

## The effect of curcumin pre-treatment on morphine-induced inhibitory memory impairment and nitric oxide level in rat

Kharazmi K<sup>1</sup>, Heydari A<sup>2,3</sup>, Ardjmand A<sup>2,3\*</sup>

1- Student Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

3- Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received: 2018/12/9 | Accepted: 2019/01/12

### Abstract:

**Background:** Curcumin, as a polyphenolic compound in turmeric plant, has a neuroprotective effect in the improvement of learning and memory. Curcumin has interaction with diverse molecules, e.g., nitric oxide (NO). The present study dealt with the effect of curcumin pre-treatment on morphine-induced inhibitory memory impairment and nitric oxide metabolites (NOx) level in rat.

**Materials and Methods:** In this experimental study, rats ( $n=40$ ) were divided into four groups (each group, 10 rats) and their memory was evaluated in an inhibitory memory apparatus: Control (saline gavage for 35 days+post-training saline (i.p.)); Curcumin (curcumin gavage (10 mg/kg for 35 days)+post-training saline (i.p.); Morphine (saline gavage for 35 days+post-training morphine (7.5 mg/kg/i.p.)); Curcumin+Morphine (curcumin gavage (35 days)+post-training morphine (i.p.)). In all groups, the memory of animals in the second day (test) was reported as the time delay (Sec.) to enter the dark chamber. The locomotor activity was evaluated using the open field. After behavioral tests, the brain of animals was removed under deep anesthesia for evaluating the NOx level using the Griess method.

**Results:** The time delay to enter the dark chamber in Morphine and Morphine+Curcumin groups were decreased ( $P<0.001$ ) and increased ( $P<0.01$ ), compared to Control and Morphine groups, respectively. Tissue NOx levels in Morphine and Morphine+Curcumin groups were decreased ( $P<0.05$ ) and increased ( $P<0.001$ ), compared to Control and Morphine groups, respectively. Locomotor activity in open field did not show a significant difference in four groups ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** Curcumin improves the morphine-induced inhibitory memory impairment in rat, probably via the NO signaling pathway.

**Keywords:** Memory, Learning, Curcumin, Morphine, Nitric oxide

\*Corresponding Author:

Email: ardjmand\_ab@kaums.ac.ir

Tel: 0098 315 554 0021-5(3514)

Fax: 0098 315 5621 157

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2019; Vol. 23, No 1, Pages 1-9

# اثر پیش‌درمان با کورکومین بر اختلال حافظه اجتنابی ناشی از مورفین و بررسی سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید در موش بزرگ آزمایشگاهی

خاطره خوارزمی<sup>۱</sup>، اژدر حیدری<sup>۲</sup>، ابوالفضل ارجمند<sup>۳</sup>\*

## خلاصه:

سابقه و هدف: کورکومین نوعی پلی‌فنول موجود در گیاه زردچوبه است که با اثر حفاظت عصبی و تعامل با ملکول‌های مختلف مثل نیتریک اکساید (NO)، در بهبود اختلالات شناختی نقش دارد. این مطالعه به بررسی اثر کورکومین بر اختلال حافظه اجتنابی ناشی از مورفین و بررسی سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید (NOx) در موش بزرگ آزمایشگاهی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی ۴۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شده و یادگیری و حافظه آن‌ها طی دو روز در دستگاه حافظه اجتنابی بررسی شد: گروه کنترل ۳۵ روز گاواز سالین (۱۰ ml/kg) و گروه کورکومین ۳۵ روز گاواز کورکومین (۱۰ mg/kg) و سپس در روز آموزش سالین داخل صفاقی پس از آموزش دریافت کردند؛ گروه مورفین ۳۵ روز گاواز سالین و گروه کورکومین+مورفین ۳۵ روز گاواز کورکومین (۱۰ mg/kg) و سپس در روز آموزش مورفین داخل صفاقی (۷/۵ mg/kg) پس از آموزش دریافت کردند. حافظه حیوانات در روز پس از آموزش به صورت زمان تأخیر ورود به اتفاق تاریک (ثانیه) در دستگاه حافظه اجتنابی گزارش شد. سپس، فعالیت حرکتی در دستگاه open field بررسی شده و پس از خروج مغز تحت بیهوشی عمیق، سطح NOx به روش گریس اندازه‌گیری شد.

نتایج: حافظه اجتنابی در گروه مورفین نسبت به گروه کنترل کاهش ( $P<0.001$ ) و در گروه مورفین+کورکومین نسبت به گروه مورفین افزایش ( $P<0.01$ ) داشت. سطح NOx نیز در گروه مورفین نسبت به گروه کنترل کاهش ( $P<0.05$ ) و در گروه مورفین+کورکومین نسبت به گروه مورفین افزایش ( $P<0.001$ ) داشت. فعالیت حرکتی تغییر معناداری بین گروه‌ها نداشت ( $P>0.05$ ).

نتیجه‌گیری: کورکومین احتمالاً از طریق مسیر سیگنالی NO اختلال حافظه اجتنابی ناشی از مورفین را در موش بزرگ آزمایشگاهی بهبود می‌بخشد.

