

اثر تزریق درون بطنی مغزی عصاره اتانولی برگ گیاه زالزالک (*Crataegus melanocarpa*) در

## بروز رفتار ناشی از احساس ترس در حضور پنتیلین تترازول در رت نر بالغ

پریسا دارابی<sup>۱\*</sup>، بهاره توکلی فر<sup>۲</sup>، غلامحسین واعظی<sup>۳</sup>، کیوان کرامتی<sup>۳</sup>

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه فیزیولوژی - فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، البرز

۲- استادیار، گروه فارماکولوژی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، البرز

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان

\*آدرس مکاتبه: کرج، باغستان، خیابان اشتراکی، گلستان یکم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز

تلفن و نمابر: ۳۴۳۳۶۰۰۷ (۰۲۶)

پست الکترونیک: parisa.darabi01@gmail.com

تاریخ تصویب: ۹۱/۷/۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۱۰

## چکیده

مقدمه: گیاه زالزالک (*Crataegus melanocarpa*) از جمله گیاهان دارویی است که خواص درمانی مختلفی در منابع سنتی و مبتنی بر دانش بومی در خصوص آن ذکر شده است. از جمله خواص مورد اشاره، تأثیر این گیاه بر سیستم عصبی است.

هدف: این پژوهش به منظور بررسی اثر تزریق درون بطنی - مغزی (I.C.V) عصاره اتانولی برگ گیاه زالزالک در موش‌های صحرایی با رفتار ترس ناشی از پنتیلین تترازول (PTZ) صورت گرفته است.

روش بررسی: در این پژوهش موش‌های صحرایی نر به طور تصادفی به سه گروه تجربی، کنترل مثبت (PTZ) و شاهد (سالین) تقسیم شدند. در گروه تجربی عصاره برگ گیاه زالزالک به میزان  $4000 \mu\text{g/Rat}$  (مؤثرترین دوز) به صورت I.C.V به موش‌هایی که پنتیلین تترازول را به میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی (I.P) دریافت کرده بودند، تزریق شد و رفتار ترس در این گروه با استفاده از Elevated plus - maze نسبت به گروه شاهد (سالین) و گروه کنترل مثبت (PTZ) بررسی و مقایسه شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که زمان اقامت (%OAT) و دفعات ورود حیوانات به بازوی باز (%OAE) در گروه تجربی، نسبت به گروه شاهد و کنترل مثبت افزایش معنی‌داری دارد ( $p < 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق درون بطنی - مغزی عصاره برگ گیاه زالزالک با دوز  $4000 \mu\text{g/Rat}$  به طور معنی‌داری باعث کاهش در بروز رفتار ترس ناشی از پنتیلین تترازول می‌شود.

کل واژگان: زالزالک، پنتیلین تترازول، حافظه و یادگیری، ترس



## مقدمه

ترس یک پاسخ دفاعی فیزیولوژیک در برابر خطر حاد یا مزمن می‌باشد که به صورت واکنش‌های اتونومیک، نورواندوکرینی و رفتاری تظاهر می‌یابد. ترس از جمله اختلالاتی است که با شدت‌های متفاوتی می‌تواند موجب بروز مشکلاتی در زندگی فردی و اجتماعی انسان شود. از دیرباز تلاش برای یافتن راهی مؤثر، سریع، کم‌خطر و بدون عارضه جهت کاهش ترس و اضطراب وجود داشته است. در بین درمان‌های رایج، جایگاه طب سنتی و گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها برکسی پوشیده نیست. در این میان جستجو برای یافتن دارویی با عوارض کمتر امری ضروری است. از جمله گیاهان دارویی که در طب سنتی و طب مدرن اثرات مختلفی برای آن ذکر شده زالزالک می‌باشد.

زالزالک (*Crataegus spp*)، کیالک یا کویچ (نام انگلیسی: hawthorn) یکی از گیاهان خوراکی خودرو و متعلق به خانواده گل سرخ (*Rosaceae*) می‌باشد. تاکنون ۲۵ گونه زالزالک در ایران مورد شناسایی قرار گرفته است. در ایران گونه کراتاکوس ملانوکارپا (*Crataegus melanocarpa*) در نواحی مختلف به صورت خودرو در گرگان، دامغان، اراک، کلاردشت، ارومیه، بروجرد، کوهستان‌های البرز و حتی ناحیه پس قلعه شمال تهران وجود دارد. همچنین در شمال ایران گونه‌های وحشی آن به شکل خودرو در جنگل‌ها می‌روید و آن را (ولیک) می‌نامند.

