

Effect of Morphine on Passive Avoidance Memory in Cholestatic Rats

Mahsa Poureidi¹,
Zinat Heydarnia Kalati²,
Seyed-Hosein Abtahi-Evary³,
Masoumeh Fani⁴,
Maryam Moghimian⁵

¹ MSc in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

² MSc in Physiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

³ Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

⁴ Lecturer, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

(Received March 14, 2020 ; Accepted May 3, 2020)

Abstract

Background and purpose: Morphine as an opioid compound has different and sometimes conflicting effects on memory and learning process. Bile duct ligation causes cholestasis, which disrupts liver function. It is known that opioid systems are involved in cholestasis. The aim of this study was to investigate the possible effect of morphine on the memory of cholestatic rats.

Materials and methods: In this experimental study, the cholestatic model in male Wistar rats (weighing 200-250 g) was induced by bile duct ligation (BDL). The animals were injected with morphine (4 and 6 mg/kg, ip), naloxone (0.6 and 0.8 mg/kg, ip), and morphine and naloxone in different groups. Passive avoidance memory was evaluated on day 7 after BDL by shuttle box test. Data were analyzed by PRISM software and ANOVA.

Results: Naloxone (0.6 and 0.8 mg/kg), 30 min before the test, did not show significant changes in the memory of the cholestatic rats compared to the BDL group, whereas, morphine (4 and 6 mg/kg) showed significant increase in step-through latency ($P < 0.05$). Also, naloxone (0.6 mg/kg, ip) 15 minutes before injection of morphine (6 mg/kg) showed a significant increase in acquired memory on day 7 after BDL ($P < 0.0001$).

Conclusion: According to findings, morphine had a protective effect on memory impairment induced by cholestasis.

Keywords: morphine, passive avoidance memory, cholestasis

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (186): 13-23 (Persian).

* Corresponding Author: Maryam Moghimian- Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran (E-mail: moghimian.m@gmu.ac.ir)

اثر مورفین بر حافظه اجتنابی غیر فعال در موش های صحرائی کلاستاز شده

مهسا پورعیدی¹
زینت حیدرنیا کلاتی²
سید حسین ابطحی ایوری³
معصومه فانی⁴
مریم مقیمیان⁵

چکیده

سابقه و هدف: مورفین به عنوان یک ترکیب اپیوئیدی تأثیرات مختلف و گاه متضادی بر روند حافظه و یادگیری دارد. بستن مجرای صفراوی باعث کلاستاز می شود که عملکرد کبد را مختل می کند. مشخص شده است که سیستم های اپیوئیدی در کلاستاز نیز نقش دارند. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر احتمالی مورفین بر حافظه موش های کلاستاتیک می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، مدل کلاستاز در موش های صحرائی نر نژاد ویستار (با وزن 200-250 گرم) توسط بستن مجرای صفراوی (BDL) القا شد. مورفین (4 و 6 mg/kg، داخل صفاقی)، نالوکسان (0/6 و 0/8 mg/kg، داخل صفاقی) و مورفین + نالوکسان در گروه های مختلف به حیوانات تزریق شدند. حافظه اجتنابی غیر فعال در روز 7 بعد از BDL توسط تست شاتل باکس ارزیابی شد. نتایج توسط نرم افزار آماری PRISM و آزمون ANOVA آنالیز شدند.

یافته ها: تزریق نالوکسان (0/6 و 0/8 mg/kg، 30 دقیقه قبل از آزمون، در دستیابی به حافظه موش های کلاستاز شده تغییر معنی داری نسبت به گروه BDL نشان نداد، در حالی که تزریق مورفین (4 و 6 mg/kg) در زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0/05$). همچنین تزریق یک دوز نالوکسان (0/6 mg/kg، داخل صفاقی) 15 دقیقه قبل از تزریق یک دوز مورفین (6 mg/kg) باعث افزایش معنی داری در حافظه اکتسابی در روزهای 7 بعد از BDL شد ($P < 0/0001$). **استنتاج:** با توجه به داده ها احتمال داده می شود، مورفین اثر محافظتی بر روی تخریب حافظه ناشی از کلاستاز داشته باشد.

