



Research Article

The Role of Gender on Memory in Cholestatic rats Gender, Memory and Cholestasis

Masoumeh Fani ¹ , Mahsa Poureidi ² , Zinat Heydarnia Kalati ³ , Seyed-Hosein Abtahi-Evary ⁴ , Maryam Moghimian ^{5,*} 

¹ Instructor, Department of anatomy, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

² Master of Cellular and Molecular Sciences, Department of Physiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

³ Master of Medical Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

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

* **Corresponding author:** Maryam Moghimian, Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran. E-mail: moghimian.m@gmu.ac.ir

DOI: [10.52547/nkums.13.1.100](https://doi.org/10.52547/nkums.13.1.100)

How to Cite this Article:

Fani M, Poureidi M, Heydarnia Kalati Z, Abtahi-Evary SH, Moghimian M. The Role of Gender on Memory in Cholestatic rats Gender, Memory and Cholestasis. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2021;**13**(1):101-109. DOI: 10.29252/nkjms-130113

Received: 29 Sep 2020

Accepted: 10 Jan 2021

Keywords:

Gonads
Memory
Cholestasis

Abstract

Introduction: This study was performed to investigate the effect of cholestasis on memory and the role of sex difference in this effect.

Methods: This experimental study performed at Gonabad University of Medical Sciences, male rats were divided into 4 groups of 8 (sham and 3 cholestatic groups) to investigate the effect of cholestasis (7, 14 and 21 days) on lateral memory. To evaluate the effect of sex difference on the memory of cholestatic mice, rats were divided into 6 groups of 8 (male and female sham, male and female gonadectomy, male and female cholestatic-gonadectomy). In the gonadectomy groups, the testicles and ovaries were surgically removed, in the cholestatic groups, the bile duct was closed, and in the sham groups, only surgical stress was received. A shuttle box was used to evaluate the passive avoidance memory. Data were evaluated by PRISM software and ANOVA test.

Results: In the study of memory in male cholestatic groups during days 7, 14 and 21, after cholestasis, the mean latency of dark room entry in all three groups were significantly reduced ($P < 0.05$) compared to the sham group. Also, in the male gonadectomy group, the mean delay time in entering the dark room compared to the sham group showed a significant decrease ($P < 0.05$). In male and female cholestatic-gonadectomy groups, this time was significantly reduced compared to male and female sham groups as well as male and female cholestatic ($P < 0.05$, $P < 0.001$).

Conclusions: Based on these findings, it can be concluded that due to the sex difference in the effect of cholestasis on memory and learning, sex hormones may have some protective effect on memory impairment due to cholestasis.



نقش جنسیت بر حافظه در موش‌های کلاستایک، جنسیت، حافظه و کلاستاز

معصومه فانی^۱، مهسا پورعیدی^۲، زینت حیدرنیا کلاتی^۳، دکتر سید حسین ابطحی ایوری^۴، دکتر مریم مقیمیان^{۵*}

^۱ مربی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
^۲ کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
^۳ کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
^۴ دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
^۵ دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
 * نویسنده مسئول: دکتر مریم مقیمیان، دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

ایمیل: moghimian.m@gmu.ac.ir

DOI: 10.52547/nkums.13.1.100

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۸	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱	مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی تأثیر هورمون‌های جنسی در همزمانی با کلاستاز بر روی حافظه می‌باشد.
واژگان کلیدی:	روش کار: در این مطالعه تجربی که در دانشگاه علوم پزشکی گناباد انجام شد، ابتدا برای بررسی اثر دوره زمانی کلاستاز (۱۴، ۷ و ۲۱ روز) بر حافظه جانبی، موش‌های صحرایی نر در ۴ گروه ۸ تایی (شم و ۳ گروه کلاستایک) قرار گرفتند و جهت بررسی اثر تفاوت جنسی بر حافظه موش‌های کلاستایک، موش‌های صحرایی در ۶ گروه ۸ تایی (شم نر و ماده، گنادکتومی نر و ماده، کلاستایک-گنادکتومی نر و ماده) قرار داده شدند. در گروه‌های گنادکتومی، تحت عمل جراحی بیضه‌ها و تخمدان‌ها حذف شد، در گروه‌های کلاستایک مجرای صفراوی بسته شد و گروه‌های فقط استرس جراحی را دریافت کردند. جهت ارزیابی حافظه احترازی غیرفعال از دستگاه شاتل باکس استفاده شد. داده‌ها توسط نرم افزار PRISM و آزمون ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.
گناداها	یافته‌ها: در بررسی حافظه در گروه‌های کلاستایک نر طی روزهای ۱۴، ۷ و ۲۱، پس از انجام کلاستاز میانگین زمان تأخیر ورود به اتاق تاریک در هر سه گروه نسبت به گروه‌های نر به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش داشت. همچنین در گروه نر گنادکتومی شده، میانگین زمان تأخیر ورود به اتاق تاریک نسبت به گروه‌های نر به طور معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). در گروه‌های نر و ماده گنادکتومی _کلاستایک، این مدت زمان به ترتیب در مقایسه با گروه‌های نر و ماده و همچنین کلاستایک نر و ماده به طور معنی داری کاهش داشت ($P < 0.05$, $P < 0.001$).
حافظه	نتیجه گیری: بر اساس این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به وجود تفاوت جنسی در میزان تأثیر کلاستاز بر حافظه و یادگیری احتمالاً هورمون‌های جنسی تا حدی می‌توانند دارای اثر محافظتی بر اختلال حافظه ناشی از کلاستاز باشند.
کلاستاز	

مقدمه

باشد (۳). علائم بالینی این بیماری شامل زردی، خارش، خستگی، برادی کاردی، تغییر در عملکرد تنفس و نارسایی کلیوی است، همچنین موجب افزایش پروستاگلاندین ها، کلاسترول، بیلی روبین، آلکالین فسفاتاز و بالا رفتن سطح نمک‌های صفراوی در خون نیز شده که به دنبال آن می‌تواند بر بسیاری از سیستم‌های بدن از جمله قلب و عروق، کلیه و سیستم ایمنی نیز تأثیر گذارد (۳-۵). بر اثر کلاستاز، میزان اندوتوکسین ها نیز در خون افزایش می‌یابد، این ترکیبات سمی بوده و توانایی عبور از سد خونی- مغزی را دارا می باشند. این مواد توسط باکتری‌های گرم منفی روده تولید و به کمک صفرا به ترکیباتی بی ضرر تبدیل می‌شوند ولی به موجب کلاستاز و عدم ورود صفرا به روده مقدار این ترکیبات در خون افزایش می‌یابد (۶). مطالعات بسیاری افزایش بیش از حد تولید نیتریک اکساید طی کلاستاز

