

## ***Involvement of Median Septum Region in Ghrelin Effects on Morphine-Induced Memory Impairment in Passive Avoidance Learning***

Mohammad Shafieifar<sup>1</sup>,

Niloufar Darbandi<sup>2</sup>,

Farzaneh Nazari-Serenjeh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Animal Physiology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received August 6, 2019 ; Accepted October 8, 2019)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Many studies have reported the effect of morphine on memory impairment. Evidence suggests that ghrelin enhances memory consolidation. The median septum also has a major role in memory and learning mechanisms. The present study aimed at investigating the role of median septum on the effects of ghrelin in morphine-induced amnesia.

**Materials and methods:** In this experimental research, male Wistar rats were randomly divided into 12 groups: ghrelin groups (0, 0.3, 1.5, 3 nmol/ $\mu$ l) plus saline (1 ml/kg) or morphine (7.5 mg/kg) and groups treated with lidocaine (1  $\mu$ l/rat) or saline (1  $\mu$ l/rat) plus ghrelin (3 nmol/ $\mu$ l) or saline (1  $\mu$ l/rat) plus morphine (7.5 mg/kg). Cannulation was done in the lateral ventricle and median septum. Ghrelin and lidocaine were injected into the lateral ventricle and septum, respectively and morphine was injected subcutaneously. Memory was assessed by avoidant learning.

**Results:** Post-training intra-ventricle administration of ghrelin 5 min prior to morphine (7.5 mg/kg) prevented morphine amnesia ( $P=0.000$ ). Injection of lidocaine into the median septum 5 min before the injection of ghrelin prevented its effect on inhibition of morphine amnesia ( $P=0.000$ ).

**Conclusion:** Injection of ghrelin into the lateral ventricle was found to be capable of preventing morphine-induced memory impairment. Inactivation of the median septum by injection of lidocaine reduced the effect of ghrelin on morphine-induced memory deficits. Therefore, the median septal region appears to mediate the effects of ghrelin on morphine-induced amnesia.

**Keywords:** ghrelin, lateral ventricle, median septum, morphine, passive avoidance learning

**J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (179): 28-39 (Persian).**

\* Corresponding Author: Farzaneh Nazari-Serenjeh- Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran (E-mail: nazari\_farzaneh@yahoo.com)

## دخالت ناحیه سیتوم میانی در اثرات گرلین بر اختلال حافظه ناشی از مورفین در مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال

محمد شفیعی فر<sup>1</sup>نیلوفر دربندی<sup>2</sup>فرزانه نظری سرنجه<sup>3</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** در مطالعات زیادی تخریب حافظه ناشی از تزریق مورفین گزارش شده است. همچنین شواهد نشان می‌دهد که هورمون گرلین تثبیت حافظه را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر ناحیه سیتوم میانی نقش مهمی در مکانیسم حافظه و یادگیری دارد. در مطالعه حاضر نقش ناحیه سیتوم میانی در اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی رت‌های نر بالغ از نژاد ویستار بطور تصادفی به 12 گروه تقسیم شدند: گروه‌های گرلین (0/5، 1/5، 3nmol/μl) به همراه سالین (1ml/kg) یا مورفین (7/5 mg/kg) و گروه‌های تیمار شده با لیدوکائین (1 μl/rat) یا سالین (1 μl/rat) به همراه گرلین (3 nmol/μl) یا سالین (1 μl/rat) به علاوه مورفین (7/5 mg/kg). کانول گذاری در نواحی بطن جانبی و سیتوم میانی انجام شد. گرلین و لیدوکائین به ترتیب در بطن جانبی و سیتوم و مورفین به صورت زیرجلدی تزریق شد. حافظه به کمک یادگیری اجتنابی ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** تزریق بعد از آموزش گرلین به درون بطن جانبی 5 دقیقه قبل از تزریق مورفین (7/5 mg/kg) به صورت وابسته به دوز، از ایجاد فراموشی ناشی از مورفین جلوگیری کرد ( $P=0/000$ ). تزریق لیدوکائین به درون ناحیه سیتوم میانی 5 دقیقه قبل از تزریق گرلین مانع از اثر آن در مهار فراموشی ناشی از مورفین شد ( $P=0/000$ ).

**استنتاج:** این مطالعه نشان می‌دهد تزریق گرلین به بطن جانبی قادر است از تخریب حافظه ناشی از مورفین جلوگیری کند. غیرفعال سازی سیتوم میانی توسط تزریق لیدوکائین اثر گرلین بر نقص حافظه ناشی از مورفین را کاهش داد. لذا به نظر می‌رسد ناحیه سیتوم میانی در میانجیگری اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین دخالت دارد.

**واژه های کلیدی:** گرلین، بطن جانبی، سیتوم میانی، مورفین، یادگیری اجتنابی غیر فعال

### مقدمه

که اولین بار پس از شناسایی و استخراج از سلول‌های معده در سال 1999 به عنوان محرک ترشح هورمون رشد معرفی شد. گیرنده گرلین (GHS-R) از خانواده گیرنده‌های مزدوج با G- پروتئین است و در نواحی

مطالعات نشان می‌دهد که برخی از هورمون‌های گوارشی مانند گرلین به دلیل وجود ترانسپورتر، از سد خونی - مغزی عبور کرده و عملکرد مغز را تحت تاثیر قرار می‌دهند (1). هورمون گرلین یک پپتید گوارشی است

E-mail: nazari\_farzaneh@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** فرزانه نظری سرنجه - تهران: دانشگاه پیام نور

1. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

2. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

3. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ تصویب: 1398/7/16

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/5/13

تاریخ دریافت: 1398/5/5

ساختارهای لیمبیک است که در مکانیسم‌های یادگیری و حافظه دخالت دارد و فرآیند تشکیل حافظه در ساختارهایی مانند هیپوکمپ (۱۸،۱۷) را تنظیم می‌کند. این ناحیه همچنین در یادگیری وابسته به حالت مورفین دخالت دارد (19). مجموعه سیتوم میانی و باند مورب (MS/DB) حاوی نورون‌های کولینرژیک و گابائریک بوده و اخیراً نورون‌های گلو تاما ترژیک نیز در این منطقه شناسایی شده‌اند (20، 21). فعال‌سازی هسته سیتوم میانی باعث افزایش فعالیت نورون‌های هرمی در همه مناطق هیپوکمپ از جمله شکنج دندان‌های، CA1 و CA3 می‌شود. انواع مختلفی از گیرنده‌های گلو تامات در تراکم بالا در هیپوکمپ و سیتوم وجود دارد. این گیرنده‌ها نقش مهمی در یادگیری دارند. هیپوکمپ به طور مستقیم از طریق فیمبریا - فورنیکس و به طور غیرمستقیم از طریق هسته سیتوم جانبی با سیتوم میانی ارتباط دارد. خروجی‌های هماهنگ مسیر سیتو - هیپوکمپ موجب انتقال و انعطاف پلاستیسیته سیناپسی می‌شود (22). مطالعات ایمونو هیستوشیمیایی نشان می‌دهد که گیرنده‌های گرلینی در ناحیه سیتوم حضور دارند (23)، اما تاکنون نقش این ناحیه در اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا با توجه به نقش ناحیه سیتوم در یادگیری و حافظه، در مطالعه حاضر با استفاده از روش غیر فعال‌سازی برگشت پذیر ناحیه سیتوم میانی توسط تزریق لیدوکائین، دخالت این ناحیه از مغز در اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین به روش یادگیری اجتنابی مهارتی که یک نوع یادگیری وابسته به هیپوکمپ است، مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

پروتکل این مطالعه تجربی توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک بررسی و تأیید شد (شماره

مختلف سیستم عصبی بیان می‌شود (2). گرلین در اعمال عالی مغز مانند یادداشت، یادگیری و حافظه، تنظیم خواب و ترشح هورمون‌ها نقش دارد (3). مطالعات نشان می‌دهد که گرلین با سیستم اوپیوئیدی مغز برهمکنش داشته و در بروز اثرات رفتاری اوپیوات‌ها مانند مورفین نقش دارد (۵،۴). یکی از اثرات مخرب مورفین، تغییرات شناختی و کاهش یادگیری و حافظه است. مورفین ساختار و عملکرد طبیعی نواحی درگیر در مکانیسم‌های یادگیری و حافظه مانند هیپوکمپ را تغییر داده و سبب تغییرات شناختی و القاء فراموشی می‌شود (۷،۶). بر خلاف مورفین، گرلین اثرات مثبتی بر روی حافظه و یادگیری دارد (8). تزریق مقادیر مختلف گرلین به داخل ناحیه CA1 همراه با مقدار موثر مورفین (7/5mg/kg) یادآوری حافظه را به طور معنی‌داری نسبت به گروه مورفین افزایش می‌دهد (9). گیرنده‌های گرلین در ناحیه هیپوکمپ بیان می‌شوند و مشخص شده است که تزریق گرلین به درون هیپوکمپ، تشکیل سیناپس در این ناحیه و ایجاد حافظه بلند مدت را تسریع می‌کند (10). بهشتی و همکارانش نشان دادند که تزریق آگونیست گیرنده‌های گرلین به درون سایر نواحی مرتبط با یادگیری نیز سبب افزایش تثبیت حافظه می‌شود (11). به علاوه، گرلین رهایی نوروترانسمیتر گلو تامات (12) و تشکیل مولکول‌های دخیل در حافظه را افزایش می‌دهد (13). همچنین گرلین دارای اثر حفاظت نورونی است و قادر است نقص حافظه و تخریب نورونی در بیماری آلزایمر القاء شده در حیوانات آزمایشگاهی را بهبود بخشد (14). در زمینه تأثیر گرلین بر روی اثرات شناختی مورفین مطالعات محدودی انجام شده است. مطالعات قبلی ما نشان می‌دهد که تزریق گرلین به درون ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) و یا هیپوکمپ از بروز فراموشی ناشی از مورفین جلوگیری می‌کند (۱۶،۱۵). فرآیند یادگیری و شکل‌گیری حافظه یک مکانیسم پیچیده است که در نتیجه برهم‌کنش میان قسمت‌های مختلف مغز اتفاق می‌افتد. ناحیه سیتوم میانی (median septum) یکی از

کد اخلاق IR.ARAKMU.REC. 1397/261 و در انجام آن کلیه دستورالعمل‌های کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. جهت انجام مطالعه تعداد 84 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 220-250 گرم (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. حیوانات در دمای کنترل شده حیوان خانه ( $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد) در 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی و دسترسی آسان به آب و مواد غذایی قرار داشتند. آزمایشات در بازه زمانی 9 صبح تا 13 بعد از ظهر انجام شد. حیوانات به 12 گروه 7 تایی تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی شامل: گروه‌های دریافت کننده گرلین + سالین: در این گروه‌ها به حیوانات بلافاصله پس از آموزش یکی از مقادیر گرلین ( $0/5, 1/5, 3 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ ) (شرکت Abcam، انگلستان) به داخل بطن جانبی تزریق و پس از 5 دقیقه سالین ( $1 \text{ ml}/\text{kg}$ ) به صورت زیر جلدی تزریق شد. گروه‌های دریافت کننده گرلین + مورفین: در این گروه‌ها، به حیوانات بلافاصله پس از آموزش یکی از مقادیر گرلین به داخل بطن جانبی تزریق و پس از 5 دقیقه مورفین ( $7/5 \text{ mg}/\text{kg}$ ) (تهیه شده از شرکت دارو پخش، ایران) به صورت زیر جلدی تزریق شد. گروه‌های دریافت کننده لیدوکائین: در این گروه‌ها، بلافاصله پس از آموزش ابتدا لیدوکائین ( $1 \mu\text{l}/\text{rat}$ ) به درون ناحیه سپتوم میانی تزریق گردید. سپس به فواصل 5 دقیقه‌ای گرلین ( $3 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ ) و یا سالین ( $1 \mu\text{l}/\text{rat}$ ) به داخل بطن جانبی و در نهایت مورفین ( $7/5 \text{ mg}/\text{kg}$ ) به صورت زیر جلدی تزریق شد.

