ORIGINAL ARTICLE

# *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 Namazi[1],
Hosein Asgarian Emran[2],
Amin Ataie[3],
Mohammad Karami[4],
Ramin Ataee[5],
Hossein Khaleghzadeh-Ahangar[6,7],
Mahdi Mahmoudi[3],
Amir Hossein Pouladi[3]

[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 Proffessor, 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 piperien. 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 coticosterone 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)

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره 223 مرداد سال 1402 (10-1)

# 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 نمازی[1]
حسین عسگریان عمران[2]
امین عطایی[3]
محمد کرمی[4]
رامین عطایی[5]
حسین خالق زاده آهنگر[6و7]
مهدی محمودی[3]
امیر حسین پولادی[3]

## چکیده

**سابقه و هدف:** افسردگی یکی از شایع‌ترین 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 می‌پردازد.

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

**یافته‌ها:** آزمون شنای اجباری و Plus-Maze نشان داد که بین گروه درمانی (کورتیکوسترون+پی پرین+ ممانتین) و گروه (کورتیکوسترون+ پی پرین) تفاوت معنی‌داری وجود دارد($P<0/05$). هم‌چنین نتایج realtime PCR نشان داد که افزایش معنی‌دار بیان BDNF در گروه‌های (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 به‌صورت هم افزا می‌توانند به‌طور معنی‌دار 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 شایع‌ترین اختلالات روانی می‌باشد و 10 تا 20 درصد عموم مردم، افسردگی در حد خفیف تا شدید را تجربه می‌کنند و 15درصد افراد حداقل یک‌بار در طول زندگی با آن مواجه می‌شوند(1). درمان‌های دارویی

**مولف مسئول: رامین عطایی -** ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail:raminataee1349@gmail.com
1. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استاد، مرکز ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استادیار، گروه داروشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران
4. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، 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



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

در دسترس برای اختلال افسردگی شامل گروه داروهای چند حلقه‌ای، گروه داروهای مهارکننده اختصاصی باز جذب سروتونین (SSRI)، گروه داروهای مهارکنندهٔ آنزیم مونوآمین اکسیداز (MAOI) و چند نمونه داروی جدید مانند بوپروپیون، نفازودون، ونلافاکسین و غیره می‌باشند(5-2). 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 جهت‌گیری به سمت معرفی داروهای مؤثر و در عین حال با عوارض جانبی کم‌تر، منطقی به‌نظر 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 پی پرین و به‌خصوص در بیماری افسردگی انجام یافته و حتی نتایجی در ارتباط با تاثیر پی پرین در افسردگی به‌دست آمده است(2).

(N-methyl-D-aspartate receptor) NMDA گیرنده‌ای برای نوروترانسمیتر تحریکی گلوتامات است، که متعاقب تحریک دردناک محیطی آزاد می‌شود. گیرنده گلوتامات NMDA در حقیقت یکی از گیرنده‌های مهم کانال یونی است که واسطه انتقالات 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 تائید شده است(4). به‌طوری‌که برخی مطالعات نشان داده که ممانتین به‌عنوان آنتاگونیست رسپتور NMDA خواص ضد افسردگی دارد(5). در رابطه با بررسی مکانیسم اثر ضد افسردگی پی پرین 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 پی پرین باعث افزایش غلظت BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) در هیپوکامپ و قشر مغز شده است(1). در برخی مطالعات نیز به اثرات آنتی اکسیدانتی پی‌پرین و کاهش TNFα و استرس اکسیداتیو در مغز اشاره داشته است(6). اگرچه مطالعاتی در رابطه با مکانیسم ضد افسردگی پی پرین وجود دارد، اما مکانیسم دقیق ضد افسردگی آن مشخص نیست و به‌خصوص آن‌که بررسی تداخل مسیر NMDA توسط پی پرین 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 هم افزایی 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 پی پرین 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 هم افزایی 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 پروش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران در درجه حرارت 2±23 درجه سانتی‌گراد با سیکل روشنایی خاموشی 12 ساعته نگهداری شدند و

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

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 به‌صورت سوسپانسیون در آمد و به موش‌ها در دوز 20 mg/kg به‌صورت داخل صفاقی(IP) به مدت سه هفته متمادی تزریق شد. تجویز پی پرین در دوز 10 mg/kg به‌صورت داخل صفاقی به مدت 3 هفته همزمان با کورتیکوسترون به موش‌های گروه درمانی انجام شد. ممانتین 15 دقیقه قبل از پی پرین به مقدار 3 mg/kg به‌طور داخل صفاقی تجویز شد(۲،۱).

