مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۲۰، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v20i1.3410

مقاله پژوهشی

بررسی اثر محافظتی عصاره متانولی گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر اختلالات یادگیری، حافظه فضایی و مرگ سلولی نکروز در ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی نر مدل سمیت عصبی مت‌آمفتامین

طاهره ولدبیگی[۱*]، مهدی خاکساری[۲]، مریم منصوری‌فر[۳]

۱- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایران.

۲- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۲، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۴/۰۱/۰۴

چکیده

مقدمه: *مصرف داروی محرک مت‌آمفتامین، سبب کاهش حجم و تخریب نورونی در ناحیه هیپوکامپ می‌شود. تخریب نورونی در هیپوکامپ به معنای کاهش ظرفیت مغز در تشکیل حافظه جدید و نقص یادگیری است. پروتوپارملیوپسیس مورالیس یک گلسنگ دارای اثرات بیولوژیکی مختلف از جمله اثر آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ترمیم‌کنندگی است. مطالعه حاضر جهت بررسی عملکرد محافظت گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس در برابر سمیت نورونی مت‌آمفتامین انجام گرفته است.*

مواد و روش‌ها: *در این پژوهش تجربی، ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم تهیه شدند. پس از یک دوره سازگاری، حیوانات به‌صورت تصادفی به چهار گروه ۷ تایی (گروه شاهد، گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین با دوز ۴×۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم+ عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین با دوز ۴×۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم+ عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) تقسیم شدند. تزریق درون صفاقی مت‌آمفتامین در دوز ۴۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم در چهار نوبت و با فواصل زمانی هر دو ساعت یکبار به میزان ۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم انجام شد. برای حیوانات تیمار، عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم ۳۰ دقیقه، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از آخرین دوز دریافتی مت‌آمفتامین تجویز شد. پس از آزمون حافظه فضایی، مغز حیوانات جهت بررسی مرگ سلولی نکروز استخراج شد.*

نتایج: *براساس داده‌های رفتاری، یادگیری در گروه‌های درمان با عصاره پروتوپارملیوپسیس نسبت‌به گروه مت‌آمفتامین بهبودیافته و در آزمون پروب درصد حضور حیوانات در منطقه هدف در گروه‌های تیمار به طور معناداری از گروه مت‌آمفتامین بیشتر بود که بیانگر بهبود عملکرد حافظه می‌باشد ($P>0/01$). در گروه مت‌آمفتامین افزایش سلول‌های نکروتیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ مشاهده گردید که درمان با عصاره گلسنگ پروتوپارملیوپسیس کاهش معناداری در میزان آن ایجاد کرد ($P>0/05$).*

نتیجه‌گیری: *گلسنگ پروتوپارملیوپسیس احتمالاً با کاهش مرگ نورونی سبب بهبود اختلال حافظه و یادگیری ناشی از مت‌آمفتامین می‌شود.*

واژه‌های کلیدی: گلسنگ، پروتوپارملیوپسیس، مت‌آمفتامین، نکروز، حافظه فضایی.

***نویسنده مسئول:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، **تلفن:** ۰۹۱۲۶۰۹۲۱۹۷، **نمابر:** ۰۸۴۳۲۲۲۲۰۱۵، **Email:** taherehvaladbeigi2024@gmail.com

ارجاع: ولدبیگی طاهره، خاکساری مهدی، منصوری‌فر مریم. بررسی اثر محافظتی عصاره متانولی گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر اختلالات یادگیری، حافظه فضایی و مرگ سلولی نکروز در ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی نر مدل سمیت عصبی مت‌آمفتامین. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۴؛۲۰(۱):۴۹-۴۲.

CC BY NC

مقدمه

جهان امروز ما پیش از هر زمان دیگری با مشکلات ناشی از سوء مصرف مواد مخدر و محرک درگیر است (۱ و ۲). مت‌آمفتامین یک ترکیب شیمیایی محرک سیستم عصبی مرکزی با خاصیت اعتیادآوری بسیار قوی است که به‌طور گسترده در سراسر جهان مورد سوءاستفاده قرار می‌گیرد. براساس گزارش سال ۲۰۲۱ سازمان بهداشت روان آمریکا، حدود ۰/۹ درصد از جوانان ۱۸ تا ۲۵ ساله و ۱/۱ درصد از بزرگسالان بالای ۲۶ سال این کشور، در سال گذشته ماده مت‌آمفتامین مصرف کرده‌اند. در اروپا نیز، ۲/۹ میلیون نفر در سال ۲۰۲۰ در گروه سنی ۱۵ تا ۶۴ سال حداقل یک بار آمفتامین مصرف کرده‌اند. برآوردهای جهانی نشان می‌دهد که حدود ۳۴/۰۷ میلیون نفر، معادل ۰/۷ درصد جمعیت جهان، از این ماده مخدر استفاده می‌کنند (۳). برخی مطالعات و گزارش‌ها حاکی از آن است که مصرف داروهای اعتیاد خصوصاً مواد محرک در کشور ما ایران در سال‌های اخیر افزایش‌یافته است، هرچند آمار دقیقی از تعداد مصرف‌کنندگان در دسترس نیست (۴). از نظر بیوشیمیایی، مت‌آمفتامین با مهار باز جذب دوپامین، نوراپی‌نفرین و سروتونین، به افزایش بیش از حد این نوروترانسمیترها در سیناپس‌های عصبی کمک می‌کند که این بیش فعالیتی نوروترانسمیتری در نهایت به آسیب سلولی و از دست رفتن آنها منتهی می‌شود (۵ و ۶). علاوه بر این، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که سوء مصرف مت‌آمفتامین، تغییرات ساختاری و عملکردی از جمله کاهش حجم و تخریب سیناپس‌ها در ناحیه هیپوکامپ را به‌دنبال دارد. در واقع کاهش تعداد نورون‌ها در هیپوکامپ به معنای کاهش ظرفیت مغز در تشکیل حافظه جدید و همچنین نقص در تثبیت و بازیابی اطلاعات است (۷). علاوه بر این، مت‌آمفتامین با ایجاد اختلال در عملکرد سیناپس‌ها، مانع از انتقال موثر اطلاعات در مغز می‌شود. این اختلال در انتقال مؤثر بین نورونی اطلاعات، پایه و اساس بسیاری از اختلالات شناختی از جمله اختلالات حافظه‌ای و مشکلات یادگیری است که در مصرف‌کنندگان مت‌آمفتامین مشاهده می‌شود (۸). پژوهش‌های متعدد بر روی مدل‌های حیوانی سمیت مت‌آمفتامینی به مکانیسم‌های احتمالی مسئول در ایجاد تخریب نورونی ناشی از مت‌آمفتامین در هیپوکامپ و همچنین تأثیر آن بر اختلال در جنبه‌های مختلف شناختی مانند حافظه و یادگیری پرداخته‌اند (۱۱-۹). مطالعه لی و همکاران نشان داده است که مت‌آمفتامین با فعال‌سازی مکانیسم‌های آپوپتوزی، به ویژه از طریق افزایش بیان پروتئین‌های پیش‌برنده مرگ سلولی مانند Bax و کاسپاز ۳ و کاهش همزمان بیان پروتئین‌های بازدارنده آپوپتوز مانندBcl-2 ، به‌طور قابل توجهی به نورون‌های هیپوکامپ آسیب رسانده و منجر به مرگ گسترده سلولی در این ناحیه شده است (۱۲).