#### روش کانول گذاری

ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین هیدروکلراید (100 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلزین (5 میلی گرم بر کیلوگرم وزن) بیهوش و در دستگاه استرنو تاکسی قرار گرفتند. پس از برداشتن پوست و نسج ناحیه فوقانی سر دو عدد کانول راهنما

(که از سر سوزن 22 گیج دندانپزشکی تهیه شده بود) یک میلی متر بالاتر از ناحیه بطن جانبی ( $0/8 -$  میلی متر از برگما)،  $1/4 -$  میلی متر از شکاف ساژیتال و  $2/5 -$  میلی متر از سطح از جمجمه) و سپتوم میانی ( $1/2 +$  میلی متر از برگما،  $0/1 +$  میلی متر از شکاف ساژیتال و  $5/5 -$  میلی متر از سطح از جمجمه) به وسیله سیمان دندانپزشکی بر روی جمجمه تثبیت شدند. پس از کانول گذاری، حیوانات 7 روز دوره بهبودی را سپری کرده و سپس حافظه و یادگیری آن‌ها به روش یادگیری اجتنابی غیرفعال ارزیابی شد (15).

#### روش تزریق درون مغزی

برای تزریق داروها از سرنگ هامیلتون متصل به رابط پلی اتیلنی و کانول تزریق استفاده شد. کانول‌های تزریق از سرسوزن‌های 27 گیج دندانپزشکی تهیه شدند و طول آن‌ها یک میلی متر بلندتر از کانول‌های راهنما بود. حجم تزریق به درون ناحیه بطن جانبی و سپتوم هر دو 1 میکرولیتر بود که در مدت زمان 60 ثانیه تزریق شد. جهت اطمینان از تزریق و جذب کامل دارو به درون نواحی مورد نظر و جلوگیری از انتشار آن به نواحی اطراف، کانول تزریق 60 ثانیه پس از پایان تزریق دارو از کانول راهنما خارج می‌شد. پس از انجام آزمایش‌ها جهت تأیید محل کانول راهنما و تزریق صحیح دارو، رنگ متیلن بلو به درون ناحیه بطن جانبی و سپتوم تزریق و پس از کشتن حیوانات و قرار دادن مغز آن‌ها در محلول فرمالین 10 درصد به مدت 10 روز، برش‌هایی از مغز تهیه می‌شد و محل کانول‌ها با اطلس پاکسینوس و واتسون مطابقت داده می‌شدند. داده‌های حیواناتی که محل کانول‌ها با موقعیت مورد نظر بر روی اطلس منطبق نبود، حذف می‌شدند (15).

#### دستگاه Step-through

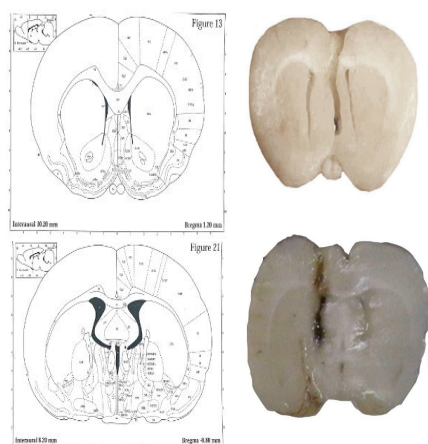
دستگاه Step-through جعبه‌ای از جنس پلکسی گلاس (شرکت برج صنعت، ایران) و از دو

### آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده با روش آنالیز واریانس (یک طرفه و دو طرفه) تجزیه و تحلیل شدند. همچنین برای تعیین گروه‌هایی که با هم اختلاف معنی‌دار داشتند، از آزمون Tukey استفاده شد. برای تمام محاسبات سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد. نتایج در تمامی نمودارها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از میانگین گزارش و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Sigmaplot نسخه 12 رسم شد.

### یافته‌ها

تصویر شماره 1 مکان تزریق دارو به درون نواحی بطن جانبی و سیتوم را در مقایسه با موقعیت مکانی این نواحی بر روی اطلس پاکسینوس و واتسون نشان می‌دهد. تصویر مذکور نشان می‌دهد که کانول گذاری و در نتیجه تزریق دارو به درون نواحی مذکور به درستی انجام شده است.



تصویر شماره 1: برش بافتی تهیه شده از نواحی بطن جانبی و سیتوم در مقایسه با موقعیت مکانی این نواحی بر روی اطلس پاکسینوس و واتسون

نتایج حاصل از مطالعات قبلی ما نشان داده بود که تزریق زیرجلدی مورفین در دوزهای (5, 7/5 mg/kg)، (0/5, 2/5) پنج دقیقه بعد از آموزش به طور وابسته به دوز

قسمت سیاه و سفید با ابعاد 20×20×30 سانتی متر ساخته شده است و توسط یک درب گیوتینی با یکدیگر مرتبط می‌شوند. در کف قسمت سیاه رنگ میله‌های فولادی تعبیه شده که هنگام روشن شدن دستگاه یک جریان الکتریکی (50 هرتز، یک میلی آمپر و به مدت 3 ثانیه) در آن‌ها برقرار می‌شود.