*گروه‌های درمانی*

موش‌ها به‌طور تصادفی به 4 گروه 5 تایی تقسیم شدند:

گروه اول (کنترل) که هیچ دارویی به آن‌ها تزریق نشد و تنها نرمال سالین 0/5 درصد (به‌عنوان حامل دارویی) دریافت کردند.

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

گروه سوم، علاوه بر دریافت کورتیکوسترون پی‌پرین را در دوز 10mg/kg به‌صورت IP به‌مدت سه هفته دریافت کردند. پی‌پرین نیم ساعت قبل از کورتیکوسترون تجویز شد.

گروه چهارم، شامل موش‌هایی بود که تحت تجویز کورتیکوسترون قرار گرفتند و سپس به آن‌ها پی پرین و ممانتین تزریق شد. در گروه دریافت‌کننده ممانتین، ممانتین 15 دقیقه قبل از پی پرین به‌ترتیب به مقدار 3 mg/kg به‌طور داخل صفاقی تجویز شد(2). پس از اتمام دوره تجویز دارو جهت بررسی اثرات داروها در مدل افسردگی اضطرابی، آزمون‌های 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 به‌کار می‌رود. در این آزمایش به‌حیوان مدت 5 دقیقه فرصت داده می‌شود تا آزادانه در قسمت‌های 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 اندازه‌گیری می‌شود و درصد زمان گذرانده در بازوهای باز نسبت به مدت زمان کل اقامت در بازوهای باز و بسته محاسبه می‌گردد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار می‌گیرد. هر چه موش مدت زمان بیش‌تری در بازوی باز باشد بیانگر کاهش اضطراب موش است(۸،۷). فعالیت لوکوموتور یا فعالیت حرکتی موش توسط دستگاه (open feild) اندازه‌گیری شد. اوپن فیلد (open feild) مکعبی است که در کف مربعی شکل به ابعاد 100 در 100 سانتی‌متر به ارتفاع 30 سانتی‌متر 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 می‌شود و تعداد عبورها و عقب رفتن‌ها از مربع‌ها Crossing time، rearing time، immobility time اندازه‌گیری می‌شود(۸،۷).

تست شنای اجباری (Force swimming) بین ساعت 9 الی 10 صبح، پس از تست اوپن فیلد اندازه‌گیری می‌شود. در تست شنای اجباری، موش‌ها نباید کف تانک را لمس نمایند. ارتفاع تانک 60 سانتی‌متر و قطر تانک 30 سانتی‌متر و آب 25 درجه تا ارتفاع 35 سانتی‌متر پر می‌شود. هر موش به تنهایی به مدت 5 دقیقه در تانک قرار داده می‌شود و به مدت 5 دقیقه زیر نظر قرار می‌گیرد و مدت بی‌حرکتی توسط همان محقق اندازه‌گیری می‌شود. برای هر موش زمانی بی‌حرکت تعریف می‌شود

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

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 می‌شود. مدت بی‌حرکتی بیانگر معیاری از افسردگی است. پس از اخذ و ثبت اطلاعات و جمع‌بندی برای تحلیل آماری، از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و Post-Tukey test استفاده شد. اختلاف بین گروه‌ها با $P<0/05$ در هر نقطه از نظر آماری معنی‌دار 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 ترایزول آسپیره گردید تا کاملا محلول یکنواختی ایجاد شود. سپس محلول هموژن به لوله‌های 1/5 ml منتقل شد و بعد از 5 دقیقه وقفه به ازای هر یک میلی‌لیتر از آن مقدار 200 میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد و لوله به‌مدت 15 ثانیه شدیداً مخلوط گردید و سپس به مدت 15 دقیقه در حرارت 4°C و با 12000 g سانتریفوژ گردید. سه لایه حاصل آمد: لایهٔ رویی (upper phase) حاوی RNA، لایه حد واسط (Mid phase) حاوی DNA و لایه زیرین که پروتئی‌ها در آن بودند.

