Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره چهارم، تیر ۹۵
صفحه ۱۰ الی ۲۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر لورازپام و عصاره آبی بادرنجبویه بر تغییرات بافتی هیپوکامپ و حافظه فضایی در رت‌های نر

سکینه حیدری‌فر[1*]، مینو ایلخانی‌پور[1]، فرح فرخی[2]، مهدی محمدزاده[1]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

چکیده

زمینه و هدف: مهم‌ترین جایگاه یادگیری و حافظه در مغز، هیپوکامپ است. بادرنجبویه به‌طور طبیعی روی سیستم عصبی تأثیر گذاشته و باعث آرامش می‌شود. لورازپام نیز در درمان بی‌خوابی و اضطراب کاربرد دارد. در این مطالعه اثر لورازپام و عصاره آبی بادرنجبویه بر بافت هیپوکامپ و حافظه فضایی در رت‌های نر به روش ماز شعاعی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۴ سر موش رت نژاد ویستار به‌طور تصادفی در چهار گروه قرار گرفتند. گروه کنترل، آب و غذای معمولی؛ گروه دوم لورازپام (دوز ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) و دو گروه دیگر عصاره بادرنجبویه را (دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) به مدت ۱۸ روز به روش گاواژ دریافت کردند. سپس، حافظه فضایی آنها در ماز شعاعی ۸ بازو مورد ارزیابی قرار گرفت . میزان پراکسیداسیون لیپیدی بافت هموژنه مغز سنجیده شد و از بافت هیپوکامپ، مقاطع بافتی تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با H&E به‌وسیله میکروسکوپ، ناحیه DG بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میزان یادگیری در حیوانات دریافت‌کننده لورازپام با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج آزمایشها، تأثیر مثبت دوز پایین عصاره بادرنجبویه (دوز ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) بر حافظه فضایی را نشان داد، این در حالی بود که دوز بالای بادرنجبویه (دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) از تشکیل حافظه جلوگیری کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد عصاره آبی بادرنجبویه می‌تواند در دوز پایین (۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) سبب تقویت حافظه کوتاه‌مدت گردد، ولی در دوزهای بالا، احتمالاً از تشکیل حافظه فضایی جلوگیری می‌کند.

کلید واژه‌ها: بادرنجبویه؛ حافظه؛ هیپوکامپ؛ پراکسیداسیون لیپیدی؛ موش صحرایی.

[1]گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[2]گروه بافت‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
سکینه حیدری‌فر، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
heydarifar68@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Heydarifar S, Ilkhanipour M, Farokhi F, Mohammadzadeh M. The effect of lorazepam and aqueous extract of *melissa officinalis* on histological changes in the hippocampus and spatial memory in male rats. Qom Univ Med Sci J 2016;10(4):10-21. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

مقدمه

بادرنجبویه یکی از قدیمی‌ترین و رایج‌ترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده نعناعیان است. بوی لیمو از مشخصات این گیاه است و به‌همین دلیل به آن *Lemon balm* گفته می‌شود. از رایج‌ترین خواص درمانی بادرنجبویه می‌توان به خواص آرام‌بخشی، آنتی‌اکسیدانی، ضداسپاسم، ضدنفخ، ضدباکتری، ضدویروس و ضدالتهابی آن اشاره کرد (۱). این گیاه از سلول‌های عصبی محافظت کرده و رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد (۲). در قدیم از بادرنجبویه به‌عنوان تقویت‌کننده حواس و ذهن استفاده می‌شد. جوشانده یا شربت این گیاه برای تقویت معده، کبد و ازدیاد هوش و حافظه نیز توصیه شده است (۳). همچنین در بررسی تأثیر این گیاه بر دستگاه عصبی مشخص گردید بادرنجبویه علائم اختلالات عصبی از جمله استرس، اضطراب و تحریک‌پذیری را کاهش داده و در درمان بیماری صرع مؤثر است (۴). نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهد عصاره این گیاه حاوی اسید رزمارینیک، تری‌ترپنوئیدها، اولینولیک اسید و اسید اورسولیک است که از فعالیت گاما آمینو بوتریک اسید ترانس آمیناز (GABA-T) ممانعت می‌کنند (۵). ممانعت از فعالیت GABA-T نیز موجب افزایش قابلیت دسترسی مغز به GABA می‌شود (۶). استفاده از بنزودیازپین‌هایی مانند لورازپام (Lorazepam) در بسیاری از کشورها متداول است. لورازپام برای درمان بی‌خوابی و اضطراب نیز به کار می‌رود. بنزودیازپین‌ها از جمله لورازپام با افزایش انتقال‌دهنده عصبی گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA)، اثرات آرام‌بخشی، خواب‌آوری، ضداضطراب، ضدتشنج، خواص شل‌کننده عضلات را داشته و برای درمان بیماری صرع استفاده می‌شود. همچنین در فارماکولوژی کاربرد بالایی دارد (۷). عصاره بادرنجبویه و داروی لورازپام هر دو آرام‌بخش بوده و در درمان بیماری صرع کاربرد دارند و اثرات خود را بر روی سیستم عصبی مرکزی از طریق GABA اعمال می‌کنند. سیستم لیمبیک در دستگاه عصبی مرکزی شامل بخش‌هایی از مغز است که برای حافظه، احساس و عملکردهای درکی مهم می‌باشد. هیپوکامپ که درون لوب گیجگاهی مغز واقع شده؛ جزء مهم این سیستم بوده که به شکل گسترده‌ای، نقش مهم آن در حافظه و یادگیری اثبات شده است (۸).

