



## اثر حفاظتی پالماتین هیدروکلرید بر بهبود حافظه فضایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مرگ سلولی ناحیه هیپوکامپ بر اثر ایسکمی جریان مجدد مغزی

حسین خواستار<sup>۱</sup>، بهزاد گرمابی<sup>۲</sup>، مهرانه میرزایی<sup>۳</sup>، مهدی خاکساری<sup>۱\*</sup>

۱-دانشیار- گروه فیزیولوژی- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- شاهرود- ایران.

۲- استادیار- گروه فیزیولوژی- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- شاهرود- ایران.

۳- دانشجوی پزشکی- کمیته تحقیقات دانشجویی- دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- شاهرود- ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۷

### چکیده

**مقدمه:** پالماتین یک پروتوبربرین از گروه آلکالوئیدها است که در مدل‌های حیوانی مختلف، دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که پالماتین به وسیله اثرات آنتی‌اکسیدانی، از آپوپتوز ناشی از سمیت جنتامایسن در بافت کلیه جلوگیری می‌کند. ایسکمی مغز / رپرفیوژن باعث آسیب غیرقابل برگشت به ویژه در ناحیه هیپوکامپ می‌شود. هدف اصلی در این مطالعه ارزیابی تأثیر نوروپروتکتیو ابستاتین بر درمان اختلالات شناختی و مرگ سلولی ناشی از ایسکمی در موش‌های صحرایی بود.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۳۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار، به سه گروه تقسیم شدند. ۱- گروه شم، ۲- گروه ایسکمی ناشی از انسداد هر دو شریان کاروتید معمولی به مدت ۲۰ دقیقه، ۳- گروه تیمار که در آنها تزریق پالماتین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن درون صفاقی در شروع دوره رپرفیوژن صورت گرفت و مجدداً بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت، دوباره تزریق انجام شد. حافظه فضایی توسط ماز آب موریس و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوسیله روش اسپکتوفتومتری مورد بررسی قرار گرفت و جهت ارزیابی میزان مرگ سلولی نکروزیس، از تکنیک رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل) استفاده شد.

**نتایج:** نتایج مطالعه نشان داد که در گروه‌های تیمار شده با پالماتین، میزان یادگیری نسبت به گروه ایسکمی مغزی افزایش یافته و در آزمون پروب، درصد حضور حیوانات در ربع دایره هدف در گروه‌های تیمار شده با پالماتین به طور معناداری از گروه ایسکمی مغزی بیشتر بود که نشان‌دهنده بهبود عملکرد حافظه می‌باشد ( $P < 0/05$ ). همچنین درمان با پالماتین باعث کاهش مالون دی‌الدهید و افزایش سوپر دی‌اکسیداز مغز شد ( $P < 0/05$ ). به علاوه در گروه ایسکمی مغزی، افزایش مرگ سلولی نکروز در ناحیه CA1 هیپوکامپ مشاهده گردید و تیمار با پالماتین کاهش معناداری در میزان سلول‌های نکروتیک نشان داد ( $P < 0/01$ ).

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان داد که درمان با پالماتین به طور قابل توجهی آسیب ناحیه هیپوکامپ و اختلالات حافظه و یادگیری فضایی ناشی از ایسکمی را بهبود می‌بخشد. به نظر می‌رسد که این اثرات حفاظتی پالماتین از طریق مکانیسم‌های متعددی مانند سرکوب رادیکال‌های آزاد باعث مهار مرگ سلولی نکروزیس و آپوپتوزیس می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** پالماتین، هیپوکامپ، ایسکمی مغزی، اختلالات حافظه و یادگیری، مرگ سلولی.

\*نویسنده مسئول: شاهرود، میدان هفت تیر، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴، نامبر: ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴. Email: khaksari417@yahoo.com

**ارجاع:** خواستار حسین، گرمابی بهزاد، میرزایی مهرانه، خاکساری مهدی. اثر حفاظتی پالماتین هیدروکلرید بر بهبود حافظه فضایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مرگ سلولی ناحیه هیپوکامپ بر اثر ایسکمی جریان مجدد مغزی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۹؛ ۱۵(۱): ۲-۹.