فاز بالایی که حاوی RNA است با دقت زیاد و با استفاده از سرسمپلرهای عاری از RNase به لوله‌ی جدید 1/5 میلی‌لیتری 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 لوله‌ها اضافه شد. بعد از 5 تا 10 ثانیه تکان دادن لوله‌ها، لوله‌ها 10 دقیقه در دمای اتاق ساکن ماندند و پس از آن به‌مدت 10 دقیقه درحرارت 4°C با دور 12000g 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 مقدار یک میلی‌لیتر اتانول 75 درجه اضافه شده و به آرامی مخلوط گردید. سپس میکروتیوب به مدت5 دقیقه در 4°C و 7500g سانتریفوژ گردید و سپس مایع رویی توسط سمپلر دور ریخته می‌شود. غلظت RNA با روش تعیین دانسیته نوری (optical density: OD) توسط دستگاه Nano drop اندازه‌گیری شد و RNA در طول موج‌های 260 و 280 ارزیابی گردید. جذب نوری معادل یک به معنای وجود 40 میکروگرم RNA در هرمیلی‌لیتر از محصول استخراج شده است. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده 2µg از آن را به روش ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت و باندهای18S و 28S مشاهده گردید.

بعد از استخراج RNA توسط کیت تهیه cDNA، (Fermantas) Revert AID First Strand cDNA Synthesis، RNA تبدیل به cDNA گردید. اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های 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 به‌صورت 95 درجه سانتی‌گراد 10 دقیقه، 95 درجه سانتی‌گراد 15 ثانیه، 61 درجه سانتی‌گراد 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، stockهای 10 درصد از stock اولیه 100µl تهیه شد و سپس حجم‌های لازم از پرایمرها وارد 20µl مخلوط واکنش شد. هم‌چنین در این مطالعه در هر µl از cDNA به میزان 15ngنمونه وجود داشت. مواد لازم جهت انجام Real-time PCR در جدول شماره 1 نشان داده شده‌اند.

**جدول شماره 1:** مواد لازم برای Real time PCR

| ماده | حجم |
|---|---|
| Master Mix Green | 10 µL |
| $ddH_2O$ | 7 µL |
| Forward Primer | 0/5 µL |
| Reverse Primer | 0/5 µL |
| cDNA | 2 µL |
| کل | 20 µL |

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

در آخر cDNA را به میزان 2 µl 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

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

شرایط سیکل دمایی Real time PCR برای ژن BDNF به قرار ذیل بود: یک مرحله 95°C برای 10دقیقه به جهت فعال سازی آغازی آنزیم پلیمراز، در ادامه 40 سیکل که شامل 95°C برای 5 ثانیه و 61°C برای 40 ثانیه می‌باشد برای مرحله anealing/extention صورت می‌گیرد 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 می‌گیرد. تمام یافته‌های آماری با کمک نرم افزار نسخه SPSS 21 مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. برای آنالیز نتایج مربوط به بررسی کمی بیان ژن، بیان ژن‌های BDNF به وسیله بیان ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع نرمال‌سازی شد. اطلاعات آماری با به کار بردن متد 2-ΔΔCT 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 معنی‌دار در گروه‌های مختلف از P-value استفاده شد. مقادیر P کم‌تر از 0/05 معنی‌دار 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 معنی‌داری در هر متغیر بین گروه‌ها وجود دارد. از آزمون دانکن جهت آزمون تعقیبی استفاده شد. این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری در تست Plus-Maze بین گروه کنترل و دو گروه کورتکوسترون + پی پرین و گروه کورتیکوسترون+ پی پرین و+ ممانتین وجود دارد (P<0/05). هم‌چنین نشان داده که تفاوت معنی‌داری 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 بیش‌تر در بازوی باز بیانگر کاهش اضطراب است. کم‌ترین زمان اقامت در بازوی روشن در گروه کورتیکوسترون+ پی پرین می‌باشد که نشان‌دهنده بیش‌ترین میزان اضطراب در این گروه است و بیش‌ترین زمان اقامت در بازوی بازدر گروه کنترل می‌باشد که نشان‌دهنده کم‌ترین 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 بی‌حرکتی بیش‌تر، بیانگر افزایش علایم افسردگی است. کم‌ترین

