

## Effect of Pentylenetetrazol on Morphine State-Dependent Memory in Rat

Marziyeh Tavassoli<sup>1</sup>, Azam Alinaghypour<sup>1</sup>, Abolfazl Ardjmand<sup>2\*</sup>

1. MSc Student in Medical Physiology, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

2. Associate Professor, PhD of Neuroscience, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Received: 10 Jul 2017, Accepted: 2 Aug 2017

### Abstract

**Background:** Learning and memory are among the higher functions of the brain. State-dependent memory (STM) is a type of memory in which the recall of a learned behavior is happen only in the same sensory and physiologic condition in which the behavior is encoded. The STM is seen with some drugs, e.g. the morphine. The pentylenetetrazol (PTZ) is a durg which is used for the induction of seizure in experimental models. Some studies have been revealed different effects of the PTZ on brain higher function (learning, memory ...). The aim of present study was to explore the effect of PTZ on morphine-induced STM.

**Materials and Methods:** In this study, male adult Wistar rats (190-220 g) were used. Animals in 3 groups (n=8) during 3 sessions (learning/memory, STM and interaction) were studied. During 48 hour (training and test) the learning and memory of animals were studied in inhibitory avoidance apparatus. The step-through latency in the test day was used as a criterion for memory. Post-training injection of saline or morphine (2.5, 5 and 7.5 mg/kg-ip) in different groups was carried out. In addition, the pre-test injection of morphine at the same doses was made to study the STM. Moreover, the interaction of pre-test single-dose PTZ (60 mg/kg-ip) on STM was studied. The locomotion of the animals was measured using the open field.

**Results:** The post-training injection of morphine (2.5, 5 and 7.5 mg/kg-ip) impaired the inhibitory memory of rats compared to control group ( $p<0.001$ ). The post-training and pre-test injections of the same dose of morphine (7.5 mg/kg-ip) reversed the impaired memory compared to morphine (2.5 and 5 mg/kg-ip), ( $p<0.001$ ). The pre-test PTZ (60 mg/kg-ip) maintained the morphine (7.5 mg/kg-ip) STM ( $p<0.001$ ).

**Conclusion:** The present study revealed that the post-training ip injection of different doses of morphine results in the impairment of inhibitory avoidance memory in rat. In addition, the pre-test injection of the same doses of morphine reverses the impaired memory. This process is called STM. Consequently, the pre-test injection of PTZ maintains the morphine STM.

**Keywords:** Avoidance learning, Morphine, Pentylenetetrazol, State-dependent.

\*Corresponding Author

Address: Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran  
Email: ardjmand\_ab@kaums.ac.ir

## بررسی اثر پنتیلین تترازول بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی

مرضیه توسلی<sup>۱</sup>، اعظم علی نقی پور<sup>۱</sup>، ابوالفضل ارجمند<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. دانشیار، دکتری علوم اعصاب، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۹، تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** حافظه و یادگیری از فرآیندهای برتر مغزی محسوب می شوند. حافظه وابسته به وضعیت (STM)، پدیده ای است که در آن یادآوری اطلاعات تازه کسب شده تنها در شرایطی صورت می گیرد که موجود از لحاظ فیزیولوژیک در همان شرایطی قرار گیرد که اطلاعات در همان شرایط رمزگذاری شده است. پدیده STM را می توان با داروهایی مثل مورفین ایجاد کرد. پنتیلین تترازول (PTZ) دارویی است که برای القای تشنج در مدل های آزمایشگاهی استفاده می شود. مطالعات چندی بیان گر آثار مختلف این دارو بر روی فرآیندهای برتر مغزی (حافظه و یادگیری و...) است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر پنتیلین تترازول (PTZ) بر روی STM ناشی از مورفین بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه از موش های بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ (۲۲۰-۱۹۰ گرم) نژاد ویستار، استفاده شد. حیوانات در ۳ گروه ۸ تایی، طی ۳ مرحله آزمایش (شامل حافظه/یادگیری، بررسی وابسته به وضعیت و اثر تداخل) مورد مطالعه قرار گرفتند. یادگیری و حافظه حیوانات در دستگاه یادگیری اجتنابی و طی ۲ روز (آموزش و آزمون) بررسی شد. مدت زمان تأخیر ورود حیوان به محفظه تاریک دستگاه به عنوان ملاکی برای سنجش حافظه استفاده شد. در روزهای پس از آموزش، سالیان یا دوزهای مختلف مورفین (۵، ۲/۵، ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم- درون صفاقی) در گروه های مختلف تجویز شد. علاوه بر این، تزریق قبل از آزمون دوزهای مشابه مورفین برای یادگیری وابسته به وضعیت مورفین بررسی شد. هم چنین اثر تزریق قبل از آزمون تک دوز PTZ (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم- درون صفاقی) به همراه مورفین وابسته به وضعیت مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت حرکتی حیوانات توسط دستگاه open-field اندازه گیری شد.

