Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

The Role of Mitochondrial Biogenesis and A2-Adrenergic Receptors of the Hippocampal CA1 Region in Morphine-Induced Memory Impairment

E. Beirami (PhD)[*1], S. M. Seyedhosseini Tamijani (PhD)[2]

1.Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R.Iran.
2.Department of Neuroscience, School of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.

•**Corresponding Author: E. Beirami (PhD)**
Address: Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R.Iran.
Tel: +98 (21) 86072709. **E-mail:** elmira.beirami@khu.ac.ir

Article Type
Research Paper

Received:
May 3rd 2024
Revised:
Jul 29th 2024
Accepted:
Sep 7th 2024

ABSTRACT

Background and Objective: Mitochondrial biogenesis and the adrenergic system play an important role in cognitive processes. The dorsal hippocampus (CA1) has a high distribution of α2-adrenergic receptors. Given that morphine can cause memory impairment, the aim of the present study was to investigate the role of mitochondrial biogenesis and α2-adrenergic receptors in the CA1 region in morphine-induced memory impairment.

Methods: This experimental study included four experimental groups: 1) morphine, 2) clonidine and clonidine + morphine, 3) yohimbine and yohimbine + morphine, 4) yohimbine + clonidine + morphine. The total number of animals in these experiments included 208 adult male Wistar rats, which were divided into 26 groups of 8. Intraperitoneal injection of morphine (4, 5, 6 mg/kg) was done to cause memory impairment. Different doses of α2-adrenergic receptor agonists and antagonists (clonidine and yohimbine, respectively) (1, 2, 4 µg/rat) were injected into the CA1 region of the hippocampus. A shuttle box apparatus was used to examine passive avoidance memory, and the ELISA technique was used to measure the expression levels of factors involved in mitochondrial biogenesis (PGC-1α, NRF-1 and TFAM) in the CA1 region. Then, the groups were examined and compared in terms of memory impairment.

Findings: Injection of the effective dose of morphine (6 mg/kg) impaired passive avoidance memory compared to the saline group (118.88±15.62 vs. 285.13±7.50) ($p<0.001$). Injection of clonidine (4 µg/rat) into the CA1 region increased memory compared to the saline group (291.25±6.86 vs. 230.25±5.64) ($p<0.05$), and its injection before the effective dose of morphine prevented memory impairment by morphine (250.62±13.72 vs. 96.12±14.57) ($p<0.001$). Yohimbine injection (4 µg/rat) resulted in a poor memory compared to saline group (161±19.69 vs. 241±15.20) ($p<0.05$) and its injection before low dose of morphine (4 mg/kg) caused inhibition of memory recall (113.12±13.9 vs. 241.5±21.59) ($p<0.001$). Low dose yohimbine injection (1 µg/rat) caused inhibition of clonidine-induced response while clonidine plus morphine caused inhibition of memory recall. The effective dose of morphine also decreased the expression levels of PGC-1α (118.25±19.85 vs. 185.1±8.8), NRF-1 (63.42±6 vs. 106.62±11.95) and TFAM (19.5±0.89 vs. 37.6±5.44) in the CA1 region compared to the saline group ($p<0.05$). Injection of the effective dose of clonidine before morphine increased the expression of these factors ($p<0.05$), while this increase was inhibited by injection of a low dose of yohimbine.

Conclusion: The results of the study showed that mitochondrial biogenesis and α2-adrenergic receptors in the hippocampal CA1 region may be involved in morphine-induced memory impairment.

Keywords: *Mitochondrial Biogenesis, A2-Adrenergic Receptors, Morphine, Memory Impairment.*

Cite this article: Beirami E, Seyedhosseini Tamijani SM. The Role of Mitochondrial Biogenesis and A2-Adrenergic Receptors of the Hippocampal CA1 Region in Morphine-Induced Memory Impairment. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2025; 27: e44.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

Copyright © 2024 Babol University of Medical Sciences. Published by Babol University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

نقش بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α_2–آدرنرژیک ناحیه CA1 هیپوکامپ در اختلال حافظه ناشی از مورفین

المیرا بیرامی (PhD)[1*]، سیده معصومه سیدحسینی تمیجانی (PhD)[2]

۱. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲. گروه علوم اعصاب، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۴۰۳/۲/۱۴
اصلاح:
۱۴۰۳/۵/۸
پذیرش:
۱۴۰۳/۶/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: بیوژنز میتوکندری و سیستم آدرنرژیک نقش مهمی در فرآیندهای شناختی دارند. هیپوکامپ پشتی (CA1) دارای توزیع فراوانی از گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک می‌باشد. با توجه به اینکه مورفین می‌تواند سبب بروز اختلال در حافظه شود، هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک ناحیه CA1 در اختلال حافظه ناشی از مورفین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از چهار گروه آزمایشی: ۱)مورفین، ۲)کلونیدین و کلونیدین+مورفین، ۳)یوهیمبین و یوهیمبین+مورفین، ۴) یوهیمبین+کلونیدین+مورفین استفاده شد. تعداد کل حیوانات در این آزمایشات شامل ۲۰۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار بود که در ۲۶ گروه ۸ تایی تقسیم بندی شده بودند. جهت ایجاد اختلال در حافظه، از تزریق داخل صفاقی مورفین (۴، ۵، ۶ mg/kg) استفاده شد. دوزهای مختلف آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک (به ترتیب کلونیدین و یوهیمبین) (۱، ۲، ۴ µg/rat) در ناحیه CA1 هیپوکامپ تزریق شدند. برای بررسی حافظه اجتنابی غیرفعال از دستگاه شاتل باکس و برای سنجش میزان بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری (PGC-1α، NRF-1 و TFAM) در ناحیه CA1، از تکنیک الایزا استفاده شد. سپس گروه‌ها از نظر اختلال حافظه، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: تزریق دوز موثر مورفین (۶ mg/kg) سبب اختلال در حافظه اجتنابی غیرفعال نسبت به گروه سالین شد (۱۱۸/۸۸±۱۵/۶۲ در مقابل ۲۸۵/۱۳±۷/۵۰) (p<۰/۰۰۱). تزریق کلونیدین (۴ µg/rat) در ناحیه CA1 سبب افزایش حافظه نسبت به گروه سالین (۲۹۱/۲۵±۶/۸۶ در مقابل ۲۳۰/۲۵±۵/۶۴) (p<۰/۰۵) و تزریق آن قبل از دوز موثر مورفین مانع از تخریب حافظه توسط مورفین شد (۲۵۰/۶۲±۱۳/۷۲ در مقابل ۹۶/۱۲±۱۴/۵۷) (p<۰/۰۰۱). تزریق یوهیمبین (۴ µg/rat) منجر به کاهش حافظه نسبت به گروه سالین (۱۶۱±۱۹/۶۹ در مقابل ۲۴۱/۳۸±۱۵/۲۰) (p<۰/۰۵) و تزریق آن قبل از دوز پایین مورفین (۴ mg/kg) سبب مهار به یادآوری حافظه شد (۱۱۳/۱۲±۱۳/۹ در مقابل ۲۴۱/۵±۲۱/۵۹) (p<۰/۰۰۱). تزریق دوز پایین یوهیمبین (۱ µg/rat) سبب مهار پاسخ ناشی از کلونیدین و نیزکلونیدین به همراه مورفین بر به یادآوری حافظه شد. دوز موثر مورفین همچنین سبب کاهش سطوح بیان PGC-1α (۱۱۸/۲۵±۱۹/۸۵ در مقابل ۱۸۵/۱±۸/۸)، NRF-1 (۶۳/۴۲±۱۱/۹۵ در مقابل ۱۰۶/۶۲±۱۱/۹۵) و TFAM (۱۹/۵±۰/۸۹ در مقابل ۳۷/۶±۵/۴۴) در ناحیه CA1، نسبت به گروه سالین شد (p<۰/۰۵). تزریق دوز موثر کلونیدین قبل از مورفین سبب افزایش بیان این فاکتورها شد (p<۰/۰۵)، در حالی که این افزایش با تزریق دوز پایین یوهیمبین مهار گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک ناحیه CA1 هیپوکامپ ممکن است در اختلال حافظه ناشی از مورفین دخالت داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: بیوژنز میتوکندری، گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک، مورفین، اختلال حافظه.

استناد: المیرا بیرامی، سیده معصومه سیدحسینی تمیجانی. نقش بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک ناحیه CA1 هیپوکامپ در اختلال حافظه ناشی از مورفین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۴؛ ۲۷: e۴۴.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

▣ این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی به شماره ۱۱۷۴۳/د دانشگاه خوارزمی می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر المیرا بیرامی
آدرس: تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری. تلفن: ۰۲۱-۸۶۰۷۲۷۰۹
رایانامه: elmira.beirami@khu.ac.ir

مقدمه

مطالعات نشان داده‌اند که مورفین مدارهای مغزی درگیر در حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱). اثرات مورفین بر حافظه توسط گیرنده‌های μ-اوپیوئیدی و برهمکنش آن‌ها با سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف مغز میانجیگری می‌شود (۲). یافته‌های حاصل از مطالعات نشان داده‌اند که اثرات مورفین بر روی فرآیندهای شناختی بـه میزان دارو، زمان تزریق، نحوه تزریق و نیز مدل بررسی حافظه بستگی دارد (۴و۳). با این حال، شواهد بسیاری نشان می‌دهند که تزریق مورفین، آگونیست گیرنده‌های μ-اپیوئیدی، سبب تخریب حافظه و ایجاد فراموشی در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود (۶و۵)، در حالی که تزریق آنتاگونیست این گیرنده‌ها همچون نالوکسان مانع از القاء فراموشی توسط مورفین می‌گردد (۷). مکانیسم دقیقی که از طریق آن مورفین سبب بروز اختلالات شناختی می‌شود، هنوز به طور کامل مشخص نشده است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که مورفین با اتصال به گیرنده‌های μ-اوپیوئیدی در نورون پیش‌سیناپسی و مسدود نمودن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، آزادسازی نوروترانسمیترهای تحریکی دخیل در فرآیندهای حافظه و یادگیری مانند گلوتامات، استیل کولین و نوراپی‌نفرین را که برای انتقال اطلاعات و شکل‌گیری حافظه ضروری می‌باشند، کاهش می‌دهد (۸). همچنین گزارش شده است که تخریب حافظه ناشی از مورفین می‌تواند به دلیل اثرات مهاری آن بر فعالیت سیستم آدرنرژیک باشد. به طوری که مطالعه‌ای نشان داده است که تزریق سیستمیک مورفین می‌تواند با مهار آزادسازی نوراپی‌نفرین در کورتکس پره‌فرونتال، سبب ایجاد اختلال در حافظه اجتنابی غیر فعال در موش‌های صحرایی شود (۹).

