ORIGINAL ARTICLE

Effects of Piperine Pretreatment on Antioxidant Capacity and Spatial Memory Impairment Induced by Local Injection of Lysolecethin in Rat Hippocampus

Hannaneh Roshanbakhsh[1],
Mahmoud Elahdadi Salmani[2],
Mahdi Goudarzvand[3],
Fereshteh Pourabdolhossein[4]

[1] MSc in Physiology, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
[2] Associate Professor, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
[3] Associate Professor, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Alborz Univercity of Medical Sciences, Karaj, Iran
[4] Assistant Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received March 11, 2020 ; Accepted July 5, 2020)

Abstract

Background and purpose: Piperine as the main alkaloid of black pepper has antioxidant and neuroprotective properties, so, it is an appropriate candidate to be studied in animal models of multiple sclerosis. This research aimed at investigating the effect of pretreatment with piperine on spatial memory, oxidative stress, and myelin repair gene markers in local demyelination model.

Materials and methods: Adult male Wistar rats (200–220 g) were studied in four experimental groups (n=8 per group). Demyelination was induced by bilateral injection of lysolecithin (LPC) into the CA1 region of the hippocampus. Piperine was injected intraperitoneally at 5 mg/kg for two weeks before induction of demyelination until the end of the experiment. The effect of piperine on spatial memory was assessed by Morris water maze. The gene expression analysis on iNOS, Nrf2, HO1, and MBP was done using qPCR. Total antioxidant capacity in the hippocampal tissue was measured by FRAP biochemical assay.

Results: Pretreatment with piperine significantly reduced escape latency and swimming distance and increased time spent in target quadrant in Morris water maze test ($P<0.0001$) . In the Piperine pretreatment group, the expression level of iNOS was significantly lower than that in the LPC group. But the expression levels of Nrf2, Hmox-1 and MBP significantly increased in piperine pretreated group compared to LPC and control groups ($P<0.001$). Total antioxidant capacity of tissue in piperine pretreated group was more than that in the LPC group and controls ($P<0.0001$).

Conclusion: Piperine improved spatial memory impairment induced by hippocampal demyelination through enhancing antioxidant defense and myelin repair.

Keywords: multiple sclerosis, piperine, spatial memory, demyelination, lysolecithin

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (188): 1-16 (Persian).

*** Corresponding Author: Fereshteh Pourabdolhossein -** Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran (E-mail: pourabdolhossein@gmail.com F.pourabdolhossein@mubabol.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 188 شهریور سال 1399 (16-1)

اثرات پیش درمانی با پیپرین بر ظرفیت آنتی اکسیدانی مغز و اختلال حافظه فضایی ناشی از تزریق لیزولسیتین در هیپوکامپ

حنانه روشن بخش[1]
محمود اله دادی سلمانی[2]
مهدی گودرزوند[3]
فرشته پورعبدالحسین[4]

چکیده

سابقه و هدف: پیپرین مهم‌ترین آلکالوئید فلفل سیاه، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و حفاظتی برای نورون ها است. بنابراین کاندید مناسبی برای مطالعه در مدل‌های حیوانی بیماری مولتیپل اسکلروزیس می‌باشد. در این مطالعه اثر پیش درمانی پیپرین بر حافظه فضایی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و ترمیم میلین در مدل دمیلیناسیون موضعی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن (220-200 گرم) در 4 گروه آزمایشی (n=8) مورد مطالعه قرار گرفتند. دمیلیناسیون با تزریق لیزولسیتین در ناحیه CA1 هیپوکامپ القاء شد. پیپرین از دو هفته قبل از القای دمیلیناسیون با دوز 5mg/kg تا پایان دوره به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. اثر پیپرین بر حافظه فضایی با تست ماز آبی موریس و بر بیان ژن‌های iNOS, Hmox-1, Nrf2 و MBP در بافت هیپوکامپ با تکنیک qPCR ارزیابی شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در بافت هیپوکامپ با تست FRAP اندازه گیری شد.

یافته‌ها: پیش درمانی با پیپرین سبب کاهش شاخص زمان و مسافت طی شده و افزایش زمان اقامت در ربع هدف در آزمون ماز آبی شد(P<0/0001). درگروه پیش درمان بیان شاخص استرس اکسیداتیو (iNOS) نسبت به گروه دمیلیناسیون کاهش یافت. بیان ژن‌های Nrf2, Hmox-1 وMBP درگروه پیش درمان نسبت به بیمار وکنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد(P<0/0001). ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در گروه پیش درمان افزایش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار و کنترل داشت(P<0/0001).

استنتاج: پیپرین با تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و افزایش میلین موجب بهبود اختلال حافظه فضایی ناشی از دمیلیناسیون هیپوکامپ می‌شود.

واژه های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، پیپرین، حافظه فضایی، دمیلیناسیون، لیزولسیتین

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) است(1)، دمیلیناسیون یکی از رایج‌ترین علایم پاتولوژیک بیماری MS می‌باشد(2). که در ماده سفید و خاکستری مغز رخ می‌دهد(4،3). در کنار ناتوانی‌های جسمی ناشی از بیماری MS، یکی دیگر از مهم‌ترین نشانه‌های این بیماری، اختلالات

مولف مسئول: فرشته پورعبدالحسین - بابل: دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی E-mail: pourabdolhossein@gmail.com F.pourabdolhossein@mubabol.ac.ir
1. کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران
2. دانشیار، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران
3. دانشیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
4. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
تاریخ دریافت : 1398/12/21 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/12/21 تاریخ تصویب : 1399/4/15