در پژوهش دیگری که توسط چن و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام شد مشخص شد که مواجهه با مت‌آمفتامین منجر به اختلال عملکرد میتوکندری و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در آستروسیت‌های هیپوکامپ می‌شود. تولید و تجمع میزان بالای ROS در آستروسیت‌ها سبب فعال شدن مسیر سیگنالینگ PRKR-like ER kinase (PERK) می‌شود که حاصل فعالیت این مسیر بیان افزایش‌یافته Astrocyte-Derived Lipocalin-2 (LCN2) می‌باشد. LCN2 تولید شده از آستروسیت‌ها خارج شده و به رسپتور خود که در سطح نورون‌های هیپوکامپی مجاور آستروسیت‌ها قرار دارد متصل می‌شود. این اتصال آبشار مرگ سلولی را با واسطه کاسپاز ۳ فعال کرده و موجب آپپتوز و مرگ نورون‌های هیپوکامپی می‌شود (۱۳).

داروی مت‌آمفتامین علاوه بر مرگ نورونی آپپتوز، سبب از بین رفتن سلول‌های عصبی از طریق القای مرگ سلولی نوع نکروز نیز می‌شود (۱۴). به‌طور مثال گزارش هادی‌زاده بزاز و همکاران در سال ۲۰۲۳ حاکی از افزایش سلول‌های نکروتیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی به دنبال تزریق مت‌آمفتامین در مقایسه با گروه کنترل بود. همچنین در این مطالعه وجود اختلالات حافظه فضایی به‌دنبال مصرف مت‌آمفتامین با مرگ سلولی وسیع در ناحیه هیپوکامپ مرتبط بود (۱۵).

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. در واقع گلسنگ‌ها ارگانیسم‌هایی هستند از هم زیستی بین یک قارچ با یک جلبک سبز یا سیانوباکتری به وجود آمده‌اند (۱۶). مطالعات بسیاری مؤید این موضوع است که ترکیبات طبیعی موجود در برخی از گلسنگ‌ها دارای خاصیت محافظتی در برابر مرگ سلولی و القای بقای نورونی هستند (۱۶). جنس پروتوپارملیوپسیس متعلق به خانواده لکانوراسه جزو قارچ‌های گلسنگ‌ساز است که با جلبک‌های سبز یا سیانوباکتری‌ها در همزیستی زندگی می‌کند (۱۷). گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس به دلیل توانایی تولید ترکیبات زیستی با خواص دارویی متنوع، از جمله اثرات محافظتی بر سیستم عصبی، مورد توجه پژوهشگران حوزه علوم اعصاب قرار گرفته است. بسیاری از ترکیبات تولید شده توسط این قارچ‌ها، خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند و با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد مضر در سلول‌ها، از اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و تخریب DNA جلوگیری می‌کنند (۱۶ و ۱۸). همچنین برخی از متابولیت‌های ثانویه گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس مسیرهای التهابی را مهار و مرگ سلولی ناشی از آسیب را به شکل چشمگیری سرکوب می‌نماید (۱۹). با در نظر گرفتن اثرات سودمند گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس در محافظت از نورون‌ها و با توجه به اینکه تاکنون درمان مؤثر دارای تأییدیه سازمان‌های دارویی معتبر جهانی جهت جلوگیری از عوارض سمی مت‌آمفتامین بر روی سیستم عصبی معرفی نشده است، در مطالعه حاضر برای نخستین بار

اثرات درمان با عصاره متانولی گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس در آسیب عصبی ناشی از سمیت مت‌آمفتامین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی، ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم، که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، در شرایط استاندارد آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود نگهداری شدند. پس از یک دوره سازگاری، حیوانات به‌صورت تصادفی به چهار گروه ۷ تایی تقسیم شدند. در طول آزمایش، تمام حیوانات به رژیم غذایی استاندارد و آب آشامیدنی به مقدار کافی دسترسی داشتند. محیط نگهداری با دمای ثابت ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و چرخه نوری ۱۲ ساعته روشنایی و ۱۲ ساعته تاریکی بود.