استفاده از زالزالک در درمان بیماری‌ها، به قرون وسطی برمی‌گردد و از همان زمان به عنوان یکی از گیاهان دارویی مفید برای درمان بیماری‌های قلب و عروق در اروپا استفاده می‌شد [۱]. حکمای طب سنتی ایران، زالزالک را از نظر طبیعت سرد و خشک می‌دانند و از پوست درخت به عنوان تب‌بر استفاده می‌کنند. به طور کلی، دم‌کرده گل‌های زالزالک و یا گرد گل خشک شده آن به مقدار پنج تا هشت گرم در روز برای ضعف قلب، آنژین، ورم آئورت، اختلالات عصبی از جمله نگرانی، بی‌خوابی، سرگیجه، احساس صدا در گوش و نظایر آن

اثر تزریق درون بطنی ...

مفید است. قسمت‌های مورد استفاده برگ، گل و میوه‌هاست. بخش‌های مورد استفاده گیاه دارای مقادیر زیادی از مواد آنتی‌اکسیدانی است. مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه زالزالک فلاونوئیدها و آنتوسیانیدین‌ها می‌باشند [۲،۳]. در تحقیقی که در همین راستا انجام شد مشخص شد که تزریق درون بطنی عصاره برگ زالزالک در دوزهای ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰  $\mu\text{g}/\text{rat}$  در موش‌های صحرایی، موجب کاهش معنی‌دار رفتار ترس در مقایسه با گروه کنترل (سالین) شد. همچنین در بین دوزهای مورد استفاده، دوز ۴۰۰۰  $\mu\text{g}/\text{rat}$  عصاره زالزالک بیشترین تأثیر را از لحاظ آماری نشان داد [۴]. چون در این زمینه تحقیق دیگری به صورت تجربی انجام نشده و با توجه به این نتایج، هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر تزریق درون بطنی - مغزی دوز ۴۰۰۰  $\mu\text{g}/\text{rat}$  عصاره برگ زالزالک بر رفتار ترس ناشی از پنتیلن تترازول (PTZ) در موش‌های صحرایی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

رت‌های نر بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰ - ۱۸۰ گرم از انستیتو رازی کرج تهیه شدند. ۲۴ سر رت در گروه‌های ۴ تایی در هر قفس نگهداری شدند. در طول مطالعه حیوانات آزادانه به آب و غذا (شرکت خوراک دام پارس، کرج) دسترسی داشتند.

محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته (هفت صبح تا هفت شب) و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و بدون هرگونه سر و صدا و آلودگی صوتی بود. موش‌ها حداقل یک هفته قبل از جراحی نسبت به شرایط محیط آزمایشگاه سازگاری پیدا نمودند. آزمایش‌های موردنظر در زمان معین از روز و مطابق دستورالعمل‌های جهانی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت.



## گیاه

برگ‌های گیاه زلزلالک از شهر دامغان در استان سمنان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در هرباریوم دانشگاه سمنان شناسایی و تأیید شدند.

## تهیه عصاره گیاه

برگ‌های تازه گیاه زلزلالک، در محیط سایه آزمایشگاه خشک شد. برای عصاره‌گیری از روش خیساندن در تاریکی استفاده شد. پودر برگ‌های خشک شده، در اتانول ۸۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. در این مدت مخلوط فوق هر ۱۲ ساعت یک‌بار به هم زده و با استفاده از قیف بوختر صاف شد. با کمک دستگاه حذف حلال در خلأ، الکل حذف شد و تولید عصاره تغلیظ شده نمود.

## روش جراحی

برای انجام عمل جراحی، ابتدا حیوانات بر اساس وزن با تزریق زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و کتامین (۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به روش داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس جهت انجام تزریقات درون بطنی مغزی (I.C.V)، کانول‌گذاری در بطن راست موش صحرائی به روش زیر انجام شد. بعد از اینکه موش بر روی دستگاه استریوتاکس ثابت شد، پوست روی جمجمه از ناحیه بین دو چشم تا انتهای استخوان پس سری شکاف داده شد و طبق اطلس پاکسینوس، نقطه برگما مشخص شد. در ناحیه بطنی مشخص شده کانول راهنما به طول ۳/۴ میلی‌متر (تهیه شده از سر سوزن شماره ۲۱) قرار داده شد. بعد از ضدعفونی ناحیه مربوطه اطراف آن توسط آکریل و منومر دندانپزشکی پوشانده شد تا کانول به طور محکم و ثابت نگه داشته شود. برای جلوگیری از مسدود شدن مجرای کانول از سیم فلزی ضدزنگ استفاده شد. پس از عمل جراحی حیوانات به مدت پنج روز دوره ریکاوری را طی کرده و سپس تزریق عصاره در دوزهای مشخص توسط کانول تزریق (سر سوزن شماره ۲۷ دندانپزشکی) و یک رابط پلی‌اتیلنی که به سرنگ هامیلتون متصل شده بود انجام شد.