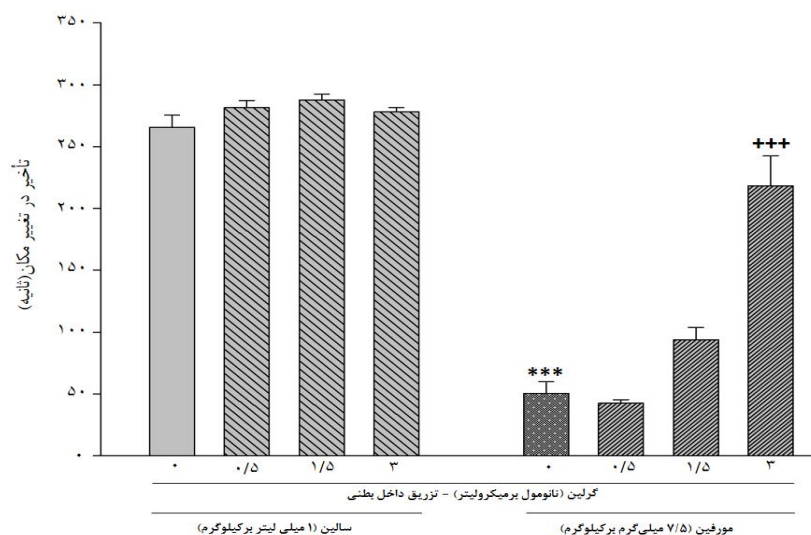
### روش یادگیری اجتنابی غیرفعال

آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال در دو روز متوالی انجام می‌شد. در روز اول و در مرحله سازش ابتدا حیوان در قسمت سفید دستگاه قرار گرفت. پس از 5 ثانیه درب گیوتینی باز و حیوان وارد قسمت سیاه دستگاه می‌شد. حیواناتی که ورود آن‌ها به قسمت سیاه بیش‌تر از 100 ثانیه طول می‌کشید، از ادامه آزمایش حذف می‌شدند. پس از 30 دقیقه مرحله آموزش انجام می‌شد. در این مرحله حیوان در بخش سفید دستگاه قرار می‌گرفت و پس از 5 ثانیه درب گیوتینی دستگاه باز و مدت زمانی که طول می‌کشید تا حیوان وارد بخش سیاه دستگاه شود، ثبت می‌شد. به محض ورود حیوان به قسمت تاریک، درب گیوتینی بسته شده و به کف پای حیوان شوک وارد می‌شد. پس از 20 ثانیه حیوان از دستگاه خارج شده و پس از گذشت 2 دقیقه مرحله فوق تکرار می‌شد. چنانچه حیوان قبل از 120 ثانیه به قسمت تاریک وارد می‌شد، برای بار دوم شوک دریافت می‌کرد، در غیر این صورت آموزش موفق برایش ثبت و بلافاصله تزریق دارو انجام می‌گرفت. یک روز پس از مرحله آموزش، حیوانات وارد مرحله آزمون می‌شدند. در این مرحله ابتدا حیوان را در قسمت سفید دستگاه قرار داده و پس از 5 ثانیه درب گیوتینی باز می‌شد. مدت زمانی که طول می‌کشید تا حیوان وارد قسمت سیاه دستگاه شود زمان تأخیر یا (Step-Through Latency) STL نام داشت و به عنوان معیاری برای اندازه‌گیری میزان حافظه ثبت می‌شد. بیش‌ترین زمان تأخیر برای ورود به قسمت تاریک 300 ثانیه در نظر گرفته می‌شد (15).

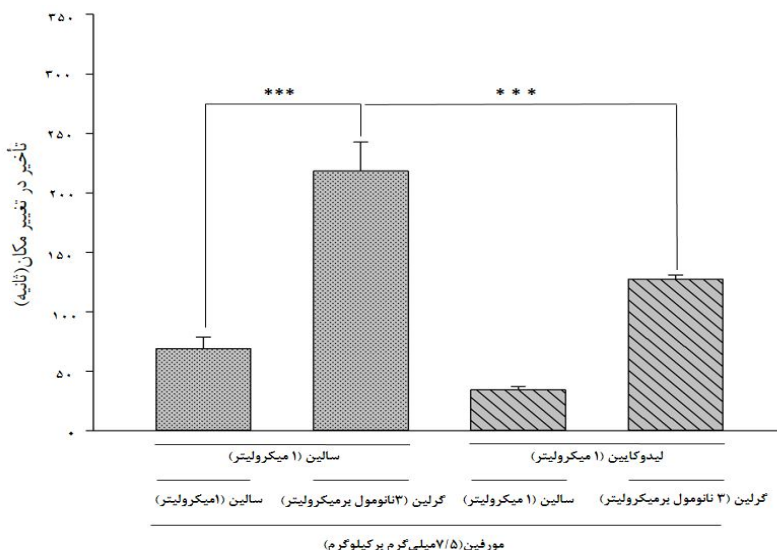
20/67 = F(3 و 56)، تداخل تیمار × مقدار دارو] (نمودار شماره 1).

