

## Investigation of the effect of *Ginkgo biloba* leaf extract on spatial memory impairment and hippocampal neuronal loss caused by diabetes induced by streptozotocin in rats

Alimoradian A., PhD<sup>1</sup>, Ghasemi S., BS<sup>2</sup>, Zahiri M., BS<sup>2</sup>, Saeedi A.H., BS<sup>2</sup>, Miladi H., BS<sup>3</sup>, Sadegh M., PhD<sup>4</sup>

1. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Faculty of Paramedicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Department of Pathology, Imam Khomeini Hospital, Arak, Iran.
4. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-86-3417350-(351), m.sadegh@arakmu.ac.ir

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Learning and memory defect occurs following chronic diabetes with uncontrolled blood glucose. Ginkgo leaf extract improves brain blood flow. Also it contains antioxidant components and has shown beneficial effects in neurological diseases. In this study we investigated the effects of Ginkgo leaf extract on spatial memory impairment and hippocampal neuronal loss caused by diabetes.

**Material and Methods:** This experimental study included 28 adult male Sparague-Dawley rats. The rats were made diabetic by injection of streptozotocin (STZ: 60 mg/kg). Ginkgo leaf extract (40 mg/kg) was administrated orally every day for two weeks and its effects on memory impairment and hippocampal tissue damage were investigated. Spatial memory was assessed in Morris water maze for four days. Then, the brains of the animals were extracted and after tissue staining hippocampal tissue damage were evaluated by neuronal count.

**Results:** Latency to find the platform in water maze were significantly increased in STZ group compared to that in the control group ( $p < 0.05$ ). While, administration of the Ginkgo extract in STZ injected animals significantly reduced the latency to find the platform ( $p < 0.05$ ). In addition, STZ reduced hippocampal neuronal count ( $p < 0.001$ ) and administration of the Ginkgo extract in STZ injected animals significantly improved hippocampal neuronal loss ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** Ginkgo leaf extract significantly improved spatial memory impairment and hippocampal neuronal loss, induced by diabetes.

**Keywords:** Learning, Morris water maze, Neuronal count, Neuropathy.

**Received:** Dec 8, 2017    **Accepted:** Apr 9, 2018

## بررسی اثر عصاره برگ جینکوبیلوبا (*Ginkgo biloba*) بر اختلال حافظه فضایی و آسیب نورونی هیپوکمپ ناشی از دیابت ایجاد شده با استرپتوزوسین در موشهای صحرایی

عباس علیمرادیان<sup>۱</sup>، سعید قاسمی<sup>۱</sup>، محمد ظهیری<sup>۱</sup>، امیرحسین سعیدی<sup>۱</sup>، حسین میلادی<sup>۱</sup>، مهدی صادق<sup>۲</sup>

۱. دکترا فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک

۲. دانشجو کارشناسی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک

۳. کارشناس گروه پاتولوژی، بیمارستان امام خمینی اراک، اراک

۴. دکترا فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، نویسنده مسئول، تلفن ثابت: (۰۳۵۱) ۳۴۱۷۳۵-

m.sadegh@arakmu.ac.ir.۰۸۶

### چکیده

**زمینه و هدف:** اختلال یادگیری و حافظه در پی دیابت مزمن با قند خون کنترل نشده رخ می دهد. عصاره برگ جینکو جریان خون مغز را بهبود می دهد. همچنین دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی می باشد، بنابراین اثرات مفیدی در بیماریهای عصبی نشان داده است. در مطالعه حاضر کارآیی عصاره برگ جینکو در اختلال حافظه و آسیب نورونی هیپوکمپ ناشی از دیابت بررسی شده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد Spargue-Dawley استفاده شد. مدل دیابت با تزریق استرپتوزوسین (STZ: ۶۰ mg/kg; i.p) ایجاد گردید. عصاره برگ جینکو (۴۰ mg/kg) بصورت خوراکی روزانه و به مدت دو هفته به حیوانات داده شد و اثرات آن در جبران اختلال حافظه و آسیب بافت هیپوکمپ بررسی گردید. حافظه فضایی در مازآبی موریس طی چهار روز اندازه گیری شد، سپس مغز حیوانات استخراج و بعد از رنگ آمیزی بافتی میزان آسیب بافت هیپوکمپ با شمارش نورونی بررسی گردید.

**یافته ها:** زمان پیدا کردن سکو در مازآبی در گروه STZ در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشت ( $p < 0/05$ ) درحالیکه تجویز عصاره جینکو در حیواناتی که STZ دریافت کرده اند، سبب کاهش معنادار زمان رسیدن به سکو شد ( $0/05 < p$ ). بعلاوه STZ باعث کاهش شمارش نورونی هیپوکمپ شد ( $0/01 < p$ ) و تجویز عصاره جینکو در گروه STZ سبب بهبود اثرات STZ در کاهش نورونی گردید ( $0/01 < p$ ).

**نتیجه گیری:** عصاره برگ جینکو اختلال حافظه ناشی از دیابت و همچنین کاهش شمارش سلولی ناشی از دیابت را بصورت معناداری جبران کرد.