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

شناختی می‌باشد. تحقیقات دو دهه اخیرنشان داده است که MS منجر به زوال عملکرد شناختی در 42 تا 73 درصد بیماران می‌گردد(5). در واقع بیش از 65 درصد از بیماران MS دچار اختلالات شناختی می‌شوند و از بین آن‌ها، بیش از 40 درصد اختلال حافظه و دمیلیناسیون هیپوکامپ دارند که کیفیت زندگی آن ها را مخدوش می‌کند(7،6). مسیرهای پاتوفیزیولوژی MS شامل درگیری چندین جزء است که شامل درگیری عروقی، فعال شدن مسیرهای اکسیداتیو، ناکارآمدی سد خونی مغزی (BBB) و آغاز روندهای خود ایمنی و التهابی در پارانشیم مغزی می‌باشد، که این اجزاء به‌صورت شبکه‌ای در هم پیچیده سبب بروز الگوهای متنوع پاتولوژیک می‌شوند(8). استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی منجر به مرگ الیگودندروسیت‌ها، آسیب آکسون و در نهایت مرگ سلول‌های عصبی می‌شود. همچنین از بین رفتن نورون، به‌ویژه در ناحیه CA1 هیپوکامپ، تأثیر معنی‌داری بر عملکرد هیپوکامپ دارد(9). هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک است که نقش فیزیولوژیک آن در بروز رفتارهای هیجانی و دخالت آن در پردازش اطلاعات فضایی و برخی از انواع حافظه و یادگیری مشخص شده است. یادگیری فضایی نوعی یادگیری لحظه ای است که در این نوع یادگیری، هیپوکامپ و لوب گیجگاهی میانی و نواحی از قشر جلوی پیشانی دخالت دارد(10). بنابراین، با توجه به اهمیت نقش هیپوکامپ در شکل‌گیری یادگیری و حافظه فضایی(11)، آسیب به هیپوکامپ می‌تواند باعث ایجاد فراموشی بعدی، ضعف حافظه کوتاه مدت و حافظه فضایی و اشکالات یادگیری شود(12). علل اختلال حافظه در بیماران MS در حال حاضر ناشناخته است ولی مطالعات تصویربرداری از مغز، درگیری پاتولوژیک هیپوکامپ، خصوصا آتروفی ناحیه CA1 آن را در این قضیه دخیل می‌دانند(13،9). بنابراین مکانیسم احتمالی اختلال حافظه در بیماران MS با توجه به گزارشات اخیر آتروفی هیپوکامپ و دمیلیناسیون در ناحیه CA1 می‌باشد(9). با توجه به این که استرس اکسیداتیو و کاهش دفاع آنتی اکسیدانی در بدن نقش مهمی در القاء و اختلال حافظه ناشی از افزایش سن، بیماری‌های آلزایمر، صرع و پارکینسون دارد، بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند راهکار بالقوه‌ای برای پیشگیری و حتی بهبود فرآیند اختلال حافظه باشد. در طی چند دهه اخیر گسترش تحقیقات در پزشکی و علوم مختلف باعث رشد چشمگیری در کشف و بررسی گیاهان دارویی شده است(14). گزارشات وسیعی در ده سال گذشته بر روی ترکیبات انواع ادویه جات نشان داده است که این ترکیبات با مهار مسیر التهابی می‌توانند از وقوع بیماری‌های تحلیل برنده عصبی پیشگیری کنند(16،15). پیپرین به‌عنوان اصلی‌ترین آلکالوئید موجود درفلفل سیاه یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی است که از میوه گیاه فلفل سیاه استخراج می‌شود(17). طبق مطالعات جدید سلولی و حیوانی، پیپرین دارای اثرات تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد کارسینوژنیک است(17). اثرات آنتی اکسیدانی(19،18) و ضد التهابی(20) پیپرین در مطالعات متعددی گزارش شده است. اثرات ضد آپوپتوز پیپرین در بیماری‌های عصبی مانند پارکینسون(21) و آلزایمر(22) شرح داده شده است. این مطالعات تأیید می‌کنند که پیپرین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود، موجب بهبود عملکرد حافظه در بیماری‌های فوق می‌گردد. همچنین پیش درمانی پیپرین در مدل‌های حیوانی بیماری‌های فوق تأثیر مثبت پیپرین در پیشگیری از القاء اختلال حافظه را تأیید می‌کند(24،23). دسترسی محدود به بافت‌ها و بیوپسی‌های MS انسانی و عدم سهولت در تغییر شرایط آزمایشگاهی در آزمایشات بالینی از جمله عواملی است که موجب ضرورت استفاده از مدل‌های تجربی می‌گردد. علاوه بر آن مدل‌های تجربی جهت القاء دمیلیناسیون مورد نیاز بوده و امکان درک بهتر از تأثیرات آزمایش درمان‌های جدید و ترمیمی را در بیماری MS را فراهم می‌کند(25). دمیلیناسیون‌های القاء شده با توکسین از رایج‌ترین مدل‌ها جهت بررسی ظرفیت ترمیمی مغز در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

MS می‌باشد. یکی از سم‌های شناخته شده برای القاء دمیلیناسیون سم لیزولسیتین است(25). لیزولسیتین (آنالوگ لیزوفسفاتیدیل کولین) دارای خاصیت مشابه مواد شوینده است که به‌طور اختصاصی بر غشا میلین سلول‌های عصبی و به‌صورت ثانویه بر سلول‌های میلینه‌کننده (اولیگودندروسیت‌ها) اثر کرده و سبب از بین رفتن آن‌ها می‌شود(26). این ماده در مطالعات گذشته نیز جهت دمیلیناسیون موضعی در نواحی مختلف CNS نظیر طناب نخاعی(27)، جسم پینه‌ای(28)، عصب بینایی(29) و هیپوکامپ(30) استفاده شده است. همچنین مدل موضعی دمیلیناسیون با لیزولسیتین در هیپوکامپ باعث القاء دمیلیناسیون و متعاقب آن موجب ایجاد اختلال در حافظه و یادگیری فضایی می‌گردد(30،31). از آن‌جایی که این مدل جهت بررسی اثرات دارویی بر فرآیندهای دمیلیناسیون، رمیلیناسیون و اختلال حافظه مدل مناسبی است، در این مطالعه از مدل تزریق موضعی لیزولسیتین جهت القای دمیلیناسیون موضعی و ایجاد اختلال حافظه فضایی در حیوانات استفاده شد.

بر اساس شواهد موجود، تاکنون مطالعه ای در مورد تأثیر پیش درمانی با پیپرین بر فرایند یادگیری و حافظه فضایی در مدل‌های بیماری MS انجام نگرفته است. لذا در این پژوهش از مدل موضعی دمیلیناسیون توسط تزریق مستقیم لیزولسیتین در ناحیه CA1 هیپوکامپ استفاده می‌شود. هدف اصلی این مطالعه بررسی اثرات پیش درمان پیپرین با دوز 5mg/kg بر اختلال حافظه فضایی ایجاد شده با لیزولسیتین می‌باشد. برای بررسی بیش‌تر مکانیسم عمل پیپرین بر حافظه فضایی و ترمیم میلین شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی بافت هیپوکمپ بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار با محدوده وزن220-200 گرم از اتاق حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بابل تهیه و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (تحت چرخه نوری 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی و با درجه حرارت 2±22 سانتی گراد) و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. تمامی آزمایش‌ها با رعایت قوانین اخلاقی برخورد با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی بابل و دانشگاه دامغان با کد (IR.DAMGHANU.1396.1991) انجام گردید.

تعداد 32 سر موش در 4 گروه (n=8) تقسیم شدند:

گروه کنترل (سالین): 2 میکرولیتر سالین را به صورت دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ به عنوان حلال لیزولسیتین دریافت کردند.

گروه بیمار(لیزولسیتین): لیزولسیتین 1درصد را به میزان 2 میکرولیتر به صورت دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ دریافت کردند.

گروه شاهد درمان (حلال پیپرین): حلال پیپرین را از دو هفته قبل از تزریق لیزولسیتین 1درصد را به میزان 2 میکرولیتر به‌صورت دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ تا پایان دوره آزمایش (10 روز) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه پیش درمان: دو هفته قبل از القاء دمیلیناسیون درمان پیپرین را با دوز 5mg/kg/day آغاز و تا پایان دوره آزمایش (10 روز پس از تزریق لیزولستین)، به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. انتخاب این دوز بر طبق منابع موجود و همچنین آزمایشات قبلی خودمان صورت گرفت(32،24).

القاء مدل موضعی دمیلیناسیون

جهت القاء این مدل، حیوانات به صورت عمیق با تزریق داخل صفاقی کتامین(Alfasan, 70mg/kg, هلند) و زایلازین (Alfasan, 10mg/kg, هلند) رقیق شده در محلول استریل سالین 0/9 درصد، بیهوش شدند. موش‌ها با موقعیت سر کامل صاف در دستگاه استریوتاکس قرار

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

گرفتند و با استفاده از اطلس پاکسینوس مشخصات مذکور را (ML:±1.6) ,AP:-3.6, DV:-3.2 روی جمجمه علامت‌گذاری کرده، باکمک دریل دو سوراخ در جمجمه به طوری که به بافت مغز آسیب نرساند ایجاد شد(30). 2 میکرولیتر از محلول 1 درصد لیزولسیتین (سیگما، آلمان) با سرنگ همیلتون 10 میکرولیتری به صورت دو طرفه به ناحیه CA1 هیپوکامپ تزریق شد. جهت اطمینان از فراهم نمودن زمان لازم برای انتشار لیزولسیتین، سوزن تزریق به مدت 5 دقیقه در محل تزریق نگه داشته شد. در حیوانات گروه کنترل با همان مشخصات اطلس و حجم یکسان سالین به صورت دو طرفه تزریق شد.

مداخلات دارویی

پیش درمانی با پیپرین با دوز 5 mg/kg دو هفته قبل از القاء مدل بصورت تزریق روزانه داخل صفاق انجام شد و تا دو هفته بعد از القا مدل ادامه یافت. پیپرین مورد استفاده از شرکت مرک آلمان خریداری و در دمای اتاق نگهداری گردید. از ترکیب نرمال سالین 0/9 درصد، اتانول 70 درصد و توئین 1 درصد به عنوان حلال پیپرین استفاده شد و تزریق حلال درگروه شاهد درمان به صورت روزانه داخل صفاقی انجام شد.