**واژگان کلیدی:** حافظه، یادگیری، کورکومین، مورفین، نیتریک اکساید

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۹۸، صفحات ۱-۹

مطالعات شناختی در حیوانات نشان می‌دهد که کورکومین به تنهایی بر حافظه اثربخش نداشته، عملکردش زمانی آشکار می‌شود که حافظه با عامل یا داروی دیگری تخریب شده باشد [۷]. مورفین یک آگونیست اپی‌پوئیدی با تمایل زیاد به گیرنده MO (۱۱) است که عملکرد مهاری آن از طریق پروتئین-G-واساطت می‌شود. در فرایند مذکور مورفین با تحریک فعالیت GTPase باعث مهار تولید cGMP و با مهار آنزیم آدنیلات سیکلاز مانع تولید cAMP شده، در نتیجه با ممانعت از ورود کلسیم به سلول حافظه را مختل می‌کند [۸]. گزارش شده است که تجویز حاد مورفین از تشکیل حافظه در حیوانات جلوگیری می‌کند [۹]. نیتریک اکساید (NO) نوعی میانجی عصبی گازی شکل است که هنگام فعالیت‌های شناختی و در پی تحریک گیرنده NMDA توسط آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (NOS) تولید و آزاد شده [۱۰]، در سیستم عصبی به شکل پس‌نورد عمل می‌کند [۱۱]. NO با نیمه عمر کوتاهش به سرعت به متابولیت‌های آن یعنی نیتریت و نیترات تبدیل می‌شود [۱۲]. مطالعات نشان می‌دهد که کورکومین با افزایش تولید ایزوفرم عصبی آنزیم NOS و افزایش غلظت NO در مغز به

## مقدمه

کورکومین نوعی پلی‌فنول غیرفلاؤنوثیدی در گیاه زردچوبه بوده و آثار فارماکولوژیکی متعددی مثل اثر آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، حفاظت عصبی و افزایش حافظه دارد [۱]. مکانیسم اصلی اثر کورکومین در اعمال مذکور شامل تعامل آن با اهداف ملکولی مختلف و تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی مربوط است [۲]. به علاوه، کورکومین با خاصیت قدرتمند حفاظت عصبی در درمان اختلالات شناختی موثر است [۳]. مصرف کورکومین در بهبود اختلالات شناختی، حافظه و یادگیری در حیوانات موثر است [۴-۶].

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

\* لشکان نمی‌سلده مسئول:

کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

تلفن: ۰۳۱ ۵۵۵۴۰۰۲۱ - ۰۳۱ ۵۵۶۲۱۱۵۷

پست الکترونیک: arjmand\_ab@kaums.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۹/۱۸ تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲

کاربردی روزانه قبل از انجام آزمایش به صورت تازه تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفت.

#### آزمون حافظه در دستگاه یادگیری اجتنابی

آزمون بررسی حافظه در دستگاه یادگیری اجتنابی (Step-through) ساخت شرکت Maze router (تبریز-ایران) طی دو روز (آموزش و آزمون) انجام شد. دستگاه مذکور ابزاری تحقیقاتی شامل دو اتاقک روشن و تاریک به ابعاد  $30 \times 20 \times 20$  سانتی‌متر است که با درب گیوتینی از هم جدا می‌شوند. کف اتاقک تاریک دستگاه شبکه فولادی زنگ نزن با فواصل ۱ سانتی‌متر از هم، جهت ایجاد شوک الکتریکی متناوب قرار دارد. برای سازش حیوان با دستگاه، ابتدا حیوان دوبار با فاصله زمانی ۲ دقیقه، هربار به مدت ۳۰ ثانیه در هر اتاقک قرار گرفت و سپس به قفس خود بازگردانده شد. پس از ۲ دقیقه در روز آزمون (مرحله آموزش) حیوان پشت به درب، در اتاقک روشن قرار گرفت و پس از ۵ ثانیه درب باز شد. پس از ورود حیوان به اتاقک تاریک درب بسته شده، شوک الکتریکی با مشخصات (50 Hz, 3 s, 1 mA) به پای موش داده شد. پس از مرحله آموزش موفق، موش از اتاقک تاریک خارج شده و براساس گروه قرارگیری، مداخله دارویی پس از آموزش انجام شده و سپس حیوان به قفس اصلی خود بازگردانده شد. در روز دوم (۲۴ ساعت بعد) جهت ارزیابی حافظه، حیوان پشت به درب باز در اتاقک روشن قرار گرفت و تاخیر زمانی (ثانیه) ورود حیوان به اتاقک تاریک به عنوان معیاری برای حافظه ثبت گردید. سقف زمانی مرحله آزمون ۳۰۰ ثانیه بود [۱۸].

#### بررسی فعالیت حرکتی حیوان در دستگاه Open-field

این دستگاه یک جعبه تاریک مریع شکل به ابعاد  $72 \times 72 \times 36$  سانتی‌متر است. کف دستگاه توسط نرم‌افزار با خطوط آبی‌رنگ به ۱۶ قسمت  $18 \times 18$  سانتی‌متر تقسیم‌بندی می‌شود. در ارتفاع بالاتری نسبت به دستگاه یک دوربین ویدیویی CCD متصل به نرم‌افزار مخصوص Maze router (تبریز-ایران) جهت ثبت حرکات حیوان قرار داشت. بررسی حرکتی در این دستگاه طی دو روز، ۵ دقیقه پس از مرحله آموزش (مرحله سازش) و ۵ دقیقه بعد از مرحله آزمون انجام شد. کل مسافت طی شده توسط حیوان با نرم‌افزار ثبت گردید [۱۹].