برای بررسی نقش ناحیه سیتوم میانی در اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین، ابتدا لیدوکائین 4 درصد (1 μl) به درون ناحیه سیتوم میانی تزریق و پس از پنج دقیقه گرلین (3 nmol/μl) و یا سالین (1 μl) به درون ناحیه بطن جانبی تزریق شد. 5 دقیقه بعد تمامی حیوانات، مورفین (7/5 mg/kg) را به صورت زیر جلدی دریافت و 24 ساعت بعد وارد مرحله آزمون حافظه شدند. آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی داری را بین گروه های آزمایش نشان داد [F(3 و 24) = 36/53, P=0/000]. میزان تأخیر در ورود به اتاق تاریک در گروه لیدوکائین - گرلین - مورفین به طور معنی داری کوتاه تر از گروه سالین - گرلین - مورفین است P=0/000، در واقع تزریق لیدوکائین در ناحیه سیتوم میانی و غیرفعال کردن این ناحیه از مغز منجر به کاهش معنی دار تأخیر در ورود به اتاق تاریک نسبت به گروه سالین - گرلین - مورفین شد. آنالیز واریانس یک طرفه همچنین نشان داد هیچ اختلاف معنی داری بین گروه های لیدوکائین - سالین - مورفین و سالین - سالین - مورفین وجود ندارد (P=0/0283) (نمودار شماره 2).

باعث کاهش زمان ورود به اتاق تاریک (STL) می شود (9). این نتایج نشان دهنده کاهش یادگیری در مدل اجتنابی مهارتی و القای فراموشی است. بیشترین اثر فراموشی در دوز (7/5 mg/kg) دیده شد (P=0/000). در مطالعه حاضر از دوز مورفین (7/5 mg/kg) استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق پس از آموزش مقادیر مختلف گرلین (3, 1/5, 0/5 nmol/μl)، پنج دقیقه قبل از تزریق زیر جلدی مورفین (7/5 mg/kg) به صورت وابسته به دوز از تخریب حافظه ناشی از مورفین جلوگیری می کند [F(3 و 24) = 33/073, P=0/000]. آزمون مکمل توکی نشان داد در این گروه، تأخیر در ورود به اتاق تاریک به طور معنی داری افزایش پیدا کرده که به معنی بهبود حافظه است. آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد اختلاف معنی داری بین گروه های گرلین - سالین با گروه کنترل سالین - سالین وجود ندارد [F(3 و 24) = 2/04, P=0/134]. همچنین آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه اختلاف معنی داری را بین گروه های گرلین - سالین و گرلین مورفین نشان داد، که بیانگر تداخل بین نوع تیمار و مقدار داروست. [F(1 و 56) = 404/82, P=0/000، نوع تیمار]، [F(3 و 56) = 21/17, P=0/000، مقدار دارو]، [P=0/000،



نمودار شماره 1: اثر تزریق مقادیر مختلف گرلین پس از آموزش به تنهایی یا همراه با مورفین بر حافظه اجتنابی غیرفعال. هر ستون نمایانگر میانگین ± انحراف از میانگین مربوط به 7 سر موش صحرائی در هر گروه می باشد.  $P < 0/001$  \*\*\* در مقایسه با گروه سالین - سالین و  $P < 0/001$  +++ در مقایسه با گروه سالین مورفین می باشد.



نمودار شماره 2: اثر غیر فعال کردن ناحیه سیتوم میانی (MS) بر اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین. هر ستون نمایانگر میانگین  $\pm$  انحراف از میانگین مربوط به 7 سر موش صحرایی نر در هر گروه می باشد.  $P < 0/001$  \*\*\* در مقایسه با گروه سالیین - گرلین - مورفین است.

## بحث

و نوروپپتیدهای مختلف مغز میانجیگری می شود (26، 27). مورفین با اتصال به گیرنده خود در نورون پیش سیناپسی و مسدود کردن کانال کلسیم وابسته به ولتاژ رها سازی نوروترانسمیترهای تحریکی دخیل در فرآیندهای حافظه و یادگیری مانند گلو تامات و استیل کولین را کاهش می دهد. این دو نوروترانسمیتر برای انتقال اطلاعات و شکل گیری حافظه ضروری می باشند (28). مورفین همچنین با افزایش تشکیل انواع مختلف رادیکال های آزاد، عدم تعادل سطح آنتی اکسیدانی و سرکوب آنزیم های آنتی اکسیدان در نورون های هیپوکمپ منجر به استرس در شبکه آندوپلاسمی، پراکسیداسیون لیپید، آسیب DNA، اکسیداسیون پروتئین، القاء آپوپتوزیس و ایجاد اتوفازی می شود که نتیجه آن کاهش تراکم سیناپس های تحریکی و افزایش تراکم سیناپس های مهارتی است (29). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق گرلین (3nmol/ $\mu$ l) به درون بطن جانبی، 5 دقیقه قبل از تزریق زیرجلدی مورفین، از اثر تخریبی مورفین بر حافظه ممانعت کرده و سبب بهبود حافظه در گروه های تیمار شده با مورفین می شود. مطالعات قبلی برهمکنش میان گرلین و سیستم اویپویدی را تأیید نموده است. در

در مطالعه حاضر تأثیر تزریق گرلین به درون ناحیه بطن جانبی بر فراموشی ناشی از مورفین و نیز نقش اختصاصی ناحیه سیتوم میانی در این برهمکنش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعات قبلی نشان داده بود که تزریق پس از آموزش مورفین به صورت زیرجلدی تثبیت حافظه اجتنابی را مهار و سبب القاء فراموشی می شود (9). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق گرلین به درون ناحیه بطن جانبی، 5 دقیقه قبل از تزریق زیرجلدی مورفین، اثر تخریبی مورفین بر حافظه را کاهش می دهد. همچنین مطالعه حاضر نشان داد در بروز اثر گرلین در مهار فراموشی ناشی از مورفین ناحیه سیتوم میانی نقش مهمی دارد. اثر مورفین بر یادگیری و حافظه در مطالعات مختلفی از جمله مطالعات فارماکولوژیک و رفتاری مورد بررسی قرار گرفته است. مشاهده شده است که تزریق زیرجلدی و یا سیستمیک مورفین تشکیل و به یادآوری حافظه را در انسان و حیوانات آزمایشگاهی مختل می کند (24، 25). اثرات مورفین بر حافظه توسط گیرنده های اویپویدی مو (mu) و برهمکنش آن ها با سیستم های نوروترانسمیتری

