

Synergistic Effects of Piperine and Memantine on Reducing the Symptoms of Depression and BDNF Expression in Corticosterone Model of Depression in Amygdala and Hippocampus of Rat Brain

Kazem Namazi¹,
Hosein Asgarian Emran²,
Amin Ataie³,
Mohammad Karami⁴,
Ramin Ataee⁵,
Hossein Khaleghzadeh-Ahangar^{6,7},
Mahdi Mahmoudi³,
Amir Hossein Pouladi³

¹ Medical Student, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

⁴ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari Iran

⁵ Associate Professor, Medicinal Plants Research Center, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

⁷ Immunoregulation Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received October 30, 2022 ; Accepted June 18, 2023)

Abstract

Background and purpose: Depression is a common psychiatric disorder. There are some studies about anti-depressant effect of piperine. This study is about the synergistic effect of piperine and memantine on behavior improvement and BDNF gene expression in depression model in rat brain.

Materials and methods: In this experimental study, Wistar rats were divided into four groups: Negative control which received no drug, Positive control that received only 20 mg/kg corticosterone i.p., group 3 which received corticosterone+piperine (10 mg/kg, i.p.), and group 4 that received corticosterone + piperine (10mg/kg) + memantine (3mg/kg). After three weeks, the forced swim test for depression, the Plus-Maze test for anxiety and Openfield test for locomotor activity assay were done. Data analysis was carried out by One-way ANOVA and Tukey's test. The study of BDNF gene expression was also performed using Real-time PCR.

Results: The results of water swim test and plus-maze showed a significant difference between corticosterone+piperine+memantine group and corticosterone+piperine ($P < 0.05$). The gene expression study revealed that increased expression of BDNF occurred in piperine+corticosterone group and piperine+memantine+corticosterone group compared with corticosterone alone group and piperine+corticosterone+memantine group compared with piperine+corticosterone group ($P < 0.05$).

Conclusion: In current study, piperine and memantine alone and in combination diminished depression and anxiety that also caused increased BDNF expression.

Keywords: piperine, depression, corticosterone, memantine

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (223): 1-10 (Persian).

Corresponding Author: Ramin Ataee - Medicinal Plants Research Center, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, and Sari Iran (E-mail: raminataee1349@gmail.com)

تاثیر درمان هم افزایی پی پرین و ممانتین در کاهش علائم افسردگی و بیان BDNF در آمیگدال و هیپوکامپ مغز در مدل افسردگی اضطرابی ناشی از کورتیکوسترون در موش صحرایی

کاظم نمازی¹
حسین عسگریان عمران²
امین عطایی³
محمد کرمی⁴
رامین عطایی⁵
حسین خالق زاده آهنگر^{6و7}
مهدی محمودی³
امیر حسین پولادی³

چکیده

سابقه و هدف: افسردگی یکی از شایع ترین اختلالات روانی است. در رابطه با اثر ضد افسردگی پی پرین، مطالعاتی وجود دارد، لذا این مطالعه به بررسی اثر هم افزایی پیپرین و ممانتین در بهبود رفتاری علائم افسردگی در مدل حیوانی و بیان BDNF در مغز موش می پردازد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، موش های صحرایی نژاد ویستار به 4 گروه تقسیم شدند: 1- هیچ دارویی به آن ها تزریق نشد، 2- دریافت کورتیکواسترون (20mg/kg) به صورت داخل صفاقی، 3- دریافت کورتیکوسترون و پی پرین (10mg/kg) به صورت داخل صفاقی و 4- علاوه بر کورتیکوسترون، پی پرین (10mg/kg) و ممانتین (3mg/kg) دریافت کردند. پس از اتمام دوره سه هفته ای، آزمون شنای اجباری جهت بررسی افسردگی، آزمون Plus-Maze جهت بررسی اضطراب و آزمون open-field جهت بررسی فعالیت لوموتور صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل داده ها از طریق Post test Tukey و One-way ANOVA انجام گرفت. جهت بررسی بیان ژن BDNF از بافت های مغزی، روش real time PCR به کار رفت.

یافته ها: آزمون شنای اجباری و Plus-Maze نشان داد که بین گروه درمانی (کورتیکوسترون+ پی پرین+ ممانتین) و گروه (کورتیکوسترون+ پی پرین) تفاوت معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$). هم چنین نتایج realtime PCR نشان داد که افزایش معنی دار بیان BDNF در گروه های (پی پرین+ کورتیکوسترون) و (پی پرین+ کورتیکوسترون+ ممانتین) نسبت به گروه کورتیکوسترون تنها و در گروه (کورتیکوسترون+ پی پرین+ ممانتین) در مقایسه با (کورتیکوسترون+ پی پرین) وجود داشت ($P < 0/05$).

استنتاج: این مطالعه نشان داد که پی پرین و ممانتین به تنهایی و به صورت هم افزایی می توانند به طور معنی دار باعث کاهش علائم افسردگی و اضطراب در موش صحرایی گردند، که این کاهش افسردگی با افزایش بیان BDNF در مغز رت همراه بوده است.