#### اندازه‌گیری سطح NO<sub>x</sub>

پس از اتمام مطالعات رفتاری، سر موش‌ها تحت بیهوشی عمیق جدا شد. کل مغز از جمجمه خارج شده و تحت شرایط

افزایش تولید PKG و بهبود حافظه از طریق مسیر NO/cGMP/PKG کمک می‌کند [۱۴، ۱۳]. بدلیل شیوع اختلالات شناختی در سال‌های اخیر [۱۵] و قابلیت بالای کورکومین به عنوان نوعی ماده طبیعی در بهبود و پیشگیری از اختلالات شناختی [۳]، هدف این مطالعه بررسی اثر کورکومین بر اختلال حافظه اجتنابی ناشی از مورفین و بررسی سطح متابولیت‌های NO در مغز موش بزرگ آزمایشگاهی است.

#### مواد و روش‌ها

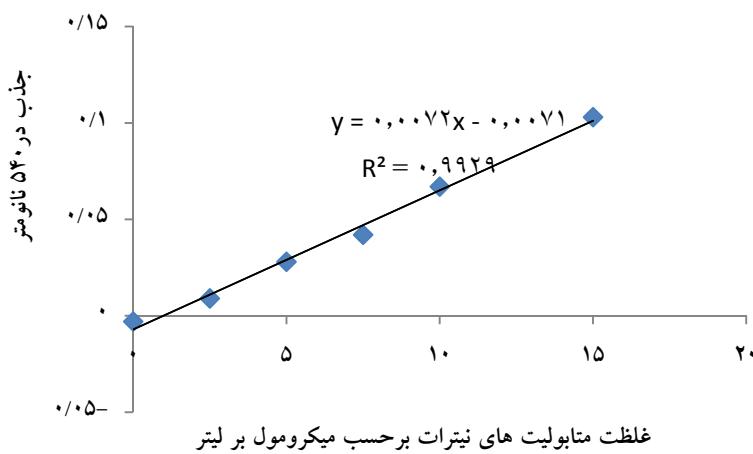
در این پژوهش تجربی تعداد ۴۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی  $180 - 220$  گرم مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات تحت شرایط دمایی  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  و چرخه شبانه‌روزی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته، با دسترسی آزاد به آب و غذا قرار گرفتند و در گروه‌های ۵ تایی در قفس‌های مخصوص در حیوانخانه بخش فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان نگهداری شدند. این طرح تحقیقاتی با شماره ۹۶۹۶ و کد اخلاق IR.KAUMS.MEDNT.REC.1393.26 در کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان ثبت و همه آزمایش‌های این مطالعه تحت نظارت کمیته مذکور انجام شد. پس از یک هفته سازش با محیط، حیوانات به روش تصادفی در ۴ گروه ۱۰ تایی (کنترل، کورکومین، مورفین، و کورکومین+مورفین) به آزمایش رفتاری حافظه وارد شدند. گروه کنترل، هم‌حجم دارو گلواژ سالین به مدت ۳۵ روز و سپس تزریق داخل صفاقی سالین پس از آموزش را دریافت کردند؛ گروه کورکومین به مدت ۳۵ روز گلواژ کورکومین (۱۰ mg/kg) [۱۶] و سپس تزریق داخل صفاقی سالین پس از آموزش را دریافت کردند؛ گروه مورفین گلواژ سالین به مدت ۳۵ روز و سپس تزریق داخل صفاقی مورفین پس از آموزش (۷/۵ mg/kg) را دریافت کردند؛ و گروه کورکومین+مورفین به مدت ۳۵ روز گلواژ کورکومین (۱۰ mg/kg) و سپس تزریق داخل صفاقی مورفین پس از آموزش (۷/۵ mg/kg) را دریافت کردند. مطالعات قبلی ما نشان داد که دوز مذکور مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی باعث تخریب حافظه می‌شود [۱۷]. حافظه حیوانات همه گروه‌ها در روز پس از آموزش (روز آزمون) به صورت زمان تاخیری ورود به اتاقک تاریک (ثانیه) در دستگاه حافظه اجتنابی گزارش شد.

#### داروها و مواد

مواد مورد استفاده شامل کورکومین (سیگما، امریکا)، مورفین (تماد، تهران) و سالین بود که به روش خوارکی (گلواژ) و تزریق داخل صفاقی مورد استفاده قرار گرفتند. داروها در دوز

طیف‌سنجی انجام گردید. جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش الایزا اندازه‌گیری شده و با استفاده از منحنی استاندارد نیتریت (شکل شماره ۱)، غلظت NO<sub>x</sub> بر حسب میکرومول بر گرم بافت مغز محاسبه شد [۲۰].

مطلوب نگهداری شد [۱۶]. برای اندازه‌گیری سطح NO<sub>x</sub> از روش گریس استفاده شد. بدین‌ترتیب که پس از خروج نمونه‌ها از بیچال ۷۰-درجه سانتی‌گراد، یک گرم بافت مغز با ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS هموژن شد. احیاء نیترات به نیتریت با استفاده از وانادیم کلراید (VCl<sub>3</sub>) انجام شد. سپس، سنجش نیتریت تام به روش



شکل شماره ۱- نمودار استاندارد جذب نوری غلظت‌های مختلف NO<sub>x</sub> در طول موج ۵۴۰ نانومتر

اثر کورکومین خواراکی و مورفين داخل صفاقی بر فعالیت حرکتی در موش بزرگ آزمایشگاهی

جدول شماره ۱ اثر گاواز کورکومین و تزریق داخل صفاقی مورفين در موش بزرگ آزمایشگاهی را بر فعالیت حرکتی حیوان در دستگاه Open-field نشان می‌دهد. انجام آزمون آماری کروسکال-والیس تفاوت معناداری را بین گروه‌ها نشان نداد [P=۰/۲۰, H(3)=۴/۶۰, n=۸-۱۰].