این راستا Zeng و همکارانش نشان دادند که تزریق گرلین به درون بطن جانبی، اثر ضد دردی مورفین را مهار می‌کند (30). همچنین، آنتاگونیست گرلین فعالیت حرکتی و افزایش دوپامین ناشی از مورفین را مهار می‌کند (5). به علاوه، نشان داده شده است که آنتاگونیست گرلین منجر به کاهش ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین می‌شود که یادگیری در آن نقش مهمی دارد (4). Carlini و همکارانش در سال 2002 نشان دادند که تزریق داخل بطن جانبی گرلین حافظه اجتنابی را افزایش می‌دهد و با توجه به بیان گیرنده‌های گرلین در ناحیه هیپوکمپ و نقش هیپوکمپ در این نوع یادگیری، پیشنهاد دادند که این اثر توسط هیپوکمپ میانجیگری می‌شود (31). تزریق گرلین به درون ناحیه هیپوکمپ، فراموشی القاشده ناشی از مورفین را در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال مهار می‌کند، بنابراین می‌تواند در بهبود اختلالات حافظه ای ناشی از مورفین مورد توجه قرار گیرد (9). در تأیید این مکانیسم، نشان داده شده است که تزریق مستقیم گرلین به درون ناحیه هیپوکمپ سبب افزایش حافظه در روش یادگیری اجتنابی می‌شود (32). مطالعه قبلی ما نشان داد که در اثر مهار گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین در روش یادگیری اجتنابی، هیپوکمپ و گیرنده‌های نیکوتینی آن نقش دارند (15). از آنجایی که گیرنده‌های گرلین در نواحی مختلف مغز بیان می‌شوند و تزریق گرلین به درون ناحیه بطن جانبی سبب فعال شدن گیرنده‌های گرلینی در نواحی مختلف مغز می‌شود این احتمال وجود دارد که علاوه بر هیپوکمپ سایر نواحی مغزی بیان‌کننده گیرنده‌های گرلین نیز در این فرآیند نقش داشته باشند. مطالعات نشان می‌دهد گرلین باعث آزاد شدن گلو تامات از سیناپتوزوم‌های هیپوکمپ می‌شود. گرلین در سطح پیش‌سیناپسی احتمالاً با افزایش کلسیم باعث آزاد شدن گلو تامات می‌شود و باعث فعالیت گیرنده‌های AMPA و NMDA در نورون پس‌سیناپسی می‌شود، همچنین با فعال‌سازی گیرنده‌های GHSR و بیان زیر واحد NR2B نقش مهمی در تقویت

طولانی مدت حافظه دارد. NR2B موجب فعال‌سازی آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز و افزایش نیتریک اکسید می‌شود. از طرف دیگر گرلین با افزایش میزان کلسیم درون سلولی و فعالیت PKA منجر به فعالیت پروتئین CREB و به دنبال آن رونویسی از ژن‌های دخیل در تقویت حافظه می‌شود (33). گرلین همچنین با کاهش آپوپتوز، کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو و همچنین بهبود عملکرد میتوکندریایی، بقای عصبی را بهبود می‌بخشد. شواهد نشان می‌دهد که گرلین با فعال نمودن PKC و PKA مکانیسم‌های آپوپتوزی را مهار می‌کند. فعال‌سازی این مسیرها با کاهش فعال شدن BAX و افزایش بیان Bcl2 موجب بهبود نسبت Bcl2/BAX و سرکوب آپوپتوز و بهبود بقای سلولی می‌شود (34). ناحیه سیتوم میانی یکی از نواحی قاعده‌ای مغز است که خروجی‌های متعدد و از جمله پایانه‌های کولینرژیک به نواحی گسترده‌ای از مغز ارسال می‌کند (35). نوروترانسمیتر استیل کولین و گیرنده‌های آن در فرآیند حافظه و یادگیری نقش مهمی دارند (36) به طوری که کاهش سطح استیل کولین در مغز سبب کاهش حافظه و افزایش آن سبب افزایش حافظه می‌شود (37). به علاوه، مسیر کولینرژیک سیتوم - هیپوکمپ در تولید و تنظیم ریتم‌تا در هیپوکمپ (18) نقش دارد و غیر فعال کردن آن سبب از دست رفتن حافظه می‌گردد (38). از طرفی نشان داده شده است که یکی از مکانیسم‌های دخیل در اثرات تخریبی مورفین کاهش فعالیت و رهایی استیل کولین در نواحی دخیل در حافظه از جمله هیپوکمپ است (41-38). یادگیری اجتنابی غیرفعال یک نوع یادگیری وابسته به هیپوکمپ است و فعالیت ناحیه سیتوم میانی و سیستم کولینرژیک جهت تثبیت حافظه در این روش ضروری است (42). لذا در مطالعه حاضر، با استفاده از تکنیک غیر فعال‌سازی موقت توسط تزریق لیدوکائین، نقش ناحیه سیتوم میانی در اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین در این نوع یادگیری مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که لیدوکائین یک

داروی بی حس کننده موضعی است که نفوذپذیری نسبت به سدیم را کاهش داده و سبب غیرفعال شدن موقت انتقال پیام عصبی می شود. لذا در مطالعات متعدد جهت غیرفعال سازی عصبی از آن استفاده می شود (۴۴،۴۳).