گروه اول: شاهد یا کنترل: حیوانات این گروه هیچ مداخله‌ایی دریافت نکردند.

گروه دوم: دریافت‌کننده مت‌آمفتامین با دوز ۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن به‌صورت ۴ دوز متوالی به فاصله ۸ ساعت داخل صفاقی تزریق گردید (۲۰).

گروه سوم: دریافت‌کننده مت‌آمفتامین با دوز ۴×۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی + عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با دوز ۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی ۳۰ دقیقه، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق مت‌آمفتامین (۲۰).

گروه چهارم: دریافت‌کننده مت‌آمفتامین با دوز ۴×۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی + عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی۳۰ دقیقه، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق مت‌آمفتامین (۲۰). محور زمانی مطالعه در شکل ۱ نمایش داده شده است.

تهیه عصاره متانولی گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس

به‌منظور جمع‌آوری گلسنگ از قلم سنگ‌تراشی و چکش استفاده شد. این جمع‌آوری در اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۰ از اطراف ایلام، منطقه قلاجه انجام گرفت. گلسنگ‌ها همراه با بخشی از بستر جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها طوری برداشته شدند که همه دارای آسکوکارپ و هم دارای لوب باشند. جهت عصاره‌گیری گلسنگ، نمونه پروتوپارملیوپسیس مورالیس جمع‌آوری شده چند بار با آب مقطر شستشو و در سایه خشک شد. پس از خشک شدن، نمونه در هاون چینی خرد و از پودر حاصله ۵۰۰ گرم جهت انجام مراحل بعدی آزمایش استفاده گردید. عصاره‌گیری با استفاده از سوکسله انجام شد. جهت تهیه عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس به ازای هر ۵۰ گرم از نمونه یک لیتر متانول استفاده گردید. عصاره‌گیری در سوکسله تا زمانی که داخل ستون آن بی‌رنگ شد (یعنی فقط حلال وجود داشته باشد) ادامه یافت. سپس محلول حاصله در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در آون خشک شد. عصاره تا انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای رقیق کردن نمونه پروتوپارملیوپسیس مورالیس از حلال دیمتیل سولفوکسید ۵ درصد استفاده شد (۲۱).

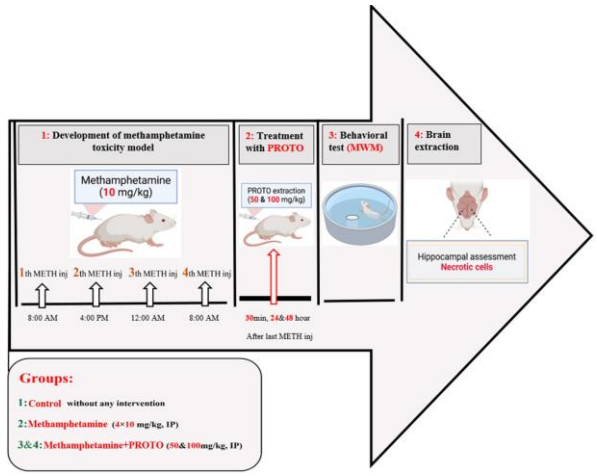
پس از القای مدل حیوانی، آزمون ماز آبی موریس جهت سنجش حافظه فضایی برای حیوانات در تمام گروه‌ها انجام شد. در این آزمون میزان یادگیری حیوانات به مدت ۵ روز متوالی (۴ روز آموزش و یک روز آزمون) ارزیابی شد. ماز آبی موریس از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتیمتر با آب ۲۲ درجه سانتیگراد پر شد. حوضچه به چهار 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 چهار روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل چهار تجربه) از چهار ربع حوضچه به طور تصادفی رهاسازی و تحت آموزش و آزمایش قرار گرفت و در روز پنجم ارزیابی از آموزش داده شده انجام گرفت. یک تجربه زمانی به اتمام رسید که موش بر روی سکو رفته و یا یک دقیقه سپری شده باشد. سپس ۳۰ ثانیه به حیوان فرصت داده شده و پس از آن تجربه بعدی شروع شد. موش‌هایی که محل سکو را پیدا نکردند توسط آزمایشگر به روی سکو منتقل شده و اجازه یافتند سی ثانیه در آنجا بمانند. پس از اتمام تجربه چهارم موش‌ها از حوضچه خارج شدند. حرکات حیوان درون ماز آبی به‌وسیله یک نرم‌افزار کامپیوتری ردیابی و بررسی شد. در این آزمون، مدت زمان رسیدن به سکوی هدف به‌عنوان زمان تأخیر تا 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 همین طور در روز آزمون در روز پنجم، سکو برداشته شد و به حیوانات اجازه داده شد تا مدت یک دقیقه شنا کنند و زمان صرف شده در منطقه هدف ثبت گردید (۲۲). 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 شد.

بلافاصله بعد از انجام آزمون ماز آبی موریس بافت مغز حیوانات جهت کار بافتی استخراج شد. برای این کار ابتدا تحت بی‌هوشی برای موش‌ها مراحل عمل پرفیوژن ترانس کاردیاک با سالین ۰/۹٪ و به دنبال آن با پارافرمالدهید ۴٪ افر فسفات ۰/۱ مولار (pH ۷/۴) انجام شد. سپس سر حیوانات به‌وسیله گیوتین و جدا مغز حیوانات برداشته شد (۲۳). بافت مغز به مدت یک شبانه‌روز در فرمالین ۱۵ درصد قرار داده شد. سپس از مغزها بلوک‌های پارافینه تهیه شد و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع کرونال با ضخامت ۷µm برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی تهیه شد. لازم به

CC BY NC

ذکر است که مقاطع بر اساس اطلس پاکسینوس بین ۳/۳ و ۴/۲ میلی‌متر پشت برگما تهیه گردید (۲۴).