کلاستاز یا همان اختلال در دفع صفرا نوعی بیماری کبدی است که می تواند به علت اختلال در تولید صفرا توسط هپاتوسیت ها و سلول‌های مجاری و یا به علت انسداد مجاری صفراوی و جریان ناقص صفرا ایجاد شود (۱). اثرات اولیه کلاستاز شامل افزایش غلظت صفرا در سرم و کاهش ترشح صفرا به داخل روده می‌باشد که می‌تواند منجر به بیماری سیستمیک شده و در نهایت پیشرفت بیماری منجر به فیبروز کبدی، سیروز کبدی، انسفالوپاتی کبدی و آدم مغزی گردد (۲). بروز این بیماری محدود به رده سنی خاصی نیست و رخداد آن در تمام رده‌های سنی مشاهده می‌شود، با این وجود نوزادان به علت عدم بلوغ کامل کبد بیشتر در معرض کلاستازیس می‌باشند. همچنین میزان بروز این بیماری در هر دو جنس یکسان است ولی از آن جا که بارداری خود از عوامل خطر ابتلا به این بیماری است شیوع آن در زنان بیشتر از مردان می

دانشگاه علوم پزشکی گناباد تکثیر و نگهداری شدند. رت‌ها آزادانه به آب و غذا کافی دسترسی داشتند و در دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته، در قفس‌های مخصوص به صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری می‌شدند. پروتکل این مطالعه مطابق با دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گناباد با کد اخلاق ۱/۴۳۲/پ انجام شد.

نمونه‌های استفاده شده در هر گروه به صورت تصادفی انتخاب می‌شدند و آزمایش‌ها طی مرحله نوری در ساعت‌های ۸ تا ۱۴ انجام گرفت، همچنین از هر حیوان تنها یک بار استفاده شد. جهت انجام تمام آزمایشات رت‌ها به صورت تصادفی به گروه‌های ۸ تایی تقسیم شدند.

جراحی کلاستاتیک ((BDL: bile duct ligation

جهت القای کلاستاز و بستن مجاری صفراوی حیوانات بعد از بیهوشی ناشی از تزریق داخل صفاقی کتامین / زایلازین (به ترتیب ۵۰ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفتند که طی این عمل ناحیه شکمی حذفاصل رأس زائده خنجر استرونوم تا ۳ سانتی متر پایین‌تر ابتدا با الککل ضد عفونی و سپس موهای این بخش با تیغ زده شد، پوست و عضله طی دو مرحله برش خورد. پس از آن با کمک پنس مجرای صفراوی مشترک از زیر کبد خارج و بعد از جداسازی عروق دو طرف مجرا با نخ سیلک بسته و بین دو گره توسط قیچی بریده و مجرا قطع گردید. دو روز بعد از انجام جراحی، خون‌گیری از رت‌ها و جداسازی سرم جهت سنجش کراتین انجام شد و نشانه‌های کلاستاز (زرد شدن گوش‌ها و ادرار تیره) نیز به عنوان شاخصی جهت ایجاد کلاستاز در نظر گرفته شد (۲۲).

جراحی گنادکتومی (GDX: gonadectomy)

به جهت حذف هورمون‌های جنسی از روش گنادکتومی استفاده شد. در ابتدا موش‌ها تحت بیهوشی با کتامین / زایلازین (به ترتیب ۵۰ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت تزریق داخل صفاقی قرار گرفتند. سپس در موش‌های ماده برش کوچکی در پوست و عضله در ناحیه بین واژن و تخمدان‌ها ایجاد شد. بعد از مشاهده لوله‌های رحمی ناحیه اتصال لوله‌های رحمی و تخمدان‌ها با نخ جراحی بصورت محکم بسته و سپس تخمدان‌ها از بافت‌های مجاور جدا گردید. در موش‌های نر نیز در قسمت شکمی یک سانتیمتر بالاتر از آلت تناسلی برشی افقی زده و سپس بیضه‌ها از محل موردنظر خارج گشت و محل جراحی با نخ بخیه دوخته شد (۲۳).

آزمون یادگیری احترازی غیرفعال

دستگاه یادگیری اجتنابی مهارتی (غیرفعال)، مدل Step-Through از جعبه‌ای تشکیل شده که به وسیله دیواره‌ای به دو قسمت سیاه و سفید با اندازه یکسان (با ابعاد ۲۰، ۲۰، ۳۰ سانتی متر) تقسیم می‌شود و بین دو قسمت درب کشویی به ابعاد ۹*۷ سانتی متر تعبیه شده است. در این دستگاه بخش سیاه رنگ در قسمت کف دارای میله‌های فولادی با فاصله یک سانتی متر بوده و شوک الکتریکی از طریق این میله‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می‌شود.

بررسی حافظه در موش‌های صحرایی در ۲ روز متوالی انجام شد. روز اول که روز آموزش می‌باشد، ابتدا هر حیوان به آرامی در بخش روشن دستگاه قرار گرفت، پس از گذشت ۵ ثانیه درب کشویی باز شده و به

و فیروز کبدی را نشان داده‌اند و نیز گفته شده است (۳، ۴، ۷) افزایش بیش از حد اندوتوکسین‌ها در جریان خون به علت ایجاد کلاستاز و اثرگذاری آن‌ها از طریق سیتوکین‌ها موجب تولید بیش از حد نیتریک اکساید در مغز و به دنبال آن باعث کاهش سطح حافظه می‌گردد (۸، ۹).

مطالعات نشان داده است که کبد می‌تواند بر بخش‌های مختلف مغز از جمله جسم مخطط (corpus striatum) تأثیر بگذارد. جسم مخطط از جمله هسته‌های ورودی اصلی عقده‌های قاعده‌ای می‌باشد که در دریافت و یکسان سازی ورودی گلوتاماترژیک تحریکی نواحی قشری و تالاموسی مغز نقش مهمی داشته و نیز یادگیری رویه‌ای، جهت‌گیری خود محور، حافظه مرجع و یادگیری مبتنی بر قانون توسط این بخش انجام می‌شود (۱۰، ۱۱). احتمالاً ایجاد هر گونه اختلال در سلول‌های کبدی به موجب بیماری‌هایی مانند کلاستاز با تأثیر بر این هسته بسیاری از فعالیت‌های شناختی را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بروز کلاستاز و به دنبال آن افزایش بیلی روبین می‌تواند بر بسیاری از رفتارهای ادراکی تأثیر گذاشته و موجب اختلالاتی از جمله کاهش حافظه و تغییر الگوی خواب گردد (۱۲، ۱۳). تاکنون مکانیسم دقیق این نوع درگیری‌های عصبی شناخته نشده ولی ظاهراً باقی ماندن ترکیباتی که برای دفع، وابسته به جریان صفراوی می‌باشند مانند اسیدهای صفراوی و اندوتوکسین‌های داخلی در ایجاد علائم بالینی نقش داشته باشند (۱۲-۱۴).