نتایج به دست آمده نشان داد که غیرفعال کردن ناحیه سیتوم میانی توسط تزریق موضعی لیدوکائین، اثر تزریق پس از آموزش گرلین در بهبود فراموشی ناشی از مورفین را مهار می کند که بیانگر نقش ضروری ناحیه سیتوم میانی جهت بروز اثرات گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین است.

Parfitt و همکارانش در سال 2012 نشان دادند که غیرفعال کردن ناحیه سیتوم میانی سبب نقص در یادگیری اجتنابی می شود (38). از طرفی سیستم کولینرژیک در بروز اثرات فیزیولوژیک گرلین نقش مهمی دارد.

Jerlhag و همکارانش در سال 2006 نشان دادند که تزریق گرلین به درون ناحیه بطن جانبی سبب افزایش رهایی دوپامین در ناحیه اکومبسن و بروز اثرات پاداشی می شود و این اثر توسط سیستم کولینرژیک میانجیگری می شود (45). در حالی که آنتاگونیست گیرنده های نیکوتینی کولینرژیک سبب کاهش اثر گرلین در تحریک غذا خوردن می شود (46).

مطالعه قبلی ما نیز نشان داد که تزریق آنتاگونیست گیرنده های نیکوتینی به درون ناحیه تگمنتوم شکمی اثر گرلین در بهبود فراموشی ناشی از مورفین را مهار

می کند (16). همچنین، نشان داده شده است که تزریق محیطی و یا موضعی گرلین سبب افزایش رهایی استیل کولین می شود (47). از آن جایی که افزایش فعالیت سیستم کولینرژیک می تواند اثر مورفین بر حافظه را بهبود ببخشد (27) این احتمال وجود دارد که گرلین از طریق این مکانیسم با اثر مهاری مورفین مقابله نموده و سبب بهبود حافظه شود. گرچه باید توجه داشت که ناحیه سیتوم میانی خروجی های غیر کولینرژیک دیگری از جمله گلو تاما ترژیک (48) به هیپوکمپ و قشر اینتورینال ارسال می کند و نباید نتایج به دست آمده از غیرفعال کردن این ناحیه را تنها به نورون های کولینرژیک آن نسبت داد. لذا انجام مطالعات بیش تری جهت مشخص شدن نوروترانسمیترهای ناحیه سیتوم که در این برهمکنش نقش دارند، ضروری است. براساس مطالعه حاضر می توان نتیجه گرفت که اثر تزریق داخل بطن جانبی گرلین بر فراموشی ناشی از مورفین توسط غیرفعال شدن ناحیه سیتوم میانی، مهار می شود که این امر نشان دهنده نقش مهم این ناحیه در برهمکنش میان گرلین و مورفین در بروز اثرات شناختی است.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات کارشناسان و مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست شناسی دانشگاه اراک تشکر و قدردانی می شود.

## References

1. Pang ZP, Han W. Regulation of synaptic functions in central nervous system by endocrine hormones and the maintenance of energy homeostasis.
2. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and Function. *Physiol Rev* 2005; 85(2): 495-522.
3. Steiger A, Dresler M, Schüssler P, Kluge M. Ghrelin in mental health, sleep, memory. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340(1): 88-96.
4. Jerabek P, Havlickova T, Puskina N, Charalambous C, Lapka M, Kacer P, et al. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats. *Neurochem Int* 2017; 110: 101-113.
5. Sustkova-Fiserova M, Jerabek P, Havlickova T, Kacer P, Krsiak M. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens

- dopamine release and behavioral stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2014; 231(14): 2899-2908.
6. Meilandt WJ, Barea-Rodriguez E, Harvey SA, Martinez JJJr. Role of hippocampal CA3 mu-opioid receptors in spatial learning and memory. *J Neurosci* 2004; 24(12): 2953-2962.
  7. Kutlu MG, Gould TJ. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory contributions to development and maintenance of addiction. *Learn Mem* 2016; 23(10): 515-533.
  8. Beck B, Pourié G. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the hippocampus: role in learning and memory. *Nutr Rev* 2013; 71(8): 541-561.
  9. Darbandi N, Nazari Serenjah F, Moradi P. The Effect of Intrahippocampal Injection of Ghrelin on Morphine-Induced Amnesia by Passive Avoidance Task in Male Laboratory Rats. *Qom Univ Med Sci J* 2018; 12(8): 19-29 (Persian).
  10. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci* 2006; 9: 381-388.
  11. Beheshti S, Aslani N. Local injection of D-lys-3-GHRP-6 in the rat amygdala, dentate gyrus or ventral tegmental area impairs memory consolidation. *Neuropeptides* 2018; 67: 20-26.
  12. Gheri MS, Gabach LA, Buteler F, Vilcaes AA, Schiöth HB, Perez MF, et al. Ghrelin increases memory consolidation through hippocampal mechanisms dependent on glutamate release and NR2B-subunits of the NMDA receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 2015; 232(10): 1843-1857.
  13. Cuellar JN, Isokawa M. Ghrelin-induced activation of cAMP signal transduction and its negative regulation by endocannabinoids in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2001; 60(6): 842-851.
  14. Moon M, Choi JG, Nam DW, Hong HS, Choi YJ, Oh MS, et al. Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid- $\beta$ 1-42 oligomer-injected mice. *J Alzheimers Dis* 2011; 23(1): 147-159.
  15. Nazari-Serenjah F, Darbandi N, Majidpour S, Moradi P. Ghrelin modulates morphine-nicotine interaction in avoidance memory: involvement of CA1 nicotinic receptors. *Brain Res* 2019; 146315.
  16. Nazari-serenjah F, Darbandi N, Yadegary A, Momeni HR. The Effect of Intra-ventral tegmental area injection of ghrelin on morphine-induced amnesia in Male rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18(2): 147-160 (Persian).
  17. Mamad O, McNamara HM, Reilly RB, Tsanov M. Medial septum regulates the hippocampal spatial representation. *Front Behav Neurosci* 2015; 30:9:166.
  18. Yoder RM, Pang KC. Involvement of GABAergic and Cholinergic Medial Septal in Hippocampal Theta Rhythm. *Hippocampus* 2005; 15(3): 381-392.
  19. Alijanpour S, Rezayof A. Involvement of dorsal hippocampal and medial septal nicotinic receptors in cross state-dependent memory between WIN55, 212-2 and nicotine or ethanol in mice. *Neuroscience* 2013; 45: 61-73.
  20. Manseau F, Danik M, Williams S. A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. *J Physiol* 2005; 566(3): 865-884.

