DOI: 10.22100/jkh.v17i4.2652

مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

اثر اسنیک اسید بر اختلالات یادگیری، حافظه فضایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مرگ سلولی نکروز در ناحیه هیپوکامپ در مدل سمیت عصبی ناشی از مت‌آمفتامین

نگار غلامپور[۱]، آنه محمد غراوی[۲]، حسین خواستار[۳]، منیره شفاهی[۴]، مهدی خاکساری[۵*]

۱- مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- مرکز تحقیقات سلامت جنسی و باروری، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۴- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزاد شهر، آزاد شهر، ایران.

۵- مرکز تحقیقات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۱، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۹/۱۹

چکیده

مقدمه: *امروزه کشور ما با مشکل روزافزون اعتیاد به مت‌آمفتامین به‌ویژه در جوانان و نوجوانان روبرو است. مصرف این ماده اعتیادآور در درازمدت به سیستم‌های دوپامینرژیک، سروتونرژیک و سوخت و ساز مغزی آسیب می‌رساند و به‌علت اثرات نوروتوکسیسیته در مغز، بیمار دچار اختلالات شناختی از جمله اختلال در حافظه و یادگیری، اختلالات خلقی و اضطرابی می‌گردد. اسنیک اسید یک متابولیت ثانویه از گلسنگ است که دارای خواص بیولوژیکی مختلف از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است. از این‌رو این مطالعه در جهت کمک به اثبات عملکرد محافظت نورونی اسنیک اسید در برابر فعالیت سمیت عصبی مت‌آمفتامین انجام گرفته است.*

مواد و روش‌ها: *سمیت عصبی به‌وسیله تزریق مت‌آمفتامین با دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در چهار نوبت با فاصله زمانی دو ساعت هر بار به مقدار ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ایجاد شد سپس در گروه‌های تیمار تزریق اسنیک اسید با دوز ۲۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن درون صفاقی انجام گرفت؛ به این صورت که نوبت‌های تزریق ۳۰ دقیقه، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق مت‌آمفتامین انجام شدند. جهت بررسی حافظه فضایی آزمون ماز آبی موریس انجام گرفت سپس مغزها جهت آزمایشات بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی نیسل خارج گردیدند.*

نتایج: *داده‌های رفتاری نشان داد که در گروه‌های تیمار شده با اسنیک اسید میزان یادگیری نسبت‌به گروه مت‌آمفتامین افزایش‌یافته و در آزمون پروب درصد حضور حیوانات در ربع دایره هدف در گروه‌های تیمار شده به‌طور معناداری از گروه مت‌آمفتامین بیشتر بود که نشان‌دهنده بهبود عملکرد حافظه می‌باشد ($P<۰/۰۱$)، همچنین درمان با اسنیک اسید باعث کاهش مالوندی الدهید و افزایش سوپر دی اکسیداز مغز شد ($P<۰/۰۵$)، به‌علاوه در گروه مت‌آمفتامین افزایش مرگ سلولی نکروز در ناحیه CA1 هیپوکامپ مشاهده گردید که تیمار با اسنیک اسید کاهش معناداری در میزان سلول‌های نکروتیک نشان داد ($P<۰/۰۵$)*

نتیجه‌گیری: *براساس یافته‌ها اسنیک اسید احتمالاً با کاهش مرگ سلولی در برابر سمیت عصبی ناشی از مت‌آمفتامین باعث بهبود عملکرد حافظه و یادگیری در رت‌ها گردد.*

واژه‌های کلیدی: سمیت عصبی مت‌آمفتامین، اسنیک اسید، نکروز، اختلال یادگیری و حافظه.

***نویسنده مسئول:** شاهرود- میدان هفت تیر- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی، **تلفن:** ۹۱۵۵۸۱۷۰۵۴، **نمابر:** ۳۲۳۹۵۰۰۹، **Email:** khaksari417@yahoo.com

ارجاع: غلامپور نگار، غراوی آنه محمد، خواستار حسین، شفاهی منیره، خاکساری مهدی. اثر اسنیک اسید بر اختلالات یادگیری، حافظه فضایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مرگ سلولی نکروز در ناحیه هیپوکامپ در مدل سمیت عصبی ناشی از مت‌آمفتامین. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۱؛۱۷(۴):۸-۱.

مقدمه

مت‌آمفتامین یکی از انواع داروهای مخدر روان‌گردان می‌باشد که بر سیستم نوروترامیترهای مونوآمین مغز اثر گذاشته سبب افزایش انرژی و سرخوشی می‌گردد (۱). عقیده بر این است که اثرات پاتوژنیک نوروتوکسیسیته ناشی از مت‌آمفتامین در بخش‌هایی، مشابه سایر بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نظیر پارکینسون و آلزایمر می‌باشد (۲). هرچند به‌نظر می‌رسد فاکتورهای دیگری نیز در ایجاد نوروتوکسیته ناشی از مت‌آمفتامین شرکت داشته باشند که مکانیسم‌های آنها هنوز شناخته نشده است. بیشتر فرضیه‌ها بر وقایع درون نورون‌ها از قبیل اکسیداسیون دوپامین، استرس اکسیداتیو و سمیت خارج سلولی استوارند (۳ و ۴).

