

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۹، اردیبهشت ۱۳۹۹، ۱۲۴-۱۱۵

# تأثیر اپی گالوکاتچین-۳-گالات بر نقص حافظه کاری القاء شده با مورفین در موش‌های صحرایی نر: یک مطالعه تجربی

سبا صفار<sup>۱</sup>، ایمان فاطمی<sup>۲</sup>، محمد رضا رحمانی<sup>۳</sup>، جلال حسن شاهی<sup>۴</sup>، محمد پاک‌هاشمی<sup>۵</sup>، آیت کائیدی<sup>۶</sup>

دریافت مقاله: ۹۸/۸/۱۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۸/۹/۲۴ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۸/۱۱/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۸/۱۱/۱۹

### چکیده

**زمینه و هدف:** مصرف مزمن مورفین، تغییرات ساختاری در بخش‌های مختلف مغز را به دنبال دارد. از طرفی اپی گالوکاتچین-۳-گالات (Epigallocatechin-3-gallate; EGCG) موجود در چای سبز اثرات ضد التهاب و محافظت کننده عصبی دارد، لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر EGCG بر نقص حافظه کاری موش‌های القاء شده با مورفین طراحی شد.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه تجربی حاضر، ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند که شامل: گروه کنترل، گروه مورفین (دریافت ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین یکبار در روز به مدت ۴ هفته) و گروه‌های مورفین + EGCG (دریافت مورفین (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و هم‌چنین ۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم EGCG یکبار در روز به مدت ۴ هفته) می‌باشند. برای بررسی حافظه کاری از آزمون رفتاری اندازه‌گیری رفتار تناوب در ماز Y شکل استفاده شد. برای بررسی میزان بیان پروتئین TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) در بافت هیپوکامپ مغز از تست وسترن بلات استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.

**یافته‌ها:** تزریق داخل صفاقی مورفین، باعث بروز نقص حافظه کاری و افزایش میزان بیان پروتئین TNF- $\alpha$  نسبت به گروه کنترل شد ( $P < 0.001$ ). تزریق داخل صفاقی EGCG با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در موش‌های دریافت کننده مورفین به‌طور معنی‌دار باعث بهبود عملکرد حافظه کاری ( $P < 0.010$ ) و کاهش میزان بیان پروتئین TNF- $\alpha$  ( $P < 0.050$ ) نسبت به گروه دریافت کننده مورفین شد.

**نتیجه‌گیری:** EGCG می‌تواند نقص حافظه کاری و التهاب عصبی القاء شده با مورفین را در موش‌های صحرایی بهبود بخشد.

**واژه‌های کلیدی:** مورفین، اپی گالوکاتچین-۳-گالات، حافظه کاری، موش صحرایی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی - فارماکولوژی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۲- استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

۳- استادیار پژوهشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی - فارماکولوژی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۴- استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۶- نویسنده مسئول استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

تلفن: ۰۳۴-۳۱۳۱۵۰۷۴، دورنگار: ۰۳۴-۳۱۳۱۵۰۰۳، پست الکترونیکی: a.kayedi@gmail.com

## مقدمه

مورفین داروی ارزش‌مندی است که عمدتاً از آن برای تسکین دردهای حاد و شدید کلینیکی استفاده می‌شود. مورفین علاوه بر اثرات ضد دردی شناخته شده، در فرآیندهای تکوین مغز، عصب زایی، تمایز سلولی و آپوپتوز نورون‌های سیستم عصبی مرکزی نیز تأثیرگذار می‌باشد. استفاده مزمن از مورفین و سایر اوپیوئیدها باعث ایجاد وابستگی و تحمل (Tolerance) به اثر بی دردی آنها می‌شود [۱]. نشان داده شده است که وابستگی مزمن به مورفین سبب بروز اختلالات شناختی از جمله بروز نقایص حافظه و یادگیری می‌شود. علاوه بر این مورفین باعث بروز استرس اکسیداتیو، مرگ نورونی، بروز التهاب، تغییر در مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی و فاکتورهای نوروتروفیک، مانند فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز می‌شود [۲]. با توجه به این‌که گیرنده‌های اوپیوئیدی در بافت مغز به وفور بیان می‌شوند (به‌ویژه نواحی قشر پره فورتال، هیپوکمپ، هسته لوكوسرئولوس، هسته اکومبسن) و همچنین مسیرهای عصبی آوران از سایر نقاط مغز به این نواحی نیز حاوی نوروپپتیدهای اوپیوئیدی هستند، نشان داده شده است که این گیرنده‌ها باعث تغییراتی در انواع یادگیری و حافظه می‌گردند. همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند که مورفین با شکل‌پذیری نامطلوب و آتروفی دندریتی یا تخریب نورونی در هیپوکمپ و ساختمان‌های وابسته به قشر لیمبیک باعث کاهش میزان نورون زایی در لایه سلول‌های گرانولی هیپوکمپ موش‌های بالغ می‌گردد [۳]. مورفین هم‌چنین از طریق تداخل با مسیرهای مربوط به پیام‌رسانی درون

