اثرات مرفین بر یادگیری و حافظهٔ فضایی موش‌های سالم و آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین

محمد صوفی‌آبادی[۱]، محمدحسین اسماعیلی*[۱]، امیررضا مافی[۲]

۱. دکترای تخصصی فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲. دانشجوی پزشکی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۶

چکیده

زمینه و هدف رسوب آمیلوئیدهای بتا در مغز یکی از ویژگی‌های پاتولوژیک بیماری آلزایمر است. دوزهای پایین مرفین می‌تواند حافظه را افزایش دهد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثربخشی درمان مرفین بر حافظهٔ موش‌های سالم و آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین بود.

مواد و روش‌ها در آزمایش اول حیوانات به گروه شاهد و مرفین تقسیم شدند که سالین و مرفین(۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) به‌مدت ۱۰ روز به آن‌ها تزریق شد. در آزمایش دوم حیوانات به گروه شاهد، شم، گروه‌های تحت درمان با استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین به همراه سالین یا مرفین(۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. برای ایجاد الزایمر استرپتوزوتوسین(۳میلی‌گرم برکیلوگرم ، ۱۰میکرولیتر در محل تزریق) به داخل بطن‌های طرفی مغز تزریق شد. مرفین یا سالین برای مدت ۱۰ روز تزریق شد. همهٔ موش‌ها در ماز آبی آموزش داده شدند.

یافته‌ها نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تزریق مزمن مرفین(۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث اختلال در یادگیری فضایی می‌شود؛ اما حافظهٔ فضایی را در موش‌های نرمال بهبود می‌بخشد، نیز تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین باعث افزایش معنادار تأخیر زمانی و فاصلهٔ شناکردن برای یافتن سکو در مقایسه با گروه شاهد می‌شود($P<۰/۰۵$). از اثرهای فراموشی‌آور استرپتوزوتوسین با تزریق دوز کم مرفین پیشگیری شد؛ چنان‌که تأخیر زمانی و مسافت طی‌شده برای یافتن سکو در گروه استرپتوزوسین + مرفین (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌طرز معناداری کمتر از گروه استرپتوزوتوسین بود($P<۰/۰۵$). برعکس، درصد زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده در ربع هدف در تست پروب در گروه استرپتوزوتوسین + مرفین به‌طرز معناداری بیشتر از گروه استرپتوزوتوسین بود.

نتیجه‌گیری دوزهای بالایی مرفین یادگیری را در موش‌های نرمال مختل می‌کند؛ درحالی‌که دوزهای پایین مرفین یادگیری و حافظه را در موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین بهبود می‌بخشد. نتایج نشان می‌دهد که درمان با دوز کم مرفین برای درمان اختلال‌های شناختی در بیماران آلزایمری مفید است.

کلیدواژه‌ها:
آلزایمر، مرفین، یادگیری، حافظهٔ فضایی.

۱. مقدمه

بیماری آلزایمر نوعی بیماری نورودژنراتیو پیش‌رونده، برگشت‌ناپذیر و تدریجی است که موجب اختلال حافظه، کاهش عملکردهای شناختی و توانایی‌های فکری و تغییرهای رفتاری می‌شود[۱، ۲]. این بیماری با تجمع داخل و خارج سلولی پلاک‌های بتاآمیلوئیدی و پروتئین Tau هیپرفسفریله و از بین رفتن سیناپس‌ها و نورون‌ها شناخته می‌شود[۳-۵].

استرپتوزوتوسین (STZ) در تزریق درون‌مغزی در دوز زیر دیابتی با ایجاد آسیب‌های استرس اکسیداتیو موجب بروز اختلال‌های شناختی مشابه بیماری آلزایمر در حیوانات می‌شود[۶، ۷].

* نویسندهٔ مسئول: محمدحسین اسماعیلی
نشانی: دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۱۸۱۸۹۰۶
رایانه: mesmaili@qums.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0003-2152-966X
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0001-9459-3369

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۷، شمارهٔ ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۹، ص ۱۵۳-۱۴۱
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

اگرچه بسیاری از بررسی‌ها نشان داده‌اند که تماس طولانی‌مدت با مرفین منجر به مشکلات شناختی و اختلال در حافظه و یادگیری می‌شود[۸-۱۱]؛ اما پژوهش‌هایی وجود دارند که نشان می‌دهند دوزهای پایین مرفین باعث افزایش حافظهٔ طولانی‌مدت بازشناختی می‌شود[۱۲]. همچنین محققان در بررسی‌های مختلف به شواهدی دست یافته‌اند که نشان می‌دهد مرفین ممکن است اثرات محافظت نورونی نیز داشته باشد. دراین‌باره پژوهشگران نشان داده‌اند که استفاده از مرفین باعث کاهش حجم منطقهٔ آسیب انفارکتوس مغز می‌شود[۱۳]، نیز تکثیر نورونی را در مغز جنین ماهی افزایش می‌دهد[۱۴] و نورون‌ها را در برابر اثرهای نوروتوکسیک متیل فنیل پیریدینیم محافظت می‌کند[۱۵]. محققان نشان داده‌اند که پیش شرطی‌سازی با مرفین مرگ سلولی در اثر ایسکمی و محرومیت از گلوکز هیپوکامپ را کاهش می‌دهد[۱۶، ۱۷].

پژوهشگران نشان داده‌اند که مرفین مرگ سلولی القاشده با ویروس HIV را نیز کاهش می‌دهد و می‌تواند از نورون‌ها در مقابل مسمومیت داخل سلولی آمیلوئید بتا محافظت کند[۱۸، ۱۹]. نیز مرفین می‌تواند تغییرهای الکتروفیزیولوژیک ایجادشده از سوی آمیلوئید بتای داخل سلولی را معکوس کند. افزون‌براین مرفین می‌تواند عملکرد حافظهٔ فضایی در موش‌های ترنس‌ژنیک و موش‌های آلوده به آمیلوئید بتای داخل سلولی را بهبود بخشد[۱۹].

با توجه به اثرهای سودمند مرفین در راستای محافظت عصبی، هدف از این پژوهش تجربی بررسی اثرهای مرفین بر حافظه و یادگیری موش‌های سالم و آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین است.

۲. مواد و روش‌ها

این بررسی تجربی در سال ۱۳۹۶در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. تعداد ۷۰ رأس موش نر نژاد ویستار(تهیه‌شده از مؤسسهٔ رازی) که وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم داشتند در ۵ گروه(۱۰ موش در هر گروه) آزمایش شدند. موش‌ها در ۱۱ قفس جداگانه در وضعیت استاندارد از نظر دما(۲±۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد) و نور نگه‌داری شدند. در طول مدت آزمایش موش‌ها آب‌وغذای طبیعی خود را آزادانه دریافت می‌کردند. این تحقیق در دو مرحله اجرا شد:

۱) بررسی اثر تزریق داخل صفاقی مرفین بر یادگیری و حافظهٔ فضایی موش‌های سالم طبیعی؛

در این مرحله ۲۰ رأس موش در دو گروه به‌مدت ۱۰ روز و روزی یک‌بار سالین و مرفین(۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌صورت درون‌صفاقی دریافت کردند و در پایان ۱۰روز یادگیری و حافظهٔ فضایی آن‌ها به کمک ماز آبی ارزیابی شد.