مت‌آمفتامین از طریق ناقل‌های دوپامین یا سروتونین (DAT یا SERT) وارد پایانه‌های نورونی شده و جایگزین دوپامین و سروتونین درون سلولی و وزیکولار می‌گردد. اینگونه آمین‌های جایگزین شده از طریق اتواکسیداسیون و یا به‌وسیله مونوآمین اکسیداز (MAO) به رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) اکسیده می‌شوند (۵). با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (از طریق NO و H_2O) مرگ نکروتیک سلولی رخ می‌دهد (۶). هرچند در طول زمان مکانیسم‌های دیگری از جمله نوروتوکسیته ناشی از گلوتامات یا پروکسی نیتریت نیز افزوده شدند.

همچنین نشان داده شده مت‌آمفتامین به‌دلیل خاصیت چربی دوستی‌اش قادر به انتشار از خلال غشاهای سلولی ارگانل‌های درون سلولی نظیر میتوکندری می‌باشد (۷) و نیز ممکن است مت‌آمفتامین از طریق تولید رادیکال‌های آزاد، بلکه حتی با القا و راه‌اندازی آبشارهای آپوپتوزی وابسته به میتوکندری سبب مرگ نورون‌ها شود (۸) در خصوص اثر التهابی مت‌آمفتامین مطالعات نشان می‌دهد استفاده از مت‌آمفتامین سبب فعالسازی میکروگلیاها در استریاتوم، قشر مغز و هیپوکامپ می‌شود (۴ و ۹–۱۱). افزایش دوپامین سیتوزولی و استرس اکسیداتیو در جریان استفاده از مت‌آمفتامین باعث تولید دوپاکوئینون‌ها شده میکروگلیاها را فعال می‌کند سپس سیتوکین‌های تولید شده در جریان فعال شدن میکروگلیاها باعث افزایش انتقال گلوتامات شده سمیت سلولی ایجاد می‌کند (۱۲). گلسنگ‌ها، از مهمترین منابع ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که به‌دلیل خاصیت درمانی ارزشمندشان همانند اغلب گیاهان، از دوران باستان به‌عنوان داروهای طبیعی در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۳). این ارگانیسم‌ها دارای فعالیت‌های بیولوژیکی بسیار متفاوت هستند از جمله خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد تب، ضد درد، ضد سرطان، ضد میکروب، ضد دیابت و ترمیم زخم هستند (۱۴). شایع‌ترین جنس گلسنگ، Usnea Dill Adans است که سابقه کاربرد پزشکی در سراسر جهان دارد. به‌عنوان مثال Usnea longissima Ach یک نوع از گونه‌های گلسنگ است که به‌طور گسترده برای درمان آسیب‌های ناشی از شکستگی استخوان و التهاب پوستی استفاده می‌شود (۱۵).

اسنیک اسید یک آنتی‌بیوتیک طبیعی است که به‌طور اختصاصی در گلسنگ یافت می‌شود و در پزشکی و مصارف زیست محیطی کاربرد دارد. اسنیک اسید در بسیاری از انواع گلسنگ شناخته شده از جمله Hypotrachyna، Cladonia، Usnea، Parmelia، Evernie، Ramalina، Lecanora و Alectoria شناسایی شده است. در برخی از مطالعات به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌التهابی اسنیک اسید اشاره شده است (۱۶ و ۱۷). در مطالعه لی و همکاران نشان داده شده است که اسنیک اسید بعلت داشتن اثرات ضدالتهاب عصبی، می‌تواند به‌عنوان کاندیدای درمانی بالقوه مفید برای بیماری پارکینسون (PD) و سایر بیماری‌های تخریب عصبی مرتبط با التهاب عصبی در نظر گرفته شود (۱۸).

با توجه به تمام حقایق فوق الذکر در مورد اثر حفاظتی اسنیک اسید و مکانیسم‌های مهم سمیت عصبی مت‌آمفتامین و با توجه به اینکه تاکنون درمان مشخص و مؤثری جهت جلوگیری از عوارض سمی مت‌آمفتامین بر روی سیستم عصبی مشخص و تأیید نشده در مطالعه حاضر، برای اولین بار، اثرات درمان اسنیک اسید در آسیب عصبی به دنبال سمیت عصبی مت‌آمفتامین را بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۶ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار و با وزن تقریبی ۲۸۰–۲۵۰ گرم خریداری شده وتحت شرایط استاندارد با دوره معکوس روشنایی و تاریکی ۱۲ساعته (۸ صبح تا ۸ شب) و دمای ۱ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد و دسترسی به آب آشامیدنی و غذای کافی نگهداری شدند. حیوانات برای سازگاری با محیط حداقل ۱۰ روز قبل از مطالعه به حیوانخانه منتقل می‌گردند. رت‌ها سه بار در هفته وزن شدند. با بررسی لازم اطمینان حاصل می‌گردد که هیچکدام از حیوانات واجد بیماری یا دارای شواهدی دال بر بیماری نبودند. سپس رت‌ها به‌طور تصادفی در ۳ گروه ۱۲ تایی تقسیم‌بندی‌شدند. کد اخلاق IR.SHMU.REC.1397.186

ایجاد مدل نوروتوکسیسیته مت‌آمفتامین و اختلال حافظه و یادگیری در رت‌ها به‌صورت زیر انجام شد:

۲–۱– مرحله اول: تجویز دارو

گروه اول: شاهد.