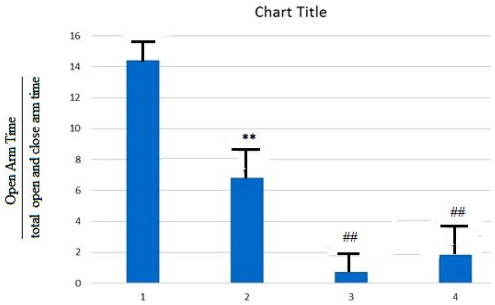
**جدول شماره 3:** میانگین و انحراف استاندارد نتایج پلاس میز وشنای اجباری

| | کنترل | | | | سطح معنی داری |
|---|---|---|---|---|---|
| | کنترل (انحراف معیار ± میانگین) | کورتیکوسترون (انحراف معیار ± میانگین) | کورتیکوسترون و پی پرین (انحراف معیار ± میانگین) | کورتیکوسترون و پی پرین و ممانتین (انحراف معیار ± میانگین) | |
| تست پلاس میز | 14/58 11/36 | 6/82 ± 5/29 | 74 ± 1/65 | 1/84 ± 4/11 | 0/019 |
| تست شنای اجباری | 100/25 9/50 | 119/20 ± 9/55 | 75/00 ± 18/75 | 64/80 ± 17/77 | 0/001> |



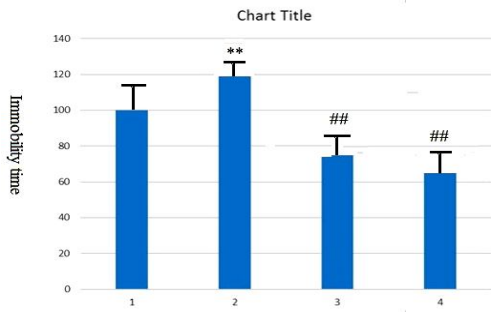
[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

زمان بی حرکتی در گروه کورتیکوسترون + پی پرین + ممانتین می‌باشد که نشان‌دهنده کاهش علایم افسردگی در این گروه است و بیش‌ترین زمان بی حرکتی در گروه کورتیکوسترون می‌باشد که نشان‌دهنده افزایش علایم 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 و پی پرین 4- گروه کورتیکوسترون پی‌پرین و ممانتین

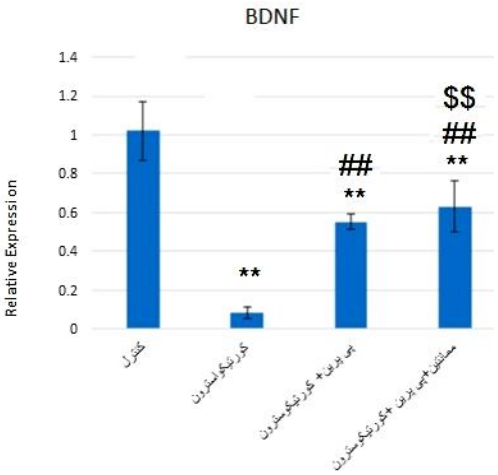
**:Significant compared with control P<0.01
##:Significant compared with corticosterone P<0.01




**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 و پی پرین 4- گروه کورتیکوسترون پی پرین 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 + پی پرین و کورتیکوسترون + پی پرین + ممانتین نسبت به گروه کنترل نشان داده شد ه 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 + پی پرین و کورتیکوسترون + پی پرین + 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 + پی پرین + ممانتین نسبت به گروه کورتیکوسترون + پی پرین 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 corticostrone
$$: Significant:P<0.05 compared with corticostrone+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