مطالعات رفتاری

ماز آبی موریس یکی از آزمون های رفتاری موثر و دقیق برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی است(33). این ماز از یک مخزن حلقوی با دیواره مشکی (قطر 155 سانتی متر و ارتفاع 60 سانتی متر) تشکیل شده که به چهار ربع تقسیم می شود (Q1-4). مخزن تا ارتفاع 35 سانتی متر از آب 1±22 درجه سانتی‌گراد پر شده و یک سکوی (با قطر 10 سانتی متر) 2 سانتی متر زیر سطح آب در مرکز ربع چهارم (Q4) قرار داده می‌شود. در اطراف ماز آبی علائم هندسی به عنوان راهنمای بینایی تعبیه شد و مسیر شنای حیوان به‌وسیله یک سیستم ردیاب کامپیوتری (EthoVision XT11) ثبت شد(30). حیوانات 24 ساعت قبل از آموزش به منظور سازش با محیط برای مدت 60 ثانیه به داخل استخر رها می شدند تا با استفاده از علائم محیطی، محل سکوی پنهان (Q4) در آب را پیدا کنند و در صورتی که موش ها قادر به پیدا کردن سکو نبودند، با دست به سمت آن هدایت می شدند و اجازه داده می شد به مدت 20 ثانیه روی سکو بمانند. برای مطالعه یادگیری فضایی، آموزش حیوانات در ماز آبی طی 4روز متوالی انجام گرفت. هر موش روزانه (4 Trial در روز) برای مدت 60 ثانیه از یکی از دیواره های ماز (Q1- Q4) به داخل آب رها می‌شد. موش‌ها بعد از هر Trial به مدت 5 دقیقه استراحت می کردند. هر 4 Trial در صبح انجام می گرفت و از هر 4 Trial روزانه هر حیوان، میانگین گرفته می شد. پس از آخرین بار آموزش، حیوان از حوضچه خارج و با حوله خشک و به قفس خود باز گردانده می شد. مدت زمان پیدا کردن سکو و مسافت کل طی شده در هر بار آموزش اندازه گیری و ارزیابی می شد. سرعت شنا برای ارزیابی فعالیت حرکتی موش ها مورد استفاده قرار گرفت. میانگین هر روز به مدت 4 روز آزمایش و برای زمان پیدا کردن سکو، مسافت طی شده و سرعت شنای حیوانات در یک نمودار رسم گردید. 24 ساعت پس از اتمام آموزش، سکو برداشته شد و موش از Q2 رها شد. در طول آزمایش پروب به موش اجازه داده شد تا 60 ثانیه بدون وجود سکو به جست و جو ادامه دهد. مدت زمان سپری شده در ربع هدف برای ارزیابی چگونگی یادآوری محل سکو توسط موش ها (حافظه) مورد استفاده قرار گرفت. از این آزمایش برای اندازه گیری تأثیر اختلالات عصبی بر یادگیری فضایی استفاده می‌شود. 24 ساعت پس از آموزش تست حافظه انجام و سپس حیوانات جهت نمونه برداری قربانی شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و نسخه برداری معکوس (Real-Time PCR)

بافت هیپوکامپ تحت شرایط استریل از سایر نواحی مغز جدا و به داخل میکروتیوب استریل منتقل شد. سپس توسط تانک نیتروژن مایع به فریزر 80- درجه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

سانتی‌گراد منتقل شده و تا زمان استخراج در آن نگهداری شد. به منظور جداسازی RNA خالص (Total RNA) از بافت هیپوکامپ، از کیت استخراج Super RNA یکتا تجهیز آزما (YTA) مطابق با پروتکل استخراج آن استفاده شد. تمامی مراحل در زیر هود انجام شد و از میکروتیوب‌های DNase-RNase free و اتوکلاو شده استفاده گردید. سنتز cDNA مطابق با پروتکل کیت یکتا تجهیز انجام شد. برای از مستر میکس سایبرگرین (کیاژن، آلمان) واز دستگاه ABI 7500 Real-Time PCR System جهت بررسی بیان ژن‌های مورد نظر استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژن‌های فاکتور هسته‌ای اریتروئید2 (Nrf2)، نیتریک اکساید سنتتاز القائی (iNOS) و آنزیم هم اکسیژناز1 (Hmox-1) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (qPCR) در جدول شماره 1 توضیح داده شده است. 1 میکرولیتر cDNA، 10 میکرولیتر از مستر میکس سایبرگرین (کیاژن، آلمان) و 5 pmol/µL از هر یک از پرایمرها (فضاپژوه، تهران-ایران) به همراه 8 میکرولیتر از nuclease free water در حجم نهایی 20 میکرولیتر جهت واکنش نسخه‌برداری معکوس (real-time PCR) میکس شدند. واکنش‌ها به صورت دوبار تکرار انجام شد. جهت کنترل مثبت و ارزیابی واکنش RT از ژن مرجع (GAPDH) به عنوان یک ژن Housekeeping استفاده شد. بیان نسبی ژن مورد نظر در مقایسه با بافت کنترل، توسط روش $2^{-C t \Delta\Delta}$ محاسبه و به‌صورت Fold Change گزارش شد.

جدول شماره 1: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش qPCR.

نشانه ژن	شناسه دسترسی ژن	توالی (5'→3')
GAPDH	NM_017008.4F	ACGGCAAGTTCAACGGCACAG
	NM_017008.4R	GACATACTCAGCACCAGCATCACC
iNOS	NM_012611.3F	TGGTGAGGGGACTGGACTTT
	NM_012611.3R	ATCCTGTGTTGTTGGGCTGG
Hmox-1	NM_012580.2F	GGGAAGGCTTTAAGCTGGTGA
	NM_012580.2R	GTGGGGCATAGACTGGGTTC
Nrf2	NM_031789.2F	GTCCCAGCAGGACATGGATT
	NM_031789.2R	GTTTGGGAATGTGGGCAACC
MBP	NM_001020462.1F	CTATAAATCGGCTCACAAGG
	NM_001020462.1R	AGGCGGTTATATTAAGAAGC

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام

برای اندازه گیری پتانسیل آنتی اکسیدانی تام The ferric reducing ability of plasma (FRAP)، از روش بنزی و استرین (Benzie & Strain) استفاده شد(34). آزمایش FRAP یک روش ساده برای اندازه‌گیری توانایی احیا کنندگی یون فریک پلاسما است و به‌عنوان یک روش در ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی معرفی شده است(35). بافت هیپوکامپ به نسبت وزنی یکسان، به ازای هر گرم بافت با 0/5 میکرولیتر از سرم فیزیولوژی به خوبی هموژنایزر شد. سپس مخلوط حاصل در سانتریفیوژ معمولی با دور 2000 g و به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شده و در سانتریفیوژ یخچال دار به مدت 10 دقیقه با دور 10000g و دمای 4 درجه سانتریفیوژ شد. سوپ حاصل به عنوان عصاره بافتی جهت آنالیز بیوشیمیایی مورد آنالیز قرار گرفت. 1/5 سی سی معرف آماده کار FRAP شامل (بافراستات، معرف TPTZ و محلول کلرور فریک به نسبت به ترتیب 11:1:1) به تمام لوله‌های آزمایش اضافه شده و به مدت 5 دقیقه در 37 درجه انکوبه شد. در مرحله بعد 50 میکرولیتر از نمونه (عصاره بافت و یا استانداردهای مختلف) به لوله های مربوطه اضافه و به خوبی مخلوط گشته و مجددا 15 دقیقه در 37 درجه انکوبه شد. پس از طی این زمان شدت رنگ در طول موج 593 نانومتر در مقابل بلانک (1/5 میلی‌لیتر محلول FRAP و 50 میکرولیتر آب مقطر) با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر جذب بدست آمده با استفاده از منحنی استاندارد، که با کمک محلول سولفات آهن در غلظت‌های 125-250-500-1000 میکرومولار به عنوان استاندارد رسم شد، به غلظت تبدیل گردید. مقادیر FRAP بر حسب Fe2+ mM بر میلی گرم پروتئین بیان شده است(35).