واژه های کلیدی: مورفین، حافظه احترازی غیر فعال، کلاستاز

مقدمه

فرایندهای پاتولوژیک از جمله بیماری های نورودژنراتیو، سکت، تومورها، ترومای سر، هیپوکسی، جراحی قلب، سوء تغذیه، کمبود اختلال توجه، افسردگی، اضطراب، عوارض جانبی دارو و سالمندی می باشد (2). یادگیری و حافظه جزء رفتارهای پیچیده مغزی هستند که عالی ترین

حافظه فرایندی ذهنی است که اطلاعات را ثبت، ذخیره و بازخوانی می کند و با توجه به افزایش شمار مبتلایان به اختلالات یادگیری و حافظه در دوران سالخوردگی، امروزه یکی از مهم ترین موضوعات مورد مطالعه می باشد (1). حافظه در معرض انواع مختلف

E-mail: moghimian.m@gmu.ac.ir

مؤلف مسئول: مریم مقیمیان - گناباد: دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی

1. کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گناباد، ایران

2. کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گناباد، ایران

3. دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گناباد، ایران

4. مربی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گناباد، ایران

5. دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گناباد، ایران

تاریخ دریافت: 1398/12/24 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/12/25 تاریخ تصویب: 1399/2/14

سطوح عملکردی سیستم عصبی مرکزی را شامل می‌شوند (3). مطالعاتی نشان داده‌اند که اپیوئیدها مدارهای مغزی در گیر در حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار می‌دهند (5,4). اثرات مورفین بر حافظه توسط گیرنده‌های اپیوئیدی و برهمکنش آن‌ها با سیستم‌های نوروترانسمیتری مو (mu) و نوروپپتیدهای مختلف مغز میانجیگری می‌شود (6,7). 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 می‌دهد این دو نوروترانسمیتر برای انتقال اطلاعات و شکل گیری حافظه ضروری می‌باشند (8). مورفین همچنین با افزایش تشکیل انواع مختلف رادیکال‌های آزاد، عدم تعادل سطح آنتی اکسیدانی و سرکوب آنزیم‌های آنتی اکسیدان در نورون‌های هیپوکمپ منجر به استرس در شبکه آندوپلاسمی، پراکسیداسیون لیپید، آسیب اکسیداسیون پروتئین، القاء آپوپتوزیس و ایجاد DNA اتوفاژی می‌شود که نتیجه آن کاهش تراکم سیناپس‌های تحریکی و افزایش تراکم سیناپس‌های مهارتی است (9). در ارتباط با نقش سیستم اپیوئیدی بر روند حافظه و یادگیری، مطالعات متناقضی وجود دارد (10,11). اپیوئیدها به ویژه مورفین می‌توانند اثرات متفاوتی بر فرایند یادگیری و حافظه داشته باشد و اثرات مورفین وابسته به تجویز، دوز دارو و مدل بررسی حافظه در حیوانات می‌باشد (12). الگوهای رفتاری متعددی برای ارزیابی حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد (13,14). مشاهده شده است که مورفین بخاطر آوری حافظه را در روش احترازی غیرفعال تسهیل می‌کند و این اثرات به‌طور کامل توسط نالوکسان آنتاگونیست می‌شود (15). از طرفی مشاهده شده است که تجویز مورفین موجب تخریب یادگیری احترازی فعال می‌شود که این اثر وابسته به دوز مورفین بود (16).

کبد به دلیل سنتز و متابولیسم مواد مورد نیاز بدن و همچنین غیر فعال کردن هورمون‌ها، مواد سمی و داروها

نقش مهمی در هومئوستاز بدن ایفا می‌کند، به‌علاوه سلول‌های کبدی موادی مثل بیلیروبین حاصل از تخریب گلبول‌های قرمز پیر را به همراه مواد دیگری مثل اسیدهای صفراوی و کلسترول به داخل مجاری صفراوی ترشح کرده و از این طریق این مواد را از بدن دفع می‌کنند (17). آسیب‌های کبدی می‌توانند منجر به اختلال در ترشح صفرا شوند که این اختلال تحت عنوان کلاستاز کبدی شناخته می‌شود. در کلاستاز مواد مختلف صفرا از جمله اسیدهای صفراوی در پلاسما تجمع می‌یابند (18). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بروز کلاستاز می‌تواند بر بسیاری از رفتارهای ادراکی تاثیر گذاشته و موجب اختلالاتی بویژه کاهش حافظه گردد. تاکنون مکانیسم دقیق این نوع درگیری‌های عصبی شناخته نشده ولی ظاهراً باقی ماندن ترکیباتی که برای دفع، وابسته به جریان صفراوی می‌باشند مانند اسیدهای صفراوی و اندوتوکسین‌های داخلی در ایجاد علائم بالینی نقش داشته باشند (19-21). به‌علاوه در توجیه اختلالات حرکتی و شناختی متعاقب انسداد مجرای صفراوی مطالعات نشان دادند که الگوی شلیک نورن‌ها در اثر تغییر در رهایش میانجی‌های عصبی گلو تامات و گابا در هیپوکمپ و مخچه تغییر می‌یابد (22,23). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که جهت حفظ عملکرد طبیعی مغز، تعامل بین سلول‌های مغز و کبد دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. با توجه به این که سلول‌های کبدی نقش مهمی در دفع مواد نوروتوکسین دارند، هر گونه آسیب به این سلول‌ها می‌تواند تاثیرات منفی بر بخش‌های مختلف مغز داشته باشد (24). در مطالعات حیوانی مشاهده شده است که ترشح صفرا توسط یک مسیر مرکزی مواد اپیوئیدی تنظیم می‌شود. از طرفی سطوح آندوژنیک پپتیدهای اپیوئیدی در بیماران مبتلا به کلاستاتیک و همچنین در رت‌های کلاستاز شده افزایش می‌یابد (18,25-27). با توجه به شواهدی که نشان می‌دهد کلاستاز منجر به اختلال فرایند حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود (28) و همچنین مشخص شدن این امر که اپیوئیدها در پاتوفیزیولوژی