## آزمون رفتاری

برای سنجش رفتارهای مربوط به ترس از Elevated Plus Maze (EPM) استفاده می‌شد. این تست در ابتدا توسط Pellow & File در سال ۱۹۸۶ میلادی معرفی شد [۵]. دستگاه EPM یک ماز چوبی به شکل به علاوه + می‌باشد که از چهار بازو تشکیل شده است. دو تا از بازوها دارای هیچ دیواره‌ای نیست و اندازه آن ۱۰×۵۰ سانتی‌متر می‌باشد. دو بازوی دیگر دارای دیواره‌های جانبی و انتهایی، ولی بدون سقف می‌باشند. ارتفاع دیواره‌ها ۴۰ سانتی‌متر و اندازه خود بازوهای آن ۱۰×۵۰ سانتی‌متر می‌باشد. این ماز به اندازه ۵۰ سانتی‌متر بالاتر از سطح زمین قرار گرفته است. در محل تلاقی چهار بازو یک مربع به اندازه ۱۰×۱۰ سانتی‌متر ایجاد می‌شود [۶]. اساس تست EPM بر دو اصل استوار است یکی حس غریزی جستجوگرانه حیوان و دیگری غریزه احتراز از محیط‌های باز و روشن. به بیان دیگر از طرفی حیوان تمایل به حرکت و جستجو در تمام بازوها را دارد و از طرف دیگر از ورود به بازوی باز می‌ترسد و همین امر سبب بروز تضاد و اضطراب در حیوان می‌شود. به همین دلیل حیوان بیشتر وقت خود را در بازوی بسته سپری می‌کند.

هر موش قبل از قرار گرفتن در Plus-maze ابتدا در جعبه‌ای به ابعاد ۶۰×۶۰×۳۵ سانتی‌متر به مدت ۵ دقیقه قرار می‌گرفت. مطالعات قبلی نشان دادند که این روش مجموع تعداد داخل شدن حیوان را به قسمت‌های مختلف Plus-maze افزایش می‌دهد. پس از گذشتن زمان لازم حیوان بلافاصله از داخل جعبه به maze منتقل می‌شد، به طوری که در مربع مرکزی، رو به یک بازوی بسته قرار می‌گرفت. نور مناسب توسط یک لامپ ۱۰۰ واتی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی‌متری از مرکز maze قرار داشت، تأمین می‌شد. در مدت ۵ دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف maze حرکت می‌کرد، پارامترهای زیر به روش مشاهده اندازه‌گیری می‌شد:

تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز می‌شد:

(Open Arm Entry, OAE)



**گروه سوم:** گروه تجربی ( $n=8$ ) که PTZ را به صورت تزریق داخل صفاقی و دوز ( $4000 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) عصاره زالزالک را به صورت (I.C.V) دریافت کردند.

### آنالیز آماری

محاسبات آماری توسط نرم افزار آماری SPSS انجام شد و نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش و با آنالیز واریانس یک طرفه ارزیابی شد (ANOVA one - way). از آزمون Tukey Kramer برای تعیین اختلاف بین گروهها استفاده شد. در تمامی موارد، از لحاظ آماری  $p < 0.05$  به عنوان معنی دار بودن تفاوتها در نظر گرفته شد.

### نتایج

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه گروه کنترل مثبت (PTZ) و گروه عصاره زالزالک + PTZ (گروه تجربی) در شاخص درصد ورود به بازوی باز (OAE%) مشخص شد که گروه عصاره + PTZ به طور معنی داری باعث افزایش (OAE%) شد (نمودار شماره ۱).

در بررسی صورت گرفته میان گروه کنترل مثبت (PTZ) و گروه عصاره + PTZ در شاخص درصد ورود به بازوی بسته (CAE%) مشخص شد که گروه عصاره + PTZ به طور معنی داری باعث کاهش (CAE%) شد (نمودار شماره ۲).

در شاخص (OAT%) نیز طبق آزمایش انجام شده در مقایسه گروه کنترل مثبت PTZ و گروه عصاره + PTZ مشخص شد که گروه عصاره + PTZ به طور معنی داری باعث افزایش (OAT%) شد (نمودار شماره ۳).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه گروه کنترل مثبت (PTZ) و گروه عصاره + PTZ در شاخص درصد حضور در بازوی بسته (CAT%) مشخص شد که گروه عصاره + PTZ به طور معنی داری باعث کاهش (CAT%) شد (نمودار شماره ۴).

تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی بسته می شد: (Closed Arm Entry, CAE)

مدت زمانی که حیوان در بازوی باز باقی می ماند: (Open Arm Time, OAT)

مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته باقی می ماند: (Closed Arm Time, CAT)

منظور از ورود به بازوی باز یا بسته هنگامی است که هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر قرار می گرفت. زمان سپری شده در هر بازو نیز بر همین اساس محاسبه شده است [۷].

### بافت شناسی

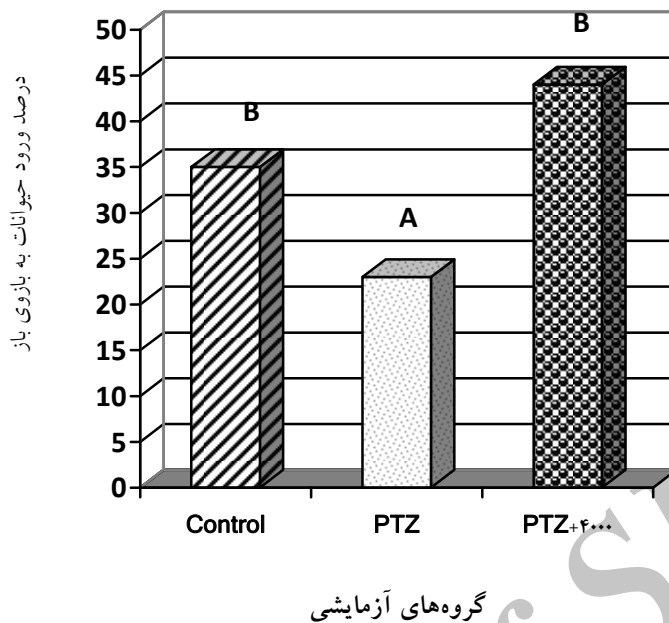
در پایان آزمایشها تمام حیوانات گروههای مختلف جهت تأیید موقعیت کانول راهنما مورد بررسی بافت شناسی قرار گرفتند. به این ترتیب که حیوانات با کلروفورم کشته شده و سپس با سرنگ هاملتون و از طریق کانول راهنما ۱ میکرولیتر متیلن بلو به داخل مغز تزریق شده. بعد از خارج نمودن مغز حیوان از مجسمه و فیکس نمودن آنها در فرمالین ۱۰ درصد، با انجام پروسه بافتی صحت عمل کانول گذاری تأیید شد. چنانچه محل قرار گرفتن کانولها با مختصات مورد نظر مطابقت نداشت، حیوان در تجزیه و تحلیل آماری شرکت داده نمی شد.

**گروههای مورد آزمایش:** در این پژوهش حیوانات به سه گروه و به شرح زیر تقسیم شدند:

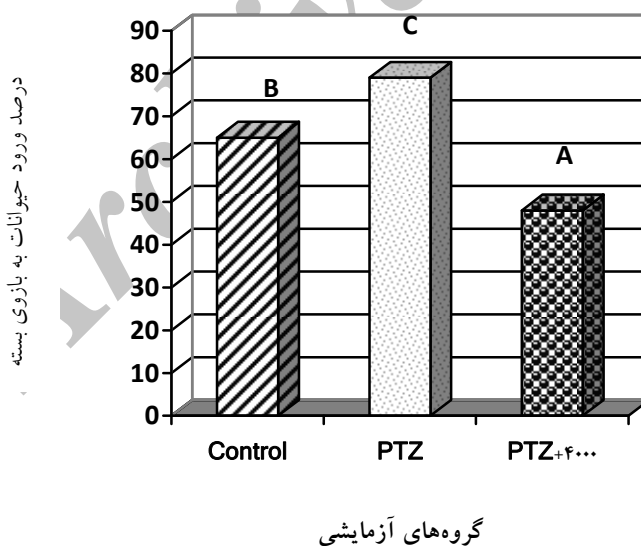
**گروه اول:** گروه کنترل که در آن ( $n=8$ ) بوده و تزریق سالین به صورت i.c.v و به مقدار  $1 \mu\text{lit}$  انجام شد.

**گروه دوم:** گروه کنترل مثبت PTZ ( $n=8$ ) را به صورت تزریق داخل صفاقی (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و بعد از آن ۱ میلی لیتر سالین را به صورت داخل بطنی مغزی (I.C.V) دریافت نمودند.





نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار درصد ورود حیوانات به بازوی باز (Open Arm Entry, %OAE) در گروه تجربی (دوز PTZ + 4000 µg/rat) با کنترل مثبت (PTZ) و گروه کنترل (سالین) (n=8) ( $p < 0.05$ )



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار درصد ورود حیوانات به بازوی بسته (Closed Arm Entry, %CAE) در گروه تجربی (دوز PTZ + 4000 µg/rat) با کنترل مثبت (PTZ) و گروه کنترل (سالین) (n=8) ( $p < 0.05$ )





## بحث

اضطراب فعال می‌شود. پس با مهار این محور اضطراب نیز کاهش می‌یابد [۱۰].

با توجه به آزمایش Ahumada et al نشان داده شد که سیکلوآرتنول مشتق شده از تری‌ترین‌های موجود در عصاره زالزالک، باعث مهار فسفولیپاز A2 می‌شود [۱]. فسفولیپاز A2 به طور مستقیم باعث تولید اسید آراشیدونیک از فسفولیپیدها می‌شود و رسپتورهای موسکارینی نوع M1 را تحریک می‌کند و این رسپتورها باعث افزایش پیامبرهای ثانویه IP3, DAG شده و همچنین با اثر بر روی کانال‌های کلسیمی باعث افزایش غلظت درون سلولی کلسیم می‌شود. همچنین در بررسی‌های به عمل آمده مشخص شده که در افزایش غلظت کلسیم، گیرنده‌های NMDA نقش دارند. با مدنظر قرار دادن این یافته‌ها می‌توان احتمال داد که اثر مهار فسفولیپاز A2 عصاره به واسطه گیرنده‌های NMDA از افزایش غلظت‌های یون کلسیم جلوگیری می‌کند و به دنبال این اثر، مهار حاصل از گابا به سلول عصبی تشدید و به این ترتیب از بروز رفتار ترس جلوگیری می‌کند [۱۱].

از آنجایی که پروستاگلاندین‌ها فرایندهای سلولی را دچار دستخوش تغییر می‌کنند، نهایتاً می‌توانند بلوک کانال‌های پتاسیمی را در غشاء پس سیناپسی سبب شوند.

فسفودی استراز ۴ (PDE4) آنزیم درگیر در هیدرولیز AMP حلقوی است و یک نقش حیاتی در کنترل غلظت‌های درون سلولی cAMP بازی می‌کند [۱۲]. فلاونوئیدهای موجود در عصاره گیاهان دارای فعالیت مهارکنندگی فسفودی استرازهای (PDE) تیپ ۴ هستند [۱۳، ۱۴، ۱۵] و محققین نشان دادند که ارتباط مهم و معنی‌داری بین توانایی کاهش ترس و توانایی مهار فعالیت فسفودی استراز ۴ توسط فلاونوئیدها وجود دارد [۱۶]. با توجه به پژوهش انجام شده توسط جردی و همکاران (Jordi) بر روی مهار کننده اختصاصی فسفودی استراز تیپ ۴، نشان دادند که این مهار کننده‌ها یک عمل پیش سیناپسی را میانجی می‌کند و برگشت منوآمینرژیک را افزایش می‌دهد که نتیجه آن افزایش در تحریک پس سیناپسی است. با

ترس یک واقعه بیولوژیکی است که امکان اجتناب از خطر را در حالت‌های مختلف می‌دهد. مهم‌ترین رفتار در مقابل ترس در حیوانات افزایش فعالیت حرکتی و فرار از محیط خطر بود و این رفتار هنگام ارزیابی با تست plus-maze به صورت اجتناب حیوان از ورود به راهروی باز قابل مشاهده می‌باشد.

در تحقیق حاضر پس از تجویز درون بطنی - مغزی سالین در گروهی از موش‌ها به عنوان گروه کنترل و داروی PTZ به عنوان یک داروی مولد ترس به عنوان گروه کنترل مثبت تجویز و با مقایسه نتایج به دست آمده تأثیر احتمالی ترکیب یاد شده تأیید شد ( $p < 0.05$ ).

از PTZ به عنوان داروی ایجاد صرع استفاده می‌شود و همچنین داروی ایجاد کننده اضطراب است. این ماده بیشترین تأثیر را بر روی گابا دارد. بر اساس نوعی بررسی نشان داده شد که PTZ غلظت یون کلسیم درون سلولی را افزایش می‌دهد. و مشخص شده که در این افزایش غلظت، گیرنده‌های NMDA نقش دارند از سوی دیگر مشخص شده که افزایش کلسیم در سلول مانع از بروز اثرات مهاری ناشی از گابا می‌شود [۸، ۹].