**کلیدواژه ها:** نوروپاتی، یادگیری، ماز آبی موریس، شمارش نورونی

وصول مقاله: ۹۶/۹/۱۷ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۱۲/۲۲ پذیرش: ۹۷/۱/۲۰

## مقدمه

تغییر فرآیندهای متابولیسمی در پی دیابت شیرین و قند خون کنترل نشده سبب ایجاد شرایط پاتولوژیک و پاتوفیزیولوژیک در بافتهای بدن می شود. اختلالات قلب و عروق، کلیوی و نقص عملکردهای سیستم عصبی از جمله عوارض طولانی مدت دیابت کنترل نشده است (۱). نوروپاتی سیستم عصبی مرکزی و محیطی در پی دیابت کنترل نشده در شرایط بالینی و در مدل های آزمایشگاهی نشان داده شده است (۲). بررسی ها نشان می دهد که عملکردهای شناختی مغز از جمله یادگیری و حافظه در موارد دیابت طولانی مدت همراه با قند خون کنترل نشده دچار اختلال می شود (۳ و ۴). همچنین یافته ها نشان می دهد که افراد مبتلا به دیابت شیرین و افراد چاق مستعد ابتلا به دیابت شیرین ۷۵ درصد بیشتر از افراد طبیعی در خطر ابتلا به آلزایمر هستند (۵ و ۷). به نظر می رسد تغییرات کنترل نشده قند خون و در پی آن اختلال در متابولیسم گلوکز، چربی و پروتئین مسیرهای داخل سلولی را فعال می کند که منجر به روندهای آپوپتوزی و آسیب سلولی می شوند (۸ و ۹). از جمله آنزیمهای دخیل در استرس اکسیداتیو و عوامل سیستم آنتی اکسیدانی در دیابت با قند خون کنترل نشده دستخوش تغییر می شود (۱۰ و ۱۱). همچنین آسیب اندوتلیال عروق و اختلال خونرسانی نیز بعنوان مکانیسمهای شروع روندهای آپوپتوزی و در نتیجه آسیب بافتی معرفی شده اند (۱). آسیب سد خونی- مغزی در پی دیابت نشان داده شده است (۱۲).

هیپوکمپ ساختار مغزی مهمی در عملکردهای شناختی بویژه حافظه و یادگیری می باشد. آسیب نورونی در بافت هیپوکمپ و اختلال در حافظه و یادگیری ناشی از آن در مدل دیابتی نشان داده شده است (۹).

استرپتوزوسین ماده شیمیایی مصنوعی می باشد که با تخریب سلولهای بتا در پانکراس سبب کاهش و یا عدم تولید و رهایش انسولین می شود. فقدان انسولین و در پی آن عدم تنظیم قند خون مدل آزمایشگاهی مناسبی را برای بررسی بیماری دیابت ایجاد می کند. بررسی ها نشان می دهد که حیوانات که بر اثر تزریق استرپتوزوسین دچار دیابت کنترل نشده هستند بعد از مدتی اختلال در عملکرد حافظه و یادگیری را نشان می دهند (۱۳).

جینکو بیلوبا (*Ginkgo biloba*) گیاهی با قدمت طولانی در طب سنتی آسیا می باشد. به دلیل اثرات عصاره این گیاه در افزایش جریان خون بافتهای مختلف بدن، کاربرد آن اثرات مثبتی را در بیماران دیابتی نشان داده است، بویژه اینکه آسیب عروق خونی و اختلال جریان خون در بیماران دیابتی از جمله دلایل مهم آسیب های بافتی می باشد (۱۴ و ۱۵). بدلیل ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در عصاره گیاه می تواند در جهت تقویت سیستم آنتی اکسیدانی بدن و مقابله با اثرات رادیکالهای آزاد تولید شده از متابولیسم غیرطبیعی گلوکز و چربیها موثر باشد (۱۶ و ۱۷). استفاده از عصاره این گیاه جریان خون را در بافت مغز بهبود می دهد و اثرات استرس بر سطح میانجی های عصبی را تعدیل می کند (۱۸)، همچنین اثرات منفی استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت در بافت مغز را جبران می کند (۱۹). اثرات مثبت عصاره این گیاه در بهبود اختلالات حافظه نشان داده شده است (۲۰ و ۲۱).

در مطالعه حاضر، هدف بررسی کارایی عصاره جینکو در جبران اختلال حافظه و آسیب نورونی هیپوکمپ ناشی از دیابت کنترل نشده است. برای این منظور مدل دیابت با تزریق استرپتوزوسین به موشهای صحرایی

ایجاد شد. بررسی حافظه در ماز آبی انجام گردید. همچنین بررسی آسیب بافتی هیپوکمپ انجام شد. سپس اثر عصاره گیاه جینکو در جبران اختلال حافظه و آسیب بافتی ناشی از دیابت بررسی شد.

## روش بررسی

حیوانات:

در این مطالعه تجربی ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد Spargue-Dawley در محدوده سن ۱۲-۱۰ هفته بطور تصادفی به چهار گروه ( $n = 7$ ) تقسیم شدند. حیوانات در شرایط دمایی استاندارد ( $22-25^{\circ}\text{C}$ ) و  $12$  ساعت تاریکی- $12$  ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا قرار گرفتند. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق مصوبات کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک رعایت شد.