**یافته ها:** تزریق داخل صفاقی پس از آموزش مورفین (۵، ۲/۵، ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش حافظه اجتنابی موش بزرگ آزمایشگاهی شد ( $p < 0.001$ ). تزریق بعد از آموزش و قبل از آزمون دوزهای مشابه مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با دوز ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین، سبب فراخوانی حافظه شد ( $p < 0.001$ ). علاوه بر این، تزریق پیش از آزمون ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم PTZ باعث حفظ STM ناشی از دوز ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین شد ( $p < 0.001$ ).

**نتیجه گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که تزریق داخل صفاقی مورفین پس از آموزش در دوزهای مختلف باعث اختلال حافظه اجتنابی موش بزرگ آزمایشگاهی می شود. به علاوه، تزریق قبل از آزمون دوزهای مشابه مورفین اختلال حافظه ناشی از مورفین را بازگرداند. این پدیده حافظه وابسته به وضعیت محسوب می شود. هم چنین، این مطالعه نشان داد که تزریق پیش از آزمون PTZ باعث حفظ STM ناشی از مورفین در حیوان می گردد.

**واژگان کلیدی:** یادگیری اجتنابی، مورفین، پنتیلین تترازول، وابسته به وضعیت

\*نویسنده مسئول: ایران، کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

Email: ardjmand\_ab@kaums.ac.ir

## مقدمه

کنداکنانس کلری القاء شده با نوروتراسمیترا کاهش می دهد (۹). در طی مطالعاتی به کاهش حافظه و یادگیری توسط PTZ اشاره شده است (۱۰). در اکثر مطالعات حیوانی اثرات مورفین و PTZ هر کدام به تنهایی روی حافظه و یادگیری در مدل های مختلف بررسی شده است. با در نظر گرفتن این نکته که از دیدگاه فارماکولوژیک گاه اثر جداگانه دو دارو در مواردی قابل جمع بندی نیست و اثر توأم دو دارو ممکنست از اثر جداگانه هر یک از آنها متفاوت باشد و اینکه در موارد بالینی ممکنست ما شاهد سوء مصرف مورفین در افرادی با سابقه تشنج باشیم و یا برعکس، این نوع مطالعه ممکن است در واقع شبیه سازی تجربی از موارد مشابهی باشد که در بالین اتفاق می افتد. با در نظر گرفتن این نکات و لحاظ کردن اختلالات حافظه ایجاد شده در شرایط مذکور اهمیت این نوع مطالعه دو چندان جلوه میکند. با عنایت به اینکه طبق اطلاعات ما تاکنون در مورد اثرات این دو ماده در مدل یادگیری وابسته به وضعیت و شرایط مذکور مطالعه ای صورت نگرفته است، هدف این مطالعه بررسی اثر مورفین و پنتیلین تترازول بر یادگیری اجتنابی در موش بزرگ آزمایشگاهی بود.

## مواد و روش ها

برای این مطالعه تجربی، ۸۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر، نژاد ویستار (وزن ۱۹۰-۲۲۰ گرم) از مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه شد. حیوانات بعد از انتقال به حیوانخانه تحقیقاتی، در قفس های چهار تایی با دوره شبانه روزی (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای  $22 \pm 3$  درجه سانتی گراد، با آب و غذای کافی نگهداری شدند. تمامی مراحل آزمایش از مرحله تکثیر تا انجام آزمایشات و در نهایت معدوم کردن آن ها مطابق با قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی و اصول مصوب کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان و با کد اخلاق IR.KAUMS.REC.1395.72 صورت گرفت.

یادگیری عبارت است از کسب مهارت جدید و یا اصلاح و ارتقاء دانش ها، مهارت ها، ارزش ها و یا اولویت های موجود که ممکن است شامل انواع مختلف اطلاعات باشد (۱). یادگیری وابسته به وضعیت (STM) پدیده ای است که در آن یادآوری اطلاعات تازه کسب شده تنها در شرایطی صورت می گیرد که فرد از لحاظ حسی و فیزیولوژیک در همان شرایطی قرار گیرد که اطلاعات در همان شرایط کد شده است (۲). حافظه فرآیندی است که در آن اطلاعات کدگذاری، ذخیره و بازیابی می شود (۱). فراخوانی حافظه، نوعی بازگشت به وضعیت ناپایدار است، یعنی حافظه تثبیت شده طی فرآیند به خاطر آوری، مستعد آسیب می باشد و باید دوره ای از پایدار سازی به نام تثبیت مجدد را طی کند (۳). در همین راستا گزارش شده تجویز مورفین قبل از آموزش حیوانات، یادگیری آن ها را ماز ۷ و مدل یادگیری احترازی فعال و غیر فعال مهار می کند (۴). از طرف دیگر مشخص شده تجویز مورفین باعث ایجاد فراموشی در یادگیری احترازی غیر فعال می شود، و چنانچه حیوانات مجدداً تحت تجویز مورفین قرار گیرند، فراموشی مذکور بهبود می یابد (۵). استفاده از مورفین قبل و بعد از آموزش سبب تخریب حافظه می شود ولی استفاده از همان دوز مورفین در روز قبل تست، بهبود حافظه تخریب شده را در پی دارد. مطالعات پیشین نشان می دهد که مورفین، لیتیم (۶) و هیستامین (۷) قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می باشند.