از سوی دیگر افزایش غلظت صفرا موجب تحریک نوتروفیل‌ها و تجمع در کبد، تولید گونه‌های فعال اکسیژن، التهاب بافتی و توسعه استرس اکسیداتیو و در نهایت آپوپتوز و نکروز سلول‌های کبدی می‌شود، که برخی از این تغییرات بر فیزیولوژی هورمون‌های جنسی تأثیرگذار می‌باشد (۱۵).

در چندین مطالعه گزارش شده است که هورمون‌های جنسی در یادگیری و حافظه دخالت دارند و کمبود یا عدم این هورمون‌ها می‌تواند اثرات مهمی بر هیپوکمپ که نقش بسزایی در حافظه و یادگیری دارد بگذارد (۱۶، ۱۷). و نیز طی مطالعات قبلی مشخص شده است که مناطق مختلفی در CNS وجود دارد که دارای گیرنده‌های استروژن و پروژسترون است که از آن جمله می‌توان مخچه، هیپوکمپ، هیپوتالاموس، هسته‌های قاعده مغز جلویی و قشر مغز اشاره کرد (۱۸، ۱۹). همچنین مشخص شده است که تستوسترون با تأثیر بر خارهای دندریتیک و تراکم سیناپس در سلول‌های هرمی هیپوکمپ در بهبود حافظه و یادگیری نقش بسزایی دارد (۲۰). بر این اساس این هورمون‌ها علاوه بر اثراتی که بر سیستم تولید مثل دارند بر اعمال دستگاه عصبی مرکزی نیز تأثیرگذار می‌باشند.

پس با توجه به اینکه یکی از تغییرات کلاستاز اثر آن بر روی حافظه است (۵) و از طرفی چندین مطالعه نشان داده است که گنادکتومی موجب کاهش یادگیری و حافظه می‌شود (۱۷، ۲۱)، هدف از این مطالعه این است که آیا تفاوت در جنسیت و گنادکتومی به دنبال کلاستاز موجب اختلال در حافظه و یادگیری می‌شود.

روش کار

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر و ماده نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در خانه حیوانات

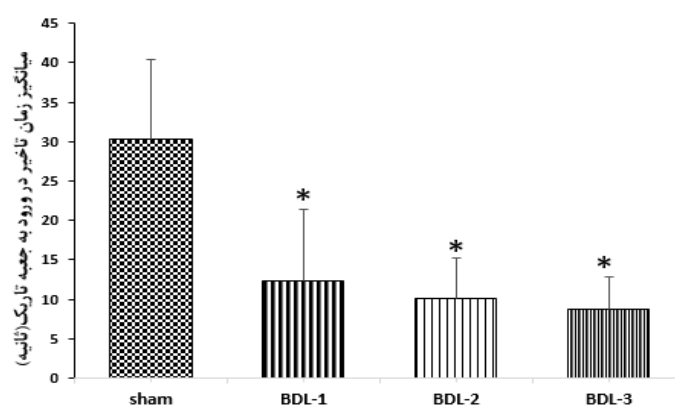
در گروه‌های کلاستاتیک با انجام عمل جراحی صرفاً جهت دریافت استرس انجام شد. در گروه‌های گنادکتومی - کلاستاتیک ابتدا عمل گنادکتومی جهت حذف گناد (تخمدان/ بیضه) انجام گرفت و پس از گذشت ۴ هفته جهت بهبودی حیوانات، عمل کلاستاز برای بستن مجاری صفراوی انجام شد، در نهایت با توجه به نتایج آزمایش تأثیر دوره زمانی کلاستاز بر حافظه اجتنابی غیر فعال، تست حافظه پس از ۷ روز با استفاده از دستگاه شاتل باکس صورت گرفت.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار آماری PRISM انجام شد. برای مقایسه گروه‌ها از آزمون ANOVA جهت تعیین سطوح تفاوت معنی داری بین گروه‌ها استفاده شد و جهت مقایسه بین گروه‌ها از آزمون متعاقب توکی (Post hoc tukey test) استفاده گردید. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده است و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأثیر دوره زمان کلاستاز (BDL بر یادگیری و حافظه) نتایج حاصل از مقایسه دوره‌ی زمانی کلاستاز بر حافظه در گروه‌های مختلف نشان داد که میانگین زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک در گروه‌های BDL1، BDL2 و BDL3 نسبت به گروه sham دارای کاهش معنی داری بود ($P < 0.05$)، به عبارتی اختلال حافظه در ۱۴، ۷ و ۲۱ روز بعد از عمل کلاستاز صورت گرفته است. از آنجایی که در مقایسه بین گروهی مشاهده شد که طول دوره‌ی زمانی طی شده بعد از کلاستاز هیچ اثر معنی داری بر میانگین زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک ندارد در آزمایش دوم تست ارزیابی حافظه، ۷ روز بعد از کلاستاز در نظر گرفته شد (شکل ۱).



نمودار ۱. مقایسه تأثیر دوره‌ی زمانی کلاستاز بر میانگین زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک. گروه sham: جراحی شده بدون بستن مجاری صفراوی، گروه BDL1: بررسی حافظه اجتنابی غیر فعال پس از گذشت ۷ روز از جراحی کلاستاتیک، گروه BDL2: بررسی حافظه اجتنابی غیر فعال پس از گذشت ۱۴ روز از جراحی کلاستاتیک، گروه BDL3: بررسی حافظه اجتنابی غیر فعال پس از گذشت ۲۱ روز از جراحی کلاستاتیک. در هر گروه، هر ستون نمودار نشان دهنده مقادیر میانگین $\pm$ انحراف زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک حاصل از سنجش ۸ موش صحرایی مجزا می‌باشد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری آماری در نظر گرفته شده است. * نشان دهنده میزان $P < 0.05$ در مقایسه با گروه sham می‌باشد. (BDL: bile duct ligation)