اثر کورکومین خواراکی بر سطح NO<sub>x</sub> در اختلال حافظه ناشی از مورفين در مغز موش بزرگ آزمایشگاهی

شکل شماره ۳ اثر گاواز کورکومین به مدت ۳۵ روز و تزریق داخل صفاقی مورفين بر مقدار به دست آمده از سطح NO<sub>x</sub> در بافت مغز موش بزرگ آزمایشگاهی را نشان می‌دهد. انجام آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تفاوت معناداری را بین گروه‌ها، به دنبال گاواز کورکومین و تزریق مورفين نشان داد (LSD<۰/۰۰۱, F<sub>۳/۳۶</sub>=۵/۵۶, P<۰/۰۰۱). به علاوه، انجام آزمون تعقیبی تفاوت معناداری را در مقایسه بین گروه مورفین با گروه کنترل (P<۰/۰۵) و گروه کورکومین+مورفین در مقایسه با گروه مورفین (P<۰/۰۰۱) نشان داد.

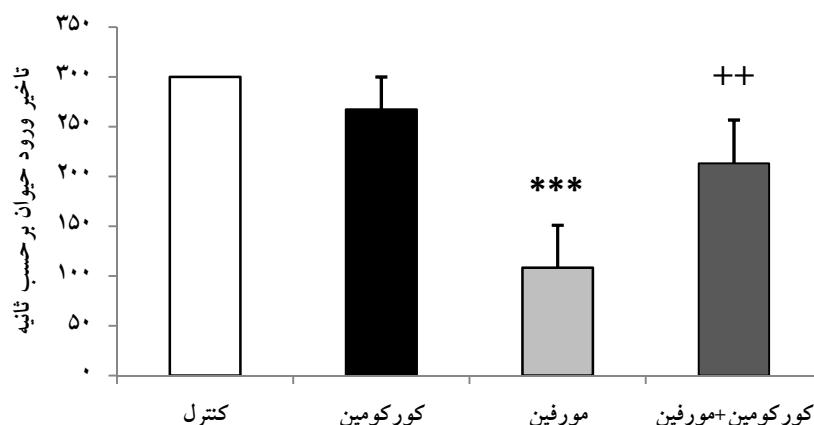
روش تجزیه و تحلیل آماری

قبل از تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده‌های رفتاری مربوط به مدت زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک (ثانیه) و بررسی سطح NO<sub>x</sub> از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه پارامتری و ناپارامتری (بسته به نتیجه آزمون نرمال بودن) و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. سطح P<۰/۰۵ به عنوان معیار اختلاف معنادار در نظر گرفته شد.

**نتایج**

اثر کورکومین خواراکی بر اختلال حافظه ناشی از مورفين در مدل یادگیری اجتنابی در موش بزرگ آزمایشگاهی

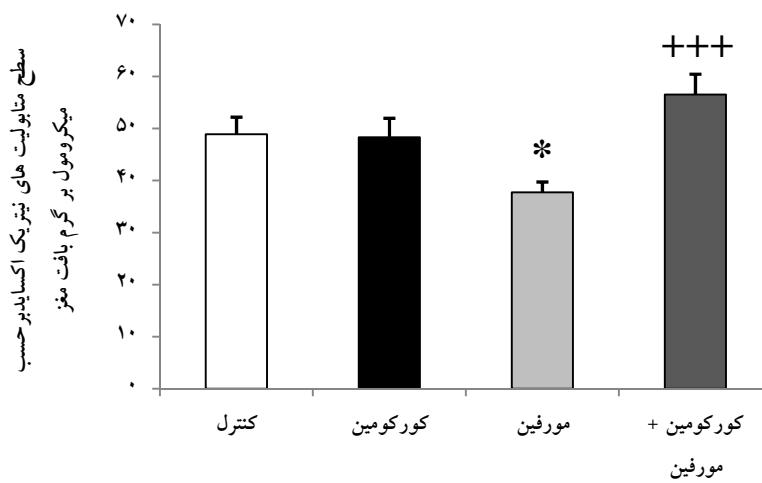
شکل شماره ۲ اثر گاواز کورکومین (10 mg/kg) به مدت ۳۵ روز را بر اختلال حافظه اجتنابی ناشی از تزریق داخل صفاقی مورفين (7/5 mg/kg) در مدل یادگیری اجتنابی در موش بزرگ آزمایشگاهی نشان می‌دهد. انجام آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تفاوت معناداری را در گاواز کورکومین و تزریق مورفين بین گروه‌ها نشان داد (LSD<۰/۰۰۱, F<sub>۳/۳۶</sub>=۱۱/۴۴, P<۰/۰۰۱). به علاوه، انجام آزمون تعقیبی LSD تفاوت معناداری را بین گروه مورفین و کنترل (P<۰/۰۰۱) و گروه مورفین+کورکومین در مقایسه با گروه مورفین (P<۰/۰۱) نشان داد.