پنتیلین تترازول (PTZ) به عنوان آنتاگونیست گیرنده های  $GABA_A$ ، یک ماده شیمیایی تشنج زاست. تزریق غلظت مشخصی از این دارو به تشنج منجر می شود (۸)، به گونه ای که استفاده از تک دوز PTZ باعث تشنج و اختلال یادگیری می شود (۸). به خوبی ثابت شده است که PTZ، اثرات مخربی را روی ویژگی های غشاء نورون دارد. PTZ کانال های پتاسیمی و کلسیمی را تحت تاثیر قرار داده و ذخایر یون های کلسیمی درون سلولی را آزاد می کند. هم چنین PTZ،

داروها

داروهای مورد استفاده در این مطالعه مورفین (TEMAD, Iran) و پنتیلین تترازول (Germany Tocris) بود که به صورت درون صفاقی تزریق گردید. مورفین در دوزهای (۵، ۲/۵، ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و پنتیلین تترازول به صورت تک دوز (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم) مورد استفاده قرار گرفتند. گروه ها

در تحقیق حاضر سه دسته آزمایش انجام گرفت:

آزمایش اول: گروه حافظه و یادگیری

گروه تزریق بعد از آموزش ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین و تزریق قبل از آزمون سالیین  
گروه تزریق بعد از آموزش ۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین و تزریق قبل از آزمون سالیین  
گروه تزریق بعد از آموزش ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین و تزریق قبل از آزمون سالیین  
گروه کنترل: تزریق بعد از آموزش سالیین و قبل از آزمون سالیین

در این آزمایش سه گروه دارویی و یک گروه کنترل از حیوانات مورد استفاده قرار گرفتند. یک گروه، بلافاصله بعد از آموزش، سالیین (۱ میلی گرم بر کیلوگرم) و سه گروه دوزهای مختلف (۷/۵، ۵، ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) مورفین (هر دوز دارو در یک گروه از حیوانات) به صورت صفاقی دریافت کردند و ۲۴ ساعت بعد، در روز آزمون، تمامی گروه ها، ۳۰ دقیقه قبل از بررسی روند حافظه و یادگیری تنها سالیین (۱ میلی گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند و دوز ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین به عنوان دوز موثر در نظر گرفته شد و در ادامه مطالعه از این دوز استفاده گردید.

آزمایش دوم: بررسی وابسته به وضعیت مورفین

گروه تزریق بعد از آموزش مورفین (بهترین دوز) و تزریق قبل از آزمون ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین

گروه تزریق بعد از آموزش مورفین (بهترین دوز) و تزریق قبل از آزمون ۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین  
گروه تزریق بعد از آموزش مورفین (بهترین دوز) و تزریق قبل از آزمون ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین  
برای انجام این آزمایش، سه گروه حیوان استفاده شدند. هر سه گروه بلافاصله بعد از آموزش، دوز موثر (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) مورفین دریافت کردند و ۲۴ ساعت بعد، در روز آزمون، ۳۰ دقیقه قبل از بررسی روند حافظه و یادگیری دوزهای مختلف (۷/۵، ۵، ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) مورفین (هر دوز دارو در یک گروه از حیوانات) به صورت صفاقی تزریق شد.

آزمایش سوم: بررسی اثر تداخلی PTZ و بررسی وابسته به وضعیت مورفین

گروه تزریق بعد از آموزش ۶۰ PTZ میلی گرم بر کیلوگرم و تزریق قبل از آزمون سالیین  
گروه تزریق بعد از آموزش مورفین (بهترین دوز) و تزریق قبل از آزمون سالیین و مورفین (بهترین دوز)  
گروه تزریق بعد از آموزش مورفین (بهترین دوز) و تزریق قبل از آزمون ۶۰ PTZ میلی گرم بر کیلوگرم و مورفین (بهترین دوز)

در این گروه بلافاصله بعد از آموزش، دوز موثر ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین تزریق گردید و ۲۴ ساعت بعد، در روز آزمون، داروهای پنتیلین تترازول ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم و مورفین ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب با فاصله ۱۵ دقیقه نسبت به هم در روز آزمون تزریق شد.

دستگاه های بررسی یادگیری و حافظه

برای سنجش حافظه و یادگیری در حیوان از دستگاه یادگیری اجتنابی (shuttle box یا step trough, Iran) استفاده شد. این دستگاه از جنس پلکسی گلاس و از دو محفظه تاریک و روشن هر کدام به ابعاد ۲۰\*۲۰\*۳۰ سانتی متر تشکیل شده است. این دو محفظه توسط یک درب گیوتینی (۷\*۹ سانتی متر) واقع در دیواره میانی، با یکدیگر