گروه دوم: دریافت‌کننده مت‌آمفتامین با دوز۴× ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی +سالین به‌عنوان حلال دارو۳۰ دقیقه، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق متامفتامین

گروه سوم: دریافت‌کننده مت‌آمفتامین با دوز ۴× ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی + اسنیک اسید ۲۵ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم

وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی ۳۰ دقیقه ، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق مت‌آمفتامین.

۲-۲- مرحله دوم: انجام آزمون‌های رفتاری

۲-۳- دستگاه ماز آبی موریس:

در این آزمون میزان یادگیری حیوانات به مدت ۵ روز متوالی (۴ روز آموزش و یک روز آزمون) ارزیابی شد. ماز آبی موریس از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر با آب (۲۲ ± ۱oC) پرشد. حوضچه به ۴ ربع دایره (شمال، جنوب، شرق و غرب) تقسیم شده و یک سکوی مخفی کوچک از جنس فلز تیره رنگ یک سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز ربع دایره جنوب غربی قرار دارد. هر موش به‌طور تصادفی از یکی از ربع‌های حوضچه آزاد شده و سپس مدت زمان و مسافت طی شده تا پیدا کردن سکو ثبت شد. هر موش به مدت ۴ روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) از ۴ ربع حوضچه به‌طور تصادفی رهاسازی و تحت آموزش و آزمایش قرار گرفت و در روز ۵ ارزیابی از آموزش صورت گرفت. یک تجربه زمانی به اتمام رسید که موش بر روی سکو رفته و یا ۹۰ ثانیه بگذرد. سپس ۳۰ ثانیه به حیوان فرصت داده شده و پس از آن تجربه بعدی شروع گردید. موش‌هایی که محل سکو را پیدا نکردند توسط آزمایش‌گر به روی سکو منتقل شده و اجازه یافتند ۳۰ ثانیه در آنجا بمانند. پس از اتمام تجربه چهارم موش‌ها از حوضچه خارج شدند. حرکات حیوان درون ماز آبی بوسیله یک نرم‌افزار کامپیوتری ردیابی و بررسی شد. در این آزمون، مدت زمان رسیدن به سکوی هدف به‌عنوان زمان تأخیرتا گریز یا مدت زمان لازم برای یافتن سکوی پنهان، مسافت طی شده برای رسیدن به سکو و سرعت طی شده در طول روزهای آموزش ثبت شد و همین‌طور در روز آزمون در روز پنجم، سکو برداشته شد و به حیوانات اجازه داده‌شد تا به مدت ۶۰ ثانیه شنا کند و زمان صرف شده در منطقه هدف ثبت گردید. اطلاعات جمع‌آوری شده برای هر یک از حیوانات شامل: ۱- مدت زمان سپری شده به‌منظور یافتن سکوی پنهان ۲- مدت مرحله پروب. مقایسه اطلاعات به‌دست آمده از حیوانات گروه‌های مختلف مورد مطالعه با روش‌های آماری و نرم‌افزارهای مرتبط انجام می‌شود.

۲-۴- روش ارزیابی سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای بررسی سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بعد از انجام آزمون‌های رفتاری، نیمی از حیوانات در هر گروه تحت بیهوشی عمیق، کشته شده، مغز آنها خارج و هیپوکامپ به دقت جدا می‌گردد و در داخل نیتروژن مایع و سپس فریزر منفی ۸۰ قرار داده خواهد شد. نمونه‌ها در بافر مخصوص، هموژنایز و سپس سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت آنها برای ارزیابی‌های بیوشیمیایی جمع‌آوری خواهد شد. سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دسموتاز، مالون دیالدهید) با استفاده از کیت‌های مخصوص و به روش اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌صورت پیکوگرم در هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد

۳-۴- روش ارزیابی میزان مرگ سلولی نکروزیس با رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل)

رنگ‌آمیزی نیسل معمولاً برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های سالم به‌صورت سلول‌های یوکروماتین دیده می‌شوند.

بعد از انجام تست حافظه، جهت آماده‌سازی بافت‌ها، نیمی دیگر از حیوانات در هر گروه بی‌هوش شده و سپس پرفیوژن ترانس‌کاردیاک با سالین ۰/۹٪ و به‌دنبال آن پارافرمالدهید ۴٪ در بافر فسفات ۰/۱M (۷/۴ pH) به‌عنوان فیکساتیو انجام شد. سپس مغز موش‌های صحرایی برداشته شده و به مدت یک شبانه روز در فیکساتیو مشابه قرار داده شدند. سپس از مغزها بلوک‌های پارافینه تهیه شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع کرونال با ضخامت ۷µm برای رنگ‌آمیزی بافتی تهیه شد. مقاطع بر اساس اطلس پاکسینوس بین ۳/۳ و ۴/۲ میلی‌متر پشت برگما تهیه شد. برای رنگ‌آمیزی نیسل، برش‌های ۷ میکرومتری (سه برش در هر حیوان) بر روی لام‌های سیلانه شده انتقال داده شدند. سپس با استفاده از محلول کرزیل ویوله استات ۰/۱ درصد (سیگما، USA) رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها سپس خشک شده و با انتالن پوشانده شدند. سپس با استفاده از میکوسکوپ نوری (Olympus AX-70) و با بزرگنمایی x۴۰۰ از برش‌ها تصویر تهیه شد. بعد از تهیه تصاویر، با استفاده از نرم‌افزار Olysia bio report شمارش سلولی در امتداد خطی با طول ۴۰۰ میکرومتر (مساحتی حدود ۰/۱۶۰ میلی‌متر مربع) از ناحیه CA1 هیپوکامپ راست رت‌ها انجام گردید. فقط سلول‌های نامنظم و تیره که هسته و هستک مشخص نداشتند به‌عنوان سلول‌های مرده در نظر گرفته و شمارش شدند.

