroscience*, 23(10 Suppl): S34-40.

23- Shulz, D.E., R. Sosnik, V. Ego, S. Haidarliu, E. Ahissar (2000), A neuronal analogue of state-dependent learning. *Nature*, 403(6769): 549-53.

24- Wittmann, B.C., B.H. Schott, S. Guderian, J.U. Frey, H.J. Heinze, E. Duzel (2005), Reward-related FMRI activation of dopaminergic midbrain is associated with enhanced hippocampus-dependent long-term memory formation. *Neuron*, 45(3): 459-67.

25- Zarrindast, M.R., M. Dorrani, R. Lachinani, A. Rezayof (2010), Blockade of dorsal hippocampal dopamine receptors inhibits state-dependent learning induced by cannabinoid receptor agonist in mice. *Neuroscience Research*, 67(1): 25-32.

26- Zarrindast M.R., J. Meshkani, A. Rezayof, R. Beigzadeh, P. Rostami (2010), Nicotinic acetylcholine receptors of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala are involved in ethanol-induced conditioned place preference. *Neuroscience*, 168(2): 505-13.

27- Zarrindast, M.R., M. Nasehi, M. Piri, N. Heidari (2011), Effects of cholinergic system of dorsal hippocampus of rats on MK-801 induced anxiolytic-like behavior. *Neuroscience Letter*, 505(2): 65-70.

28- Zarrindast, M.R., M. Piri, M. Nasehi, M. Ebrahimi-Ghiri (2012), Nitric oxide in the nucleus accumbens is involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Pharmacological Biochemistry and Behavior*, 101(1): 166-73.