مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۲، شماره‌ی ۹۵، بهمن و اسفند ۱۳۹۳، صفحات ۱۰۱ تا ۱۱۱

بررسی تاثیر عصاره‌ی آبی سنجد بر اختلال حافظه ایجاد شده توسط اسکوپولامین در موش‌های صحرایی

امیدرضا تمتاجی[۱]، دکتر محسن تقی‌زاده[۲]، سیدمهدی تخت فیروزه[۳]، سیدعلیرضا طلایی[٤]

نویسنده‌ی مسوول: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی talaei@kaums.ac.ir

دریافت: ۹۲/۱۲/۸ پذیرش: ۹۳/۵/٤

چکیده

زمینه و هدف: *یکی از مشخصه‌های بیماری آلزایمر آسیب عملکرد شناختی و حافظه است که علت آن می‌تواند کاهش فعالیت سیستم کولینرژیکی باشد. اسکوپولامین یک آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی است که باعث ایجاد اختلال موقت در حافظه شده و مدلی شبیه بیماری آلزایمر در حیوانات ایجاد می‌کند. این مطالعه به‌منظور بررسی اثر عصاره‌ی آبی سنجد بر اختلال حافظه ایجاد شده توسط اسکوپولامین طراحی شده است.*

روش بررسی: *مطالعه‌ی تجربی حاضر بر روی شش گروه ۱۰ تایی موش صحرایی نر بالغ انجام شد که شامل ٤ گروه دریافت کننده‌ی اسکوپولامین همراه با عصاره‌ی آبی سنجد با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و دو گروه کنترل مثبت و کنترل منفی بودند. گروه‌ها روزانه و به‌مدت ٤ هفته گاواژ شدند. در پایان میزان یادگیری و حافظه‌ی فضایی آن‌ها با استفاده از روش ماز آبی موریس ارزیابی گردید.*

یافته‌ها: *مطالعه‌ی حاضر نشان داد تزریق اسکوپولامین باعث ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه‌ی موش صحرایی در آزمون ماز آبی موریس می‌شود ($P<۰/۰۰۰۱$). تجویز خوراکی عصاره‌ی آبی سنجد به‌صورت وابسته به دوز، اختلال ایجاد شده در یادگیری و حافظه ناشی از اسکوپولامین را در موش بهبود بخشید ($P<۰/۰۰۰۱$)؛ به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره با گروه کنترل منفی مشاهده نگردید.*

نتیجه‌گیری: *عصاره‌ی آبی سنجد باعث بهبود روند یادگیری و حافظه‌ی فضایی در اختلال ایجاد شده توسط اسکوپولامین موش‌های صحرایی می‌شود.*

واژگان کلیدی: سنجد، حافظه، اسکوپولامین، ماز آبی موریس، موش صحرایی

مقدمه

بیماری آلزایمر رایج‌ترین شکل زوال عقل در افراد مسن بوده و از جمله بیماری‌هایی است که شیوع آن در سراسر جهان به‌سرعت در حال افزایش است (۱). این بیماری یک اختلال عصبی تدریجی و پیش‌رونده سیستم عصبی مرکزی

۱- دانشجوی کارشناسی بهداشت عمومی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
۲- دکترای تخصصی تغذیه، استادیار دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک
۳- دانشجوی کارشناسی بهداشت محیط، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
٤- دانشجوی دکترای علوم اعصاب، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد که به‌وسیله‌ی آسیب عمیق عملکرد شناختی و حافظه مشخص می‌شود (۲). هر چند علل اصلی ایجاد این بیماری شناخته نشده است، اما عوامل متعددی از قبیل تشکیل پلاک‌های بتا آمیلوئید (۳)، تجمع تائوپروتئین‌ها (٤)، افزایش رادیکال‌های آزاد (۵)، التهاب (٦) و هم‌چنین مهار گیرنده‌های کولینرژیک و کاهش فعالیت سیستم کولینرژیکی (۸و ۷) می‌تواند عاملی جهت ایجاد اختلالات شناختی در بیماری آلزایمر باشد. اسکوپولامین یک آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی است که باعث ایجاد اختلال موقت در حافظه می‌شود. اثر اسکوپولامین بر تغییر فعالیت سیستم کولینرژیک در بیماری آلزایمر نیز مشاهده شده که می‌توان گفت مدلی شبیه مدل بیماری آلزایمر ایجاد می‌کند (۱۰و ۹). مطالعات مختلفی جهت درمان اختلال حافظه‌ی ناشی از اسکوپولامین با استفاده از گیاهان دارویی انجام گرفته است (۱۲و ۱۱). نشان داده شده است که ترکیبات پلی‌فنولی (۱۳) و ترکیبات فلاونوئیدی مانند کوئرستین، روتئین (١٤)، رسوراترول (۱۵)، لوتئولین (١٦) و کورکومین (۱۷) اختلال حافظه‌ی ناشی از اسکوپولامین را کاهش می‌دهند. یکی از مکانیسم‌هایی که ممکن است در بهبود اختلال حافظه‌ی ناشی از اسکوپولامین توسط این ترکیبات موثر باشد، بهبود عملکرد سیستم کولینرژیک و مهار آنزیم استیل‌کولین استراز، توسط این ترکیبات می‌باشد (۱۸، ۱۵، ۱۳).