پس از تهیه مقاطع بافتی بر روی لام رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل) انجام شد. 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. برای رنگ‌آمیزی نیسل، برش‌های ۷ میکرومتری (سه برش در هر حیوان) بر روی لام‌های سیلانه شده انتقال داده می‌شوند. سپس با استفاده از محلول کریزیل ویوله استات ۰/۱ درصد (سیگما، USA) رنگ‌آمیزی خواهند شد. لام‌ها سپس خشک شده و با انتالن پوشانده می‌شوند. سپس با استفاده از میکوسکوپ نوری (Olympus AX-70) و با بزرگنمایی x۴۰۰ از برش‌ها تصویر تهیه خواهد شد. بعد از تهیه تصاویر، با استفاده از نرم‌افزار Olysia bio report شمارش سلولی در امتداد خطی با طول ۴۰۰ میکرومتر (مساحتی حدود $0/160 mm^2$) از ناحیه CA1 هیپوکامپ راست موش‌های صحرایی انجام خواهد شد. فقط سلول‌های نامنظم و تیره که هسته و هستک مشخص نداشتند به‌عنوان سلول‌های مرده در نظر گرفته و شمارش می‌شوند (۲۵).



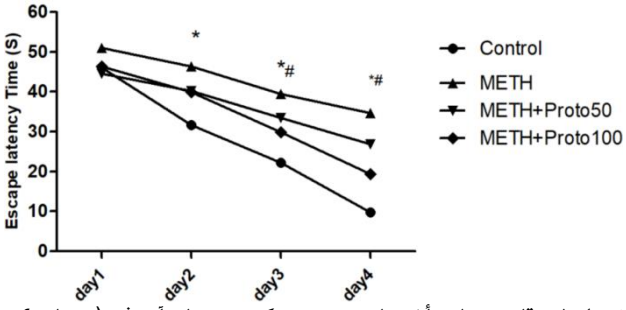
شکل ۱- محور زمانی آزمایش

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری پریزم و آزمون‌های تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و دوطرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به‌صورت mean ± SEM بیان شده‌اند و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر درمانی عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر زمان تأخیر تا رسیدن به سکو (اختلال یادگیری) در روزهای آموزش (روزهای ۴-۱)

نتایج آزمایش ماز آبی موریس نشان داد که میزان یادگیری در طول روزهای آموزش، اختلاف معناداری بین گروه مت نسبت‌به گروه‌های کنترل و گروه درمان با عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس دارد (کاهش میزان یادگیری P<۰/۰۰۰۱) به علاوه، در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس میزان تأخیر تا رسیدن به سکو در روزهای آموزش نسبت‌به گروه مت کاهش‌یافته است که نشان از بهبود در فرآیند یادگیری به‌دنبال تیمار با این عصاره می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱)، (نمودار ۱).



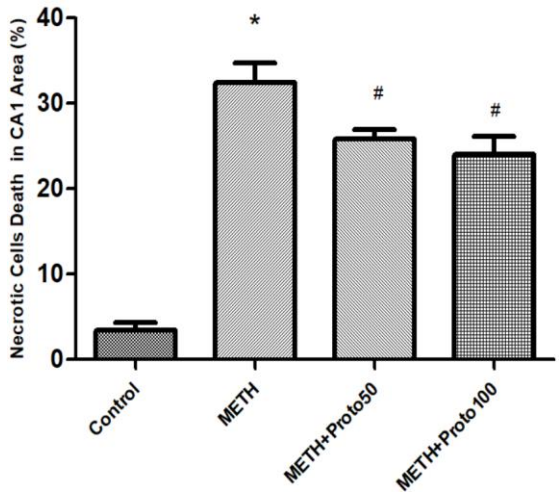
نمودار ۱- مقایسه زمان تأخیر تا رسیدن به سکو در روزهای آموزش (روزهای ٤-۱) در گروه‌های مورد آزمایش

* تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۰۱)

تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین (P<۰/۰۰۰۱)

اثرات درمانی عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر زمان صرف شده در منطقه‌ی هدف (اختلال حافظه) طی روز آزمون پروب (روز ۵) در ماز آبی موریس