مسیرهای آدرنرژیک که بخش عمده‌ای از آن‌ها از لوکوس سرولئوس منشاء می‌گیرند، نقش مهمی در بسیاری از عملکردهای پیچیده مغزی از قبیل یادگیری و حافظه دارند (۱۰). نوراپی‌نفرین آزاد شده از این نورون‌ها اثرات خود را از طریق دو دسته گیرنده‌های جفت شده با G پروتئین‌ها بنام گیرنده‌های α و β-آدرنرژیک اعمال می‌نماید. این گیرنده‌ها دارای توزیع گسترده‌ای در سیستم عصبی مرکزی از جمله هیپوکامپ می‌باشند (۱۱). گیرنده‌های α به دو زیر گروه α_1 و α_2-آدرنرژیک تقسیم‌بندی می‌شوند. گیرنده‌های α_1-آدرنرژیک بیشتر به صورت پس‌سیناپسی بوده و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک می‌توانند هم به صورت پس‌سیناپسی و هم پیش‌سیناپسی در نورون‌های هیپوکامپ حضور داشته باشند (۱۲). گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک نقش بسیار مهمی در یادگیری و حافظه دارند. کلونیدین، به عنوان آگونیست اختصاصی این گیرنده‌ها دارای اثرات متنوعی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌باشد، که می‌توان به کنترل فشار خون، کنترل اضطراب و تنش عصبی و نیز تاثیر بر روی فرآیندهای شناختی اشاره نمود (۱۳). یوهیمبین نیز به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک، با مهار این گیرنده‌ها می‌تواند باعث کاهش آزادسازی نوراپی‌نفرین و فعالیت سمپاتیکی شود. همچنین با اثر تحریکی بر خلق و خوی ممکن است منجر به افزایش اضطراب گردد (۱۴).

حضور میتوکندری‌ها در سلول‌های عصبی دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد، زیرا یکی از مهم‌ترین و حیاتی‌ترین عوامل مرتبط با حافظه بلند مدت، عملکرد صحیح میتوکندری‌ها است (۱۵). به فرآیند افزایش تعداد میتوکندری‌ها بیوژنز میتوکندری گفته می‌شود که برای رخدادهایی همچون تولید انرژی، سیگنالینگ کلسیم و چرخه پیری ضروری می‌باشد (۱۶). PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) به عنوان تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکندری، فعال کننده فاکتورهای رونویسی همچون فاکتورهای تنفسی هسته‌ای (Nuclear Respiratory Factor=NRF) و فاکتور رونویسی میتوکندری A (Mitochondrial Transcription Factor A=TFAM) می‌باشد. نشان داده شده است که هرگونه نقص در بیوژنز میتوکندری می‌تواند منجر به بروز بیماری‌های نورودژنراتیو و نیز اختلال در حافظه و یادگیری شود (۱۷).

اگر چه نقش بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک در فرآیندهای شناختی به خوبی مشخص شده است و از طرفی مطالعات زیادی اختلال حافظه ناشی از مورفین را گزارش کرده‌اند، اما تاکنون نقش بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک ناحیه CA1 هیپوکامپ در اختلال حافظه ناشی از مورفین مورد بررسی قرار نگرفته است و نیز مطالعه‌ای در رابطه با گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک و بیوژنز میتوکندری گزارش نشده است. لذا، هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α2-آدرنرژیک ناحیه CA1 هیپوکامپ در اختلال حافظه ناشی از مورفین می‌باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه خوارزمی با کد IR.KHU.REC.1402.011، بر روی موش صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) انجام گرفت. حیوانات در حیوانخانه‌ای با دمای ۲۲±۲°C، رطوبت ٪۱۰±۵۰ و دوره تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و دسترسی کافی به آب و غذا را داشتند.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

داروها: کتامین هیدروکلراید و زایلازین (شرکت آلفاسان، هلند) به صورت داخل صفاقی و جهت بیهوش نمودن حیوانات استفاده شدند. سولفات مورفین (شرکت تماد، ایران) به صورت داخل صفاقی، کلونیدین (آگونیست اختصاصی گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک) و یوهیمبین (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک) (شرکت سیگما، انگلستان) در ناحیه CA1 هیپوکامپ تزریق شدند. مورفین، کلونیدین و یوهیمبین بلافاصله قبل از تزریق در نرمال سالین ۰/۹٪ حل شدند.

جراحی استریوتاکسی: حیوانات با تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین (۸۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) بیهوش شدند و سپس در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) قرار گرفتند. پس از تعیین نقاط برگما و لامبدا، مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ جهت تزریق کلونیدین و یوهیمبین، بر اساس اطلس پاکسینوس به قرار زیر مشخص شد: AP= -۳/۳۶ mm، ML= ±۱/۸ mm و DV= -۲/۵ mm (۱۸). کانول‌های راهنما (تهیه شده از سرسوزن شماره ۲۳ و به طول ۸ mm) به صورت دو طرفه در نقاط تعیین شده قرار گرفتند و با سیمان دندانپزشکی ثابت شدند. پس از یک هفته دوره بهبودی حیوانات برای تزریق داروها و آزمایش‌های رفتاری مورد استفاده قرار گرفتند. تزریق در ناحیه CA1 با استفاده از سرنگ هامیلتون ۵ µl انجام گرفت. یک کانول تزریق (تهیه شده از سر سوزن شماره ۲۷ و به طول ۹ mm) که توسط یک لوله پلی اتیلن به سرنگ هامیلتون مرتبط بود، در درون کانول راهنما قرار گرفت و در مدت ۶۰ ثانیه مقدار ۰/۵ µl محلول تزریقی در هر طرف تزریق شد (۱ µl در هر حیوان). برای انتشار کامل دارو در ناحیه CA1، کانول تزریق ۶۰ ثانیه پس از تزریق خارج شد. در پایان آزمایشات برای اطمینان از درستی مختصات محل جراحی و تزریق دارو، مقدار ۱ µl از رنگ متیلن بلو ۱٪ به صورت دو طرفه در ناحیه CA1 تزریق شد. سپس حیوان توسط کلروفرم کشته شد و مغز بعد از خارج شدن از جمجمه به مدت یک هفته در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت. محل‌های کانون گذاری شده (نواحی CA1) با تطبیق مقاطع تهیه شده از مغز با اطلس پاکسینوس تایید شدند. داده‌های حیواناتی که محل کانون گذاری آن‌ها خارج از ناحیه CA1 بود، از محاسبات آماری حذف شدند.

گروه‌های مورد مطالعه: در طراحی این مطالعه از چهار گروه آزمایشی استفاده شد. تعداد کل حیوانات در این آزمایشات شامل ۲۰۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار بود که به طور تصادفی در ۲۶ گروه ۸ تایی تقسیم بندی شده بودند:

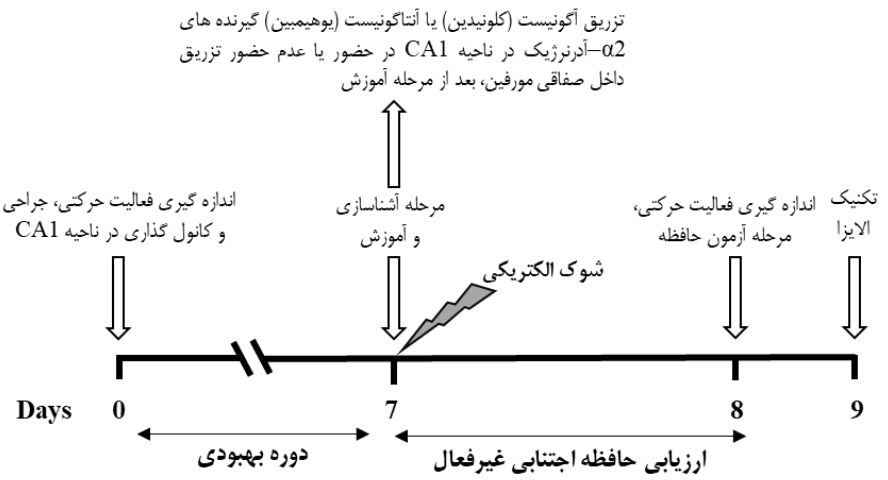
آزمایش اول (مورفین): در این آزمایش برای بررسی اثر تزریق پس از آموزش مورفین در بروز اختلال حافظه، از چهار گروه حیوان استفاده شد. یک گروه بلافاصله پس از آموزش، سالین و سه گروه دیگر دوزهای مختلف مورفین (۶، ۵، ۴ mg/kg) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و ۲۴ ساعت بعد، بدون هیچ تزریقی مورد آزمون حافظه قرار گرفتند.

آزمایش دوم (کلونیدین و کلونیدین+مورفین): در این آزمایش برای بررسی اثر تزریق پس از آموزش کلونیدین بر فراموشی ناشی از مورفین، از هشت گروه حیوان استفاده شد. چهار گروه بلافاصله پس از آموزش، کلونیدین (۱، ۲، ۴ µg/rat) را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد سالین را بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. چهار گروه دیگر پس از آموزش، کلونیدین (۱، ۲، ۴ µg/rat) را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد دوز موثر مورفین (۶ mg/kg) را بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. تمامی حیوانات ۲۴ ساعت بعد، بدون دریافت هیچ تزریقی مورد آزمون حافظه قرار گرفتند.