میوه‌ی درخت سنجد (*Elaeagnus Angostifulia*) کمی شیرین و قابض بوده و از این گیاه در طب سنتی در درمان بیماری‌هایی مانند تهوع، زردی، استفراغ، آسم و نفخ استفاده می‌شود (۱۹). مواد موثره‌ی موجود در سنجد شامل ترکیبات پلی‌فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی، ترپنوئیدها و گلیکوزیدهای قطبی می‌باشد (۲۲-۲۰). با توجه به اثر مثبت ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی بر درمان اختلال حافظه، این پژوهش برای اولین بار با هدف بررسی تاثیر عصاره‌ی آبی میوه سنجد بر اختلال ایجاد شده در حافظه‌ی فضایی موش صحرائی توسط اسکوپولامین انجام گرفت.

روش بررسی

این مطالعه‌ی تجربی بر روی ٦۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به شش گروه شامل گروه کنترل منفی [CO(-)]، کنترل مثبت [CO(+)]، و گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره همراه با اسکوپولامین با دزهای ۵۰ (SCO+۵۰)، ۱۰۰ (SCO+۱۰۰)، ۲۰۰ (SCO+۲۰۰)، و ٤۰۰ (SCO+٤۰۰) میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند. پس از گاواژ روزانه عصاره‌ی آبی سنجد به مدت چهار هفته، روند یادگیری و تثبیت حافظه‌ی فضایی با استفاده از آزمون ماز آبی موریس مورد بررسی قرار گرفت. جهت ایجاد اختلال حافظه نیز اسکوپولامین هر شب ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمون ماز به صورت درون صفاقی به موش‌ها تزریق گردید. در طول مطالعه حیوانات از نظر دسترسی به آب و غذا آزاد بودند. درجه‌ی حرارت محل نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ تا ٦۰ درصد و سیکل روشنایی ۱۲ ساعته بود.

تزریق اسکوپولامین: به‌منظور ایجاد اختلال در حافظه‌ی موش‌ها در گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره‌ی آبی سنجد و گروه کنترل مثبت، از محلول اسکوپولامین (Sigma-Aldrich, USA) با پایه‌ی آب مقطر به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش‌ها استفاده گردید. نیم ساعت قبل از انجام آزمایش ماز آبی موریس در هر شب با استفاده از سرنگ انسولین محلول اسکوپولامین به داخل صفاق موش تزریق گردید (۲۳).

تهیه‌ی عصاره‌ی آبی گیاه سنجد: به‌منظور تهیه‌ی عصاره‌ی آبی، ابتدا سنجد مورد نیاز از فروشگاه‌های شهر کاشان خریداری شده و پس از بررسی و تایید آن از نظر هرباریوم و سلامت،

Archive of SID
www.SID.ir

توسط کارشناس ارشد گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شرکت باریج‌اسانس، خرد و پس از جدا سازی هسته، آسیاب شد. پودر به‌دست آمده به همراه آب مقطر جوش با نسبت یک به یک، به داخل ارلن مایر ریخته شد تا کاملا خمیری شکل شود. پس از اینکه پودر آب کافی جذب کرد، دوباره آنقدر آب جوش به آن اضافه شد تا سطح آن با آب پوشیده گردید و به‌مدت ۷۲ ساعت در داخل روتاری در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد باقی ماند تا کاملا مخلوط شده و عصاره آن خارج شود. پس از آن عصاره‌ی آبی موجود در ارلن توسط کاغذ صافی، صاف شده و به‌منظور تغلیظ، محلول حاصل در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت مقدار ماده‌ی خشک عصاره‌ی تغلیظ شده اندازه‌گیری شد.

تعیین مقدار فلاونوئیدهای تام بر اساس کوئرستین: در آنالیز عصاره، ابتدا جهت رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین در واکنش با معرف آلومینیم کلرید، ۵ میلی‌گرم کوئرستین استاندارد توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌گرم توزین شد. پس از حل کردن کوئرستین در اتانول ۸۰ درجه در یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول فوق توسط پیپت مقادیر ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر برداشته و به بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و با اتانول ۸۰ به حجم رسانده شد، تا غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آید. از هر یک از محلول‌های اخیر با پیپت حجمی مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته، به بالن حجمی ۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس به آن ۲ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درجه اضافه گردید. به دنبال آن به هر یک از بالن‌ها مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلراید (w/w) ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پتاسیم استات یک مولار اضافه کرده و با اتانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شد. پس از ۳۰ دقیقه، جذب محلول‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت گردید (محلول شاهد شامل کلیه‌ی اجزا به جز محلول نمونه می‌باشد که همزمان با بقیه تهیه می‌گردد). این آزمایش را برای هر غلظت سه بار تکرار و میانگین جذب هر غلظت برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار برده شد.