واژه های کلیدی: پی پرین، افسردگی، کورتیکوسترون، ممانتین

مقدمه

افسردگی یکی از شایع ترین اختلالات روانی می باشد و 10 تا 20 درصد عموم مردم، افسردگی در حد خفیف تا شدید را تجربه می کنند و 15 درصد افراد حداقل یک بار در طول زندگی با آن مواجه می شوند (1). درمان های دارویی

E-mail: raminataee1349@gmail.com

مؤلف مسئول: رامین عطایی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

1. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استاد، مرکز ایمونونوتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استادیار، گروه داروشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران
4. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، انستیتو هموگلوبین پاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
6. استادیار، گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران
7. مرکز تحقیقات تنظیم ایمنی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: 1401/8/8 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/9/21 تاریخ تصویب: 1402/3/28

در دسترس برای اختلال افسردگی شامل گروه داروهای چند حلقه‌ای، گروه داروهای مهارکننده اختصاصی باز جذب سروتونین (SSRI)، گروه داروهای مهارکننده آنزیم مونوآمین اکسیداز (MAOI) و چند نمونه داروی جدید مانند بوپروپیون، نفازودون، ونلافاکسین و غیره می‌باشند (2-5). داروها عمدتاً از طریق تغییر میزان آزاد شدن انتقال دهنده‌های عصبی (نوروترانسمیترها) و یا فعال یا غیرفعال کردن گیرنده‌ها آثار خود را اعمال می‌نمایند (2). عموماً داروهای در دسترس دارای عوارض جانبی ناخواسته مزاحم و گاهی خطرناک می‌باشند. لذا جهت گیری به سمت معرفی داروهای مؤثر و در عین حال با عوارض جانبی کم‌تر، منطقی به نظر می‌رسد. پی‌پرین، آلکالوئیدی است که به‌طور طبیعی در *Piper nigrum* و *Piper longum* یافت می‌شود. *Piper longum*، *Piper nigrum* و *Piper cubeba* درخت‌های گل‌داری شبیه درخت مو (flowering vines) می‌باشند که در تیره پی‌پراسه (*Piperaceae*) قرار دارند (2). در سال‌های اخیر مطالعاتی در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانت و محافظت عصبی پی‌پرین و به‌خصوص در بیماری افسردگی انجام یافته و حتی نتایجی در ارتباط با تاثیر پی‌پرین در افسردگی به‌دست آمده است (2).

NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor) گیرنده‌ای برای نوروترانسمیتر تحریکی گلو تامات است، که متعاقب تحریک دردناک محیطی آزاد می‌شود. گیرنده گلو تامات NMDA در حقیقت یکی از گیرنده‌های مهم کانال یونی است که واسطه انتقال عصبی تحریکی سریع در سیستم اعصاب مرکزی بوده و نقش مهمی را در پدیده حساس شدگی مرکزی (central sensitization) ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر نقش این رسپتور و داروهای محرک یا مهارکننده آن در برخی از بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله آلزایمر و هم‌چنین افسردگی بررسی و تأیید شده است (4). به‌طوری که برخی مطالعات نشان داده که ممانتین به‌عنوان آنتاگونیست رسپتور NMDA خواص ضد افسردگی دارد (5). در رابطه با

بررسی مکانیسم اثر ضد افسردگی پی‌پرین مطالعاتی صورت گرفته و بخصوص نشان داده شده که در مدل افسردگی اضطرابی (توسط کورتیکوسترون) توانسته اثرات مفیدی داشته باشد (2). هم‌چنین نشان داده شده که پی‌پرین باعث افزایش غلظت BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) در هیپوکامپ و قشر مغز شده است (1). در برخی مطالعات نیز به اثرات آنتی‌اکسیدانتی پی‌پرین و کاهش TNF α و استرس اکسیداتیو در مغز اشاره داشته است (6). اگرچه مطالعاتی در رابطه با مکانیسم ضد افسردگی پی‌پرین وجود دارد، اما مکانیسم دقیق ضد افسردگی آن مشخص نیست و به‌خصوص آن که بررسی تداخل مسیر NMDA توسط پی‌پرین در نواحی مزولیمبیک مغز وجود ندارد و این مطالعه برای اولین بار به بررسی این تداخل در این مسیر به‌خصوص در مدل افسردگی اضطرابی در موش می‌پردازد. در واقع در این مطالعه به‌دنبال بررسی اثر هم‌افزایی پی‌پرین و ممانتین در بهبود رفتاری علائم افسردگی در مدل موشی بودیم. هم‌چنین در خصوص ممانتین به عنوان آنتاگونیست NMDA اگرچه مطالعاتی در خصوص کاهش علائم اضطرابی وجود دارد، اما در خصوص تداخل آن با پی‌پرین مطالعاتی وجود ندارد و این مطالعه به عنوان اولین بار به بررسی این موضوع پرداخته است. هدف این مطالعه بررسی اثرات ضد افسردگی پی‌پرین و ممانتین به تنهایی و به‌صورت هم‌افزایی و تاثیر آن‌ها در بیان BDNF در آمیگدال و هیپوکامپ مغز موش صحرایی بوده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی بوده و بر روی جمعیت موش‌های صحرایی (Rat) از نژاد Wistar انجام شده است. موش‌های صحرایی با وزن 200 الی 250 گرم در حیوانخانه مجتمع پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران در درجه حرارت 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد با سیکل روشنایی خاموشی 12 ساعته نگهداری شدند و