سلولی فاکتورهای رشد نوروتروفیک مغز، در اعمال تنظیمی آنها بر عملکرد نورون‌ها مداخله می‌کند [۴]. هم‌چنین مشاهده شده است که استفاده مزمن از مورفین موجب القاء استرس اکسیداتیو، التهاب و بروز آپوپتوز در نورون‌های مغز، به‌ویژه نورون‌های هیپوکمپ حیوانات آزمایشگاهی می‌شود [۵-۶]. فاکتور نکروز تومور آلفا (Tumor necrosis factor alpha; TNF- $\alpha$ ) یکی از مهم‌ترین واسطه‌ها در ایجاد التهاب و یکی از سیتوکین‌های درگیر در ایجاد واکنش فاز حاد در بدن انسان است و مصرف مورفین می‌تواند باعث افزایش سطح بیان آن در بدن شود [۷]. پلی‌فنول‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی هستند که قادرند رادیکال‌های آزاد را جذب نموده و از بدن در برابر بسیاری از بیماری‌ها محافظت کنند. به‌عنوان مثال پلی‌فنول‌ها می‌توانند از بافت‌های بدن در برابر استرس‌های اکسیداتیو، افزایش لیپوپروتئین با چگالی پایین (Low-density lipoprotein; LDL) و سرطان‌هایی (مانند پرستات، سینه و پوست) جلوگیری کنند [۸-۱۰]. اپی گالوکاتچین گالات (Epigallocatechin gallate; EGCG)، مهم‌ترین ترکیب پلی‌فنولی برگ چای سبز است که از جمله مهم‌ترین گروه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و بسیار از خواص آنتی‌اکسیدانی چای سبز به آن نسبت داده می‌شود [۱۱-۱۲]. با توجه به مطالب ذکر شده، از آنجایی که مصرف مزمن مورفین می‌تواند باعث ایجاد تغییرات ساختاری در بخش‌های مختلف مغز از جمله هیپوکمپ شود و باعث اختلال در حافظه کاری شود و از طرفی EGCG موجود در چای سبز دارای اثرات محافظت نورونی می‌باشد، بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر احتمالی EGCG سطح TNF- $\alpha$  هیپوکمپ

(مورفین): حیوانات این گروه به مدت ۴ هفته مورفین (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم یک بار در روز، به صورت زیر پوستی) را دریافت کردند. گروه سوم (مورفین + ۵ میلی گرم بر کیلوگرم EGCG): حیوانات این گروه روزانه به مدت ۴ هفته ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین را به صورت زیر پوستی و همچنین ۵ میلی گرم بر کیلوگرم EGCG را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه چهارم (مورفین + ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم EGCG): حیوانات این گروه روزانه به مدت ۴ هفته ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم مورفین را به صورت زیر پوستی و همچنین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم EGCG را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

در پایان دوره ۴ هفته ای تیمار با مورفین و EGCG، برای بررسی حافظه کاری از تست رفتاری اندازه گیری رفتار تناوب در ماز Y شکل (Y-maze spontaneous alternation test) استفاده شد. داده های آزمون ماز Y- شکل می تواند نشان دهنده شاخصی از حافظه فضایی کاری در کوتاه مدت (از نوع بازشناختی) در جوندگانی نظیر موش کوچک آزمایشگاهی و همچنین موش صحرایی باشد. در این آزمون میزان عملکرد حیوانات از نظر حافظه کاری با مشاهده بررسی رفتار مداوم خودمختار حیوان در یک روز مورد بررسی قرار گرفت. ماز مربوط به این آزمون دارای ۳ بازو از جنس پلکسی گلاس بود. هریک از بازوها دارای ابعاد ۱۵ × ۳۰ × ۴۰ سانتی متر بوده و بازوها از طریق یک محوطه مرکزی به هم متصل بودند. برای انجام آزمون هر موش صحرایی در قسمت انتهایی یک بازو قرار داده می شد و امکان دسترسی آزاد آن به تمام نواحی ماز در یک دوره زمانی ۸ دقیقه ای فراهم می گردید. با مشاهده رفتار

(به عنوان یک شاخص التهابی) و نقص حافظه کاری موش های القاء شده با مورفین طراحی شده است. امید است که نتایج این مطالعه بتواند در آینده در بیماران مبتلا به مصرف مورفین مؤثر واقع شود.