آنالیز آماری

برای مقایسه چند گروه با یک متغیر از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن جهت مقایسه

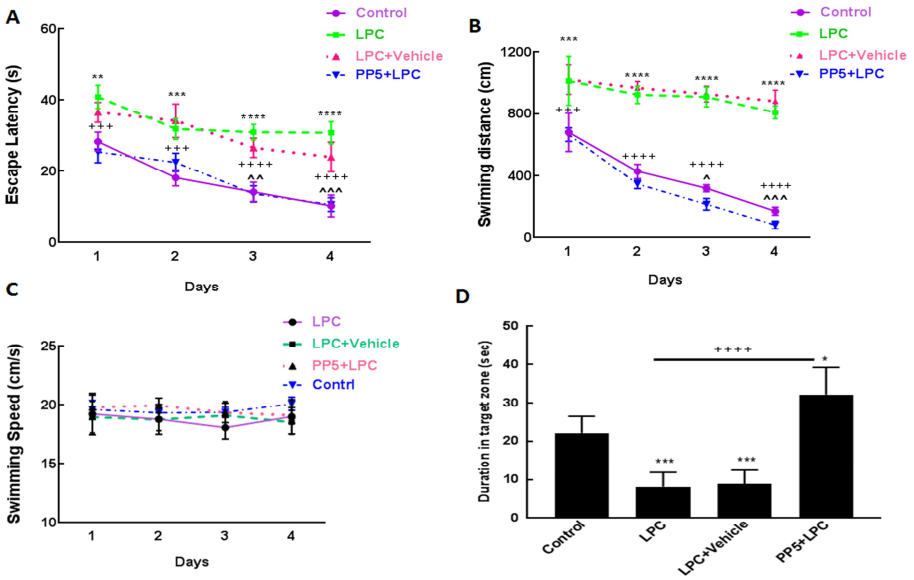
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

میانگین گروه‌ها، از آزمون توکی استفاده شد. برای مقایسه چند گروه با دو متغیر در روزهای متوالی از آزمون واریانس دو طرفه با اندازه‌گیری تکراری و به دنبال آن جهت مقایسه میانگین گروه‌ها، از آزمون بونفرونی استفاده شد. در همه محاسبات آماری، $P<0/05$ به‌عنوان حداقل سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار Graph pad Prism Diego. CA (Inc, San) نسخه 6 صورت گرفت.

یافته ها

پیش درمانی با پیپرین اختلال یادگیری و حافظه فضایی را در مدل دمیلیناسیون موضعی هیپوکامپ کاهش داد. جهت القاء دمیلیناسیون موضعی، گروه بیمار لیزولسیتین 1 درصد را به میزان 2 میکرولیتر به صورت دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ دریافت کرده و گروه کنترل به همان میزان و در همان ناحیه سالین دریافت کردند. گروه پیش درمان از دو هفته قبل از القای دمیلیناسیون تا پایان دوره پیپرین با دوز 5 mg/kg و گروه شاهد درمان نیز در همین زمان حلال پیپیرین را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. یک هفته پس از القای مدل دمیلیناسیون توسط لیزولسیتین، تست ماز آبی موریس با پروتکل 5 روزه برای گروه‌های کنترل، بیمار، شاهدِ درمان و پیش درمان انجام شد. 4 روز اول جهت ارزیابی یادگیری و یک روز آخر برای سنجش حافظه حیوانات در نظر گرفته شد. شاخص‌های ارزیابی یادگیری و حافظه در طول مراحل انجام آزمایش شامل مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکو، مسافت پیموده شده تا سکو و سرعت حرکت برای یافتن سکوی پنهان (جهت تأیید عدم اختلال حرکتی در حیوانات گروه‌های مختلف) بود که در 5 روز تست رفتاری ماز آبی موریس مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت. اختلال یادگیری و حافظه فضایی در مدل تزریق موضعی لیزولسیتین در بافت هیپوکامپ توسط آزمون موریس تأیید شد و در گروه بیمار و شاهد درمان، زمان پیدا کردن سکوی پنهان در روزهای اول تا چهارم تست نسبت به همان روزها در گروه کنترل تأخیر معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/01$ **، $P<0/001$ ***، $P<0/0001$ ****، آنالیز واریانس دو طرفه با اندازه گیری تکراری و آزمون بونفرونی - تصویر شماره 1 A). مسافت طی شده در گروه بیمار و شاهد درمان در روز 1 ($P<0/01$ ***) و روزهای 2، 3، 4 ($P<0/0001$ ****) افزایش معنی‌داری نسبت به همان روزها در گروه کنترل نشان داد (آنالیز واریانس دو طرفه با اندازه‌گیری تکراری و آزمون بونفرونی) (تصویر شماره B1). علت طی شده در گروه بیمار در روز 1 ($P<0/01$ **) و روزهای 2، 3، 4 ($P<0/0001$ ****). افزایش معنی‌داری نسبت به همان روزها در گروه کنترل نشان داد (آنالیز واریانس دو طرفه با اندازه‌گیری تکراری و آزمون بونفرونی). علت این افزایش مسافت طی شده در همه روزهای گروه بیمار نسبت به گروه کنترل، می‌تواند تأییدی بر اختلال یادگیری دراین گروه‌ها باشد (تصویر شماره A-B1). کاهش معنی‌دار زمان یافتن سکو و مسافت طی شده در گروه کنترل، نشانگر سلامت یادگیری حیوانات در این گروه بوده و افزایش معنی‌دار زمان و مسافت برای یافتن سکو در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل، بیانگر القاء اختلالات یادگیری ناشی از مدل دمیلیناسیون موضعی در ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌باشد. همچنین گروه کنترل و پیش درمان با پیپرین به ترتیب در روزهای 3 ($p<0/01$ ^^) و ($p<0/01$ ^^) و 4 ($p<0/001$ ^^^) کاهشی معنی دار را در مسافت طی شده نسبت به روز 1 این گروه نشان داد. بررسی سرعت شنای حیوانات در همه گروه های آزمایشی در روزهای تست اختلاف معنی‌داری نشان نداد و این تأییدی بر عدم ایجاد اختلال حرکتی در این مدل می‌باشد (آنالیز واریانس دو طرفه با اندازه‌گیری تکراری و آزمون بونفرونی - تصویر شماره 1 C).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]



تصویر شماره 1: پیش درمانی با پیپرین اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از مدل دمیلیناسیون موضعی هیپوکامپ را کاهش میدهد. A زمان یافتن سکو در گروه بیمار در همه روزهای آموزش نسبت به همان روزها در گروه کنترل افزایش معنی‌داری (P <0/0001 ****، P <0/01 **، P <0/001 ***) نشان داد. زمان یافتن سکو (sec) درگروه پیش درمان پیپرین نسبت به گروه های بیمار و شاهد درمان کاهش معنی داری (P <0/0001 ++++، P <0/001 +++) یافت. در مقایسه درون گروهی در گروهای بیمار و شاهد درمان تفاوت معنی داری بین روزهای آزمون مشاهده نشد. اما در گروه کنترل و پیش درمان با پیپرین در روزهای 3 و 4 کاهش معنی داری در زمان یافتن سکو مشاهده شد (P <0/01 ^^، P <0/001 ^^^) .B مسافت طی شده جهت یافتن سکو در حیوانات گروه بیمار نسبت به گروه کنترل بطور معناداری افزایش (P <0/01 ***، P <0/0001 ****)یافت. مسافت طی شده در گروه های پیش درمان نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان کاهش معنی‌داری (P <0/001 +++، P<0/0001 ++++) یافت. در مقایسه درون گروهی در گروهای بیمار و شاهد درمان تفاوت معنی‌داری بین روزهای آزمون مشاهده نشد. اما در گروه کنترل و پیش درمان با پیپرین در روزهای 3 و 4 کاهش معنی داری در مسافت طی شده مشاهده شد (P <0/05 ^، P <0/001 ^^^) C مقایسه سرعت شنای حیوانات در گروه های مختلف تغییرات معناداری را نشان نداد. D مدت زمان سپری شده در ربع هدف در آزمون پروب در گروه بیمار و شاهد درمان نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار (P <0/001 ***) و مقایسه این زمان در گروه پیش درمان پیپرین (P <0/0001 ++++) نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان افزایش معناداری را نشان داد.