حافظه و یادگیری مفاهیم بسیار نزدیکی هستند. در واقع، آموزش نیازمند برخی امکانات برای ذخیره اطلاعات و مکانیسم‌های نگهداری اطلاعات شبیه به حافظه است. به عبارت دیگر، حافظه همیشه همراه و مستلزم یادگیری است (۹). تغییر در سیناپس، اساس عصبی یادگیری بوده و در طی شکل‌گیری، یادگیری و حافظه؛ ارتباطات بین نورون‌ها (سیناپس) از نظر قدرت تغییر می‌یابد. کلید ایجاد حافظه تغییر در قدرت ارتباطات سیناپسی می‌باشد (۱۰). هیپوکامپ دارای ارتباطات متعددی با ساختمان‌های اصلی دستگاه لیمبیک بوده و به‌طور فطری در فرآیندهای حافظه و یادگیری درگیر است (۱۱).

نقش هیپوکامپ در تثبیت حافظه کاملاً شناخته شده است. چنانچه هیپوکامپ آسیب ببیند شخص از ذخیره اطلاعات عاجز می‌ماند، اما اطلاعات قدیمی‌تر که قبلاً تثبیت شده‌اند دست نخورده و قابل‌استفاده باقی می‌ماند (۱۲). تشکیلات هیپوکامپ در تمام گونه‌های پستانداران وجود دارد و شامل سابیکولوم، هیپوکامپ اصلی و شکنج دندانه‌ای (Dentate gyrus) می‌باشد. هیپوکامپ می‌تواند به سه زیر ناحیه CA1، CA2 و CA3 تقسیم شود (۱۳). شکنج دندانه‌ای که در بخش داخلی ناحیه CA3 هیپوکامپ قرار دارد، بخشی از تشکیلات هیپوکامپی است که در فرآیندهای یادگیری و حافظه، نقش قابل‌توجهی دارد. این بخش که در واقع نقطه ورود اطلاعات به مدار هیپوکامپی است، از یک قشر سه لایه‌ای تشکیل شده و سلول‌های گرانولار در لایه میانی قرار دارند (۱۴). صرف‌نظر از نورون‌های اصلی، تشکیلات هیپوکامپ حاوی سلول‌های گلیال، به‌ویژه آستروسیت‌ها بوده که در لایه‌های مختلف سلولی جای گرفته‌اند (۱۵،۱۴). در رابطه با ذخیره حافظه، Longton اشاره به این موضوع دارد که جسم سلولی آستروسیت‌ها در اثر افزایش حافظه، بزرگتر می‌شود (۱۶).