## مواد و روش ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۷ انجام شد. از ۳۲ موش صحرایی نر نژاد ویستار (وزن  $10 \pm 230$  گرم) استفاده شد. موش ها به صورت تصادفی در چهار گروه در قفس های پلاستیکی در یک چرخه ۱۲ ساعته روشنایی / تاریک (روشنایی از ساعت ۰۷:۰۰ الی ۱۹:۰۰) با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری و در دمای  $2 \pm 23$  درجه سانتی گراد و رطوبت ۴۰-۵۰ درصد نگهداری می شدند. تمام مراحل آزمایشی مطابق دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام شد. همچنین این مطالعه دارای کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به شماره ثبتی IR.RUMS.REC.1396.210 می باشد. در این مطالعه، از هر موش فقط یک بار استفاده شد. EGCG هر روز به صورت تازه در سالیین حل شده و با استفاده از سرنگ انسولین به صورت داخل صفاقی و همچنین مورفین نیز به صورت زیر پوستی تزریق می شد.

## گروه های آزمایشی و نحوه تیمار:

هر گروه آزمایشی شامل ۸ حیوان بود. در این مطالعه حیوانات به چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند: گروه اول دریافت کننده سالیین (کنترل): حیوانات به مدت ۴ هفته، سالیین (به عنوان حلال EGCG) را دریافت کردند. گروه دوم

به مدت ۵ دقیقه در محلول TBS-T، غشاء به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP (Horseradish peroxidase) انکوبه شد. در نهایت غشاء در معرض محلول سوبسترای ECL (chemiluminescence) قرار گرفته و باندهای حاصل بر روی فیلم رادیولوژی مخصوص ثبت شدند. جهت کمی کردن بیان پروتئین‌های TNF- $\alpha$  یا  $\beta$ -actin از نرم افزار ImageJ نسخه ۱/۵۱ استفاده شد [۲].

با توجه به اینکه داده‌ها به صورت کمی بود، توسط آزمون Shapiro-Wilk فرض نرمال بودن داده‌ها تأیید گردید ( $P > 0.05$ ). داده‌های به دست آمده به صورت خطای معیار  $\pm$  میانگین بیان شدند و برای مقایسه اختلاف بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

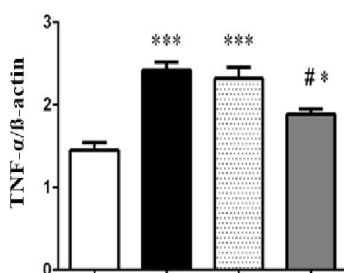
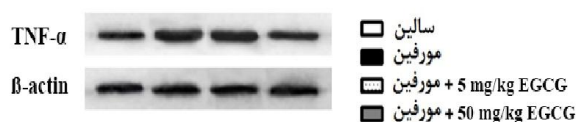
### نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد تیمار مزمن حیوانات با مورفین باعث کاهش درصد رفتار تناوبی در ماز Y-شکل نسبت به گروه سالین می‌شود ( $P < 0.001$ ). علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز هم‌زمان EGCG (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به حیوانات تیمار شده با مورفین شده باعث بهبود رفتار تناوبی در این گروه‌های آزمایشی شد ( $P = 0.008$ )، به‌صورتی که تفاوت معنی‌داری میان این گروه با گروه سالین مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). لازم به ذکر است که تجویز EGCG با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر معنی‌داری در رفتار تناوب حیوانات وابسته به مورفین نداشت و در پایان هم‌چنان میان

حیوان در طی این مدت، تعداد دفعات ورود حیوان به داخل هر بازو ثبت می‌شد. معیار ورود حیوان به داخل یک بازو با ورود قاعده دم حیوان بطور کامل در داخل بازو در نظر گرفته شد، رفتار تناوب به عنوان ورودهای موفق و پشت سر هم به داخل تمام بازوها در مجموعه‌های سه تایی در نظر گرفته شد. درصد تناوب از نسبت تناوب مشاهده شده به حداکثر تناوب (۲- تعداد کل بازوهای وارد شده)  $\times 100$  محاسبه شد [۱۳].