مقایسه بین گروه‌های شاهد درمان و گروه بیمار هیچ تغییر معنی‌داری را در زمان یافتن سکو در روزهای مطالعه نشان نداد، بنابراین حلال پیپرین تأثیری بر روند یادگیری نداشته و حیوانات این گروه همانند گروه بیمار بر اثر القاء مدل دمیلیناسیون موضعی در ناحیه CA1 هیپوکامپ دچار اختلالات یادگیری فضایی بودند (آنالیز واریانس دو طرفه با اندازه گیری تکراری و آزمون بونفرونی-تصویر شماره 1A). در گروه پیش درمان پیپرین زمان رسیدن به سکو در تمام روزها، به ترتیب در روزهای 1و2 (P <0/001 +++) روزهای 3 و 4 (P <0/0001 ++++) به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد درمان و گروه بیمار کاهش یافت، بنابراین پیش درمان پیپرین با دوز 5mg/kg/day از دو هفته قبل از آغاز جراحی تأثیر مثبت در کاهش روند اختلال یادگیری و یا بهبود آن داشته است (تصویر شماره 1A). مقایسه مسافت طی شده به عنوان شاخص تأیید کننده زمان تأخیر، در گروه شاهد درمان و بیمار در طی 4 روز چه به‌صورت درون گروهی و چه به‌صورت برون گروهی تغییرات معنی‌داری نشان نداد و بدین ترتیب اختلال حافظه در گروه حلال پیپرین نیز تأیید شد. در گروه پیش درمان با پیپرین مسافت طی شده در تمام روزها، به ترتیب در روز 1 (P <0/001 +++) و روزهای 2 و 3 و4 (P <0/0001 ++++) نسبت به روزهای 4-1 گ روه شاهد درمان و گروه بیمار کاهشی معنی‌داری را

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

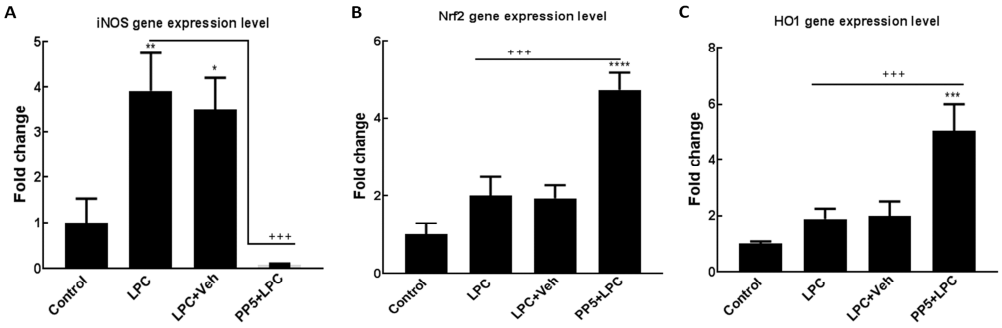
نشان دادند (آنالیز واریانس دو طرفه با اندازه‌گیری تکراری و آزمون بونفرونی (تصویر شماره 1B). مقایسه درون‌گروهی در گروه پیش درمان نیز کاهش معنی‌داری در مسافت طی شده در روزهای 4 (P <0/001 ^^^) و 3 (P <0/05 ^) نسبت به روزهای 1 و2 این گروه نشان داد که بیانگر تأثیر مثبت پیش درمانی با پیپرین دو هفته قبل از القاء مدل بر اختلال یادگیری حیوانات می‌باشد (آنالیز واریانس یک طرفه با اندازه‌گیری تکراری و آزمون توکی- تصویر شماره 1 A-B). مقایسه سرعت شنای حیوانات در گروه‌های شاهد درمان و پیش درمان تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه بیمار نشان نداد. این نتایج به‌دست آمده تأثیر پیپرین بر یادگیری فضایی را تأیید می‌کنند (آنالیز واریانس دو طرفه با اندازه‌گیری تکراری و آزمون بونفرونی- تصویر شماره 1 C).

24 ساعت پس از اتمام دوره چهار روزه آموزش سکو برداشته شد و موش‌ها از ربع دوم (ربع مخالف سکو) رها شدند. در این بخش (آزمون پروب) به موش‌ها 60 ثانیه زمان داده شد تا بدون وجود سکو به جست و جو ادامه دهند. مدت زمان سپری شده در ربع هدف (Q4) برای ارزیابی چگونگی یادآوری محل سکو (حافظه فضایی) توسط موش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های روز پروب (مدت زمان حضور حیوان در ربع هدف) کاهش معنی‌داری (P <0/001 ***)، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی کاهش معنی‌داری) را در گروه های بیمار و شاهد درمان نسبت به گروه کنترل نشان دادند. حیوانات این گروه زمان کم‌تری را در ربع هدف سپری کرده و زمان خود را به صورت تصادفی در ربع‌های دیگر سپری کردند، این داده‌ها تأییدکننده بروز اختلال حافظه فضایی در مدل موضعی دمیلیناسیون ناحیه CA1 هیپوکامپ وداده های مشابه در گروه شاهد درمان نیز تأییدی بر بی اثر بودن حلال پیپرین بر فرآیند حافظه می‌باشد. جهت بررسی اثر پیش درمانی پیپرین بر حافظه فضایی، این شاخص زمانی بین گروه پیش درمان، شاهد درمان و بیمار مقایسه شد. زمان سپری شده در ربع هدف در گروه پیش درمان پیپرین افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های بیمار و شاهد درمان نشان داد (P <0/0001 ++++)، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی- تصویر شماره 1 D). همچنین مدت زمان سپری شده در ربع هدف در گروه پیش درمان افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت (P <0/05 *) (تصویر شماره 1 D).

پیش درمانی با پیپرین موجب تعدیل بیان ژن‌های شاخص استرس اکسیداتیو و تقویت ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی شد.

در این مطالعه سطح بیان ژن‌های iNOS, HO1 و Nrf2 در بافت هیپوکامپ با استفاده از تکنیک qRT-PCR ارزیابی شد. القاء دمیلیناسیون با لیزولسیتین در گروه بیمار (P <0/01 **) و شاهد درمان (P <0/05 *) منجر به افزایش معنی‌دار بیان iNOS نسبت به گروه کنترل شد که این افزایش نشان دهنده آن است که مدل دمیلیناسیون موضعی با لیزولسیتین سبب القاء تغییرات اکسیداتیو می‌شود. اما بیان ژن iNOS در گروه پیش درمان با پیپرین کاهش معنی‌داری نسبت به دو گروه بیمار و شاهد درمان یافت (P <0/001 +++)، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی- تصویر شماره 2 A). Nrf2 یک فاکتور رونویسی و یک فاکتور شاخص آنتی‌اکسیدانی سیستم دفاعی می‌باشد. بیان ژن Nrf2 در گروه پیش درمان با پیپرین افزایش معنی داری را نسبت به گروه‌های کنترل (P <0/0001 ****)، بیمار و شاهد درمان (P <0/001 +++) نشان داد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی- تصویر شماره 2 B). ارزیابی بیان ژن HO1 در همه گروه‌ها نشان داد که بیان این ژن در گروه پیش درمان با پیپرین افزایش معناداری را نسبت به گروه‌های کنترل (P <0/001 ***)، بیمار و شاهد درمان (P <0/001 +++) نشان داد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، تصویر شماره 2C).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