آزمایش سوم (یوهیمبین و یوهیمبین+مورفین): در این آزمایش برای بررسی اثر تزریق پس از آموزش یوهیمبین بر فراموشی ناشی از مورفین، از هشت گروه حیوان استفاده شد. چهار گروه بلافاصله پس از آموزش، یوهیمبین (۱، ۲، ۴ µg/rat) را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. چهار گروه دیگر پس از آموزش، یوهیمبین (۱، ۲، ۴ µg/rat) را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد دوز پایین مورفین (۴ mg/kg) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. تمامی حیوانات ۲۴ ساعت بعد، بدون دریافت هیچ تزریقی مورد آزمون حافظه قرار گرفتند.

آزمایش چهارم (یوهیمبین+کلونیدین+مورفین): در این آزمایش برای بررسی اثر تزریق پس از آموزش دوز پایین یوهیمبین (۱ µg/rat) همراه با دوز موثر کلونیدین (۴ µg/rat) و نیز تزریق دوز پایین یوهیمبین به همراه دوز موثر کلونیدین به اضافه دوز موثر مورفین (۶ mg/kg) از ۶ گروه حیوان استفاده شد. گروه اول پس از آموزش، سالین را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه دوم پس از آموزش، سالین را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد دوز موثر مورفین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه سوم پس از آموزش، دوز موثر کلونیدین را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه چهارم پس از آموزش، دوز موثر کلونیدین را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد دوز موثر مورفین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه پنجم پس از آموزش، ابتدا دوز پایین یوهیمبین را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد دوز موثر کلونیدین را در این ناحیه دریافت کردند و ۵ دقیقه بعد سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. گروه ششم پس از آموزش، ابتدا دوز پایین یوهیمبین را در ناحیه CA1 و ۵ دقیقه بعد دوز موثر کلونیدین را در این ناحیه دریافت کردند و ۵ دقیقه بعد نیز دوز موثر مورفین را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. ۲۴ ساعت بعد، حافظه همه گروه‌ها بدون هیچ تزریقی مورد آزمون قرار گرفت. پروتکل مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]



شکل ۱. پروتکل تزریق داروها و زمان‌بندی ارزیابی‌های رفتاری و مولکولی

ارزیابی فعالیت حرکتی: برای این منظور از دستگاه Open field استفاده شد. این دستگاه شامل یک جعبه از جنس پلاستیک فشرده شفاف با ابعاد cm ۴۰×۴۰×۴۰ است که به حس‌گرهای مادون قرمز در فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از لبه پایینی جعبه مجهز است. تمامی حیوانات قبل از جراحی و تزریق داروها (روز صفر) و نیز قبل از انجام تست حافظه (روز ۸) به مدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار گرفتند و سپس فعالیت‌های حرکتی افقی آن‌ها (تعداد عبورها از مقابل حس‌گرهای مادون قرمز) در این مدت توسط دستگاه ثبت شده و به عنوان شاخصی از فعالیت حرکتی استفاده شد (۱۹).

دستگاه یادگیری اجتنابی غیرفعال مدل Step-through (شاتل باکس): این دستگاه جعبه‌ای از جنس پلکسی گلاس بوده و دارای دو بخش تاریک و روشن هر کدام به ابعاد cm ۲۰×۲۰×۳۰ می‌باشد که توسط یک درب گیوتینی به ابعاد cm ۹×۷ با یکدیگر ارتباط دارند. در کف بخش تاریک میله‌های فولادی به قطر mm ۳ و با فواصل cm ۱ تعبیه شده است که توسط یک کابل ارتباطی به استیمولاتور متصل هستند. این دستگاه یک جریان الکتریکی را به میله‌های فولادی رها کرده و موجب وارد شدن شوک الکتریکی به دست و پای حیوان می‌گردد.

ارزیابی حافظه اجتنابی غیر فعال: الگوهای رفتاری متعددی برای ارزیابی یادگیری و حافظه در حیوانات آزمایشگاهی وجـود دارد. مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال به صورت گسترده در مطالعات فارماکولوژیکی، برای بررسی حافظه اجتنابی دراز مدت که در ایجاد آن هیپوکامپ نقش مهمی دارد، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مدل یادگیری حیوان یاد می‌گیرد که برای دوری از حوادث مضر (شوک الکتریکی به دست و پا)، تمایل ذاتی خود (ورود به بخش تاریک) را سرکوب نماید (۲۰). ارزیابی حافظه اجتنابی غیر فعال در ۳ مرحله و در ۲ روز متوالی انجام گرفت:

۱. مرحله آشنا سازی: در این مرحله هر حیوان در داخل بخش روشن و پشت به درب قرار گرفت،۱۰ ثانیه بعد درب برداشته شد تا حیوان وارد بخش تاریک شود، به محض ورود به این بخش درب بسته شد تا حیوان ۳۰ ثانیه آزادانه در آنجا حرکت کرده و با دستگاه آشنا شود.

۲. مرحله آموزش: این مرحله ۳۰ دقیقه بعد از مرحله ۱ انجام گرفت. ابتدا کف دست‌ها، پاها و دم حیوان به آرامی خیس شد (این عمل هیچ گونه استرسی را به حیوان وارد نمی‌کند و صرفاً برای این می‌باشد که هنگام وارد نمودن شوک الکتریکی، آسیبی به دست‌ها، پاها و دم حیوان وارد نشود) و سپس در بخش روشن و پشت به درب قرار گرفت، بعد از ۱۰ ثانیه درب برداشته شد و اجازه ورود به بخش تیره به حیوان داده شد. به محض ورود حیوان به بخش تیره، درب بسته و جریان الکتریکی با شدت ۱ میلی‌آمپر و فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۲ ثانیه از پاهای حیوان عبور داده شد. ۲۰ ثانیه پس از اعمال شوک درب برداشته شد تا حیوان وارد بخش روشن شود. اگر حیوان بعد از ورود به بخش روشن، ۱۲۰ ثانیه در آن بخش می‌ماند و وارد بخش تاریک نمی‌شد، نشان دهنده یادگیری در موش بود. در این حالت حیوان بعد از دریافت سالین یا دارو (تیمار پس از آموزش)، به قفس خود منتقل شد.

۳. مرحله آزمون یا به یادآوری حافظه: این مرحله ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش و بدون تزریق هیچ دارویی جهت سنجش حافظه اجتنابی غیرفعال انجام گرفت. به این ترتیب که هر موش به صورت جداگانه در بخش روشن دستگاه قرار داده شد و پس از ۱۰ ثانیه درب گیوتینی باز شد. مدت زمان تاخیر ورود حیوان به بخش تاریک (Step through latency) ثبت گردید. در این مرحله هیچ گونه شوک الکتریکی به حیوان اعمال نشد و حداکثر زمان برای توقف موش در بخش روشن ۳۰۰ ثانیه بود. در این تست افزایش زمان تاخیر در ورود به بخش تاریک نشان دهنده افزایش حافظه و کاهش تأخیر نشان دهنده تضعیف حافظه می‌باشد (۲۱).

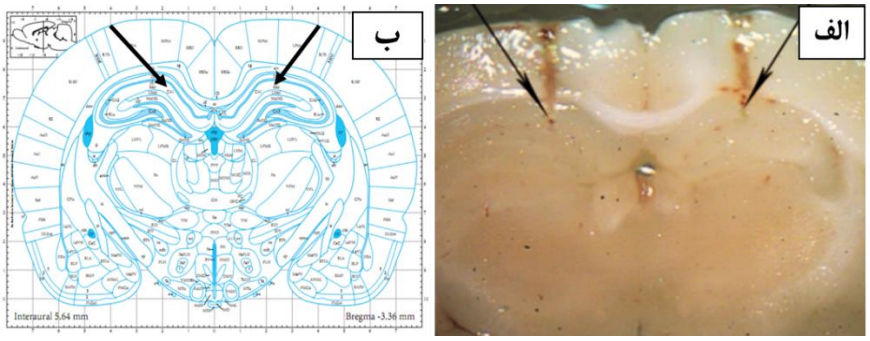
[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