آب و غذای استاندارد موش (پارس، ایران) همیشه به جز در هنگام آزمایشات در اختیار حیوانات قرار گرفت و از هر حیوان نیز فقط یک بار استفاده شد. لازم به ذکر است که کلیه مطالعات حیوانی بر اساس پروتکل های اخلاق پژوهشی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوبه دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1400.4973 انجام شده است. جهت ایجاد مدل افسردگی، کورتیکوسترون در PBS حاوی Tween-80 0/1 درصد به صورت سوسپانسیون در آمد و به موش ها در دوز 20 mg/kg به صورت داخل صفاقی (IP) به مدت سه هفته متمادی تزریق شد. تجویز پی پرین در دوز 10 mg/kg به صورت داخل صفاقی به مدت 3 هفته همزمان با کورتیکوسترون به موش های گروه درمانی انجام شد. ممانتین 15 دقیقه قبل از پی پرین به مقدار 3 mg/kg به طور داخل صفاقی تجویز شد (۲۰۱).

گروه های درمانی

موش ها به طور تصادفی به 4 گروه 5 تایی تقسیم شدند: گروه اول (کنترل) که هیچ دارویی به آن ها تزریق نشد و تنها نرمال سالین 0/5 درصد (به عنوان حامل دارویی) دریافت کردند.

گروه دوم که تحت تجویز کورتیکواسترون 20 mg/kg طی 3 هفته به صورت IP قرار گرفتند (1). از کورتیکوسترون جهت القای افسردگی اضطرابی استفاده می شود.

گروه سوم، علاوه بر دریافت کورتیکوسترون پی پرین را در دوز 10mg/kg به صورت IP به مدت سه هفته دریافت کردند. پی پرین نیم ساعت قبل از کورتیکوسترون تجویز شد.

گروه چهارم، شامل موش هایی بود که تحت تجویز کورتیکوسترون قرار گرفتند و سپس به آن ها پی پرین و ممانتین تزریق شد. در گروه دریافت کننده ممانتین، ممانتین 15 دقیقه قبل از پی پرین به ترتیب به مقدار 3 mg/kg به طور داخل صفاقی تجویز شد (2). پس از

اتمام دوره تجویز دارو جهت بررسی اثرات داروها در مدل افسردگی اضطرابی، آزمون های شنای اجباری و Plus-Maze و برای بررسی فعالیت لوکوموتور، آزمون Open-field انجام شد. تست پلاس میز (Plus Maze) برای بررسی اضطراب (anxiety) در حیوان به کار می رود. در این آزمایش به حیوان مدت 5 دقیقه فرصت داده می شود تا آزادانه در قسمت های مختلف ماز حرکت کند. ورود به بازوی باز یا بسته هنگامی است که هر چهار دست و پای حیوان در راهروی مورد نظر قرار گیرد. تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و بسته و زمان حضور حیوان در بازوهای باز و بسته اندازه گیری می شود و درصد زمان گذرانده در بازوهای باز نسبت به مدت زمان کل اقامت در بازوهای باز و بسته محاسبه می گردد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار می گیرد. هر چه موش مدت زمان بیش تری در بازوی باز باشد بیانگر کاهش اضطراب موش است (۸،۷). فعالیت لوکوموتور یا فعالیت حرکتی موش توسط دستگاه (open feild) اندازه گیری شد. اوپن فیلد (open feild) مکعبی است که در کف مربعی شکل به ابعاد 100 در 100 سانتی متر به ارتفاع 30 سانتی متر تشکیل شده است. سطح مکعب از 25 مربع برابر تشکیل شده است. 24 ساعت پس از آخرین تزریق دارو بین ساعت 7 الی 8 صبح موش صحرایی در مرکز مربع قرار داده می شود و تعداد عبورها و عقب رفتن ها از مربع ها immobility time rearing time، Crossing time اندازه گیری می شود (۸،۷).

تست شنای اجباری (Force swimming) بین ساعت 9 الی 10 صبح، پس از تست اوپن فیلد اندازه گیری می شود. در تست شنای اجباری، موش ها نباید کف تانک را لمس نمایند. ارتفاع تانک 60 سانتی متر و قطر تانک 30 سانتی متر و آب 25 درجه تا ارتفاع 35 سانتی متر پر می شود. هر موش به تنهایی به مدت 5 دقیقه در تانک قرار داده می شود و به مدت 5 دقیقه زیر نظر قرار می گیرد و مدت بی حرکتی توسط همان محقق اندازه گیری می شود. برای هر موش زمانی بی حرکت تعریف می شود

