

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

Hannaneh Roshanbakhsh¹,
Mahmoud Elahdadi Salmani²,
Mahdi Goudarzvand³,
Fereshteh Pourabdolhossein⁴

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 University 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)

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

حنانه روشن بخش¹

محمود اله دادی سلمانی²

مهدی گودرزوند³

فرشته پورعبدالحسین⁴

چکیده

سابقه و هدف: پیرین مهم ترین آلکالوئید فلفل سیاه، دارای خواص آنتی اکسیدانی و حفاظتی برای نورون ها است. بنابراین کاندید مناسبی برای مطالعه در مدل های حیوانی بیماری مولتیپل اسکلروزیس می باشد. در این مطالعه اثر پیش درمانی پیرین بر حافظه فضایی، شاخص های استرس اکسیداتیو و ترمیم میلین در مدل دمیلائسیون موضعی بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی موش های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن (200-220 گرم) در 4 گروه آزمایشی (n=8) مورد مطالعه قرار گرفتند. دمیلائسیون با تزریق لیزولستین در ناحیه CA1 هیپوکامپ القاء شد. پیرین از دو هفته قبل از القای دمیلائسیون با دوز 5mg/kg تا پایان دوره به صورت داخل صفاقی تزریق شد. اثر پیرین بر حافظه فضایی با تست ماز آبی موریس و بر بیان ژن های Hmx-1, iNOS, Nrf2 و MBP در بافت هیپوکامپ با تکنیک qPCR ارزیابی شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در بافت هیپوکامپ با تست FRAP اندازه گیری شد.

یافته ها: پیش درمانی با پیرین سبب کاهش شاخص زمان و مسافت طی شده و افزایش زمان اقامت در ربع هدف در آزمون ماز آبی شد (P<0/0001). در گروه پیش درمان بیان شاخص استرس اکسیداتیو (iNOS) نسبت به گروه دمیلائسیون کاهش یافت. بیان ژن های Nrf2, Hmx-1 و MBP در گروه پیش درمان نسبت به بیمار و کنترل، افزایش معنی داری نشان داد (P<0/0001). ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در گروه پیش درمان افزایش معنی داری نسبت به گروه بیمار و کنترل داشت (P<0/0001).

استنتاج: پیرین با تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و افزایش میلین موجب بهبود اختلال حافظه فضایی ناشی از دمیلائسیون هیپوکامپ می شود.

واژه های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، پیرین، حافظه فضایی، دمیلائسیون، لیزولستین

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) است (1)، دمیلائسیون یکی از رایج ترین علائم پاتولوژیک بیماری MS می باشد (2). که در ماده سفید و خاکستری مغز رخ می دهد (3،4). در کنار ناتوانی های جسمی ناشی از بیماری MS، یکی دیگر از مهم ترین نشانه های این بیماری، اختلالات

مؤلف مسئول: فرشته پورعبدالحسین - بابل: دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی

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

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 (15، 16). پپیرین به‌عنوان اصلی‌ترین آلکالوئید موجود در فلفل سیاه یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی است که از میوه گیاه فلفل سیاه استخراج می‌شود (17). طبق مطالعات جدید سلولی و حیوانی، پپیرین دارای اثرات تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد کارسنوژنیک است (17). اثرات آنتی‌اکسیدانی (18، 19) و ضد التهابی (20) پپیرین در مطالعات متعددی گزارش شده است. اثرات ضد آپوپتوز پپیرین در بیماری‌های عصبی مانند پارکینسون (21) و آلزایمر (22) شرح داده شده است. این مطالعات تأیید می‌کنند که پپیرین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود، موجب بهبود عملکرد حافظه در بیماری‌های فوق می‌گردد. همچنین پیش‌درمانی پپیرین در مدل‌های حیوانی بیماری‌های فوق تأثیر مثبت پپیرین در پیشگیری از القاء اختلال حافظه را تأیید می‌کند (23، 24). 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 فراهم می‌کند (25). دمی‌لیناسیون‌های القاء شده با توکسین از رایج‌ترین مدل‌ها جهت بررسی ظرفیت ترمیمی مغز در

شناختی می‌باشد. تحقیقات دو دهه اخیر نشان 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 آن‌ها را مخدوش می‌کند (6، 7). 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 لحظه‌ای 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، خصوصاً آتروفی ناحیه CA1 آن را در این قصبه دخیل می‌داند (9، 13). 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

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 22 ± 2 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 لیزولستین دریافت کردند. گروه بیمار (لیزولستین): لیزولستین 1 درصد را به میزان 2 میکرولیتر به صورت دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ دریافت کردند.