## مقدمه

«سکته مغزی»، آسیب عصبی حاد ناشی از اختلال در خون‌رسانی به قسمتی از بافت مغز است که ناشی از انسداد رگ‌های خونی مغز به وسیله یک لخته خونی و یا پارگی یکی از شریان‌های تغذیه‌کننده آن قسمت از بافت مغز می‌باشد. به بیان دیگر اگر خون‌رسانی به قسمتی از مغز دچار اختلال شده و متوقف گردد، این قسمت از مغز دیگر نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را داشته باشد. این وضعیت را اصطلاحاً سکته مغزی می‌نامند. در طی ایسکمی مغزی جریان خون مغزی و میزان اکسیژن و متابولیت‌ها کاهش می‌یابد و بعد از برقراری جریان خون مغزی، جریان بازگشتی به دنبال انسداد باعث بازگشت اکسیژن در سلول‌ها و آسیب‌های ناشی از تولید و تهاجم رادیکال‌های سوپراکسید می‌گردد. این امر می‌تواند روی سیگنالینگ سلول‌ها تأثیر گذاشته و باعث نکروز و آپوپتوز بافتی گردد (۱). به دنبال ایسکمی، مناطق مختلف مغز دچار آسیب می‌شوند. هیپوکامپ یکی از نواحی مغز است که حساسیت بسیار بالایی به ایسکمی دارد (۲)، لذا یکی از نواحی مهم مغزی مورد بررسی در این تحقیق می‌باشد. تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از ایسکمی مغزی موجب آسیب‌های ساختاری و عملکردی برگشت‌ناپذیری در هیپوکامپ خواهد شد (۳). این تغییرات منجر به آسیب گسترده نورونی در هیپوکامپ می‌شود که اختلالات رفتاری از جمله اختلال در حافظه و یادگیری را به دنبال دارد (۴). برقراری مجدد جریان خون به دنبال ایسکمی مغزی، تشکیل رادیکال‌های آزاد (ROS) را تسریع کرده و سبب اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها و آسیب DNA و مرگ سلول می‌شود (۵). تشکیل رادیکال‌های آزاد به‌ویژه سوپراکسیدان‌ها و پروتئازها به دنبال ایسکمی مغزی باعث افزایش نفوذپذیری «سد خونی مغزی» و تشکیل ادم و مرگ سلول‌ها می‌شود. همچنین برقراری مجدد جریان خون بعد از ایسکمی، نفوذپذیری عروق مغز را افزایش داده و آسیب‌های ایجاد شده بعد از ایسکمی را وخیم‌تر می‌سازد (۶). علت مرگ تدریجی نورون‌ها و ایجاد ضایعات ثانویه پس از ایسکمی مغزی، احتمالاً فعال شدن مسیرهای آبشاری نورتوکسیک بسیار پیچیده از جمله افزایش بیش از حد کلسیم داخل سلولی، رادیکال‌های آزاد، آزاد شدن اسیدآمینو تحریکی گلوتامات، اسید آراشیدونیک و متابولیت‌های آن، سایتوکاین‌ها، التهاب، آپوپتوزیس و تشکیل ادم و غیره در این ناحیه می‌باشد (۷ و ۸). به نظر می‌رسد جلوگیری از التهاب، مهار آپوپتوز و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد از جمله عواملی هستند که می‌توانند به ترمیم بافت عصبی پس از ایسکمی کمک کنند و عوارض ناشی از آن را کاهش دهند. از این رو، عاملی که بتواند برخی از این مکانیسم‌ها را به کار گیرد به ترمیم ناحیه آسیب دیده مغزی کمک زیادی خواهد کرد.

پالماتین یک پروتوبربرین از گروه آلکالوئیدها است که دارای قدمتی تاریخی در طب سنتی چین و هند می‌باشد و در گیاهان متعددی از جمله زرشک خاردار یافت می‌شود. این ترکیب را می‌توان در ریشه، ریزوم و پوست ساقه این گیاهان یافت. در مطالعه‌ای که توسط کیم و همکاران انجام شد (۹)، پالماتین در بافت میوکارد موش‌های صحرایی تحت ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون، به مقدار قابل‌توجهی میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) را افزایش داد. SOD یک آنزیم آنتی‌اکسیدان است که تبدیل سوپراکسید را به  $H_2O_2$  (پراکسید هیدروژن) و  $O_2$  کاتالیز می‌کند. بنابراین می‌توان متوجه شد که پالماتین می‌تواند آزادسازی رادیکال‌های آزاد را طی ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون کاهش دهد (۱۰ و ۱۱). همچنین در مطالعه ای لی و همکاران آثار حفاظتی پالماتین بر کبد را مورد مطالعه قرار دادند. در نارسایی کبدی القا شده با گالاکتوزآمین/لیپوپولی ساکارید،  $TNF-\alpha$ ، نقش مهمی در پاسخ التهابی ایفا می‌کند.  $TNF-\alpha$  می‌تواند آغازگر یک آبشار التهابی دخیل در القاء سایر سیتوکین‌های التهابی نظیر اینترفرون-گاما ( $IFN-\gamma$ ) و  $IL-1\beta$  و  $IL-6$  باشد. در این مطالعه در گروه درمان شده با گالاکتوزآمین/لیپوپولی ساکارید، سطح سرمی  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  افزایش یافت و افزایش  $TNF-\alpha$  با پالماتین تقلیل یافت (۱۲).

با توجه به تمام حقایق فوق‌الذکر در مورد اثر حفاظتی پالماتین و مکانیسم‌های مهم آسیب به دنبال ایسکمی مغزی و با توجه به اینکه تاکنون درمان مشخص و مؤثری جهت کاهش عوارض ایسکمی مغزی مشخص و تأیید نشده است در مطالعه حاضر، برای اولین بار اثرات درمان پالماتین در آسیب عصبی به دنبال ایسکمی مغزی را بررسی کردیم.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۳۰ رأس موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار و inbreed با وزن تقریبی ۲۶۰-۳۰۰ گرم از پژوهشکده رویان تهران خریداری و تحت شرایط استاندارد با دوره معکوس روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (۸ صبح تا ۸ شب) و دمای  $21 \pm 3$  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 شدند. رت‌ها سه بار در هفته وزن و با بررسی لازم اطمینان حاصل گردید که هیچکدام از حیوانات واجد بیماری یا دارای شواهدی دال بر بیماری نیستند. سپس رت‌ها به‌طور تصادفی در ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند.