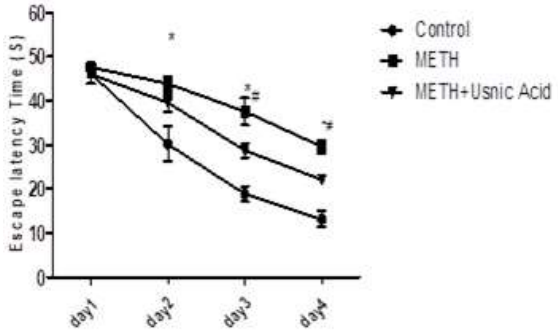
۵- تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری پریسم و آزمون‌های تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و دو طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به‌صورت mean ± SEM بیان می‌شوند و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

۳-۱- اثر درمانی اسنیک اسید بر اختلال یادگیری در روزهای آموزش (روزهای ۴-۱)

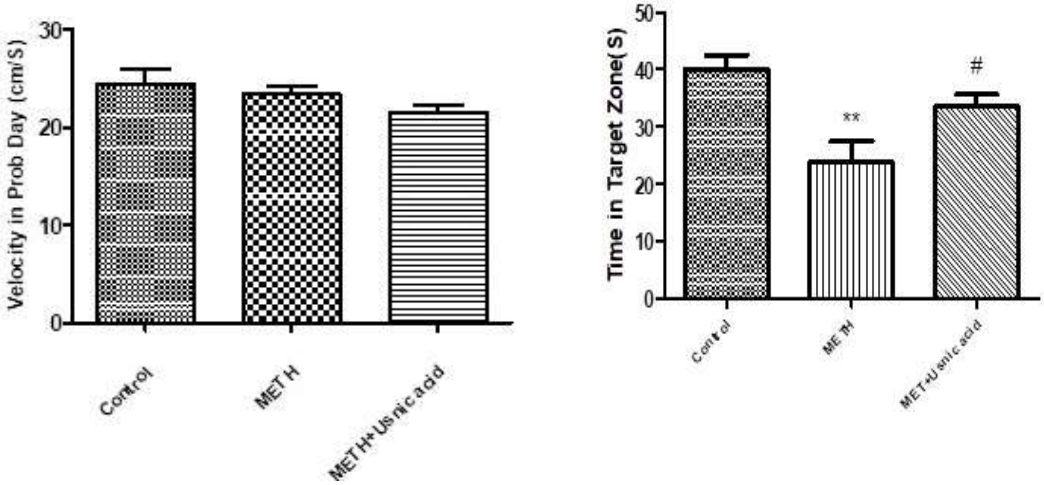
میزان یادگیری در روزهای آموزش افزایش معناداری در گروه متآمفتامین نسبت‌به گروه‌های کنترل نشان می‌دهد (کاهش میزان یادگیری P<۰/۰۱). به‌علاوه در گروه‌های تیمار شده با اسنیک اسید میزان یادگیری در روزهای آموزش نسبت‌به گروه متآمفتامین کاهش‌یافته است (بهبود فرآیند یادگیری P<۰/۰۱).



نمودار ۱- مقایسه زمان تأخیر تا گریز در روزهای آموزش (روزهای ٤-۱) در گروه‌های مورد آزمایش

* نشانه معناداری میانگین گروه متآمفتامین در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱).

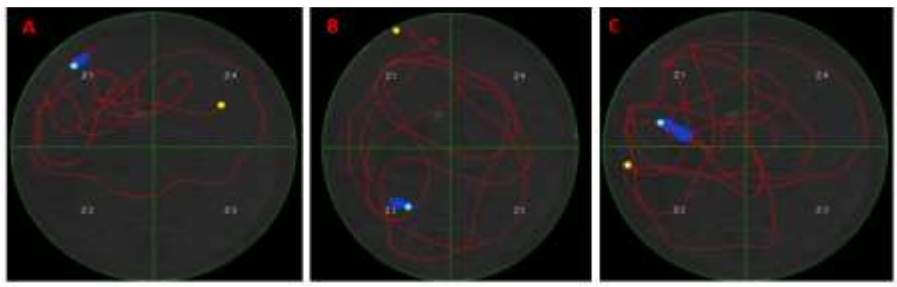
نشانه معناداری میانگین گروه اسنیک اسید در مقایسه با گروه دریافت‌کننده متآمفتامین (P<۰/۰۱).