مقدار یک میلی لیتر اتانول 75 درجه اضافه شده و به آرامی مخلوط گردید. سپس میکروتیوب به مدت 5 دقیقه در 4°C و 7500g سانتریفوژ گردید و سپس مایع رویی توسط سمپلر دور ریخته می شود. غلظت RNA با روش تعیین دانسیته نوری (optical density: OD) توسط دستگاه Nano drop اندازه گیری شد و RNA در طول موج های 260 و 280 ارزیابی گردید. جذب نوری معادل یک به معنای وجود 40 میکروگرم RNA در هر میلی لیتر از محصول استخراج شده است. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده $2\mu\text{g}$ از آن را به روش ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت و باندهای 18S و 28S مشاهده گردید. بعد از استخراج RNA توسط کیت تهیه cDNA، (Fermantas) Revert AID First Strand cDNA Synthesis RNA تبدیل به cDNA گردید. اندازه گیری سطوح بیان ژن های هدف در دستگاه Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System و با استفاده از کیت RealQ Plus Master Mix Green (ampliqon) در سه تکرار تکنیکال صورت گرفت. چرخه دمایی مورد استفاده به صورت 95 درجه سانتی گراد 10 دقیقه، 95 درجه سانتی گراد 15 ثانیه، 61 درجه سانتی گراد 40 ثانیه در 40 چرخه بوده و حداقل یک کنترل منفی (NTC) برای هر پرایمر در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه برای همه پرایمرهای استفاده شده در واکنش Real-time PCR، stock های 10 درصد از stock اولیه $100\mu\text{l}$ تهیه شد و سپس حجم های لازم از پرایمرها وارد $20\mu\text{l}$ مخلوط واکنش شد. هم چنین در این مطالعه در هر μl از cDNA به میزان 15ng نمونه وجود داشت. مواد لازم جهت انجام Real-time PCR در جدول شماره 1 نشان داده شده اند.

جدول شماره 1: مواد لازم برای Real time PCR

حجم	ماده
10 μL	Master Mix Green
7 μL	ddH ₂ O
0/5 μL	Forward Primer
0/5 μL	Reverse Primer
2 μL	cDNA
20 μL	کل

که از تقلا کردن دست بکشد و در آب به شکل شناور قرار بگیرد و تنها برای خارج کردن سر از آب حرکت لازم باشد. آب تانک با هر موش عوض می شود. مدت بی حرکتی بیانگر معیاری از افسردگی است. پس از اخذ و ثبت اطلاعات و جمع بندی برای تحلیل آماری، از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و Post-Tukey test استفاده شد. اختلاف بین گروه ها با $P < 0/05$ در هر نقطه از نظر آماری معنی دار تلقی شد. جهت استخراج RNA و Real time PCR، ابتدا بخش آمیگدال و هیپوکامپ بافت مغز موش با کمک اطلس آناتومی جدا شده و توسط دستگاه هموژنایزر به خوبی هموژن گردید. سپس با سرنگ 2cc و سر سرنگ 20cc، 10 بار محلول بافت مغز و تریزول آسپیره گردید تا کاملاً محلول یکنواختی ایجاد شود. سپس محلول هموژن به لوله های 1/5 ml منتقل شد و بعد از 5 دقیقه وقفه به ازای هر یک میلی لیتر از آن مقدار 200 میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد و لوله به مدت 15 ثانیه شدیداً مخلوط گردید و سپس به مدت 15 دقیقه در حرارت 4°C و با 12000 سانتریفوژ گردید. سه لایه حاصل آمد: لایه رویی (upper phase) حاوی RNA، لایه حد واسط (Mid phase) حاوی DNA و لایه زیرین که پروتئین ها در آن بودند.

فاز بالایی که حاوی RNA است با دقت زیاد و با استفاده از سرسمپلرهای عاری از RNase به لوله ی جدید 1/5 میلی لیتری که عاری از RNase بود منتقل شد (از تماس نوک سرسمپلر با لایه میانی تا حد امکان اجتناب گردید). سپس هم حجم محلول جدا شده ایزوپروپانول (حدود 500 میکرولیتر) و 5 میکرولیتر گلیکوژن به لوله ها اضافه شد. بعد از 5 تا 10 ثانیه تکان دادن لوله ها، لوله ها 10 دقیقه در دمای اتاق ساکن ماندند و پس از آن به مدت 10 دقیقه در حرارت 4°C با دور 12000 سانتریفوژ گردیدند تا با خارج کردن محلول رویی که حاوی پروتئین است، رسوب RNA در ته لوله باقی بماند. برای خارج کردن کامل کلروفرم، رسوب RNA با اتانول 75 درصد شستشو داده شد. به این منظور به رسوب RNA

معنی دار در گروه‌های مختلف از P-value استفاده شد. مقادیر P کم تر از 0/05 معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

در جدول شماره 3، میانگین و انحراف استاندارد نتایج Plus-Maze و شنای اجباری نمایش داده شده است. از آزمون One-way ANOVA جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. این آزمون نشان داد که تفاوت معنی داری در هر متغیر بین گروه‌ها وجود دارد. از آزمون دانکن جهت آزمون تعقیبی استفاده شد. این آزمون نشان داد که تفاوت معنی داری در تست Plus-Maze بین گروه کنترل و دو گروه کورتیکوسترون + پی پرین و گروه کورتیکوسترون + پی پرین + ممانتین وجود دارد ($P < 0/05$). هم چنین نشان داده که تفاوت معنی داری در تست شنای اجباری بین گروه کنترل و کورتیکوسترون با دو گروه دیگر وجود دارد ($P < 0/05$).