گروه اول: گروه شم ( $n=10$ ): در این گروه نمونه‌ها فقط تحت عمل جراحی قرار گرفته ولی شریان‌های کاروتید مشترک آنها بسته نمی‌شود. گروه دوم: گروه ایسکمی ( $n=10$ ): در این گروه، با جراحی و انسداد موقتی شریان‌های کاروتید مشترک، ایسکمی القاء شده و بلافاصله بعد

می‌شود و اجازه دارد تا ۳۰ ثانیه روی آن قرار بگیرد. در طول این ۳۰ ثانیه حیوان با توجه به موقعیت سکو و علایم نصب شده در آزمایشگاه موقعیت خود را به خاطر می‌سپارد. در صورتی که حیوان سکو را پیدا نماید همزمان با قرارگیری حیوان روی سکو عمل ضبط متوقف می‌شود و باز هم به حیوان ۳۰ ثانیه جهت به خاطر سپردن علایم وقت داده می‌شود. پس از این مدت حیوان به درون ظرف مخصوصی منتقل شده و پس از خشک شدن به قفس خود انتقال داده می‌شود. مدت زمان کل آزمایش ۵ روز در نظر گرفته می‌شود که ۴ روز مربوط به آموزش است و روز پنجم روز آزمون اصلی است. در هر روز آموزش چهار بار با فاصله ده دقیقه حیوان در ماز آبی رها می‌شود. در این مراحل روند آموزش حیوان براساس مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده جهت یافتن سکو سنجیده می‌شود در پایان روز پنجم پس از اتمام آزمایشات یک مرحله پروب برای سنجش حافظه انجام می‌شود؛ بدین صورت که پس از برداشتن سکو حیوان باز هم به صورت تصادفی از یکی از جهات درون ماز رها می‌شود. این آزمایش بر این اساس است که با فرض اینکه حیوان محل سکو را به خاطر سپرده باید بیشترین زمان و مسافت را در ربع محل قرارگیری سکو بماند. این مرحله برای هر حیوان یک بار تکرار می‌شود که مدت آن همان ۹۰ ثانیه است. مدت زمان و مسافت طی شده در ربع محل قرارگیری سکو معیار و میزان سنجش حافظه می‌باشد.

اطلاعات جمع‌آوری شده برای هر یک از حیوانات شامل: ۱- مدت زمان سپری شده به منظور یافتن سکوی پنهان و ۲- مدت مرحله پروب است. مقایسه اطلاعات به دست آمده از حیوانات گروه‌های مختلف مورد مطالعه با روش‌های آماری و نرم‌افزارهای مرتبط انجام می‌شود.

برای بررسی سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بعد از انجام آزمون‌های رفتاری، حیوانات تحت بیهوشی عمیق، کشته شده، مغز آنها خارج و هیپوکامپ به دقت جدا می‌گردد و در داخل نیتروژن مایع و سپس فریزر 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 به صورت پیکوگرم در هر میلی‌گرم پروتئین بیان خواهد 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 به صورت سلول‌های یوکروماتین دیده می‌شوند.

بعد از انجام آزمون حافظه، جهت آماده‌سازی بافت‌ها، ابتدا موش‌ها بی‌هوش شده و سپس پرفیوژن ترانس کاردیال با ۰/۹٪ سالین و به دنبال آن ۴٪ پارافرمالدهید در 0.1 M بافر فسفات (pH 7.4) به عنوان

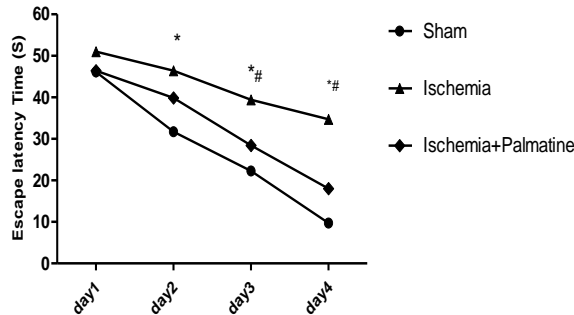
از آن، سالین به عنوان حلال دارو در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر به نمونه‌ها تزریق می‌شود.

گروه سوم: گروه ایسکیمی-پالماتین (n=۱۰): در این گروه، بلافاصله بعد از برقراری جریان مجدد و ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ایسکمی، پالماتین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/ به ازای کیلوگرم وزن بدن به نمونه‌ها تزریق می‌شود.

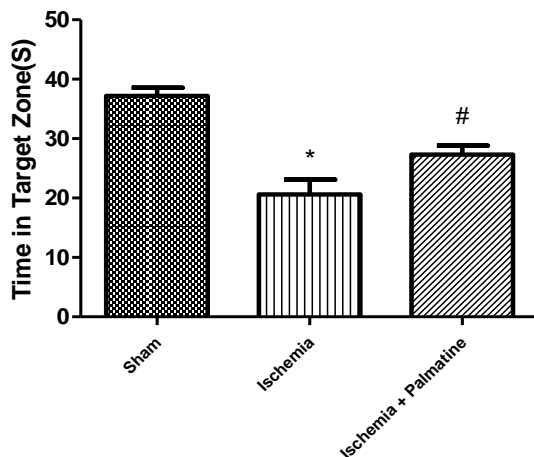
سه روز پس از تزریق پالماتین، آزمون حافظه فضایی توسط ماز آب موریس انجام شد و سپس برای ارزیابی میزان مرگ سلولی نکروزیس از تکنیک رنگ‌آمیزی کریزل و یوله (نیسل) استفاده شد (۱۳).