پس از اتمام ماز Y-شکل، حیوانات تحت بیهوشی عمیق با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، کشته شده و مغز آنها از جمجمه به سرعت جدا سازی شد. بافت هیپوکمپ از سایر نواحی مغز جدا و بافت هیپوکمپ در بافر (1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 0.1% Na deoxycholate, 1% NP-40) هموژن گردید. نمونه هموژن شده سانتریفیوژ (۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه، در دمای ۴ درجه و به مدت ۲۰ دقیقه) و قسمت رویی که حاوی نمونه‌های پروتئین تام بافت بود، از آن استخراج و بر اساس روش برادفورد (Bradford) میزان پروتئین هر نمونه اندازه‌گیری شد [۱۴، ۲]. حدود ۴۰ میکروگرم پروتئین از عصاره پروتئینی بر روی ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۲/۵ درصد الکتروفورز شد. سپس نمونه‌های الکتروفورز شده به غشای PVDF (Polyvinylidene Fluoride) منتقل شده و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه در محلول ۵ درصد TBS-T (NaCl/150mM, Tris-HCl/20mM, and 0.1% Tween20; pH7.4) انکوبه شد. در مرحله بعدی غشای PVDF با آنتی‌بادی اولیه علیه TNF- $\alpha$  یا  $\beta$ -actin (به عنوان کنترل داخلی) به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. پس از ۳ بار شستشو

دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان پروتئین TNF- $\alpha$  در موش‌های تحت تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EGCG در مقایسه با حیوانات تیمار شده با مورفین به تنهایی شده بود ( $P < 0.05$ ). هر چند تفاوت معنی‌داری در بیان پروتئین TNF- $\alpha$  بین گروه تیمار شده با مورفین به تنهایی و گروه تیمار شده با مورفین و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پلی فنول EGCG مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

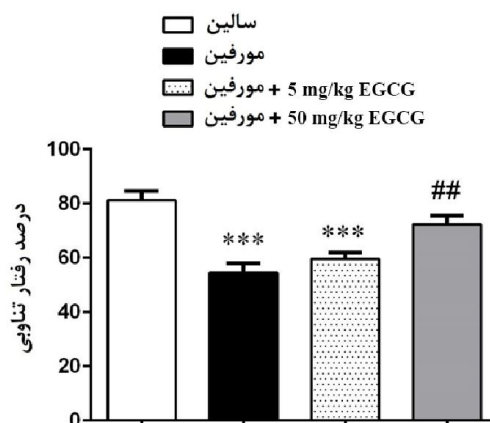


نمودار ۲- تأثیر EGCG بر میزان بیان پروتئین TNF- $\alpha$  بافت هیپوکمپ. داده‌ها به صورت خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر بود. از آزمون ANOVA یک‌طرفه و پس آزمون Tukey برای مقایسه داده‌ها استفاده شد.  $P < 0.05$  و  $P < 0.001$  اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین.  $P < 0.05$  اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه مورفین.

## بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر EGCG بر حافظه کاری موش‌های تیمار شده با مورفین انجام شد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با مورفین منجر به ایجاد اختلال در حافظه کاری و افزایش التهاب در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرائی می‌شود. از سوی دیگر EGCG باعث بهبود حافظه

این گروه با گروه کنترل/سالین تفاوت معنی‌داری وجود داشت (نمودار ۱).



نمودار ۱- تأثیر مورفین و EGCG بر میزان درصد رفتار تناوبی در ماز Y شکل.

داده‌ها به صورت خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر بود. از آزمون ANOVA یک‌طرفه و پس آزمون Tukey برای مقایسه داده‌ها استفاده شد. درصد رفتار تناوبی در گروه تیمار شده با مورفین نسبت به گروه سالین به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. همچنین درصد رفتار تناوبی در گروه تیمار شده با EGCG با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه تیمار شده با مورفین، به طور معنی‌داری بهبود یافته بود.  $P < 0.001$  اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین؛  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه مورفین.

میزان بروز التهاب به دنبال تیمار مزمن با مورفین از طریق اندازه‌گیری میزان بیان TNF- $\alpha$  در بافت هیپوکمپ برآورد شد.

