تأثیر L- آرژنین بر روی اثر بهبودبخش نیکوتین روی فراموشی القاء شده با اتانول

مرتضی پیری[1*]، اعظم مشفق [2]، نسرین رئوفی[3] و مریم السادات شاهین [4]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، گروه زیست شناسی، اردبیل، ایران

۲ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه بیولوژی دریا، لاهیجان، ایران

۳ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران

۴ـ عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرری، گروه زیست شناسی، شهرری، ایران

مسئول مکاتبات:biopiri@yahoo.com

چکیده

نیتریک اکسایدسنتاز در هیپوکامپ پشتی، که یک ناحیه کلیدی از مغز برای میانجی‌گری اثرات رفتاری اتانول و نیکوتین می‌باشد، یافت شده است. در این مطالعه اثر L-arginine پیش ساز نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی، بر اثرات نیکوتین روی فراموشی القاء شده با اتانول مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه تجربی بر روی ۳۰۰ موش های سوری نر انجام شد. موش ها با تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید، بعلاوه زایلزین بی هوش شدند و سپس در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. کانول‌گذاری دوطرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی انجام گردید و موش‌ها در دستگاه یادگیری اجتنابی مدل Step-Down آموزش داده شدند. ۲٤ ساعت بعد از آموزش در روز آزمون تأخیر حیوانات در پایین آمدن از سکو اندازه‌گیری شد. تزریق قبل از آموزش یا قبل از آزمون اتانول (۱ گرم بر کیلوگرم) به یادآوری حافظه را کاهش داد. تزریق نیکوتین یا L- آرژنین قبل از آزمون خود به تنهایی اثری بر روی به یادآوری حافظه ندارد. از طرف دیگر، استفاده از اتانول (۱ ، ۰/۵ گرم بر کیلوگرم)، نیکوتین (۰/۸ ، ۰/٤ میکروگرم بر موش) یا L- آرژنین(۰/۸ میکروگرم بر موش) همراه با مقدار غیرمؤثر نیکوتین نیکوتین (۰/۲ میکروگرم بر موش) باعث برگشت حافظهٔ تخریبی القاء شده با تزریق قبل از آموزش اتانول شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که سیستم نیتریک هیپوکامپ پشتی، نقش مهمی در اثرات بهبود بخش نیکوتین بر روی فراموشی القاء شده با اتانول دارند.

کلمات کلیدی: هیپوکامپ پشتی، فراموشی القاء شده با اتانول، نیکوتین، پیش ساز نیتریک اکساید

مقدمه

معمولاً مصرف سیگار همراه با الکل انجام می‌گیرد و بیشتر افراد الکلی به شدت سیگاری نیز می‌باشند [۲]. اتانول و نیکوتین هر دو بر روی سیستم دوپامینی مزولیمبیک که در تقویت مصرف موادی که مورد سوء مصرف قرار می‌گیرند دخیل می‌باشند، اثر می‌گذارند [۸]. بین نیکوتین و اتانول در سیستم عصبی مرکزی برهمکنش وجود دارد و به نظر می‌رسد گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین در ایجاد این رابطه و برهمکنش دخیل می‌باشد [۹]. برهمکنش بین اتانول و نیکوتین در زمینه حافظه و یادگیری در برخی از مطا لعات نشان داده شده است. در انسان ترکیب نیکوتین و اتانول می‌تواند باعث ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت شود [٤]. همچنین گزارشاتی وجود دارد که نشان می دهد که اتانول از طریق اختلال در عملکرد سیستم کولینرژیک باعث القاء فراموشی می شود[۲۱]. با توجه به اینکه اتانول و نیکوتین اثرات متضادی بر روی حافظه و یادگیری دارند برهمکنش بین این دو دارو خیلی پیچیده می باشد و ابعاد آن هنوز مشخص نشده است [۳]. از طرف دیگر مطالعات نشان می‌دهد که هیپوکامپ نقش مهمی در اختلال حافظه القاء شده توسط اتانول دارد [۲۵]. مطالعات نشان می‌دهد که تزریق اتانول شکل‌گیری تقویت دراز مدت سیناپسی در هیپوکامپ را مهار می‌نماید [۱۷]، که این مهار شکل گیری