در نهایت جهت تعیین مقدار فلاونوئید تام در نمونه، مقدار مشخصی از نمونه‌ی درون یک بالن رفلاکس ۵۰ میلی‌لیتری توزین شد. سپس به آن ۸ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درجه‌ی اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت رفلاکس شد. پس از سرد شدن مخلوط به وسیله‌ی کاغذ صافی واتمن نمره‌ی ۴۰ به داخل یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری صاف گردید. محتویات بالن و صافی را با مقدار کافی از اتانول ۸۰ درجه شسته و در نهایت محلول مورد نظر به حجم رسانده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول توسط پیپت به بالن حجمی ۵ میلی‌لیتری منتقل گردید و مشابه روش ذکر شده برای رسم منحنی کالیبراسیون با معرف آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد واکنش داده شد. این آزمایش شش مرتبه تکرار گردید و میانگین جذب محلول‌ها در ۴۱۵ نانومتر به‌دست آمد.

تعیین مقدار ترکیبات فنولیک تام بر اساس گالیک اسید: در آنالیز عصاره جهت رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، مقدار ۵/۵ میلی‌گرم از استاندارد گالیک اسید با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌گرم توزین گردید و پس از حل کردن در مقداری آب در یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری، به حجم رسانده شد ۵۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول فوق با پیپت مقادیر ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌لیتر برداشته و به بالن‌های حجمی ۵ میلی‌لیتری منتقل گردید و سپس با آب به حجم رسانده شد. بدین‌ترتیب محلول‌های استاندارد از گالیک‌اسید با غلظت‌های ۵۵، ۱۱۰، ۱۶۵، ۲۲۰ و ۲۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. ۰/۲ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد فوق توسط پیپت به بالن‌های حجمی ۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس به هر کدام از بالن‌ها ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه سپس تکان داده شد. پس از گذشت ۲ دقیقه به هر یک از بالن‌ها،

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۲۰ درصد (حجمی/وزنی) افزوده شد و در نهایت با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول شاهد نیز به‌طور همزمان و به طریق مشابه بدون افزودن محلول نمونه به آن تهیه گردید. پس از گذشت ۲ ساعت از به حجم رساندن محلول‌ها، جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت گردید. این آزمایش برای هر غلظت سه مرتبه تکرار و میانگین جذب برای هر غلظت محاسبه گردید و سپس منحنی کالیبراسیون رسم شد. در نهایت جهت تعیین مقدار ترکیبات فنولیک تام در نمونه، مقدار مشخصی از نمونه درون یک بالن رفلاکس ۵۰ میلی‌لیتری توزین شد و با اتانول ۸۰ درجه به حجم رسانده شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول اخیر توسط پیپت حجمی به بالن ژوژه ۵ میلی‌لیتری منتقل و مشابه روش ذکر شده برای رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید با معرف فولین واکنش داده شد. میزان جذب محلول پس از دو ساعت در طول موج ۷۶۰ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت گردید (۳۰و ۲۹).

ماز آبی موریس: سنجش یادگیری و تثبیت حافظه‌ی فضایی توسط ماز موریس به‌طور گسترده در تحقیقات انجام می‌شود که یک تانک آب با قطر ۱۸۰ و عمق ۷۰ سانتی‌متر است و تقریبا نیمی از آن از آب پر می‌شود. ماز به‌طور فرضی به چهار ربع مساوی شمالی، جنوبی، شرق و غربی تقسیم شده و یک سکوی نجات با ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر در وسط یکی از این چهار ربع قرار می‌گیرد؛ به‌طوری‌که حدود ۱/۵ سانتی‌متر زیر سطح آب واقع می‌شود و از بیرون قابل دیدن نیست. حرارت آب در حدود ۲۰ تا ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم می‌گردد. ماز در اتاقی قرار می‌گیرد که در آن علایم فضایی مختلفی وجود دارد که در طول آزمایشات ثابت بوده و برای حیوان در ماز قابل دید است. این مجموعه از طریق یک دوربین ردیاب که در ارتفاع ۱۸۰ سانتی‌متری و در بالای مرکز ماز آبی قرار گرفته است، مونیتور شده و از طریق اتصال به کامپیوتر، اطلاعات مربوط به آزمایش در حال انجام ذخیره می‌گردد. جهت انجام، ثبت و آنالیز بعدی داده‌های حاصل از آزمایش از نرم افزار اختصاصی "ردیاب-۱ ویرایش ۷" که توانایی پذیرش تنظیمات مختلف برای آزمایشات گوناگون در ماز آبی را دارد، استفاده شد.