ایجاد مدل دیابت و گروههای آزمایش:

استرپتوزوتوسین ( $60\text{ mg/kg}$ ) ( $22$ ) بصورت محلول در نرمال سالین ( $0.9\%$ ) بصورت داخل صفاقی (i.p.) به حیوانات تزریق شد. برای اثرگذاری بیشتر تزریق در وضعیت ناشتا انجام شد. بنابراین حیوانات دریافت کننده استرپتوزوسین از ساعت  $12$  شب قبل تا زمان تزریق بدون دسترسی به غذا بودند.  $72$  ساعت بعد از تزریق قند خون حیوانات اندازه گیری شد و حیوانات با قند خون بالای  $200\text{ mg/dl}$  بعنوان حیوان دیابتی وارد آزمایش شدند. حیوانات با قند خون پایین تر مجدداً استرپتوزوتوسین دریافت کردند و بعد از  $72$  ساعت مجدد قند خون اندازه گیری شد. عصاره جینکو از شرکت گل دارو تهیه و با دوز ( $60\text{ mg/kg}$ ) ( $23$ ) به روش گاواژ خوراکی به حیوانات تجویز شد. گروه های آزمایش بصورت زیر بودند: (۱) گروه دیابتی

(STZ)، (۲) گروه کنترل (Control)، (۳) گروه دریافت کننده جینکو (Ginkgo) و (۴) گروه دیابتی دریافت کننده جینکو (Ginkgo+STZ).

بررسی حافظه فضایی:

حافظه فضایی با استفاده از ماز آبی موریس و دو هفته بعد از تزریق STZ و تجویز عصاره Ginkgo انجام شد. ماز آبی موریس یک حوضچه استوانه ای با سطح داخلی سیاه رنگ (قطر  $140$  و ارتفاع  $80$  سانتی متر) است و تا ارتفاع  $40$  سانتی متر آن با آب ( $22^{\circ}\text{C}$ ) پر می شود. یک سکوی با قطر  $10$  سانتی متر که یک سانتیمتر زیر سطح آب است در مرکز یکی از ربع ها آن قرار داشت. یک دوربین متصل به کامپیوتر در بالای حوضچه طوریکه قرار داشت که بتواند کل فضای داخل استوانه را فیلم برداری و در کامپیوتر ذخیره کند. هر موش چهار بار هر بار به طور تصادفی از یکی از ربع های حوضچه بداخل آب آزاد شده و زمان پیدا کردن سکو ثبت می شود. آزمون به مدت چهار روز تکرار می شد. محل سکو در طی چهار روز ثابت بود بنابراین تکرار آزمونها در طی روزهای متوالی سبب یادگیری محل سکو و در نتیجه کوتاه شدن زمان یافتن سکو می شود. حیوانات  $60$  ثانیه فرصت داشتند محل سکو را پیدا کنند سپس  $30$  ثانیه به حیوانات فرصت داده می شد روی سکو برای بررسی موقعیت فضایی و یادگیری بمانند. موش هایی که محل سکو را پیدا نمی کردند توسط آزمایشگر به روی سکو منتقل می شدند. فاصله بین چهار آزمون روزانه  $10$  دقیقه بود در این فاصله حیوانات خشک و در محل دمایی مناسب نگهداری می شدند. در روز پنجم آزمایش سکو از حوضچه خارج می شد و یکبار حیوان بصورت تصادفی بداخل حوضچه

کردن سکو (Latency) بودند (نمودار ۱) با آزمون Repeated Measured و سپس آزمون تکمیلی Bonferroni تحلیل آماری شدند و داده های روز پنجم مازآبی (نمودار ۲) بین گروههای آزمایشی با آزمون One-way ANOVA و سپس آزمون تکمیلی Bonferroni مورد مقایسه قرار گرفتند. داده های شمارش نورونی (نمودار ۳) که از نوع غیرپارامتریک بودند با آزمون Kruskal-Wallis و آزمون تکمیلی Dunns مقایسه آماری شدند. داده ها به صورت  $Mean \pm SEM$  ارائه شده اند و  $P < 0.05$  شاخص معناداری قرار گرفت. تعداد ۷ سر حیوان در هر گروه وجود داشت.

#### یافته ها

بررسی اثر عصاره جینکو در آسیب حافظه فضایی ناشی دیابت ایجاد شده با STZ:

میانگین زمان تاخیر (Latency) روزانه در گروههای آزمایشی محاسبه و طی چهار روز آموزش بین گروههای آزمایشی مورد تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد که زمان رسیدن تا سکو (نمودار ۱) در همه گروههای آزمایشی طی روند چهار روزه آموزش و یادگیری سیر کاهشی داشت. به عبارتی با تکرار آزمون طی روزهای آزمایش حیوانات همه گروههای آزمایشی محل سکو را یاد می گیرند و زمان و مسافت کمتری برای یافتن آن صرف می کنند. با این حال مقایسه این روند یادگیری به صورت دو به دو بین گروههای آزمایشی نشان داد برخی گروهها با هم تفاوتی معناداری دارند. مقایسه بین گروهها با آزمون تکمیلی Bonferroni نشان داد که حیوانات دیابتی دریافت کننده STZ در مقایسه با حیوانات گروه کنترل

آزاد می شد. مدت زمان اولین عبور از محل سکو بعنوان شاخص بخاطر آوری محاسبه می شد (۲۴).