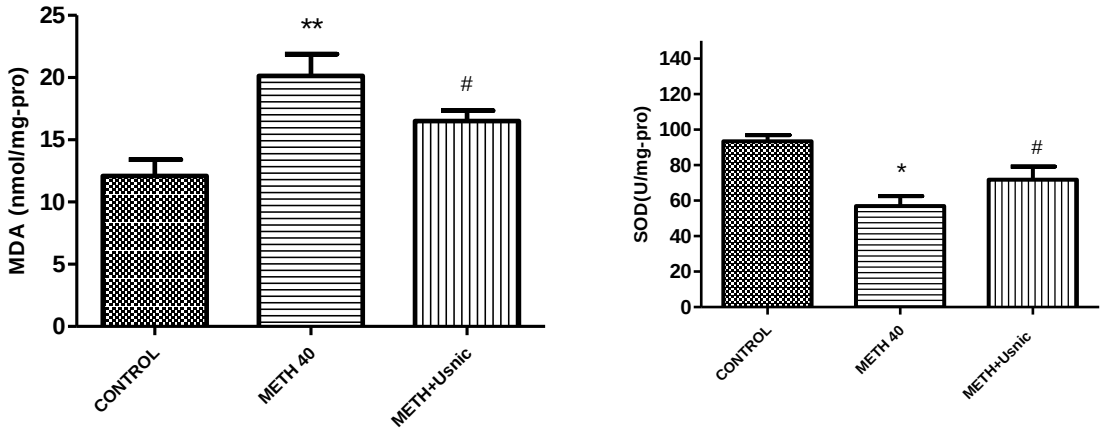
نمودار ۲- مقایسه عملکرد حافظه در ماز آبی موریس در گروه‌های مورد آزمایش

* نشانه معناداری میانگین گروه در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۱).

نشانه معناداری میانگین گروه اسنیک اسید در مقایسه با گروه متآمفتامین (P<۰/۰۵).



شکل ۱- الگوی شنای حیوانات در گروه‌های مختلف در روز آزمون (روز پنجم) در تست ماز آبی موریس. A)گروه کنترل، B) گروه متآمفتامین، C) گروه تیمار شده با اسنیک اسید



نمودار ۳- اثرات اسنیک اسید بر مرگ سلول‌های نکروتیک ناشی از دریافت مت‌آمفتامین در ناحیه هیپوکامپ CA1 موش صحرایی با استفاده از رنگ‌آمیزی نیسل

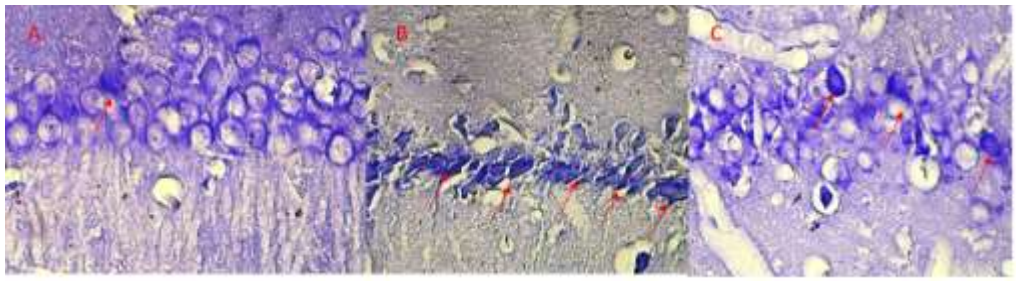
* نشانه معناداری میانگین گروه مت‌آمفتامین در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱).

نشانه معناداری میانگین گروه اسنیک اسید در مقایسه با گروه مت‌آمفتامین (P<۰/۰۵).

نمودار ۳- اثرات اسنیک اسید بر غلظت مالون دی الدهید و آنزیم سوپراکسد دسموتاز در ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی

* نشانه معناداری میانگین گروه مت‌آمفتامین در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱).

نشانه معناداری میانگین گروه اسنیک اسید در مقایسه با گروه مت‌آمفتامین (P<۰/۰۵).



شکل ۲- فوتومیکروگراف از رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل) در ناحیه CA1 هیپوکامپ راست پس از ایجاد نوروتوکسیسیته ناشی از مت‌آمفتامین: A) گروه کنترل، B) گروه مت‌آمفتامین، C) گروه تیمار شده با اسنیک اسید

۳-۲- اثرات درمانی اسنیک اسید بر اختلال حافظه طی روز آزمون (روز ۵) در ماز آبی موریس

زمان حضور در منطقه هدف (محل حضور سکو در روزهای آموزش) در روز پراب در گروه مت‌آمفتامین کاهش معناداری نسبت‌به گروه‌های کنترل و اسنیک اسید نشان می‌دهد که بیانگر اختلال در حافظه فضایی می‌باشد. در گروه تیمار شده با اسنیک اسید افزایش معناداری در عملکرد حافظه نسبت‌به گروه مت‌آمفتامین مشاهده می‌شود (P<۰/۰۱). همچنین قسمت دیگر نتایج نشان می‌دهد که سرعت حرکت شنا در گروه‌های مختلف تفاوت معناداری وجود ندارد.

۳-۳- +++ اثر تجویز اسنیک اسید بر شاخص اکسداتیو و سطح آنزیم آنتی‌اکسیدانی در ناحیه هیپوکامپ در موش‌های صحرایی نر تحت مصرف مت‌آمفتامین

درمان با اسنیک اسید غلظت MDA ناشی از مت‌آمفتامین در ناحیه هیپوکامپ را کاهش می‌دهد. در تجزیه و تحلیل‌های بیوشیمیایی سطح MDA در هیپوکامپ گروه مت‌آمفتامین از گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۱). درمان با پالماتین سطح MDA را در مقایسه با گروه مت‌آمفتامین کاهش داد (P<۰/۰۱).