در این تحقیق تزریق همزمان عصاره به همراه PTZ در مقایسه با گروه کنترل در پارامترهای OAT, %OAE, %OAT دارای افزایش معنی‌دار و در پارامترهای CAE, %CAT, %OAE دارای کاهش معنی‌داری بوده است که نشان دهنده تأثیر عصاره زالزالک بر رفتار ترس ناشی از PTZ می‌باشد. به عبارت دیگر عصاره گیاه زالزالک با دوز ( $400 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) بروز رفتار ترس را در حیوان دریافت کننده PTZ کاهش می‌دهد.

طبق تحقیقات معلوم شده که این گیاه دارای ترکیباتی به نام فلاونوئیدها است [۲، ۳]. طبق تحقیقات به عمل آمده بر روی فلاونوئیدهای موجود در گیاهان مشخص شده است که برخی از آنها دارای خاصیت ضدافسردگی و آرامش‌بخشی می‌باشند؛ محور HPA (-Hypothalamic-Pituitary-Adrenal) را مهار می‌کنند که این محور در استرس و



فلاونوئیدهای موجود در گیاهان دارای اثرات ضدافسردگی و ضداضطرابی هستند. این ترکیبات به جایگاه رسپتورهای A GABA متصل می‌شوند [۲۴]. همچنین برخی از فلاونوئیدها بر روی گیرنده مرکزی بنزودیازپین و رسپتور موسکارینی  $\alpha_1$  آدرنژیک و همچنین رسپتورهای موسیمولی GABAA متصل می‌شود. اثرات گابا روی کنداکتانس یون کلر به وسیله بنزودیازپین‌ها که فعالیت بارز کاهش ترس دارند تسهیل می‌شود [۲۴، ۲۵].

بنزودیازپین‌ها رسپتورهای گابا A را فعال می‌کنند، که این رسپتورها کانال‌های کلر هستند و با افزایش کنداکتانس یون کلر اثرات هیپریلاریزه کننده ایجاد می‌نمایند [۲۶].

PTZ در سلول‌های عصبی به عنوان آنتاگونیست گابا مطرح است. در مطالعات الکتروفیزیولوژی مشخص شده که افزایش نفوذپذیری پتاسیم و جریان چند یون را در غشا ایجاد می‌کند از جمله سدیم و کلسیم که باعث تحریک‌پذیری غشا نورو می‌شود. PTZ از طریق اتصال به جایگاهی درگیرنده‌های GABA، مهار ناشی از این گیرنده‌ها را مختل می‌سازد و لذا موجب بروز ترس و تشنج می‌شود. جایگاه مذکور برای اتصال پیکر و توکسین ویژگی دارد [۸].

با توجه به نتایج حاصل از تحقیقات مختلف، به نظر می‌رسد عصاره گیاه زالزالک به واسطه مهار گیرنده‌های NMDA، از افزایش غلظت یون‌های کلسیم درون سلولی جلوگیری می‌کند که به دنبال این اثر، مهار حاصل از گابا در سلول عصبی تقویت می‌شود. همچنین احتمال دارد که عصاره گیاه زالزالک با ممانعت از اتصال PTZ به جایگاه پیکروتوکسین موجود در گیرنده‌های گابا، مانع القاء ترس توسط آن شود. جهت مشخص شدن مکانیسم دقیق دخیل در این وضعیت، انجام تحقیقات بیشتر پیشنهاد می‌شود.

## نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز درون بطنی مغزی دوز  $4000 \mu\text{g}/\text{rat}$  عصاره برگ زالزالک در موش‌های دریافت‌کننده

بالا رفتن انتقال پیش سیناپسی سیگنال‌ها از قبیل افزایش میزان cAMP درون سلولی و در نتیجه به نظر می‌رسد که یک چنین احتمالی ناشی از توانایی برای عمل بر روی بالا بردن سطح درون سلولی رسپتورهای منوآمین (سروتونین) پیش سیناپسی است [۱۷، ۱۸].

آنژیوتانسین اخیراً به عنوان یکی از هورمون‌های دخیل در ترس و استرس که در پاسخ‌های مختلف تحریک‌کننده ترس و استرس دخالت دارد، شناسایی شده است. رسپتورهای آنژیوتانسین شامل AT1، AT2 در نواحی مغزی مختلف شامل هیپوتالاموس، هیپوکمپ، substantia nigra، caudat nucleus و پوتامن که در پاسخ‌های ترس درگیرند، شناسایی شده است. طبق نتایج به دست آمده در زمان ترس و استرس سطح آنژیوتانسین در مغز و پلاسما افزایش می‌یابد [۱۹].