هدف اصلی این مطالعه، مقایسه تأثیر داروهای شیمیایی و گیاهی بوده است. همچنین با توجه به اینکه اثر مقایسه‌ای عصاره آبی بادرنجبویه و داروی لورازپام بر یادگیری و حافظه فضایی در موش‌های صحرایی به روش استفاده از ماز شعاعی ۸ بازو تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است، این مطالعه با هدف تعیین اثر عصاره آبی گیاه بادرنجبویه و داروی لورازپام بر یادگیری و حافظه در موش‌های رت به روش ماز شعاعی ۸ بازو انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

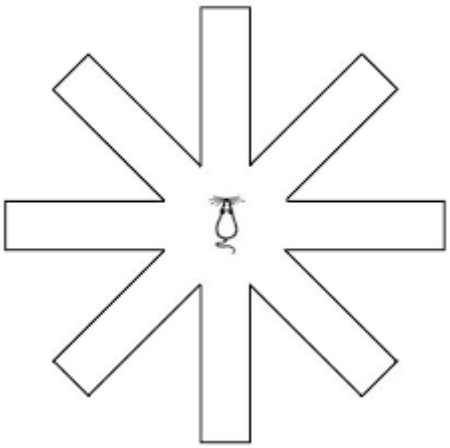
روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۳۰±۱۸۰ با رعایت تمامی ملاحظات اخلاقی بررسی گردید. محل انجام تحقیق، حیوانخانه دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه بود. تمامی گروه‌ها در شرایط استاندارد (دمای ۳±۲۴ درجه سانتیگراد، شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند و آب و غذا به‌طور آزاد در اختیار آنها قرار گرفت. حیوانات به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل که آب و غذای معمولی و سرم فیزیولوژی دریافت کردند. ۲- گروهی که داروی لورازپام (دوز ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن) دریافت کردند و به گروه ۳ و ۴ عصاره گیاه بادرنجبویه (دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هرکیلوگرم وزن بدن) داده شد. تمامی گروه‌های مورد مطالعه، لورازپام و یا عصاره بادرنجبویه را به روش گاواژ و با استفاده از سوند معدی شماره ۴ دریافت کردند. برای تهیه گیاه و عصاره‌گیری، گیاه خشک‌شده بادرنجبویه از مراکز معتبر خریداری و توسط کارشناس بخش هرباریم دانشگاه ارومیه تأیید شد. جهت عصاره‌گیری گیاه از روش خیساندن استفاده گردید.

بدین منظور ساقه و برگهای خشک‌شده به‌وسیله آسیاب برقی در حد ملایم به پودر تبدیل شد، سپس پودرها با آب (به اندازه‌ای‌که سطح آب چند سانتی‌متر بالاتر از سطح پودر قرار گیرد) مخلوط و بعد از ۴۸ ساعت محتوی ظرف با کاغذ صافی و قیف شیشه‌ای صاف گردید. محلول صاف‌شده به داخل بالن منتقل و حلال آن به‌وسیله دستگاه روتاری (تقطیر در خلأ) خارج شد. مایع غلیظ به‌دست‌آمده درون ظرف شیشه‌ای پهن داخل آون با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد خشک گردید. پس از آن پودر حاصل، از روی ظرف جمع‌آوری و برای تهیه دوزهای مختلف عصاره بادرنجبویه از طریق حل شدن در آب مقطر مورد استفاده قرار گرفت.

برای آزمون یادگیری، از نوعی ماز شعاعی ۸ بازو استفاده شد، این دستگاه دارای یک میدان مرکزی با ۸ بازوی بن‌بست می‌باشد که به‌طور شعاعی از آن خارج می‌شوند. ارتفاع ماز از زمین حدود ۴۰ سانتی‌متر است. قطر محفظه مرکزی ۳۰ سانتی‌متر و طول هر بازو ۷۰ و عرض آن ۱۵ سانتی‌متر است. در انتهای هر بازو حفره‌ای برای قرار دادن غذای مخصوص وجود دارد؛ به‌نحوی‌که حیوان نتواند آن را از دور ببیند. در یکی از بازوها از غذا به‌عنوان پاداش استفاده می‌شود. (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: شکل شماتیک از ماز شعاعی ۸ بازو.