به منظور بررسی میزان یادگیری فضایی حیوانات، ماز آبی موریس مورد استفاده قرار می‌گیرد. ماز آبی از یک مخزن آب استوانه‌ای سیاه رنگ به قطر ۱۴۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر تشکیل شده است که تا ارتفاع ۳۲ سانتی‌متر از آب پر می‌شود. دمای آب، هم دمای اتاق آزمایشگاه و برابر با ۲۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم می‌گردد. ماز به چهار قسمت مساوی فرضی تقسیم می‌شود و یک سکوی نجات با ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر در یکی از چهار قسمت قرار می‌گیرد؛ به طوری که بین ۱ تا ۲ سانتی‌متر زیر سطح آب واقع می‌شود و از بیرون قابل دیدن نباشد. ماز در اتاقی قرار می‌گیرد که در آن علایم فضایی مختلفی که در طول آزمایشات ثابت بوده و برای حیوان در ماز قابل دیدن وجود دارد و در طول آزمایش، شخص آزمایش‌کننده همیشه باید در یک جا بایستد. این مجموعه از طریق دوربین ردیاب که در ارتفاع ۱۸۰ سانتی‌متری و در بالای مرکز ماز آبی قرار گرفته است، مونتور شده و از طریق اتصال به کامپیوتر اطلاعات مربوط به آزمایش در حال انجام ذخیره می‌گردد. نرم‌افزار اختصاصی "ردیاب" که توانایی پذیرش تنظیمات مختلف برای آزمایشات متفاوت در ماز آبی را دارد نصب شده در کامپیوتر از TV Tuner با به کارگیری قابلیت‌های روند آزمایش فیلم تهیه کرده و با ذخیره کردن اطلاعات در حافظه کامپیوتر آن را برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری می‌کند. در این سیستم کافی است تا شروع آزمایش را با به کاراندازی حسگرهای اختصاصی نصب شده در کناره‌های ماز به نرم‌افزار مذکور اعلام کنیم. نرم‌افزار بر اساس تنظیمات قبلی روند آزمایش را تا انتها تعقیب می‌کند و پس از اتمام زمان موردنظر یا بعد از پایان آزمایش، مونتورینگ را به طور اتوماتیک قطع می‌کند. در طول انجام آزمایش، حیوان از یکی از سمت‌های چهارگانه ماز به طوری که روی آن به طرف دیوارهای ماز باشد رها می‌شود. انتخاب محل شروع به صورت تصادفی و توسط نرم‌افزار صورت گیرد. همزمان با رهاسازی حیوان درون آب دکمه شروع برنامه فشار داده می‌شود و برنامه شروع به ضبط و ثبت رفتار حیوان درون ماز می‌کند. حداکثر زمانی که حیوان جهت پیدا کردن سکو در اختیار دارد ۶۰ ثانیه است. در صورتی که حیوان نتواند در طول این مدت سکو را پیدا کند حیوان به سمت سکو راهنمایی

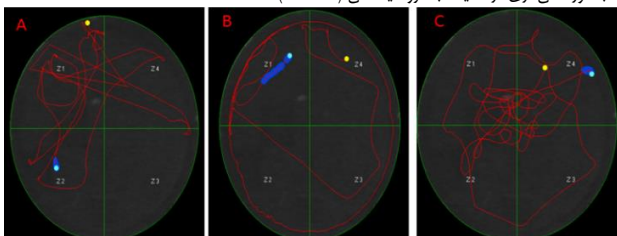
درمان با پالماتین سطح SOD را پس از ایسکمی را افزایش داد. کاهش قابل توجهی در میزان SOD در گروه ایسکمی در مقایسه با گروه شاهد ( $P < 0.01$ ) مشاهده شد. درمان با پالماتین سطح SOD را در مقایسه با گروه ایسکمی افزایش داد ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۱- زمان تأخیر فرار، فاصله کل جابجایی و سرعت برای رسیدن به پلت فرم در طول روزهای آزمایشی در ماز آبی موریس برای گروه‌های مختلف \* به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل ( $P < 0.05$ ). # نسبتاً متفاوتی نسبت به گروه دریافت‌کننده پالماتین ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۲- زمان صرف شده در منطقه هدف (چپ) و سرعت در روز پروب (راست) \* به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل ( $P < 0.05$ ). # به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه ایسکمی ( $P < 0.05$ ).



شکل ۱- نمایش مسیرهای شنا و جستجوی روزانه (روز پنجم) در ماز آب موریس برای گروه‌های مختلف

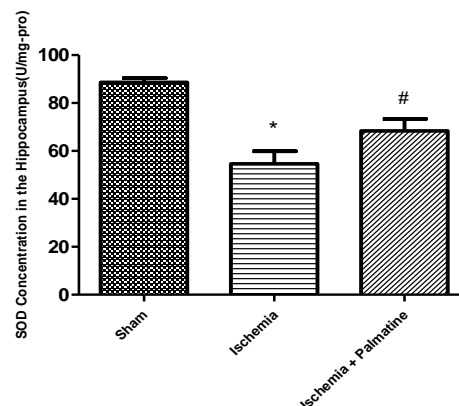
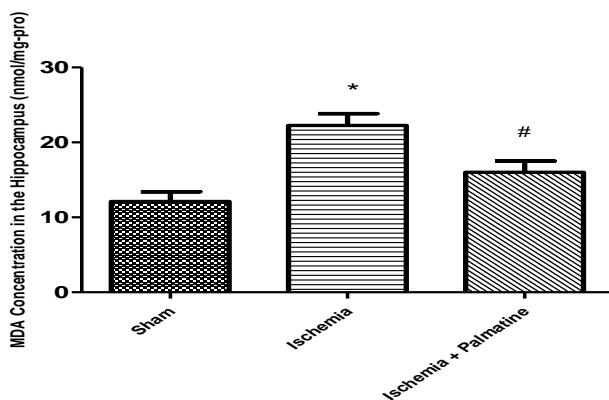
فیکساتیو انجام شد. سپس مغز موش‌های صحرایی برداشته شده و به مدت یک شبانه‌روز در فیکساتیو مشابه قرار داده شدند. سپس از مغزها بلوک‌های پارافینه تهیه شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع کرونال با ضخامت  $7\mu\text{m}$  برای رنگ‌آمیزی بافتی تهیه شد. مقاطع بر اساس اطلس پاکسینوس بین  $3/3$  و  $4/2$  میلی‌متر پشت برگما تهیه شد. برای رنگ‌آمیزی نیسل، برش‌های  $7\mu\text{m}$  میکرومتری (سه برش در هر حیوان) بر روی لام‌های سیلانه شده انتقال داده شدند. سپس با استفاده از محلول کرزیل ویوله استات  $0.1\%$  (سیگما، USA) رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها سپس خشک شده و با انتالن پوشانده شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus AX-70) و با بزرگنمایی  $\times 400$  از برش‌ها تصویر تهیه شد. بعد از تهیه تصاویر، با استفاده از نرم‌افزار Olysia bio report شمارش سلولی در امتداد خطی با طول  $400\mu\text{m}$  میکرومتر (مساحتی حدود  $0.16\text{cm}^2$  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.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری پرسم و آزمون‌های تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به‌صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  بیان می‌شوند و سطح معنی‌داری کمتر از  $0.05$  در نظر گرفته شد.