شکل شماره ۲- مدت زمان تأخیر ورود حیوان به اتاقک تاریک در دستگاه حافظه اجتنابی. گروه کنترل: دریافت‌کننده سالین تزریقی و خوراکی (۱،۱۰ mg/kg)؛ گروه کورکومین: دریافت‌کننده کورکومین خوراکی به صورت گاواز (۱۰ mg/kg)؛ گروه مورفین: دریافت‌کننده مورفین (۷/۵ mg/kg.ip) و گروه کورکومین+مورفین: دریافت‌کننده گاواز کورکومین و مورفین داخل صفاقی است. داده‌ها به صورت Mean±SEM گزارش شده است (n=۸-۱۰). \*\*\*P<۰/۰۰۱ و ++P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، و \*P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه مورفین می‌باشد.

جدول شماره ۱- میانگین کل مسافت طی شده توسط حیوانات در دستگاه open-field [n=۸-۱۰, H(3)=۴/۶۰, P=۰/۲۰].

گروهها	کورکومین+مورفین	کنترل	کورکومین	مورفین	میانگین
	۵۹۶/۸۸	۵۵۳/۶۳	۵۷۸/۳۸	۵۷۵/۱۳	
انحراف استاندارد	۶/۲۹	۱۱/۹۳	۱۵/۸۸	۲۲/۴۳	



شکل شماره ۳- سطح NOx به ازای میکرومول بر گرم بافت مغز. گروه کنترل: دریافت‌کننده سالین (۱ ml/kg)؛ گروه کورکومین: دریافت‌کننده کورکومین خوراکی به صورت گاواز (۱۰ mg/kg)؛ گروه مورفین: دریافت‌کننده مورفین (۷/۵ mg/kg.ip)؛ گروه کورکومین+مورفین: دریافت‌کننده گاواز کورکومین و مورفین داخل صفاقی است. داده‌ها به صورت Mean±SEM گزارش شده است (n=۸-۱۰). \*P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل و \*\*P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه مورفین می‌باشد.

نداشته، عملکردش زمانی آشکار می‌شود که عملکرد حافظه با عامل یا داروی دیگری تخریب شده باشد [۷]. ما در این مطالعه جهت تخریب حافظه از مورفین استفاده کردیم. طبق گزارش Mehmet و همکاران (۲۰۱۵) اختلال حافظه و یادگیری ناشی از سیسپلاتین [۲۱] و طبق گزارش Nam و همکاران (۲۰۱۴)

## بحث

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر کورکومین بر اختلال حافظه اجتنابی ناشی از مورفین و بررسی سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید در موش بزرگ آزمایشگاهی بود. مطالعات شناختی در حیوانات نشان می‌دهد که کورکومین به تهایی بر حافظه اثری

روش تجویز بر نتیجه آزمون حافظه موثر باشد. در مطالعه مذکور، کورکومین به شکل حاد و داخل صفاقی، و در مطالعه ما به صورت مزمن و از طریق گواژ تجویز شده بود. هم راستا با نتایج ما، طبق نتایج مطالعه Liu و همکاران (۲۰۱۴) گواژ  $10\text{mg/kg}$  کورکومین به مدت ۳۵ روز حافظه را افزایش می دهد [۱۶]. کورکومین با اتصال به اهداف مولکولی مختلف و تنظیم مسیر پایام رسانی مربوط آثار خود را بروز می دهد [۳۰]. برای مثال، اثر کورکومین بر شناخت با وساطت گیرنده گلوتامات و با افزایش کلسیم داخل سلولی و فعال کردن آنزیم آدنیلات سیکلاز که به افزایش بیان cAMP و در نتیجه فعال سازی کینازهای پروتئین (مانند پروتئین کینازهای A و یا C) منجر می شود، بروز می نماید [۳۱]. از طرف دیگر، مورفین با عملکرد مهاری از طریق پروتئین-G و تحریک GMPase مانع تولید cGMP و با مهار آنزیم آدنیلات سیکلاز مانع تولید cAMP شده، در نتیجه با ممانعت از ورود کلسیم به سلول حافظه را مختل می کند [۸]. با توجه به نقش پروتئین کیناز وابسته به cGMP در فرآیند حافظه و یادگیری [۳۲]، احتمالاً مورفین از طریق این مکانیسم هم می تواند حافظه را مختل کند. در مطالعه ما ضمن بررسی سطح NO<sub>x</sub> اختلال معناداری بین گروه کورکومین و گروه کورکومین+مورفین با گروه کنترل مشاهده نشد. در حالی که در گروه مورفین نسبت به گروه مورفین معنادار و در گروه کورکومین+مورفین نسبت به گروه مورفین افزایش معناداری دیده شد. مورفین با اثر بر NO در مغز در فرآیند حافظه و یادگیری مداخله می کند [۳۳]. هم راستا با مطالعه ما، مطالعه Khavandgar و همکاران نشان داد که اختلال یادگیری و حافظه ناشی از مورفین با کاهش تولید NO همراه بوده و تجویز ال-آرژنین این اختلالات را بهبود می بخشد [۳۴]. مورفین با کاهش تولید cAMP و cGMP و ممانعت از ورود کلسیم به سلول، تولید CAMKII را کاهش داده [۳۵،۳۶]. در نتیجه کاهش غلظت nNOS و سطح NO را سبب می گردد [۳۶]. در مطالعه دیگری فرمتدفر و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کرده اند که تجویز ال-آرژنین به عنوان پیش ساز NO هم زمان با مورفین، سبب بهبود اختلال حافظه ناشی از مورفین می شود [۳۳]. مطالعه اخیر نشان می دهد مورفین با کاهش NO حافظه را مختل می کند. گزارش شده ترکیبات مشابه ال-آرژنین، مانند متیل ال-آرژنین، دی متیل ال-آرژنین و آگماتین که به شکل درونزاد در بافت عصبی وجود دارند، با مهار فعالیت nNOS و eNOS تولید NO و در نتیجه cGMP را در نواحی مختلف مغز موش کاهش داده، به اختلالات شناختی منجر می گردد [۳۷]. افزایش سطوح این ترکیبات در شرایط پاتولوژیک، تولید NO را در مغز کاهش می-