ماز در اتاقی قرار گرفت که در آن علائم فضایی مختلفی وجود داشت و در طول آزمایش ثابت و برای حیوان در ماز، قابل‌دید بود. این مجموعه از طریق یک دوربین ردیاب که در ارتفاع ۱۸۰ سانتی‌متری و در بالای مرکز ماز شعاعی قرار گرفته بود، پایش و از طریق اتصال به کامپیوتر، اطلاعات مربوط به آزمایش در حال انجام، ذخیره می‌شد. رادیال ماز برای زمانهایی که حافظه فضایی یا رفتار جستجوی جوندگان مختلف در حال بررسی بود مورد استفاده قرار گرفت. این طرح تضمین می‌کند بعد از اینکه حیوان برای یافتن غذا به انتهای یکی از بازوها برمی‌گردد، برای اینکه به بازوی دیگر برود مجبور است که به صفحه مرکزی برگردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

در نتیجه حیوان همیشه ۸ گزینه ممکن را دارد و یک بازوی ثابت با یک ظرف مخفی همیشه محتوی غذا می‌باشد (۱۷). برای یادگیری فضایی، حیوانات در تمام مراحل در یک جهت ثابت (مثلاً مقابل landmark) قرار گرفتند تا شرایط برای همه حیوانات مورد آزمایش مساوی باشد. تمام تست‌ها در یک اتاق ساکت و آرام بین ۸ صبح تا ۴ بعد از ظهر انجام گرفت. به‌منظور فراهم آوردن انگیزه لازم برای جستجو کردن حیوان، میزان غذای حیوان تا حدی کاهش یافت که میزان وزن موش‌ها به ۸۵٪ وزن آنها در حالت تغذیه نرمال برسد. حیوان به دلیل کنجکاوی، شروع به گشتن ماز می‌کرد و وقتی حیوان غذا را در انتهای یکی از بازوها می‌یافت، به رت اجازه داده می‌شد تا کمی غذا خورده و سپس به قفس برگردانده می‌شد. بعد از این مرحله، حیوان می‌دانست که باید در ماز دنبال غذا بگردد. بنابراین، حیوان در بین ۸ بازو به دنبال بازوی محتوی غذا بود تا بازوی مورد نظر را پیدا کند. پس رت‌ها باید قادر باشند که به یاد بیاورند در کدام بازو غذا را پیدا کرده‌اند؛ زیرا آنها به بازوهایی که قبلاً سر زده‌اند برنمی‌گردند. بعد از مرحله آموزش حیوانات، تست حافظه شروع شد. غذا در یک بازوی مشخص قرار گرفت و ارزیابی حافظه فضایی، ۳۰ دقیقه بعد از دریافت دارو و عصاره توسط حیوان انجام گرفت. چندین علامت قابل‌دید (landmark) مانند پوسترها و کاغذهای رنگی با اشکال مختلف روی دیوار قرار داده شد که این علائم، حیوان را برای یافتن غذا کمک می‌کرد. یک ورود به بازو زمانی ثبت می‌شد که ۴ پنجه حیوان وارد بازو شود. بین رت‌های مختلف، ماز باید از مدفوع و ادرار پاک می‌شد (از بین بردن بو با استفاده از محلول الکل ۱۰٪) (۱۸،۱۷).

جهت مطالعه بافت‌شناسی و آزمایشهای بیوشیمیایی، حیوانات مورد نظر، بیهوش و بعد از آن مغز حیوان از جمجمه خارج و نیمکره راست مغز هر موش جهت سنجش پراکسیداسیون لیپیدی و آنزیم‌های دیگر به دمای ۷۰- درجه منتقل گردید. نیمکره چپ مغز نیز به محلول فرمالین ۱۰٪ منتقل شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، نمونه‌ها وارد روند آبگیری، شفاف‌سازی، آغشتگی با پارافین و درنهایت قالب‌گیری شدند. بعد از قالب‌گیری با پارافین، برش‌گیری با میکروتوم (Anglia Scientific; England) انجام و برش‌هایی با ضخامت پنج میکرومتر تهیه گردید و بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین - ائوزین، مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری (BX50F-3, Olympus, Tokyo, Japan) بررسی و عکس‌برداری شد. نورون‌های ناحیه DG با عدسی مشبک و در واحد سطح شمارش شدند. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Aebi و با دنبال نمودن تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۹). (تجزیه H_2O_2 با کاهش جذب در طیف جذبی ۲۴۰ نانومتر قابل بررسی است. تفاوت در جذب در واحد زمان معادل مقدار فعالیت کاتالاز می‌باشد.) بدین منظور از پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی‌مولار (شبه‌عنوان سوبسترا) و از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۰/۷ به‌عنوان جایگزین سوبسترا در محلول بلانک استفاده شد. محلول سنجش، حاوی ۲ میلی‌لیتر محلول هموژنای بافتی و ۱ میلی‌لیتر محلول پراکسید هیدروژن بود. واکنش با افزودن H_2O_2 شروع شد و کاهش جذب به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه بررسی و در پایان مقادیر ثبت گردید.