ارتباط دارند. در کف محفظه تاریک، نیز میله های فولادی (به قطر ۲/۵ میلی متر و با فواصل ۱ سانتی متر) تعبیه شده است، که توسط یک کابل ارتباطی به استیمولاتور متصل است. این دستگاه یک جریان الکتریکی (به مدت ۳ ثانیه و شدت ۱ میلی آمپر و فرکانس ۵۰ هرتز) را در این میله ها می کند، که موجب وارد شدن شوک الکتریکی به دست و پای حیوان می گردد. یادگیری اجتنابی غیر فعال (مهاری) به روش step-through برای بررسی حافظه طولانی مدت در موش بزرگ آزمایشگاهی، در دو روز پشت سر هم انجام شد. روز اول یا روز آموزش، شامل آموزش دادن حیوان در دستگاه می باشد و روز دوم یا روز آزمون، شامل بررسی یا سنجش میزان حافظه حیوانات آموزش دیده است (۱۱). مرحله آزمون برای سنجش حافظه طولانی مدت، ۲۴ ساعت بعد از جلسه آموزش انجام گرفت. به این ترتیب که هر موش بصورت جداگانه در محفظه روشن دستگاه قرار داده و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز می شود، و ملاک سنجش حافظه در روند آزمون مدت زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک است. در این مرحله هیچ گونه شوک الکتریکی به حیوان وارد نمی شود. در این آزمایش سقف زمانی (cut off) برای توقف موش در محفظه روشن حداکثر ۳۰۰ ثانیه بود.

بررسی فعالیت حرکتی

انجام بررسی فعالیت حرکتی طی دو روز بر روی حیوانات انجام شد، ۱۰ دقیقه قبل از آموزش و ۱۰ دقیقه بعد از تست حیوانات در دستگاه (Maze router, Iran) Open Field مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت نشان دادن رفتار های اضطرابی داده های آن ها از نتایج تحقیق حذف شد که توسط نرم افزار Hindsight مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند (۱۲). این مطالعه از طرح تحقیقاتی پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد که با شماره ۹۵۷۲ و کد اخلاقی IR.KAUMS.REC.1395.72 توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان حمایت گردیده است.

تحلیل آماری

به منظور تعیین تفاوت معنی داری بین گروه های مورد آزمایش، از روش آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و هم چنین آزمون تکمیلی توکی استفاده گردید. معیار معنی دار بودن تفاوت ها،  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

### یافته ها

۱) اثر دوز های مختلف پس از آموزش مورفین بر اکتساب یادگیری اجتنابی و فعالیت حرکتی

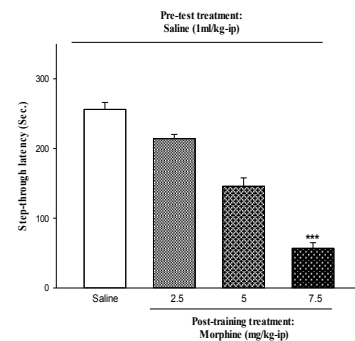
شکل ۱. الف) اثر دوزهای مختلف پس از آموزش مورفین را بر روند اکتساب یادگیری اجتنابی در موش بزرگ آزمایشگاهی نشان می دهد. مطابق شکل آنالیز واریانس یکطرفه داده ها نشان داد، که تزریق بعد از آموزش دوزهای ۵ و ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین در مقایسه با گروه سالین به طور معنادار سبب اختلال حافظه نشد ( $p > 0.05$ ). ولی تزریق بعد از آموزش دوز ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین به طور معنادار باعث بیشترین اختلال در اکتساب یادگیری اجتنابی در مقایسه با گروه سالین شد، [F(3, 24)=87.24, (p<0.001)] و در ادامه مطالعه به عنوان دوز موثر در نظر گرفته شد.

به علاوه مطابق شکل ۱. ب) آنالیز فعالیت حرکتی

حیوان (مسافت طی شده بر حسب cm) در دستگاه Open-field با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیز آماری هیچ اثر معنادار ناشی از تزریق دوزهای مختلف مورفین بر روی فعالیت حرکتی حیوان نشان نداد. [F(3, 24)=0.1, (p>0.05)].

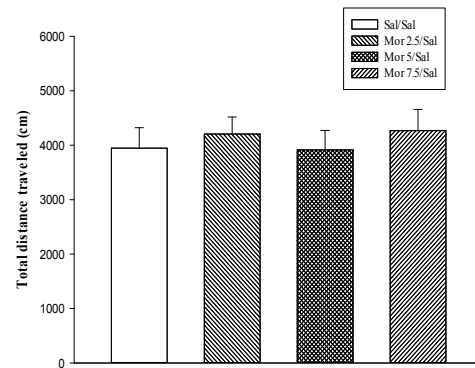
شکل ۱. الف

آنالیز ناپارامتری کروسکال والیس داده ها نشان داد که تزریق بعد از آموزش و قبل از آزمون مورفین ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم، بطور معناداری موجب افزایش تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک دستگاه سنجش حافظه و یادگیری شد (به این پدیده وابسته به وضعیت می گویند)،  $[H_4=25.767, p<0.001]$  هم چنین آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد حیواناتی که بلافاصله بعد از آموزش مورفین ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم، و روز آزمون مورفین ۵ میلی گرم بر کیلوگرم و ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معناداری را در بیادآوری حافظه و یادگیری در روز آزمون نشان نداده اند ( $p>0.05$ ).