تکنیک الایزا: ارزیابی میزان بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری (PGC-1α، NRF-1 و TFAM) در سطح پروتئین، با استفاده از تکنیک الایزا انجام گرفت که دارای حساسیت، دقت و اختصاصیت بالایی برای این منظور می‌باشد. در ابتدا حیوانات توسط CO2 به طور کاملاً عمیق بیهوش شدند و در کمترین زمان ممکن سر آن‌ها با گیوتین بریده شد. بعد از خارج کردن هیپوکامپ، نواحی CA1 آن به دقت جدا شدند و تا زمان انجام آزمایشات مربوط به الایزا در فریزر ۸۰°C– نگهداری شدند. برای لیز نمودن نمونه‌های بافتی، از بافر رقیق کننده موجود در کیت‌ها استفاده شد. به ازای ۱۰۰ mg از بافت، ۵۰۰ µl بافر اضافه و بافت هموژن شد. سپس محلول به دست آمده در۱۲۰۰۰ دور و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد و از مایع رویی به عنوان نمونه استفاده شد. با توجه به دستورالعمل سازنده هر کیت (PGC-1α: #MBS2706379، NRF-1: #ABIN6958273 و TFAM: #MBS1600609)، مقدار تعیین شده از محلول رقیق داخل کیت به همه چاهک‌های پلیت‌ها اضافه شد. سپس در هر چاهک مقدار تعیین شده از نمونه و استاندارد اضافه شد و مطابق با دستورالعمل کیت مربوطه در مدت زمان و دمای معینی انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها خالی شده و ۴ بار هر بار با مقدار معینی از محلول شستشو پلیت‌ها شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک با توجه به دستورالعمل کیت مربوطه مقدار معینی از محلول کونژوگه PGC-1α، NRF-1 و یا TFAM اضافه شد و در مدت زمان و دمای معینی انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها خالی شدند و ۴ بار هر بار با مقدار معینی از محلول شستشوی موجود در کیت شستشو داده شدند. در مرحله بعد به هر چاهک مقدار معینی از محلول سوبسترا اضافه شد و بر اساس دستورالعمل کیت مربوطه در مدت زمان و دمای معینی در محل تاریک انکوبه شدند و در مرحله آخر به هر چاهک مقدار معینی از محلول متوقف کننده آزمایش اضافه شد. با استفاده از دستگاه الایزا ریدر که بر روی طول موج ۴۵۰ nm تنظیم شده بود، جذب نوری نمونه‌ها و استانداردها خوانده شد و سپس داده‌ها وارد اکسل شدند و بر اساس شیب خط و عرض المبدا، غلظت فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری در هر چاهک محاسبه و به صورت pg/mg بیان شد (۲۲). انجام این تکنیک و آنالیز داده‌های حاصل از آن توسط محققی انجام گرفت که بی اطلاع از نوع تقسیم بندی گروه‌های مورد مطالعه بود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: از آزمون Kolmogorov-Smirnov جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. به منظور تعیین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمایش از آزمون واریانس یک طرفه یا دوطرفه (One- or two-way ANOVA) و برای مشخص نمودن گروه‌های دارای اختلاف معنی‌دار از آزمون تعقیبی توکی (Tukey post hoc test) استفاده شد. نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۸ (Graph Pad Software, SA) برای رسم نمودارها و نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (IBM, SPSS, Armonk, NY, USA) برای بررسی‌های آماری استفاده شد و نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

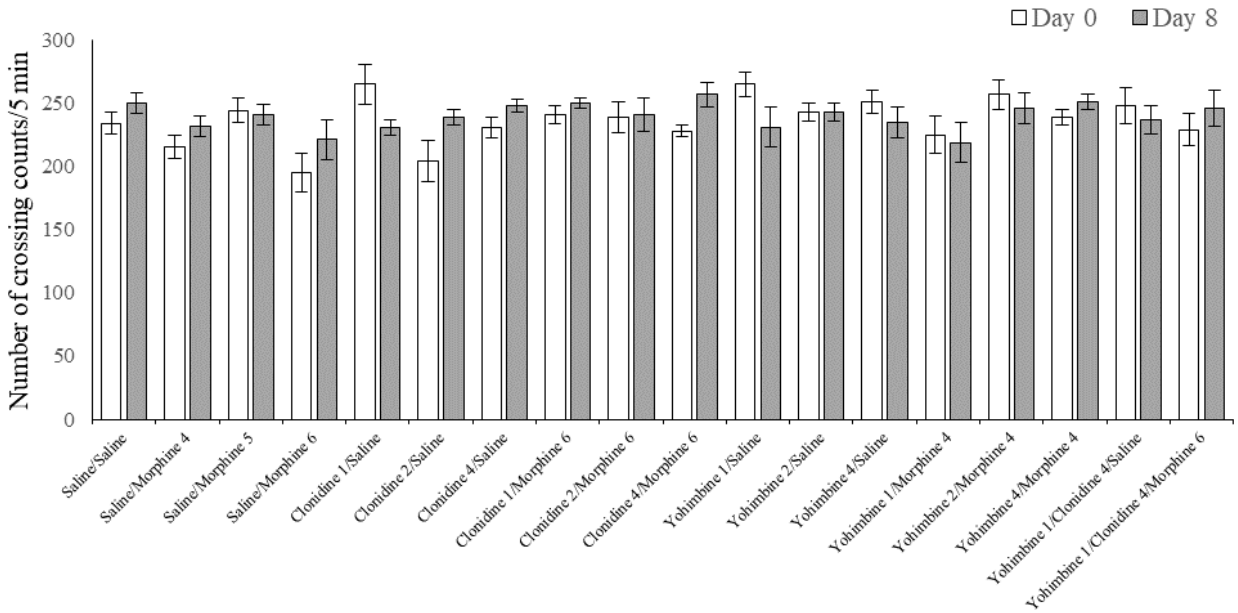
مقطع بافتی مربوط به ناحیه CA1 هیپوکامپ که نشان دهنده محل قرارگیری صحیح کانول‌ها در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس می‌باشد، در شکل ۲ ارائه شده است. لازم به ذکر است که تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که محل جراحی آن‌ها در مقایسه با اطلس پاکسینوس صحیح بود، در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۲. (الف) مقطع بافتی مربوط به محل جراحی و تزریق دارو در ناحیه CA1 و (ب) شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس که ناحیه CA1 در آن مشخص شده است.

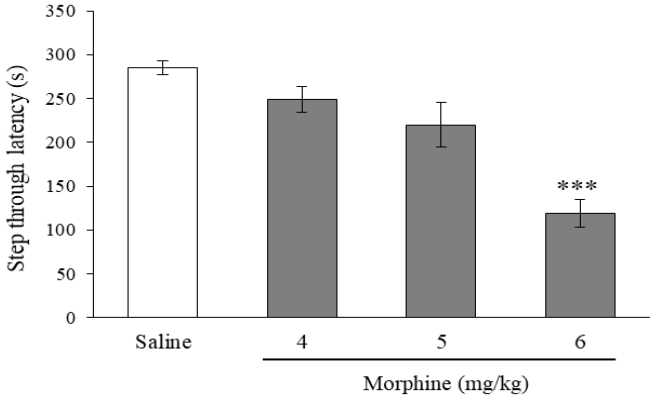
[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

در این مطالعه بررسی نتایج حاصل از تست Open field توسط آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی توکی، تفاوت معنی‌داری را در فعالیت حرکتی حیوانات در گروه‌های مختلف نسبت به گروه سالین/سالین در روز صفر (قبل از جراحی و تزریق داروها) و روز ۸ (قبل از انجام تست حافظه) نشان نداد (نمودار ۱). هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود.



نمودار ۱. اثر جراحی و تزریق داروها بر فعالیت حرکتی حیوانات

آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تزریق مورفین در دوز ۶ mg/kg سبب کاهش معنی‌دار در زمان تاخیر اولیه در ورود به بخش تاریک در مرحله به یادآوری حافظه نسبت به گروه سالین شد (۱۵/۶۲±۱۱۸/۸۸ در مقابل ۷/۵۰±۲۸۵/۱۳) (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۲). هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود.



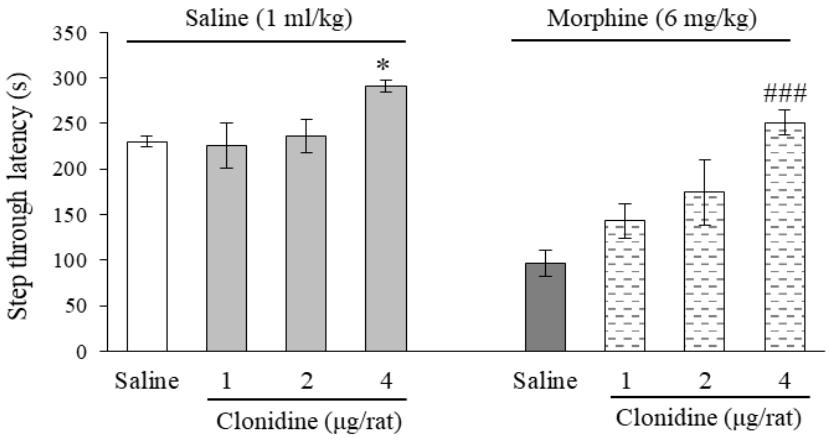
نمودار ۲. اثرات تزریق پس از آموزش مورفین بر حافظه اجتنابی غیر فعال. **حیوانات بلافاصله پس از آموزش، سالین یا مقادیر مختلف مورفین را دریافت کرده و ۲٤ ساعت بعد، بدون هیچ تزریقی مورد آزمون حافظه قرار گرفتند. اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید. هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود (p<۰/۰۰۱*** در مقایسه با گروه سالین).**

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

آنالیز واریانس دوطرفه، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌هایی که پس از آموزش، کلونیدین (۴، ۲، ۱ µg/rat) را همراه با سالین دریافت کرده بودند و گروه‌هایی که همان مقادیر کلونیدین را همراه با دوز موثر مورفین (۶ mg/kg) دریافت کرده بودند، نشان داد. آنالیز واریانس یک طرفه و نیز به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی نشان داد حیواناتی که بلافاصله پس از آموزش، دوز ۴ µg/rat کلونیدین را به همراه سالین دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه سالین/سالین، افزایش معنی‌داری را در به یادآوری حافظه در روز آزمون نشان دادند (۶/۸۶±۲۹۱/۲۵ در مقابل ۵/۶۴±۲۳۰/۲۵) (p<۰/۰۵) (سمت چپ نمودار ۳). به علاوه آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تزریق دوز ۴ µg/rat کلونیدین پس از آموزش و قبل از تزریق دوز موثر مورفین به طور معنی‌داری موجب افزایش تاخیر در ورود حیوان به بخش تاریک دستگاه در مقایسه با گروه سالین/مورفین شد (۱۳/۷۲±۲۵۰/۶۲ در مقابل ۱۴/۵۷±۹۶/۱۲) (p<۰/۰۰۱) (سمت راست نمودار ۳). هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود.