گروه شاهد درمان (حلال پبیرین): حلال پبیرین را از دو هفته قبل از تزریق لیزولستین 1 درصد را به میزان 2 میکرولیتر به صورت 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 پبیرین 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 (24، 32).

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

می‌باشد. یکی از سم‌های شناخته شده برای القاء دمیلیناسیون سم لیزولستین است (25). لیزولستین (آنالوگ لیزوفسفاتیدیل کولین) دارای خاصیت مشابه مواد شوینده است که به‌طور اختصاصی بر غشا میلین سلول‌های عصبی و به‌صورت ثانویه بر سلول‌های میلین‌کننده (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 لیزولستین 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 لیزولستین جهت القاء دمیلیناسیون موضعی و ایجاد اختلال حافظه فضایی در حیوانات استفاده شد.

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

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار با محدوده وزن 200-220 گرم از اتاق

گرفتند و با استفاده از اطلس پاکسینوس مشخصات مذکور را (AP:-3.6, DV:-3.2, (ML:±1.6) روی جمجمه علامت گذاری کرده، با کمک 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 پیرین با دوز 5 mg/kg دو هفته قبل از القاء مدل بصورت تزریق روزانه داخل صفاق انجام شد و تا دو هفته بعد از القاء مدل ادامه یافت. پیرین 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 پیرین استفاده شد و تزریق حلال در گروه 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 22 ± 1 درجه سانتی گراد پر شده و یک سکوی (با قطر 10 سانتی متر) 2 سانتی متر زیر سطح آب در مرکز ربع چهارم (Q4) قرار داده می شود. در اطراف ماز آبی علائم هندسی به عنوان راهنمای بینایی تعبیه شد و مسیر شنای حیوان به وسیله 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 استخرها 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 4 روز متوالی انجام گرفت. هر موش روزانه (Trial 4 در روز) برای مدت 60 ثانیه از یکی از دیواره های ماز (Q1- Q4) به داخل آب رها می شد. موش ها 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 می شود. 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

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام

برای اندازه گیری پتانسیل آنتی اکسیدانی تام روش بنزی و استرین (Benzie & Strain) استفاده شد (34). آزمایش FRAP یک روش ساده برای اندازه گیری توانایی احیا کنندگی یون فریک پلازما است و به عنوان یک روش در ارزیابی قدرت آنتی اکسیدانی 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 (بافر استات، معرف TPTZ و محلول کلرور فریک به نسبت به ترتیب 11:1:1) به تمام لوله های 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 مجدداً 15 دقیقه در 37 درجه انکوبه شد. پس از طی این زمان شدت رنگ در طول موج 593 نانومتر در مقابل بلاتک (1/5 میلی لیتر محلول FRAP و 50 میکرولیتر آب مقطر) با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. مقادیر جذب بدست آمده با استفاده از منحنی استاندارد، که با کمک محلول سولفات آهن در غلظت های 125-250-500-1000 میکرومولار به عنوان استاندارد رسم شد، به غلظت تبدیل گردید. مقادیر FRAP بر حسب Fe^{2+} 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

سانتی گراد 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 میکروتیوب های 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) و از دستگاه ABI 7500 Real-Time PCR System جهت بررسی بیان ژن های مورد نظر استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژن های فاکتور هسته ای اریترئوئید 2 (Nrf2)، نیتریک اکساید سنتتاز القائی (iNOS) و آنزیم هم اکسیژناز 1 (Hmox-1) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش های زنجیره ای پلیمرز (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 (فضا پڑوه، تهران-ایران) به همراه 8 میکرولیتر از nuclease free water در حجم نهایی 20 میکرولیتر جهت واکنش نسخه برداری معکوس (real-time PCR) میکس شدند. واکنش ها به صورت دوبار تکرار انجام شد. جهت کنترل مثبت و ارزیابی واکنش RT از ژن Housekeeping (GAPDH) به عنوان یک ژن Housekeeping استفاده شد. بیان نسبی ژن مورد نظر در مقایسه با بافت کنترل، توسط روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه و به صورت Fold Change گزارش شد.