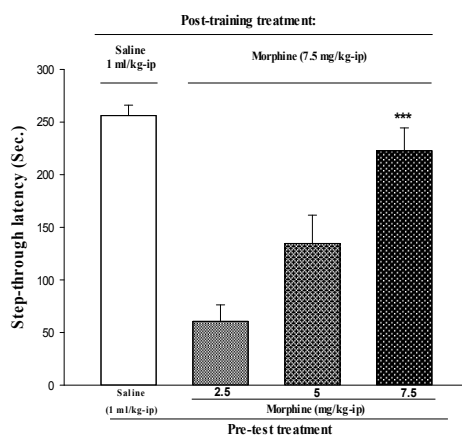


شکل ۱. ب

به علاوه مطابق شکل ۲.ب) آنالیز فعالیت حرکتی حیوان (مسافت طی شده بر حسب cm) در دستگاه Open-field با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیز آماری هیچ اثر معنادار ناشی از تزریق پیش از آزمون و پس از آموزش دوزهای مختلف مورفین بر روی فعالیت حرکتی حیوان نشان نداد  $[F(3, 24)=0.1, (p>0.05)]$ .



شکل ۲. الف

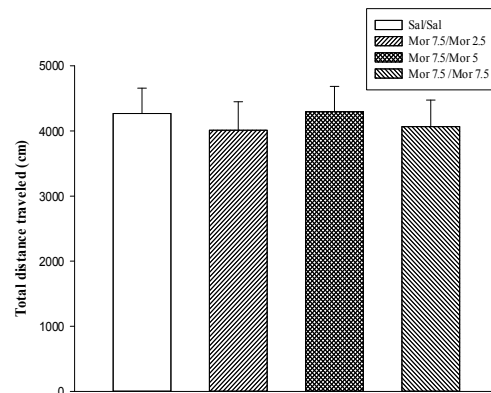


شکل ۱. اثر تزریق پس از آموزش دوزهای مختلف مورفین بر حافظه اجتنابی و فعالیت حرکتی. الف) دوز ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین به طور معنادار سبب کاهش حافظه اجتنابی شد ( $n=8, ***p<0.001$ ). ب) دوزهای مختلف مورفین بر روی فعالیت حرکتی حیوان تاثیری نداشت.

۲) اثر دوزهای مختلف مورفین بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین

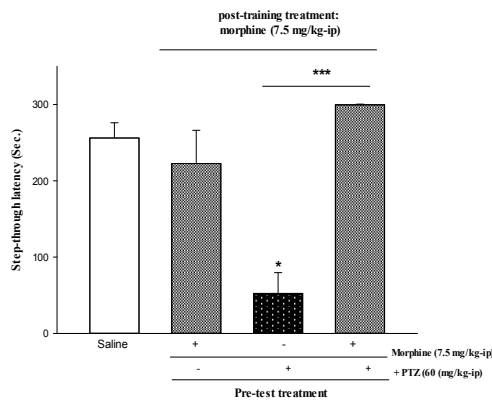
شکل ۲. الف) اثر دوزهای مختلف مورفین بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین را بر روند اکتساب یادگیری اجتنابی در موش بزرگ آزمایشگاهی نشان می دهد.

شکل ۲. ب

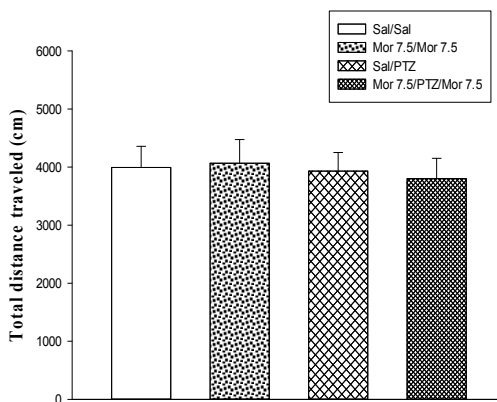


شکل ۲. اثر تزریق پس از آموزش و قبل از آزمون دوزهای مختلف مورفین بر حافظه اجتنابی و فعالیت حرکتی. الف) دوز مشابه مورفین (۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) در روز آموزش و آزمون سبب بازگرداندن حافظه اجتنابی شد ( $n=8, ***p<0.001$ ) ب) اثر دوزهای مختلف مورفین بر روی فعالیت حرکتی حیوان تأثیری نداشت.

شکل ۳. الف



شکل ۳. ب



شکل ۳. اثر بر حافظه اجتنابی و فعالیت حرکتی. ناشی شد تزریق پس از آموزش و قبل از آزمون دوزهای مختلف مورفین. الف) تزریق قبل از آزمون پنتیلین تترازول بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین سبب حفظ و نگه داری حافظه اجتنابی شد ( $n=8, +p<0.05, ***p<0.001$ ) ب) تزریق پنتیلین تترازول بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین، روی فعالیت حرکتی حیوان تأثیری نداشت.