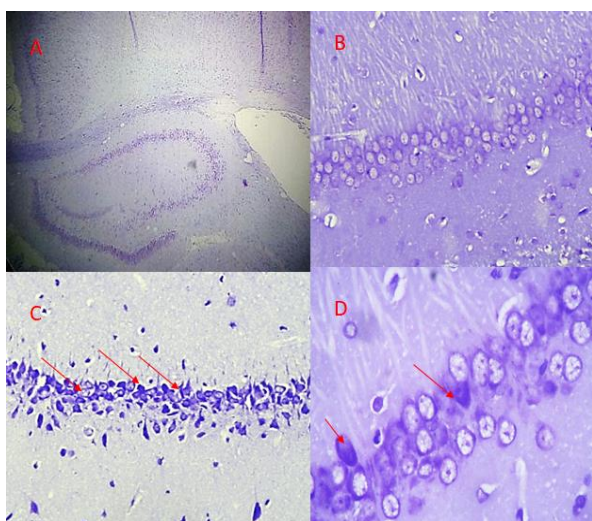
## نتایج

نتایج آزمایش ماز آبی موریس نشان داد که در طول روزهای آزمایش اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها در زمان تأخیر فرار و فاصله کل عبور برای رسیدن به سکو وجود داشت اما تفاوت معناداری در سرعت حرکت پلت فرم بین گروه‌ها مشاهده نشد. حیوانات در گروه ایسکمی زمان و فاصله بیشتری را برای رسیدن به سکوی پنهان در تمام روزهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد ( $P \leq 0.05$ ) صرف کردند. همچنین در موش‌های صحرایی گروه تحت درمان با پالماتین زمان و فاصله برای رسیدن به سکوی پنهان در تمام روزهای آزمایشی نسبت به گروه ایسکمی کاهش یافت (نمودار ۱). نتیجه آزمایش پروب (نمودار ۲) نشان داد که موش‌های صحرایی در گروه ایسکمی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کمتر در منطقه ربع هدف حضور داشتند ( $P \leq 0.05$ ). افزایش قابل توجهی در زمان صرف شده در ربع هدف در گروه درمانی پالماتین مشاهده شد ( $P \leq 0.05$ ).

درمان با پالماتین غلظت MDA پس از القای ایسکمی را کاهش می‌دهد. در تجزیه و تحلیل‌های بیوشیمیایی سطح MDA در هیپوکامپ گروه ایسکمی از گروه‌های شاهد بیشتر بود ( $P < 0.01$ ). درمان با پالماتین سطح MDA را در مقایسه با گروه ایسکمی کاهش داد ( $P < 0.05$ ).

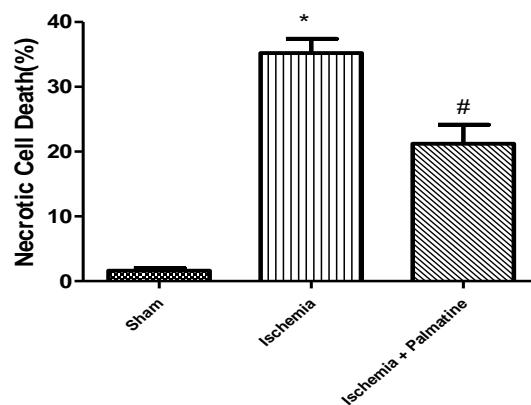


نمودار ۳- اثر تجویز پالماتین بر سطح آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی  
\* در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ( $P \geq 0.01$ ).  
# تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه ایسکمی ( $P \geq 0.05$ ).