بررسی بافت شناسی:

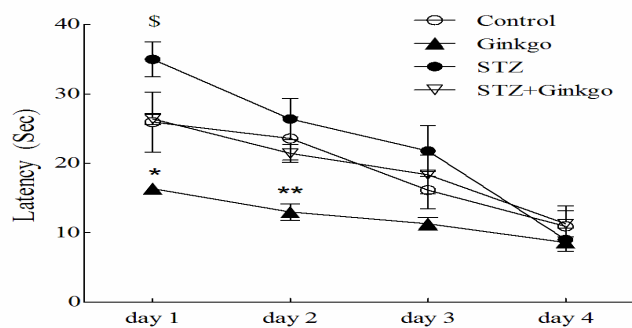
بعد از آزمون حافظه همه حیوانات گروههای آزمایشی با تزریق مخلوط کتامین (۶۰ mg/kg) / زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش و بصورت ترانس کاردیال ابتدا با نرمال سالین و سپس با محلول پارافرمالدئید (۴٪) پرفیوژن شدند. مغز حیوانات بعد از باز کردن جمجمه استخراج و در پارافرمالدئید ۴٪ تثبیت و نگهداری شد. با استفاده از دستگاه میکروتوم برشهای کرونال و سریالی با ضخامت ۵ میکرون از بافت مورد نظر تهیه شد، بطوریکه که تمام محدوده ناحیه هیپوکمپ را شامل شود. سپس بمنظور شمارش تعداد نورونها ناحیه هیپوکمپ، رنگ آمیزی نیسل انجام شد. تصاویر دیجیتال با استفاده از میکروسکوپ دوربین دار متصل به کامپیوتر گرفته و ذخیره شد. با استفاده از نرم افزار Olisia Bio Report ناحیه CA1 هیپوکمپ راست و چپ به نواحی کوچکتر و مساوی (۳۰۰ × ۳۰۰ × ۵ میکرون) تقسیم شد سپس شمارش نورونی در پنج عدد از این نواحی انجام شد. از هر حیوان ۵ برش انتخاب و به این روش شمارش در هر ۵ برش انجام شد. میانگین شمارش های انجام شد برای برشهای هر حیوان محاسبه و برای مقایسه آماری گروهها استفاده شد (۲۵).

تحلیل آماری:

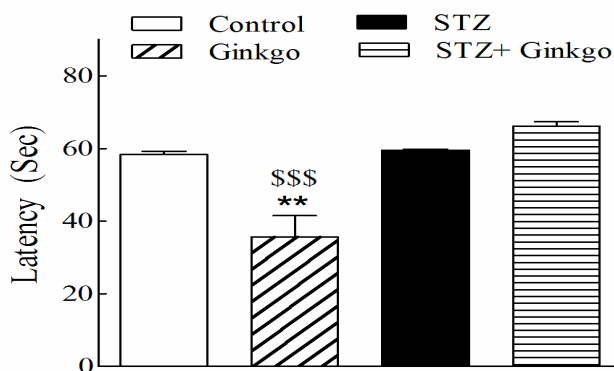
از نرم افزار آماری GraphPad Prism برای تحلیل آماری استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون D'Agostino-Pearson normality test استفاده شد. داده های آزمون مازآبی که توزیع نرمال داشتند با آزمونهای پارامتریک مقایسه شدند. داده های چهار روز یادگیری در ماز آبی که شامل زمان پیدا

زمان بیشتری را برای رسیدن به سکو صرف می کنند. بطوریکه در روز اول این تفاوت معنادار بود ( $p < 0/05$ ). بعلاوه تجویز عصاره جینکو در حیواناتی که STZ دریافت کرده اند، سبب جبران اثرات STZ بر روی یادگیری فضایی شد. بطوریکه تفاوت معناداری بین حیوانات گروه کنترل و حیوانات دیابتی دریافت کننده عصاره جینکو وجود نداشت ( $p > 0/05$ ). همچنین تجویز عصاره جینکو به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را زمان رسیدن به سکو در روزهای اول ( $p < 0/05$ ) و دوم ( $p < 0/01$ ) یادگیری آزمون ایجاد کرد (نمودار ۱). در روز پنج آزمون بخاطر آوری حافظه بدون حضور سکو انجام شد. میانگین تاخیر زمانی اولین عبور از محل پیشین سکو بعنوان شاخص بخاطر آوری حافظه فضایی در نظر گرفته شد (نمودار ۲). تحلیل آماری نشان داد که حیوانات دیابتی دریافت کننده STZ در مقایسه با حیوانات گروه کنترل تفاوت معناداری را بخاطر آوری حافظه فضایی نشان نمی دهند ( $p > 0/05$ ). بعلاوه تجویز عصاره جینکو به حیوانات دیابتی تفاوت معناداری با گروه کنترل و همچنین گروه STZ ایجاد نمی کند ( $p > 0/05$ ). با این حال حیواناتی که فقط عصاره جینکو را دریافت کرده بودند در مقایسه با حیوانات گروه کنترل و همچنین در مقایسه با گروه