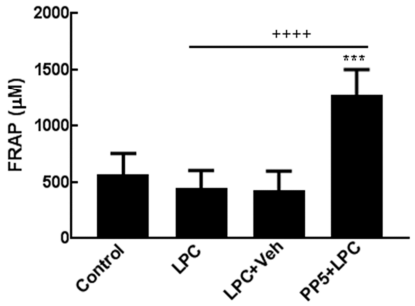


تصویر شماره 2: پیش درمانی با پیپرین موجب تعدیل بیان ژن های شاخص استرس اکسیداتیو می شود. Aبیان ژن iNOS به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در گروه بیمار(0/01> P **) و شاهد درمان(0/05> P *) نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری افزایش و در گروه پیش درمان(0/001> P +++) نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان بطور معنی داری کاهش یافت. بیان شاخص های آنتی اکسیداتیو (C) HO-1 و Nrf2 (B) گروه پیش درمان نسبت به گروه کنترل (0/001> P *** HO-1 ، 0/0001> P ****، ;Nrf2)،گروه بیمار و شاهد درمان (0/001> P +++ :Nrf2and HO-1) به طور معنی‌داری افزایش یافت.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده‌های تست FRAP با روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی نشان داد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه‌های بیمار وشاهد درمان نسبت به‌گروه‌کنترل‌کاهش نسبی داشت که تغییرات آن معنی‌دار نبود. اما پیش درمانی با پیپرین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز را به‌صورت قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل افزایش داد (0/001> P ***) و گروه بیمار و شاهد درمان (0/0001> P ++++) بالا برد (تصویر شماره 3). بنابراین القای مدل دمیلیناسیون با لیزولسیتین تا حدودی باعث ایجاد استرس اکسیداتیو شده و روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز تأثیر می‌گذارد. پیش درمانی با پیپرین با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد در محیط، فرآیند ترمیم میلین و بهبود اختلال حافظه ناشی از مدل را تسهیل نماید.

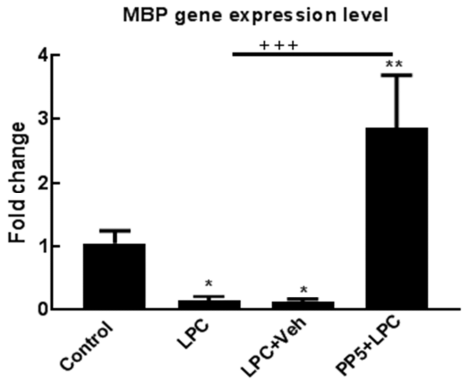
پیش درمانی با پیپرین با افزایش بیان ژن MBP ظرفیت ترمیم میلین را بالا برد.

در این مطالعه سطح بیان ژن myelin basic protein (MBP) به‌عنوان یک پروتئین ضروری جهت تشکیل و تثبیت غشای میلین در گروه‌های مختلف ارزیابی شد. داده‌های ما در گروه‌های بیمار و شاهد درمان نشان داد که بیان ژن MBP در این دو گروه به‌طور قابل توجهی پایین تر از گروه کنترل بود (0/05> P *، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، تصویر شماره 4). درگروه پیش درمان پیپرین افزایش معنی‌داری در بیان ژن MBP نسبت به دو گروه شاهد درمان و بیمار (0/001> P +++) و همچنین گروه کنترل (0/01> P **) ایجاد کرد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، تصویر شماره 4).



تصویر شماره 3: پیش درمانی با پیپرین موجب افزایش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در گروه های پیش درمان نسبت به گروه کنترل (0/001> P ***)، گروه بیمار و شاهد درمان (0/0001> P ++++) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]



تصویر شماره 4: پیش درمانی با پیپرین موجب افزایش بیان سطح MBP در بافت هیپوکمپ شد. بیان ژنMBP به‌عنوان شاخص میلین در گروه بیمار و شاهد درمان(0/05> P *) نسبت به گروه کنترل بطور معناداری کاهش و در گروه پیش درمان نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان (0/001> P +++) و کنترل (0/01> P **) بطور معناداری افزایش یافت

بحث

اختلالات شناختی از جمله اختلال حافظه و دمیلیناسیون هیپوکامپ در بیماران MS شایع است(7،6). اختلال حافظه ناشی از مدل موضعی دمیلیناسیون با لیزولسیتین در تحقیقات گذشته تأیید شده بود(30،31،36)، بنابراین در این پژوهش از این مدل جهت بررسی اثر پیپرین بر اختلال حافظه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. یافته‌های ما تایید کرد که پیش درمانی با پیپرین موجب بهبود اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از مدل موضعی دمیلیناسیون در هیپوکمپ می‌شود. پیپرین با کاهش بیان ژن iNOS موجب کاهش آسیب اکسیداتیو شده و با افزایش بیان ژن‌های HO1 و Nrf2 دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن را بالا برده و در نهایت ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان مغز را بالا می‌برد. پیش درمانی با پیپرین با افزایش بیان ژن MBP ظرفیت ترمیمی مغز را نیز بالا می‌برد. تشکیلات هیپوکامپ در اکتساب حافظه فضایی نقش عمده‌ای را بازی می‌کنند، بنابراین با ایجاد ضایعه دو طرفه در ناحیه پشتی هیپوکامپ حافظه فضایی به میزان 50-30 درصد مختل می‌شود(37). ارزیابی داده‌های رفتاری این مطالعه نشان داد که تزریق لیزولسیتین در ناحیه CA1 هیپوکامپ موجب تخریب حافظه فضایی و یادگیری در حیوانات می شود که هم راستا با مطالعات قبلی در این زمینه هست(31،30). بر طبق ارزیابی‌های انجام شده، کاهش شاخص زمان و مسافت جهت یافتن سکو در گروه کنترل در طی روزهای تست، نشانگر سلامت یادگیری حیوانات در این گروه بوده و افزایش آن‌ها در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل، بیانگر القاء اختلال یادگیری ناشی از مدل دمیلیناسیون موضعی در ناحیه CA1 هیپوکامپ می باشد. نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های Makinodon و همکاران در سال 2008 مطابقت دارد، به طوری که نشان دادند که تزریق لیزولسیتین سبب افزایش زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی شده و حافظه و یادگیری مختل شده است(38). به‌علاوه تعدادی از گزارشات شروع فرآیند استرس اکسیداتیو را در ناحیه ضایعه پس از القاء مدل لیزولسیتینی نشان داده‌اند(40،39). در مطالعه کنونی نیز افزایش بیان ژن iNOS به عنوان شاخص فرایند استرس اکسیداتیو تایید شد. این در حالی است که مکانیسم مولکولی اختلال حافظه ناشی از دمیلیناسیون هیپوکامپ در بیماری MS به‌طور دقیق مشخص نیست و درمان‌های موثری در این رابطه وجود ندارد.

در طی چند دهه اخیر، گیاهان دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌های تحلیل برنده عصبی ازجمله بیماری MS مورد توجه چشم‌گیر قرار گرفته‌اند. گواه این مدعا تاثیر بسزای پیپرین در بهبود اختلال عملکرد یادگیری و حافظه در چندین مدل حیوانی بیماری‌های تحلیل برنده عصبی است(43-41) با این وجود، مکانیسم عملکرد دارویی پیپرین به‌طور کامل مشخص نیست. نتایج مطالعات رفتاری مطالعه ما اثر پیش درمانی پیپرین بر بهبود عملکرد حافظه را در مدل موضعی دمیلیناسیون تأیید کرد. در این راستا اثر محافظتی و درمانی پیپرین در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی و اختلال شناختی ناشی از مدل‌های حیوانی آلزایمر و پارکینسون گزارش شده است(44،43،21). همچنین بررسی سرعت شنای حیوانات

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

در روزهای مختلف آزمون نیز اختلاف معنی‌داری را در بین گروه‌ها نشان نداد و این تأییدی بر این موضوع است که القاء مدل دمیلیناسیون در هیپوکامپ و یا درمان با پیپرین قبل از القاء مدل تأثیری بر سرعت حرکت حیوانات نداشته است.