۲) بررسی اثر تزریق داخل صفاقی مرفین بر یادگیری و حافظهٔ فضایی موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوسین؛

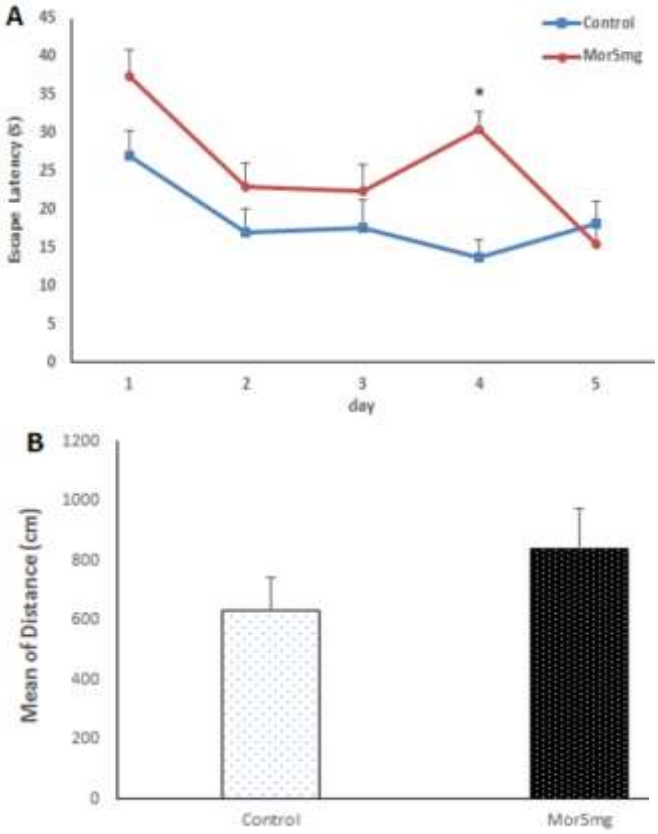
در این مرحله تعداد ۵۰ موش به ۵ گروه: کنترل و شم و گروه‌های درمان‌شده با استرپتوزوسین و استرپتوزوسین به همراه سالین یا مرفین تقسیم شدند. مراحل: ۱) جراحی استرئوتاکسی و تزریق دو طرفهٔ استرپتوزوتوسین به درون بطن‌های طرفی به‌منظور ایجاد مدل آلزایمر؛ ۲) تزریق درون صفاقی مرفین به موش‌های آلزایمری‌شده با استرپتوزوسین به‌مدت ۱۰ روز(از روز هفتم پس از تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین تا روز شروع آزمون به‌صورت روزانه)؛ ۳) آزمون رفتاری ماز آبی به‌مدت ۵ روز و آزمون تست پروب(probe test) به‌منظور ارزیابی حافظهٔ موش‌ها در روز ششم آزمون. برای القای آلزایمر۱۰ میکرولیتر از محلول استرپتوزوتوسین با غلظت ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌وسیلهٔ جراحی استرئوتاکسیک به درون هر کدام از بطن‌های جانبی مغز با مختصات برحسب برگما: AP = -0.5, ML = ±1.2, DV = -3.2 تزریق شد. در این جراحی ابتدا حیوانات با استفاده از کتامین/زایلازین(6/60 mg/kg) بیهوش و سپس در دستگاه استرئوتاکس قرار داده شدند و پس از ثابت‌کردن حیوان در این دستگاه در پشت‌سر حیوان در خط وسط یک برش ایجاد شد. پس از تمیزکردن سطح جمجمه و یافتن نقطهٔ برگما در قالب مرجع، با استفاده از اطلس پاکسینوز به روش استرئوتاکسیک محل مورد نظر تزریق در دو طرف سر نشانه‌گذاری شد. پس از علامت‌گذاری نقاط هدف بر سطح جمجمه، دو سوراخ به کمک دریل دندان‌پزشکی ایجاد شد و سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون محلول استرپتوزوسین(۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۰ میکرولیتر در هر طرف) به صورت دو طرفه به درون بطن‌های جانبی به‌آرامی تزریق شد. گروه‌های مورد آزمایش به شرح زیر بودند: ۱)گروه کنترل، ۲)گروه شم(نرمال سالین در نقش vehicle یا حلال STZ به داخل بطن‌های جانبی مغز تزریق شد)، ۳)گروه آلزایمری‌شده با STZ که خود به سه زیرگروه به شرح زیر تقسیم شدند:۱) گروه STZ، ۲)گروه سالین + STZ که به‌مدت ۱۰ روز و روزی یک مرتبه نرمال سالین(۰/۲ میلی‌لیتر) به‌صورت درون‌صفاقی دریافت می‌کردند، ۳)گروه‌های مرفین+ STZ که به‌مدت۱۰ روز و روزی یک مرتبه مرفین(۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌صورت درون‌صفاقی مشابه گروه

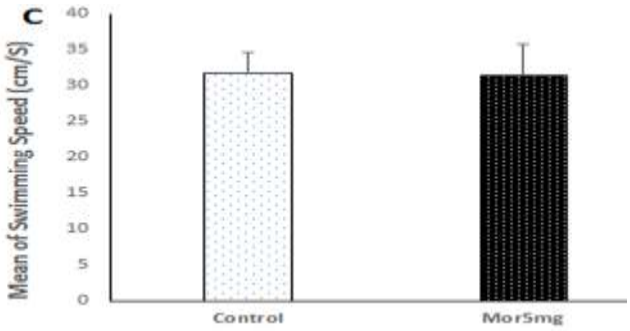
سالین دریافت می‌کردند(۲۰،۲۱).