اختلال شناختی ناشی از پیری، با مصرف کورکومین تا حد زیادی بهبود یافته است [۶]. مطالعه ما نیز این نتایج را تایید می کند، ولی ویژگی و نوآوری مطالعه حاضر این بود که کورکومین می تواند حافظه تخریب شده به وسیله مورفین را بهبود بخشد. از اثرات مورفین بر حافظه و یادگیری نتایج مختلفی به شرح زیر گزارش شده است: گرچه طبق اکثر گزارش ها تجویز حاد مورفین حافظه را مختل می کند [۲۲]. Motamedi و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کرده اند که تجویز مورفین یادگیری اجتنابی فعال را در موش های نر تسهیل می کند و بر حافظه اجتنابی فعال و غیرفعال بی اثر است [۲۳]. به نظر می رسد اثرات مورفین بر حافظه و یادگیری بر اساس نحوه مصرف متفاوت است. زیرا در مطالعه ما مورفین به شکل تزریقی و در مطالعه ایشان، به شکل خوراکی تجویز شده بود. اخیرا Pan و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کرده اند که تجویز مورفین حافظه را مختل نمی کند [۲۴]. ممکن است دوز و روش تجویز هم بر حافظه موثر باشد؛ هر چند روش تزریق مورفین در مطالعه ایشان نیز مانند مطالعه ما به صورت داخل صفاقی بود، اما دوز آن دو برابر دوز تجویزی ما ( $15\text{ mg/kg}$ ) و به صورت مزمن بود. مطالعه Sharifi و همکاران (۲۰۱۷) هم سو با مطالعه ما نشان داد که تزریق داخل صفاقی مورفین، بلا فاصله پس از آموزش، حافظه را مختل می کند [۲۵]. تحقیقات متعددی نشان می دهند که کورکومین با اثر حفاظت سیستم عصبی دارای قابلیت قدرتمندی برای درمان اختلالات شناختی است [۲۶،۴-۶]. در سال های اخیر مکمل های غذایی تهیه شده از کورکومین از بعد خاصیت حفاظت عصبی شان در بهبود بیماری های شناختی استفاده می شوند [۲۷]. اخیرا Soukhaklari و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کرده اند مصرف کورکومین در موش های سوری جوان به افزایش حافظه اجتنابی مهاری کمک می کند [۲۸]. Dong و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان داده اند که کورکومین به بهبود یادگیری در موش های بزرگ آزمایشگاهی کمک می کند [۵]. Bassani و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کرده اند که تجویز خوراکی مزمن کورکومین در موش بزرگ آزمایشگاهی حافظه کوتاه مدت شناسایی اشیاء را بهبود بخشیده، اما بر حافظه کوتاه مدت فضایی بی تاثیر بوده است [۲۶]. در مطالعه ما از مدل اجتنابی مهاری استفاده شد که نوعی حافظه غیر فضایی است. همه شواهد فوق دلیل بر این است که احتمالاً روش آزمون حافظه می تواند به عنوان عامل موثری در نتیجه مطالعه حاصل نقش داشته باشد. بر خلاف مطالعه ما، Sarlak و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کرده اند که تجویز داخل صفاقی کورکومین در دوز های پایین و متوسط ( $15$  و  $5\text{ mg/kg}$ ) بر حافظه اجتنابی مهاری بی تاثیر است [۲۹]. احتمالاً طول دوره مصرف و نیز تفاوت

تحت غلظت فیزیولوژیک NO امکان پذیر بوده [۴۲]. در چند مورد افزایش تجویز ال-آرژنین به افزایش NO در مغز و اختلال در مرحله اکتساب حافظه در یادگیری فضایی و اجتنابی در موش ها منجر شده است [۴۳، ۱۰]. در مطالعه ما کورکومین به نهایی افزایش معناداری در سطح NO<sub>x</sub> در مغز موش های گروه کنترل نداد که احتمال دارد به نقش حفاظتی کورکومین بر سیستم عصبی مربوط باشد.

#### نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که پیش درمان با کورکومین اختلال حافظه اجتنابی ناشی از مورفین را احتمالاً از طریق مسیر سیگنالی NO در موش بزرگ آزمایشگاهی بهبود می بخشد.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی پایان نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان «بررسی اثر کورکومین بر اختلال حافظه و یادگیری احترازی ناشی از مورفین، بیان پروتئین CREB و سطح متabolیت های NO در هیپوکامپ موش بزرگ آزمایشگاهی» مصوب دانشگاه علوم پزشکی کاشان با شماره ۹۶۹۶ می باشد که با حمایت دانشگاه مذکور اجرا شده است. بدین وسیله نویسندها، از کلیه کسانی که در گردآوری این پژوهش همکاری و مساعدت نموده اند، کمال تشکر را دارند.