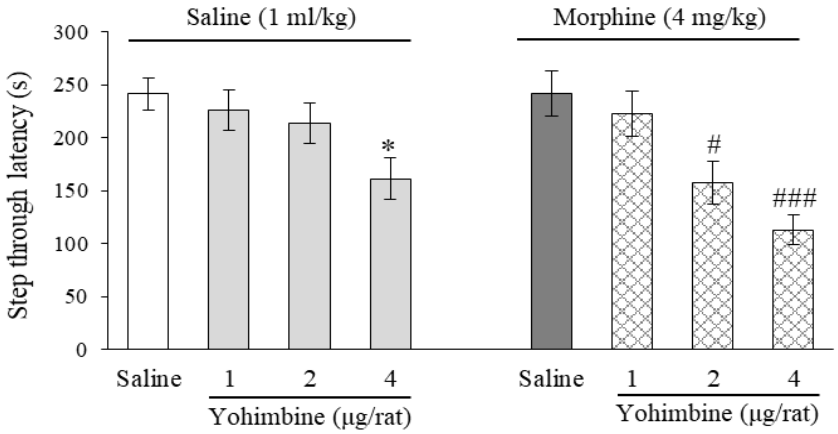
آنالیز واریانس دو طرفه، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌هایی که پس از آموزش، یوهیمبین (۴، ۲، ۱ µg/rat) را به همراه سالین دریافت کرده بودند و گروه‌هایی که همان مقادیر یوهیمبین را به همراه دوز پایین مورفین (۴ mg/kg) دریافت کرده بودند، نشان داد. آنالیز واریانس یک طرفه و نیز به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی نشان داد حیواناتی که بلافاصله پس از آموزش، دوز ۴ µg/rat یوهیمبین را به همراه سالین دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه سالین/سالین کاهش معنی‌داری را در به یادآوری حافظه در روز آزمون نشان دادند (۱۹/۶۹±۱۶۱ در مقابل ۱۵/۲۰±۲۴۱/۳۸) (p<۰/۰۵) (سمت چپ نمودار ۴). به علاوه آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تزریق دوزهای ۲ و ۴ µg/rat یوهیمبین پس از آموزش و قبل از تزریق دوز پایین مورفین به طور معنی‌داری زمان تاخیر ورود حیوان به بخش تاریک دستگاه را در مقایسه با گروه سالین/مورفین کاهش داد (به ترتیب ۲۰/۵۱±۱۵۷/۵ در مقابل ۲۱/۵۹±۲۴۱/۵ و ۱۳/۹۰±۱۱۳/۱۲ در مقابل ۲۱/۵۹±۲۴۱/۵) (p<۰/۰۵ و p<۰/۰۰۱) (سمت راست نمودار ۴). هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود.

نمودار ۵ اثر مهاری دوز پایین یوهیمبین (۱ µg/rat) را بر پاسخ ناشی از کلونیدین (۴ µg/rat) و نیز کلونیدین به همراه دوز موثر مورفین (۶ mg/kg) در به یادآوری حافظه نشان می‌دهد. آزمون تعقیبی توکی نشان داد که حیواناتی که دوز پایین یوهیمبین را ۵ دقیقه قبل از دوز موثر کلونیدین دریافت کرده بودند، نسبت به گروه دریافت کننده کلونیدین/سالین، کاهش معنی‌داری را در به یادآوری حافظه در روز آزمون نشان دادند (۱۶/۱۷±۱۹۹/۱۳ در مقابل ۶/۱۵±۲۹۴/۲۵) (p<۰/۰۱). همچنین تزریق دوز پایین یوهیمبین از اثر مهاری کلونیدین (۴ µg/rat) بر فراموشی ناشی از تزریق مورفین (۶ mg/kg) جلوگیری نموده و موجب فراموشی گردید (۱۸/۲۱±۱۴۹/۳۷ در مقابل ۱۷/۷۸±۲۵۴/۱۳) (p<۰/۰۰۱). هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود.

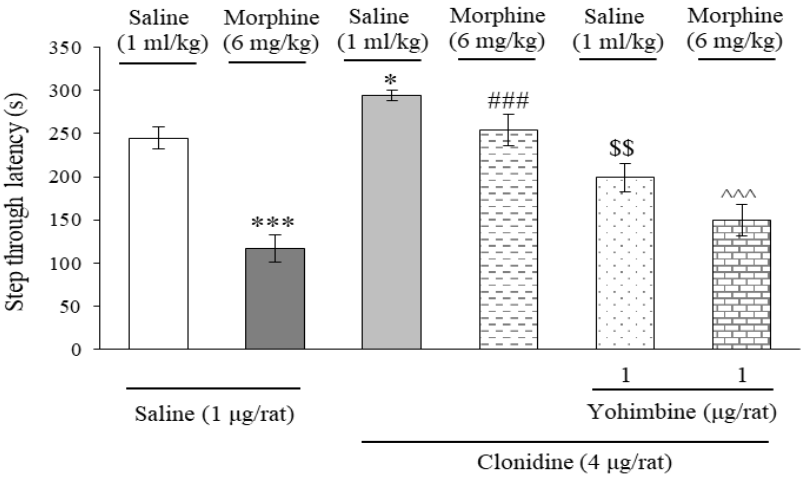


نمودار ۳. اثر تزریق پس از آموزش مقادیر مختلف کلونیدین بر حافظه اجتنابی غیر فعال در حضور یا عدم حضور مورفین. حیوانات بلافاصله پس از آموزش، مقادیر مختلف کلونیدین را در ناحیه CA1 و سالین یا دوز موثر مورفین را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند و ۲۴ ساعت بعد، بدون هیچ تزریقی مورد آزمون حافظه قرار گرفتند. اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید. هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود ($p<۰/۰۵^{*}$ در مقایسه با گروه سالین/سالین، $p<۰/۰۰۱^{###}$ در مقایسه با گروه سالین/مورفین).

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]



نمودار ٤. اثرات تزریق پس از آموزش مقادیر مختلف یوهیمبین بر حافظه اجتنابی غیر فعال در حضور یا عدم حضور مورفین. حیوانات بلافاصله پس از آموزش، مقادیر مختلف یوهیمبین را در ناحیه **CA1** و سالین یا دوز پایین مورفین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و ۲٤ ساعت بعد، بدون هیچ تزریقی مورد آزمون حافظه قرار گرفتند. اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید. هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود ($p<۰/۰۵$ *) در مقایسه با گروه سالین/سالین، ($p<۰/۰۵$ #) و ($p<۰/۰۰۱$ ###) در مقایسه با گروه سالین/مورفین).

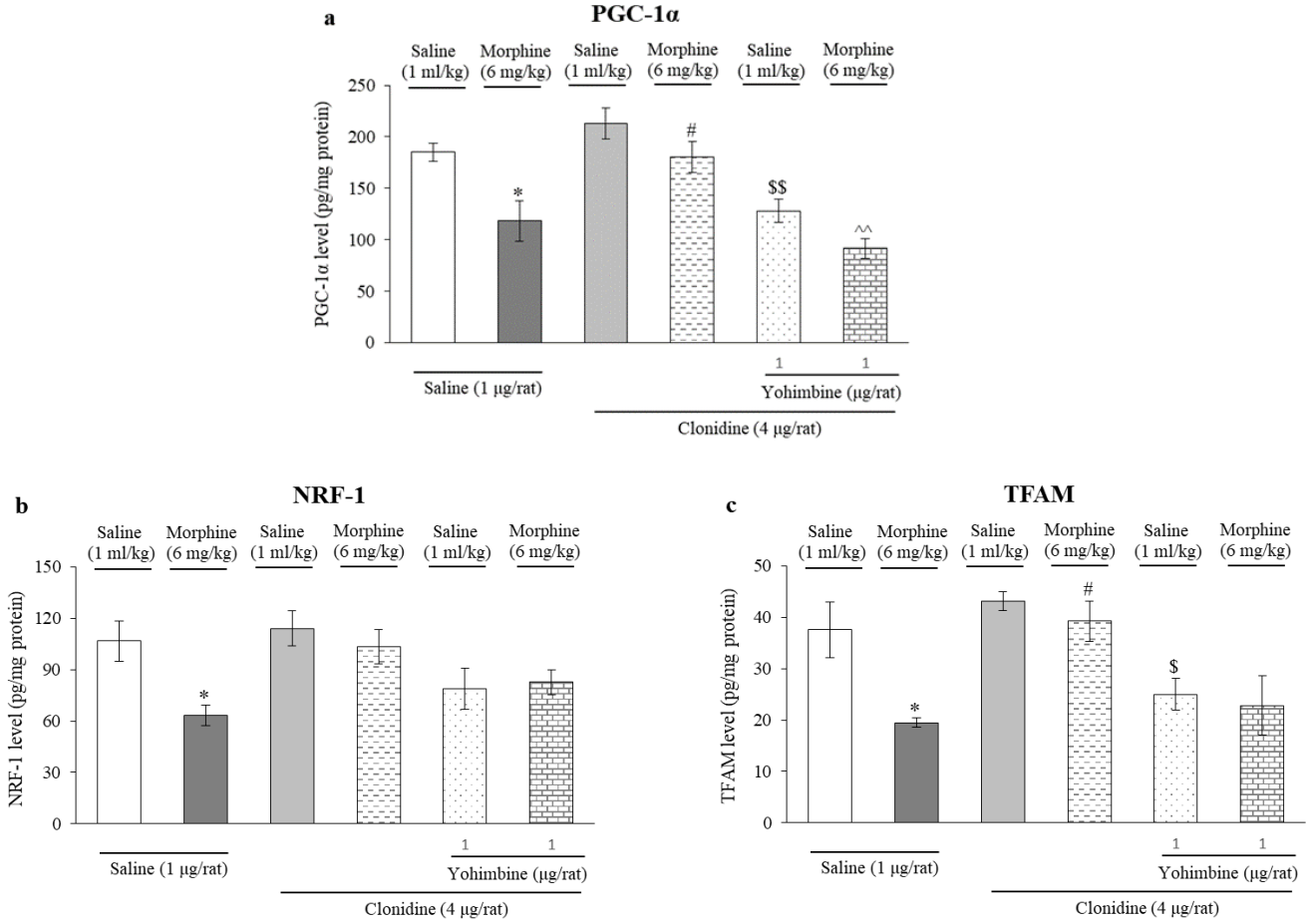


نمودار ۵. اثر مهاری یوهیمبین بر پاسخ ناشی از کلونیدین و نیز کلونیدین به همراه مورفین بر حافظه اجتنابی غیر فعال. اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید. هر گروه آزمایشی شامل ۸ موش بود ($p<۰/۰۵$ *) و ($p<۰/۰۰۱$ ***) در مقایسه با گروه سالین/سالین، ($p<۰/۰۰۱$ ###) در مقایسه با گروه سالین/مورفین، ($p<۰/۰۱$ $$) در مقایسه با گروه کلونیدین/سالین، ($p<۰/۰۰۱$ ^^^) در مقایسه با گروه کلونیدین/مورفین).