مراحل انجام آزمایش به شرح زیر است. ۱- مرحله‌ی یادگیری یا آموزش: طی این مرحله، حیوان از یکی از سمت‌های چهارگانه (شمال، جنوب، مشرق و مغرب) ماز در حالی که صورت آن به طرف دیواره ماز است، در آب رها می‌شد (لازم به‌ذکر است که انتخاب ناحیه شروع آزمایش به‌طور تصادفی بوده و به‌وسیله‌ی برنامه‌ی نرم افزاری پیشنهاد می‌گردید). با توجه به اندازه ماز و نوع حیوان (موش صحرایی) حداکثر زمان آزمایش ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در صورتی‌که حیوان به‌طور اتفاقی سکوی پنهان مخفی در زیر آب را پیدا می‌کرد و روی آن قرار می‌گرفت، به‌حیوان اجازه داده می‌شد تا به‌مدت ۱۵ ثانیه روی سکو بماند و با جستجوی اطراف و دیدن علایم موجود در آزمایشگاه موقعیت خود را شناسایی کند. این موضوع به حیوان کمک می‌کند تا در جلسات بعدی آزمایش با استفاده از علایم بینایی در اتاق محل آزمایش، جایگاه سکو را پیدا نماید. لازم به‌ذکر است که هم علایم فضایی موجود در محل آزمایش و هم موقعیت سکو در یکی از چهار قسمت ماز در طول آزمایشات ثابت بود. در صورتی‌که در مدت تعیین شده موش نمی‌توانست سکو را پیدا کند، حیوان توسط آزمایش کننده به آرامی به‌سوی سکو هدایت می‌شد تا سکو را یافته و برای ۱۵ ثانیه روی آن قرار گیرد. پس از گذشت این زمان، حیوان از سکو برداشته شده و بعد از خشک شدن با یک حوله به قفس خود برگردانده می‌شد. پس از ۱۰ دقیقه آزمایش مجددا تکرار می‌گردید؛ با این تفاوت که محل رها شدن موش در ماز نسبت به مرحله قبل متفاوت بود. هر موش روزانه ۴ جلسه آموزش با فاصله‌ی ۱۰ دقیقه‌ای را تجربه می‌کرد. در مجموع این مرحله از آزمایش به‌مدت ۴ روز طول کشید و طی آن

Archive of SID
www.SID.ir

۱۶ جلسه آزمایش روی حیوانات انجام گرفت.

۲- مرحله‌ی باز خوانی یا پروب: بلافاصله پس از تکمیل مرحله اول، مرحله‌ی بعد انجام گرفت. در این مرحله (با توجه به اینکه حیوان محل سکوی پنهان را می‌داند) سکو از ماز برداشته شده و آزمایش انجام می‌شد. و این نکته مورد توجه قرار می‌گرفت که موش در حین آزمایش (که قاعدتا قادر به یافتن سکو نیست) بیشترین وقت خود را در کدامیک از قسمت‌های چهارگانه ماز می‌گذراند. لازم به‌ذکر است که در این مرحله از آزمایش هر جلسه ۳۰ ثانیه طول کشید و به‌دلیل عدم وجود سکو پس از پایان زمان، موش از ماز برداشته می‌شد. این مرحله از آزمایش برای هر موش یک بار انجام گرفت و مدت زمان ماندن و نیز مسافت پیموده شده در ربع صحیح ماز (که در مرحله‌ی قبل واجد سکو بود) معیار میزان یادگیری و یادآوری قرار گرفت.

آنالیز آماری: نتایج حاصل از آزمایشات مرحله‌ی یادگیری با استفاده از آزمون Repeated Measures One-Way ANOVA مقایسه گردیدند. داده‌های مربوط به مرحله‌ی پروب نیز با استفاده از One-Way ANOVA و پس آزمون Bonferroni مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

یافته ها

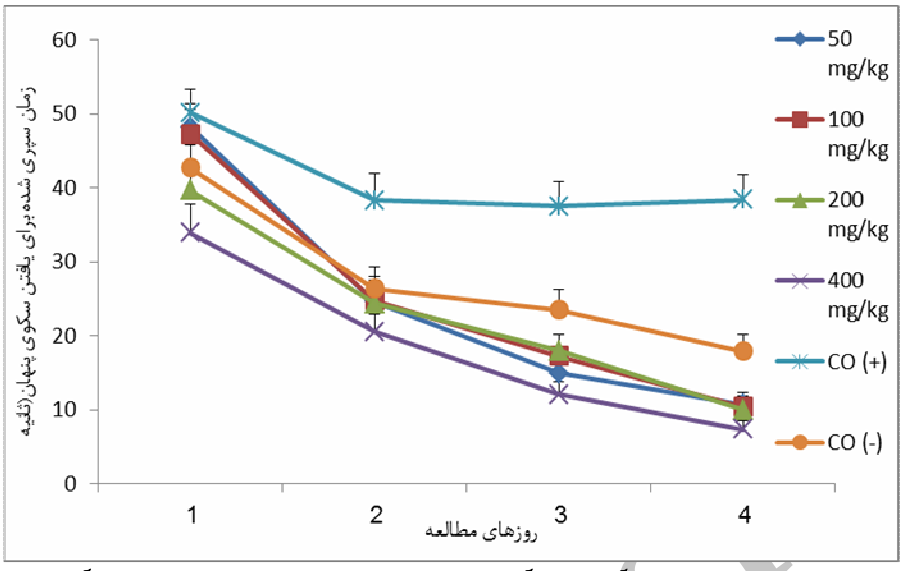
با توجه به روش‌های ذکر شده برای آنالیز ترکیبات موجود در عصاره‌ی آبی سنجد، پس از ٦ تکرار برای هر آزمایش، میانگین پلی‌فنول‌ها براساس اسید گالیک معادل ۲/۵ درصد به ازای هر گرم ماده خشک و میزان فلاونوئیدهای آن بر اساس کوئرستین معادل ۵۰ میکروگرم به ازای هر گرم ماده خشک بود. در بررسی یادگیری و حافظه در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از ماز آبی موریس، اطلاعات جمع‌آوری شده از زمان سپری شده، و مسافت پیموده شده تا رسیدن به سکوی پنهان به‌صورت زیر می‌باشند:

الف- مرحله‌ی یادگیری: با مطالعه داده‌های جمع‌آوری شده از مجموع چهار روز آموزش حیوانات در ماز آبی موریس و با توجه به معنی‌دار نبودن (P=۰/۱۶۳) آزمون کرویت موخلی (Mauchly's test of Sphericity)، نتایج آزمون Sphericity Assumed نشان داد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان در روزهای مختلف در همه گروه‌ها وجود دارد ($F_{۵/۲۴۷}$= ۳٤/۲۱۸ ;P<۰/۰۰۰۱). نتایج مقایسه‌ی بین گروهی نیز نشان می‌دهد که اختلاف بین روند یادگیری در گروه‌های مختلف آزمایش معنی‌دار است ($F_{۵/۲۳٤}$= ۱٤/۳۲۸ ;P<۰/۰۰۰۱). همان‌گونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است، تزریق اسکوپولامین باعث افزایش مدت زمان یادگیری در مقایسه با گروه کنترل منفی گردید (P<۰/۰۰۰۱)، اما مصرف عصاره‌ی آبی سنجد منجر به کاهش زمان سپری شده برای یافتن سکوی هدف در موش‌هایی شد که توسط اسکوپولامین دچار اختلال حافظه شده بودند. در این مطالعه نه تنها اختلاف معنی‌داری بین سه گروه اول دریافت کننده‌ی عصاره و گروه کنترل منفی مشاهده نشد، بلکه گروه چهارم که عصاره‌ی آبی سنجد را به مقدار ٤۰۰ میلی‌گرم دریافت کرده بودند، در مدت زمان کمتری نسبت به گروه کنترل منفی سکو را پیدا کرده و در واقع این کاهش زمان، اختلاف قابل توجهی با گروه کنترل منفی داشته است (P<۰/۰۰۰۱).

ب- مرحله‌ی بازخوانی (پروب): در این مرحله مدت زمانی که حیوانات مورد مطالعه در ربع دارای سکو در مرحله‌ی قبل گذراندند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه‌ی بین گروه‌ها با آزمون آنالیز واریانس بیانگر این مطلب است که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های شرکت کننده در آزمایش وجود دارد ($F_{۵/۰٤}$= ۵/۸۲٤ ;P<۰/۰۰۰۱). با توجه به نتایج حاصل از آزمون تعقیبی Bonferroni می‌توان دریافت که موش‌های گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل زمان کمتری را در ربع دارای سکو گذراندند (P<۰/۰۵).