تقویت دراز مدت سیناپسی ممکن است در اثر مهار فعالیت گیرنده‌های NMDA و یا تحریک انتقال پیام های گابائرژیک صورت گیرد [۲٤ و ۲۵]. بر خلاف اتانول اثرات بهبود بخش نیکوتین بر حافظه در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است [۷] . مطالعات نشان می‌دهد که نیکوتین باعث بهبود عملکرد شناختی می‌شود و شکل‌گیری تقویت دراز مدت سیناپسی در هیپوکامپ را تنظیم و تعدیل می‌نماید [۱۲]. باید توجه داشت که هیپوکامپ ورودی‌های کولینرژیک زیادی را از بخش میانی سپتوم و بازوی عمودی و افقی بخش موردب بروکا دریافت می‌نماید و این ورودیهای کولینرژیک در یادگیری، حافظه و فرآیند توجه دخیل می‌باشد [۱۰]. گیرنده‌های نیکوتینی هم در نورون‌های هرمی تحریکی و هم در نورون های بینابینی مهاری هیپوکامپ وجود دارد [۵]، 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 [۵].

گزارشات متعدد نشان می‌دهند که تزریق اتانول قبل یا بعد از آموزش باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود و تزریق مجدد اتانول قبل از آزمون باعث بازگشت حافظه تخریب شده توسط اتانول روز آموزش می‌شود [۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۲]. این پدیده یادگیری وابسته به وضعیت خوانده می‌شود، یادگیری وابسته به وضعیت پدیده ای است که در آن به یادآوری اطلاعاتی که جدیداً کسب شده‌اند تنها هنگامی امکان پذیر می‌باشد که حیوان از لحاظ حسی و فیزیولوژیک در همان شرایطی قرار گیرد که در هنگام کدبندی اطلاعات در آن شرایط قرار داشته است [۱ و۱۵]. مطالعات قبلی همچنین نشان می‌دهد که نیکوتین روز آزمون به مانند اتانول روز آزمون قادر به اصلاح حافظه تخریب شده با اتانول می‌باشد و گیرنده-های NMDA ناحیه هیپوکامپ پشتی نقش مهمی در این اثر اصلاحی نیکوتین دارند، به گونه‌ای که تزریق آنتاگونیست گیرنده NMDA به هیپوکامپ پشتی در روز آزمون جلوی بازگشت حافظه توسط نیکوتین روز آزمون را می‌گیرد [۲۲]. نیتریک اکساید یک میانجی عصبی گازی شکل می‌باشد که بعد از فعال شدن گیرنده NMDA توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از L ـ آرژنین ساخته می‌شود [۱۱]. مطالعات نشان می‌دهند که نیتریک اکساید در تقویت دراز مدت سیناپسی (LTP)، تغییر شکل سیناپسی و به تبع آن در حافظه و یادگیری نقش دارد [۳۰]، مدل‌های مختلف یادگیری از جمله یادگیری حرکتی [۲٦]، یادگیری اجتنابی غیرفعال [۱۸] و حافظه فضایی [۱۳] تحت تأثیر سیستم نیتریک اکساید قرار می-گیرند. با توجه به این که تولید نیتریک اکساید بعد از فعال شدن گیرنده‌های NMDA صورت می‌گیرد و خود نیتریک اکساید بعد از تولید باعث رهایش دوپامین و گلوتامات می‌شود [۱۵] و با در نظر داشتن اینکه اتانول، نیکوتین و نیتریک اکساید هر سه یادگیری و حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهند، در این مطالعه برای اولین بار نقش نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی در میانجی‌گری اثرات نیکوتین بر روی یادگیری وابسته به وضعیت اتانول مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

حیوانات: در این مطالعه تجربی از موش‌های کوچک آزمایشگاهی 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 موش ها 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 هشت‌تایی قرار داده شدند و هر حیوان فقط یک بار استفاده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام گرفت.

دستگاه یادگیری اجتنابی: دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال، مدل Step-down، جعبه چوبی به ابعاد

(٤٠×٣٠× ٣٠ سانتی متر) می باشد. کف دستگاه دارای ٢٩ میله فولادی با قطر ٠/٣ سانتی‌متر می‌باشد که به فاصله ١ سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفته‌اند، این میله‌ها به دستگاه تحریک کننده 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.

داروها: داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از اتانول، نیکوتین و L- آرژنین که بلافاصله قبل از آزمایش‌ها داروهای نیکوتین و L- آرژنین در سرم فیزیولوژیک استریل ٠/٩ درصد استریل حل گردیدند و pH نیکوتین بعد از حل شدن در سرم فیزیولوژیک ٠/٩ درصد توسط سود ٠/١ نرمال به محدوده ٧/٤ رسید.

روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه هیپوکامپ پشتی (CA1): موش های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (١٠٠ میلی گرم بر کلیو گرم) بعلاوه گزیلزین (١٠ میلی گرم بر کلیو گرم) بی هوش شدند . بعد از بی هوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند و دو کانول راهنما (اندازه ٢٢) یک میلی متر بالاتر از محل تزریق ، بر اساس اطلس پاکسینوس (٢٠٠١) قرار داده شد. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی عبارت بود از: ٢- = AP ، ±١/٦ = ML ، ١/٥- = V [٢٨]. 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 ٥ تا ٧ 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 موش های کوچک آزمایشگاهی می‌باشد [٦]. در این روش، بررسی حافظه در دو روز متوالی و بین ساعت ٨ صبح تا ٢ بعد از ظهر انجام می شود. روز اول یا روز آموزش (Training day) شامل آموزش دادن حیوان ها در دستگاه می باشد و در روز دوم یا روز آزمون (Testing day) میزان حافظه حیوان های آموزش دیده بررسی می شود .

٢-٥-١- **مرحله آموزش:** در روز آموزش هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار می گیرد و مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت می‌شود. در صورتی که هر موش بیش از ٢٠ ثانیه روی سکو بماند آن موش حذف می‌شود. بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای مؤثر بر روی میله‌های فولادی شوک الکتریکی به مدت ١٥ثانیه (١هرتز، ٠/٥ ثانیه و ٤٥ ولت مستقیم) توسط حیوان دریافت می‌شود.

٢-٥-٢- **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 اندازه‌گیری می‌شود، که حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف cut-off) برابر با ٣٠٠ ثانیه می-باشد 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 ٢٧ که ٩ میلی متر طول داشت و به کت دان تیوب نوزاد (شماره ٤) متصل بود، در داخل کانول راهنما شماره ٢٢ قرار داده شد و در هر کانول ٠/٥ میکرولیتر دارو در مدت ٩٠-٦٠ ثانیه تزریق شد. در طول تزریق به حیوان اجازه داده شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

بافت‌شناسی: پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم، ۰/۵ میکرولیتر رنگ متیلن بلو ۱ ٪ 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 آنالیزواریانس یکطرفه (ANOVA) برای داده‌های غیرپارامتریک (Kruskal- wallis) و به دنبال آن برای بررسی جفت گروه‌ها از روش Mann- withy و-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 نرم افزار SPSS و رسم نمودارها از نرم افزار Sigmaplot استفاده شد.

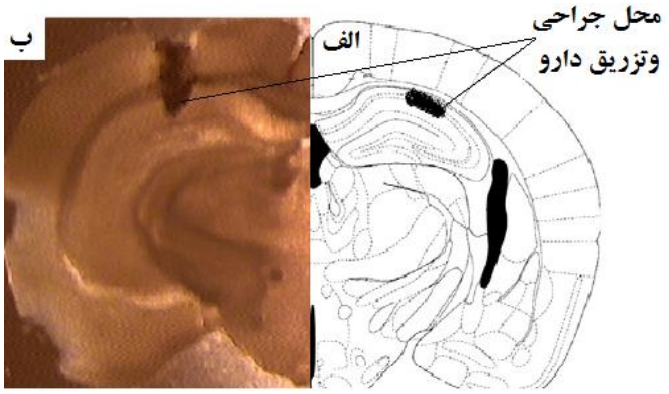
تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده: ۲-۹-۱-

آزمایش اول : 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 (۱، ۰/۵ ، ۰/۲۵، ۰ گرم برکیلوگرم) و۳۰ دقیقه قبل از تست، سالین را به صورت درون صفاقی دریافت کردند. چهار گروه باقیمانده اتانول (۱ یا ۰ گرم برکیلوگرم) را قبل از آموزش دریافت کرده و در روز آزمون مقادیر مختلف اتانول (۱ ، ۰/۵ ، ۰/۲۵ ، ۰ گرم برکیلوگرم) را دریافت کردند.