همچنین مشخص شده است که عصاره زالزالک باعث مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) می‌شوند [۲۰]. این آنزیم یک دی پپتیدیل کربوکسی پپتیداز است که هیستیدیل - لوسین را از آنژیوتانسین جدا می‌کند. از طرفی این آنزیم باعث تبدیل آنژیوتانسین می‌شود که در صورت مهار آن توسط عصاره می‌توان پیشنهاد داد که در نبود این نوروترانسمیتر پاسخ‌های القاء‌کننده ترس ایجاد نمی‌شود. همچنین در آزمایشی نشان دادند که نقص رسپتور AT2 آنژیوتانسین در آمیگدال باعث کاهش ترس در حیوانات مورد آزمایش شد [۲۱].

از طرفی رسپتور AT1 آنژیوتانسین نیز در استرس، ترس و اضطراب دخالت دارد و در بررسی‌ها نشان داده شد که در عدم حضور آنژیوتانسین عملکرد این رسپتور در موارد بالا تعدیل می‌شود. از جمله اعمال دیگر آنژیوتانسین عبارت است از تسهیل آزاد شدن نوراپی نفرین توسط یک عمل مستقیم روی نورون‌های نورآدرنژیک واقع در هیپوتالاموس، آمیگدال، مغز میانی و قشر پیشانی می‌شود. از آنجایی که فعالیت سیستم نوراپی نفرین باعث تحریک ترس و اضطراب می‌شود. با این بررسی‌ها می‌توان احتمال داد که مهار آنزیم ACE سبب کاهش آنژیوتانسین و در نتیجه کاهش ترس می‌شود [۲۲، ۲۳].





آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره گیاه در تقویت سیستم گابارژیک حیوان باشد.

PTZ، سبب کاهش بروز رفتار ترس در حیوان شد. به نظر می‌رسد که این امر به دلیل تأثیر مواد فلاونوئیدی و

## منابع

- Ahumada C, Saenz T, Garcia D, De La Puerta R, Fernandez A and Martinez E. The effects of a triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. On different acute inflammation models in rats and mice. Leucocyte migration and phospholipase A2 inhibition. *J. Pharm-Pharmacol.* 1997; 9 (3): 329 - 31.
- Elliott Middleton Jr, Kandaswami CH and Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews* 2000; 52 (4): 673 - 751.
- Svedstrom U, Vuorela H, Kostianen R, Tuominen J, Kokkonen J, Rauha JP, Laakso I and Hiltunen R. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochem.* 2002; 60 (8): 821 - 5.
- Vaezi GH, Keramati K and Darabi P. Effect of Intracerebroventricular Injection of *Crataegus melanocarpa* Etanolic Extract on fear Behavior in adult Mal Rat. *Veterinary Journal of Islamic Azad University, Garmsar Branch* 2008; 4 (2): 81 - 8.
- Pellow S and File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986; 24 (3): 525 - 9.
- Boulton A and Baker G. *Neuromethods Animal Models in Psychiatry*) Human Press Clifton, New Jersey, U.S.A. 1991, 199 - 223.
- Edinger KL and Frye CA. Testosterones antianxiety and analgesic effect may be due in part to actions of its 5 $\alpha$ -reduced metabolites in the hippocampus. *Psychoneuroendocrino* 2005; 42: 418 - 30.
- Ren-Qi Huang, Cathy L, Bell-Horner, Mohammed I Dibas, Douglas F Covey, John A et al. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: Mechanism And Site of Action. 2004; 298 (3): 986 - 95.
- Lister RQ. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *J. Psycharmacol.* 1987; 92: 180 - 5.
- Butterweck V, Hegger M, Winterhoff H. Flavonoids of St. John's Wort reduce HPA axis function in the rat. *Planta Med* 2004; 70 (10): 1008 - 11.
- Cheng XP, Qin S, Dong LY and Zhou JN. Inhibitory effect of total flavone of *Abelmoschus manihot* L. Medic on NMDA receptor-mediated current in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 2006; 55 (2): 142 - 5.
- Rotella P.D. Phosphodiesterase Enzymes-Target Overview. *Touch BRIEFINGS* 2007; 1756-1892:22 - 3.
- Ko WC, Shih CM, Lai YH, Chen JH and Huang HL. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68 (10): 2087 - 94.
- Cheng XP, Qin S, Dong LY and Zhou JN. Inhibitory effect of total flavone of *Abelmoschus manihot* L. Medic on NMDA receptor-mediated current in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 2006; 55 (2): 142 - 5.