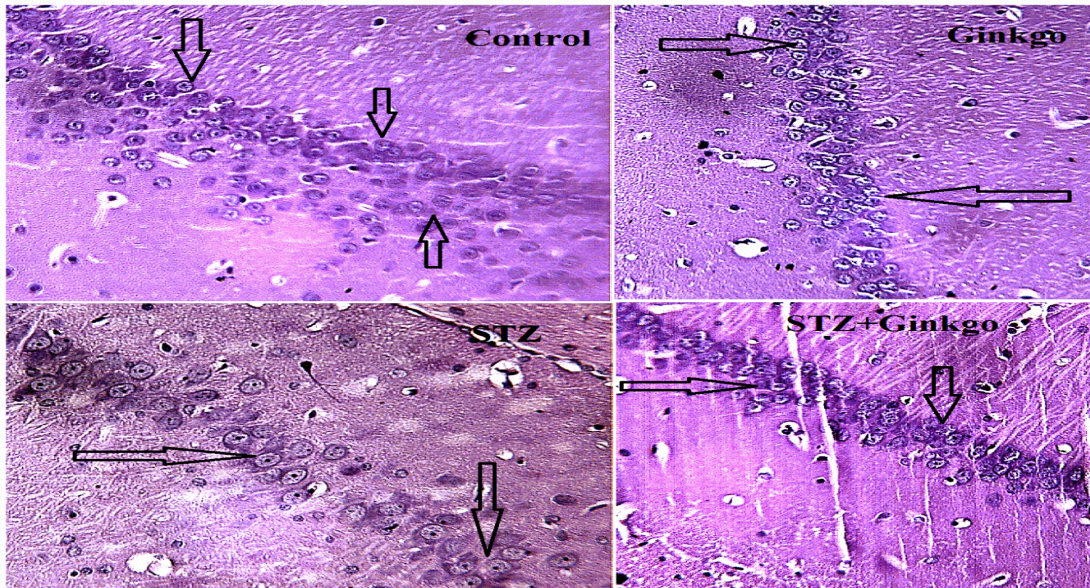
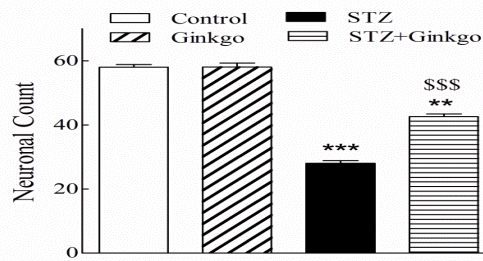
STZ، بصورت معناداری میانگین زمانی کمتری برای اولین عبور از محل سکو نشان دادند ( $p < 0/001$ ). مقایسه گروه Ginkgo با گروه کنترل، ( $p < 0/01$ ) مقایسه گروه Ginkgo با گروه STZ (نمودار ۲). بررسی اثر عصاره جینکو در جبران اثرات STZ در کاهش شمارش نورونی هیپوکمپ: نتایج مقایسه آماری داده های شمارش نورونی بافت هیپوکمپ نشان داد که STZ باعث کاهش شمارش نورونی هیپوکمپ و در نتیجه آسیب بافتی هیپوکمپ می شود (نمودار و شکل ۳). بطوریکه شمارش نورونی در گروه دیابتی که STZ دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل بطور معنادار کاهش نشان داد ( $p < 0/001$ ). بعلاوه تجویز عصاره جینکو در گروه دیابتی سبب بهبود تخریب نورونی و جبران اثرات STZ شده است ( $p < 0/001$ ). با این حال اگرچه گروه دیابتی دریافت کننده عصاره جینکو افزایش معناداری در شمارش نورونی نسبت به گروه STZ نشان می دهد اما همچنان در مقایسه با گروه کنترل شمارش نورونی کاهش معناداری را نشان داد ( $p < 0/01$ ).



نمودار ۱. عصاره جینکو سبب بهبود اختلال حافظه فضایی ناشی از STZ شد. میانگین زمان پیدا کردن سکو در ماز آبی مورس در طی چهار روز آزمایش نشان داده شده است. در همه گروههای آزمایش میانگین مسافت طی شده تا سکو طی روزهای آزمایش به تدریج کاهش یافته است که بیانگر ایجاد حافظه فضایی طی چهار روز تمرین می باشد. مقایسه بین گروهها طی روزهای یادگیری با آزمون آماری Two-way ANOVA Repeated Measured و آزمون تکمیلی Bonferroni نشان داد که گروه دریافت کننده STZ مسافت بیشتری را برای رسیدن به سکو طی می کنند بطوریکه در روز اول این تفاوت معنادار بود ( $p < 0.05$ ). تجویز جینکو در حیوانات دیابتی سبب جبران اثرات STZ شد بطوریکه تفاوت معناداری بین حیوانات گروه کنترل و حیوانات دیابتی دریافت کننده جینکو وجود نداشت. همچنین تجویز جینکو به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را زمان رسیدن به سکو در روزهای اول و دوم یادگیری آزمون ایجاد کرد ( $p < 0.05$  برای روز اول و  $p < 0.01$  برای روز دوم). داده ها بصورت  $Mean \pm SEM$  ارائه شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ سر می باشد. \$ مقایسه گروه STZ با گروه کنترل، \* و \*\* مقایسه گروه Ginkgo با گروه کنترل را نشان می دهند.



نمودار ۲. جینکو بخاطرآوری حافظه فضایی را در روز پنجم افزایش داد. میانگین تاخیر زمانی اولین عبور از محل سکو در روز پنجم (ماز بدون سکو) نشان داده شده است. مقایسه داده ها با آزمون آماری One-way ANOVA و آزمون تکمیلی Bonferroni نشان داد که اگرچه STZ تغییر معناداری در بخاطرآوری حافظه در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نمی کند اما تجویز جینکو به تنهایی سبب کاهش معنادار میانگین زمان یافتن سکو در مقایسه با گروه کنترل می شود ( $p < 0.01$  و  $p < 0.001$ ). داده ها بصورت  $Mean \pm SEM$  ارائه شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ سر می باشد. \$\$\$ مقایسه گروه Ginkgo با گروه STZ، \*\* مقایسه گروه Ginkgo با گروه کنترل را نشان می دهند.