TNF- $\alpha$  یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌باشد که می‌تواند منجر به بروز تخریب و مرگ سلولی شود. بنابراین در این مطالعه به صورت غیر مستقیم با اندازه‌گیری مقدار بیان پروتئین TNF- $\alpha$ ، بروز التهاب برآورد شد. همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است، تیمار مزمن با مورفین باعث افزایش معنی‌دار بیان پروتئین TNF- $\alpha$  در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرائی تیمار با مورفین نسبت به گروه کنترل شد ( $P < 0.001$ ). همچنین تجویز EGCG (در

کاری و کاهش میزان التهاب در هیپوکمپ مغز در این حیوانات می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده اند که حیوانات تحت درمان با مورفین دارای اختلال حافظه هستند. اگر چه مکانیسم‌هایی که اثرات مخرب مورفین بر حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهد هنوز کاملاً شناخته نشده‌اند، اما پیشنهاد شده است که تجویز مورفین از طریق نقص در عملکرد هیپوکمپ و سایر نواحی مغز که مرتبط با عملکرد حافظه می‌باشند، تأثیر مخرب خود را اعمال می‌کند [۲]. التهاب نورونی و اختلال عملکرد میتوکندری از جمله نشان‌گرهای بیماری‌های تخریب نورنی در سیستم عصبی مرکزی می‌باشند. هر دو عوامل التهاب نورونی و اختلال عملکرد میتوکندری، می‌توانند از طریق آزاد شدن بیش از اندازه گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی و نیتروژنی منجر به افزایش استرس اکسیداتیو مخرب شوند. استرس اکسیداتیو حاصل نیز باعث افزایش تخریب نورونی و التهاب و در نتیجه پیشبرد حلقه معیوب آسیب عصبی می‌شود. سایتوکاین  $TNF-\alpha$ ، یکی از تنظیم‌کننده‌های سیستم ایمنی می‌باشد که از طریق گیرنده  $TNF-\alpha$  و بسیج سلول‌های ایمنی نقش مهمی را در پیشرفت التهاب ایفاء می‌کند. علاوه بر این  $TNF-\alpha$  از طریق عمل بر گیرنده TNFR1 می‌تواند با فعال کردن آنزیم‌های تولیدکننده گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی و نیتروژنی بروز استرس اکسیداتیو را بیش از پیش القاء نماید [۱۵]. تولید بیش از حد رادیکال آزاد در شرایط خاص می‌تواند سبب القاء چندین اثر مختلف شامل تغییرات و شکست در سطح مولکول‌های تشکیل دهنده ساختمان سلولی شود. پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع توسط رادیکال

هیدروکسیل باعث تأثیر در بسیاری از پارامترهای مهم عملکردی، مانند سیالیت، نفوذپذیری، پتانسیل الکتریکی و انتقال کنترل شده متابولیت‌ها در عرض غشاء می‌گردد [۱۶]. لازم به یادآوری است که مصرف مزمن مواد مخدر از جمله مورفین با افزایش قابل توجه پراکسیداسیون لیپیدی در ارتباط است [۲]. در مطالعه حاضر در بررسی حافظه کاری با استفاده از آزمون ماز Y نشان داده شد که تعداد کل ورودی‌ها و درصد رفتار تناوبی در گروه‌های تحت درمان با EGCG بیش‌تر از سایر گروه‌های دریافت‌کننده مورفین بود که نشان دهنده اثرات محافظت‌کننده سیستم عصبی می‌باشد. EGCG می‌تواند یادگیری و حافظه فضایی را در مدل‌های حیوانی افزایش دهد. در این رابطه، Renno و همکاران نشان دادند که ترکیب پلی فنول EGCG چای سبز با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود می‌تواند در بهبود آسیب عصب سیاتیک موش‌های صحرایی مؤثر باشد. آنان نشان دادند که تجویز EGCG به حیوانات باعث افزایش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم می‌شود. علاوه بر این میزان فاکتور التهابی اینترلوکین-۶ سرمی نیز در حیوانات تیمار شده با EGCG کاهش یافته بود [۱۷]. هم‌چنین مشخص شده است که EGCG باعث بهبود نقص حافظه، کوچک‌تر شدن وسعت ناحیه آسیب دیده در اثر سکت و هم‌چنین بهبود پتانسیل پس سیناپسی تقویت شده نورن‌های هیپوکمپ در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۸]. در این رابطه He و همکاران در یک مطالعه نشان دادند که پلی فنول EGCG چای سبز می‌تواند از نورون‌های کورتکس مغز موش‌های صحرایی در مقابل اثرات سمی آکریل

هم‌زمان EGCG موجب کاهش اثرات زیان‌بار رژیم غذایی پرچرب بر حافظه فضایی در موش‌های تغذیه شده با رژیم پرچرب شد [۲۱].