نمودار ۶ اثرات تزریق پس از آموزش دوز موثر مورفین (۶ mg/kg)، دوز موثر کلونیدین (۴ µg/rat) به تنهایی و نیز به همراه دوز موثر مورفین، دوز پایین یوهیمبین (۱ µg/rat) به همراه دوز موثر کلونیدین و نیز دوز پایین یوهیمبین به همراه دوز موثر کلونیدین به اضافه دوز موثر مورفین را بر بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری نشان می‌دهد. بررسی آماری نشان داد که دوز موثر مورفین سبب کاهش سطح بیان پروتئین‌های PGC-1α، NRF-1 و TFAM نسبت به گروه سالین/سالین شد (به ترتیب ۱۹/۸۵±۱۱۸/۲۵ در مقابل ۸/۸±۱۸۵/۱، ۶±۶۳/۴۲ در مقابل ۱۱/۹۵±۱۰۶/۶۲ و ۰/۸۹±۱۹/۵ در مقابل ۵/۴۴±۳۷/۶) ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۶a، ۶b و ۶c). تزریق دوز موثر کلونیدین پس از آموزش، منجر به افزایش سطح بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری شد، اما این افزایش‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند. در صورتی که تزریق دوز موثر کلونیدین قبل از تزریق دوز موثر مورفین سبب افزایش سطح بیان

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

پروتئین‌های PGC-1α و TFAM نسبت به گروه سالین/مورفین شد (به ترتیب ۱۵/۲۹±۱۸۰/۱۹ در مقابل ۱۹/۸۵±۱۱۸/۲۵ و ۳/۹۷±۳۹/۲۳ در مقابل ۱۹/۵۰±۰/۸۹) (p<۰/۰۵) (نمودار ۶a و ۶c). لازم به ذکر است که افزایش سطح بیان پروتئین NRF-1 نسبت به گروه سالین/مورفین از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۶b). تزریق دوز پایین یوهیمبین قبل از تزریق دوز موثر کلونیدین سبب کاهش سطح بیان پروتئین‌های PGC-1α و TFAM نسبت به گروه کلونیدین/سالین شد (به ترتیب ۱۱/۲۱±۱۲۸/۱۱ در مقابل ۱۵/۱۶±۲۱۲/۹ و ۳/۰۷±۲۴/۹۸ در مقابل ۱/۸۳±۴۳/۱۵) (p<۰/۰۱ و p<۰/۰۵) (نمودار ۶a و ۶c). اما کاهش سطح بیان پروتئین NRF-1 نسبت به گروه کلونیدین/سالین از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۶b). همچنین تزریق دوز پایین یوهیمبین به همراه دوز موثر کلونیدین به اضافه دوز موثر مورفین سبب کاهش سطح بیان پروتئین PGC-1α نسبت به گروه کلونیدین/مورفین شد (۹/۷۱±۹۱/۴۸ در مقابل ۱۵/۲۹±۱۸۰/۱۹) (p<۰/۰۱) (نمودار ۶a). اما کاهش سطح بیان پروتئین‌های NRF-1 و TFAM نسبت به گروه کلونیدین/مورفین از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند (نمودار ۶b و ۶c). هر گروه آزمایشی شامل ۴ موش بود.



نمودار ٦. اثرات تزریق دوز موثر مورفین (٦ mg/kg)، دوز موثر کلونیدین (٤ µg/rat) به تنهایی و نیز به همراه دوز موثر مورفین، دوز پایین یوهیمبین (١ µg/rat) به همراه دوز موثر کلونیدین و نیز دوز پایین یوهیمبین به همراه دوز موثر کلونیدین به اضافه دوز موثر مورفین بر بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری. برای مشخص نمودن گروه‌های دارای اختلاف معنی‌دار از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. ($p<۰/۰۵^{*}$ در مقایسه با گروه سالین/سالین، $p<۰/۰۵^{\#}$ در مقایسه با گروه سالین/مورفین، $p<۰/۰۵^{\$}$ و $p<۰/۰۱^{\$\$}$ در مقایسه با گروه کلونیدین/سالین، $p<۰/۰۱^{\wedge\wedge}$ در مقایسه با گروه کلونیدین/مورفین، هر گروه آزمایشی شامل ٤ موش بود).

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های مطالعه حاضر دخالت بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک را در اختلال حافظه ناشی از مورفین نشان داد، به طوری که که تحریک گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک ناحیه CA1 هیپوکامپ توسط آگونیست این گیرنده‌ها و نیز افزایش بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری سبب کاهش اختلال حافظه ناشی از مورفین در موش‌های صحرایی گردید. مطالعات زیادی در رابطه با دخالت مورفین و سیستم اوپیوئیدی در فرآیندهای شناختی وجود دارد. بخش عمده‌ای از این مطالعات نشان می‌دهند که مورفین منجر به کاهش حافظه می‌شود. از طرفی در مطالعاتی نیز اثر مـورفین بر تسهیل حافظه گزارش شده است. این نتایج نشان می‌دهند که اثرات متفاوت مورفین بر روی یادگیری و حافظه ممکن است به نحوه تجویز دارو، دوز دارو و مدل بررسی حافظه در حیوانات بستگی داشته باشد (۲۴و۲۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق پس از آموزش دوز ۶ mg/kg مورفین حافظه اجتنابی غیر فعال را در موش‌های صحرایی تخریب نمود، که این پدیده فراموشی ایجاد شده توسط مورفین نامیده می‌شود. در تایید یافته‌های ما، گزارش شده است که تزریق سیستمیک مورفین منجر به اختلال در تثبیت حافظه می‌شود (۲۶و۲۵). در مطالعات دیگری مشاهده شده است که تزریق مورفین در ناحیه آمیگدال و نیز تگمنتال شکمی موش‌ها سبب اختلال در حافظه اجتنابی غیر فعال می‌گردد (۲۸و۲۷). مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که مورفین سبب بروز اختلال در یادگیری و حافظه فضایی در موش‌های صحرایی می‌شود، در حالی که تزریق نالوکسان منجر بـه تسهیل روند یادگیری و حافظه فضایی می‌گردد (۳۰و۲۹). مکانیسمی که از طریق آن مورفین سبب بروز اختلالات شناختی می‌شود، به طور کامل مشخص نشده است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که اختلال حافظه ناشی از مورفین می‌تواند از طریق القاء آپوپتوز، التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ باشد (۳۱). علاوه بر این، گزارش شده است که مورفین با کاهش آزادسازی نوروترانسمیترهای مهم دخیل در فرآیندهای شناختی همچون گلوتامات، استیل کولین و نیز نوراپی نفرین می‌تواند سبب اختلال در یادگیری و حافظه شود (۹و۸).

دخالت سیستم آدرنرژیک هیپوکامپ در بسیاری از عملکردهای مغزی همچون یادگیری و حافظه توسط مطالعات بسیاری نشان داده شده است (۳۲). به طوری که گزارش شده است فعال سازی گیرنده‌های α یا β-آدرنرژیک در بخش‌های مختلف مغز از جمله هیپوکامپ، حافظه را در موش‌های صحرایی افزایش داده و مهار این گیرنده‌ها منجر به تضعیف حافظه می‌شود (۳۴و۳۳). نتایج به دست آمده در این مطالعه نیز نشان داد که تزریق پس از آموزش کلونیدین (۴ µg/rat)، آگونیست گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک، در ناحیه CA1 منجر به افزایش حافظه اجتنابی غیر فعال در موش‌ها گردید. در حالی که تزریق پس از آموزش یوهیمبین (۴ µg/rat)، آنتاگونیست گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک، در ناحیه CA1 حافظه اجتنابی غیر فعال را کاهش داد. در توافق با یافته‌های ما، برخی مطالعات نشان داده‌اند که تزریق سیستمیک یا درون مغزی آگونیست گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک حافظه را در موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد و تزریق آنتاگونیست این گیرنده‌ها منجر به تضعیف حافظه می‌شود (۳۶و۳۵). مطالعه‌ای نشان داده است که تزریق قبل از آزمون کلونیدین در ناحیهCA1 موش‌های صحرایی اختلال در حافظه اجتنابی غیر فعال ناشی از اسکوپولامین را بهبود می‌بخشد، اما تزریق یوهیمبین تخریب حافظه ناشی از اسکوپولامین را تشدید می‌کند (۳۷). به علاوه مطالعه دیگری نشان داده است که تزریق پس از آموزش کلونیدین در ناحیهCA1 سبب بهبود اختلال حافظه ناشی از محرومیت از خواب در موش‌های صحرایی می‌شود (۳۸). مطالعات بر روی موش‌هایی با جهش‌های ژنتیکی در گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک نیز نقش این گیرنده‌ها را در تقویت حافظه و عملکردهای شناختی بیشتر آشکار نمود (۳۹).