شکل ۲- اثرات پالماتین بر میزان مرگ سلولی نکروزیس در ناحیه هیپوکامپ،  
A: هیپوکامپ، B: گروه کنترل، C: گروه ایسکمی، D: گروه ایسکمی-پالماتین  
در این مطالعه با استفاده از ماز آبی موریس اثرات درمانی پالماتین بر  
اختلال یادگیری فضایی و حافظه ناشی از ایسکمی مورد بررسی قرار  
گرفت. همانند مطالعات گذشته ایسکمی موجب اختلال در یادگیری و  
حافظه فضایی گردید. ایسکمی موجب افزایش میانگین زمان و مسافت  
طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در ماز آبی موریس شد که  
نشان‌دهنده اختلال در یادگیری فضایی در رت‌ها می‌باشد. در  
آزمایشات ما تجویز پالماتین موجب بهبود در عملکرد یادگیری شد.  
همچنین ارزیابی درصد حضور حیوان در ربع دایره هدف در مرحله  
probe trial نشان داد که گروه پالماتین زمان بیشتری را در ربع دایره  
هدف سپری نمودند که نشان‌دهنده بهبود حافظه فضایی در این گروه‌ها  
می‌باشد.

طبق نمودار ۴ در گروه ایسکمی افزایش معنی‌داری در میزان نکروزیس  
نسبت به گروه شاهد وجود داشته است ( $P < 0.001$ ). در گروه ایسکمی +  
پالماتین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم کاهش معنی‌دار در میزان نکروزیس  
نسبت به گروه ایسکمی مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). در نتیجه می‌توان  
چنین بیان کرد که درمان با پالماتین می‌تواند میزان نکروزیس را کاهش  
دهد.



نمودار ۴- اثرات پالماتین بر میزان مرگ سلولی نکروزیس  
\* در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ( $P \leq 0.001$ ).  
# تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه ایسکمی ( $P \leq 0.05$ ).

### بحث

این مطالعه با عنوان بررسی اثر تجویز پالماتین بر اختلالات حافظه و  
یادگیری، مرگ سلولی و سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ناحیه  
هیپوکامپ در مدل ایسکمی گلوبال انجام شد. هدف اصلی در این مطالعه  
ارزیابی تأثیر نوروپروتکتیو پالماتین بر درمان اختلالات شناختی و مرگ  
سلولی ناشی از ایسکمی در موش‌های صحرائی بود.



القاء شده توسط اسکوپلامین می‌شود که نتایج این مطالعه منطبق با نتایج ما می‌باشد (۲۱) مکانسیمی که پالماتین باعث کاهش مرگ سلولی نکروزیس می‌شود به‌طور دقیق مشخص نمی‌باشد. ولی با توجه به مطالعات قبلی که نشان داده‌اند به‌دنبال ایسکمی مغزی عوامل مختلفی باعث مرگ نورونی می‌شوند که عبارتند از تولید رادیکال‌های آزاد، تحریک بیش از حد گیرنده‌های NMDA توسط گلوتامات، ادم مغزی و واکنش‌های التهابی (۲۲). به نظر می‌رسد مواد یا داروهایی که باعث کاهش عوامل فوق شوند می‌توانند از طریق کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول اثرات حفاظتی خود را در مقابل ایسکمی مغزی اعمال کنند. با توجه به یافته‌های قبلی نشان داده شده که به‌دنبال ایسکمی مغزی افزایش سطح کلسیم از طریق گیرنده‌های NMDA و AMPA منجر به فعال شدن ملکول‌های Calpains و Caspase-8 در سلول می‌شود و به‌دنبال آن مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول فعال می‌شود (۲۳). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند استرس‌های اکسیداتیو در پاتوژنیز مرحله حاد سکنه مغزی نقش محوری دارند. ایجاد ایسکمی مغزی موضعی - موقتی باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، نیتریک اکساید و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل سوپراکساید دیسموتاز، گلوکاتایون و کاتالاز می‌شود (۲۴). 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 (۲۵). پژوهش‌های قبلی گزارش کرده‌اند، مهارکننده پراکسیداسیون چربی‌های غشاء و یا از بین‌برنده‌های رادیکال‌های آزاد اثر محافظتی در مقابل سکنه مغزی دارند (۲۶). همچنین مطالعه دیگر نشان داد که پالماتین باعث کاهش اثرات سمی ناشی از جنتامایسین در بافت کلیه و کبد از طریق کاهش مرگ سلولی آپوپتوز می‌شود. که این اثرات همراه با اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۲۷). که نتایج این مطالعه منطبق با نتایج مطالعه ما می‌باشد و نشان داده که پالماتین از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش مرگ سلولی می‌شود.

در این مطالعه، ما دریافتیم که درمان با پالماتین به‌طور قابل توجهی آسیب ناحیه CA1 هیپوکامپ و اختلالات حافظه و یادگیری فضایی ناشی از ایسکمی را بهبود می‌بخشد. به نظر می‌رسد که این اثرات نوروپروتکتیو ایسکمی از مکانیسم‌های بسیاری مانند مهار مرگ سلولی نکروزیس و آپوپتوزیس به‌واسطه سرکوب رادیکال‌های آزاد و کاهش بیان پروتئین‌های پروآپوپتوزی Caspase-3 و همچنین کاهش پاسخ‌های التهابی به‌واسطه مهار فعال‌سازی آستروسیت‌ها و میکروگلیاها ناشی می‌شود. در نتیجه، با توجه به این اثرات حفاظتی پالماتین در شرایط

اثرات پالماتین بر مرگ سلول‌های نکروتیک ناشی از ایسکمی در ناحیه هیپوکامپ CA1 موش صحرایی با استفاده از رنگ‌آمیزی Nissl نشان داد که پالماتین به‌طور قابل توجهی کاهش مرگ سلولی نکروتیک ناشی از ایسکمی در ناحیه CA1 می‌گردد.