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) از روش Satho استفاده شد (۲۰). به حجم مناسبی از بافت هموژنه، اسید تری‌کلرواستیک (TCA) ۱۰٪، اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از جدا کردن مایع رویی، اسید تیوباربیتوریک (TBA) ۰/۶۷٪، اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری جوش داده شد. ۵ دقیقه بعد از خنک شدن، جذب محلول رویی صورتی‌رنگ در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما به روش FRAP (قدرت آنتی‌اکسیدانتی احیائی آهن) مورد سنجش قرار گرفت (۲۱).

نتایج حاصل به‌صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین ارائه گردید. داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از آزمون‌های آماری واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

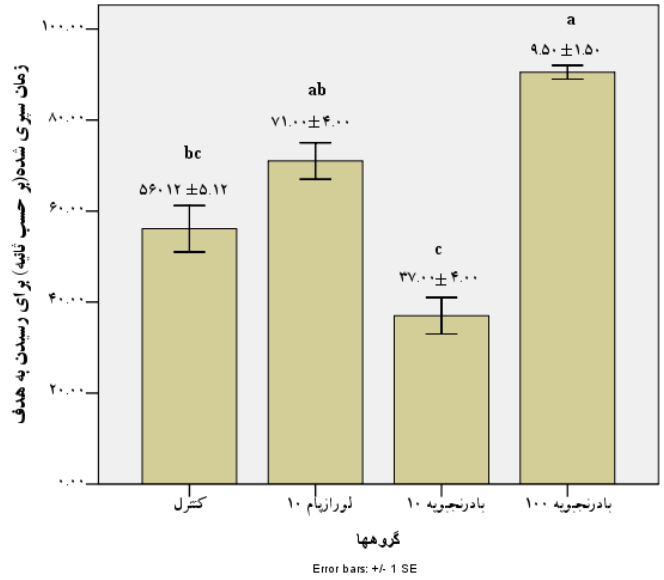
در این مطالعه بین گروه کنترل و دریافت‌کننده لورازپام، هیچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. دوز کم عصاره بادرنجبویه (۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هرکیلوگرم وزن بدن) سبب تقویت حافظه فضایی و دوز بالای آن (۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هرکیلوگرم وزن

www.SID.ir

Archive of SID

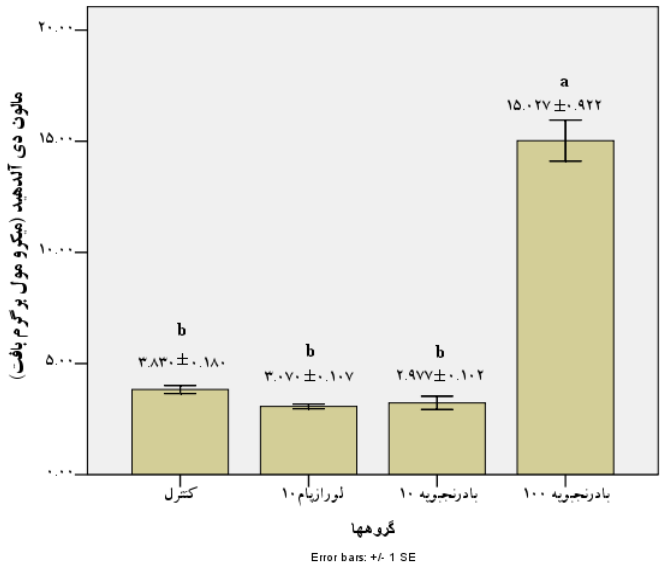
Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

بدن)، تأثیر منفی بر روی حافظه را نشان داد. بنابراین، با افزایش دوز عصاره از میزان یادگیری حیوانات کاسته شد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: نمودار تست حافظه، زمان سپری‌شده (برحسب ثانیه) برای رسیدن به هدف (غذا) در ماز شعاعی ۸ بازو.
اعداد روی ستون‌ها میانگین ± خطای استاندارد میانگین (Mean±SE) را نشان می‌دهد. حروف نامشابه در هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

تنها در گروه دریافت‌کننده عصاره گیاه با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم، افزایش معنی‌داری در میزان MDA مغز مشاهده شد (p<۰/۰۵). در بین گروه‌های دیگر، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.