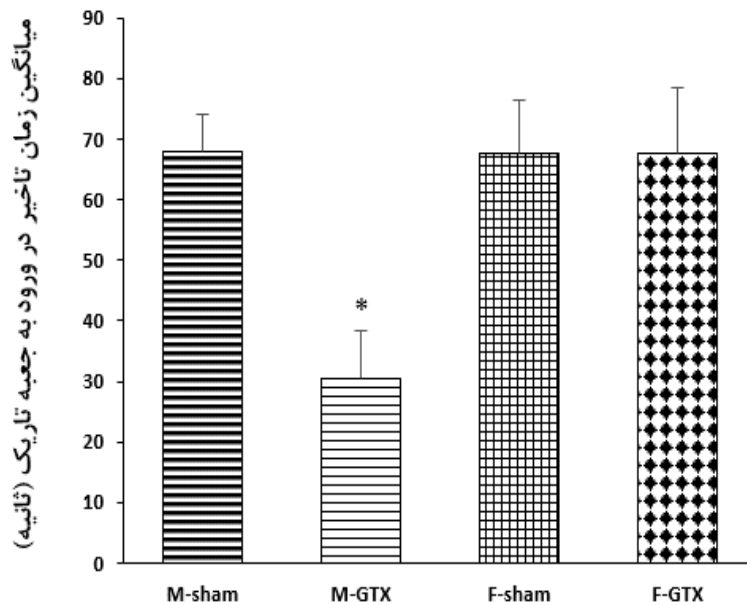
حیوان اجازه داده شد که وارد قسمت سیاه دستگاه شود. بلافاصله بعد از ورود حیوان به خانه سیاه، درب کشویی بسته و حیوان از دستگاه خارج شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه این حیوان دوباره به بخش سفید دستگاه انتقال یافت و پس از گذشت ۵ ثانیه درب کشویی باز شد تا حیوان وارد بخش تاریک گردد. با ورود حیوان به بخش تاریک و بسته شدن درب کشویی، حیوان تحریک الکتریکی را با شدت ۱ میلی آمپر به مدت ۳ ثانیه دریافت کرد. آزمون به خاطر آوری ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش انجام شد. بیشترین مقدار تأخیر برای ورود به بخش تاریک که به عنوان حافظه کامل شناخته می‌شود ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد (۲۴).

آزمایش‌ها

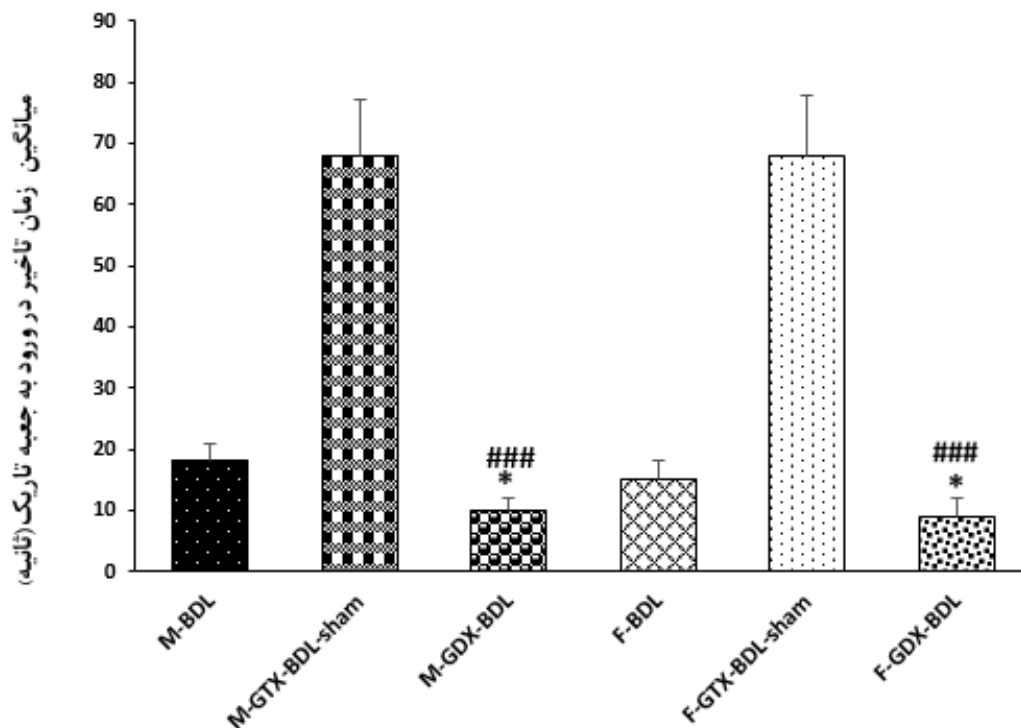
آزمایش اول: تأثیر دوره زمانی کلاستاز بر حافظه اجتنابی غیر فعال: جهت بررسی تأثیر مدت زمان کلاستاز بر حافظه، رت‌ها به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی به صورت زیر تقسیم شدند، و در نهایت پس از مدت زمان مشخص حافظه آن‌ها توسط تست شاتل باکس مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱. شم (جراحی شده بدون بستن مجاری صفراوی): بررسی حافظه ۷ روز بعد از بستن مجاری صفراوی، ۲. کلاستاتیک ۱ (BDL1): بررسی حافظه ۷ روز بعد از بستن مجاری صفراوی، ۳. کلاستاتیک ۲ (BDL2): بررسی حافظه ۱۴ روز بعد از بستن مجاری صفراوی، ۴. کلاستاتیک ۳ (BDL3): بررسی حافظه ۲۱ روز بعد از بستن مجاری صفراوی، انجام شد.

آزمایش دوم: تأثیر جنسیت از طریق گنادکتومی در موش‌های کلاستاز شده بر حافظه اجتنابی: در این آزمایش نیز حیوانات در ۶ گروه ۸ تایی به صورت زیر تقسیم بندی شدند: ۱. شم نر، ۲. شم ماده، ۳. کلاستاتیک نر (M-BDL)، کلاستاتیک ماده ((F-BDL)، ۵. گنادکتومی - کلاستاتیک نر (M-GDX-BDL)، ۶. گنادکتومی - کلاستاتیک ماده (F-GDX-BDL).