در نمودار شماره 1، مربوط به تست Plus Maze، مدت زمان اقامت در بازوی باز به کل اقامت در بازوی باز و بسته بر حسب ثانیه در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. اقامت بیش تر در بازوی باز بیانگر کاهش اضطراب است. کم ترین زمان اقامت در بازوی روشن در گروه کورتیکوسترون + پی پرین می باشد که نشان دهنده بیش ترین میزان اضطراب در این گروه است و بیش ترین زمان اقامت در بازوی باز در گروه کنترل می باشد که نشان دهنده کم ترین میزان اضطراب است.

در نمودار شماره 2، مربوط به آزمون شنای اجباری، مدت زمان بی حرکتی بر حسب ثانیه در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. مدت زمان بی حرکتی بیش تر، بیانگر افزایش علائم افسردگی است. کم ترین

در آخر cDNA را به میزان 2 μ l به هر ویال استریپ اضافه کردیم و در نهایت استریپ‌ها را به دستگاه Real time PCR انتقال دادیم تا تحت برنامه داده شده به دستگاه عمل کند. پرایمرهای استفاده شده متعلق به شرکت Metabion international AG بودند. توالی پرایمرها در جدول شماره 2 نشان داده شده اند.

جدول شماره 2: پرایمرهای مورد استفاده برای Real time PCR

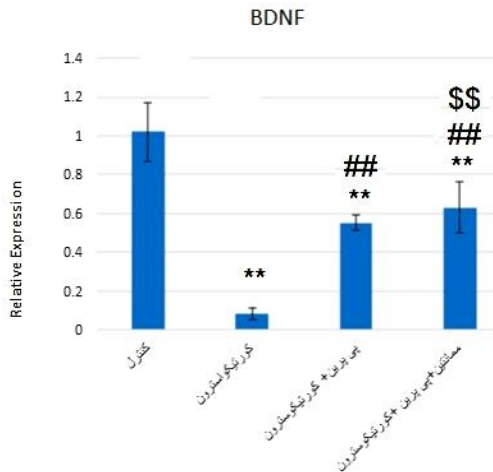
طول پرایمر	سکانس پرایمر	ژن
159bp	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA G-3'	GAPDH F
	5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT C-3'	GAPDH R
152bp	5'-TCTACGAGACCAAGTGTAATCC-3'	BDNF F
	5'-TATGAACCGCCAGCCAAT-3'	BDNF R

شرایط سیکل دمایی Real time PCR برای ژن BDNF به قرار ذیل بود: یک مرحله 95°C برای 10 دقیقه به جهت فعال سازی آغازی آنزیم پلیمرز، در ادامه 40 سیکل که شامل 95°C برای 5 ثانیه و 61°C برای 40 ثانیه می باشد برای مرحله anealing/extention صورت می گیرد و در نهایت برای رسم منحنی ذوب (Melt Curve Analysis) 95°C برای 15 ثانیه، 61°C برای 15 ثانیه و 95°C برای 15 ثانیه صورت می گیرد. تمام یافته‌های آماری با کمک نرم افزار نسخه 21 SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای آنالیز نتایج مربوط به بررسی کمی بیان ژن، بیان ژن‌های BDNF به وسیله بیان ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع نرمال سازی شد. اطلاعات آماری با به کار بردن متد $\Delta\Delta\text{CT}2$ نمایش داده شد و متوسط متغیرها بیان شد. پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده توسط آزمون kolmogorov smirnov، اختلافات برای بیان ژن بین گروه کنترل و گروه مورد به وسیله آزمون آماری T مورد تخمین قرار گرفت. جهت محاسبه اختلاف

جدول شماره 3: میانگین و انحراف استاندارد نتایج پلاس میز و شنای اجباری

سطح معنی داری	کنترل			
	کورتیکوسترون و پی پرین و ممانتین (انحراف معیار \pm میانگین)	کورتیکوسترون و پی پرین (انحراف معیار \pm میانگین)	کورتیکوسترون (انحراف معیار \pm میانگین)	کنترل (انحراف معیار \pm میانگین)
0/019	1/84 \pm 4/11	74 \pm 1/65	6/82 \pm 5/29	14/58 11/36
0/001 >	64/80 \pm 11/77	75/00 \pm 18/75	119/20 \pm 9/55	100/25 9/50

کنترل نشان داده شده است. که در این نمودار معیار سنجش گروه کنترل منفی 1 در نظر گرفته شد و در تمامی گروه‌ها کاهش معنی‌داری در بیان ژن BDNF نسبت به گروه کنترل وجود دارد. درحالی که در گروه‌های کورتیکوسترون + پی‌پرین و کورتیکوسترون + پی‌پرین + ممانتین نسبت به گروه کورتیکوسترون بیان ژن BDNF افزایش یافته که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. هم‌چنین بیان ژن BDNF در گروه کورتیکوسترون + پی‌پرین + ممانتین نسبت به گروه کورتیکوسترون + پی‌پرین افزایش مختصری داشته که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0/05$).