### نتیجه‌گیری

داد های به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که تجویز EGCG به موشهای صحرایی می‌تواند از القاء نقص حافظه کاری در آنها جلوگیری کند. با توجه به داده‌های حاصل از این تحقیق، اثر مفید EGCG بر حافظه کاری در مطالعه حاضر می‌تواند تا حدودی ناشی از کاهش التهاب در مغز موش‌های صحرایی تیمار شده با مورفین باشد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و از محل طرح شماره ۹۶۱۷۱ انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را اعلام می‌نمایند.

آمید محافظت کند. آنان نشان دادند تجویز EGCG باعث کاهش استرس اکسیداتیو و هم‌چنین کاهش آپوپتوز در نورن‌های کورتکس موش‌های صحرایی تیمار شده با آکریل آمید می‌شود [۱۹]. از جمله در دیگر مطالعات Yu و همکاران نشان دادند که پلی فنول EGCG موجود در چای سبز با مهار استرس اکسیداتیو از بروز التهاب و آپوپتوز ناشی از آرسنیک در موش‌های آزمایشی جلوگیری می‌کند. داده‌های آزمایشات آنان نشان داد که که تجویز EGCG به همراه آرسنیک موجب کاهش سطح فاکتورهای التهابی اینترلوکین-۶ و TNF $\alpha$  خون، کاهش سطح استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در بافت‌های طحال و تیموس شده بود [۲۰]. Mi و همکاران نیز نشان دادند که پلی فنول EGCG موجود در چای سبز می‌تواند از نقص حافظه القاء شده با رژیم غذایی پرچرب در موش‌های آزمایشگاهی جلوگیری کند. داده‌های آنان نشان داد که تجویز

## References

- [1] Zhang Y, Loh HH, Law P-Y. Effect of opioid on adult hippocampal neurogenesis. *The Scientific World Journal* 2016; 2016.
- [2] 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-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2019; 1-9.
- [3] Grilli M. Chronic pain and adult hippocampal neurogenesis: translational implications from preclinical studies. *Journal of Pain Research* 2017; 10: 2281.
- [4] Nestler EJ, Lüscher C. The molecular basis of drug addiction: linking epigenetic to synaptic and circuit mechanisms. *Neuron* 2019; 102(1): 48-59.

- [5] 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. *Molecular Neurobiology* 2017; 54(3): 1710-24.
- [6] 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-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2019; 392(11): 1383-91.
- [7] Eidson LN, Inoue K, Young LJ, Tansey MG, Murphy AZ. Toll-like receptor 4 mediates morphine-induced neuroinflammation and tolerance via soluble tumor necrosis factor signaling. *Neuropsychopharmacology* 2017; 42(3): 661.
- [8] Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* 2016; 8: 33-42.
- [9] Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016.
- [10] Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16(2): 3350-76.
- [11] de Oliveira MR, Nabavi SF, Daglia M, Rastrelli L, Nabavi SM. Epigallocatechin gallate and mitochondria—a story of life and death. *Pharmacological research* 2016; 104: 70-85.
- [12] Chowdhury A, Sarkar J, Chakraborti T, Pramanik PK, Chakraborti S. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: a perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 78: 50-9.
- [13] Mozafari N, Moghadam-Ahmadi A, Shamsizadeh A, Fatemi I, Allahtavakoli M, Kaeidi A. The effect of ampakine Farampator (CX691) on working memory in a rat model of Alzheimer's disease induced by Amyloid beta 1-42. *Iranian Journal of Physiology and Pharmacology* 2018; 2(2): 107-0.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72(1-2): 248-54.
- [15] Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015; 2015.
- [16] Motaghinejad M, Karimian M, Motaghinejad O, Shabab B, Yazdani I, Fatima S. Protective effects of various dosage of Curcumin against morphine induced