آزمایش دوم : در این آزمایش، برای بررسی اثر نیکوتین در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی حافظه تخریب شده با اتانول از دوازده گروه حیوان استفاده شد. چهار گروه اول بلافاصله قبل از آموزش، سالین را به صورت درون صفاقی و ۵ دقیقه قبل از آزمون مقادیر مختلف نیکوتین (۰/۸ ، ۰/٤ ، ۰/۲، ۰ میکروگرم برموش) را به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پشتی دریافت کردند. هشت گروه باقیمانده قبل از آموزش اتانول (۱ گرم برکیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند، چهار گروه از این موش‌ها در روز آزمون سالین را به صورت درون صفاقی و مقادیر مختلف نیکوتین (۰/۸ ، ۰/٤ ، ۰/۲، ۰ میکروگرم برموش) را به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پشتی قبل از آزمون دریافت کردند. چهار گروه بعدی مقادیر مختلف نیکوتین را به همراه مقدار غیر مؤثر اتانول (۰/۲۵ گرم برکیلوگرم) در روز آزمون دریافت کردند.

آزمایش سوم : در این آزمایش برای بررسی اثر L- آرژنین در ناحیه هیپوکامپ پشتی بر روی حافظه از هشت گروه حیوان استفاده شد، چهار گروه اول بلافاصله قبل از آموزش ، سالین را به صورت درون صفاقی دریافت کردند و در روز آزمون، مقادیر مختلف L- آرژنین (۰/۸ ، ۰/٤ ، ۰/۲، ۰ میکروگرم برموش) را به صورت درون مغزی در ناحیه هیپوکامپ پشتی دریافت داشتند. چهار گروه بعدی در روز آموزش، اتانول (۱ گرم برکیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند و در روز آزمون ۵ دقیقه قبل از تست، مقادیر مختلف L- آرژنین (۰/۸ ، ۰/٤ ، ۰/۲، ۰ میکروگرم برموش) را به همراه مقدار غیر مؤثر نیکوتین (۰/۲ میکروگرم بر موش) به صورت درون مغزی درداخل ناحیه هیپوکامپ پشتی دریافت داشتند.

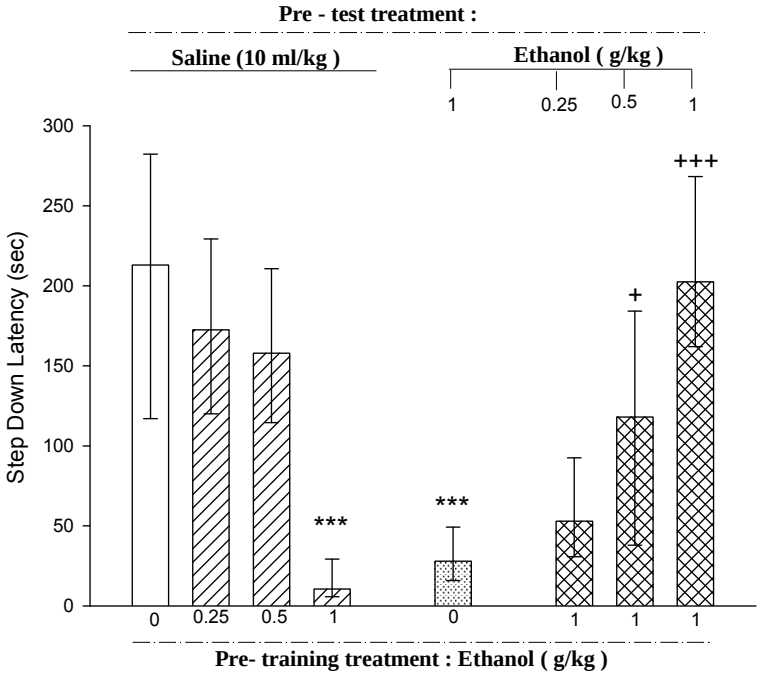
شکل ۱ مقطع بافتی مربوط به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی که نشان دهنده محل قرار گیری صحیح کانول در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس می باشد را نمایش می‌دهد. لازم به ذکر است که تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که محل جراحی آنها در مقایسه با اطلس پاکسینوس صحیح بود، در آنالیز آماری مورد استفاده قرار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



شکل 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) .