نمودار ۲. مقایسه تأثیر حذف هورمون‌های جنسی بر میانگین زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک در رت‌های نر و ماده. گروه M-sham: گروه نر جراحی شده بدون حذف بیضه، گروه M-GDX: گروه نر گنادکتومی شده، گروه F-sham: گروه ماده جراحی شده بدون حذف تخمدان، گروه F-GDX: گروه ماده گنادکتومی شده. در هر گروه، هر ستون نمودار نشان دهنده مقادیر میانگین $\pm$ انحراف معیار زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک حاصل از سنجش ۸ موش صحرایی می‌باشد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری آماری در نظر گرفته شده است. * نشان دهنده میزان $P < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه M-sham می‌باشد. (GDX: gonadectomy)



نمودار ۳. مقایسه تأثیر جنسیت و حذف هورمون‌های جنسی از طریق گنادکتومی در موش‌های کلاستاز شده بر میانگین زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک. گروه M-BDL: گروه نر کلاستاتیک، گروه M-GDX-BDL-sham: گروه نر جراحی شده بدون، حذف بیضه و بستن مجرای صفراوی. گروه M-GDX-BDL: گروه نر گنادکتومی - کلاستاتیک، گروه F-BDL: گروه ماده کلاستاتیک، گروه F-GDX-BDL-sham: گروه ماده جراحی شده بدون، حذف تخمدان و بستن مجرای صفراوی. گروه F-GDX-BDL: گروه ماده گنادکتومی - کلاستاتیک. در هر گروه، هر ستون نمودار نشان دهنده مقادیر میانگین $\pm$ انحراف معیار زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک حاصل از سنجش ۸ موش صحرایی می‌باشد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری آماری در نظر گرفته شده است. * نشان دهنده میزان $P < ۰/۰۵$ در مقایسه بین گروه کلاستیک با گروه گنادکتومی - کلاستاتیک هم جنس می‌باشد، ### نشان دهنده $P < ۰/۰۰۱$ بین گروه گنادکتومی - کلاستاتیک با گروه‌های هم جنس می‌باشد. (GDX: gonadectomy, BDL: bile duct ligation)

تأثیر جنسیت و حذف هورمون‌های جنسی از طریق گنادکتومی (GDX: gonadectomy) در موش‌های کلستانز شده بر حافظه اجتنابی

نتایج حاصل از مقایسه جنسیت و حذف هورمون‌های جنسی بر حافظه اجتنابی نشان داد که گنادکتومی موش‌های نر (M-GDX) منجر به کاهش زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک می‌شود و این کاهش زمان نسبت به گروه‌شم معنی دار بود ($P < 0.05$), به عبارتی در موش‌های نر گنادکتومی شده فرایند حافظه و یادگیری دچار اختلال شده است، در حالی که گنادکتومی رت‌های ماده (F-GDX) مدت زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه‌شم اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۲).

نتایج حاصل از حذف هورمون‌های جنسی بر حافظه اجتنابی در مدل کلستانز شده نشان داد که حافظه در موش‌های گنادکتومی نر که تحت جراحی کلاستاتیک نیز قرار گرفته بودند، منجر به کاهش معنی داری در زمان تأخیر ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه‌شم و گروه کلاستاتیک هم جنس شد ($P < 0.05$ $P < 0.001$). همچنین در موش‌های گنادکتومی ماده که آن‌ها نیز جراحی کلاستاتیک شدند، میانگین مدت زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه‌شم و کلاستاتیک ماده کاهش معنی داری داشت ($P < 0.001$, $P < 0.05$).

بحث

در مورد تفاوت در جنسیت و نقش هورمون‌های جنسی و نیز اثر کلستانز بر حافظه، هر کدام به صورت مجزا گزارش‌های بسیاری ارائه شده است اما در مورد اثر همزمان نقش جنسیت و کلستانز بر حافظه طبق دانش ما، مطالعاتی صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه به بررسی اثر گنادکتومی و کلستانز، بر حافظه موش‌های صحرایی به صورت مجزا و همچنین ترکیبی پرداخته شد، که نتایج حاصل در دو محور اصلی به ترتیب مورد بحث قرار می‌گیرد.

اثر کلستانز بر حافظه

در مطالعه حاضر، اثر بستن مجاری صفراوی بر روند حافظه موش‌های نر در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از عمل کلستانز بررسی شد، که نتایج نشان داد بستن مجاری صفراوی در هر سه گروه منجر به کاهش زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه‌شم می‌شود، که نتایج حاصل مطابق با مطالعه Zarrindast و همکاران بود (۱۳).

مطالعات نشان داده‌اند که جهت حفظ عملکرد طبیعی مغز، تعامل بین سلول‌های مغز و کبد دارای اهمیت بسیاری می‌باشد (۱۱، ۲۵). با توجه به اینکه سلول‌های کبدی نقش مهمی در دفع مواد نوروتوکسین دارند، هر گونه آسیب به این سلول‌ها می‌تواند تأثیرات منفی بر بخش‌های مختلف مغز داشته باشد (۲۶). یکی از این نواحی که متعاقب آسیب سلول‌های کبدی، دچار اختلال می‌شود جسم مخطط (corpus striatum) است، که این بخش از مغز کنترل شدیدی بر عملکرد سایر هسته‌های قاعده‌ای دارد و نیز بسیاری از فعالیت‌های شناختی، یادگیری رویه‌ای، حافظه مرجع و یادگیری مبتنی بر قانون توسط این بخش از مغز انجام می‌شود (۱۰). هیپوکمپ نیز جز اولین بخش‌هایی از مغز می‌باشد که در بیماری‌هایی نظیر آلزایمر، ایسکمی، صرع و سکتة مغزی دچار آسیب می‌گردد (۲۷). هیپوکمپ قسمتی از مغز است که نقش اصلی در عملکرد حافظه ایفا می‌کند، و پس از مرگ نورون‌هایش، توانایی تکثیر مجدد را دارد، اما تحقیقات نشان داده است که افزایش میزان توکسین‌ها می‌تواند منجر به التهاب نورون‌ها و کاهش نورونز شده، و از طریق دژنره شدن نورون‌ها و مهار نوروپروژنی‌تور هیپوکامپ، منجر به تغییرات بافتی هیپوکامپ گردد (۲۸، ۲۹). همچنین گزارش شده است که افزایش توکسین‌ها موجب تولید سائتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF α در کبد می‌شود، که این سائتوکین‌ها در شرایط طبیعی بدن نقش مهمی در شکل‌گیری سیناپس، نورون زایی و تثبیت حافظه دارند (۳۰).

در مطالعه‌ای که اثر آسیب کبدی را بر اختلال حافظه فضایی با استفاده از تست ماز آبی موریس بررسی کرده بود و نیز مطالعه دیگری که به بررسی اثر کلستانز بر حافظه طولانی مدت موش‌های صحرایی پرداخته بود، نتایج منطبق بر یافته‌های مطالعه حاضر است (۵، ۳۱). همچنین تحقیقات اسلیمی اصفهانی و همکاران نشان داده است که کلستانز با ایجاد آسیب بافتی بر هیپوکمپ منجر به التهاب مغز و اختلال حافظه می‌شود (۳۲).

نشان داده شده است، کلستانز با افزایش آندوتوکسین‌ها مرتبط است و آندوتوکسین‌ها نیز منجر به آسیب با شدت‌های متفاوت در مغز می‌شوند بطوریکه موجب تغییر تحریک پذیری نورون‌ها در نواحی هیپوکمپ شده و لذا موجب بروز اختلالات حافظه و حرکتی می‌گردد (۳۳). لذا این احتمال وجود دارد که اختلال در حافظه ناشی از افزایش آندوتوکسین‌ها به دنبال کلستانز باشد.