۳) اثر تداخلی ناشی از تزریق پیش از آزمون پنتیلین تترازول بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین

شکل ۳. الف) اثر تداخلی ناشی از تزریق پیش از آزمون پنتیلین تترازول بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین را بر روند اکتساب یادگیری اجتنابی در موش بزرگ آزمایشگاهی نشان می دهد. آنالیز واریانس یک طرفه داده ها نشان داد مدت زمان تاخیر ورود حیوان در تزریق قبل از آزمون ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم PTZ و پس از آموزش سالین در مقایسه با گروه سالین به طور معنادار کاهش یافت و حافظه اجتنابی موش تخریب شد ( $p<0.05$ ). هم چنین آنالیز ناپارامتری کروسکال والیس داده ها نشان داد که در گروه تداخلی یادگیری وابسته به وضعیت مورفین سبب حفظ حافظه ناشی از تخریب PTZ شد و مدت زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک افزایش پیدا کرد ( $H=21.502, p<0.001$ )]. به علاوه مطابق شکل ۳. ب) آنالیز فعالیت حرکتی حیوان (مسافت طی شده بر حسب cm) در دستگاه

## بحث

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر PTZ بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین بود و اثر تزریق مورفین با دوزهای مختلف بصورت پیش از آزمون و پس از آموزش در فرآیند حافظه و یادگیری بررسی شد. نتایج نشان دهنده تخریب حافظه اجتنابی به دنبال تزریق بعد از آموزش مورفین ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم (دوز موثر)، بود به عبارت دیگر، تخریب یادگیری طولانی مدت حیوان توسط مورفین، موجب کاهش زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک (کاهش حافظه) در روز آزمون گردید، که فراموشی القاء شده توسط مورفین نامیده می شود. در این مطالعه تزریق مورفین ۵ و ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم، بلافاصله پس از آموزش (وابسته به دوز)، سبب بازگشت کامل فراخوانی حافظه نشد ولی تزریق پیش از آزمون مورفین ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم، فراخوانی را در حیواناتی که تحت تأثیر همان دوز مورفین پس از آموزش قرار گرفته بودند، افزایش داد (حافظه وابسته به وضعیت مورفین). در گروه تداخل مشاهده گردید که تخریب حافظه حیوانات مورد مطالعه مهار گردید و تزریق قبل از آزمون ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم PTZ و پس از آموزش سالیان، حافظه موش تخریب را کرد.

نتایج گزارش های پیشین حاکی از این است که تزریق سیستمیک مورفین با دوزهای مختلف موجب کاهش حافظه می گردد (۱۳، ۱۴) که این نتایج تایید کننده نتایج مطالعه حاضر است. این آثار تخریبی مورفین بوسیله آنتاگونیست گیرنده های اپیوئیدی مانند نالوکسان مهار می شود اما نالتریدول آنتاگونیست گیرنده  $\delta$  یا  $K$ ، چنین اثری ندارد که این مساله نشان دهنده دخالت گیرنده های اپیوئیدی در یادگیری وابسته به وضعیت مورفین است. هم چنین مشخص شده است که آگونیست های اپیوئیدی حافظه را به صورت وابسته به زمان و مقدار تضعیف می کنند (۱۵).

در این مطالعه برای تخریب حافظه و ایجاد حافظه وابسته به وضعیت، مورفین بلافاصله بعد از آموزش تزریق شد چرا که حافظه کوتاه مدت بدون نیاز به ساخت پروتئین های جدید برای ثانیه ها تا ساعت ها دوام دارد (۱۶). با گذشت زمان، و تولید پروتئین های جدید این حافظه در ساختارهای مختلف مغز به شکل پایدار تثبیت می گردد و به حافظه بلند مدت تبدیل می شود. مطالعات نشان داده است که اعمال شوک الکتریکی اندکی بعد از آموزش سبب آسیب به حافظه می شود ولی بکارگیری این شوک چند ساعت بعد از آموزش و ایجاد حافظه بلند مدت تاثیری بر آن ندارد. این اثرات وابسته به زمان پایه و اساس تئوری "تثبیت حافظه" یا "تئوری سلولی تثبیت" حافظه، تشکیل می دهد. مطالعات مختلف نشان دهنده توانایی مورفین در ایجاد حافظه وابسته به وضعیت مورفین است (۵). در واقع، حافظه وابسته به وضعیت محصول تقویت مسیر خاص سیناپسی در مغز است. سیناپس عصبی فضای بین سلول های مغز و یا نورون ها است که اجازه می دهد تا سیگنال های شیمیایی از یک نورون به دیگری منتقل شود. حافظه به تقویت این مسیر عصبی وابسته است و یک نورون را با یک دیگر مرتبط می کند. در مسیر یادگیری و حافظه، مسیرهای جدیدی بین نورون های مغز ایجاد می شوند که سپس از طریق سیگنال های شیمیایی ارتباط برقرار می کنند. اگر این سلول ها سابقه ارسال سیگنال های خاص را در شرایط خاص شیمیایی درون مغز داشته باشند، سپس در شرایط مشابه به طور موثر کار می کنند. یادگیری وابسته به وضعیت با انواع مختلفی از داروها از جمله ترکیبات اپیوئیدی مانند مورفین ایجاد می شود (۱۷). به نظر می رسد مکانیسم اثر مورفین بر حافظه توسط گیرنده های اپیوئیدی مو ( $\mu$ ) در نواحی مختلف مغزی میانجیگری می شود (۱۸). علاوه بر این نشان داده شده است که چندین سیستم نورترانسمیتری از جمله گلوتاماترژیک (۱۹)، آدرنرژیک (۲۰)، نیتریک اکساید (۲۱) و گاباژرژیک در یادگیری وابسته به وضعیت مورفین تا حدودی دخیل می باشند (۲۲).