کلاستاز نقش دارند (29,18) و از طرفی با توجه به نقش سیستم اپیوئیدی در روند حافظه و یادگیری (5,4)، ما در این مطالعه دخالت احتمالی سیستم اپیوئیدی را در گسترش اختلال حافظه ناشی از کلاستاز با استفاده از مدل اجتنابی غیرفعال در موش صحرایی بررسی کردیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه‌ی تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 250 تا 200 گرم استفاده شد. حیوانات در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی گناباد تکثیر و نگهداری شدند. رت‌ها آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند و در دمای 21-23 درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی - تاریکی 12 ساعته، در قفس‌های مخصوص به صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری می‌شدند. این طرح با کسب مجوز از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گناباد با کد اخلاق 1/432/پ انجام شد. نمونه‌های استفاده شده در هر گروه به صورت تصادفی انتخاب شدند و آزمایش‌ها طی مرحله نوری در ساعت‌های 8 تا 14 انجام گرفت، همچنین از هر حیوان تنها یک بار استفاده شد.

گروه‌های مورد مطالعه:

در این مطالعه 13 گروه 6تایی مورد مطالعه قرار گرفت که شامل گروه کنترل (بدون هیچ مداخله‌ای)، گروه شم (جراحی شده بدون بستن مجاری صفراوی)، گروه BDL (بستن مجاری صفراوی یا القای کلاستاز)، گروه‌های mor4 و mor6 که مورفین (تهیه شده از شرکت تماد تهران، ایران) به ترتیب با دوز 4 و 6 میلی‌گرم بر کیلوگرم (30) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند، گروه‌های BDL-mor4 و BDL-mor6 که کلاستاز شده و مورفین را به ترتیب با دوز 4 و 6 میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند، گروه‌های nal0.6 و nal0.8 که نالوکسان (تهیه شده از شرکت تهران دارو، ایران) را به ترتیب با دوز 0/6 و 0/8 میلی‌گرم بر کیلوگرم (30)

دریافت کردند، گروه‌های BDL-nal0.6 و BDL-nal0.8 که کلاستاز شده و نالوکسان را به ترتیب با دوز 0/6 و 0/8 میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند، گروه mor-nal (گروهی که نالوکسان با دوز 0/6 میلی‌گرم بر کیلوگرم و به فاصله 15 دقیقه بعد مورفین را با دوز 6 میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند)، گروه BDL-mor-nal (گروه کلاستاز شده که نالوکسان با دوز 0/6 میلی‌گرم بر کیلوگرم و به فاصله 15 دقیقه بعد مورفین را با دوز 6 میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند). در تمام گروه‌ها مورفین و نالوکسان 30 دقیقه قبل از آزمون شاتل باکس به داخل صفاق حیوانات تزریق می‌شد. حافظه اجتنابی غیرفعال در روز 7 بعد از BDL توسط تست شاتل باکس ارزیابی شد.

جراحی کلاستاتیک (BDL):

برای بستن مجاری صفراوی (ایجاد کلاستازی)، حیوانات با کتامین (50 میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) و زایلازین (10 میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی، موهای ناحیه میانی شکم زیر جناغ توسط قیچی برادشته، سپس یک شکاف طولی به اندازه 2 سانتی‌متر در خط میانی شکم ایجاد شد و در دو مرحله پوست و عضلات جدار شکم باز شد. با بیرون کشیدن دو لوب جلویی از 4 لوب کبد مجرای صفراوی قابل رویت گردید. در گروه شاهد، مجاری صفراوی با استفاده از پنست فقط مشاهده شد. در گروه کلاستاتیک پس از یافتن مجرا، یک عدد پنس زیر آن قرار داده شد و با استفاده از نخ در دو جایگاه با فاصله نیم سانتی‌متر از هم دو گره زده شد. سپس مجرا بین دو گره قطع گردید و در داخل شکم آزاد شد. جدار شکم در دو لایه عضله و پوست با نخ به شکل بخیه دوخته شد. بعد از اتمام عمل جراحی به میزان 1 میلی‌لیتر نرمال سالین داخل صفاق رت جراحی شده تزریق گردید. پس از به هوش آمدن رت در گروه‌های 6 تایی با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی نگهداری شدند. در