برای ارزیابی یادگیری و حافظهٔ فضایی حیوان از ماز آبی موریس(Morris water maze) استفاده شد که یک تانک آب با قطر ۱۸۰ و عمق ۶۰ سانت متر است و تا نیمه از آب پر می‌شود و یک سکوی نجات با قطر۱۰ سانتی‌متر در یکی از چهار ربع آن ۱ سانتی‌متر زیر سطح آب قرار گرفته است. این مجموعه از طریق دوربین ردیابی و اطلاعات مربوط به آزمایش در کامپیوتر ذخیره و آنالیز می‌شود. بیشینه زمانی-که حیوان برای یافتن سکو در اختیار دارد ۶۰ ثانیه است. درصورتی‌که حیوان در طول این مدت سکو را پیدا نکرد با دست به‌سوی سکو هدایت می‌شود و به‌مدت ۱۰ ثانیه روی آن قرار می‌گیرد تا موقعیت سکو را در مقایسه با علائم نصب-شده در آزمایشگاه به‌خاطر بسپارد. درصورتی‌که حیوان سکو را پیدا کند هم‌زمان با قرارگیری حیوان روی سکو عمل ضبط دوربین متوقف می‌شود. این آزمایش به‌مدت ۶ روز و هر روز ۴ بار با فاصلهٔ۱۰ دقیقه‌ای تکرار می‌شود. در این مراحل روند یادگیری حیوان بر اساس مدت زمان سپری-شده و مسافت طی‌شده و سرعت حرکت حیوان جهت یافتن سکو سنجیده می‌شود. در پایان روز ششم پس از اتمام آزمایش‌ها یک مرحله پروب انجام می‌شود؛ بدین‌صورت که پس از برداشتن سکو(probe) حیوان از یکی از جهات درون ماز رها می‌شود. این آزمایش بر این اساس است که با فرض اینکه حیوان محل سکو را به‌خاطر سپرده باید بیشترین زمان و مسافت را در ربع محل قرارگیری سکو بماند. این مرحله برای هر حیوان یک‌بار تکرار می‌شود که مدت آن۶۰ ثانیه است. مدت زمان و مسافت طی‌شده در ربع محل قرارگیری سکو معیار و میزان سنجش حافظه است. برای بررسی یادگیری مدت زمان رسیدن به سکو و مسافت طی-شده و سرعت حرکت حیوان، جهت یافتن سکو در مدت ۶ روز یادگیری در بین گروه‌ها باهم مقایسه شد. برای بررسی حافظه مدت زمان حضور در ربع سکوی هدف و مسافت طی-شده در ربع سکوی هدف در روز هفتم در بین گروه‌ها باهم مقایسه شد. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های T مستقل، ANOVA یک‌طرفه(و آزمون تعقیبی LSD و توکی) استفاده شد.

۳. یافته‌های پژوهش

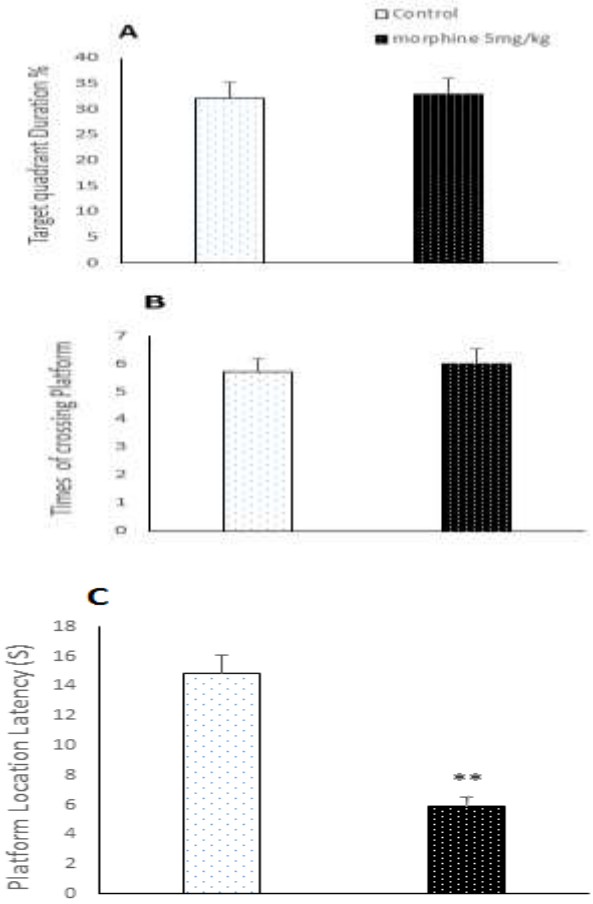
الف)اثر مرفین بر یادگیری فضایی موش‌های نرمال در پنج روز آموزش در ماز آبی موریس.





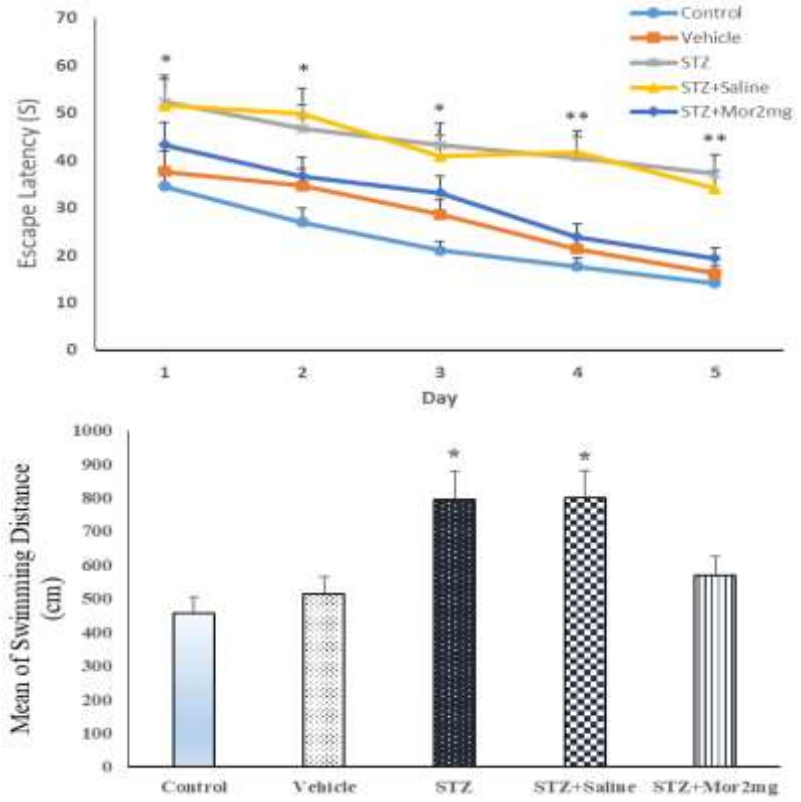
شکل ۱. تأثیر تزریق داخل صفاقی مرفین(۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به موش‌های نرمال بر میانگین زمان (A) و مسافت (B) و سرعت (C) طی‌شده تا رسیدن به سکو در طول ۵ روز آموزش در ماز آبی. مسافت و زمان طی شده تا رسیدن به سکو در گروه مرفین بیشتر از گروه شاهد(سالین) است که نشان می‌دهد یادگیری در گروه مرفین تا حدودی مختل شده است؛ ولی سرعت حرکت دو گروه اختلافی نشان نمی‌دهد. تعداد موش‌ها در هر گروه ۱۰ رأس بود.