افزایش یا کاهش فعالیت سیستم عصبی اپیوئیدی آندوژن شود. به نظر می رسد اثر PTZ در بازگرداندن حافظه از طریق افزایش سطوح و یا آزاد شدن اپیوئیدهای درون زا در مغز باشد.

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر PTZ بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین بود و اثر تزریق مورفین با دوزهای مختلف بصورت قبل از آزمون و پس از آموزش در فرآیند حافظه و یادگیری بررسی شد. نتایج نشان دهنده تخریب حافظه اجتنابی به دنبال تزریق بعد از آموزش مورفین بود به عبارت دیگر، تخریب یادگیری طولانی مدت حیوان توسط مورفین، موجب کاهش زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک (کاهش حافظه) در روز آزمون گردید که فراموشی القاء شده توسط مورفین نامیده می شود. در این مطالعه تزریق دوزهای مشابه مورفین سبب بازگشت کامل فراخوانی حافظه شد (حافظه وابسته به وضعیت مورفین). هم چنین تزریق PTZ سبب حفظ STM ناشی از مورفین شد.

### نتیجه گیری

این مطالعه نشان می دهد که استفاده از دوز مشابه مورفین هم در روز آموزش و هم در روز آزمون سبب فراخوانی حافظه از دست رفته می گردد و PTZ اثر حافظه وابسته به وضعیت مورفین را حفظ می کند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی پایان نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان بررسی اثر پنتیلین ترازول بر یادگیری وابسته به وضعیت مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی در سال ۹۵ با شماره ۹۵۷۲ و کد اخلاقی IR.KAUMS.REC.1395.72 می باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کاشان اجرا شده است.

با اعمال PTZ تغییراتی در فعالیت سیستم گلوتامرژیک ایجاد می شود که نقش مهمی در یادگیری و حافظه ایفا می کنند. در طول تشنج تغییرات بیوشیمیایی فراوانی در سطوح نوروترنسمیترهای گابا (گاما آمینوبوتیریک اسید)، گلوتامات، کاتکولامین ها و تغییراتی در عبور یون ها از خلال غشای سلولی در مغز ایجاد می شود. در طی تشنج با PTZ گیرنده GABAA و عملکرد کانال کلری آن در سیستم عصبی مرکزی، مهار می شود (۲۳). نقش گیرنده های گابا a در یادگیری وابسته به وضعیت در برخی مطالعات پیشنهاد شده است. از طرفی مشخص شده است که اپیوئیدها، تحریک پذیری بعضی از نورون های هیپوکامپ را به طور غیر مستقیم با اثر بر روی اینترنورون های گابارژیک کنترل می کنند زیرا نشان داده شده است که بیان ژن های گیرنده های اپیوئیدی  $\mu$  و  $\delta$ ، در هیپوکامپ به نورون های گابارژیک محدود شده است (۲۴).

دوزهای فوق العاده ناچیز مورفین سیگنالینگ تحریکی را با قدرت بیشتری نسبت به نوع مهارتی در سلول عصبی فعال می کند (۲۵). گیرنده های اپیوئیدی بر روی سلولهای گابارژیک هم وجود دارند. به نظر می رسد با سیگنالینگ تحریکی اپیوئیدی بر سلولهای گابارژیک تحریک این سلول ها و در نتیجه افزایش تون گابارژیک اتفاق می افتد که مهار تحریک پذیری نورونی و کاهش شدت تشنج را در پی دارد. اما دوزهای معمول مورفین، سیگنالینگ مهارتی را در سلولهای گابارژیک فعال می کند که مهار سلول های گابارژیک و کاهش تون گابارژیک رخ می دهد و در نهایت سبب کاهش مهار تحریک پذیری نورونی و افزایش شدت تشنج می شود (۲۵-۲۷). براساس مطالعات پیشین، PTZ ممکن است با مورفین تداخل نشان دهد. میل ترکیبی بالای آگونیست و آنتاگونیست های اپیوئیدی به گیرنده هایشان، تحت تاثیر PTZ قرار می گیرد. PTZ می تواند میل ترکیبی گیرنده های اپیوئیدی را به وسیله تغییر در شکل فضایی گیرنده تغییر دهد و بدین وسیله باعث