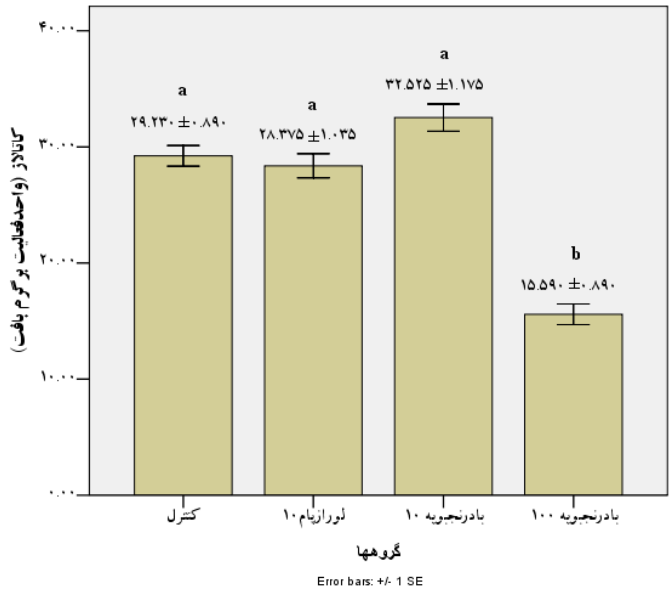
نمودار شماره ۲. مقایسه میزان غلظت MDA در گروه‌های مورد مطالعه.
اعداد روی ستون‌ها میانگین±خطای استاندارد میانگین (Mean±SE) را نشان می‌دهد. حروف نامشابه در هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با سایر گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵ است.

www.SID.ir

Archive of SID

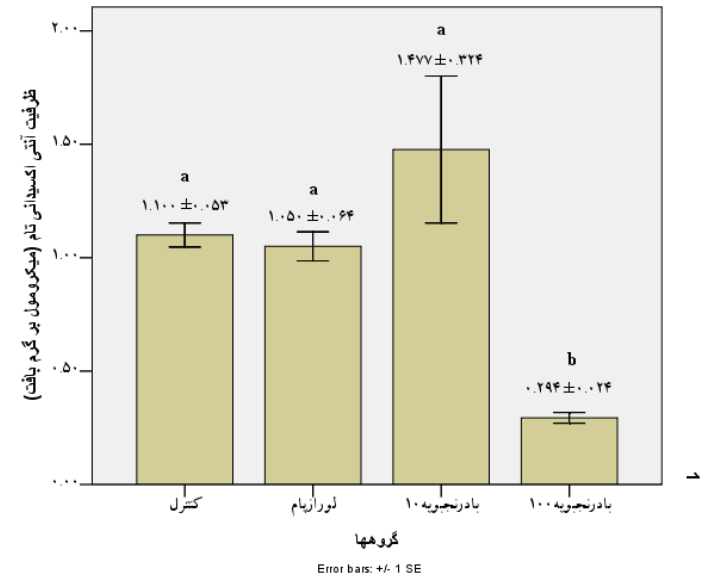
Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه دریافت‌کننده بادرنجبویه (دوز ۱۰۰میلی‌گرم برکیلوگرم)، به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها کاهش نشان داد (p<۰/۰۵) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳ : مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های مورد مطالعه.
اعداد روی ستون‌ها میانگین±خطای استاندارد میانگین (Mean±SE) را نشان می‌دهد. حروف نامشابه در هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با سایر گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵ است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAOC) در گروه بادرنجبویه (دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر کاهش یافت (p<۰/۰۵). TAOC در گروه دریافت‌کننده دوز پایین عصاره (۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) افزایش نشان داد. این افزایش از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (p<۰/۰۵) (نمودار شماره ۴).