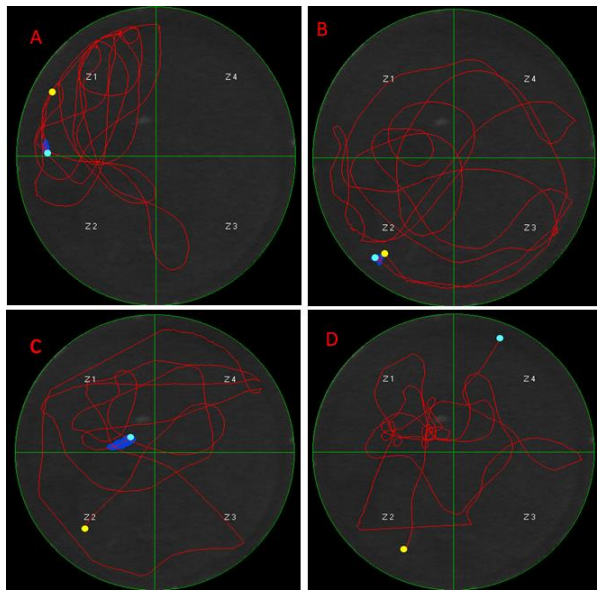
نتایج آزمایش ماز آبی موریس نشان داد که زمان حضور در منطقه هدف (محل قرارگیری سکو در روزهای آموزش) در روز آزمون درحالی‌که سکو برداشته شده بود در گروه مت‌آمفتامین نسبت به گروه کنترل و عصاره‌ی متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با دوز (۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) کاهش معناداری (P<۰/۰۰۱) داشته است که نشان از اختلال حافظه فضایی در حیوانات گروه مت‌آمفتامین است. این در حالی است که دوز پایین‌تر عصاره یعنی (۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) از نظر زمان حضور در منطقه هدف با گروه مت‌آمفتامین تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این موضوع به این معناست که درمان با این عصاره در دوز پایین اثر معنی‌داری بر بهبود اختلال حافظه ناشی از مت‌آمفتامین نداشته است. در گروه تیمار شده با عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس در دوز (۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) افزایش معنی‌داری در زمان سپری شده در منطقه هدف نسبت به گروه مت‌آمفتامین مشاهده شد که حاکی از بهبود حافظه فضایی در گروه حیوانات تیمار شده با عصاره با دوز بالاتر دارد (P<۰/۰۱)، (نمودار ۲). شکل ۲ الگوی شنای حیوانات در گروه‌های مختلف در روز آزمون (پروب) در آزمون ماز آبی موریس را نشان می‌دهد.



نمودار ۲- اثر عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر زمان حضور در منطقه هدف (عملکرد حافظه فضایی) در روز آزمون در ماز آبی موریس

* تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)

تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین (P<۰/۰۱)

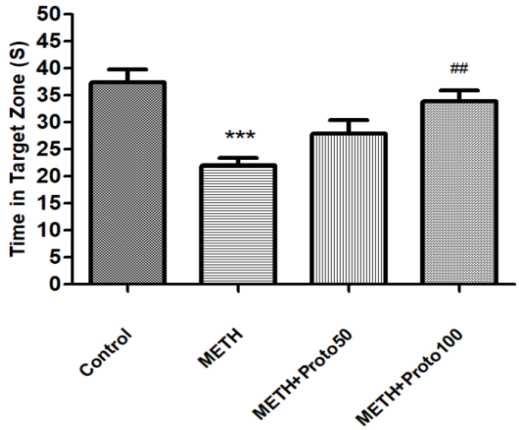


شکل ۲- الگوی شنای حیوانات در گروه‌های مختلف در روز آزمون (روز پنجم) در آزمون ماز آبی موریس

A) گروه کنترل، B) گروه مت، C) گروه تیمار شده با عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس ۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم، D) گروه تیمار شده با عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس موزالیس ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم.

اثر تجویز عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر مرگ سلولی نکروز (رنگ‌آمیزی نیسل) ناشی از دریافت مت‌آمفتامین در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی

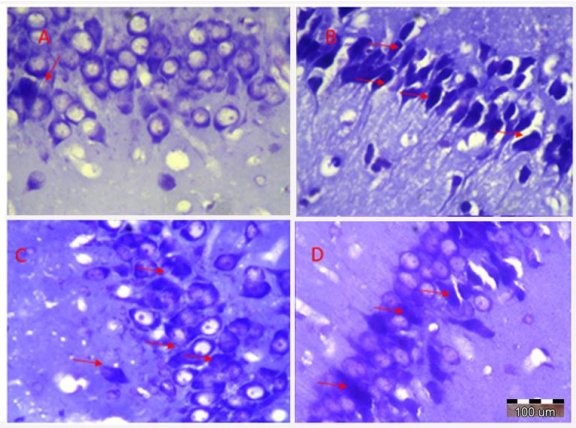
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی نیسل نشان داد، درصد سلول‌های نکروتیک در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در گروه مت‌آمفتامین (۴±۲۴٪) نسبت به گروه شاهد و عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس (۲±۲۰٪) بیشتر است (P< ۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد که درمان با عصاره در هر دو دوز (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) به یک اندازه در کاهش مرگ سلولی نکروتیک ناشی از مت‌آمفتامین مؤثر بوده است (نمودار ۳) (شکل ۳).



نمودار ۳- مقایسه درصد سلول‌های نکروتیک در هر گروه

* تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)

تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین (P<۰/۰۵)



شکل ۳- فتومیکروگراف از رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل) در ناحیه CA1 هیپوکامپ راست موش‌های صحرایی پس از ایجاد سمیت مت‌آمفتامین

A) گروه کنترل، B) گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین، C) گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین+ عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با دوز ۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم، D) گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین+ عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از مت‌آمفتامین سبب کاهش معنی‌داری در شاخص‌های یادگیری و حافظه فضایی شامل زمان تأخیر برای رسیدن