## منابع

1. Carmack SA, Koob GF, Anagnostaras SG. Learning and Memory in Addiction. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology: Elsevier; 2017.
2. Gill KE, Rice BA, Akins CK. Cocaine induces state-dependent learning of sexual conditioning in male Japanese quail. *Physiol Behav.* 2015;138:150-53.
3. Beheshti S, Hosseini SAMS, Noorbakhshnia M, Eivani M. Role of hippocampal CA1 area gap junction channels on morphine state-dependent learning. *Eur J Pharmacol.* 2014;745:196-200.
4. Zarrindast M-R, Rezaof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol.* 2004;497(2):197-204.
5. Farahmandfar M, Kadivar M, Rastipisheh S. Blockade of dorsal hippocampal orexin-1 receptors impaired morphine-induced state-dependent learning. *Neuropeptides.* 2016;60:13-19.
6. Zarrindast MR, Fazli-Tabaei S, Ahmadi S, Yahyavi SH. Effect of lithium on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physiol Behav.* 2006;87(2):409-15.
7. Zarrindast M-R, Bananej M, Khalilzadeh A, Fazli-Tabaei S, Haeri-Rohani A, Rezaof A. Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiology of Learning and Memory.* 2006. ۹۲-۲۸۶:(۳)۸۶;
8. Aniol VA, Ivanova-Dyatlova AY, Keren O, Guekht AB, Sarne Y, Gulyaeva NV. A single pentylenetetrazole-induced clonic-tonic seizure episode is accompanied by a slowly developing cognitive decline in rats. *Epilepsy Behav.* 2013;26(2):196-202.
9. Atapour N, Kalantaripour TP, Nourpanah M, Niazi M. Chemical kindling and seizure susceptibility in morphine dependent rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2000;10(6):483-87.
10. Lamberty Y, Klitgaard H. Consequences of Pentylenetetrazole Kindling on Spatial Memory and Emotional Responding in the Rat. *Epilepsy Behav.* 2000;1(4):256-61.
11. Jafarnejad-Farsangi S, Farazmand A, Rezaof A, Darbandi N. Proteome Analysis of Rat Hippocampus Following Morphine-induced Amnesia and State-dependent Learning. *Iran J Pharm Res.* 2015;14(2):591-602.
12. Speight A, Davey WG, McKenna E, Voigt J-PW. Exposure to a maternal cafeteria diet changes open-field behaviour in the developing offspring. *Int J Dev Neurosci.* 2017;57:34-40.
13. Squire LR, Knowlton BJ. The medial temporal lobe, the hippocampus, and the memory systems of the brain. *The new cognitive neurosciences.* 2000;2:756-76.
14. Castellano C. Effects of morphine and heroin on discrimination learning and consolidation in mice. *Psychopharmacology.* 1975;42(3):235-42.
15. Castellano C, Cestari V, Cabib S, Puglisi-Allegra S. The effects of morphine on memory consolidation in mice involve both D1 and D2 dopamine receptors. *Behav Neural Biol.* 1994;61(2):156-61.
16. Ghadiri T, Modarres Mousavi M, Alipour F, Mohammad Sadeghi S. Cellular and Molecular Pathways of Learning and Memory. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam.* 2014;2(2):81-88.
17. Slot LB, Colpaert F. Opiate states of memory: receptor mechanisms. *Journal of Neuroscience.* 1999;19(23):10520-29.
18. De Vries TJ, Ril GHTT, Van der Laan JW, Mulder AH, Schoffelmeer AN. Chronic exposure to morphine and naltrexone induces changes in catecholaminergic neurotransmission in rat brain without altering  $\mu$ -opioid receptor sensitivity. *Life sciences.* 1993;52(21):1685-93.
19. Zarrindast M-R, Jafari-Sabet M, Rezaof A, Djahanguiri B, Rezaof A. INVOLVEMENT OF NMDA RECEPTORS IN MORPHINE STATE-DEPENDENT LEARNING IN MICE. *Int J Neurosci.* 2006;116(6):731-43.
20. Homayoun H, Khavandgar S, Zarrindast M. Morphine state-dependent learning: interactions

- with  $\alpha 2$ -adrenoceptors and acute stress. *Behav Pharmacol.* 2003;14(1):41-48.
21. Rezayof A, Amini R, Rassouli Y, Zarrindast M-R. Influence of nitric oxide on morphine-induced amnesia and interactions with dopaminergic receptor agents. *Physiol Behav.* 2006;88(1):124-31.
22. Ahmadi S, Zarrindast MR, Haeri Rohani A, Rezayof A, Nouri M. Nicotine improves morphine-induced impairment of memory: Possible involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens. *Dev Neurobiol.* 2007;67.۲۷-۱۱۱۸:(<sup>^</sup>)
23. Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Giorgi O. Decrease in GABAergic function induced by pentylentetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;262(2):792-800.
24. Ji R-R, Zhang Q, Law P, Low H, Elde R, Hokfelt T. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *Journal of Neuroscience.* 1995;15(12):8156-66.
25. Shafaie A, Fereidoni M, Behnamrasooli M. Effect of ultra low dose morphine on seizure induced by pentylentetrazol. *Physiology and Pharmacology.* 2009;12(4):307-13.
26. Wallenstein M. Effect of morphine pretreatment on pentylentetrazol-induced seizures in the rat. *Neuropharmacology.* 1983;22(10):1187-92.
27. Honar H, Riazi K, Homayoun H, Sadeghipour H, Rashidi N, Ebrahimkhani MR, et al. Ultra-low dose naltrexone potentiates the anticonvulsant effect of low dose morphine on clonic seizures. *Neuroscience.* 2004;129(3):733-42.