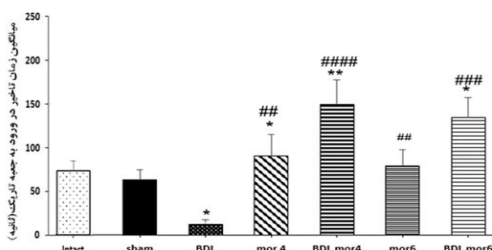
آنالیز آماری:

تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری Graphpad prism 8.0.2 انجام شد. جهت تعیین سطوح تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها از آزمون one-way ANOVA استفاده شد و جهت مقایسه دوبه دو گروه‌ها از آزمون متعاقب Tukey استفاده گردید. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده است و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثرات کلاستاز بر روند حافظه

از آنجایی که بر اساس نتایج به دست آمده هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل (Intact) و گروه شم وجود نداشت (نمودار شماره 1) نتایج در گروه‌های مختلف با گروه شم مقایسه شد. آنالیز داده‌ها توسط آزمون One-way ANOVA و تست تعقیبی Tukey نشان داد که به دنبال بستن مجاری صفراوی و القای کلاستاز در گروه BDL، میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه شم به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P < 0/05$ ، نمودار شماره 1).



نمودار شماره 1: مقایسه تاثیر مورفین بر میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک در موش‌های کلاستاز شده ($n=6$). نمودارها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده‌اند. (*: $P < 0/05$ و **: $P < 0/01$ در مقایسه با گروه شم و #: $P < 0/01$ و ####: $P < 0/0001$ در مقایسه با گروه BDL)

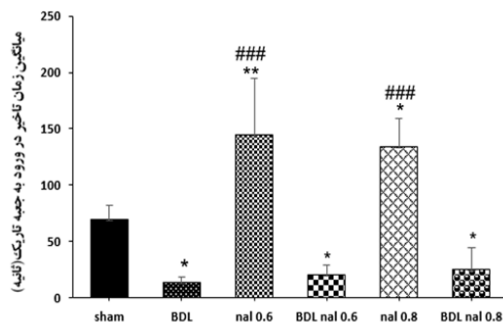
تاثیر تزریق داخل صفاقی دوز 4 و 6 میلی گرم مورفین بر حافظه در صورت وجود و عدم وجود کلاستاز:

آنالیز داده‌ها توسط آزمون One-way ANOVA

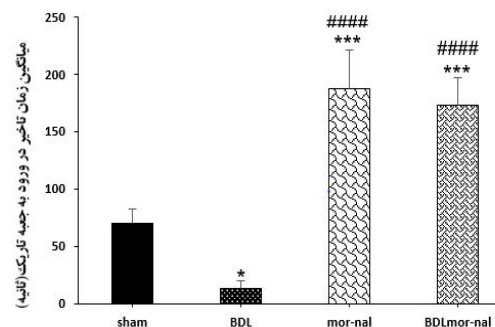
ادامه، حافظه با استفاده از آزمون یادگیری اجتناب غیرفعال در روز 7 بعد از ایجاد کلاستاز ارزیابی شد.

آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال:

دستگاه یادگیری اجتنابی مهار (غیرفعال)، مدل Step-Through از جعبه‌ای تشکیل شده که به وسیله دیواره‌ای به دو قسمت سیاه و سفید با اندازه یکسان (با ابعاد 20، 20، 30 سانتی متر) تقسیم می‌شود. درون دیواره بین دو قسمت درب کشویی به ابعاد 7*9 سانتی متر تعبیه شده است. این دستگاه دارای دو بخش سفید و سیاه رنگ می‌باشد که بخش سیاه رنگ در قسمت کف دارای میله‌های فولادی با فاصله 1 سانتی متر بوده و شوک الکتریکی از طریق این میله‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می‌شود. روش اجتنابی مهار برای بررسی حافظه در موش صحرایی در 2 روز متوالی انجام شد. روز اول که روز آموزش نام دارد شامل آموزش دادن حیوانات در دستگاه بود. ابتدا هر حیوان به آرامی در بخش روشن دستگاه قرار گرفت، پس از گذشت 5 ثانیه درب کشویی باز شده و به حیوان اجازه داده شد که وارد قسمت سیاه دستگاه شود. بلافاصله بعد از ورود حیوان به بخش سیاه، درب کشویی بسته شده و حیوان از دستگاه خارج شد. پس از گذشت 30 دقیقه این حیوان دوباره به بخش سفید دستگاه انتقال یافت و پس از گذشت 5 ثانیه درب کشویی باز شد تا حیوان وارد بخش تاریک گردد. با ورود حیوان به بخش تاریک و بسته شدن درب کشویی، حیوان تحریک الکتریکی را با شدت 1 میلی آمپر و فرکانس 50 هرتز، به مدت 3 ثانیه دریافت کرد. آزمون 24 ساعت پس از مرحله آموزش انجام شد. در روز آزمون همانند روز آموزش، حیوان در بخش سفید قرار گرفت و با باز شدن درب کشویی زمان تاخیر حیوان در ورود به بخش تاریک دستگاه به عنوان معیاری برای بررسی میزان حافظه در نظر گرفته شد. بیشترین مقدار تاخیر برای ورود به بخش تاریک که به عنوان حافظه کامل شناخته می‌شود 300 ثانیه در نظر گرفته شد (31).