ب)اثر مرفین بر حافظهٔ فضایی موش‌های نرمال در تست پروب ماز آبی موریس در روز ششم



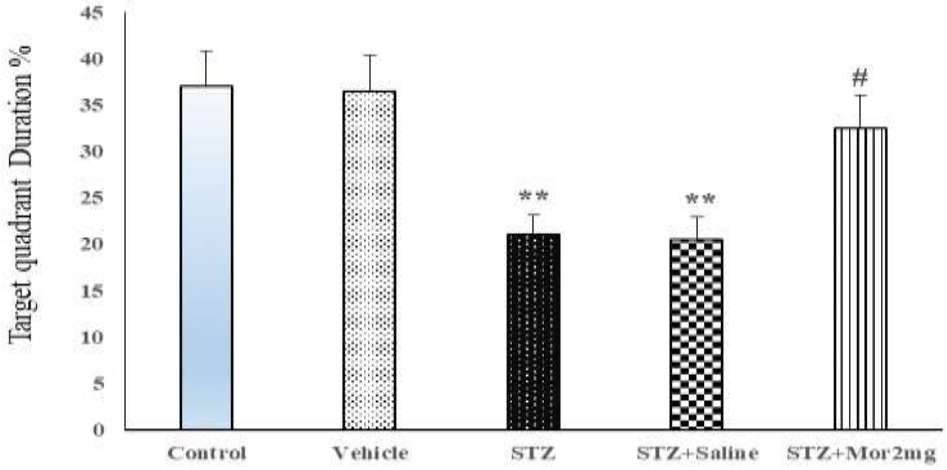
شکل ۲. تأثیر تزریق داخل صفاقی مرفین(۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به موش‌های نرمال بر درصد زمان حضور در ربع هدف (A) و تعداد دفعات عبور از روی محل سکو(B) و تأخیر زمانی در اولین عبور از روی محل سکو(C) در تست پروب در روز ششم در ماز آبی . درصد زمان حضور در ربع هدف و تعداد دفعات عبور از روی محل سکو در گروه مرفین بیشتر از گروه شاهد است و برعکس تأخیر زمانی در اولین عبور از روی محل سکو در گروه مرفین به‌طور معناداری کمتر از گروه شاهد است که نشان می‌دهد مرفین حافظهٔ فضایی موش‌های نرمال را تا حدودی بهتر کرده است. $p<0.01$نسبت به گروه شاهد.**

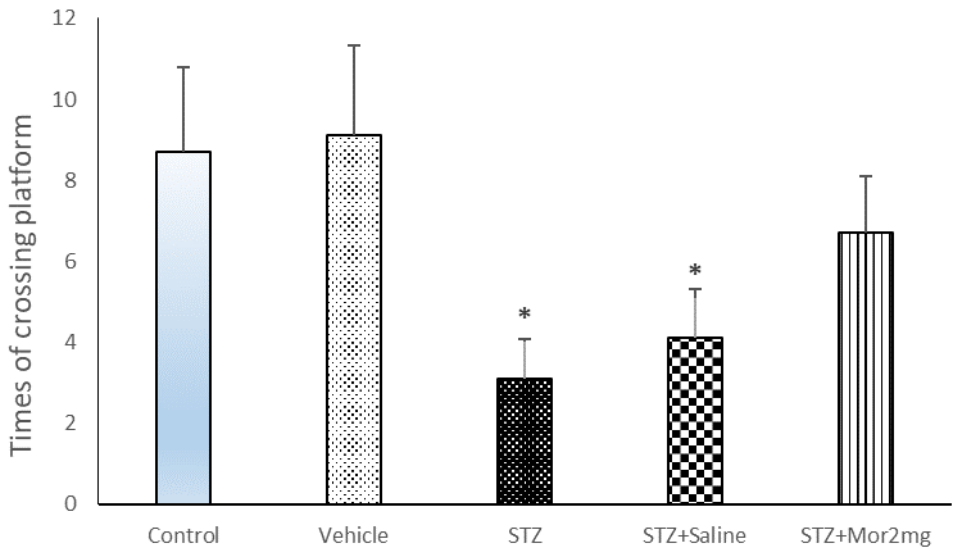
الف)اثر مرفین بر یادگیری فضایی موش‌های آلزایمری در پنج روز آموزش در ماز آبی موریس



شکل۳. تأثیر تزریق داخل صفاقی مرفین(۲میلی‌گرم بر کیلوگرم) به موش‌های آلزایمری‌شدهٔ مدل استرپتوزوتوسین بر میانگین مسافت و زمان طی‌شده تا رسیدن به سکو در طول ۵ روز آموزش در ماز آبی. مسافت و زمان طی‌شده تا رسیدن به سکو در گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین + سالین به‌طور معناداری بیشتر از گروه شاهد است که نشان می‌دهد یادگیری فضایی در گروه آلزایمری تا حدود زیادی مختل شده است. مسافت و زمان طی‌شده تا رسیدن به سکو در گروه استرپتوزوتوسین + مرفین (۲میلی‌گرم بر کیلوگرم) کمتر از گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین + سالین است که نشان می‌دهد مرفین می‌تواند تا حدودی اختلال در یادگیری ایجادشده در موش‌های آلزایمری را بهبود بخشد. $p<0.05$* و $p<0.01$ (گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین + سالین) نسبت به گروه کنترل.**

ب)اثر متفورمین بر حافظهٔ فضایی موش‌های دیابتی در تست پروب ماز آبی موریس در روز ششم





شکل۴. تأثیر تزریق داخل صفاقی مرفین(۲میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر درصد زمان حضور در ربع هدف و تعداد دفعات عبور از روی محل سکو در تست پروب در روز ششم در ماز آبی. درصد زمان حضور در ربع هدف و تعداد دفعات عبور از روی محل سکو در گروه استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین + سالین به‌طور معناداری کمتر از گروه شاهد است که نشان می‌دهد حافظه فضایی در گروه استرپتوزوتوسین تا حدود زیادی مختل شده است. این دو پارامتر در گروه استرپتوزوتوسین + مرفین(۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش یافته و بیشتر از گروه استرپتوزوتوسین + سالین است که نشان می‌دهد مرفین می‌تواند تا حدودی اختلال در حافظهٔ موش‌های آلزایمری را بهبود بخشد. $p<0.01$ و $p<0.05$* اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل و $p<0.05$# نسبت به گروه استرپتوزوتوسین.**

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج ما نشان داد که مرفین در دوز بالا یادگیری فضایی را مختل و حافظهٔ فضایی را بهتر می‌کند و تزریق مزمن آن در دوز پایین می‌تواند یادگیری و حافظه را در موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین بهبود بخشد. بنابراین برای برطرف کردن اختلال‌های شناختی ناشی از بیماری‌های نورودژنراتیوی مثل آلزایمر و پارکینسون و دیابت مفید است.