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

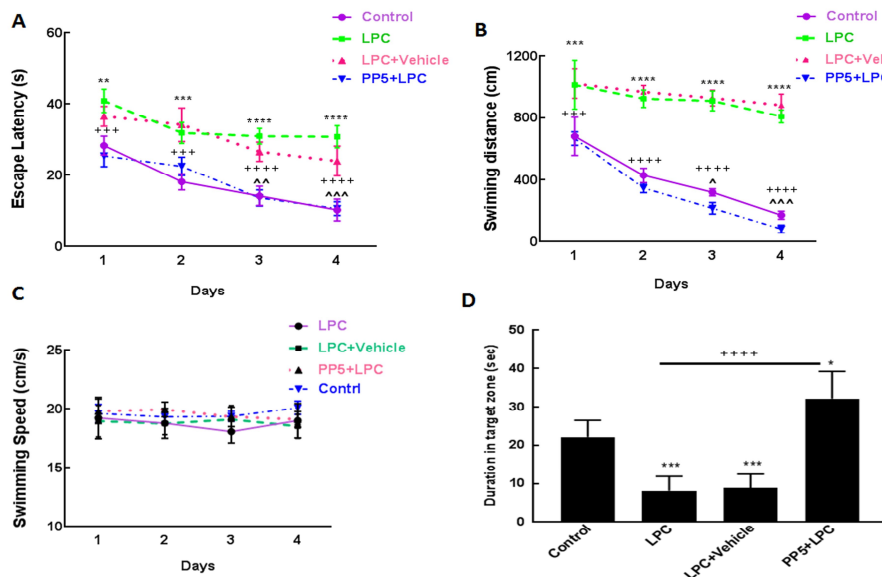
توالی (5'→3')	شماره دسترسی ژن	نقشه ژن
ACGGCAAGTTCAACGGCACAG GACATACTCAGCACCAGCATCACC	NM_017008.4F NM_017008.4R	GAPDH
TGGTGAGGGGACTGGACTTT ATCTGTGTGTGGGCTGG	NM_012611.3F NM_012611.3R	iNOS
GGGAAGGCTTTAAGCTGGTGA GTGGGGCATAGACTGGGTTC	NM_012580.2F NM_012580.2R	Hmox-1
GTCCAGCAGGACATGGATT GTTTGGGAATGTGGCAACC	NM_031789.2F NM_031789.2R	Nrf2
CTATAAATCGGCTCACAAAGG AGCGGTTTATATTAAGAAGC	NM_001020462.1F NM_001020462.1R	MBP

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، $P < 0/05$ به عنوان 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.

یافته‌ها

پیش‌درمانی با پپیرین اختلال یادگیری و حافظه فضایی را در مدل دمیلیناسیون موضعی هیپوکامپ کاهش داد. جهت القاء دمیلیناسیون موضعی، گروه بیمار لیزولستین 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 پیش‌درمان از دو هفته قبل از القای دمیلیناسیون تا پایان دوره پپیرین با دوز 5 mg/kg و گروه شاهد درمان نیز در همین زمان حلال پپیرین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. یک هفته پس از القای مدل دمیلیناسیون توسط لیزولستین، تست ماز آبی موریس با پروتکل 5 روزه برای گروه‌های کنترل، بیمار، شاهد درمان و پیش‌درمان 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 آزمایش شامل مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکوی مسافت پیموده شده تا سکوی 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 لیزولستین 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 اندازه‌گیری تکراری و آزمون بونفرونی - تصویر شماره 1A). مسافت طی شده در گروه بیمار و شاهد درمان در روز 1 ($P < 0/01$ ، $P < 0/0001$) 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 در این گروه‌ها باشد (تصویر شماره A-B1). کاهش معنی‌دار زمان یافتن سکوی مسافت طی شده در گروه کنترل، نشانگر سلامت یادگیری حیوانات در این گروه بوده و افزایش معنی‌دار زمان و مسافت برای یافتن سکوی گروه بیمار نسبت به گروه کنترل، بیانگر القاء اختلالات یادگیری ناشی از مدل دمیلیناسیون موضعی در ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌باشد. همچنین گروه کنترل و پیش‌درمان با پپیرین به ترتیب در روزهای 3 ($p < 0/01$) و 4 ($p < 0/001$) کاهش معنی‌دار را در مسافت طی شده نسبت به روز 1 این گروه نشان داد. بررسی سرعت شنای حیوانات در همه گروه‌های 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 1C).