نمودار شماره 2: مقایسه تاثیر نالوکسان بر میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک در موش های کلاستاز شده ($n=6$). نمودارها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده اند.
(*) $P < 0/05$ و (***) $P < 0/001$ در مقایسه با گروه شم و (###) $P < 0/001$ در مقایسه با گروه BDL



نمودار شماره 3: مقایسه اثر توام مورفین-نالوکسان بر میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک در موش های کلاستاز شده ($n=6$). نمودارها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده اند.
(*) $P < 0/05$ و (***) $P < 0/001$ در مقایسه با گروه شم و (####) $P < 0/0001$ در مقایسه با گروه BDL

تاثیر تزریق توام مورفین و نالوکسان بر حافظه در صورت وجود و عدم وجود کلاستاز:

در گروه mor-nal که 30 دقیقه قبل از آزمون شاتل باکس نالوکسان و به فاصله 15 دقیقه بعد مورفین دریافت کرده بودند، مشاهده شد که میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک به طور معنی داری نسبت به گروه شم ($P < 0/001$) و همچنین گروه BDL ($P < 0/0001$) افزایش می یابد. مقایسه نتایج برای گروه BDL-mor-nal نسبت به گروه شم و BDL نیز مشابه با گروه mor-nal بود.

و تست تعقیبی Tukey نشان داد که تزریق مورفین با دوز 4 میلی گرم بر کیلو گرم به داخل صفاق حیوانات (گروه mor4) قبل از تست شاتل باکس منجر به افزایش معنی داری در میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه شم شد ($P < 0/05$)، نمودار شماره 1). تزریق مورفین با دوز 6 میلی گرم بر کیلو گرم (گروه mor6) نیز منجر به افزایش در میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک شد نسبت به گروه شم شد ولی معنی دار نبود ($P > 0/05$) (نمودار شماره 1). همچنین مدت زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک در گروه های BDLmor6 و BDLmor4 که کلاستاز شده و مورفین را به ترتیب با دوز 4 و 6 میلی گرم دریافت کرده بودند، نسبت به گروه شم و همچنین نسبت به گروه BDL افزایش معنی داری داشت (به ترتیب $P < 0/01$ و $P < 0/05$ نسبت به گروه شم و $P < 0/0001$ و $P < 0/001$ نسبت به گروه BDL، نمودار شماره 1).

تاثیر تزریق داخل صفاقی دوز 0/6 و 0/8 میلی گرم نالوکسان بر حافظه در صورت وجود و عدم وجود کلاستاز:

آنالیز داده ها توسط آزمون One-way ANOVA و تست تعقیبی Tukey نشان داد که تزریق نالوکسان (با دوز 0/6 و 0/8 میلی گرم، داخل صفاقی) قبل از ارزیابی حافظه توسط شاتل باکس منجر به افزایش معنی داری در میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه شم و BDL می شود. (به ترتیب $P < 0/001$ و $P < 0/05$ نسبت به گروه شم و $P < 0/001$ نسبت به گروه BDL نمودار شماره 2).

در گروه های BDLnal0.6 و BDLnal0.8 که کلاستاز شده و به ترتیب نالوکسان را با دوز 0/6 و 0/8 میلی گرم دریافت کرده بودند میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک به طور معنی داری نسبت به گروه شم کاهش پیدا کرد ($P < 0/05$)، نمودار شماره 3) در حالی که نسبت به گروه BDL تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