نمودار و شکل ۳. جینکو اثرات STZ در کاهش شمارش نورونی را جبران کرد. میانگین شمارش نورونی در نمونه های بافتی هر گروه در نمودار نشان داده شده است. مقایسه داده ها با آزمون آماری با آزمون Kruskal-Wallis و آزمون تکمیلی Dunns نشان داد که شمارش نورونی در گروه STZ در مقایسه با گروه کنترل بطور معنادار کاهش می یابد ( $p < 0/001$  \*\*\*). اگرچه گروه دیابتی دریافت کننده جینکو افزایش معناداری در شمارش نورونی نسبت به گروه STZ نشان می دهد ( $p < 0/001$  \$\$\$) اما همچنان در مقایسه با گروه کنترل کاهش شمارش نورونی معنادار است ( $p < 0/01$  \*\*). همچنین تصاویر برش بافت CA1 هیپوکمپ در گروههای آزمایشی بعنوان نمونه ارائه شده است، نوک فلش ها در تصویر بیانگر محل حضور جسم سلولی نورونها می باشد. همانطور که در تصویر دیده می شود در نمونه ارائه شده از گروه STZ تراکم جسم سلولی های قابل شمارش کم شده در حالیکه گروه دیابتی دریافت کننده جینکو تراکم نورونی به گروه کنترل شبیه تر است داده ها بصورت  $Mean \pm SEM$  ارائه شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ سر می باشد. \* مقایسه با گروه کنترل و \$\$\$ مقایسه گروه STZ را نشان می دهد.

## بحث

آسیب سلولها و آسیب عروق حمایت کننده سبب شروع روندهای مرگ سلولی می شود و استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان می تواند در جبران یا بهبود این آسیبها موثر باشد (۱۵ و ۲۶). آسیب و مرگ نورونی هیپوکمپ در مدل دیابت شیرین نشان داده شده است (۹)، در همین راستا نتایج مطالعه ما نیز نشان دهنده کاهش در شمارش نورونی هیپوکمپ گروه دیابتی بود.

نتایج بررسی ما در راستای مطالعات قبلی نشان داد که دیابت شیرین و قند خون کنترل نشده سبب اختلال حافظه و یادگیری می شود که ناشی از اختلال در متابولیسم گلوکز می باشد (۳). نشان داده شده است که اختلال در متابولیسم گلوکز سبب افزایش رادیکالهای آزاد در بافتها بویژه بافتهای عصبی می شود. در پی آن



نیز نقش مهمی دارند. بنابراین در صورتی که عصاره برگ جینکو حاوی ترکیباتی باشد که بر سطح این میانجی ها تاثیر گذار باشد، احتمال اثرگذاری آن بر مکانیسمهای یادگیری و حافظه نیز وجود دارد.

مطالعات نشان داده اند که اختلال روندهای متابولیسم ناشی از هایپرگلیسمی کنترل نشده سبب اختلال فرایندهای سلولی بویژه در نورونها می شود. تغییر عملکرد آنزیمها و سیستمهای آنتی اکسیدانی رخ می دهد (۳۲). همچنین اندوتلیال عروق خونی در بافتهای عصبی دچار آسیب می شود که نتیجه آن اختلال در خونرسانی بافت عصبی می شود (۳۳). از طرفی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد آپوپتوزی ترکیبات عصاره جینکو نشان داده شده است (۳۴). بررسی نشان می دهد عصاره جینکو سبب بهبود عملکرد سوپراکسیددسموتاز در اندوتلیال عروق شده و آپوپتوز سلولهای زایا در این بافت را مهار می کند. در نتیجه عملکرد عروقی در شرایط دیابت بهبود می یابد (۳۵ و ۱۶). حتی گزارشها بیانگر بهبود در بخش اندوکراین پانکراس طی درمان با عصاره جینکو است (۳۶). یافته های حاصل از بررسی ما نیز بصورت هم راستایی اثرات حفاظتی عصاره برگ جینکو را در بافت هیپوکمپ نشان داد و مشخص شد که میزان مرگ نورونی ناشی از دیابت ایجاد شده با STZ در گروه دریافت کننده عصاره برگ جینکو کاهش می یابد و همزمان با این کاهش آسیب نورونی هیپوکمپ، عملکرد حافظه فضایی نیز بهبود نشان داد. بنابراین احتمال دارد عصاره جینکو روندهای اکسیداتیو و آنزیمی مخربی که در پی هیپرگلیسمی کنترل نشده رخ می دهند را مهار کرده باشد و یا از آسیب اندوتلیال عروق در بافت مغز و هیپوکمپ جلوگیری کرده باشد،

بعلاوه نتایج ما نشان داد عصاره برگ جینکو قادر است هم اختلال یادگیری ناشی از دیابت را جبران نماید و هم سبب جبران یا احتمالاً باعث مهار روندهایی شود که نتیجه آنها کاهش شمارش نورونهای هیپوکمپ می باشد.