همچنین اشاره شده است که در بیماری‌های کبد مقدار آمونیاک افزایش می‌یابد که به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل ایجاد کننده تغییرات عصبی شناخته شده است. آستروسیت‌ها نیز برای مقابله با اثرات نامطلوب آمونیاک، آن را به گلوتامین تبدیل می‌کنند، که به دنبال این افزایش، فشار اسمزی و حجم مایع میان بافتی مغز نیز افزایش می‌یابد (۳۰). افزایش میزان آمونیاک از یک سمت موجب افزایش ناقلین عصبی از جمله گلوتامات و گابا و از سمت دیگر موجب افزایش سائتوکین‌های التهابی خواهد شد، افزایش این ناقلین عصبی علاوه بر ایجاد اختلال در مسیرهای عصبی موجب تغییر در مسیرهای پیام رسانی گیرنده‌های پایین دست از جمله سائتوکین‌های التهابی نیز می‌شود (۳۴). اگر چه مکانیسم مولکولی داخل سلولی ناشی از تغییرات ناقلین عصبی هنوز به طور کامل شناخته نشده است، با این وجود تغییر در مسیر پیام رسانی گیرنده‌های N-متیل-D-آسپاراتات (NMDA) و مسیر گلوتامات - نیتریک اکساید که نقش مهمی در یادگیری و حافظه دارند می‌تواند توضیحی بر این مورد باشد. گلوتامات با اثر بر گیرنده‌های NMDA باعث افزایش ورود کلسیم به داخل سلول و فعال شدن بیش از حد مسیر پروتئین کیناز وابسته به کلسیم - کالمودولین می‌شود. این کیناز با فسفوریله کردن آنزیم نیتریک اکساید سنتاز موجب غیرفعال شدن آن و در نتیجه کاهش نیتریک اکساید، کاهش فعال شدن گوانیل سیکلاز و در نهایت کاهش میزان cGMP و نقص در یادگیری و حافظه می‌شود (۳۵، ۳۶). طبق مطالعات انجام شده سائتوکین‌ها نقش مهمی در نورون زایی و تثبیت حافظه دارند و تغییر در غلظت آن‌ها

از سمتی دیگر درمان با مقادیر بالای استرادیول منجر به اختلال در عملکرد فضایی می‌شود. با توجه به اینکه بافت های دیگری مانند کبد، غدد فوق کلیه و پستان نیز مقادیر کمی از استروژن را تولید می‌کنند (۴۶، ۴۷) احتمالاً استروژن در مقادیر پایین هم می‌تواند حافظه احترازی غیرفعال را بهبود ببخشد، که ممکن است به همین علت گنادکتومی موش‌های ماده بر حافظه تأثیر نداشته است.

در ادامه مطالعه، حذف هورمون‌های جنسی در موش‌های کلاستاز شده بررسی شد، که نتایج نشان داد در موش‌های نر که ۴ هفته پس از گنادکتومی، مجاری صفراوی آنها بسته شد، میانگین زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک نسبت به گروه‌های کلاستاتیک نر کاهش می‌یابد، در همین زمینه مطالعه‌ای که توسط nasiri و همکاران انجام شد مشخص شد که کلاستاز روی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد اثر گذاشته و موجب کاهش ترشح گنادوتروپین های LH و FSH می‌شود (۴۸). بر این اساس احتمالاً همزمانی حذف هورمون‌های جنسی نر و بستن مجاری صفراوی شدت تخریب حافظه را افزایش می‌دهد. همچنین در این مطالعه میانگین زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک برای موش‌های ماده نیز کاهش معنی داری نسبت به گروه کلاستاتیک ماده داشت. در مطالعه speroff و همکاران اعلام شد که کلاستاز باعث افزایش اویپوئیدهای آندوژن و نیتریک اکساید شده و به دنبال آن هورمون‌های محور جنسی کاهش می‌یابد (۴۹) که ممکن است این موضوع در مطالعه ما دلیل کاهش حافظه در موش‌های ماده باشد.

نتیجه گیری

بر این اساس حذف هورمون‌های جنسی در موش‌های نر باعث کاهش حافظه و یادگیری گردیده که می‌تواند نشان دهنده اثر تستوسترون بر حافظه باشد همچنین کلاستاز موجب کاهش سطح حافظه و یادگیری می‌شود که احتمالاً می‌تواند از طریق اثر بر هورمون‌های جنسی باشد. در موش‌های ماده تأثیر منفی گنادکتومی بر حافظه دیده نشد، هرچند کلاستاز موجب کاهش سطح حافظه و یادگیری شد که احتمالاً می‌تواند از طریق اثر بر اویپوئیدهای آندوژن و نیتریک اکساید باشد.

ملاحظات اخلاقی

تمامی مراحل آزمایش بر اساس پروتکل تأیید شده کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گناباد با کد ۱/۴۳۲/پ اجرا شد.

حامی مالی

مقاله حاضر مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی گناباد می‌باشد.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گناباد می‌باشد که از این معاونت تشکر به عمل می‌آید.

موجب اختلال فرایندهای عصبی می‌شود، پس می‌توان نتیجه گرفت افزایش میزان آمونیاک و التهاب عصبی ناشی از آن در نهایت باعث ایجاد اختلالات شناختی همچون نقص در یادگیری، حافظه و نیز اختلال در هماهنگی‌های حرکتی می‌شود (۵، ۳۴).

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اویپوئیدها در پاتوفیزیولوژی و تظاهرات کلاستاز نیز نقش داشته (۳۷) و با توجه به اینکه سطوح اویپوئیدی در موش‌های کلاستاتیک افزایش می‌یابد (۳۸)، احتمالاً مواد اویپوئیدی آندوژنیک ناشی از کلاستاز بر روند حافظه تأثیر داشته باشد، که در مطالعه قبلی ما نیز نشان داده شده است که مورفین دارای اثرات محافظتی بر تخریب حافظه ناشی از کلاستاز است (۳۹). با این وجود مکانیسم فراموشی که توسط کلاستاز در موش (BDL: bile duct ligation) ایجاد می‌شود همچنان به طور کامل مشخص نیست.