تصویر شماره 1: پیش درمانی با پیرین اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از مدل دمیلیتاسیون موضعی هیپوکامپ را کاهش میدهد. A زمان یافتن سکو در گروه بیمار در همه روزهای آموزش نسبت به همان روزها در گروه کنترل افزایش معنی داری ($P < 0/0001$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/001$) نشان داد. زمان یافتن سکو (sec) در گروه پیش درمان پیرین نسبت به گروه های بیمار و شاهد درمان کاهش معنی داری ($P < 0/0001$ ، $P < 0/001$) یافت. در مقایسه درون گروهی در گروه های بیمار و شاهد درمان تفاوت معنی داری بین روزهای آزمون مشاهده نشد. اما در گروه کنترل و پیش درمان با پیرین 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 معنی داری ($P < 0/0001$ ، $P < 0/001$) یافت. در مقایسه درون گروهی در گروه های بیمار و شاهد درمان تفاوت معنی داری بین روزهای آزمون مشاهده نشد. اما در گروه کنترل و پیش درمان با پیرین 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 معنی دار ($P < 0/001$) و مقایسه این زمان در گروه پیش درمان پیرین ($P < 0/0001$) نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان افزایش معناداری را نشان داد.

پیش درمان پیرین 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 به صورت درون گروهی و چه به صورت برون گروهی تغییرات معنی داری نشان نداد و بدین ترتیب اختلال حافظه در گروه حلال پیرین نیز تأیید شد. در گروه پیش درمان با پیرین مسافت طی شده در تمام روزها، به ترتیب در روز 1 ($P < 0/001$) و روزهای 2 و 3 و 4 ($P < 0/0001$) نسبت به روزهای 1-4 گگ روه شاهد درمان و گروه بیمار کاهشی معنی داری را

مقایسه بین گروه های شاهد درمان و گروه بیمار هیچ تغییر معنی داری را در زمان یافتن سکو در روزهای مطالعه نشان نداد، بنابراین حلال پیرین تأثیری بر روند یادگیری نداشته و حیوانات این گروه همانند گروه بیمار بر اثر القاء مدل دمیلیتاسیون 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 پیرین زمان رسیدن به سکو در تمام روزها، به ترتیب در روزهای 1 و 2 ($P < 0/001$) و روزهای 3 و 4 ($P < 0/0001$) به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد درمان و گروه بیمار کاهش یافت، بنابراین

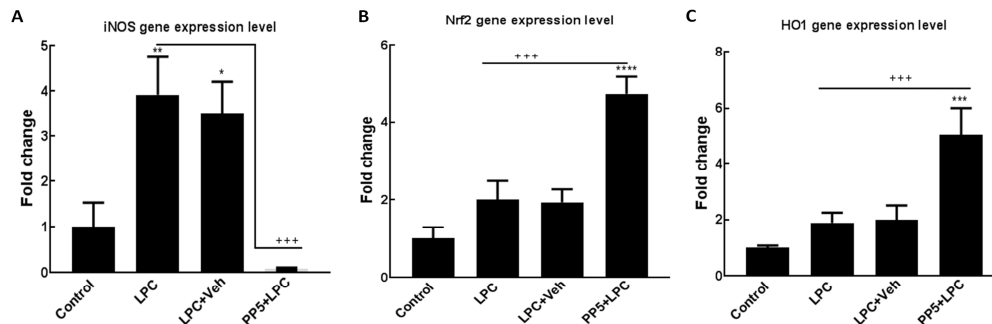
فضایی، این شاخص زمانی بین گروه پیش درمان، شاهد درمان و بیمار مقایسه شد. زمان سپری شده در ربع هدف در گروه پیش درمان پیرین افزایش معنی داری را نسبت به گروه‌های بیمار و شاهد درمان نشان داد ($P < 0/0001$ ، ++++). آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی - تصویر شماره 1 D). همچنین مدت زمان سپری شده در ربع هدف در گروه پیش درمان افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت ($P < 0/05$) * (تصویر شماره 1 D).