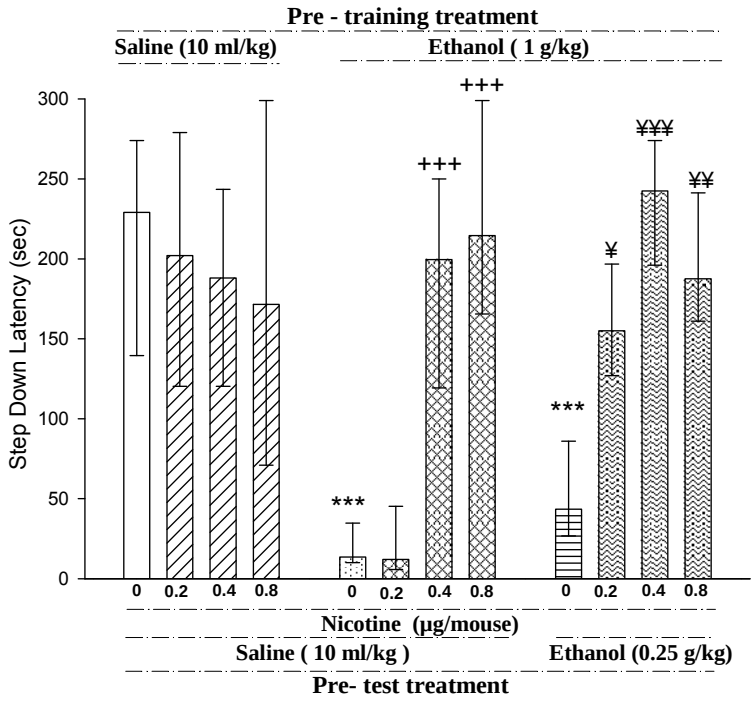
نتایج

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 یا قبل از آزمون اتانول (۱ گرم بر کیلوگرم) به تنهایی باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌گردد ($P < ۰/۰۰۱$) حافظه را تغییر می‌دهد بعلاوه بکار بردن اتانول قبل از آزمون قادر به بهبود حافظه تخریب شده با اتانول روز آموزش می‌باشد ($P < ۰/۰۰۱$).



نمودار ۱ – آثار تزریق قبل از آموزش و پیش از آزمون اتانول بر حافظه اجتنابی مهاری. داده‌ها به صورت میانه ± چارک نشان داده شده است. ۰/۰۰۱ >P*** در مقایسه با گروه سالین/ سالین و ۰/۰۰۱ > P +++ ، ۰/۰۵ >P+ در مقایسه با سالین/ اتانول می‌باشد.

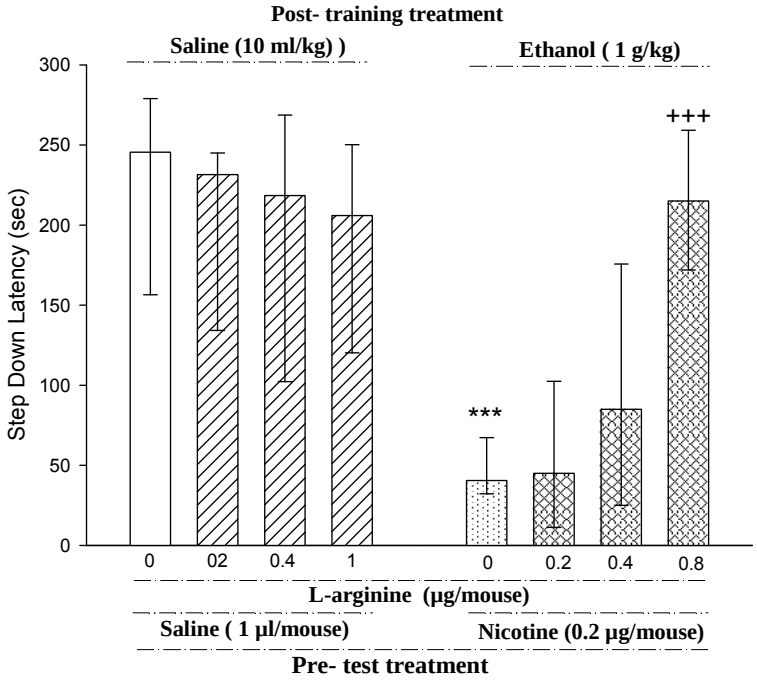
آزمایش دوم ـ نتایج تزریق نیکوتین بر حافظه اجتنابی مهاری و حافظه اجتنابی مهاری تخریب شده با اتانول: تزریق قبل از آزمون نیکوتین به ناحیه هیپوکامپ پشتی موش‌هایی که در روز آموزش سالین دریافت کرده‌اند اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری ندارد (P > ۰/۰۵). از طرف دیگر تزریق نیکوتین به تنهایی یا همراه با مقدار غیر مؤثر اتانول به موش‌هایی که در روز آموزش تحت تأثیر اتانول بوده‌اند، باعث اصلاح حافظه تخریب شده با اتانول می‌گردد (P < ۰/۰۰۱).