اثر گنادکتومی و کلاستاز بر حافظه

در بخش دیگری از این مطالعه به بررسی اثر هورمون‌های جنسی بر حافظه پرداخته شد، نتایج حاصل نشان داد که گنادکتومی در موش‌های نر باعث کاهش زمان ورود به جعبه تاریک می‌شود در حالی که در موش‌های ماده تفاوتی با گروه‌شده دیده نشد، با توجه به این می‌توان نتیجه گرفت تستوسترون اثر مثبت بر روند حافظه دارد. در این راستا نتایج مطالعه Rosario جهت بررسی اثر هورمون تستوسترون بر بیماری آلزایمر نشان داد کاهش و یا حذف تستوسترون، منجر به اختلالات حافظه و افزایش بیماری‌های نورودژنراتیو و صدمات مغزی نظیر بیماری آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون می‌شود (۴۰).

از سوی دیگر مطالعات بسیاری نقش استروژن را بر حافظه و یادگیری بررسی کرده‌اند که نتایج متناقضی در این زمینه وجود دارد از جمله در مطالعه‌ای گزارش شده است که مقادیر بالای استرادیول، حافظه مرجع، یادگیری پاسخ به محرک و نیز شرطی شدن اشتهاپی وابسته به آمیگدال را مهار می‌کند در حالی که بر حافظه کارکردی اثر کمتری دارد (۴۱). در مطالعه‌ای دیگر که به بررسی نقش استروژن در بالابردن حافظه در موش‌های نر پرداخت بود نشان دهنده افزایش خراهای دندریتی و به دنبال آن بهبود حافظه بود (۴۲). همچنین در مطالعه‌ای که جهت بررسی تحریک پذیری هیپوکمپ در فازهای مختلف سیکل استروس موش‌ها انجام شد نتایج نشان داد پاسخ نوروهای CA1 و تحریک پذیری هیپوکمپ طی مدت سیکل جنسی تغییر می‌کند به این صورت که حداکثر پاسخ تحریکی مربوط به فازهای پرواستروس و استروس است که مقدار استروژن در بالاترین میزان می‌باشد (۴۳)، در حالی که در مطالعه‌ای که توسط fugger و همکاران صورت گرفت نتایج نشان داد استروژن درمانی یادگیری فضایی در ماز آبی موریس و حافظه احترازی را دچار اختلال می‌کند (۴۴). همچنین گزارش شده است که در فصل تولید مثل (استرادیول بالا) موش‌های صحرایی ماده در مقایسه با موش‌های نر در ماز آبی موریس اجرای ضعیف‌تری داشته‌اند (۴۵).

همچنین برخی مطالعات نشان داده‌اند که درمان با استرادیول در مقادیر محدوده فیزیولوژیک هیچ تأثیری بر عملکرد حافظه و یادگیری ندارد و

References

1. Fawaz R, Baumann U, Ekong U, Fischler B, Hadzic N, Mack CL, et al. Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the North American Society

for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*

- 2017;**64**(1):154-168. doi: 10.1097/MPG.0000000000001334 pmid: 27429428
2. Moezi L, Rezayat M, Samini M, Shafaroodi H, Mehr SE, Ebrahimkhani MR, et al. Potentiation of anandamide effects in mesenteric beds isolated from bile duct-ligated rats: role of nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 2004;**486**(1):53-59. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.12.004 pmid: 14751408
3. Gupta K, Wang H, Amin SB. Parenteral Nutrition-Associated Cholestasis in Premature Infants: Role of Macronutrients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2016;**40**(3):335-341. doi: 10.1177/0148607114555161 pmid: 25316680
4. Anstee QM, Seth D, Day CP. Genetic Factors That Affect Risk of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2016;**150**(8):1728-1744 e1727. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.037 pmid: 26873399
5. Hosseini N, Alaei H, Zarrindast MR, Nasehi M, Radahmadi M. Cholestasis progression effects on long-term memory in bile duct ligation rats. *Adv Biomed Res.* 2014;**3**:215. doi: 10.4103/2277-9175.143263 pmid: 25371872
6. Moezi L, Shafaroodi H, Sarkar S, Emami-Razavi SH, Sanatkar M, Mirazi N, et al. Involvement of nitrergic and opioidergic systems in the hypothermia induced by cholestasis in rats. *Pathophysiology.* 2006;**13**(4):227-232. doi: 10.1016/j.pathophys.2006.08.001 pmid: 16963238
7. Mani AR, Nahavandi A, Mani AH, Dehpour AR. Role of nitric oxide in hypodipsia of rats with obstructive cholestasis. *J Pharm Pharmacol.* 2001;**53**(2):277-281. doi: 10.1211/0022357011775325 pmid: 11273028
8. Ding S, Liu L, Jing H, Xie J, Wang X, Mao J, et al. Dopamine from cirrhotic liver contributes to the impaired learning and memory ability of hippocampus in minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 2013;**57**(3):923-936. doi: 10.1007/s12072-013-9431-6 pmid: 26201931
9. Gorg B, Schliess F, Haussinger D. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys.* 2013;**536**(2):158-163. doi: 10.1016/j.abb.2013.03.010 pmid: 23567841
10. Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM, Ferguson SM. The ins and outs of the striatum: role in drug addiction. *Neuroscience.* 2015;**301**:529-541. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.033 pmid: 26116518
11. Hashemi I, Entezari M, Zarindast MR. Investigating the gene expression level of Bad and Bcl-xl following cholestasis and curcumin treatment in the striatum area of male rat. *Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch.* 2017;**27**(4):244-251.
12. Ahmadi S, Karami Z, Mohammadian A, Khosrobakhsh F, Rostamzadeh J. Cholestasis induced antinociception and decreased gene expression of MOR1 in rat brain. *Neuroscience.* 2015;**284**:78-86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.063 pmid: 25290008
13. Nasehi M, Sabouri Khanghah V, Mirzaei Varzeghani S, Zarrindast MR. Involvement of nitric oxide system on anxiolytic-like behaviors induced by cholestasis. *Basic Clin Neurosci.* 2012;**3**(5):19-29.
14. Bergasa NV, Rothman RB, Vergalla J. Central mu-opioid receptors are down-regulated in a rat model of cholestasis. *J Hepatol.* 1992;**15**(1-2):220-224. doi: 10.1016/0168-8278(92)90040-V
15. Khastar H, Kadkhodae M, Reza Sadeghipour H. Liver oxidative stress after renal ischemia-reperfusion injury is leukocyte dependent in inbred mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2011;**14**(6):534.
16. Mosleh M, Palizvan M. Effect of sumatriptan on the field potentials of the CA1 region of hippocampus in male rats. *Bihdashti Darmanii Arak.* 2013;**15**(10):77-84.
17. Pourrabi S, Nayebi AM, Hossini S. Role of the Androgen Receptors in Memory Impairment in Mature Male Rats. *Experimental Animal Biol.* 2012;**1**(2):25-32.
18. Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, et al. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol.* 2008;**29**(2):313-339. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.02.001 pmid: 18374402
19. Nico-khesal A, Bakhtiari H, Akhgary A. The role of steroids on brain function. *Neurosci J Shafaye Khatam.* 2017;**5**(1):58-72. doi: 10.18869/acadpub.shefa.5.1.58
20. Leranthy C, Petnehazy O, MacLusky NJ. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci.* 2003;**23**(5):1588-1592. pmid: 12629162
21. Ghahramani P, Fatemi Tabatabaei S, Eshagh Harooni H, Moazedi AA. Effects of zinc chloride on passive avoidance memory of male rats in gonadectomized peri-pubertal. *Vet Res Forum.* 2018;**28**(11):708-714.
22. Khosrobakhsh F, Moloudi MR, Shoja K, Mohammadi S. Effect of Alpha-Lipoic acid on Pancreatic Optic Atrophy 1 (OPA1) Gene Expression in Male Rat Model of Obstructive Cholestasis and Cirrhosis. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci.* 2019;**24**(5):120-134. doi: 10.29252/sjku.24.5.120
23. Niksokhan M, Hedarieh N. Effect of hydroalcoholic extract of Pimpinella anisum seed on anxiety in gonadectomized male rat. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci.* 2015;**20**(4):56-64.
24. Navaeian M, Pakpour B, Piri M. Modulation of muscimol state-dependent learning by α 1-adrenergic receptors of the dorsal hippocampus. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci.* 2014;**19**(4):46-57.
25. Molaei P, Nasehi M, Hashemi M. The effect of cholestasis and neuroAID treatment on Bcl-xl gene expression in hippocampus of male rats. *Daneshvar.* 2017;**25**(5):7-14.
26. Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol.* 2009;**156**(1):7-27. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00030.x pmid: 19133988
27. Alipanahzade H, Soleimani M, Mehdizadeh M, Katebi M. Effect of transforming growth factor alpha of dentate gyrus neurons and pyramidal cells of CA1 subfield of hippocampus following ischemia-reperfusion in Rats. *J Gorgan Univ Med Sci.* 2012;**14**(3):26-32.
28. Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, et al. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology.* 2007;**45**(6):1517-1526. doi: 10.1002/hep.21599 pmid: 17523148
29. Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation.* 2008;**5**:10. doi: 10.1186/1742-2094-5-10 pmid: 18348728
30. Savlan I, Liakina V, Valantinas J. Concise review of current concepts on nomenclature and pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Medicina (Kaunas).* 2014;**50**(2):75-81. doi: 10.1016/j.medici.2014.06.008 pmid: 25172600
31. Monfort P, Erceg S, Piedrafita B, Llansola M, Felipe V. Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur J Neurosci.* 2007;**25**(7):2103-2111. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05444.x pmid: 17439494
32. Eslimi Esfahani D, Oryan S, Nabian M, Karimian Peiro M. The role of cholestasis in brain hippocampus trauma in male Wistar rat. *Nova Biologica Reperta.* 2017;**4**(2):128-136. doi: 10.21859/acadpub.nbr.4.2.128
33. Aghaei I, Saeedi Saravi SS, Ghotbi Ravandi S, Nozari M, Roudbari A, Dalili A, et al. Evaluation of prepulse inhibition and memory impairments at early stage of cirrhosis may be considered as a diagnostic index for minimal hepatic encephalopathy. *Physiol Behav.* 2017;**173**:87-94. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.01.033 pmid: 28119160
34. Khaledi S, Ahmadi S. Hepatic Encephalopathy: Pathogenesis and Treatment Strategies. *Neurosci J Shafaye Khatam.* 2019;**7**(1):77-90. doi: 10.29252/shefa.7.1.77
35. Agusti A, Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Hernandez-Rabaza V, Felipe V. p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut.* 2011;**60**(11):1572-1579. doi: 10.1136/gut.2010.236083 pmid: 21636647
36. Felipe V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci.* 2013;**14**(12):851-858. doi: 10.1038/nrn3587 pmid: 24149188