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

به کورتیکوسترون معنی‌دار بوده است، که بیانگر افزایش بیان BDNF توسط پی پرین و ممانتین است و هم‌چنین هم افزایی معنی‌دار 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(۱۱،۱۰). دو آزمون رایج برای ارزیابی فعالیت ضدافسردگی، آزمون شنای اجباری (FST) و آزمون معلق ماندن دُم (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 به‌سرعت وضعیت بی‌حرکتی را می‌پذیرند(12). محققین معتقدند این تغییر رفتار منعکس‌کننده رفتار نا امیدی است.

در مطالعه بایراملو و همکاران، اعمال استرس به حیوانات تحت آزمون، منجر به افزایش معنی‌دار 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 پی‌پرین به‌طرز چشمگیری سرکوب افسردگی را نشان می‌دهد و آزمون شنای اجباری و تست دم معلق به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی اثرات ضد افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرند(14). طبق گزارش‌ها تزریق مکرر کورتیکوسترون باعث افزایش قابل ملاحظه بی‌تحرکی موش‌ها در آزمایش شنای اجباری و تعلیق دم می‌شود که می‌تواند با استفاده از داروهای ضد افسردگی و درمان طب سوزنی معکوس شود(16-14).

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 اگزوژن باعث کاهش معنی‌داری 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 سالین 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 به‌مدت 21 روز باعث افزایش معنی‌داری در مدت زمان عدم تحرک موش‌ها در آزمایش شنای اجباری و تعلیق دم می شود و درمان با پی‌پرین می‌تواند این تغییرات را کاهش دهد(2). روی هم رفته، نتایج به‌دست 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 شایع‌ترین 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 تزریق3 هفته‌ای کورتیکوسترون به‌طور معنی‌داری باعث کاهش پروتئین BDNF و mRNA در هیپوکامپ موش‌ها شد. درمان پی‌پرین به‌طور قابل ملاحظه‌ای تغییرات ناشی از کورتیکواسترون در بیان BDNF را معکوس می‌کند و نشان می‌دهد BDNF ممکن است در اثر ضد افسردگی پی‌پرین نقش داشته باشد(2). هم‌چنین نشان داده شده است که درمان با پی‌پرین می‌تواند در برابر سمیت عصبی ناشی از کورتیکواسترون در سلول‌های فئوکروموسیتومای موش محافظت ایجاد کند که احتمالا 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 هم‌چنین 14 روز درمان با ممانتین مدت زمان بی‌حرکتی را در

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

موش‌های تحت استرس نرمال می‌نماید(19،20). نتایج این مطالعه نشان داد که ممانین قادر به افزایش زمان عدم تحرک موش‌های در معرض استرس در آزمایش شنای اجباری در مقایسه با موش‌های کنترل شده است(19،20). هم‌چنین اخیرا در مطالعه‌ای نشان داده‌ایم که اپی‌کاتچین گالات و اداراوون نقش محافظتی در برابر آپوپتوز ناشی از 6- OHDA در سلول‌های عصبی نروبلاستوما دارد(21). مطالعه خاضر در راستاری مطالعه Amidfar(20)، Réus(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 توجیه 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 هم افزایی 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.

## References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Dimitrakopoulos S, Konstantakopoulos G. Pharmacological agents under research for the maintenance treatment in bipolar disorder. Psychiatriki 2015; 26(3): 169-180.
5. Gordon RP, Brandish EK, Baldwin DS. Anxiety disorders, post-traumatic stress disorder, and obsessive–compulsive disorder. Medicine 2016; 44(11): 664-671.
6. Pourabdolhossein F. Piperine ameliorated memory impairment and myelin damage in lysolecethin induced hippocampal demyelination. Life Sci 2020; 253: 117671.
7. Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. Trends Endocrinol Metab 2014; 25(2): 89-98.
8. Mirisis 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.
9. 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.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]

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.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-07-10 ]