استرس اکسیداتیو سهم بسزایی در پیشرفت بیماری MS دارد. آنزیم نیتریک سنتتاز القایی (iNOS) یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌باشد که با تولید نیتریک اکساید (NO) نقش مهمی را در ایجاد مسمومیت عصبی، التهاب و آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو بازی می‌کند(45). مطالعه حاضر نشان داد که تزریق لیزولسیتین به‌طور معناداری بیان ژن iNOS را افزایش داد، این در حالی بود که میزان بیان ژن‌های HO-1 و Nrf2 تحت تاثیر القاء لیزولستین قرار نگرفت. در این راستا، گزارشات متعددی نیز نشان داده‌اند که بیان ژن iNOS در نواحی دمیلینه افزایش یافته است(46،15). داده‌های ما نشان داد که پیش درمانی با پیپرین بیان ژن iNOS را بطور معناداری کاهش و بیان ژن‌های HO-1 و Nrf2 را افزایش داد. جالب توجه است که این تغییرات در مورد بیان ژن‌های HO-1 و Nrf2 نسبت به گروه کنترل نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد(تصویر شماره 2).

Nrf2 به عنوان یک فاکتور رونویسی، تنظیم پاسخ آنتی‌اکسیدانی سلول را در شرایط استرس‌زا بر عهده دارد. Nrf2 توانایی تعدیل بیان صدها ژن آنتی‌اکسیدان شامل HO-1 به‌عنوان هدف پایین دست مسیرهای Nrf2-ARE (عنصر پاسخ آنتی اکسیدان) را دارد(47). آنزیم هم اکسیژناز (HO1) در شکستن هِم به آهن، مونواکسید کربن و بیلی وردین و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو نقش دارد(48). داده‌های ما نشان داد که افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های Nrf2 و HO-1 به دنبال پیش درمانی با پیپرین، می‌تواند یکی ازمسیرهای مکانیسمی محافظت عصبی دخیل در بهبود اختلال حافظه فضایی باشد. در این راستا، در سال 2008، Kappos و همکاران گزارش دادند که دی متیل فومارات، که Nrf2 را تنظیم می‌کند، به‌طور قابل توجهی عود و ناتوانی را در طی کارآزمایی بالینی فاز3 بیماری MS، کاهش می‌دهد(49). همچنین نشان داده شد که آلکالوئیدهای جدا شده از فلفل سیاه با سرکوب iNOS و فعال کردن مسیر Nrf2/HO-1 التهاب را کاهش می‌دهند(50).

مطالعه دیگر ثابت کرد که بیان بالای HO-1 شدت آسیب‌های بالینی ناشی از القاء مدل EAE را در موش‌ها کاهش داد(51). بنابر گزارشات موجود، پیپرین می‌تواند عملکرد حافظه را از طریق آنتی اکسیدان ها و مهار رادیکال‌های آزاد بهبود ببخشد(44،52). نتایج داده‌های ما نیز افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام را در گروه پیش درمان با پیپرین نشان داد و با سایر گزارشات در این راستا مطابق بود. یافته‌های این مطالعه این فرضیه را مطرح می‌کند که اثر مثبت پیش درمانی پیپرین بر بهبود اختلال حافظه فضایی می‌تواند از طریق مکانیسم تعدیل شرایط اکسیداتیو به نفع بیان بیش‌تر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باشد.

در قسمت بعدی این مطالعه به بررسی اثرات پیپرین بر میزان بیان MBP به‌عنوان اصلی‌ترین پروتئین ساختاری میلین پرداختیم. بر اساس داده‌های ما پیش درمانی با پیپرین سطح بیان MBP را به‌طور معنی‌داری حتی تا سطح بالاتری نسبت به گروه کنترل افزایش داد. مشابه یافته‌های ما در مطالعه‌ای دیگر کورکومین باعث افزایش سطح بیان MBP در مدل انسفالومیلیت مزمن آزمایشگاهی (EAE) شد و فرایند ترمیم میلین را تسهیل کرد(15). یکی از پروتئین‌های اصلی در سطح میلین، MBP است که در اولیگودندروسیت های بالغ نیز فراوان یافت می‌شود(53). افزایش تولید اولیگودندروسیت‌ها می‌تواند توجیه کننده افزایش سطح MBP در گروه پیش درمان پیپرین باشد که در مورد کورکومین افزایش سطح اولیگودندروسیت‌ها در مدل EAE تایید شده است(15).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌طور خلاصه یافته‌های این مطالعه نشان داد که تزریق لیزولسیتین در ناحیه CA1 هیپوکامپ باعث ایجاد اختلال در یادگیری

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

و حافظه رت‌ها می‌شود که با شروع فرایندهای استرس اکسیداتیو همراه بود. در این مدل تجربی بیماری، پیش درمانی با پیپرین دو هفته قبل از القا مدل توانست باعث بهبود اختلال یادگیری و حافظه فضایی شود. به طور کلی یافته‌های ما نشان می‌دهد که اثر محافظتی پیپرین می‌تواند از طریق کاهش فرایند استرس اکسیداتیو ، تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز و افزایش سطح MBP و تسهیل ترمیم میلین در شرایط دمیلیناسیون باشد. از این رو با نگاه کلی به بررسی اثرات پیپرین در مطالعات گذشته و مطالعه فعلی می‌توان نتیجه گرفت که پیپرین می‌تواند کاندید مناسبی برای پیشگیری و درمان اختلالات شناختی ناشی از MS باشد. البته مطالعات گسترده‌تری لازم است تا به بررسی مکانیسم‌های دقیق‌تر عملکرد پیپرین در مدل‌های حیوانی بیماری MS بپردازد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل و دانشگاه دامغان و سازمان توسعه علوم و فناوری‌های شناختی به جهت اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.این مقاله بخشی از پایانامه کارشناسی ارشد می‌باشد.

References

1. Lassmann H. Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. Neuropathol Appl Neurobiol 2011; 37(7): 698-710.
2. Dutta R, Chomyk AM, Chang A, Ribaudo MV, Deckard SA, Doud MK, et al. Hippocampal demyelination and memory dysfunction are associated with increased levels of the neuronal microRNA miR 124 and reduced AMPA receptors. Ann Neurol 2013; (73): 537-645
3. Honce JM. Gray Matter Pathology in MS: Neuroimaging and Clinical Correlations. Mult Scler Int 2013; 2013: 627870.
4. Calabrese M, Rinaldi F, Grossi P, Gallo P. Cortical pathology and cognitive impairment in multiple sclerosis. Expert Rev Neurother 2011; 11(3): 425-432.
5. Bobholz JA, Rao SM. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: a review of recent developments. Curr Opin Neurol 2003; 16(3): 283-288.
6. Messina S, Patti F. Gray matters in multiple sclerosis: cognitive impairment and structural MRI. Mult Scler Int 2014; 2014: 609694.
7. Dutta R, Chang A, Doud MK, Kidd GJ, Ribaudo MV, Young EA, et al. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. Ann Neurol 2011; 69(3): 445-454.
8. Miljkovic D, Spasojevic I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal 2013; 19(18): 2286-2334.
9. Ziehn MO, Avedisian AA ,Tiwari-Woodruff S, Voskuhl RR. Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. Lab Invest 2010; 90(5): 774-786.
10. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 1993; 361(6407): 31-39.
11. Nistico R, Mori F, Feligioni M, Nicoletti F, Centonze D. Synaptic plasticity in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. Phil Trans R Soc B 2014; 369(1633): 20130162.
12. Sekeres MJ, Winocur G, Moscovitch M. The hippocampus and related neocortical

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

structures in memory transformation. Neuroscience Letters 2018; 680: 39-53.