CC BY NC

به سکو در روزهای آموزش و همین‌طور زمان صرف شده در منطقه هدف در طول روز آزمون در گروه مت‌آمفتامین نسبت به سایر گروه‌ها می‌شود که شاخص‌های مذکور در حیواناتی که با عصاره متانولی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با دوز بالاتر یعنی (۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) تیمار شدند به شکل چشم‌گیری بهبود یافت. این نتایج نشان‌دهنده اثرات مثبت درمان با عصاره‌ی پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر آسیب یادگیری و تخریب حافظه فضایی پس از سمیت عصبی ناشی از مت‌آمفتامین با دوز مناسب است. این بهبود در فرآیند یادگیری و حافظه می‌تواند به دلیل اثرات محافظت‌کننده عصبی این عصاره و کاهش مرگ سلولی در ناحیه CA1 هیپوکامپ باشد به نحوی که افزایش معناداری در میانگین تعداد سلول‌های نکروتیک این ناحیه در گروه مت‌آمفتامین نسبت به سایر گروه‌ها وجود دارد که در اثر تیمار با عصاره‌ی پروتوپارملیوپسیس مورالیس در هر دو دوز (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) میزان مرگ سلولی نکروز در مقایسه با گروه مت‌آمفتامین به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. یافته‌های پژوهش حاضر مبنی بر اثرات تخریبی مت‌آمفتامین بر حافظه فضایی همراستا با سایر مطالعات پیشین است که عنوان می‌کنند این داروی اعتیادی بر سایر انواع حافظه نیز اثرات مخرب دارد. به‌طور مثال سید حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که تجویز مزمن مت‌آمفتامین در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار سبب تخریب حافظه‌کاری سنجش شده با ماز Y شکل و همچنین کاهش ضریب حافظه شناخت شیء جدید نسبت به شیء قدیمی که حیوان قبلاً با آن مواجه شده بود می‌شود که این موضوع حاکی از القای نقص حافظه غیرفضایی در مواجهه با مت‌آمفتامین می‌باشد (۲۶). همچنین در یک بررسی دیگر مشخص شد که مت‌آمفتامین حافظه غیرفضایی سنجیده شده با آزمون مکان یابی اشیاء را نیز دچار اختلال می‌کند. اختلال این نوع حافظه به دنبال تجویز مت‌آمفتامین با تغییر رسپتورهای گلوتاماتی NMDA هیپوکامپ که مربوط به کنترل انعطاف‌پذیری سیناپسی و دخیل در عملکردهای یادگیری و حافظه هستند همراه بوده است (۲۶). پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که ترکیبات فعال بیولوژیکی در برخی گونه‌های قارچ‌های گلسنگی دارای اثرات محافظتی قوی در برابر سمیت ناشی از مت‌آمفتامین بوده‌اند. در این خصوص غلامپور و همکاران گزارش داده اند که درمان موش‌های صحرایی دچار سمیت مت‌آمفتامینی با داروی اسید اسنیک که یک آنتی‌بیوتیک طبیعی است و به‌طور اختصاصی در گلسنگ یافت می‌شود سبب بهبود اختلالات حافظه فضایی ناشی از سمیت مت‌آمفتامین شده است. بر اساس گزارش این پژوهش، بهبود یادگیری و حافظه فضایی به دنبال تجویز این ماده مؤثره گلسنگ مرتبط با اثرات آنتی‌اکسیدانی (کاهش آنزیم اکسیدکننده مالون دی آلدهید و افزایش آنزیم ضداسترس اکسیداتیوی سوپر دی اکسیداز) و با واسطه سرکوب مرگ سلولی نکروتیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ بوده است (۲۰). یافته‌های این مطالعه همراستای با نتایج مطالعه حاضر است که بیان می‌کند گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس اثرات درمانی خود بر تخریب یادگیری و حافظه ناشی از سمیت مت‌آمفتامین را از طریق سرکوب مرگ نورونی از نوع نکروز در ناحیه CA1 هیپوکامپ القاء می‌کند.

لذا به نظر می‌رسد عصاره‌ی گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس از طریق مهار قوی مرگ سلولی و در نتیجه آن ایجاد بقای سلولی در کنار خواص ترمیم‌کنندگی سلولی اثرات محافظتی خود را بر بافت اعمال می‌کند که بسیاری از مطالعات پیشین نیز به این موضوع اذعان دارند. به‌طور مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ توسط راشکی و همکاران انجام شد مشخص شد درصد بهبودی در زخم به‌وجود آمده به‌دنبال عفونت قارچی القاء شده در موش صحرایی به شکل قابل توجهی با درمان توسط پماد پروتوپارملیوپسیس مورالیس بهبود یافت که حاکی از اثرات بهبوددهندگی این دارو در سطح بافتی و سلولی است (۲۱). تعدادی از پژوهش‌ها به مکانیسم‌های دخیل در ایجاد اثرات محافظتی پروتوپارملیوپسیس اشاره کرده اند. براساس مطالعه علوی و همکاران در سال ۲۰۱۹ پروتوپارملیوپسیس می‌تواند انواعی از نانوذرات فلزی (MNPs) تولید کند که خواص آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهند. این نانوذرات طبیعی به مهار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش استرس اکسیداتیو کمک می‌کنند (۱۹). همچنین مشابه سایر قارچ‌ها، ترکیبات پروتوپارملیوپسیس مورالیس ممکن است مسیرهای دخیل در سیگنال‌دهی تخریب و مرگ سلولی مانند فسفوریلاسیون درون سلولی MAPK را مهار کرده و بقای نورونی را سبب شوند.

همچنین احتمالاً تعدیل پاسخ‌های التهابی از طریق سرکوب فعال‌سازی میکروگلیال‌ها نیز می‌تواند در محافظت عصبی ایجاد شده توسط پروتوپارملیوپسیس دخیل باشد، همان‌طور که در سایر عصاره‌های قارچی دیده می‌شود (۲۷). مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از عصاره گلسنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس در زمینه محافظت عصبی در سمیت ناشی از داروی اعتیادی مت‌آمفتامین می‌تواند نویدبخش تولید دارویی با منشأ طبیعی در آینده باشد. هرچند تحقیقات بیشتری برای روشن شدن کامل اثرات این دارو و سایر مکانیسم‌های محافظتی دخیل موردنیاز است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود که با در اختیار دادن امکانات، ما را در انجام این تحقیق یاری کردند قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان اعلام می‌دارند که نتایج گزارش شده در تحقیق حاضر، در هیچ مجله دیگری منتشر نشده است و کلیه ملاحظات اخلاقی مرتبط با نگارش و تحقیق رعایت شده است.