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که تزریق پس از آموزش کلونیدین (۴ µg/rat) قبل از تزریق دوز موثر مورفین (۶ mg/kg) مانع از آسیب حافظه و ایجاد فراموشی توسط مورفین گردید. در حالی که تزریق پس از آموزش یوهیمبین (۴ µg/rat) قبل از تزریق دوز پایین مورفین (۴ mg/kg) منجر به تضعیف حافظه در موش‌ها شد. به عبارت دیگر یوهیمبین اثر مورفین را در ایجاد فراموشی تقویت نمود. در تحقیق حاضر، همچنین تزریق دوز پایین یوهیمبین (µg/rat ۱) که به تنهایی تاثیری بر حافظه نداشت، پیش از تزریق دوز موثر کلونیدین (۴ µg/rat) مانع از اثر کلونیدین در افزایش حافظه شد. به علاوه تزریق دوز پایین یوهیمبین اثر مهاری بر پاسخ ناشی از کلونیدین به همراه مورفین داشت. به عبارتی تزریق دوز پایین یوهیمبین مانع از اثر کلونیدین در بهبود فراموشی ناشی از مورفین شد. با وجود اینکه تداخل عمل بین سیستم‌های آدرنرژیک و اپیوئیدرژیک در فرآیندهایی همچون اضطراب، یادگیری و حافظه توسط محققین دیگر گزارش شده است (۴۱و۴۰)، با این حال ارتباط بین گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک و μ-اوپیوئیدی در ناحیه CA1 هیپوکامپ تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. در راستای یافته‌های ما، مطالعه‌ای نشان داده است که تزریق آنتولول، آنتاگونیست گیرنده‌های β_1-آدرنرژیک، در کورتکس پره فرونتال موش‌های صحرایی، باعث ایجاد فراموشی می‌شود و تزریق همزمان آنتولول همراه با مورفین سبب تشدید فراموشی در موش‌ها می‌گردد، که این یافته‌ها دخالت گیرنده‌های β_1-آدرنرژیک را در فراموشی ناشی از مورفین نشان می‌دهند (۴۲). مطالعه دیگری نیز نشان داده است که تزریق مورفین به همراه پروپرانولول، آنتاگونیست گیرنده‌های β_2-آدرنرژیک، سبب تخریب حافظه فضایی در میمون‌ها و نیز موش‌های صحرایی می‌شود (۴۴و۴۳). در مطالعه دیگری نیز تعامل بین مورفین و سیستم نورآدرنرژیک آمیگدال قاعده‌ای جانبی در اضطراب و حافظه در تست ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع نشان داده است (۴۵). در این مطالعه ممکن است تزریق دوز بالای کلونیدین با تحریک گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک پس‌سیناپسی و افزایش آزادسازی نوراپی نفرین در ناحیه CA1 سبب کاهش اختلال حافظه ناشی از مورفین شده باشد و یا افزایش در آزادسازی نوراپی نفرین ممکن است به طور غیر مستقیم و از طریق تحریک آزادسازی سایر نوروترانسمیترهای دخیل در

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

یادگیری و حافظه همچون گلوتامات، منجر به کاهش اختلال حافظه ناشی مورفین شده باشد. با این حال، برای روشن شدن مکانیسم (های) دقیق دخیل در تعامل بین گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک و سیستم اوپیوئیدی به مطالعات بیشتری به خصوص در بخش مولکولی نیاز است. لازم به ذکر است در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی فعالیت‌های حرکتی حیوانات تایید نمود که داده‌های حاصل از تست‌های رفتاری صرفاً مربوط به اثرات تیمار با داروها بوده و به دلیل وجود اختلالات حرکتی در حیوانات نمی‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که تزریق مورفین (۶ mg/kg) منجر به کاهش بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری (PGC-1α، NRF-1 و TFAM) در ناحیهCA1 موش‌ها شد، که دلالت بر کاهش بیوژنز میتوکندری توسط مورفین دارد. در راستای یافته‌های ما، مطالعات نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض مورفین باعث ایجاد آپوپتوز و اختلال در عملکرد میتوکندری در مغز موش‌های صحرایی می‌شود (۴۷و۴۶). به علاوه، مطالعه‌ای اخیراً نشان داده است که تزریق طولانی مدت مورفین باعث ایجاد رفتارهای شبه اضطرابی و افزایش سطح بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری همچون PGC-1α، TFAM و NRF-1 در بخش قاعده‌ای جانبی آمیگدال موش‌ها می‌شود. به علاوه این مطالعه بیان نموده است که بیوژنز بیش از حد میتوکندری فراتر از آنچه که از نظر فیزیولوژیکی ضروری است، ممکن است منجر به افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال شود که خود می‌تواند بر رفتارهای شبه اضطرابی تأثیر بگذارد (۴۸). نتایج متفاوت این مطالعه با مطالعه ما، می‌تواند به دلیل میزان دوز تزریقی مورفین و مدت زمان تزریق آن باشد. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه ما و یافته‌های مطالعات پیشین، این احتمال وجود دارد که مورفین حداقل بخشی از اثرات خود در تخریب حافظه را با تاثیر بر روی بیوژنز میتوکندری اعمال کرده باشد. زیرا مطالعات بسیاری نشان داده‌اند هر گونه اختلال در بیوژنز میتوکندری می‌تواند منجر به اختلالات شناختی شود (۴۸). از این رو، یافتن راهکارهای درمانی که بتوانند منجر به کاهش اختلال در بیوژنز میتوکندری شوند، می‌توانند از بروز اختلالات شناختی ناشی از مصرف مورفین تا حد زیادی جلوگیری نمایند. در مطالعه حاضر مشاهده گردید که تزریق کلونیدین به همراه مورفین سبب افزایش بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری نسبت به گروه دریافت کننده مورفین شد. در صورتی که تزریق یوهیمبین به همراه کلونیدین و یا به همراه کلونیدین به اضافه مورفین، از افزایش بیان فاکتورهای مذکور جلوگیری نمود. لذا این امکان وجود دارد که در این مطالعه کلونیدین از طریق افزایش بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری توانسته است مانع از بروز اختلالات شناختی ناشی از مورفین گردد. مطالعات در رابطه با تاثیر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های آدرنرژیک بر روی بیوژنز میتوکندری در سیستم عصبی مرکزی بسیار اندک می‌باشند. در مطالعه‌ای گزارش شده است که تزریق فرموترول (آگونیست گیرنده β_2-آدرنرژیک) با افزایش بیان PGC-1α و TFAM سبب بهبود آسیب نخاعی در موش‌ها می‌شود (۴۹). مطالعه دیگری نیز نشان داده است که فورموترول سبب افزایش در تعداد کپی mtDNA، افزایش در بیان PGC1α و نیز ژن‌های درگیر در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری در کلیه و قلب موش‌ها می‌شود (۵۰). همچنین گزارش شده است تزریق میدودرین (آگونیست غیرانتخابی گیرنده α_1-آدرنرژیک) با افزایش بیان PGC1α در میوبلاست‌های C2C12 و کاردیومیوسیت‌هایHL1 سبب تقویت بیوژنز میتوکندری در شرایط in-vitro می‌شود (۵۱).

تحقیق حاضر بررسی اولیه نقش بیوژنز میتوکندری و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک را در اختلال حافظه ناشی از مورفین مورد مطالعه قرار داد. لذا، از محدویت‌های این مطالعه می‌توان به انجام مطالعات مولکولی بیشتر برای درک بهتر اثر متقابل بین سیستم α_2-آدرنرژیک و بیوژنز میتوکندری اشاره نمود. همچنین انجام مطالعات هیستولوژیکی جهت شمارش تعداد میتوکندری‌ها و نیز بررسی بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری در سطح mRNA توسط تکنیک Real-time PCR و نیز در سطح پروتئین توسط تکنیک وسترن بلات برای تحقیقات آتی پیشنهاد می‌شود.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که تحریک گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک توسط آگونیست این گیرنده‌ها و نیز افزایش بیان فاکتورهای دخیل در بیوژنز میتوکندری سبب کاهش اختلالات حافظه ناشی از مورفین گردید. بر این اساس به نظر می‌رسد که گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک ناحیه CA1 هیپوکامپ و نیز بیوژنز میتوکندری ممکن است در اثرات مورفین در تخریب حافظه دخالت داشته باشند.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی به جهت حمایت از این پژوهش قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

References

1.Alipour V, Shojaei A, Rezaei M, Mirnajafi-Zadeh J, Azizi H. Intergenerational consequences of adolescent morphine exposure on learning and memory. Neurosci Lett. 2023;808:137303.

2.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.

3.Beirami E, Seyedhosseini Tamijani SM. Effects of CA1 α2-adrenergic receptors on morphine-induced exploratory behaviors. Physiol Pharmacol. 2024; 28(1):66-79.

4.Khani F, Pourmotabbed A, Hosseinmardi N, Nedaei SE, Fathollahi Y, Azizi H. Impairment of spatial memory and dorsal hippocampal synaptic plasticity in adulthood due to adolescent morphine exposure. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2022;116:110532.

5.Shibani F, Sahamsizadeh A, Fatemi I, Allahtavakoli M, Hasanshahi J, Rahmani M, et al. Effect of oleuropein on morphine-induced hippocampus neurotoxicity and memory impairments in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2019;392(11):1383-91.

6.Hamidkhaniha S, Bashiri H, Omidi A, Hosseini-Chegeni A, Tavangar SM, Sabouri S, et al. Effect of pretreatment with intracerebroventricular injection of minocycline on morphine-induced memory impairment in passive avoidance test: Role of P-CREB and c-Fos expression in the dorsal hippocampus and basolateral amygdala regions. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2019;46(8):711-22.

7.Guo H, Xie Q, Cui J, Xu D, Deji C, Chen Y, et al. Naloxone reversed cognitive impairments induced by repeated morphine under heavy perceptual load in the 5-choice serial reaction time task. J Neurosci Res. 2019;97(9):1051-65.

8.Listos J, Łupina M, Talarek S, Mazur A, Orzelska-Górka J, Kotlińska J. The Mechanisms Involved in Morphine Addiction: An Overview. Int J Mol Sci. 2019;20(17):4302.