نمودار ۲ – آثار تزریق قبل از آزمون نیکوتین بر حافظه اجتنابی مهاری و حافظه اجتنابی مهاری تخریب شده با اتانول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. داده ها به صورت میانه ± چارک نشان داده شده است . ۰/۰۰۱ >P*** در مقایسه با گروه سالین/ سالین ، ۰/۰۰۱ > P+++ در مقایسه با اتانول/ سالین و ۰/۰۰۱ >P ¥¥¥ ، ۰/۰۱ >P ¥¥¥ و ۰/۰۵ >P ¥¥¥ در مقایسه با اتانول/ اتانول می باشد.

آزمایش سوم ـ نتایج تزریق L ـ آرژنین به تنهایی و همراه با دوز غیر مؤثر نیکوتین بر حافظه اجتنابی مهاری: آزمون آماری نشان داد که تزریق قبل از آزمون L ـ آرژنین به ناحیه هیپوکامپ پشتی موش‌هایی که در روز آموزش سالین دریافت کرده‌اند، اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری ندارد (P>۰/۰۵). اما تزریق همین L ـ آرژنین (۰/۸ میکروگرم برموش) همراه مقدار غیرمؤثر

نیکوتین به طور معنی‌داری حافظه تخریب شده با اتانول روز آموزش را اصلاح می‌نمایند (P < ۰/۰۰۱).



نمودار ۳ – آثار تزریق قبل از آزمون L ـ آرژنین به تنهایی و همراه با 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 < ۰/۰۰۱ در مقایسه با اتانول/ نیکوتین می‌باشد.

بحث

داروهایی که مورد سوء مصرف قرار می‌گیرند مانند اتانول و نیکوتین، به صورت محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در پاسخ به مصرف آنها میزان فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی افزایش یافته و باعث رهایش بیشتر دوپامین در هسته آکومبنس، آمیگدال و هیپوکامپ می‌شود [۲۰]. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق قبل از آموزش اتانول باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود. نتایج ما همسو با مطالعاتی می‌باشند که نشان می‌دهند تزریق پس یا پیش از آموزش اتانول باعث تخریب حافظه در مدل‌های مختلف یادگیری از جمله یادگیری اجتنابی مهاری می‌شود [۱۹–۲۲, ۲۹]. همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که تزریق پیش از آزمون اتانول به حیواناتی که در روز آموزش نیز اتانول دریافت کرده‌اند باعث بهبود حافظه تخریب شده با اتانول روز آموزش می‌شود، 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 [۱۹ و ۲۰]. مکانیسم واقعی یادگیری وابسته به وضعیت مشخص نمی‌باشد، اما مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سیستم های نورترانسمیتری مختلف از جمله دوپامین، گلوتامات، استیل کولین و نیتریک اکساید در یادگیری وابسته به وضعیت مورفین تا حدودی دخیل می‌باشند [۱۹–۲۳,

۲۷]. اتانول تولید نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۳]. مطالعات نشان می‌دهد که اتانول به مانند آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA عمل می نماید و با توجه به اینکه تحریک گیرنده‌های NMDA تولید نیتریک اکساید را در نواحی مختلف مغز تحریک می نماید[۲۲, ۲۳]، می توان انتظار داشت که مهار گیرنده های NMDA توسط اتانول تولید نیتریک اکساید را کاهش دهد. نیکوتین برخلاف اتانول باعث افزایش تولید نیتریک اکساید در نواحی مختلف مغز می-شود [۱۵]. با در نظر گرفتن این شواهد این احتمال مطرح می‌شود که سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پشتی در تخریب حافظه ایجاد شده توسط اتانول و یادگیری وابسته به وضعیت اتانول دخیل می‌باشد.