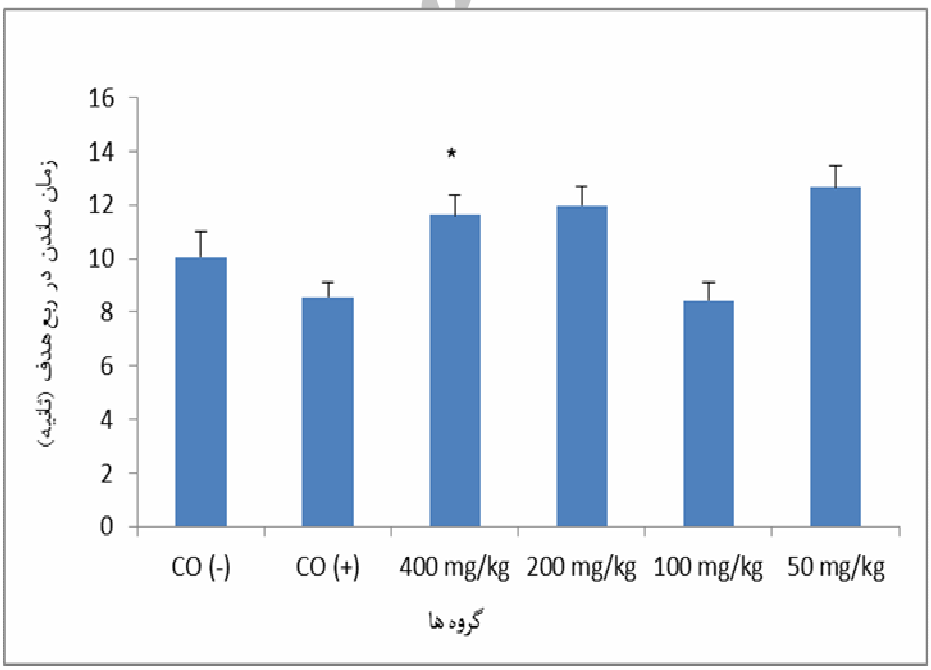
Archive of SID

www.SID.ir



نمودار۱: زمان لازم جهت یافتن سکوی پنهان در آزمون ماز آبی موریس توسط حیوانات (در روزهای مختلف آزمایش). داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف میانگین استاندارد حاصل از مجموع جلسات انجام شده طی یک روز نمایش داده شده است روند بهبود یادگیری در هر چهارگروه نمایان است. اسکوپولامین باعث اختلال در روند یادگیری حیوانات شد و اختلاف بین گروه‌های CO (-) و CO (+) معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). تجویز عصاره‌ی آبی سنجد باعث بهبود روند یادگیری در موش‌های دریافت کننده اسکوپولامین شد.

CO (-): Positive Control, CO (+): Negative Control



*نمودار ۲: مدت زمانی که موش‌های گروه‌های آزمایش در مرحله بازخوانی اطلاعات آموخته شده برای یافتن سکوی پنهان صرف کردند. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف میانگین استاندارد نمایش داده شده است. * اختلاف بین گروه کنترل مثبت و گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره‌ی آبی سنجد به‌مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).*

CO (-): Positive Control, CO (+): Negative Control

www.SID.ir

همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است، بعد از تجویز عصاره‌ی آبی سنجد، حیوانات گروه دریافت کننده‌ی عصاره به مقدار ٤۰۰ میلی‌گرم در مقایسه با حیوانات گروه کنترل مثبت زمان بیشتری را در ربع دارای سکو سپری کرده‌اند (P<۰/۰۵) و زمان سپری شده در ربع دارای سکو در گروهی که این عصاره را به مقدار ٤۰۰ میلی‌گرم دریافت کرده بودند، نزدیک به گروه کنترل منفی بود (P=۱). این افزایش زمان در سایر گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره قابل توجه نبود.

بحث

در این مطالعه جهت بررسی میزان یادگیری و تثبیت حافظه‌ی فضایی از ماز آبی موریس استفاده گردید. در مجموع داده‌های این مطالعه نشان دادند که اسکوپولامین باعث ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه‌ی موش‌های صحرایی می‌شود و گاواژ عصاره‌ی آبی سنجد باعث بهبود روند یادگیری فضایی موش‌های صحرایی دریافت کننده اسکوپولامین می‌شود؛ بدین معنی که موش‌های دریافت کننده‌ی عصاره آبی سنجد در مقایسه با موش‌های گروه کنترل برای یافتن سکوی پنهان زمان کمتری را در ماز سپری کرده، مسافت کمتری را نیز پیمودند. در آزمون پروب نیز دریافت عصاره منجر به تثبیت بهتر حافظه‌ی فضایی در مقایسه با گروه کنترل مثبت شد. به‌منظور بررسی عملکرد سیستم کولینرژیک و گیرنده‌های موسکارینی مطالعات مختلفی روی ترکیبات فلاونوئیدی انجام شده است (۲٦و ۱۸، ۱۵). نشان داده شده است که ترکیب فلاونوئیدی لوتئولین از طریق گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتین باعث فعال شدن سیستم کولینرژیک مرکزی شده و فعالیت سیستم کولینرژیک را افزایش می‌دهد (۲٦و ۱۸). به‌علاوه، بیان گردیده است که رسوراترول با تاثیر بر گیرنده‌های موسکارینی و هم‌چنین مهار آنزیم استیل کولین استراز می‌تواند باعث بهبود یادگیری و حافظه‌ی فضایی در موش‌های صحرایی گردد (۱۵). در مطالعه‌ی پیوش و همکاران مشخص گردید که کورکومین نقش حیاتی در تنظیم فعالیت‌های سیستم کولینرژیک در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین داشته و بیان ژن آنزیم استیل کولین استراز را افزایش می‌دهد (۲۷). در مطالعه‌ی حاضر عصاره‌ی آبی سنجد آنالیز شد که مشخص گردید عصاره‌ی مورد استفاده در این مطالعه حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد. در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که عصاره‌ی سنجد دارای مقادیر زیادی از ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد (۲۱و ۲۰). در مطالعه‌ی آیاز و برتوفت مشخص شد که میوه‌ی سنجد دارای ۳/۲ درصد ترکیبات پلی‌فنولی در ۱۰۰ گرم میوه خشک می‌باشد (۲۲). بنابر این علت اثر مثبت عصاره‌ی آبی سنجد بر بهبود اختلال حافظه ناشی از اسکوپولامین می‌تواند تاثیر ترکیبات فلاونوئیدی این گیاه بر گیرنده‌های موسکارینی و بهبود عملکرد سیستم کولینرژیک باشد؛ چرا که اسکوپولامین میزان آنزیم استیل‌کولین استراز (AChE) را افزایش داده و نشان داده شده است بین زمان پیدا کردن سکو در ماز آبی موریس و میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز ارتباط مستقیم وجود دارد (۲۸). جهت درمان بیماری آلزایمر نیز از داروهایی مانند فیزوستیگمین و ریواستیگمین استفاده می‌شود که با مهار آنزیم استیل کولین استراز باعث بهبود عملکرد سیستم کولینرژیک و در نتیجه بهبود حافظه و اختلالات شناختی ناشی از ابتلا به بیماری آلزایمر می‌شوند (۳۰و ۲۹). در مطالعه‌ای مشخص شد ترکیبات پلی‌فنولی موجود در چای سبز باعث مهار آنزیم استیل کولین استراز می‌شوند (۳۱). همچنین رسوراترول با مهار آنزیم استیل کولین استراز باعث بهبود حافظه در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین می‌گردد (۳۲). با توجه به مطالعات قبلی، یکی از علل اثر مهاری عصاره‌ی آبی سنجد بر اختلال حافظه