درمان با اسنیک اسید سطح SOD را پس از مت‌آمفتامین را افزایش داد. کاهش قابل توجهی در میزان SOD در گروه مت‌آمفتامین در مقایسه با گروه شاهد بود و درمان با اسنیک اسید سطح SOD را در مقایسه با گروه مت‌آمفتامین افزایش داد (P<۰/۰۵).

۳-۴- اثر تجویز اسنیک اسید بر مرگ سلولی نکروزیس در ناحیه هیپوکامپ در موش‌های صحرایی نر تحت مصرف مت‌آمفتامین

اسنیک اسید نکروز نورونی ناشی از مت‌آمفتامین در ناحیه هیپوکامپ را کاهش می‌دهد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی نیسل نشان می‌دهد که درصد سلول‌های نکروتیک در ناحیه CA1، هیپوکامپ راست در گروه مت‌آمفتامین نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۰۱).

در گروه تیمار شده با اسنیک اسید مرگ سلولی نکروتیک در مقایسه با گروه مت‌آمفتامین کاهش یافت (P<۰/۰۵).

پالماتین به‌طور قابل توجهی باعث کاهش مرگ سلولی نکروتیک ناشی از دریافت مت‌آمفتامین در ناحیه CA1 می‌شود.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از مت‌آمفتامین باعث کاهش معنی‌داری در شاخص‌های عملکردی یادگیری و حافظه فضایی شامل زمان تأخیر تا گریز برای رسیدن به سکو در روزهای آموزش و همین‌طور زمان صرف شده در منطقه هدف در طول روز آزمون در گروه مت‌آمفتامین نسبت‌به سایر گروه‌ها مشاهده شد که این شاخص‌ها در گروه تیمار شده با اسنیک اسید بهبود یافتند. این نتایج نشان‌دهنده اثرات مثبت اسنیک اسید بر آسیب یادگیری و حافظه فضایی موش‌ها پس از سمیت عصبی ناشی از مت‌آمفتامین است که می‌تواند به‌دلیل اثرات محافظت‌کننده عصبی اسنیک اسید و کاهش مرگ سلولی در ناحیه CA1 هیپوکمپ باشد. به‌نحوی که افزایش معناداری در میانگین تعداد سلول‌های نکروتیک ناحیه CA1 در گروه مت‌آمفتامین نسبت‌به سایر گروه‌ها وجود دارد که در اثر تیمار با اسنیک اسید میزان مرگ سلولی نکروز در مقایسه با گروه مت‌آمفتامین به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد.

پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند استرس‌های اکسیداتیو در اسیب ناشی از سمیت مت‌آمفتامین نقش محوری دارند. مت‌آمفتامین باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، نیتریک اکساید و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل سوپراکساید دیسموتاز، گلوتاتیون و کاتالاز می‌شود (۱۹). مطالعات دیگر نشان دادند که افزایش سطح رادیکال‌های آزاد از طریق اثر مستقیم و تخریب پروتئین‌ها و لیپیدهای سلول و همچنین تخریب DNA منجر به فعال شدن مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود. همچنین از طریق اثر غیرمستقیم باعث اختلال در مسیر سیگنالینگ و تنظیم ژنی سلول و نهایتاً مرگ سلول می‌شود. پژوهش‌های قبلی گزارش کرده‌اند، مهارکننده پراکسیداسیون چربی‌های غشاء و یا از بین برنده‌های رادیکال‌های آزاد اثر محافظتی در مقابل سمیت ناشی از مت‌آمفتامین دارند (۲۰).

یکی از محصولات سیتوتوکسیک ایجاد شده از پراکسیداسیون لیپیدها مالون دی‌آلدهید می‌باشد که به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای استرس اکسیداتیو، تولید رادیکال‌های آزاد و آسیب بافتی را اثبات می‌کند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون سلول‌ها را در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کنند. آنها یک مکانیسم دفاعی برای ارگانسیم‌های هوازی محسوب می‌شوند (۲۱). سوپراکسید دیسموتاز، تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید اکسیژن و هیدروژن راکاتالیز می‌نماید. به‌علاوه گلوتاتیون سلول‌ها را در برابر آسیب ناشی از ذرات اکسیژن فعال شده شامل رادیکال‌ها و پراکسیدهای آزاد محافظت می‌کند. ظرفیت بلوکه کردن تولید سایتوکین‌های التهابی نظیر فاکتور نکروز توموری آلفا می‌تواند یکی دیگر از مکانیسم‌های ممکن در خصوص توانایی محافظت‌کننده عصبی پالماتین در برابر مت‌آمفتامین به حساب آید. سطح فاکتور نکروز توموری آلفا مغز به‌طور مشخص در انواع مختلفی از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی نظیر تروما، ایسکمی، مالتیپل اسکلروزیس و صرع لوب گیجگاهی افزایش می‌یابد. علاوه بر این بسیاری از تحقیقات مشخص می‌کند که تیمار با مت‌آمفتامین سبب افزایش فاکتور نکروز توموری آلفا mRNA و اینترلوکین -۶ در هیپوکامپ و قشر پیشانی می‌گردد همچنین پیشنهاد شده که فاکتور نکروز توموری آلفا برای نورون‌ها و گلیاها خاصیت سمی‌داشته و با سمیت عصبی ناشی از مت‌آمفتامین همراه است. این مولکول‌های پیش التهابی مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوزی پایین دستی را در نورون‌ها فعال نموده، در نهایت سبب مرگ نورونی و فعالسازی سلول‌های گلیال می‌گردند که التهاب نورونی را تشدید می‌نماید (۱۹).