مطالعات قبلی نشان داده بود که ترکیبات موجود در عصاره جینکو سبب بهبود اختلال حافظه ناشی از افزایش سن می شود (۲۷). از سوی دیگر نشان داده شده است که ترکیبات موجود در عصاره گیاه سبب تسهیل رهایش گلوتامات در پایانه های سیناپسی هیپوکمپ می شود (۲۸). نتیجه یک بررسی دیگر نشان داد ترکیبات مستخرج از عصاره جینکو بعنوان آنتاگونیست رقابتی گیرنده های مهاری  $GABA_A$  عمل می کنند (۲۹). با توجه به اهمیت زیاد این دو میانجی عصبی در وقایع سیناپسی و عملکرد نورونهای نواحی قشری مغز از جمله هیپوکمپ بنابراین ممکن است نتایج ما در بهبود عملکرد حافظه فضایی می تواند ناشی از افزایش سطح گلوتامات یا تعدیل اثرات مهاری گیرنده های  $GABA_A$  در هیپوکمپ باشد که می تواند در مطالعات بعدی مد نظر قرار گیرد.

همچنین مطالعات در خصوص اثرات ضد افسردگی عصاره برگ جینکو نشان می دهد که تجویز مزمن این عصاره سبب افزایش سطح سروتونین و همچنین دوپامین در نواحی قشری مغز می شود. به نظر می رسد ترپنوئیدها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره برگ این گیاه از طریق مهار مونوآمینواکسیدازو افزایش سطح این دو میانجی عصبی حداقل سبب بخشی از اثرات ضد افسردگی گیاه می شوند (۳۰ و ۳۱). دوپامین و سروتونین علاوه بر تنظیم مکانیسمهای مرتبط با خلق و خو که با افسردگی مرتبط می باشد، در فرآیندهای شناختی مغز

که اثبات نقش این مکانیسمهای احتمالی نیاز به آزمایشهای دقیق دارد.

بنابراین با تکیه بر شواهد ارائه شده از مطالعات قبلی و یافته های بررسی حاضر، به نظر می رسد ترکیبات موجود در عصاره جینکو می توانند براساس عملکرد آنتی اکسیدانی در سطح سلول و بافت سیستم عصبی اثر کرده و نقش حفاظتی را در برابر آسیبهای ناشی از اختلال متابولسیم گلوکز در شرایط دیابت اجرا کنند. این پیامد ممکن است بصورت مستقیم ناشی از حفاظت خود بافت عصبی توسط ترکیبات موجود در عصاره باشد یا ناشی از اثر این ترکیبات در بهبود آسیب عروق بافت عصبی و ممانعت از اختلال خونرسانی به بافت عصبی در شرایط دیابت باشد. این احتمال نیز وجود دارد که هر دو شرایط ذکر شده بصورت مکمل در جهت هم افزا عمل کرده و کارآیی عصاره جینکو را افزایش دهند. به نظر می رسد ترکیباتی در عصاره جینکو وجود دارد که قادر هستند بر سطوح میانجی های عصبی در مغز اثر کرده و با تغییر میزان رهایش

میانجی ها یا تغییر در پاسخ دهی به میانجی ها بر عملکردهای سیناپسی و نورونی اثر کنند و در شرایط آسیب عصبی ناشی از دیابت شیرین به مهار روندهای آسیب زا یا کمک به بهبود آسیب کمک کنند.

### نتیجه گیری

نتایج بررسی حاضر کارآیی عصاره برگ جینکو در بهبود اختلال حافظه فضایی ناشی از دیابت کنترل نشده را نشان داد. همچنین نشان داد عصاره جینکو از کاهش نورنهای هیپوکمپ در پی دیابت و قند خون کنترل نشده جلوگیری می کند.

### تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد. تضاد منافع مالی و غیرمالی در خصوص این پژوهش برای نویسندگان مقاله وجود ندارد.

### References

1. Van Dam PS, Cotter MA, Bravenboer B, Cameron NE. Pathogenesis of diabetic neuropathy: focus on neurovascular mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2013; 719: 180-6.
2. Said G. Diabetic neuropathy--a review. *Nat Rev Neurol* 2007; 3: 331.
3. Hoyer S. Memory function and brain glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36: 62-7.
4. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 2000; 23: 542-9.
5. Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP, Jr Yaffe K. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ* 2005; 330: 1360.
6. Wang XF, Lin X, Li DY, Zhou R, Greenbaum J, Chen YC, et al. Linking Alzheimer's disease and type 2 diabetes: Novel shared susceptibility genes detected by cFDR approach. *J Neurol Sci* 2017; 380: 262-72.
7. Kamal MA, Priyamvada S, Anbazhagan AN, Jabir NR, Tabrez S, Greig NH. Linking Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus via aberrant insulin signaling and inflammation. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014; 13: 338-46.
8. Mushtaq G, Khan JA, Kamal MA. Biological mechanisms linking Alzheimer's disease and type-2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014; 13: 1192-201.

9. Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AA. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 2002; 946: 221-31.
10. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003; 165: 52-71.
11. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 368-83.
12. Said G, Lacroix C, Lozeron P, Ropert A, Planté V, Adams D. Inflammatory vasculopathy in multifocal diabetic neuropathy. *Brain* 2003; 126: 376-85.
13. Magarinos AM, McEwen BS. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11056-61.
14. Wu Y, Li S, Cui W, Zu X, Du J, Wang F. Ginkgo biloba extract improves coronary blood flow in healthy elderly adults: role of endothelium-dependent vasodilation. *Phytomedicine* 2008; 15: 164-9.
15. Tian J, Liu Y, Chen K. Ginkgo biloba Extract in Vascular Protection: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Curr Vasc Pharmacol* 2017; 15: 532-48.
16. Zhao M, Wang XX, Wan WH. Effects of the ginkgo biloba extract on the superoxide dismutase activity and apoptosis of endothelial progenitor cells from diabetic peripheral blood. *Genet Mol Res* 2014; 13: 220-7.
17. He YT, Xing SS, Gao L, Wang J, Xing QC, Zhang W. Ginkgo biloba attenuates oxidative DNA damage of human umbilical vein endothelial cells induced by intermittent high glucose. *Pharmazie* 2014; 69: 203-7.
18. Shah ZA, Sharma P, Vohora SB. Ginkgo biloba normalises stress-elevated alterations in brain catecholamines, serotonin and plasma corticosterone levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: 321-5.
19. Loffler T, Lee SK, Noldner M, Chatterjee SS, Hoyer S, Schliebs R. Effect of Ginkgo biloba extract (EGb761) on glucose metabolism-related markers in streptozotocin-damaged rat brain. *J Neural Transm (Vienna)* 2001; 108: 1457-74.
20. Nooshinfar E, Rezaei Tavirani M, Safaei A, Tambrchi Y. The Effect of Ginkgo on Baclofen Induced Amnesia using Passive Avoidance Learning and Memory in Rats. *J Fasa Univ Med Sci* 2015; 5: 62-8. [In Persian]
21. Charembon T, Jaisin K. Ginkgo biloba for prevention of dementia: a systematic review and meta-analysis. *J Med Assoc Thai* 2015; 98: 508-13.
22. Cheng D, Liang B, Li Y. Antihyperglycemic effect of Ginkgo biloba extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 162724.
23. Saini AS, Taliyan R, Sharma PL. Protective effect and mechanism of Ginkgo biloba extract-EGb 761 on STZ-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Pharmacogn Mag* 2014; 10: 172-8.
24. Sadegh M, Fathollahi Y, Naghdi N, Semnianian S. Morphine deteriorates spatial memory in sodium salicylate treated rats. *Eur J Pharmacol* 2013; 704: 1-6.
25. Tae HJ, Kang IJ, Lee TK, Cho JH, Lee JC, Shin MC, et al. Neuronal injury and tumor necrosis factor-alpha immunoreactivity in the rat hippocampus in the early period of asphyxia-induced cardiac arrest under normothermia. *Neural Regen Res* 2017; 12: 2007-13.
26. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 537: 106-10.
27. Zuo W, Yan F, Zhang B, Li J, Mei D. Advances in the Studies of Ginkgo Biloba Leaves Extract on Aging-Related Diseases. *Aging Dis* 2017; 8: 812-26.

28. Wang SJ, Chen HH. Ginkgolide B, a constituent of Ginkgo biloba, facilitates glutamate exocytosis from rat hippocampal nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 2005; 514: 141-9.
29. Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GA. Bilobalide, a sesquiterpene trilactone from Ginkgo biloba, is an antagonist at recombinant  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* 2003; 464: 1-8.
30. Kalkunte SS, Singh AP, Chaves FC, Gianfagna TJ, Pundir VS, Jaiswal AK, et al. Antidepressant and antistress activity of GC-MS characterized lipophilic extracts of Ginkgo biloba leaves. *Phytother Res* 2007; 21: 1061-5.
31. Yoshitake T, Yoshitake S, Kehr J. The Ginkgo biloba extract EGb and its main constituent flavonoids and ginkgolides increase extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 659-68.
32. Wu T, Qiao S, Shi C, Wang S, Ji G. Metabolomics window into diabetic complications. *J Diabetes Investig* 2018; 9: 244-55.
33. Khalil H. Diabetes microvascular complications-A clinical update. *Diabetes Metab Syndr* 2017; 11: S133-S9.
34. Li Y, Zhang Y, Wen M, Zhang J, Zhao X, Zhao Y, et al. Ginkgo biloba extract prevents acute myocardial infarction and suppresses the inflammation and apoptosis-regulating p38 mitogen-activated protein kinases, nuclear factor kappa B and B cell lymphoma 2 signaling pathways. *Mol Med Rep* 2017; 16: 3657-63.
35. Wang C, Wang B. Ginkgo Biloba Extract Attenuates Oxidative Stress and Apoptosis in Mouse Cochlear Neural Stem Cells. *Phytother Res* 2016; 30: 774-80.
36. Rhee KJ, Lee CG, Kim SW, Gim DH, Kim HC, Jung BD. Extract of Ginkgo Biloba Ameliorates Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus and High-Fat Diet-Induced Type 2 Diabetes Mellitus in Mice. *Int J Med Sci* 2015; 12: 987-94.



This document was created with the Win2PDF "print to PDF" printer available at <http://www.win2pdf.com>

This version of Win2PDF 10 is for evaluation and non-commercial use only.

This page will not be added after purchasing Win2PDF.

<http://www.win2pdf.com/purchase/>

Archive of SID