دهند [۱۰]. کورکومین با ملکول های مختلفی از جمله NO در مغز تعامل دارد. Zhu و همکاران (۲۰۱۵) گزارش داده اند که کورکومین با افزایش nNOS و NO در هیپوکامپ، از مسیر PKG به افزایش NO/CGMP/PKG و بهبود روند حافظه کمک می کنند [۱۳]. در مطالعه حاضر احتمالاً کورکومین با مکانیسم مشابهی به بهبودی حافظه کمک کرده است. مطالعه دیگری همسو با یافته ما نشان داد که تجویز کورکومین در موش های پیر سطح nNOS و NO را در هیپوکامپ به طور معناداری افزایش می دهد. ایشان گزارش کرده اند که پیش درمان با NI-7 به عنوان آنتا-گونیست انتخابی مهاری nNOS اثرات کورکومین را به طور معناداری معکوس کرده و به اختلال حافظه منجر می گردد که این امر نشان می دهد کورکومین از مسیر پیام رسانی nNOS/NO عمل می کند [۴]. فعالیت انواع رسپتور های گلو تاماتی NMDA آغاز گر تولید نیتریک اکساید در مغز است [۳۸] مهار کننده های NOS بسیاری از اثرات مرکزی NMDA را مهار می کنند [۳۹]. همان- NMDA طور که قبل اشاره شد کورکومین با افزایش بیان گیرنده NMDA [۴۰] کلسیم داخل سلولی در نورون های پس سیناپسی را افزایش داده به افزایش غلظت nNOS در حضور کمپلکس کلسیم- کالمو- دولین و در نتیجه افزایش ملکول NO کمک می کند [۳۶]. پس از آن NO از مسیر NO-cGMP به رفع اختلالات شناختی کمک می کند؛ این مسیر برای القای LTP در هیپوکامپ و فرآیند یادگیری و حافظه کاملاً شناخته شده است [۴۱]. تشکیل حافظه

#### References:

- [1] Ullah F, Liang A, Rangel A, Gyengesi E, Niedermayer G, Münch G. High bioavailability curcumin: an anti-inflammatory and neurosupportive bioactive nutrient for neurodegenerative diseases characterized by chronic neuroinflammation. *Archives Toxicol* 2017; 91(4): 1623-34.
- [2] Kumar TP, Antony S, Gireesh G, George N, Paulose CS. Curcumin modulates dopaminergic receptor, CREB and phospholipase C gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of streptozotocin induced diabetic rats. *J Biomed Sci* 2010; 17(1): 43.
- [3] Yue YK, Mo B, Zhao J, Yu YJ, Liu L, Yue CL, Liu W. Neuroprotective effect of curcumin against oxidative damage in BV-2 microglia and high intraocular pressure animal model. *J Ocular Pharmacol Ther* 2014; 30(8): 657-64.
- [4] Yu SY, Zhang M, Luo J, Zhang L, Shao Y, Li G. Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 45: 47-53.
- [5] Dong S, Zeng Q, Mitchell ES, Xiu J, Duan Y, Li C, et al. Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. *PloS One* 2012; 7(2): e31211.
- [6] Nam SM, Choi JH, Yoo DY, Kim W, Jung HY, Kim JW, et al. Effects of curcumin (*Curcuma longa*) on learning and spatial memory as well as cell proliferation and neuroblast differentiation in adult and aged mice by upregulating brain-derived neurotrophic factor and CREB signaling. *J Med Food* 2014; 17(6): 641-9.
- [7] Ataei A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Moghadam AH, Ataei R, Moghaddam SN. An investigation of the neuroprotective effects of Curcumin in a model of Homocysteine-induced oxidative stress in the rat's brain. *DARU* 2010; 18(2): 128.
- [8] Al-Hasani R, Bruchas M.R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 2011; 115(6): 1363-81.
- [9] Jafarinejad-Farsangi S, Farazmand A, Rezayof A, Darbandi N. Proteome Analysis of Rat Hippocampus Following Morphine-induced Amnesia and