همان‌گونه که در قسمت نتایج دیده می‌شود موش‌های گروه مرفین زمان و مسافت بیشتری را در مقایسه با موش‌های گروه شاهد برای پیدا کردن سکو طی کرده‌اند که نشان می‌دهد یادگیری فضایی در گروه مرفین تا حدودی مختل شده است؛ هرچند اختلاف این دو پارامتر در بین این دو گروه معنادار نیست. درصد زمان حضور در ربع هدف و تعداد دفعات عبور از روی محل سکو در گروه مرفین بیشتر از گروه شاهد است و برعکس تأخیر زمانی در اولین عبور از روی محل سکو در گروه مرفین به‌طرز معناداری کمتر از گروه شاهد است($P <۰/۰۱$) که نشان می‌دهد موش‌های گروه مرفین موقعیت فضایی سکو را بیشتر به حافظه سپرده‌اند و مرفین حافظهٔ فضایی موش‌های نرمال را تا حدودی بهتر کرده است. نبود اختلاف معنادار این دو گروه در پارامترهای بالا می‌تواند به‌دلیل حجم کم نمونه یا دوز کم مرفین باشد(شاید با افزایش حجم نمونه یا افزایش دوز مرفین به ۱۰ میلی‌گرم، اختلاف این دو گروه معنادار شود). سرعت شناکردن در دو گروه اختلاف معناداری نشان نمی‌دهد و بیانگر این است که تزریق مرفین یا سالین اختلال حرکتی ایجاد نکرده است.

از سوی دیگر مسافت و زمان طی‌شده تا رسیدن به سکو در گروه استرپتوزوتوسین + سالین به‌طور معناداری بیشتر از گروه شاهد است که نشان می‌دهد یادگیری فضایی در گروه آلزایمری تا حدود زیادی مختل شده است. ولی چنین اختلاف معناداری بین گروه شاهد و گروه استرپتوزوتوسین+مرفین دیده نمی‌شود و این بدان معنی است که تزریق مرفین به موش‌های گروه استرپتوزوتوسین از اثرهای فراموشی‌آور استرپتوزوتوسین پیشگیری کرده است و باعث بهبود یادگیری فضایی آن‌ها شده است. به‌همین‌دلیل موش‌های گروه استرپتوزوتوسین + مرفین با طی مسافت و زمان کمتری نسبت به گروه استرپتوزوتوسین + سالین سکو را پیدا کرده‌اند.

نتایج تست پروب نشان می‌دهد که درصد زمان حضور در ربع هدف و تعداد دفعات عبور از روی محل سکو در گروه استرپتوزوتوسین + سالین به‌رزر معناداری کمتر از گروه شاهد است که نشان می‌دهد حافظهٔ فضایی در گروه آلزایمری تا حدود

زیادی مختل شده است. ولی چنین اختلاف معناداری بین گروه شاهد و گروه استرپتوزوتوسین + مرفین دیده نمی‌شود و این بدان معنی است که تزریق مرفین به موش‌های گروه استرپتوزوتوسین باعث بهبود حافظه فضایی آن‌ها شده است؛ چنان‌که موقعیت فضایی سکو را بهتر از گروه استرپتوزوتوسین + سالین به حافظه سپرده‌اند؛ بنابراین زمان بیشتری را در در ربع هدف صرف و تعداد دفعات بیشتری از روی محل سکو عبور کرده‌اند.

حافظه فرآیندی است که از سه مرحلهٔ کسب، تثبیت و بازیابی تشکیل شده است. گزارش شده که دست‌کاری‌های پیش از کسب نه‌تنها مرحلهٔ کسب بلکه مراحل اولیه تحکیم و تثبیت حافظه را نیز زیر تأثیر قرار می‌دهد و دست‌کاری پیش از بازیابی افزون‌بر مرحلهٔ بازیابی حافظه، مراحل دیرپایی تحکیم و تثبیت حافظه را نیز زیر تأثیر قرار می‌دهد(۲۲). اعتیاد به مواد مخدر نوعی یادگیری و حافظهٔ نابه‌جا محسوب می‌شود که به‌وسیلهٔ پلاستیی سیتی‌های ناسازگار(maladaptive plasticity) در بخش‌هایی از مغز ایجاد می‌شود که در یادگیری و حافظه دخیل هستند. برطبق تحقیق حاضر، تزریق مزمن دوز بالای مرفین(۵میلی‌گرم بر کیلوگرم) پیش از آموزش یادگیری فضایی را مختل می‌کند. از این نظر نتایج ما با نتایج محققانی که نشان دادند تزریق مرفین ۳۰ دقیقه پیش از آموزش یادگیری احترازی مهاری را سرکوب و مختل می‌کند، هم‌خوانی دارد(۱۲). این یافته همچنین هم‌خوانی دارد با نتایج محققانی که نشان داده‌اند تزریق پیش از آموزش مرفین مرحلهٔ کسب حافظه را در انواع مختلف تست‌های حافظه از قبیل ماز - Y و یادگیری احترازی فعال و غیرفعال مختل می‌کند(۲۷-۲۳). گزارش‌های زیادی نشان داده‌اند که تجویز حاد اپیوئیدها یادگیری و حافظه را مختل می‌کند و به‌طور خاص پژوهش‌های قبلی نشان داده است که تجویز دوزهای متوسط و بالای مرفین(۵ تا ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) از طریق افزایش تجمع خارج سلولی آدنوزین باعث اختلال در تقویت طولانی‌مدت هیپوکامپ(LTP) و حافظهٔ احترازی و حافظهٔ فضایی می‌شود(۳۱-۲۸).

از طرف دیگر نتایج مرحلهٔ دوم پژوهش حاضر نشان داد که تزریق داخل صفاقی مرفین در دوز کم(۲میلی‌گرم بر کیلوگرم) به موش‌های آلزایمری‌شده مدل استرپتوزوتوسین یادگیری و حافظهٔ فضایی آن‌ها را بهبود می‌بخشد.

تعدیل فرآیندهای یادگیری و حافظه به‌وسیلهٔ مرفین و دیگر عوامل اپیوئیدی، در پژوهش‌های متعددی بررسی شده است. بعضی بررسی‌ها نشان داده‌اند که مرفین می‌تواند اثرهای دو گانه‌ای در فرایند مذکور داشته باشد. چنان‌که اثرهای مرفین در حافظه، وابسته به مدت دورهٔ تجویز و دوز تجویز دارو و مدل بررسی حافظه در حیوانات است. در همین راستا گزارش شده تجویز مرفین پیش از آموزش حیوانات، یادگیری آن‌ها را در ماز آبی و ماز-Y و مدل‌های یادگیری احترازی فعال و غیرفعال مهار می‌کند (۳۲،۳۳). نتایج مطالعه‌ای معتمدی و همکارانش گویای آن است که تجویز مزمن مرفین با روش خوراکی در موش صحرایی باعث کاهش یادگیری فضایی می‌شود؛ اما هیچ‌گونه اثری بر حافظهٔ فضائی و فعالیت حرکتی ندارد(۳۴). برعکس، نتایج پژوهش پورمتعبد و همکارانش نشان داده که ایجاد وابستگی خوراکی به مرفین باعث تقویت حافظه و یادگیری فضائی در موش‌های صحرایی در ماز آبی می‌شود(۳۵). نتایج گزارش فوق با پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. همان‌گونه که از شواهد فوق برمی‌آید به نظر می‌رسد اثر اپیوئیدها بر فرایند یادگیری و حافظه وابسته به دوز و روش تجویز مرفین و مدل‌های بررسی حافظه و ایجاد یا عدم ایجاد وابستگی به مرفین باشد.