گلسنگ‌ها موجودات همزیستی هستند که از یک قارچ، یک جلبک و یا یک سیانوباکتری تشکیل شده‌اند وعلاوه بر متابولیت‌های اولیه (به‌عنوان مثال اسیدهای چرب و کربوهیدرات‌ها)، متابولیت‌های ثانویه با ویژگی‌های منحصر به فرد دارویی، تولید می‌کنند. اخیراً علاقه مجدد به گلسنگ به‌عنوان منابع جدید مولکول‌های زیستی فعال دارویی، با مطالعه دقیق آغاز شده است و اثرات ضدمیکروبی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات محافظتی نورون‌ها در برابر گونه‌های فعال اکسیژن داخل سلولی، از متابولیت‌های ثانویه آنها گزارش شده است. با این حال تعداد اندکی از مطالعات عمیقاً نقش آنها را ارزیابی کرده‌اند (۲۲). در این راستا با یافته‌های ما، نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که اسنیک اسید خواص حفاظت سلولی از سلول‌های شبیه سیستم عصبی مرکزی در برابر مدل‌های سمیت سلولی مربوطبه H_2O_2، به‌واسطه کاهش تولید ROS، سطح پراکسیداسیون لیپید و فعال‌سازی پروتئین پیش آپوپتوزی دارد. مطالعه مشابه دیگری گزارش داد که درمان با اسنیک اسید منجر به مهار استرس اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی در یک مدل آسیب حاد ریه در موش‌ها به‌واسطه افزایش فعالیت SOD و GSH و کاهش بیان کموکاین‌های التهابی شامل فاکتور نکروزدهنده آلفا، اینترلوکین -۶ اینترلوکین -۸ و پروتئین التهابی ماکروفاژ -۲ می‌شود (۲۳). نتایج این مطالعه نشان داد که درمان با اسنیک اسید اختلالات حافظه و یادگیری فضایی و آسیب ناحیه هیپوکامپ را در مدل سمیت عصبی ناشی از مت‌آمفتامین بهبود می‌بخشد. به‌نظر می‌رسد که این اثرات محافظت‌کننده عصبی پالماتین از مکانیسم‌های مانند مهار مرگ سلولی نکروزیس ناشی می‌شود. در نتیجه، با توجه به این اثرات حفاظتی اسنیک اسید در شرایط پاتولوژیک، می‌توان آن را به‌عنوان یک عامل مؤثر برای کاهش سمیت عصبی ناشی از مت‌آمفتامین معرفی کرد، هرچند که تحقیقات بیشتر در آینده موردنیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان‌نامه مقطع دکترای حرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی شاهرود می‌باشد. بدین‌وسیله از حمایت مالی این دانشگاه در طرح پژوهشی شماره ۹۸۷۸ قدردانی می‌گردد. کد اخلاق IR.SHMU.REC.1397.186