- State-dependent Learning. *Iran J Pharm Res* 2015; 14(2): 591-602.
- [10] Paul V, Ekambaram P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *Indian J Med Res* 2011; 133(5): 471.
- [11] Jafari-Sabet M, Khodadadnejad MA, Ghoraba S, Ataei R. Nitric oxide in the dorsal hippocampal area is involved on muscimol state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Pharm Biochem Behav* 2014; 117: 137-43.
- [12] Tonin AA, Da Silva AS, Thomé GR, Sangui MB, Oliveira LS, Flores MM, et al. Influence of toxoplasmosis on acetylcholinesterase activity, nitric oxide levels and cellular lesion on the brain of mice. *Pathology Res Practice* 2014; 210(8): 526-32.
- [13] Zhu W, Su J, Liu J, Jiang C. The involvement of neuronal nitric oxide synthase in the anti-epileptic action of curcumin on pentylenetetrazole-kindled rats. *Bio-Medical Materials engineering* 2015; 26(s1): S841-S50.
- [14] Yu SY, Zhang M, Luo J, Zhang L, Shao Y, Li G. Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 45: 47-53.
- [15] Aboul-Enein F. Comment on the article entitled'Frequency of cognitive impairment dramatically increases during the first 5 years of multiple sclerosis' by Reuter F, Zaaraoui W, Crespy L, Faivre A, Rico A, Malikova I, Soulier E, Viout P, Ranjeva JP, Pelletier J, Audo. 2018.
- [16] Liu D, Wang Z, Gao Z, Xie K, Zhang Q, Jiang H, et al. Effects of curcumin on learning and memory deficits, BDNF, and ERK protein expression in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behav Brain Res* 2014; 271: 116-21.
- [17] Ardjmand A, Rezayof A, Zarrindast MR. Involvement of central amygdala NMDA receptor mechanism in morphine state-dependent memory retrieval. *Neurosci Res* 2011; 69(1): 25-31.
- [18] Torkaman-Boutorabi A, Sheidadoust H, Hashemi-Hezaveh SM, Zarrindast M.-R. Influence of morphine on medial prefrontal cortex alpha2 adrenergic system in passive avoidance learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2015; 133: 92-8.
- [19] Wang M, Li D, Yun D, Zhuang Y, Repunte-Canonigo V, Sanna PP, et al. Translation of BDNF-gene transcripts with short 3' UTR in hippocampal CA1 neurons improves memory formation and enhances synaptic plasticity-relevant signaling pathways. *Neurobiol Learn Mem* 2017; 138: 121-34.
- [20] Heydari A, Davoudi S. The effect of sertraline and 8-OH-DPAT on the PTZ-induced seizure threshold: Role of the nitrergic system. *Seizure* 2017; 45: 119-24.
- [21] Oz M, Nurullahoglu Atalik KE, Yerlikaya FH, Demir EA. Curcumin alleviates cisplatin-induced learning and memory impairments. *Neurobiol Learn Mem* 2015; 123: 43-9.
- [22] Kitanaka J, Kitanaka N, Hall FS, Fujii M, Goto A, Kanda Y, et al. Memory impairment and reduced exploratory behavior in mice after administration of systemic morphine. *J Experimental Neurosci* 2015; 9: JEN. S25057.
- [23] Motamed F, Ghasemi M, Davoodi F, Naghdi N. Comparison of learning and memory in morphine dependent rats using different behavioral models. *Iran J Pharmaceutical Res* 2003; 2(4): 225-30.
- [24] Pan J, He L, Li X, Li M, Zhang X, Venesky J, et al. Activating autophagy in hippocampal cells alleviates the morphine-induced memory impairment. *Molecul Neurobiol* 2017; 54(3): 1710-24.
- [25] 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.
- [26] Bassani TB, Turnes JM, Moura EL, Bonato JM, Còppola-Segovia V, Zanata SM, et al. Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type. *Behav Brain Res* 2017; 335: 41-54.
- [27] Hemachandra Reddy P, Manczak M, Yin X, Grady MC, Mitchell A, Tonk S, et al. Protective Effects of Indian Spice Curcumin Against Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Disease* 2018; 61(3): 843-6.
- [28] SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F, Ashjazadeh N, Moosavi M. The passive avoidance memory improving effect of curcumin in young adult mice: Considering hippocampal MMP-2, MMP-9 and Akt/GSK3 $\beta$ . *PharmaNutrition* 2018; 6(3): 95-9.
- [29] Sarlak Z, Oryan S, Moghaddasi M. Interaction between the antioxidant activity of curcumin and cholinergic system on memory retention in adult male Wistar rats. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18(4): 398.
- [30] Zhou H, S Beevers C, Huang S. The targets of curcumin. *Current Drug Targets* 2011; 12(3): 332-47.
- [31] Wang H, Peng RY. Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Military Med Res* 2016; 3(1): 26.
- [32] Paul C, Schöberl F, Weinmeister P, Micale V, Wotjak C, Hofmann F, et al. Role of cGMP-dependent protein kinases for fear memory formation in the lateral amygdala. *BMC Pharmacol* 2009; 9(1): S21.
- [33] Farahmandfar M, Kadivar M, Naghdi N. Possible interaction of hippocampal nitric oxide and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on reversal of spatial memory impairment induced by

- morphine. *European J Pharmacol* 2015; 751: 99-111.
- [34] Khavandgar S, Homayoun H, Zarrindast MR. The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. *Psychopharmacol (Berl)* 2003; 167(3): 291-6.
- [35] Guerra GP, Mello CF, Bochi GV, Pazini AM, Fachinetto R, Dutra RC, et al. Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 96(2): 324-32.
- [36] Pigott BM, Garthwaite J. Nitric oxide is required for L-type Ca<sup>2+</sup> channel-dependent long-term potentiation in the hippocampus. *Front Synaptic Neurosci* 2016; 8: 17.
- [37] Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 683-706.
- [38] Mohseni G, Ostadhadi S, Akbarian R, Champanara M, Norouzi-Javidan A, Dehpour AR. Anticonvulsant effect of dextromethorphan on pentylenetetrazole-induced seizures in mice: Involvement of nitric oxide and N-methyl-d-aspartate receptors. *Epilepsy Behav* 2016; 65: 49-55.
- [39] Bergstrom HC, Darvesh AS, Berger S. Inducible Nitric Oxide Inhibitors Block NMDA Antagonist-Stimulated Motoric Behaviors and Medial Prefrontal Cortical Glutamate Efflux. *Frontiers Pharmacol* 2015; 6: 292.
- [40] Sweatt JD. Neural plasticity and behavior—sixty years of conceptual advances. *J Neurochem* 2016; 139(S2): 179-99.
- [41] Zhuo M, Hawkins RD. Long-term depression: a learning-related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Reviews Neurosciences* 1995; 6(3): 259-78.
- [42] Hall CN, Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric oxide* 2009; 21(2): 92-103.
- [43] dos Reis EA, de Oliveira LS, Lamers ML, Netto CA, Wyse AT. Arginine administration inhibits hippocampal Na(+),K(+)-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Res* 2002; 951(2): 151-7.