پیش درمانی با پیرین 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 لیزولستین در گروه بیمار ($P < 0/01$) ** و شاهد درمان ($P < 0/05$) * منجر به افزایش معنی دار بیان iNOS نسبت به گروه کنترل شد که این افزایش نشان دهنده آن است که مدل دمی‌لیناسیون موضعی با لیزولستین سبب القاء تغییرات اکسیداتیو می‌شود. اما بیان ژن iNOS در گروه پیش درمان با پیرین کاهش معنی داری 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 پیرین 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 پیرین 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).

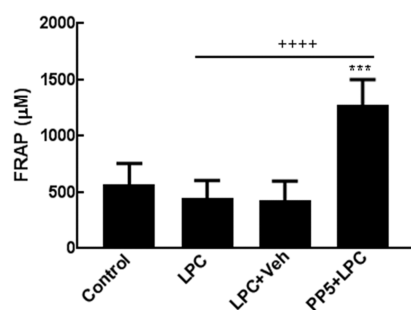
نشان دادند (آنالیز واریانس دو طرفه با اندازه‌گیری تکراری و آزمون بونفرونی (تصویر شماره 1B). مقایسه درون‌گروهی در گروه پیش درمان نیز کاهش معنی داری در مسافت طی شده در روزهای 4 ($P < 0/001$) ** و 3 ($P < 0/05$) ^ نسبت به روزهای 1 و 2 این گروه نشان داد که بیانگر تأثیر مثبت پیش درمانی با پیرین دو هفته قبل 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 شای حیوانات در گروه‌های شاهد درمان و پیش درمان تفاوت معنی داری را نسبت به گروه بیمار نشان نداد. این نتایج به دست آمده تأثیر پیرین 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 معنی داری ($P < 0/001$) ***، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی کاهش معنی داری) را در گروه‌های 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 تأیید کننده بروز اختلال حافظه فضایی در مدل موضعی دمی‌لیناسیون ناحیه CA1 هیپوکامپ و داده‌های مشابه در گروه شاهد درمان نیز تأییدی بر بی اثر بودن حلال پیرین بر فرآیند حافظه می‌باشد. جهت بررسی اثر پیش درمانی پیرین بر حافظه



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

گروه های مختلف ارزیابی شد. داده های ما در گروه های بیمار و شاهد درمان نشان داد که بیان ژن MBP در این دو گروه به طور قابل توجهی پایین تر از گروه کنترل بود (* P < 0/05)، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، تصویر شماره 4). در گروه پیش درمان پیپرین افزایش معنی داری در بیان ژن MBP نسبت به دو گروه شاهد درمان و بیمار (+++ P < 0/001) و همچنین گروه کنترل (* P < 0/01) ایجاد کرد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، تصویر شماره 4).