نمودار شماره 3: نمودار ستونی میانگین BDNF به تفکیک گروه

** : Significant: $P < 0.05$ compared with control

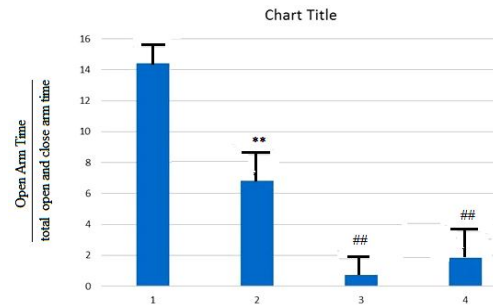
: Significant: $P < 0.05$ compared with corticosterone

\$\$: Significant: $P < 0.05$ compared with corticosterone+Piperine

بحث

در مطالعه حاضر اثرات ضد افسردگی و ضد اضطرابی پی‌پرین و ممانتین و بیان BDNF مغزی در مدل افسردگی اضطرابی ناشی از تجویز کورتیکوسترون در 4 گروه مورد مطالعه بررسی شد و بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری دیده شد، به طوری که میانگین بیان BDNF در گروه کورتیکوسترون نسبت به کنترل منفی و گروه پی‌پرین نسبت به کورتیکوسترون و گروه ممانتین + پی‌پرین نسبت

زمان بی‌حرکتی در گروه کورتیکوسترون + پی‌پرین + ممانتین می‌باشد که نشان‌دهنده کاهش علائم افسردگی در این گروه است و بیش‌ترین زمان بی‌حرکتی در گروه کورتیکوسترون می‌باشد که نشان‌دهنده افزایش علائم و رفتارهای افسردگی مانند در این گروه است.

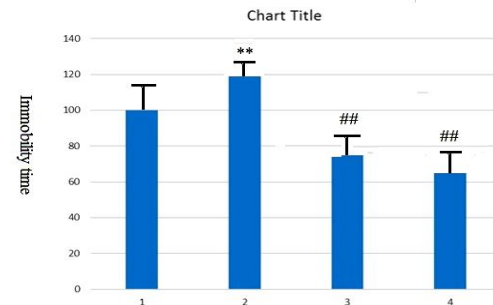


نمودار شماره 1: نمودار پلاس میز یا تست اضطرابی - محور Y نسبت

مدت زمان اقامت در بازوی باز نسبت به کل زمان اقامت در بازوی بازوبسته براساس ثانیه 1- گروه کنترل 2- گروه کورتیکوسترون 3- گروه کورتیکوسترون + پی‌پرین 4- گروه کورتیکوسترون پی‌پرین و ممانتین

** : Significant compared with control $P < 0.01$

: Significant compared with corticosterone $P < 0.01$



نمودار شماره 2: نمودار شنای اجباری یا تست افسردگی - محور Y

مدت زمان بی‌حرکتی (immobility) براساس ثانیه 1- گروه کنترل 2- گروه کورتیکوسترون 3- گروه کورتیکوسترون + پی‌پرین 4- گروه کورتیکوسترون پی‌پرین و ممانتین

** : Significant compared with control $P < 0.01$

: Significant compared with corticosterone $P < 0.01$

در نمودار شماره 3، بررسی بیان ژن BDNF در

گروه‌های کورتیکوسترون و کورتیکوسترون + پی‌پرین و کورتیکوسترون + پی‌پرین + ممانتین نسبت به گروه

به کورتیکواسترون معنی دار بوده است، که بیانگر افزایش بیان BDNF توسط پی پرین و ممانتین است و هم چنین هم افزایی معنی دار بین ممانتین و پی پرین مشاهده شد. براساس مطالعات مختلف و با پیشرفت علوم اعصاب، هیپوکامپ ممکن است نقش مهمی در پایه عصبی سندرم‌های افسردگی ایفا کند (9). تا به امروز، مکانیسم‌های آسیب عصبی هیپوکامپ در افسردگی هنوز کشف نشده است (10، 11). دو آزمون رایج برای ارزیابی فعالیت ضدافسردگی، آزمون شنای اجباری (FST) و آزمون معلق ماندن دم (TST) می‌باشد که هر دو بر پایه مشاهده زمانی هستند و در آن‌ها جوندگان در یک وضعیت گریزناپذیر قرار گرفته‌اند و بعد از تلاش‌های اولیه برای فرار، حیوانات به سرعت وضعیت بی‌حرکتی را می‌پذیرند (12). محققین معتقدند این تغییر رفتار منعکس کننده رفتار ناامیدی است.