بحث

با توجه به مطالعات قبلی مشخص شده است که سطوح اپیوئیدهای اندوژنیک در حیوانات کلاستاتیک افزایش پیدا می‌کند (26، 27). از طرفی سیستم اپیوئیدی در روند حافظه و یادگیری نیز ایفای نقش می‌کند (4، 5). همچنین شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد کلاستاز منجر به اختلال فرایند حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود (28). ما در این مطالعه دخالت سیستم اپیوئیدی را بر حافظه رت‌های کلاستاز شده بررسی کردیم. در بررسی اثر کلاستاز بر روند حافظه مشاهده شد که کلاستاز منجر به کاهش زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه شم می‌شود. در مطالعه‌ای که اثر آسیب کبدی را بر اختلال حافظه فضایی با استفاده از تست ماز آبی موریس بررسی کرده است نتایج حاصل همسو با نتایج این مطالعه می‌باشد (28). در مطالعه‌ای مشاهده شده است که نارسایی کبدی متعاقب انسداد مجرای صفراوی موجب تغییر در گیرنده‌های AMPA و NMDA می‌شود. همچنین در مطالعه دیگری سیر زمانی بروز اختلال حافظه فضایی در هفته‌های 2، 3 و 4 متعاقب انسداد مجرای صفراوی تایید شده است (32). علاوه بر این در توجیه اختلال حرکتی و شناختی متعاقب انسداد مجرای صفراوی مطالعات دیگر نشان دادند که الگوی شلیک نورن‌ها در اثر تغییر در رهائش میانجی‌های عصبی گلوتامات و گابا در هیپو کمپ و مخچه تغییر می‌یابد (22، 23). با توجه به اینکه گفته می‌شود کلاستاز با افزایش آندوتوکسین‌ها مرتبط است و آندوتوکسین‌ها نیز منجر به آسیب با شدت‌های متفاوت در مغز می‌شوند (33)، لذا احتمال دارد که تخریب حافظه ناشی از افزایش آندوتوکسین‌ها به دنبال کلاستاز باشد.

در ارتباط با اثر مورفین بر روند حافظه و یادگیری مطالعات ضد و نقیضی وجود دارد. بخش عمده مطالعات نشان می‌دهند که مورفین منجر به کاهش حافظه می‌شود از طرفی در مطالعاتی مورفین منجر به تسهیل حافظه می‌شود. مشخص شده است که مورفین باعث نقص‌های

شناختی می‌شود و استفاده از اپیوئیدها به ویژه مورفین، حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار داده و می‌تواند نورون‌زایی را در هیپو کمپ موش‌های صحرایی بالغ مهار کند (4). در مدل تزریق سیستمیک مورفین نیز مشاهده شد که مورفین منجر به اختلال در تثبیت حافظه و ایجاد فراموشی می‌شود (10). در مطالعه‌ای دیگر نیز مشاهده شد که تزریق مورفین به ناحیه آمیگدال باعث اختلال در اجرای آزمایش اجتنابی مهارتی شده و منجر به فراموشی در موش‌های صحرایی می‌شود (34). در تحقیق دیگری مشاهده شد که تزریق مورفین در ناحیه تگمنتال شکمی به صورت حاد در موش‌های سوری در آزمایش اجتنابی غیرفعال باعث تخریب بازیابی حافظه می‌گردد (35). همچنین مورفین منجر به تخریب یادگیری احترازی فعال می‌شود که وابسته به دوز مورفین است (16). در این مطالعه نتایج نشان داد که تزریق داخل صفاقی مورفین با دوز 4 میلی گرم، قبل از آزمون ارزیابی حافظه منجر به افزایش معنی‌داری در میانگین مدت زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه شم شد (نمودار شماره 1) در حالی که این افزایش برای دوز بالاتر 6 میلی گرم معنی‌دار نبود. بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه، مورفین در دوزهای پایین دارای نقش تسهیلی بر روند حافظه موش صحرایی است در حالی که در دوزهای بالاتر می‌تواند اثرات عکس داشته باشد.

در ادامه مطالعه، با تزریق مورفین با دوز 4 و 6 میلی گرم به موش‌های کلاستاز شده، اثر مورفین را به عنوان آگونیست اپیوئیدی بر حافظه موش‌های کلاستاز شده بررسی کردیم. مشاهده شد که تزریق داخل صفاقی مورفین به موش‌های کلاستاز شده منجر به افزایش معنی‌داری در میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه شم و همچنین BDL می‌شود (نمودار شماره 1). به عبارتی کلاستاز اثرات تسهیلی مورفین بر حافظه را افزایش می‌دهد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اپیوئیدها در پاتوفیزیولوژی و تظاهرات کلاستاز نیز نقش دارند (18، 29). با توجه به

این که مشخص شده است سطوح اپیوئیدی در موش های کلاستاتیک افزایش می یابد (26، 27)، بنابراین احتمالا مورفین تزریقی با مواد اپیوئیدی اندوژنیک ناشی از کلاستاز منجر به هم افزایی در اثرگذاری بر روند حافظه شده است.

در مدل ماز آبی مورفین مشخص شده است که آگونیست های اپیوئیدی منجر به تخریب روند فراگیری و آنتاگونیست آن ها منجر به تسهیل روند یادگیری می شوند (36، 37).