13. Bö L, Geurts J, Mörk S, Van Der Valk P. Grey matter pathology in multiple sclerosis. Acta Neurologica Scandinavica 2006; 113(s183): 48-50.
14. Gorgani L, Mohammadi M, Najafpour GD, Nikzad M. Sequential Microwave-Ultrasound-Assisted Extraction for Isolation of Piperine from Black Pepper (Piper nigrum L.). Food Bioprocess Tech 2017; 10(12): 2199-2207.
15. Mohajeri M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Javan M. Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair. Neuropharmacology 2015; 99: 156-167.
16. Shaterpour M, Shaki F, Ghasemi M, Jafari-Sabet M, Ziar A, Ataee R. The protective effect of curcumin against lithium-induced nephrotoxicity in rats. Pharm Biomed Res 2017; 3(2): 33-38.
17. Meghwal M, Goswami TK. Piper nigrum and piperine: an update. Phytotherapy Res 2013; 27(8): 1121-1130.
18. Abrahim NN, Kanthimathi M, Abdul-Aziz A. Piper betle shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase BMC Complement Altern Med 2012; 12(1): 220.
19. Ma Y, Tian M, Liu P, Wang Z, Guan Y, Liu Y, et al. Piperine effectively protects primary cultured atrial myocytes from oxidative damage in the infant rabbit model. Mol Med Rep 2014; 10(5): 2627-2632.
20. Sabina EP, Nagar S, Rasool M. A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation—an experimental model of gouty arthritis. Inflammation 2011; 34(3): 184-192.
21. Bi Y, Qu P-C, Wang Q-S, Zheng L, Liu H-L, Luo R, et al. Neuroprotective effects of alkaloids from Piper longum in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. Pharm Biol 2015; 53(10): 1516-1524.
22. Elnaggar YS, Etman SM, Abdelmonsif DA, Abdallah OY. Intranasal Piperine Loaded Chitosan Nanoparticles as Brain Targeted Therapy in Alzheimer's Disease: Optimization, Biological Efficacy ,and Potential Toxicity. J Pharm Sci 2015; 104(10): 3544-3556.
23. Anissian D, Ghasemi-Kasman M, Khalili-Fomeshi M, Akbari A, Hashemian M, Kazemi S, et al. Piperine-loaded chitosan-STPP nanoparticles reduce neuronal loss and astrocytes activation in chemical kindling model of epilepsy. Int J Biol Macromol 2018; 107(Pt A): 973-983.
24. Chonpathompikunlert P, Wattanathorn J, Muchimapura S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. Food Chem Toxicol 2010; 48(3): 798-802.
25. Denic A ,Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. Pathophysiology 2011; 18(1): 21-29.
26. Low PA, Schmelzer JD, Yao JK, Dyck PJ, Parthasarathy S, Baumann WJ. Structural specificity in demyelination induced by lysophospholipids. Biochim Biophys Acta Mol Cell 1983; 754(3): 298-304.
27. Jeffery ND, Blakemore WF. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. J Neurocytol 1995; 24(10): 775-781.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

28. Sahel A, Ortiz FC, Kerninon C, Maldonado PP, Angulo MC, Nait-Oumesmar B. Alteration of synaptic connectivity of oligodendrocyte precursor cells following demyelination. Front Cell Neurosci 2015; 9: 77.
29. Pourabdolhossein F, Mozafari S, Morvan-Dubois G, Mirnajafi-Zadeh J, Lopez-Juarez A, Pierre-Simons J, et al. Nogo receptor inhibition enhances functional recovery following lysolecithin-induced demyelination in mouse optic chiasm. PloS One 2014; 9(9): e106378.
30. Majd AM, Tabar FE, Afghani A, Ashrafpour S, Dehghan S, Gol M, et al. Inhibition of GABA A receptor improved special memory impairment in the local model of demyelination in rat hippocampus. Behav Brain Res 2018; 336: 111-121.
31. Khezri S, Dasht Bozorgi N, Rahmani F. The Effect of Caffeine on the Myelin Repair Following Experimental Demyelination Induction in the Adult Rat Hippocampus. Journal of Cell and Molecular Research 2016; 8(1): 15-24.
32. Bae G-S, Kim M-S, Jung W-S, Seo S-W, Yun S-W, Kim SG, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. Eur J Pharmacol 2010; 642(1-3): 154-162.
33. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods 1984; 11(1): 47-60.
34. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem 1996; 239(1): 70-76.
35. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999; 299: 15-27.
36. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tiraihi T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. Cell Mol Neurobiol 2010; 30(2): 289-299.
37. Broadbent NJ, Squire LR ,Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(40): 14515-14520.
38. Makinodan M, Tatsumi K, Okuda H, Manabe T, Yamauchi T, Noriyama Y, et al. Lysophosphatidylcholine induces delayed myelination in the juvenile ventral hippocampus and behavioral alterations in adulthood. Neurochem Int 2008; 53: 374-381.
39. Plemel JR, Michaels NJ, Weishaupt N, Caprariello AV, Keough MB, Rogers JA, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: A primary lipid disrupting myelinopathy. Glia 2018; 66(2): 327-347.
40. Yazdi A, Baharvand H, Javan M. Enhanced remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice under treatment with fingolimod (FTY720). Neuroscience 2015; 311: 34-44.
41. Mao K, Lei D, Zhang H, You C. Anticonvulsant effect of piperine ameliorates memory impairment, inflammation and oxidative stress in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy. Exp Ther Med 2017; 13(2): 695-700.
42. Moghadamnia AA, Zangoori V, Zargar-Nattaj SS, Tayebi P, Moghadamnia Y, Jorsaraei SG. Effect of breastfeeding piperine

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

on the learning of offspring mice: interaction with caffeine and diazepam. J Exp Pharmacol 2010; 2: 111-120.

43. Wang C, Cai Z, Wang W, Wei M, Kou D, Li T, et al. Piperine attenuates cognitive impairment in an experimental mouse model of sporadic Alzheimer's disease. J Nutr Biochem 2019; 70: 147-155.
44. Khalili-Fomeshi M, Azizi MG, Esmaeili MR, Gol M, Kazemi S, Ashrafpour M, et al. Piperine restores streptozotocin-induced cognitive impairments: Insights into oxidative balance in cerebrospinal fluid and hippocampus. Behav Brain Res 2018; 337: 131-138.
45. Choudhury MG, Saha N. Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by Lipopolysaccharide and the Influences of Cell Volume Changes, Stress Hormones and Oxidative Stress on Nitric Oxide Efflux from the Perfused Liver of Air-Breathing Catfish, Heteropneustes fossilis. PloS One 2016; 11(3): e0150469.
46. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. Nat Neurosci 2013; 16(9): 1211-1218.
47. Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. Mutat Res 2010; 690(1-2): 12-23.
48. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. Biochem Pharmacol 2010; 80(12): 1895-1903.
49. Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. Lancet 2008; 372(9648): 1463-1472.
50. Ngo QT, Tran PT, Tran MH, Kim JA, Rho SS, Lim CH, et al. Alkaloids from Piper nigrum exhibit antiinflammatory activity via activating the Nrf2/HO1 pathway. Phytother Res 2017; 31(4): 663-670.
51. Liu Y ,Zhu B, Luo L, Li P, Paty DW, Cynader MS. Heme oxygenase-1 plays an important protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroreport 2001; 12(9): 1841-1845.
52. Yusuf M, Khan M, Khan RA, Ahmed B. Preparation, characterization, in vivo and biochemical evaluation of brain targeted Piperine solid lipid nanoparticles in an experimentally induced Alzheimer's disease model. J Drug Target 2013; 21(3): 300-311.
53. Cameron-Curry P, Le Douarin NM. Oligodendrocyte precursors originate from both the dorsal and the ventral parts of the spinal cord. Neuron 1995; 15(6): 1299-1310.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]