تعارض منافع

هیچ تعارض منافی در ارتباط با این تحقیق وجود ندارد.

حمایت مالی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه ایلام انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

خانم دکتر طاهره ولدبیگی استاد راهنما و نویسنده مسئول مقاله و آقای دکتر خاکساری استاد مشاور پایان‌نامه بودیم. این کار از ابتدا با همفکری اساتید راهنما و مشاور طراحی و با اجرای خانم منصوری اجرا شد. در نهایت با کمک هر دو استاد مقاله کار پژوهشی حاضر، ویرایش و در اختیار مجله شما قرار گرفت. مقاله توسط تمام نویسندگان خوانده و تأیید شده است.

References

1. Mohseni F, Zare F, Garmabi B, Azizi A, Mirrezaie S M. Substances use among a sample health care workers in Iran: prevalence, pattern of use and gender differences. J Subst Use 2024; 1-7. doi: 10.1080/14659891.2024.2356583
2. Mohseni F, Behnam S G, Rafaiee R. The help seeking sex addicted patients increase in iran: a report from iran's sexaholics anonymous. Iran J Public Health 2021; 50:2155-7. doi: 10.18502/ijph.v50i10.7524
3. Han B, Compton W M, Jones C M, Einstein E B, Volkow N D. Methamphetamine use, methamphetamine use disorder, and associated overdose deaths among US adults. JAMA Psychiatry 2021;78:1329-42. doi:10.1001/jamapsychiatry.2021.2588
4. Mohseni F, Khaksari M, Khoramrooz M, Rafaiee R, Mirrezaie SM. "Emerging Risk of Ethanol-related Outbreak via Clandestine Alcohol Consumption During Pregnancy: An Alarming Note on Prevention of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in Iran," International Journal of High Risk Behaviors and Addiction 2023;12:13, doi: 10.5812/ijhrba-131881
5. Nordahl T E, Salo R, Leamon M. Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: a review. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2003;15:317-25. doi: 10.1176/jnp.15.3.317
6. Rafaiee R, Ahmadiankia N, Mousavi S A, Jafari B, Moghaddam H K. Bone marrow mesenchymal stem cells improve cognitive impairments induced by methamphetamine in rats and reduce relapse. Bioimpacts 2023; 13:97-108. doi: 10.34172/bi.2022.23329
7. Golsorkhdan S A, Boroujeni M E, Aliaghaei A, Abdollahifar M A, Ramezanpour A, Nejatbakhsh R. Methamphetamine administration impairs behavior, memory and underlying signaling pathways in the hippocampus. Behav Brain Res 2020;379:112-6. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112300
8. Shukla M, Vincent B. Methamphetamine abuse disturbs the dopaminergic system to impair hippocampal-based learning and memory: An overview of animal and human investigations. Neurosci Biobehav Rev 2021;131:541-59. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.09.016
9. Mohseni F, Rafaiee R, Rezaeian L, Sarvandani M N, Moghaddam H K. Berberine hydrochloride improves cognitive deficiency through hippocampal up-regulation of neurotrophins following inhalant self-administration of methamphetamine. Iran J Basic Med Sci 2023;26:23-9. doi: 10.22038/IJBMS.2022.65053.14326
10. Rezaeian L, Rafaiee R, Khaksari M, Kalalian Moghaddam H. Neuroprotective effects of berberine hydrochloride on methamphetamine-induced cognitive dysfunction: immunohistochemical and behavioral studies in rats. Basic Clin Neurosci 2022;13:443-53. doi: 10.32598/bcn.2021.1444.2
11. Rafaiee R, Ahmadiankia N, Mousavi S A, Rezaeian L, Sarvandani M N, Shekari A. "Inhalant self-administration of methamphetamine: the most similar model to human methamphetamine addiction," Iranian Journal of Psychiatry and Behavioral Sciences 2019;13:133.
12. Li C, Wang H, Wang M, Chen C, Bai F, Ban M. Oxytocin attenuates methamphetamine-induced apoptosis via oxytocin receptor in rat hippocampal neurons. Front Pharmacol 2021;12:63-95. doi: 10.3389/fphar.2021.639571
13. Chen X, Qiu F, Zhao X, Lu J, Tan X, Xu J. Astrocyte-derived lipocalin-2 is involved in mitochondrion-related neuronal apoptosis induced by methamphetamine. ACS Chem Neurosci 2020; 11:1102-16. doi: 10.1021/acschemneuro.9b00559
14. Garmabi B, Mohaddes R, Rezvani F, Mohseni F, Khastar H. Erythropoietin improve spatial memory impairment following methamphetamine neurotoxicity by inhibition of apoptosis, oxidative stress and neuroinflammation in CA1 area of hippocampus. J Chem Neuroanat 2022;124:102-37. doi: 10.1016/j.jchemneu.2022.102137
15. Hadizadeh-Bazaz M, Vaezi G, Khaksari M, Hojati V. Curcumin attenuates spatial memory impairment by anti-oxidative, anti-apoptosis, and anti-inflammatory mechanism against methamphetamine neurotoxicity in male Wistar rats: Histological and biochemical changes. Neurotoxicology 2021;84:208-17. doi: 10.1016/j.neuro.2021.03.011
16. Mohammadi M, Bagheri L, Badreldin A, Fatehi P, Pakzad L, Suntres Z. "Biological effects of gyrophoric acid and other lichen derived metabolites, on cell proliferation, apoptosis and cell signaling pathways," Chemico-Biological Interactions 351;2022.
17. Lee BG, Hur J-S. Two new lecanoroid lichen species from the forested wetlands of South Korea, with a key for Korean Protoparmeliopsis species. MycoKeys 2021;84:163-83. doi: 10.3897/mycokeys.84.70798
18. Shafiee M, Sohrabi M. Antibacterial activity of Candelariella rhodax and Protoparmeliopsis muralis. Cellular and Molecular Research 2021; 34:93-100.[Persian].
19. Alavi M, Karimi N, Valadbeigi T. Antibacterial, antibiofilm, antiquorum sensing, antimotility, and antioxidant activities of green fabricated Ag, Cu, TiO2, ZnO, and Fe3O4 NPs via protoparmeliopsis muralis lichen aqueous extract against multi-drug-resistant bacteria. ACS Biomater Sci Eng 2019; 5:4228-43. doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00274
20. 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 and Health 2023;17:1-8.[Persian].
21. Rashki S, Valadbeigi T. In vivo screening antifungal activity of methanolic extract of Protoparmeliopsis muralis against Aspergillus flavus. Journal of Advanced Biomedical Sciences 2017;7:53-9. [Persian].
22. Mohseni F, Ghorbani Behnam S, Rafaiee R. A Review of the Historical Evolutionary Process of Dry and Water Maze Tests in Rodents. Basic Clin Neurosci 2020;11:389-402. doi: 10.32598/bcn.11.4.1425.1
23. Mohseni F, Khaksari M, Rafaiee R, Rahimi K, Norouzi P, Garmabi B. Apelin 13 improves anxiety and cognition via hippocampal increases BDNF expression and reduction cell death in neonatal alcohol exposed rats. Int J Pept Res Ther 2021;27:1-12. doi: 10.1007/s10989-021-10173-4
24. Mohseni F, Bagheri F, Khaksari M. Hydrogen sulfide attenuates the neurotoxicity in the animal model of fetal alcohol spectrum disorders. Neurotox Res 2020;37:977-86. doi: 10.1007/s12640-019-00152-5
25. Šlamberová R, Vrajová M, Schutová B, Mertlová M, Macúchová E, Nohejlová K. Prenatal methamphetamine exposure induces long-lasting alterations in memory and development of NMDA receptors in the hippocampus. Physiol Res 2014;63:547-58. doi: 10.33549/physiolres.932926
26. Chen W Y, Chang C Y, Li J R, Wang J D, Wu C C, Kuan Y H. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of fungal immunomodulatory protein involving microglial inhibition. Int J Mol Sci 2018;19:36-78. doi: 10.3390/ijms19113678