از طرف دیگر مطالعات نشان می دهند که بین سیستم نیتریک اکساید با نیکوتین برهمکنش وجود دارد [۱۵, ۲۳]. مطالعات نشان می‌دهد که نیکوتین به واسطه افزایش رهایش گلوتامات و فعال نمودن گیرنده‌های NMDA باعث افزایش تولید نیتریک اکساید می‌گردد [۱۵]. شواهد فوق نشان می‌دهند این احتمال وجود دارد که در زمینه یادگیری اجتنابی غیرفعال نیز در هیپوکامپ پشتی بین این سیستم‌ها یک برهمکنش پیچیده وجود داشته باشد. لذا در این مطالعه ابتدا اثر نیکوتین بر روی یادگیری وابسته به وضعیت اتانول مورد مطالعه قرار گرفته و سپس اثر تزریق پیش از آزمون L- آرژنین (پیش‌ساز نیتریک اکساید، که به عنوان آگونیست نیتریک اکساید عمل می‌نماید) در هیپوکامپ پشتی در میانجی گری اثرات نیکوتین بر روی یادگیری وابسته به وضعیت اتانول مورد بررسی قرار گرفته است. همسو با مطالعات پیشین، نتایج ما نشان می-دهند، تزریق نیکوتین در روز آزمون باعث بهبود حافظه تخریب شده با اتانول روز آزمون می‌شود [۱۹ و ۲۲]، به عبارت دیگر نیکوتین قادر به تقلید عملکرد اتانول روز آزمون می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهند که اتانول و نیکوتین اثرات مشابه زیادی در بدن ایجاد می نمایند، مشخص شده نیکوتین مانند اتانول می‌تواند نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه تگمنتوم شکمی را فعال نماید و آزاد سازی دوپامین در نواحی هدف مانند هیپوکامپ را افزایش دهد [۱۵ و ۲۰]، بنابراین احتمال دارد که نیکوتین با اثر بر روی گیرنده‌های پیش سیناپسی موجود در پایانه اکسونی نورون هایی که از ناحیه تگمنتوم شکمی منشاء گرفته‌اند، رهایش دوپامین را به مانند اتانول افزایش دهد و شرایط یکسانی در روز آموزش و آزمون با مکانیسم-های مختلف ایجاد گردد، که لازمه شکل‌گیری یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد. تقویت اثر نیکوتین توسط مقدار غیر مؤثر اتانول نیز تائید کننده این فرضیه می‌باشد، چرا که مقدار غیر مؤثر نیکوتین و اتانول همراه با هم قادر به بهبود فراموش القاء شده با اتانول روز آموزش می-باشند. از طرف دیگر همسو با نتایج بدست آمده در این مطالعه اثرات بهبود بخش نیکوتین بر روی حافظه تخریب شده با مورفین [۱۵] و کانابینوئیدها [۱۵, ۱٦] نشان داده شده است. ویژگی مشترک تمامی این مواد فعال کردن نورون های دوپامینی ناحیه تگمنتوم شکمی و افزایش دوپامین در نواحی هدف نظیر هیپوکامپ می باشد[۱٤-۱٦].

نتایج ما نشان می‌دهند که تزریق قبل از آزمون L-آرژنین، پیش ساز نیتریک اکساید، که به عنوان آگونیست نیتریک اکساید عمل می‌نماید به تنهایی اثری بر روی حافظه اجتنابی مهاری ندارد. اما تزریق آن همراه با مقدار غیر مؤثر نیکوتین می‌تواند حافظه تخریب شده با اتانول روز آموزش را اصلاح نماید، این مشاهدات نشان دهنده برهمکنش بین سیستم نیکوتینی و نیتریک اکسایدی در زمینه حافظه اجتنابی مهاری در ناحیه هیپوکامپ پشتی می‌باشند. در مورد دلیل پاسخ بروز داده می توان بیان داشت که نیکوتین قادر به افزایش رهایش گلوتامات و فعال‌تر کردن گیرنده‌های NMDA می‌باشد. با توجه به اینکه فعال شدن گیرنده های NMDA باعث افزایش تولید نیتریک اکساید می‌گردد، می‌توان انتظار داشت که تزریق L- آرژنین به واسطه افزایش تولید نیتریک اکساید در هیپوکامپ اثر نیکوتین در افزایش تولید نیتریک اکساید

را تقویت می‌نماید، به گونه‌ای که در حضور L- آرژنین حتی مقدار غیر مؤثر نیکوتین نیز می‌تواند حافظه تخریب شده با اتانول را بهبود بخشد.