Archive of SID
www.SID.ir

ایجاد شده با اسکوپولامین ممکن است مهار آنزیم استیل کولین استراز توسط ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی باشد. تجویز مهار کننده‌های سیکلو اکسیژناز که داروهای کاهش دهنده‌ی التهاب هستند، نیز می‌تواند باعث بهبود اختلال حافظه و اختلال شناختی ناشی از اسکوپولامین در موش‌ها شود (۳۳). دانشمندان نشان داده‌اند که ترکیبات پلی‌فنولی (۳٤) و فلاونوئیدی (۳۵) با مهار آنزیم سیکلو اکسیژناز باعث کاهش التهاب می‌شوند.

نتیجه گیری

در مجموع می‌توان گفت عصاره‌ی آبی سنجد اختلال حافظه ایجاد شده توسط اسکوپولامین در موش‌های صحرایی را بهبود می‌بخشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کاشان با کد ۹۲۰٦۱ می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی این دانشگاه به دلیل همکاری و حمایت‌های مالی، کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آورند.

References

1- Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, et al. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol.* 2011; 95(4): 718-28.

2- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001; 81(2): 741-66.

3- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. β-Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999; 286(5440):735-41.

4-Hernandez F, Avila J. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(17): 2219-33.

5- Zhu X, Raina AK, Lee H-g, et al. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2004; 1000(1): 32-9.

6- Ferreira A, Proença C, Serralheiro M, et al. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. J *Ethnopharmacol.* 2006; 108(1): 31-7.

7- Walker LC, Rosen RF. Alzheimer therapeutics-what after the cholinesterase inhibitors? Age and ageing. 2006; 35(4): 332-5.

8- Ahmed T, Gilani A-H. Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 91(4): 554-9.

9- Ebert U, Kirch W. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest.* 1998; 28: 944-9.

10- Murray C, Fibiger H. Pilocarpine and physostigmine attenuate spatial memory impairments produced by lesions of the nucleus

Archive of SID

www.SID.ir

basalis magnocellularis. *Behav Neurosci.* 1986; 100(1): 23.

11- Lee YK, Yuk DY, Kim TI, et al. Protective effect of the ethanol extract of Magnolia officinalis and 4-O-methylhonokiol on scopolamine-induced memory impairment and the inhibition of acetylcholinesterase activity. *J Nat Med.* 2009; 63(3): 274-82.

12- Rubio J, Dang H, Gong M, et al. Aqueous and hydroalcoholic extracts of Black Maca (Lepidium meyenii) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(10): 1882-90.

13- Kwon S-H, Lee H-K, Kim J-A, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur J Pharmacol.* 2010; 649(1): 210-7.

14- Richetti S, Blank M, Capiotti K, et al. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2011; 217(1): 10-5.

15- Gacar N, Mutlu O, Utkan T, et al. Beneficial effects of resveratrol on scopolamine but not mecamylamine induced memory impairment in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011; 99(3): 316-23.

16- Yoo DY, Choi JH, Kim W, et al. Effects of luteolin on spatial memory, cell proliferation, and neuroblast differentiation in the hippocampal dentate gyrus in a scopolamine-induced amnesia model. *Neurol Res.* 2013; 35(8): 813-20.

17- Dong J, Sheng Q, Lu D. Effect of curcumin on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi.* 2009; 25(1): 112-7.