ایسکمی مغزی می‌تواند منجر به اختلالات حرکتی، حسی و بینایی، اختلال تکلم، نقایص عصبی-روانی همچون کاهش ادراک، ناتوانی در انجام تکالیفی که فرد قبلاً فرا گرفته است، اختلالات شناختی، فراموشی آنتروگرا و اختلال یادگیری فضایی گردد ضایعه ریپرفیوژن (جریان مجدد) که در اثر بازگشت جریان خون به بافت بعد از مدتی ایسکمی ایجاد می‌شود. فقدان اکسیژن و مواد غذایی وضعیت خاصی را ایجاد می‌کند، در نتیجه بازگشت دوباره گردش خون می‌تواند منجر به التهاب و ضایعات اکسیداتیو در اثر ایجاد استرس اکسیداتیو گردد (۱۴ و ۱۵). آسیب‌هایی که در اثر ریپرفیوژن ایجاد می‌شود در نتیجه عملکرد التهابی بافت ضایعه دیده است. گلبول‌های سفید خون توسط بازگشت مجدد جریان خون، باعث آزادسازی فاکتورهای التهابی مانند اینترلوکین و رادیکال‌های آزاد در بافت ضایعه دیده می‌گردند (۱۶). جریان خون برگشتی موجب بازگشت اکسیژن به سلول‌ها و آسیب‌های ناشی از آزاد شدن رادیکال‌های آزاد می‌شود. این امر می‌تواند بر روی پیام‌رسانی سلولی تأثیر گذاشته و باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی گردد. نواحی مشخصی از مغز و انواع خاصی از نورون‌ها نسبت به ایسکمی مغزی حساس‌تر هستند که نورون‌های هرمی ناحیه هیپوکامپ مغز و اجسام مخطط از آن جمله می‌باشند. در این نواحی آسیب اختصاصی به سلول‌های گلیال نیز مشاهده می‌گردد که منجر به تشدید آسیب نورون‌ها می‌شود (۱۷ و ۱۸). مهمترین وقایع آسیب‌شناسی در جریان ایسکمی عبارتند از: عکس‌العمل التهابی بیش از اندازه، تخلیه ذخایر انرژی، آپوپتوز، کاهش جریان خون مغز که منجر به تخلیه ذخایر انرژی سلولی و سایر ترکیبات حاوی اتصالات فسفات پر انرژی می‌گردد، اختلال در فعالیت پمپ‌های یونی، دپلاریزاسیون هیپوکسیک و اسیدوز داخل سلولی به علت متابولیسم بی‌هوازی، افزایش سدیم و کلسیم و آزادسازی اسیدهای آمینه، فعال شدن آنزیم‌های کاتالیتیک، تحریک تولید اکسید نیتروژن، افزایش سدیم و کلسیم، آزادسازی سایر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تغییر در بیان ژن می‌شود (۱۹ و ۲۰).

در گروه دریافت‌کننده پالماتین سرعت رسیدن به سکو افزایش یافت و زمان رسیدن به سکو نیز کاهش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد و هرچه دوز دارو افزایش یافت سرعت رسیدن به سکو نیز افزایش یافت و در نتیجه اثر آنتی‌اکسیدانی ایفا کرده است. نتایج نشان داد که مصرف پالماتین منجر به بهبود توانایی حافظه و یادگیری گردید. در مطالعه‌ای که توسط دینگرا و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد نشان داده شد که پالماتین باعث بهبود یادگیری و حافظه در مدل فراموشی

14. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Sign* 2011;14:1505-17. doi: 10.1089/ars.2010.3576
15. Tananyan A, Balasanyan M, Baykov A, Hovsepyan L, Ghazaryan G. The Effect of Mesedin on the Content of Oxidative Stress Biomarkers in the Brain Tissue in Ischemia. *Neurochem J* 2019;13:68-72.
16. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007;184:53-68. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.014
17. Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- $\gamma$  agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2006;530:70-80. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.11.049
18. Aboutaleb N, Shamsaei N, Rajabi H, Khaksari M, Erfani S, Nikbakht F, et al. Protection of hippocampal CA1 neurons against ischemia/reperfusion injury by exercise preconditioning via modulation of Bax/Bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation. *Bas Clin Neurosci* 2016;7:21-9.
19. Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mole Neurobi* 2013;47:9-23 doi: 10.1007/s12035-012-8344-z
20. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 2000;179:1-33. doi: 10.1016/S0022-510X(00)00386-5
21. Dhingra D, Kumar V. Memory-enhancing activity of palmatine in mice using elevated plus maze and Morris water maze. *Adv Pharmacol Sc* 2012;1:1-8. doi:10.1155/2012/357368
22. Verma R, Mishra V, Sasmal D, Raghurib R. Pharmacological evaluation of glutamate transporter 1 (GLT-1) mediated neuroprotection following cerebral ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2010;638:65-71. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.04.021
23. Siesjö BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjö P, Katsura K-i, Folbergrová J. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann Thorac Surg* 1995;59:1316-20. doi: 10.1016/0003-4975(95)00077-X
24. Li J, Liu W, Ding S, Xu W, Guan Y, Zhang JH, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats. *Brain Res* 2008;1210:223-9. doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.007
25. Wang Z, Liu T, Gan L, Wang T, Yuan X, Zhang B, et al. Shikonin protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity. *Eur J Pharmacol* 2010;643:211-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.06.027
26. Islekel S, Islekel H, Guner G, Ozdamar N. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Rese Exp Med* 1999;199:167-76.
27. Khaksari M, Esmaili S, Abedloo R, Khastar H. Palmatine ameliorates nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by gentamicin in rats. *Arch Physiol Biochem* 2019;1-6. doi: 10.1080/13813455.2019.1633354

پاتولوژیک، می‌توان آن را به‌عنوان یک عامل درمانی برای بیماری‌های مختلف 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 ۹۵۱۱۳ قدردانی می‌گردد.