پرسش اساسی این است که مرفین در دوز بالا بر اساس چه مکانیسم‌هایی یادگیری را در موش‌های سالم مختل، ولی در دوز پایین یادگیری و حافظهٔ فضایی موش‌های آلزایمری را بهبود می‌بخشد؟

هیپوکمپ، یکی از نواحی مغز است که نقش کلیدی در یادگیری و حافظه دارد. گزارش شده است که تقویت طولانی مدت (LTP, Long term potentiation) هیپوکمپ، با تجویز طولانی‌مدت مرفین یا هروئین به‌شدت دستخوش تغییر می‌شود. همچنین مشخص شده است که استفادهٔ مزمن از اپیوئیدها باعث کاهش یادگیری و حافظهٔ فضایی حیوانات می‌شود که به موازات کاهش LTP هیپوکمپ اتفاق می‌افتد(۳۶).

در توجیه بیشتر این یافته‌ها، قابل ذکر است که در موش‌های سوری فقدان گیرنده‌های μ مرفین باعث تخریب یادگیری فضایی در ماز آبی و همچنین کاهش LTP در هیپوکمپ می‌شود(۳۷). بنابراین به نظر می‌رسد برای تثبیت حافظهٔ فضایی فعال‌شدن گیرنده‌های μ اپیوئیدی ضروری است. از سوی دیگر، شاید بتوان فعال‌شدن برخی مسیرهای نوروترانسمیتری را نیز در این مورد مؤثر دانست؛ زیرا مشخص شده که فعال‌شدن مسیرهای کولینرژیک مغزی در فرایندهای یادگیری، توجه و حافظه دخیل هستند. پژوهش‌های بسیاری تداخل عمل سیستم اپیوئیدی و کولینرژیک را در یادگیری و حافظه تأکید می‌کنند(۳۷).

برخی بررسی‌ها نشان می‌دهند که آگونیست‌های اپیوئیدی نظیر مرفین و بتا اندورفین، تمایل زیادی به گیرنده‌هایی دارند که سبب مهار فعالیت کولینرژیک هیپوکمپ می‌شود.

افزون‌براین گزارش شده که گیرنده‌های اپیوئیدی δ و μ در

محل پایانه‌های کولینرژیک قرار دارند و این پایانه‌ها به‌طور طبیعی تحت مهار تونیک سیستم اپیوئیدی قرار می‌گیرند.

در پژوهش حاضر نیز به نظر می‌رسد کاهش یادگیری فضایی موش‌های سالم به‌وسیلهٔ مرفین به‌دلیل مهار تونیک فعالیت کولینرژیک سپتوم میانی به هیپوکمپ باشد و افزایش حافظهٔ فضایی موش‌های گروه مرفین سالم به‌دلیل برداشته‌شدن یا کم‌شدن شدت مهار فعالیت کولینرژیک هیپوکمپ بر اثر کاهش تدریجی غلظت مرفین بدن موش باشد. در پژوهش حاضر نیز تزریق مرفین ۲۴ ساعت پیش از آموزش موش‌ها متوقف شد؛ بنابراین انتظار داشتیم در روزهای آموزش به‌تدریج غلظت مرفین خون کاهش یابد و در روز ششم که روز پروب است به کمترین غلظت خود در خون برسد.

در همین مورد گزارش شده است که تجویز نالوکسان اثرهای رفتاری ناشی از اسکوپولامین(آنتاگونیست کولینرژیک) را بر می‌گرداند. این امر می‌تواند ناشی از این واقعیت باشد که نالوکسان به‌احتمال نورون‌های کولینرژیک سپتوم میانی را از اثرهای مهاری اپیوئیدها آزاد می‌کند و از این طریق باعث افزایش آزادشدن استیل کولین درهیپوکمپ می‌شود. بنابراین احتمال دارد که آزادشدن تدریجی فعالیت کولینرژیک، بر اثر کاهش غلظت مرفین بدن یا بر اثر پدیدهٔ تحمل اپیوئیدی، باعث ایجاد اثرات فوق باشد. در این مورد تحقیق‌های پیشین نشان داده است که در هنگام ترک مرفین آزادشدن استیل کولین در هستهٔ آکومبنس و کورتکس پری فورنتال افزایش می‌یابد(۳۸). بنابراین شاید در پژوهش حاضر نیز حذف مرفین پیش از شروع آموزش در ماز آبی باعث کاهش تدریجی غلظت مرفین بدن و به‌دنبال آن باعث افزایش آزادشدن استیل کولین در هیپوکمپ شده و از این طریق عملا تثبیت حافظه در گروه مرفین افزایش یافته باشد.

از سوی دیگر، ممکن است اثر مرفین در فرایند یادگیری و حافظه از طریق سیستم‌های دیگری غیر از سیستم کولینرژیک نیز واسطه شود. برای‌مثال،گزارش شده که گلوکوکورتیکوئیدها و گیرنده‌های آن‌ها در فرایندهای یادگیری و حافظه مؤثر هستند(۳۹).

تجویز دوزهای افزایش‌یابندهٔ مرفین به‌مدت چهارروز، غلظت کورتیکوسترون پلاسما را افزایش می‌دهد؛ نیز قطع تجویز مورفین یا تجویز نالوکسان باعث افزایش ترشح کورتیکوسترون می‌شود(۴۰-۳۸).

در مورد فعالیت حرکتی حیوانات نیز گزارش شده که تجویز مرفین باعث هایپرترمی و سختی عضلات می‌شود که این دو اثر می‌تواند یادگیری فضایی را تخریب کند(۳۳)؛ اما به نظر می‌رسد اثرهای حاصله وابسته به دوز بوده و در دوز حاضر به حدی مؤثر نیست که باعث تخریب عملکرد مو ش‌ها شود.