15. Nikaido T, Ohmoto T, Kinoshota T, Sankawa U, Delle Monache F, Botta, Tomimori T, Miyaichi Y, Shirataki Y, Yokoe I, et al. Inhibition of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids. III. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1989; 37 (5): 1392 - 5.
16. Li YF, Huang Y, Stolinski LR, O'Donnell M and Zhang HT. Anxiolytic- Like effect of the PDE4 Inhibitor Rolipram and relationship to cAMP signaling and hippocampal neurogenesis. *FASEB Journal* 2008; 22: 904 - 1120.
17. Jordi S, Silvestre F, Andres G, Fernandez K and Plaacios JM. Effects of rolipram on the elevated plus-maze test in rats: a Preliminary Study. *J. Psychopharmacol.* 1999; 13: 274.
18. Petkov E, Nikolov N, Uzunov, Uzunov P. Inhibitory Effect of Some Flavonoids and Flavonoid Mixtures on Cyclic AMP Phosphodiesterase Activity of Rat Heart. *Planta Med.* 1981; 43 (1): 183 - 6.
19. Watanabe T, Fujioka T, Hashimoto M and Nakamura S. Stress and brain angiotensin II receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* 1998; 12 (4): 305 - 17.
20. Ramesar S, Baijnath H, Govender T and Mackraj I. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Activity of Nutritive Plants in KwaZulu-Natal. *Journal of Medicinal Food* 2008; 11 (2): 331 - 6.
21. Okuyama S, Sakagawa T, Chaki S, Imagawa Y, ICHIKI T and Inagami T. Anxiety-like behavior in mice lacking the angiotensin II type-2 receptor. *Brain Res.* 1999; 821: 150 - 9.
22. Juan MS, Ines A, Claudia B, Augusto J, Miroslava M, Jaroslav P and Enrique S.L. A Centrally Acting, Anxiolytic Angiotensin II Ati Receptor Antagonist Prevents the Isolation Stress-Induced Decrease in Cortical Crfi Receptor and Benzodiazepine Binding. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31: 1123 - 34.
23. Ambuhl P, Gyurko R and Philips MI. A decrease in angiotensin receptor binding in rat brain nuclei by antisense oligonucleotides to the angiotensin AT1 reseptor. *Regul Pept.* 1995; 59: 171 - 80.
24. Wang F, Shing M, Huen Y, Tsang SY and Xue H. Neuroactive flavonoids interacting with GABAA receptor complex. *Curr Drug Targets CNS Neural Disorder.* 2005; 4 (5): 575 - 85.
25. Salguerio JB, Ardenghi P, Dias M, Ferreira MB, Izquierdo I and Medina J.H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997; 58 (4); 887 - 91.
26. Nassiri-Asl M, Shariati-Rad Sch and Zamansoltani F. Anticonvulsant effects of aerial parts of Passiflora incarnate extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2007; 1186/1472-6882-7-26.



## Effects of Intracerebroventricular Injection of Alcoholic Extract of hawthorn (*Crataegus melano carpa*) Leaves on Fear Behavior in Presence Pentylentetrazole (PTZ) in Adult Male Rat

Darabi P (M.Sc.)<sup>1\*</sup>, Tavakoli-far B (Ph.D.)<sup>1</sup>, Vaezi Gh (Ph.D.)<sup>2</sup>, Keramati K (Ph.D.)<sup>2</sup>

1- Department of Physiology and Pharmacology, Alborz University of Medical Science, Karaj, Iran

2- Department of Biology, Islamic Azad University Damghan, Damghan, Iran

\* Corresponding author: Alborz University of Medical Science, Karaj, Iran

Tel: +98 - 26 - 34336007

E-mail: parisa.darabi01@gmail.com

### Abstract

**Background:** In traditional medicine "*Crataegus melanocarpa*" is one of the medicinal plants that has many therapeutic effects. One of them is its effect on nervous system.

**Objective:** Evaluation of Intracerebroventricular (ICV) injection of alcoholic extract of "*crataegus melanocarpa*" leaves on fear behavior in presence pentylentetrazole (PTZ) in adult male rat.

**Methods:** Animals were divided into 3 groups: experimental, saline and, pentylentetrazole (PTZ) 20mg/kg as positive control (I.P). In the experimental group, the animals received 4000 µg/Rat alcoholic extract of "*Crataegus melanocarpa*" leaves (ICV) and PTZ (I.P). Then plus maze was used for evaluation of the fear. Open arm entries percentage (%OAE) and open arm time percentage (%OAT) were evaluated.

**Results:** The results show that intracerebroventricular (ICV) injection of alcoholic extract of "*Crataegus melanocarpa*" leaves increased %OAE and %OAT significantly ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** We concluded that alcoholic extract of "*Crataegus melanocarpa*" is effective on fear reduction in presence pentylentetrazole (PTZ) in adult male rat.

**Keywords:** *Crataegus Melanocarpa*, Pentylentetrazole, Memory and Learning, Fear