در مطالعه احمدی و همکاران نیز مشاهده شد که اختلال حافظه ناشی از اشعه تلفن همراه در مرحله تثبیت حافظه، توسط بلاک سیستم اپیوئیدی به طور کامل بهبود می یابد (11). از طرفی در مطالعه دیگری مورفین، به خاطر آوری حافظه را در روش احترازی غیر فعال تسهیل کرد که این اثر را از طریق گیرنده های مو- اپیوئیدی انجام می دهد و اثرات به طور کامل بوسیله نالوکسان آنتاگونیزه می شود (38). با توجه به مطالعات فوق انتظار می رفت در این مطالعه نیز اثرات تزریق نالوکسان بر حافظه عکس اثرات مورفین باشد، به عبارتی نالوکسان اثرات مورفین را آنتاگونیزه کند در حالی که نتایج نشان داد تزریق داخل صفاقی نالوکسان در هر دو دوز 0/6 و 0/8 میلی گرم منجر به افزایش میانگین زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک می شود (نمودار شماره 2).

مقایسه نتایج در گروه های BDL-nal0.6 و BDLnal0.8 با گروه BDL، و گروه هایی که کلاستاز نشدند و نالوکسان دریافت کرده بودند، نشان داد که کلاستاز اثرات تسهیلی نالوکسان بر حافظه را بلاک می کند. در ادامه نیز تاثیر تزریق همزمان نالوکسان و مورفین بر حافظه بررسی شد. بر اساس نتایج، تزریق توامان مورفین و نالوکسان منجر به افزایش معنی داری در مدت زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه شم و BDL می شود (نمودار شماره 3) و همچنین در گروهی که کلاستاز شده و تزریق توامان مورفین و نالوکسان را دریافت کرده بودند نیز افزایش معنی داری در مدت زمان تاخیر در ورود به جعبه تاریک مشاهده شد. با توجه به نتایج، کلاستاز منجر به کاهش حافظه می شود، اما اثرات تسهیلی مورفین بر حافظه در موش های کلاستاز شده افزایش می یابد، بنابراین احتمالا اثرات کلاستاز بر کاهش حافظه از مکانیسمی غیر از دخالت آن بر سیستم های اپیوئیدی می باشد. براساس مطالعات قبلی احتمالا کلاستاز باعث تغییر در گیرنده ها و تغییر در رهایش میانجی های عصبی و الگوی شلیک نورونی می شود و از طرفی منجر به افزایش آندوتوکسین ها شده و باعث کاهش حافظه می شود و مورفین به واسطه مکانیسم های ناشناخته اثر محافظتی بر روی تخریب حافظه ناشی از کلاستاز دارد.

References

1. Thompson RF, Kim JJ. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24): 13438-13444.
2. Kumar H, More SV, Han SD, Choi JY, Choi DK. Promising therapeutics with natural bioactive compounds for improving learning and memory—a review of randomized trials. *Molecules* 2012; 17(9): 10503-10539.
3. Assunção M, Santos-Marques MJ, Carvalho F, Andrade JP. Green tea averts age-dependent decline of hippocampal signaling systems related to antioxidant defenses and survival. *Free Radical Biol Med* 2010; 48(6): 831-838.
4. Eisch AJ, Barrot M, Schadt CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(13): 7579-7584.
5. Salmazadeh F, Fathollahi Y, Semnanian S, Shafizadeh M. Dependence on morphine

- impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res* 2003; 965(1-2): 108-113.
6. 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.
 7. 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.
 8. Cai Y, Yang L, Hu G, Chen X, Niu F, Yuan L, et al. Regulation of morphine-induced synaptic alterations: Role of oxidative stress, ER stress, and autophagy. *J Cell Biol* 2016; 215(2): 245-258.
 9. Skrabalova J, Drastichova Z, Novotny J. Morphine as a Potential Oxidative Stress-Causing Agent. *Mini Rev Org Chem* 2013; 10(4): 367-372.
 10. Tirgar F, Rezayof A, Alijanpour S, Yazdanbakhsh N. Interactive effects of morphine and nicotine on memory function depend on the central amygdala cannabinoid CB1 receptor function in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2018; 82: 62-8.
 11. Ahmadi S, Alavi SS, Jadidi M, Ardjmand A. Exposure to GSM 900-MHz mobile radiation impaired inhibitory avoidance memory consolidation in rat: Involvements of opioidergic and nitrergic systems. *Brain Res* 2018; 1701: 36-45.
 12. Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 2004; 497(2): 197-204.
 13. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol learn Mem* 1997; 68(3): 285-316.
 14. Izquierdo I, McGaugh JL. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol* 2000; 11(7-8): 517-534.
 15. Shiigi Y, Takahashi M, Kaneto H. Facilitation of memory retrieval by pretest morphine mediated by mu but not delta and kappa opioid receptors. *Psychopharmacology(Berl)* 1990; 102(3): 329-332.
 16. Aguilar MA, Minarro J, Simon VM. Dose-dependent impairing effects of morphine on avoidance acquisition and performance in male mice. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 69(2): 92-105.
 17. Gaskari SA, Honar H, Lee SS. Therapy insight: Cirrhotic cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3(6): 329-337.
 18. Gholipour T, Riazi K, Noorian AR, Jannati A, Honar H, Doratotaj B, et al. Seizure susceptibility alteration following reversible cholestasis in mice: Modulation by opioids and nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2008; 580(3): 322-328.
 19. Nasehi M, Sabouri Khanghah V, Mirzaei Varzeghani S, Zarrindast MR. Involvement of nitric oxide system on anxiolytic-like behaviors induced by cholestasiss. *Basic Clin Neurosci* 2012; 3(5): 19-29.
 20. Ahmadi S, Karami Z, Mohammadian A, Khosrobakhsh F, Rostamzadeh J. Cholestasis induced antinociception and decreased gene expression of MOR1 in rat brain. *Neuroscience* 2015; 284: 78-86.
 21. Bergasa NV, Rothman RB, Vergalla J, Xu H, Swain MG, Jones EA. Central mu-opioid