از سوی دیگر، نتایج مرحلهٔ دوم تحقیق حاضر نشان داده است که دوز کم مرفین اختلال یادگیری و حافظه در موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوسین را بهبود می‌بخشد. در این مورد، مطالعه بر بعضی مدل‌های تجربی نشان داده است که مرفین می‌تواند نقش مفیدی در برابر آسیب سیستم عصبی بازی کند. برای‌مثال محققان نشان داده‌اند که دوزهای پایین مرفین، قابل مقایسه با غلظت اندورفین مغزی، در آزمون یادگیری اجتماعی، باعث افزایش بلندمدت حافظه برای تشخیص چهره‌ها می‌شود؛ درحالی‌که دوزهای بالای آن اثر معکوس دارد؛ به‌گونه‌ای که موش‌های بالغ نمی‌توانستند موش‌های نوجوان را تشخیص دهند(۴۱). در پژوهش دیگری مشخص شد که مرفین می‌تواند سلول‌ها را در برابر مسمومیت داخل سلولی آمیلوئید(iAβ) محافظت کند. همچنین مرفین عملکرد حافظهٔ فضایی را در موش‌های ترنس‌ژنیک و در موش‌های آلوده به آمیلوئید از طریق تحریک ترشح استرادیول در نورون‌های هیپوکامپ بهبود می‌بخشد(۱۹). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهند مرفین می‌تواند نقش محافظتی برای نورون‌های مغز داشته باشد. در این مورد محققان نشان داده‌اند که استفاده از مرفین بلافاصله پس از هیپوکسی در مدل هیپوکسی-ایسکمی موقت نوزاد، حجم انفارکتوس مغز را کاهش می‌دهد و نورون‌های حرکتی را در برابر آسیب ناشی از تزریق گلوتامات محافظت می‌کند(۱۳،۱۴). همچنین مرفین می‌تواند نورون‌های دوپامینرژیک را در مقابل لیپوپلی ساکارید یا ۱-متیل ۴-فنیل پیریدینیم محافظت کند(۱۵). استفاده از مرفین می‌تواند از مرگ سلولی به‌وسیلهٔ گلیکوپروتئین120IIIB آلوده به HIV پیشگیری کند(۱۸). نیز مرفین می‌تواند از اختلال شناختی پس از عمل جراحی در موش‌های صحرایی مسن جلوگیری کند(۴۲). در این مورد محققان نشان داده‌اند که پره کاندیشنینگ با مرفین می‌تواند مرگ سلولی ناشی از ایسکمی و محرومیت اکسیژن-گلوکز را کاهش می‌دهد(۱۶، ۱۷). پیش‌درمانی با مرفین از طریق پروتئین کینازC و گیرندهٔ NMDA موجب تحمل ایسکمی در نورون‌ها می‌شود (۴۳). پلاستی سیتی مرفولوژی دندریت‌ها و خارهای سیناپسی در سیناپس‌های تحریکی را تعیین می‌کند. در نواحی از مغز که در انگیزهٔ پاداش و یادگیری دخیل هستند مرفین و دیگر مواد مخدر توانایی تعدیل پلاستی سیتی مغز را دارا است(۴۳). در کل پژوهش حاضر نشان می‌دهد که دوز بالای مرفین در موش‌های نرمال یادگیری فضایی را مختل و حافظهٔ فضایی را بهبود می‌بخشد؛

درحالی‌که دوز پایین مرفین یادگیری و حافظهٔ فضایی موش‌های آلزایمری مدل استرپتوزوتوسین را بهبود می‌بخشد. بنابراین درمان مزمن با دوز کم مرفین برای درمان اختلال‌های شناختی در بیماران آلزایمری مفید است.

قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به‌دلیل تأمین بخشی از هزینهٔ پژوهش حاضر با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1397.053 صمیمانه سپاس‌گزاریم.

References

[1]. Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. A Study on Neuroinflammation and NMDA Receptor Function in Stz (Icv) Induced Memory Impaired Rats. J Neuroimmunol. 2013; 254(1-2): 1-9.
[2]. Rafii MS, Aisen PS. Recent Developments in Alzheimer's Disease Therapeutics. BMC Med. 2009; 7: 7.
[3]. Price DL, Sisodia SS. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. Annu Rev Neurosci. 1998;21:479-505.
[4]. Li M, Chen L, Lee DH, Yu LC, Zhang Y. The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. Prog Neurobiol. 2007 Oct;83(3):131-9. Epub 2007 Aug 19.
[5]. Williams RJ, Spencer JP. Flavonoids, Cognition, and Dementia: Actions, Mechanisms, and Potential Therapeutic Utility for Alzheimer Disease. Free Radic Biol Med. 2012; 52(1): 35-45.
[6]. Ling L. Streptozocin. free radical and radiation biology program. 2001; 22(777): 1-10.
[7]. Darbandi N, Hezavehi M, Ghadimi F, Noori M. The Effect Of Hydroalcoholic Extract Of Cornus Mas L. Seed On Memory Retention And Some Serum Parameters In Alzheimer Induced Male Mice. Journal of Cell & Tissue. 2015;6(3): 269-280.
[8]. Zhang Y, Chen Q, Yu LC. Morphine: a protective or destructive role in neurons? Neuroscientist. 2008 Dec;14(6):561-70.
[9]. Bao G, Kang L, Li H, Li Y, Pu L, Xia P, et al. Morphine and heroin differentially modulate in vivo hippocampal LTP in opiate-dependent rat. Neuropsychopharmacology. 2007 Aug;32(8):1738-49.
[10]. Salmanzadeh 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 Mar 7;965(1-2):108-13.
[11]. Spain JW, Newsom GC. Chronic opioids impair acquisition of both radial maze and Y-maze choice escape. Psychopharmacology (Berl). 1991;105(1):101-6.
[12]. Zarrindast MR, Ardjmand A, Rezayof A, Ahmadi S. The time profile of morphine effect on different phases of inhibitory avoidance memory in rat. Arch Iran Med. 2013 Jan;16(1):34-7.
[13]. Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ, et al. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. Biochemistry. 1998 Jul 28;37(30):10757-65.
[14]. Sanchez-Simon FM, Arenzana FJ, Rodriguez RE. In vivo effects of morphine on neuronal fate and opioid receptor expression in zebrafish embryos. Eur J Neurosci. 2010 Aug;32(4):550-9.
[15]. Qian L, Tan KS, Wei SJ, Wu HM, Xu Z, Wilson B, et al. Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through an opioid receptor-independent reduction of NADPH oxidase activity. J Immunol. 2007 Jul 15;179(2):1198-209.
[16]. Zhao P, Huang Y, Zuo Z. Opioid preconditioning induces opioid receptor-dependent delayed neuroprotection against ischemia in rats. J Neuropathol Exp Neurol. 2006 Oct;65(10):945-52.
[17]. Liu Y, Nie YM, Wu WK. [The effect of PKC activation and Smac release on inhibition of myocardial cell apoptosis by Sini Decoction]. Zhong Yao Cai. 2008 Nov;31(11):1675-8. [Article in Chinese]
[18]. Avdoshina V, Biggio F, Palchik G, Campbell LA, Mocchetti I. Morphine induces the release of CCL5 from astrocytes: potential neuroprotective mechanism against the HIV protein gp120. Glia. 2010 Oct;58(13):1630-9.
[19]. Cui J, Wang Y, Dong Q, Wu S, Xiao X, Hu J, et al. Morphine protects against intracellular amyloid toxicity by inducing estradiol release and upregulation of Hsp70. J Neurosci. 2011 Nov 9;31(45):16227-40.
[20]. Esmaeili MH, Esmaeili MM. Metformin Improves Learning And Memory In Streptozotocin-Induced Rat Model Of Sporadic Alzheimer's Disease. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. 2016;6:270-281.
[21]. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 3rd edn. San Diego: Academic Press. 1996.
[22]. 22. McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. Science.1966; 153: 1351 – 1358.
[23]. Zarrindast MR, Hoghooghi V, Rezayof A. Inhibition of morphine induced amnesia in morphine-sensitized mice: involvement of dorsal hippocampal GABAergic receptors. Neuropharmacology. 2008; 54:569 – 576.
[24]. Zarrindast MR, Askari E, Khalilzadeh A, Nouraei N. Morphine state dependent learning sensitization and interaction with nitric oxide. Pharmacology. 2006; 78: 66 – 71.
[25]. Homayoun H, Khavandgar S, Zarrindast MR. Morphine state-dependent learning: interactions with alpha2-adrenoceptors and acute stress. Behav Pharmacol. 2003; 14: 41 – 48.
[26]. Ma MX, Chen YM, He J, Zeng T, Wang JH. Effects of morphine and its withdrawal on Y-maze spatial recognition memory in mice. Neuroscience. 2007; 147: 1059 – 1065.
[27]. Castellano C. Effects of morphine and heroin on discrimination learning and consolidation in mice. Psychopharmacologia. 1975; 42: 235– 242.
[28]. Itoh J, Ukai M, Kameyama T. Dynorphin A-(1-13) potently improves the impairment of spontaneous alternation performance induced by the mu-selective opioid receptor agonist DAMGO in mice. J Pharmacol Exp Ther. 1994; 269: 15 – 21.
[29]. Ukai M, Lin HP. Endomorphins 1 and 2 induce amnesia via selective modulation of dopamine receptors in mice. Eur J Pharmacol. 2002; 446: 97 – 101.
[30]. Jafari MR, Zarrindast MR, Djahanguiri B. Influence of cholinergic system modulators on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. Physiol Behav. 2006; 88: 146 – 151.
[31]. Gang Lu, Qi-Xin Zhou, Shuo Kang, Chronic Morphine Treatment Impaired Hippocampal Long-Term Potentiation and Spatial Memory via Accumulation of Extracellular Adenosine Acting on Adenosine A1 Receptors .The Journal of Neuroscience, April 7, 2010 • 30(14):5058 –5070
[32]. Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopaminereceptors. Eur J Pharmacol 2004; 497: 197-204.
[33]. MC.Namara RK, Skelton RW. Pretraining morphine impairs acquisition and performance in the Morris water maze: motivation reduction rather than amnesia. Psychobiol; 1991. 19: 313- 320.
[34]. Motamedi F, Ghoshoni M, Ghiafeh Davoodi F, Naghdi N. Comparison of learning and memory in morphine dependent rats using different behavioral models. Iranian J Pharmaceutical Res 2003; 2: 225-230.
[35]. Pourmotabbed A, Tahmassian M, Fathollahi Y. The Effect of Morphine Dependency on Spatial Learning and