21. Jang SH, Yeo SS. Thalamocortical tract between anterior thalamic nuclei and cingulate gyrus in the human brain: Diffusion tensor tractography study. *Brain Imaging Behav* 2013; 7(2): 236-241.
22. Drever BD, Riedel G, Platt B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res* 2011; 221(2): 505-514.
23. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 2006; 494(3): 528-548.
24. Ghasemzadeh Z, Rezayof A. Neuromodulatory effects of the dorsal hippocampal endocannabinoid system in dextromethorphan/morphine-induced amnesia. *Eur J Pharmacol* 2017; 794: 100-105.
25. Kitanaka J, Kitanaka N, Hall FS, Fujii M, Goto A, Kanda Y, et al. Memory Impairment and Reduced Exploratory Behavior in Mice after Administration of Systemic Morphine. *J xp Neurosci* 2015; 9: 27-35.
26. Sharifi KA, Rezayof A, Torkaman-Boutorabi A, Zarrindast MR. The major neurotransmitter systems in the basolateral amygdala and the ventral tegmental area mediate morphine-induced memory consolidation impairment. *Neuroscience* 2017; 353: 7-16.
27. Khajepour L, Rezayof A, Zarrindast MR. Involvement of dorsal hippocampal nicotinic receptors in the effect of morphine on memory retrieval in passive avoidance task. *Eur J Pharmacol* 2008; 584(2-3): 343-351.
28. Yu C, Lu Y, Guoku H, Xufeng C, Fang N, Li Y, Han L, Huangui X. Regulation of morphine-induced synaptic alterations: Role of oxidative stress, ER stress, and autophagy. *J Cell Biol* 2016; 215(2): 245-258.
29. Skrabalova J, Drastichova Z, Novotny J. Morphine as a Potential Oxidative Stress-Causing Agent. *Mini Rev Org Chem* 2013; 10(4): 367-372.
30. Zeng P, Chen JX, yang B, Zhi X, Guo FX, Sun ML, et al. Attenuation of systemic morphine-induced analgesia by central administration of ghrelin and related peptides in mice. *Peptides* 2013; 50: 42-49.
31. Carlini VP, Monzón ME, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(5): 739-743.
32. Kajbaf F, Ahmadi R, Fatemi Tabatabaie R, Safarpour E. Effect of intrahippocampal ghrelin agonist administration on passive avoidance learning and anxiety in rats. *Pak J Biol Sci* 2012; 15(22): 1063-1068.
33. Qian J, Du X, Li Y, Gong B, Shi L, Tang T, et al. The neurological effects of ghrelin in brain diseases: Beyond metabolic functions. *Neurosci Biobehav Rev* 2017; 73: 98-111.
34. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(3): 175-190.
35. Khakpai F, Nasehi M, Haeri-Rohani A, Eidi A, Zarrindast MR. Septo-Hippocampo-Septal Loop and Memory Formation. *Basic Clin Neurosci* 2013; 4(1): 5-23.
36. Gold PE. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 2003; 80(3): 194-210.
37. Hasselmo MH. The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16(6): 710-715.
38. Hasselmo E, Stern CE. Theta rhythm and the encoding and retrieval of space and time. *Neuroimage* 2014; 85(pt 02): 656-666.
39. Decker MW, McGaugh JL. The role of interactions between the cholinergic system

- and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 1991; 7(2): 151-168.
40. Jackisch R, Geppert M, Brenner AS, Illes P. Presynaptic opioid receptors modulating acetylcholine release in the hippocampus of the rabbit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 332: 156-162.
  41. Li Z, Wu CF, Pei G, Xu NJ. Reversal of morphine-induced memory impairment in mice by withdrawal in Morr water maze: Possible involvement of cholinergic system. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001; 68: 507-513.
  42. Parfitt GM, Campos RC, Barbosa AK, Koth AP, Barros DM. Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2012; 97: 183–188.
  43. Salazar BC, Flash DO, Walewski JL, Recio-Pinto E. Lidocaine has different effects and potencies on muscle and brain sodium channels. *Brain Res* 1995; 699(2): 305-314.
  44. Malpeli JG. Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J Neurosci Methods* 1999; 86(2): 119-128.
  45. Jerlhag E, Eggecioglu E, Dickson SL, Andersson M, Svensson L, Engel JA. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol* 2006; 11(1): 45-54.
  46. Dickson SL, Hrabovszky E, Hansson C, Jerlhag E, Alvarez-Crespo M, Skibicka KP, et al. Blockade of central nicotine acetylcholine receptor signaling attenuate ghrelin-induced food intake in rodents. *Neuroscience.* 2010; 171(4): 1180-1186.
  47. Jerlhag E, Janson AC, Waters S, Engel JA. Concomitant Release of Ventral Tegment al Acetylcholine and Accumbal Dopamine by Ghrelin in Rats. *PloS One* 2012; 7(11): e49557.
  48. Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido- Sanabria E. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse* 2005; 58: 151-164.