References

1. Yu S, Zhu L, Shen Q, Bai X, Di X. Recent advances in methamphetamine neurotoxicity mechanisms and its molecular pathophysiology. Behav Neurol 2015;2015. doi: 10.1155/2015/103969
2. Gonçalves J, Martins T, Ferreira R, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, et al. Methamphetamine-Induced Early Increase of IL-6 and TNF-α mRNA Expression in the Mouse Brain. Ann N Y Acad Sci 2008;1139:103-11. doi:10.1196/annals.1432.043
3. Cadet JL, Krasnova IN, Jayanthi S, Lyles J. Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. Neurotox Res 2007;11:183-202.
4. Thomas DM, Walker PD, Benjamins JA, Geddes TJ, Kuhn DM. Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation. J Pharmacol Exp Ther 2004;311:1-7. doi:10.1124/jpet.104.070961
5. Cubells JF, Rayport S, Rajendran G, Sulzer D. Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. J Neurosci Res 1994;14:2260-71. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-04-02260.1994
6. Bowyer JF, Clausing P, Gough B, Slikker Jr W, Holson RR. Nitric oxide regulation of methamphetamine-induced dopamine release in caudate/putamen. Brain Res 1995;699:62-70. doi: 10.1016/0006-8993(95)00877-S
7. Davidson C, Gow AJ, Lee TH, Ellinwood EH. Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. Brain Res Rev 2001;36:1-22. doi: 10.1016/S0165-0173(01)00054-6
8. Seiden LS, Sabol KE. Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity: possible mechanisms of cell destruction. Neuroto and Neuropath 1996;163:1276.
9. Escubedo E, Guitart L, Sureda FX, Jiménez A, Pubill D, Pallàs M, et al. Microgliosis and down-regulation of adenosine transporter induced by methamphetamine in rats. Brain Res 1998;814:120-6. doi: 10.1016/S0006-8993(98)01065-8
10. Guilarte T, Nihei M, McGlothan J, Howard A. Methamphetamine-induced deficits of brain monoaminergic neuronal markers: distal axotomy or neuronal plasticity. Neuroscience. 2003;122:499-513. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00476-7
11. Pubill D, Canudas AM, Pallàs M, Camins A, Camarasa J, Escubedo E. Different glial response to methamphetamine-and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. Naunyn-Schmiedeb. Arch Pharmacol 2003;367:490-9. doi: 10.1007/s00210-003-0747
12. Zou JY, Crews FT. TNFα potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NFκB inhibition. Brain Res 2005;1034:11-24. doi: 10.1016/j.brainres.2004.11.014
13. Cocchietto M, Skert N, Nimis P, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften 2002;89:137-46. doi: 10.1007/s00114-002-0305-3
14. Luzina O, Salakhutdinov N. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 1. Activity against unicellular organisms. Russ J Bioorganic Chem 2016;42:115-32. doi: 10.1134/S1068162016020084
15. Lai B, Upreti D. Ethnobotanical notes on three Indian lichens. The Lichenologist 1995;27:77-9.
16. Caviglia AM, Nicora P, Giordani P, Brunialti G, Modenesi P. Oxidative stress and usnic acid content in Parmelia caperata and Parmelia soredians (Lichenes). Il Farmaco 2001;56:379-82. doi: 10.1016/S0014-827X(01)01090-4
17. Luzina OA, Salakhutdinov NF. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000–2017). Expert Opin Ther Pat 2018;28:477-91. doi: 10.1080/13543776.2018.1472239
18. Lee S, Lee Y, Ha S, Chung HY, Kim H, Hur J-S, et al. Anti-inflammatory effects of usnic acid in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. Brain Res 2020;1730:146642. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146642
19. Zare Mehrjerdi F, Shoshtari A, Mohseni F, Khastar H, Norozi P, Asadi Y, et al. Sulfur dioxide reduces hippocampal cells death and improves learning and memory deficits in rat model of transient global ischemia/reperfusion. Iran J Basic Med Sci 2018;21:998-1003. doi: 10.22038/IJBMS.2018.29404.7106
20. Kim B, Yun J, Park B. Methamphetamine-induced neuronal damage: neurotoxicity and neuroinflamation. Biomol Ther 2020;28:381. doi: 10.4062/biomolther.2020.044
21. Moszczynska A, Callan SP. Molecular, behavioral, and physiological consequences of methamphetamine neurotoxicity: implications for treatment. J Pharmacol Exp Ther 2017;362:474-88. doi: 10.1124/jpet.116.238501
22. Shafahi M, Vaezi G, Shajiee H, Sharafi S, Khaksari M. Crocin inhibits apoptosis and astrogliosis of hippocampus neurons against methamphetamine neurotoxicity via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. Neuroch Res 2018;43:2252-9. doi: 10.1007/s11064-018-2644-2
23. Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. Food Chem Toxicol 2017;105:262-77. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.030
24. Su Z-Q, Mo Z-Z, Liao J-B, Feng X-X, Liang Y-Z, Zhang X, et al. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. Int Immunopharmaco 2014;22:371-8. doi: 10.1016/j.intimp.2014.06.043

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2023; Vol 17, No 4

DOI: 10.22100/jkh.v17i4.2652

Original Article

The Protective Effect of Usnic Acid on Impairment Learning and Memory , Antioxidant Capacity and Necrosis Cell Death on Hippocampus Following Methamphetamine Neurotoxicity

Neghar Gholampour (Medical Student)[1], Anneh Mohammad Gharravi (Ph.D.)[2], Hossein Khastar (Ph.D.)[3], Monire Shafahi (Ph.D.)[4], Mehdi Khaksari (Ph.D.)[5*]

1- Student Research Committee, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
2- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
3- Dept. of Physiology ,Sexual Health and Fertility Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
4- Dept. of Sciences, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
5- Addiction Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 12 July 2021**, Accepted:** 10 December 2022

Abstract:

Introduction*: Nowadays, methamphetamine addiction among teenagers and young people has attracted great concern in Iran. Long-term use of methamphetamine damages the brain's dopaminergic, serotonergic, and metabolic systems. Moreover, due to the effects of neurotoxicity in the brain, the patient suffers from cognitive disorders such as memory and learning disorders, mood disorders, and anxiety. Usnic acid has various biological properties, including antioxidant and anti-inflammatory activities. Therefore, the purpose of this study was to investigate the protective effects of usnic acid against the neurotoxicity of methamphetamine.*

Methods *Methamphetamine neurotoxicity was induced by 40 mg/kg of METH in four intraperitoneally (IP) injections (e.g., 4×10 mg/kg q. 2-h, IP.). Usnic acid (25 mg/kg) was inserted at 30- min, 24-h, and 48 h after the final injection of METH. The Morris water maze test was used to study spatial memory. The brains were removed for biochemical assessments and Nissl staining.*

Results*: Behavioral tests show that usnic acid treatment could significantly improve spatial memory deficits and learning ($P<0.05$) versus the METH group. Usnic acid treatment significantly increased superoxide dismutase ($P<0.01$) and reduced malondialdehyde ($P<0.05$). Moreover, usnic acid significantly reduced necrosis cell death ($P<0.05$) in the CA1 area of the hippocampus.*

Conclusion*: According to the findings, usnic acid improves memory and learning function in rats by reducing cell death.*

Keyword: Methamphetamine neurotoxicity, Usnic acid, Necrosis, Impairment learning and memory.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** M. Khaksari, **Email**: khaksari417@yahoo.com*

Citation: Gholampour N, Gharravi A.M., Khastar H, Shafahi M, Khaksari M. The protective effect of usnic acid on impairment learning and memory , antioxidant capacity and necrosis cell death on hippocampus following methamphetamine neurotoxicity. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;17(4):1-8.