- receptors are down-regulated in a rat model of cholestasis. *J Hepatol* 1992; 15(1-2): 220-224.
22. Aghaei I, Hajali V, Dehpour A, Haghani M, Sheibani V, Shabani M. Alterations in the intrinsic electrophysiological properties of Purkinje neurons in a rat model of hepatic encephalopathy: Relative preventing effect of PPARgamma agonist. *Brain Res Bull* 2016; 121: 16-25.
 23. Tahamtan M, Aghaei I, Pooladvand V, Sheibani V, Khaksari M, Shabani M. Characterization of the CA1 pyramidal neurons in rat model of hepatic cirrhosis: insights into their electrophysiological properties. *Metab Brain Dis* 2017; 32(3): 881-889.
 24. Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol* 2009; 156(1): 7-27.
 25. Demehri S, Samini M, Namiranian K, Rastegar H, Mehr SE, Homayoun H, et al. Alpha 2-adrenoceptor and NO mediate the opioid subsensitivity in isolated tissues of cholestatic animals. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003; 23(4): 201-207.
 26. Bergasa NV, Sabol SL, Young WS, 3rd, Kleiner DE, Jones EA. Cholestasis is associated with preproenkephalin mRNA expression in the adult rat liver. *Am J Physiol* 1995; 268(2 Pt 1): G346- G354.
 27. Bergasa NV, Vergalla J, Swain MG, Jones EA. Hepatic concentrations of proenkephalin-derived opioids are increased in a rat model of cholestasis. *Liver* 1996; 16(5): 298-302.
 28. Monfort P, Erceg S, Piedrafita B, Llansola M, Felipe V. Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur J Neurosci* 2007; 25(7): 2103-2111.
 29. Jones EA, Bergasa NV. Evolving concepts of the pathogenesis and treatment of the pruritus of cholestasis. *Can J Gastroenterol. Can J Gastroenterol* 2000; 14(1): 33-40.
 30. Eslimi D, Oryan S, Nasehi M, Zarrindast MR. Effects of opioidergic systems upon anxiolytic-like behaviors induced in cholestatic rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 670(1): 180-185.
 31. Nazari-Serenjeh F, Darbandi N, Majidpour S, Moradi P. Ghrelin modulates morphine-nicotine interaction in avoidance memory: Involvement of CA1 nicotinic receptors. *Brain Res* 2019; 1720: 146315.
 32. Aghaei I, Saeedi Saravi SS, Ghotbi Ravandi S, Nozari M, Roudbari A, Dalili A, et al. Evaluation of prepulse inhibition and memory impairments at early stage of cirrhosis may be considered as a diagnostic index for minimal hepatic encephalopathy. *Physiol Behav* 2017; 173: 87-94.
 33. Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, et al. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic Rat. *Hepatology* 1999; 30(5): 1198-1205.
 34. Ragozzino ME, Gold PE. Task-dependent effects of intra-amygdala morphine injections: attenuation by intra-amygdala glucose injections. *J Neurosci* 1994; 14(12): 7478-7485.
 35. Zarrindast MR, Bananej M, Khalilzadeh A, Fazli-Tabaei S, Haeri-Rohani A, Rezayof A. Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiol learn mem* 2006; 86(3): 286-292.
 36. McNamara RK, Skelton RW. Pretraining morphine impairs acquisition and performance in the Morris water maze: Motivation reduction rather than anmesia. *Psychobiology* 1991; 19(4): 313-122.

37. McNamara RK, Skelton RW. Pharmacological dissociation between the spatial learning deficits produced by morphine and diazepam. *Psychopharmacology* 1992; 108(1-2): 147-152.
38. Shiigi Y, Takahashi M, Kaneto H. Facilitation of memory retrieval by pretest morphine mediated by μ but not δ and κ opioid receptors. *Psychopharmacology* 1990; 102(3): 329-332.