37. Gholipour T, Riaz K, Noorian AR, Jannati A, Honar H, Doratotaj B, et al. Seizure susceptibility alteration following reversible cholestasis in mice: Modulation by opioids and nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 2008;**580**(3):322-328. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.018 pmid: 18164287
38. Bergasa NV, Vergalla J, Swain MG, Jones EA. Hepatic concentrations of proenkephalin-derived opioids are increased in a rat model of cholestasis. *Liver.* 1996;**16**(5):298-302. doi: 10.1111/j.1600-0676.1996.tb00749.x pmid: 8938629
39. Poureidi M, Heydarnia Kalati Z, Abtahi-Evary SH, Fani M, Moghimian M. Effect of Morphine on Passive Avoidance Memory in Cholestatic Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2020;**30**(186):13-23.
40. Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Pike CJ. Age-related testosterone depletion and the development of Alzheimer disease. *JAMA.* 2004;**292**(12):1431-1432. doi: 10.1001/jama.292.12.1431-b pmid: 15383512
41. Galea LA, Wide JK, Paine TA. High levels of estradiol disrupt conditioned place preference learning, stimulus response learning and reference memory but have limited effects on working memory. *Behav Brain Res.* 2001;**126**(1-2):115-126. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00255-8
42. Packard MG, Kohlmaier JR, Alexander GM. Posttraining intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic systems. *Behav Neurosci.* 1996;**110**(3):626-632. doi: 10.1037//0735-7044.110.3.626 pmid: 8889009
43. Klintsova A, Levy WB, Desmond NL. Astrocytic volume fluctuates in the hippocampal CA1 region across the estrous cycle. *Brain Res.* 1995;**690**(2):269-274. doi: 10.1016/0006-8993(95)00642-4
44. Fugger HN, Foster T, Gustafsson JÅ, Rissman EF. Novel effects of estradiol and estrogen receptor α and β on cognitive function. *Brain Res.* 2000;**883**(2):258-264. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02993-0
45. Gupta RR, Sen S, Diepenhorst LL, Rudick CN, Maren S. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. *Brain Res.* 2001;**888**(2):356-365. doi: 10.1016/S0006-8993(00)03116-4
46. Mani SK, Mermelstein PG, Tetel MJ, Anesetti G. Convergence of multiple mechanisms of steroid hormone action. *Horm Metab Res.* 2012;**44**(8):569-576. doi: 10.1055/s-0032-1306343 pmid: 22454239
47. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996;**392**(1):49-53. doi: 10.1016/0014-5793(96)00782-X
48. Nasiri E, Noori M, Dehpour A. Effect of obstructive cholestasis on sex axis in the adult male rats. *J Babol Univ Med Sci.* 2003;**5**(4):7-10.
49. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Baltimore, Williams and Wilkins 1999.