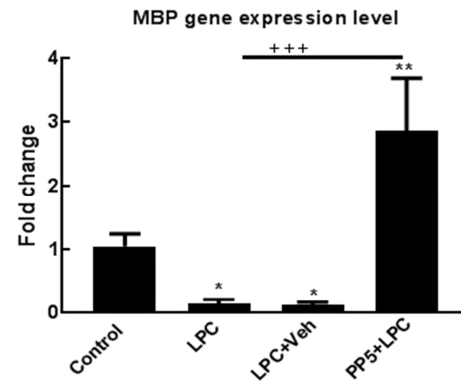
تصویر شماره 3: پیش درمانی با پیپرین موجب افزایش ظرفیت تام آنتی اکسیداتیو شد. ظرفیت آنتی اکسیداتیو تام در گروه های پیش درمان نسبت به گروه کنترل (*** P < 0/001)، گروه بیمار و شاهد درمان (+++ P < 0/0001) به طور معنی داری افزایش یافت.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده های تست FRAP با روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی نشان داد، ظرفیت آنتی اکسیداتیو تام در گروه های بیمار و شاهد درمان نسبت به گروه کنترل کاهش نسبی داشت که تغییرات آن معنی دار نبود. اما پیش درمانی با پیپرین ظرفیت آنتی اکسیداتیو مغز را به صورت قابل ملاحظه ای نسبت به گروه کنترل افزایش داد (** P < 0/001) و گروه بیمار و شاهد درمان (+++ P < 0/0001) بالا برد (تصویر شماره 3). بنابراین القای مدل دمیالیناسیون با لیزولستین تا حدودی باعث ایجاد استرس اکسیداتیو شده و روی ظرفیت آنتی اکسیداتیو نیز تأثیر می گذارد. پیش درمانی با پیپرین با افزایش ظرفیت آنتی اکسیداتیو می تواند با خنثی سازی رادیکال های 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) به عنوان یک پروتئین ضروری جهت تشکیل و تثبیت غشای میلین 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 ارزیابی های 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 آن ها 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 یافته های Makinodon و همکاران در سال 2008 مطابقت دارد، به طوری که نشان دادند که تزریق لیزولستین سبب افزایش زمان پیدا کردن غذا در ماز شعاعی شده و حافظه و یادگیری مختل شده است (38). به علاوه تعدادی از گزارشات شروع فرآیند استرس اکسیداتیو را در ناحیه ضایعه پس از القاء مدل لیزولستینی نشان داده اند (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 به طور دقیق مشخص نیست و درمان های موثری در این رابطه وجود ندارد.

در طی چند دهه اخیر، گیاهان دارویی در درمان بسیاری از بیماری های تحلیل برنده عصبی از جمله بیماری MS مورد توجه چشم گیر قرار گرفته اند. گواه این مدعا تاثیر بسزای پیپرین در بهبود اختلال عملکرد یادگیری و حافظه در چندین مدل حیوانی بیماری های تحلیل برنده عصبی است (41-43) با این وجود، مکانیسم عملکرد دارویی پیپرین به طور 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 بیماری های تحلیل برنده عصبی و اختلال شناختی ناشی از مدل های حیوانی آلزایمر و پارکینسون گزارش شده است (44,43,21). همچنین بررسی سرعت شنای حیوانات



تصویر شماره 4: پیش درمانی با پیپرین موجب افزایش بیان سطح MBP در بافت هیپوکامپ شد. بیان ژن MBP به عنوان شاخص میلین در گروه بیمار و شاهد درمان ($P < 0/05$) نسبت به گروه کنترل بطور معناداری کاهش و در گروه پیش درمان نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان ($P < 0/001$) و کنترل ($P < 0/01$) بطور معناداری افزایش یافت

بحث

اختلالات شناختی از جمله اختلال حافظه و دمیلیناسیون هیپوکامپ در بیماران MS شایع است (6,7). اختلال حافظه ناشی از مدل موضعی دمیلیناسیون با لیزولستین در تحقیقات گذشته تأیید شده بود (36,31,30)، بنابراین در این پژوهش از این مدل جهت بررسی اثر پیپرین بر اختلال حافظه و ظرفیت آنتی اکسیدانی استفاده شد. یافته های ما تایید کرد که پیش درمانی با پیپرین موجب بهبود اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از مدل موضعی دمیلیناسیون در هیپوکامپ می شود. پیپرین با کاهش بیان ژن iNOS موجب کاهش آسیب اکسیداتیو شده و با افزایش بیان ژن های HO1 و Nrf2 دفاع آنتی اکسیدانی بدن را بالا برده و در نهایت ظرفیت تام آنتی اکسیدان مغز را بالا می برد. پیش درمانی با پیپرین با افزایش بیان ژن MBP ظرفیت ترمیمی مغز را نیز بالا می برد. تشکیلات هیپوکامپ در اکتساب حافظه فضایی نقش عمده ای را بازی می کنند، بنابراین با ایجاد ضایعه دو طرفه در ناحیه پشتی هیپوکامپ حافظه فضایی به میزان 30-50 درصد مختل می شود (37). ارزیابی داده های رفتاری این مطالعه نشان داد که تزریق لیزولستین در