در مطالعه بایراملو و همکاران، اعمال استرس به حیوانات تحت آزمون، منجر به افزایش معنی دار مدت زمان بی‌حرکتی در مقایسه با گروه کنترل شد که این امر حاکی از ابتلا حیوانات به اختلال افسردگی بود (13). در بعضی مطالعات درمان پی پرین به طرز چشمگیری سرکوب افسردگی را نشان می‌دهد و آزمون شنای اجباری و تست دم معلق به طور گسترده‌ای برای ارزیابی اثرات ضد افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرند (14). طبق گزارش‌ها تزریق مکرر کورتیکواسترون باعث افزایش قابل ملاحظه بی‌حرکتی موش‌ها در آزمایش شنای اجباری و تعلیق دم می‌شود که می‌تواند با استفاده از داروهای ضد افسردگی و درمان طب سوزنی معکوس شود (14-16).

مطالعات بالینی نشان داده است که سطح BDNF در خون بیماران افسرده کاهش یافته است؛ در حالی که به نظر می‌رسد درمان ضد افسردگی سطح BDNF را عادی می‌کند. بر اساس مطالعات بالینی بیان BDNF در حیوانات افسرده کاهش یافته است که می‌تواند با درمان طولانی مدت ضد افسردگی معکوس شود. علاوه بر این، مطالعات متعددی گزارش داده‌اند که درمان حیوانات با

کورتیکواسترون آگزوژن باعث کاهش معنی داری در بیان BDNF در هیپوکامپ و قشر فرونتال می‌شود (17).

ممانتین برای درمان بیماری آلزایمر متوسط تا شدید استفاده می‌شود (18). در مطالعه Réus در موش‌های دارای استرس که سالیین به آن‌ها تزریق شد، سطح پروتئین BDNF در قشر جلوی مغز، هیپوکامپ و آمیگدال تغییر نکرد، اما درمان با ممانتین در حیوانات تحت استرس باعث افزایش سطح پروتئین BDNF در قشر جلوی مغز شد (19).

Mao و همکاران در مطالعه خود دریافتند که تزریق به‌طور مداوم کورتیکواسترون به مدت 21 روز باعث افزایش معنی داری در مدت زمان عدم تحرک موش‌ها در آزمایش شنای اجباری و تعلیق دم می‌شود و درمان با پی پرین می‌تواند این تغییرات را کاهش دهد (2). روی هم رفته، نتایج به دست آمده از مطالعات رفتاری نشان می‌دهد که درمان با پی پرین شبیه به ماده ضد افسردگی در موش‌های تحت درمان با کورتیکواسترون عمل کرده است. آن‌ها بر روی BDNF، یکی از شاخص‌ترین فاکتورهای عصبی در سیستم عصبی مرکزی، به عنوان یک هدف برای مطالعه مکانیسم‌های تحت تأثیر اثرات ضد افسردگی پی پرین، تمرکز کردند. در این مطالعه تزریق 3 هفته‌ای کورتیکواسترون به‌طور معنی داری باعث کاهش پروتئین BDNF و mRNA در هیپوکامپ موش‌ها شد. درمان پی پرین به‌طور قابل ملاحظه‌ای تغییرات ناشی از کورتیکواسترون در بیان BDNF را معکوس می‌کند و نشان می‌دهد BDNF ممکن است در اثر ضد افسردگی پی پرین نقش داشته باشد (2). هم چنین نشان داده شده است که درمان با پی پرین می‌تواند در برابر سمیت عصبی ناشی از کورتیکواسترون در سلول‌های فئوکروموسیتومای موش محافظت ایجاد کند که احتمالاً با مهار استرس اکسیداتیو و تنظیم سطح BDNF mRNA همراه است (2). در مطالعه Réus و Amidfar نشان داده شد که تزریق ممانتین باعث افزایش تأخیر در استرس غیرقابل پیش‌بینی می‌شود و میزان BDNF را افزایش می‌دهد و هم چنین 14 روز درمان با ممانتین مدت زمان بی‌حرکتی را در

توجه کرد. نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی از جمله Mao و Amidfar همسو بوده و نشانگر تاثیر پی‌پرین و ممانتین از طریق سیگنالینگ BDNF در افسردگی و اضطراب است.

این مطالعه نشان داد که پی‌پرین و ممانتین باعث کاهش علائم افسردگی اضطرابی در مدل موشی شدند و این کاهش افسردگی با افزایش بیان BDNF در مغز موش همراه است. هم‌چنین هم‌افزایی درمانی بین پی‌پرین و ممانتین در کاهش علائم افسردگی و بیان BDNF وجود داشته است. برای مطالعه دقیق‌تر جهت کاربرد این ترکیبات در روند درمانی، نیاز به مطالعات دقیق بالینی در بیماران با بیماری افسردگی اضطرابی و یا بیماران دوقطبی می‌باشد.