18- Tsai F-S, Peng W-H, Wang W-H, et al. Effects of luteolin on learning acquisition in rats: involvement of the central cholinergic system. *Life Sci.* 2007; 80(18): 1692-8.

19- Mirhydar H. Encyclopedia of plants: indications of plants in the prevention and treatment of diseases. Islamic Farhang: Tehran; 1998; 2: 163-4.

20- Hosseinzadeh H, Ramezani, M. and Namjo, N. Muscle relaxant activity of Elaeagnus angustifolia L. fruit seeds in mice. *J Ethnopharmacol.* 2003; 84(2-3): 275-8.

21- Ahmadiani A HJ, Semnanian S, Javan M, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Elaeagnus angustifolia fruit extract. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72(1-2): 287-92.

22- Ayaz FA, Bertoft E. Sugar and phenolic acid composition of stored commercial oleaster fruits. *J Food Compost Anal.* 2001; 14(5): 505-11.

23- Bhattamisra SK, Singh PN, Singh SK. Effect of standardized extract of Marsilea minuta on learning and memory performance in rat amnesic models. *Pharm Biol.* 2012; 50(6): 766-72.

24- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, et al. Standardization of a propolis extract and identification of the main constituents. *J Pharm Belg.* 1994; 49: 462-8.

25- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation

Archive of SID

www.SID.ir

substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 152-78.

26- EL Omri A, Han J, Kawada K, et al. Luteolin enhances cholinergic activities in PC12 cells through ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Brain Res.* 2012; 1437: 16-25.

27- Peeyush KT, Gireesh G, Jobin M, et al. Neuroprotective role of curcumin in the cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2009; 85(19): 704-10.

28- Yamada N, Hattori A, Hayashi T, et al. Improvement of scopolamine-induced memory impairment by ajoene in the water maze in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 78(4): 787-91.

29- Thal L, Fuld P, Masur D, et al. Oral physostigmine and lecithin improve memory in Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 1983; 13(5): 491-6.

30- Bejar C, Wang R-H, Weinstock M. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999; 383(3): 231-40.

31- Chung JH, Kim M, Kim HK. Green tea polyphenols suppress nitric oxide–induced apoptosis and acetylcholinesterase activity in human neuroblastoma cells. *Nutr Res.* 2005; 25(5): 477-83.

32- Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2009; 610(1): 42-8.

33- Jain NK, Patil C, Kulkarni SK, et al. Modulatory role of cyclooxygenase inhibitors in aging-and scopolamine or lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction in mice. *Behav Brain Res.* 2002; 133(2): 369-76.

34- Lee KW, Kundu JK, Kim SO, et al. Cocoa polyphenols inhibit phorbol ester-induced superoxide anion formation in cultured HL-60 cells and expression of cyclooxygenase-2 and activation of NF-κB and MAPKs in mouse skin in vivo. *J Nutr.* 2006; 136(5): 1150-5.

35- Liang Y-C, Huang Y-T, Tsai S-H, et al. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 1999; 20(10): 1945-52.

Archive of SID

www.SID.ir

The Effect of *Elaeagnus Angustifolia* Water Extract on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats

Tamtaji OR[1], Taghizadeh M[2], Takhtfiroozeh SM[3], Talaei SA[4]

[1]Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Students Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, IR. Iran.

[2]Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, IR. Iran.

[3]Students Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, IR. Iran.

[4]Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, IR. Iran.

Corresponding Author: Talaei SA, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

E-mail: talaei@kaums.ac.ir

Received: 27 Feb 2014 **Accepted:** 26 Jul 2014

Background and Objective: Impaired cognitive function and memory, a characteristic of Alzheimer's disease, can be caused by decreased activity of the cholinergic system. Scopolamine, a muscarinic receptor antagonist, may cause temporary impairment in memory and provide an Alzheimer's disease model. This study was designed to evaluate the effects of water extract of *Elaeagnus Angustifolia* on memory impairment caused by scopolamine.

Materials and Methods: Sixthy male Wistar rats were randomly assigned to 6 groups (n=10 for each group). Four groups received scopolamine (1mg/kg, IP) and water extract of *Elaeagnus Angustifolia* (50, 100, 200 and 400 mg/kg) along with a positive control group (received scopolamine) and a negative control group. Water extract of *Elaeagnus Angustifolia* was administered through gavage every day for 4 weeks. Using Morris water maze (MWM), spatial learning and memory were evaluated.

Results: The present study showed that scopolamine injection leads to impairment of learning and memory of rats in the Morris water test ($P<0.0001$). In addition, *Elaeagnus Angustifolia* water extracts dose-dependently improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in rats ($P<0.0001$). There was no significant difference between groups that received water extract of *Elaeagnus Angustifolia* and negative control group ($P=1$).

Conclusion: Water extract of *Elaeagnus Angustifolia* improves spatial learning and memory induced by scopolamine in rats.

Keywords: Elaeagnus angustifolia, Memory, Scopolamine, Morris water maze, Rats

Archive of SID

www.SID.ir