9.Torkaman-Boutorabi A, Sheidadoust H, Hashemi-Hezaveh SM, Zarrindast MR. Influence of morphine on medial prefrontal cortex alpha2 adrenergic system in passive avoidance learning in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2015;133:92-8.

10.Nguyen PV, Connor SA. Noradrenergic Regulation of Hippocampus-Dependent Memory. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 2019;19(3):187-96.

11.Coradazzi M, Gulino R, Fieramosca F, Falzacappa LV, Riggi M, Leanza G. Selective noradrenaline depletion impairs working memory and hippocampal neurogenesis. Neurobiol Aging. 2016;48:93-102.

12.Maletic V, Eramo A, Gwin K, Offord SJ, Duffy RA. The Role of Norepinephrine and Its α-Adrenergic Receptors in the Pathophysiology and Treatment of Major Depressive Disorder and Schizophrenia: A Systematic Review. Front Psychiatry. 2017;8:42.

13.Lechsner P, Ban EG. Alpha adrenergic receptors in clinical practice–Present and future. Acta Marisiensis - Seria Medica. 2022;68(4):145-9.

14.Chiu CW, Hsieh CY, Yang CH, Tsai JH, Huang SY, Sheu JR. Yohimbine, an α2-Adrenoceptor Antagonist, Suppresses PDGF-BB-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Downregulating the PLCγ1 Signaling Pathway. Int J Mol Sci. 2022;23(14):8049.

15.Alshial EE, Abdulghaney MI, Wadan AS, Abdellatif MA, Ramadan NE, Suleiman AM, et al. Mitochondrial dysfunction and neurological disorders: A narrative review and treatment overview. Life Sci. 2023;334:122257.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

16.San-Millán I. The Key Role of Mitochondrial Function in Health and Disease. Antioxidants (Basel). 2023;12(4):782.

17.Singulani MP, Pereira CPM, Ferreira AFF, Garcia PC, Ferrari GD, Alberici LC, et al. Impairment of PGC-1α-mediated mitochondrial biogenesis precedes mitochondrial dysfunction and Alzheimer's pathology in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. Exp Gerontol. 2020;133:110882.

18.Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: Hard Cover edition, 6th ed. Elsevier; 2006. p.104.

19.Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Methods Mol Biol. 2019;1916:99-103.

20.Krypotos AM, Effting M, Kindt M, Beckers T. Avoidance learning: a review of theoretical models and recent developments. Front Behav Neurosci. 2015;9:189.

21.Eshrati Z, Beirami E, Eslimi Esfahani D. Protective Effect of Intranasal Insulin Administration on Cognitive Functions and Neurogenesis in a Rat Model of Alzheimer's Disease. J Babol Univ Med Sci. 2023;25(1):386-96. [In Persian]

22.Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. J Neuroimmunol. 2008;205(1-2):51-6.

23.Askari N, Mousavi A, Vaez-Mahdavi MR. Maternal deprivation effect on morphine-induced CPP is related to changes in opioid receptors in selected rat brain regions (hippocampus, prefrontal cortex, and nucleus accumbens). Behav Processes. 2022;197:104607.

24.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.

25.Khalifeh S, Nasehi M, Zarrindast MR. Lysosomal and Dopaminergic D2 Inhibition Reversed the Effect of Morphine on Learning and Memory in Male Wistar Rats Relating Mitochondrial Biogenesis. Arch Adv Biosci. 2023;14:E39090.

26.Liu Q, Li X, Zhao Y, Cao K, Liu Y, Xiao R, et al. Dopamine D1 receptor agonist treatment alleviates morphine-exposure-induced learning and memory impairments. Brain Res. 2019;1711:120-9.

27.Sharifi KA, Rezayof A, Alijanpour S, Zarrindast MR. GABA-cannabinoid interplays in the dorsal hippocampus and basolateral amygdala mediate morphine-induced amnesia. Brain Res Bull. 2020;157:61-8.

28.Zhang H, Lipinski AA, Liktor-Busa E, Smith AF, Moutal A, Khanna R, et al. The Effects of Repeated Morphine Treatment on the Endogenous Cannabinoid System in the Ventral Tegmental Area. Front Pharmacol. 2021;12:632757.

29.Ma J, Zou L, Lou Y, Lin Y, Zhou J, Ju N, et al. 20- Deoxyingenol attenuate morphine-induced hippocampus neurotoxicity and memory impairments in rats. Heliyon. 2024;10(11):e31605.

30.Saffar S, Fatemi I, Rahmani M, Hassanshahi J, Sahamsizadeh A, Allahtavakoli M, et al. The effect of epigallocatechin-3-gallate on morphine-induced memory impairments in rat: EGCG effects on morphine neurotoxicity. Hum Exp Toxicol. 2020;39(7):994-1002.

31.Osmanlıoğlu HÖ, Yıldırım MK, Akyuva Y, Yıldızhan K, Nazıroğlu M. Morphine Induces Apoptosis, Inflammation, and Mitochondrial Oxidative Stress via Activation of TRPM2 Channel and Nitric Oxide Signaling Pathways in the Hippocampus. Mol Neurobiol. 2020;57(8):3376-89.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

32.Bekdash RA. The Cholinergic System, the Adrenergic System and the Neuropathology of Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci. 2021;22(3):1273.

33.Dahl MJ, Kulesza A, Werkle-Bergner M, Mather M. Declining locus coeruleus-dopaminergic and noradrenergic modulation of long-term memory in aging and Alzheimer's disease. Neurosci Biobehav Rev. 2023;153:105358.

34.Balbinot G, Haubrich J. Dorsal Hippocampal β-Adrenergic System Modulates Recognition Memory Reconsolidation. Neuroscience. 2023;516:91-9.

35.Li Y, Yu M, Zhao B, Wang Y, Zha Y, Li Z, et al. Clonidine preconditioning improved cerebral ischemia-induced learning and memory deficits in rats via ERK1/2-CREB/ NF-κB-NR2B pathway. Eur J Pharmacol. 2018;818:167-73.

36.Lu Y, Li C, Zhou M, Luo P, Huang P, Tan J, et al. Clonidine ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via up-regulation of the $GABA_BR1$ and GAD67 in hippocampal CA1 in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2015;132:96-102.

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

38.Norozpour Y, Nasehi M, Sabouri-Khanghah V, Nami M, Vaseghi S, Zarrindast MR. The effect of alpha-2 adrenergic receptors on memory retention deficit induced by rapid eye movement sleep deprivation. Iran J Basic Med Sci. 2020;23(12):1571-5.

39.Franowicz JS, Kessler LE, Borja CM, Kobilka BK, Limbird LE, Arnsten AF. Mutation of the alpha2A-adrenoceptor impairs working memory performance and annuls cognitive enhancement by guanfacine. J Neurosci. 2002;22(19):8771-7.

40.Beirami E, Oryan S, Valizadegan F, Zarrindast M. Performance Evaluation of Interference Morphine and β-Adrenergic System of Dorasal Hippocampus on Anxiety-Related Behaviour in Male Wistar rat. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012; 22(91):50-9. [In Persian]

41.Khajehpour L, Fathinia K, Moazedi AA, Kesmati M. Beta1-Adrenoreceptors of the CA1 Area Mediate Morphine-Modified State-Dependent Memory in Rats. Neurophysiology. 2013;45:146-52.

42.Torkaman-Boutorabi A, Hashemi-Hezaveh SM, Sheidadoust H, Zarrindast MR. The possible role of medial prefrontal cortex beta-1-adrenoceptors in morphine-induced amnesia. Pharmacology. 2014;93(5-6):272-7.

43.Wang J, Chen Y, Carlson S, Li L, Hu X, Ma Y. Interactive effects of morphine and scopolamine, MK-801, propanolol on spatial working memory in rhesus monkeys. Neurosci Lett. 2012;523(2):119-24.

44.Zhang J, He J, Chen YM, Wang JH, Ma YY. Morphine and propranolol co-administration impair consolidation of Y-maze spatial recognition memory. Brain Res. 2008;1230:150-7.

45.Valizadegan F, Oryan S, Nasehi M, Zarrindast MR. Interaction between morphine and noradrenergic system of basolateral amygdala on anxiety and memory in the elevated plus-maze test based on a test-retest paradigm. Arch Iran Med. 2013;16(5):281-7.

46.Kasala S, Briyal S, Prazad P, Ranjan AK, Stefanov G, Donovan R, et al. Exposure to Morphine and Caffeine Induces Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in a Neonatal Rat Brain. Front Pediatr. 2020;8:593.

47.Cunha-Oliveira T, Silva L, Silva AM, Moreno AJ, Oliveira CR, Santos MS. Mitochondrial complex I dysfunction induced by cocaine and cocaine plus morphine in brain and liver mitochondria. Toxicol Lett. 2013;219(3):298-306.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]

48.Yin F, Zhang J, Liu Y, Zhai Y, Luo D, Yan X, et al. Basolateral Amygdala SIRT1/PGC-1α Mitochondrial Biogenesis Pathway Mediates Morphine Withdrawal-Associated Anxiety in Mice. Int J Neuropsychopharmacol. 2022;25(9):774-85.

49.Scholpa NE, Williams H, Wang W, Corum D, Narang A, Tomlinson S, et al. Pharmacological Stimulation of Mitochondrial Biogenesis Using the Food and Drug Administration-Approved β_2-Adrenoreceptor Agonist Formoterol for the Treatment of Spinal Cord Injury. J Neurotrauma. 2019;36(6):962-72.

50.Wills LP, Trager RE, Beeson GC, Lindsey CC, Peterson YK, Beeson CC, et al. The β2-adrenoceptor agonist formoterol stimulates mitochondrial biogenesis. J Pharmacol Exp Ther. 2012;342(1):106-18.

51.Sandroni PB, Fisher-Wellman KH, Jensen BC. Adrenergic Receptor Regulation of Mitochondrial Function in Cardiomyocytes. J Cardiovasc Pharmacol. 2022;80(3):364-77.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.44]