Memory in Male Rat. Physiology and Pharmacology, 9 (2), 127-137. Winter 2005[Article in Persian].
[36]. PU L, Bao GB, Xu N j, Ma L, Pei G. Hippocampal long –term potentation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. J Neurosci 2002; 22: 1914-1921.
[37]. Jang CG, Lee SY, Yan JJ, Song DK, Loh HH, Ho IK. Impaired water maze learning in μ-opioid receptor knockout mice. Mol Brain Res 2003; 117: 68-72.
[38]. Li Z, Wu C F, Pei G, Xu N J. Reversal of morphine induced memory impairment in mice by withdrawal in morris water maze: possible involvement of cholinergic system. Pharmacol Biochem Behav 2001; 68: 507-513.
[39]. Budziszewska B, Leskiewicz M, Jaworska-Feil L, Lason W. The effect of N-nitro-L-arginine methyl ester on morphine-induced changes in the plasma corticosterone and testosterone levels in mice. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1999;107:75±9.
[40]. Roozendaal B. Glucocorticoids and regulation of memory consolidation. Psychonoroendocrinol; 2000; 25:213-238.
[41]. Bianchi E, Menicacci C, Ghelardini C.Dual effect of morphine in long-term social memory in rat. Br J Pharmacol. 2013 Apr;168(8):1786-93
[42]. Kawano T , Takahashi T, Iwata H, Morikawa A. Effects of ketoprofen for prevention of postoperative cognitive dysfunction in agedrats, J. Anesth. 28 (2014) 932–936.
[43]. Fanjun M, Junfa L, Bingxi Z, Fang J. nPKCepsilon and NMDA receptors participate in neuroprotection induced by morphine pretreatment. J Neurosurg Anesthesiol. 2006 Apr;18(2):119-24

Effects of morphine on spatial learning and memory in Healthy Rats and Streptozotocin Rat Model of Alzheimer's disease

Mohammad Sofiabadi[1], Mohammad Hossein Esmaeili[1*], Amir-reza Mafea[2]

1. PhD. in Physiology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin , Iran
2. Student of Medicine, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Abstract

Introduction: The deposition of β-amyloid in the brain is a pathologic feature of Alzheimer's disease (AD). Low doses of morphine, can enhance memory. The aim of present study, was to investigate the therapeutic efficacy of morphine on memory in Healthy and Streptozotocin (STZ) Rat Model of AD.

Materials and Methods: In first experiment animals were divided to: Control and Morphine group which were injected with saline and Morphine (5mg/kg, ip) for 10 days. In the second experiment animals were divided to: control, sham operated and groups treated with STZ and STZ plus saline or morphine (2 mg/kg.). For induction of AD, STZ (3 mg/kg, 10 µl/injection site) were administered into lateral ventricles. Morphine or saline, were injected for 10days. All rates were trained in the Morris water maze.

Results: Our results show that chronic injection of Morphine (5mg/kg) impaired spatial learning but improves spatial memory in Healthy rats. our results also show that i.c.v. injection of STZ significantly increased escape latency and Swimming distance to find the hidden platform in comparison with the control group ($P<0.05$). The amnesic effect of STZ was prevented in rats treated with Low doses of Morphine, So The latency time and Swimming distance to find the platform in the STZ+ Morphine (2 mg/kg) group rats were significantly lower than STZ group ($P<0.05$). conversely, the percentage of time spent and distance swimming in the target quadrant in the probe test in the STZ+ Morphine group rats were significantly higher than those in the STZ group.

Conclusion: Higher doses of Morphine, impairs, learning in Healthy rats, whereas Low doses of Morphine, improved , learning and memory in the STZ rat model of AD. The results suggest that treatment with Low doses of Morphine is useful for treatment of cognitive impairment in AD.

Received: 2018/06/10
Accepted: 2018/12/27

Keywords: Streptozotocin; Morphine; Morris Water Maze; Alzheimer's disease.