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2025; Vol 20, No 1

DOI: 10.22100/jkh.v20i1.3410

Orginal Article

The Study of the Protective Effect of Methanolic Extract of Protoparmeliopsis Moralis Lichen on learning and Spatial Memory Disorders and Necrotic Cell Death in the Hippocampus of Male Rats in a Methamphetamine Neurotoxicity Model

Tahereh Valadbeigi (Ph.D.)[1*], Mehdi Khaksari (Ph.D.)[2], Maryam Mansoorifar (M.Sc. Student)[3]

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Ilam University, Ilam, Iran.
2- Professor of Medical Physiology Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
3- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Ilam, Iran.

Received: 2 December 2024**, Accepted:** 24 March 2025

Abstract:

Introduction: *Methamphetamine use leads to a reduction in hippocampal volume and neuronal damage, impairing the brain's ability to form new memories and learn. Protoparmeliopsis moralis, a lichen with antioxidant, anti-inflammatory, and restorative properties, was studied to evaluate its potential protective effects against methamphetamine-induced neuronal toxicity.*

Methods*: In this experimental study, 28 male Wistar rats (250–280 g) were randomly assigned to four groups (7 rats per group): a control group, a group receiving methamphetamine at a dose of 10 mg/kg, a group receiving methamphetamine at a cumulative dose of 40 mg/kg (administered as 4 doses of 10 mg/kg at two-hour intervals) plus 50 mg/kg of methanolic extract of Protoparmeliopsis moralis, and a group receiving the same methamphetamine regimen plus 100 mg/kg of the extract. The methanolic extract was administered intraperitoneally at 30 minutes, 24 hours, and 48 hours after the final methamphetamine dose. Following spatial memory testing, the rats' brains were collected for the assessment of necrotic cell death.*

Results: *Behavioral data showed that learning improved in the groups treated with Protoparmeliopsis moralis extract compared to the methamphetamine group. In the probe test, treated animals spent significantly more time in the target area, indicating enhanced memory performance ($P<0.01$). Additionally, the methamphetamine group exhibited increased necrotic cell death in the CA1 region of the hippocampus, which was significantly reduced by treatment with the lichen extract ($P<0.05$).*

Conclusion: *Protoparmeliopsis moralis, a lichen species, may improve methamphetamine-induced memory and learning impairments by reducing neuronal cell death.*

Keywords: Lichen, Protoparmeliopsis, Methamphetamine, Necrosis, Spatial Memory.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author**: T. Valadbeigi, **Email:** taherehvaladbeigi2024@gmail.com*

Citation: Valadbeigi T, khaksari M, Mansoorifar M. The study of the protective effect of methanolic extract of Protoparmeliopsis moralis lichen on learning and spatial memory disorders and necrotic cell death in the hippocampus of male rats in a methamphetamine neurotoxicity model. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2025;20(1):42-49.

CC BY NC