## References

1. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992;77:169-84. doi: 10.3171/jns.1992.77.2.0169
2. Netto C, Hodges H, Sinden J, Le Peillet E, Kershaw T, Sowinski P, et al. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neurosci* 1993;54:69-92. doi: 10.1016/0306-4522(93)90384-R
3. Wang Y, Zh Qin. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 2010;15:1382-402. doi: 10.1007/s10495-010-0481-0
4. Ibasser MM, Amin E, Lin T-CE, Iordanova MD, Aggleton JP. Evidence that the rat hippocampus has contrasting roles in object recognition memory and object recency memory. *Behav Neurosci* 2012;126:659-64.
5. Murakami K, Kondo T, Chan PH. Reperfusion following focal cerebral ischemia alters distribution of neuronal cells with DNA fragmentation in mice. *Brain Res* 1997;751:160-4. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00029-2
6. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends Neurosci* 1995;18:83-8. doi: 10.1016/0166-2236(95)80029-2.
7. Siesjö BK. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood F Met* 1981;1:155-85. doi: 10.1038/jcbfm.1981.18
8. Wang X, Feuerstein G. The janus face of inflammation in ischemic brain injury, in *Mechanisms of secondary brain damage from trauma and ischemia*. 2004,49-54.
9. Hong-DaM, Tao G, Ming Y. Palmatine from *Coptidis rhizoma* reduces ischemia-reperfusion-mediated acute myocardial injury in the rat. *Food Chem Toxicol* 2102;47:2097-102. doi: 10.1016/j.fct.2012.05.031
10. im YM, Ha YM, Jin YC, Shi LY, Lee YS, Kim HJ, et al. Palmatine from *Coptidis rhizoma* reduces ischemia-reperfusion-mediated acute myocardial injury in the rat. *Food Chem Toxicol* 2009;47:2097-102. doi: 10.1016/j.fct.2009.05.031
11. Tan HL, Chan KG, Pusparajah P, Duangjai A, Saokaew S, Mehmood Khan T, et al. *Rhizoma coptidis*: a potential cardiovascular protective agent. *Front Pharmacol* 2016;7:362. doi: 10.3389/fphar.2016.00362
12. Lee W-C, Kim J-K, Kang J-W, Oh W-Y, Jung J-Y, Kim YS, et al. Palmatine attenuates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in mice. *Food Chem Toxicol* 2010;48:222-228. doi: 10.1016/j.fct.2009.10.004
13. Ghanbari F, Khaksari M, Vaezi G, Hojati V, Shiravi A. Hydrogen sulfide protects hippocampal neurons against methamphetamine neurotoxicity via inhibition of apoptosis and neuroinflammation. *J Mol Neurosci* 2019;67:133-41. doi: 10.1007/s.1203-018-1218



## Protective Effect of Palmatin Hydrochloride on Improving Spatial Memory, Antioxidant Capacity and Necrosis Cell Death of Hippocampus Following Brain Ischemia Reperfusion

Hossein Khastar (Ph.D.)<sup>1</sup>, Behzad Gharmabi (Ph.D.)<sup>1</sup>, Mehraneh Mirzaei (M.D.)<sup>2</sup>, Mehdi Khaksari (Ph.D.)<sup>1\*</sup>

1- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

2- Student Research Committee, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

### Abstract:

**Introduction:** Palmatine is a protoberbene of the alkaloids group with antioxidant activities in various animal models. Recent studies have shown that palmatine prevents gentamicin-induced apoptosis in kidney tissue with antioxidant effects. Brain ischemia-reperfusion can cause irreversible damage especially in the area of the hippocampus. The aim of the study was to evaluate the effect of Palmatine on cognitive function, antioxidant activity and neuronal cell death following brain ischemia-reperfusion in male rats.

**Methods:** 21 male wistar rats were divided into three groups. 1- Sham group, 2- Ischemia group due to obstruction of both normal carotid arteries for 20 minutes, and 3- Treatment group in which palmatine injection at a dose of 100 mg / kg was performed intraperitoneally at the beginning of the reperfusion period and again after 24 and 48 hours. Spatial memory test was evaluated by Morris water maze. The brains were removed for antioxidant enzyme evaluation and Nissl staining to assess necrosis neuronal death within the hippocampal CA1 area.

**Results:** The results showed that the rate of learning in treatment group improved versus the ischemia group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the attendance of animals in the target circle in the probe test, in the treatment groups was significantly higher than the Ischemia group which indicates an improvement in memory performance ( $P < 0.05$ ). Palmatine could significantly reduce necrosis cell death ( $P < 0.05$ ) in CA1 area of hippocampus. Also palmatine could significantly reduce MDA and increase SOD concentration ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The findings showed that treatment with Palmatine significantly ameliorated hippocampal injury and spatial learning and memory impairments after brain ischemic. These protective effects of Palmatine appear to be mediated by many mechanisms such as necrosis and apoptosis cell death by suppression of free radicals formation.

**Keyword:** Palmatine, Hippocampus, Brain ischemia, Memory impariment, Neuronal cell death.

Conflict of Interest: No

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

**Citation:** Khastar H, Gharmabi B, Mirzaei M, Khaksari M. The evaluation effect of Palmatin on improvement of learning and memory, antioxidant capacity and necrosis cell death on hippocampus following brain ischemia reperfusion. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2020;15(1):2-9.