- apoptosis and oxidative stress in rat isolated hippocampus. *Pharmacological Reports* 2015; 67(2): 230-5.
- [17] Renno WM, Benov L, Khan KM. Possible role of antioxidative capacity of (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment in morphological and neurobehavioral recovery after sciatic nerve crush injury. *Journal of Neurosurgery: Spine* 2017; 27(5): 593-613.
- [18] Ding J, Fu G, Zhao Y, Cheng Z, Chen Y, Zhao B, et al. EGCG ameliorates the suppression of long-term potentiation induced by ischemia at the Schaffer collateral-CA1 synapse in the rat. *Cellular and molecular neurobiology* 2012; 32(2): 267-77.
- [19] He Y, Tan D, Bai B, Wu Z, Ji S. Epigallocatechin-3-gallate attenuates acrylamide-induced apoptosis and astrogliosis in rat cerebral cortex. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2017; 27(4): 298-306.
- [20] Yu N-H, Pei H, Huang Y-P, Li Y-F. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate inhibits arsenic-induced inflammation and apoptosis through suppression of oxidative stress in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2017; 41(5): 1788-800.
- [21] Mi Y, Qi G, Fan R, Qiao Q, Sun Y, Gao Y, et al. EGCG ameliorates high-fat-and high-fructose-induced cognitive defects by regulating the IRS/AKT and ERK/CREB/BDNF signaling pathways in the CNS. *The FASEB Journal* 2017; 31(11): 4998-5011.

## The Effect of Epigallocatechin gallate on Morphine Induced Working Memory Defects in Rats: An Experimental Study

S. Saffar<sup>1</sup>, I. Fatemi<sup>2</sup>, M. R. Rahmani<sup>3</sup>, J. Hassanshahi<sup>4</sup>, M. Pak-Hashemi<sup>5</sup>, A. Kaeidi<sup>6</sup>

Received: 10/11/2019 Sent for Revision: 15/12/2019 Received Revised Manuscript: 05/02/2020 Accepted: 08/02/2020

**Background and Objectives:** Chronic morphine use leads to structural changes in the brain. Some studies have shown the antioxidant and neuroprotective effects of Epigallocatechin gallate (EGCG) as a main polyphenol of green tea. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of EGCG on working memory in morphine-treated rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 32 male Wistar rats were divided into 4 experimental groups (8 rats in each group): 1- control; 2- Morphine group (the animals received 40 mg/kg morphine for 4 weeks, once a day, s.c.); 3 and 4- Morphine + EGCG, the animals received morphine (40 mg/kg, 4 weeks, once a day, s.c.) and EGCG (5 and 50 mg/kg, once a day, i.p.). To evaluate the working memory, Y-maze spontaneous alternation was used. To measure the level of TNF- $\alpha$  protein expression in brain hippocampus tissue, the western blot test was used. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test was used for data analysis.

**Results:** Intraperitoneal morphine injection resulted in working memory deficits and increased TNF- $\alpha$  protein expression levels compared to the control group ( $p < 0.001$ ). Moreover, intraperitoneal injection of 50 mg/kg EGCG in morphine treated rats significantly improved working memory ( $p < 0.01$ ) and decreased TNF- $\alpha$  protein expression level ( $p < 0.05$ ) compared to solely morphine treated group.

**Conclusion:** EGCG improved morphine induced working memory deficits in rats.

**Key words:** Morphine, EGCG, Working memory, Rat

**Funding:** This research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences approved the study (IR.RUMS.REC.1396.210).

**How to cite this article:** Saffar S, Fatemi I, Rahmani M R, Hassanshahi J, Pak-Hashemi M, Kaeidi A. The Effect of Epigallocatechin gallate on Morphine Induced Working Memory Defects in Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 19 (2): 115-24. [Farsi]

1- MSc Student of Physiology, Physiology-Pharmacology Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, ORCID:321x-6912-0001-0000

2- Assistant Prof. of Pharmacology, Research Center of Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0002-9666-9651

3- Research Assistant Prof. of Physiology, Physiology-Pharmacology Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, ORCID: 0000-0001-7395-5770

4- Assistant Prof. of Physiology, Dept. of Physiology and Pharmacology, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, ORCID: 0000-0003-3754-8152

5- MSc Student of Physiology, Dept. of Physiology and Pharmacology, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, ORCID:0000-0002-1645-6980

6- Assistant Prof. of Physiology, Dept. of Physiology and Pharmacology, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, ORCID: 0000-0002-3292-2603

(Corresponding Author) Tel: (034) 31315074, Fax: (034) 31315003, E-mail: a.kaeidi@gmail.com