موش‌های تحت استرس نرمال می‌نماید (20،19). نتایج این مطالعه نشان داد که ممانتین قادر به افزایش زمان عدم تحرک موش‌های در معرض استرس در آزمایش شنای اجباری در مقایسه با موش‌های کنترل شده است (20،19). هم‌چنین اخیراً در مطالعه‌ای نشان داده‌ایم که اپی‌کاتچین گالات و ادارا وون نقش محافظتی در برابر آپوپتوز ناشی از OHDA 6- در سلول‌های عصبی نوروبلاستوما دارد (21). مطالعه حاضر در راستاری مطالعه Amidfar (20)، Rêus (19) و Mao (2) در تاثیر آنتاگونیست‌های NMDA از جمله ممانتین در افسردگی و بیماری‌های نورودژنراتیو است. از آن‌جاکه ممانتین به‌عنوان آنتاگونیست رسپتور NMDA گلوتاماتی می‌باشد، می‌توان نقش این رسپتور را در پاتوفیزیولوژی افسردگی

References

- Mao QQ, Huang Z, Zhong XM, Xian YF, Ip SP. Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. *Neurochem Int* 2014; 74: 36-41.
- Mao QQ, Huang Z, Zhong XM, Xian YF, Ip SP. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. *Behav Brain Res* 2014; 261 140-145.
- Pelton GH, Harper OL, Roose SP, Marder K, D'Antonio K, Devanand D. Combined treatment with memantine/es-citalopram for older depressed patients with cognitive impairment: a pilot study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2016; 31(6): 648-655.
- Dimitrakopoulos S, Konstantakopoulos G. Pharmacological agents under research for the maintenance treatment in bipolar disorder. *Psychiatriki* 2015; 26(3): 169-180.
- Gordon RP, Brandish EK, Baldwin DS. Anxiety disorders, post-traumatic stress disorder, and obsessive-compulsive disorder. *Medicine* 2016; 44(11): 664-671.
- Pourabdolhossein F. Piperine ameliorated memory impairment and myelin damage in lysolecethin induced hippocampal demyelination. *Life Sci* 2020; 253: 117671.
- Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25(2): 89-98.
- Miris AA, Alexandrescu A, Carew TJ, Kopec AM. The contribution of spatial and temporal molecular networks in the induction of long-term memory and its underlying synaptic plasticity. *AIMS Neurosci* 2016; 3(3): 356-384.
- Sakr HF, Abbas A, Elsamanoudy A, Ghoneim F. Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66(4): 515-527.

10. Fan Y, Chen P, Li Y, Cui K, Noel DM, Cummins ED, et al. Corticosterone administration up-regulated expression of norepinephrine transporter and dopamine β -hydroxylase in rat locus coeruleus and its terminal regions. *J Neurochem* 2014; 128(3): 445-458.
11. Shen F, Tsuruda PR, Smith JA, Obedencio GP, Martin WJ. Relative contributions of norepinephrine and serotonin transporters to antinociceptive synergy between monoamine reuptake inhibitors and morphine in the rat formalin model. *PLoS One* 2013; 8(9): e74891.
12. Pytka K, Podkowa K, Rapacz A, Podkowa A, Żmudzka E, Olczyk A, et al. The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. *Pharmacol Rep* 2016; 68(2): 263-274.
13. Bayramlou R, Mohammadzadeh M, Babaei Balderlou F. A Comparative Survey of the Effects of Fluoxetine and Imipramine on Depression-Like Behavior and Serum Levels of Corticosterone and Glucose in Male Rats under Immobilization Stress. *Qom Univ Med Sci J* 2018; 12(2): 1-10 (Persian).
14. Mao QQ, Huang Z, Ip SP, Xian YF, Che CT. Protective effects of piperine against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobio* 2012; 32(4): 531-537.
15. Zhao Y, Xie W, Dai J, Wang Z, Huang Y. The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. *Brain Res* 2009; 1261: 82-90.
16. Crupi R, Mazzon E, Marino A, La Spada G, Bramanti P, Cuzzocrea S, et al. Melatonin treatment mimics the antidepressant action in chronic corticosterone-treated mice. *J Pineal Res* 2010; 49(2): 123-129.
17. Luo L, Li C, Du X, Shi Q, Huang Q, Xu X, Wang Q. Effect of aerobic exercise on BDNF/proBDNF expression in the ischemic hippocampus and depression recovery of rats after stroke. *Behav Brain Res* 2019; 362: 323-331.
18. Bago Rožanković P, Rožanković M, Badžak J, Stojić M, Šušak Sporiš I. Impact of Donepezil and Memantine on Behavioral and Psychological Symptoms of Alzheimer Disease: Six-month Open-label Study. *Cogn Behav Neurol* 2021; 34(4): 288-294.
19. Réus GZ, Abelaira HM, Stringari RB, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Memantine treatment reverses anhedonia, normalizes corticosterone levels and increases BDNF levels in the prefrontal cortex induced by chronic mild stress in rats. *Metab Brain Dis* 2012; 27(2): 175-182.
20. Amidfar M, Kim Y-K, Wiborg O. Effectiveness of memantine on depression-like behavior, memory deficits and brain mRNA levels of BDNF and TrkB in rats subjected to repeated unpredictable stress. *Pharmacol Rep* 2018; 70(3): 600-606.
21. Shokrzadeh M, Javanmard H, Zadeh GG, Yaghubi-Beklar S, Ataee R. Evaluation of the anti-apoptotic and anti-cytotoxic effect of epicatechin gallate and edaravone on SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Basic and Clinical Neurosciences* 2019; 10(6): 619-630.