در روزهای مختلف آزمون نیز اختلاف معنی داری را در بین گروه‌ها نشان نداد و این تأییدی بر این موضوع است که القاء مدل دمیلیناسیون در هیپوکامپ و یا درمان با پپیرین 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 لیزولستین 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 (15, 46). داده‌های ما نشان داد که پیش‌درمانی با پپیرین 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 معنی داری 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 مسیره‌های Nrf2-ARE (عنصر پاسخ آنتی‌اکسیدان) را دارد (47). آنزیم هم‌اکسیژناز (HO1) در شکستن هم‌به آهن، مونواکسید کربن و بیلی‌وردین و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو نقش دارد (48). داده‌های ما نشان داد که افزایش معنی دار بیان ژن‌های Nrf2 و HO-1 به دنبال پیش‌درمانی با پپیرین، می‌تواند یکی از مسیرهای مکانیسمی محافظت عصبی دخیل در بهبود اختلال حافظه فضایی باشد. در این راستا، در سال 2008، Kappos و همکاران گزارش دادند که دی‌متیل‌فومارات، که Nrf2 را تنظیم

می‌کند، به‌طور قابل توجهی عود و ناتوانی را در طی کارآزمایی بالینی فاز 3 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، پپیرین می‌تواند عملکرد حافظه را از طریق آنتی‌اکسیدان‌ها و مهار رادیکال‌های آزاد بهبود ببخشد (44, 52). نتایج داده‌های ما نیز افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام را در گروه پیش‌درمان با پپیرین نشان داد و با سایر گزارشات در این راستا مطابق بود. یافته‌های این مطالعه این فرضیه را مطرح می‌کند که اثر مثبت پیش‌درمانی پپیرین 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 پپیرین بر میزان بیان MBP به‌عنوان اصلی‌ترین پروتئین ساختاری میلین پرداختیم. بر اساس داده‌های ما پیش‌درمانی با پپیرین سطح بیان MBP را به‌طور معنی داری 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 اولیگودندروسیت‌های بالغ نیز فراوان یافت می‌شود (53). افزایش تولید اولیگودندروسیت‌ها می‌تواند توجیه‌کننده افزایش سطح MBP در گروه پیش‌درمان پپیرین 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 لیزولستین در ناحیه CA1 هیپوکامپ باعث ایجاد اختلال در یادگیری

اختلالات شناختی ناشی از MS باشد. البته مطالعات گسترده تری لازم است تا به بررسی مکانیسم‌های دقیق تر عملکرد پیپرین در مدل‌های حیوانی بیماری MS پردازد.

سپاسگزاری

بدین وسیله 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.

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

References

- Lassmann H. Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37(7): 698-710.
- Dutta R, Chomyk AM, Chang A, Ribaldo 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
- Honce JM. Gray Matter Pathology in MS: Neuroimaging and Clinical Correlations. *Mult Scler Int* 2013; 2013: 627870.
- Calabrese M, Rinaldi F, Grossi P, Gallo P. Cortical pathology and cognitive impairment in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 2011; 11(3): 425-432.
- Bobholz JA, Rao SM. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: a review of recent developments. *Curr Opin Neurol* 2003; 16(3): 283-288.
- Messina S, Patti F. Gray matters in multiple sclerosis: cognitive impairment and structural MRI. *Mult Scler Int* 2014; 2014: 609694.
- Dutta R, Chang A, Doud MK, Kidd GJ, Ribaldo MV, Young EA, et al. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2011; 69(3): 445-454.
- Miljkovic D, Spasojevic I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19(18): 2286-2334.
- 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.
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361(6407): 31-39.
- 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.
- Sekeres MJ, Winocur G, Moscovitch M. The hippocampus and related neocortical

- 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. Abraham NN, Kanthimathi M, Abdul-Aziz A. Piper beetle 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.

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 spatial 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

- 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, Esmaceli 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.