در راستای مطالعات قبلی، نتایج ما در این پژوهش نشان می‌دهد که اتانول قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد و تزریق نیکوتین در روز آزمون، به موش‌هایی که در روز آموزش مقدار مؤثر اتانول را دریافت کرده اند، باعث بهبود حافظه اجتنابی مهاری تخریب شده با اتانول روز آموزش می شود. همچنین نتایج ما در این پژوهش نشان می دهد که سیستم نیتریک اکساید ناحیه هیپوکامپ پشتی نقش مهمی در میانجی‌گری اثر بهبود بخش نیکوتین بر حافظه تخریب شده با اتانول دارد. شواهد بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که نیکوتین بواسطه افزایش تولید نیتریک اکساید در روز آزمون فراموشی القاء شده با اتانول را اصلاح می‌نماید.

منابع

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

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

3. Dawson D.A. (2000), Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend*, 59(3): 235-49.

4. Gould TJ, Collins AC, Wehner JM. (2001), Nicotine enhances latent inhibition and ameliorates ethanol-induced deficits in latent inhibition. *Nicotine Tob Res*, 3(1): 17-24.

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

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

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

8. Larsson A, Engel JA. (2004), Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(8): 713-20.

9. Larsson A., Svensson L., Soderpalm B., Engel J.A. (2002), Role of different nicotinic acetylcholine receptors in mediating behavioral and neurochemical effects of ethanol in mice. *Alcohol*, 28(3): 157-67.

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

11. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. (1991), Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43(2): 109-42.

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

13. Okere C.O., Kaba H., Higuchi T. (1996), Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. *Neuroscience*, 71(2): 349-54.

14. Piri M., Nasehi M., Zarrindast M.R. (2010), Interactions between the Cannabinoid and Nicotinic Systems in

Inhibitory Avoidance Learning in Mice. *Journal of Rafsenjan University of Medical Sciences,* 9(3): 162-74.

15. Piri M., Zarrindast M.R. (2011), Nitric oxide in the ventral tegmental area is involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neuroscience.*

16. Piri M., Zarrindast M.R., Oryan S. (2009), Effects of cannabinoidergic system of CA1 area of dorsal hippocampus on the memory of nicotine sensitized rats. *Advance in Cognitive Science,* 11(2): 27-37.

17. Pyapali GK., Turner D.A., Wilson W.A., Swartzwelder H.S. (1999), Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. *Alcohol,* 19(2): 107-11.

18. Qiang M., Chen Y.C., Wang R., Wu F.M., Qiao J.T. (1997), Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: studies using passive avoidance response and Morris water maze task. *Behav Pharmacol,* 8(2-3): 183-7.

19. Rezayof A., Alijanpour S., Zarrindast M.R., Rassouli Y. (2008), Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. *Neurobiol Learn Mem,* 89(4): 441-7.

20. Rezayof A., Motevasseli T., Rassouli Y., Zarrindast M.R. (2007), Dorsal hippocampal dopamine receptors are involved in mediating ethanol state-dependent memory. *Life Sci,* 80(4): 285-92.

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

22. Rezayof A., Shirazi-Zand Z., Zarrindast M.R., Nayer-Nouri T. (2010), Nicotine improves ethanol-induced memory impairment: the role of dorsal hippocampal NMDA receptors. *Life Sci,* 86(7-8): 260-6.

23. Rezayof A., Zare-Chahoki A., Zarrindast M.R., Rassouli Y. (2010), Inhibition of dorsal hippocampal nitric oxide synthesis potentiates ethanol-induced state-dependent memory in mice. *Behav Brain Res,* 209(2): 189-95.

24. Schummers J., Browning M.D. (2001), Evidence for a role for GABA(A) and NMDA receptors in ethanol inhibition of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res,* 94(1-2): 9-14.

25. White A.M., Matthews D.B., Best P.J. (2000), Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus,* 10(1): 88-93.

26. Yanagihara D., Kondo I. (1996), Nitric oxide plays a key role in adaptive control of locomotion in cat. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 93(23): 13292-7.

27. Zarrindast M.R., Meshkani J., Rezayof A., Beigzadeh R., Rostami P. (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.

28. Zarrindast M.R., Nasehi M., Piri M., Bina P. (2010), Anxiety-like behavior induced by histaminergic agents can be prevented by cannabinoidergic WIN55,212-2 injected into the dorsal hippocampus in mice. *Pharmacol Biochem Behav,* 94(3): 387-96.

29. Zarrindast M.R., Rezayof A. (2004), Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol,* 497(2): 197-204.

30. Zorumski C.F., Izumi Y. (1998), Modulation of LTP induction by NMDA receptor activation and nitric oxide release. *Prog Brain Res,* 118: 173-82.