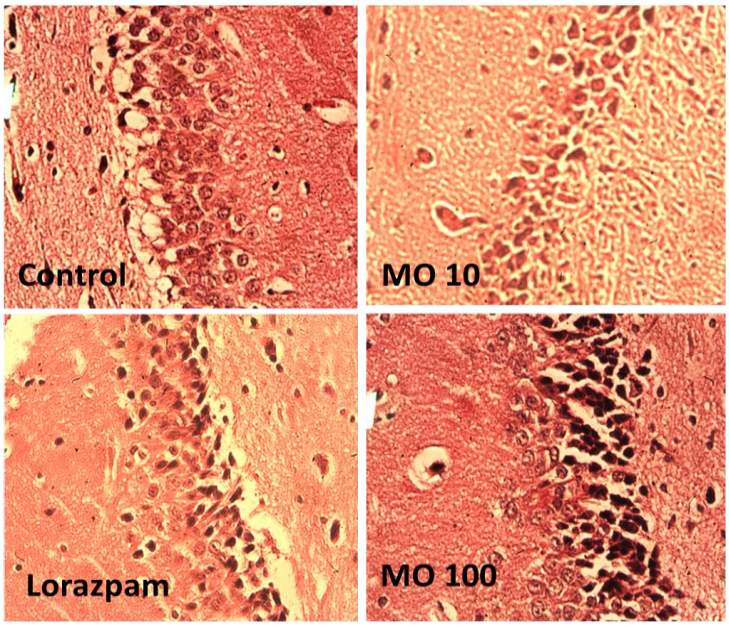
نمودار شماره ٤. مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه‌های مورد مطالعه.
اعداد روی ستون‌ها میانگین±خطای استاندارد میانگین (Mean±SE) را نشان می‌دهد. حروف نامشابه در هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با سایر گروه‌ها در سطح p <۰/۰۵ است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

در ناحیه DG هیپوکامپ موش‌های تیمارشده با لورازپام؛ تعدادی از آستروسیت‌ها آسیب دیدند و نکروز در آنها به‌صورت متراکم‌شدن هسته‌ها مشاهده گردید. همچنین در موش‌های تیمارشده با عصاره بادرنجبویه (دوز ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) (MO10) هیچ نوع آسیبی در نورون‌ها و سلول‌های پشتیبان مشاهده نشد، درحالی‌که در موش‌های تیمارشده با عصاره بادرنجبویه (دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) (MO100)، نکروزه‌شدن سلول‌های پشتیبان به‌طور چشمگیری افزایش یافت (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲: مقطع عرضی از ناحیه DG هیپوکامپ در موش‌های رت نر، با بزرگنمایی ×400 و رنگ‌آمیزی H&E

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد عصاره آبی بادرنجبویه، اثر قابل‌توجهی بر روی یادگیری حیوانات مورد بررسی در ماز شعاعی ۸ بازو ایجاد می‌کند. نتایج مطالعه Pereira و همکاران نیز نشان داد ترکیب اصلی گیاه بادرنجبویه (رزمارینیک اسید)، هیچ‌گونه اثر تقویت‌کننده یا مهارکننده روی حافظه کوتاه‌مدت و بلندمدت ندارد (۲۲). در تحقیق حاضر، عصاره بادرنجبویه توانست در دوز پایین (۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) حافظه فضایی را در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. از آنجا که ترکیبات متنوعی از جمله آلدئیدها، فلاونوئیدها و ترکیبات پلی‌فنلی، به‌خصوص رزمارینیک اسید و گلیکوزیدهای مونوترپن در بادرنجبویه شناسایی شده است (۲۴،۲۳)، به‌نظر می‌رسد اثر مثبت دوز پایین این گیاه در تقویت حافظه به ترکیبی غیر از رزمارینیک اسید، مثلاً به ترپن‌ها مرتبط می‌باشد. در مطالعه بر روی گلبول‌های قرمز انسان نیز مشخص شده است ترپن‌ها دارای خواص آنتی‌کولین استرازی هستند (۲۵).

همچنین در مطالعه Perry و همکاران در بافت مغز انسان (۲۶) و در مطالعه Orhan و همکاران در موش سوری (۲۷)، مشخص گردید برگ بادرنجبویه دارای خاصیت آنتی‌کولین استرازی می‌باشد. در مطالعات قابل‌توجهی، اثر مثبت سیستم کولینرژیک (افزایش استیل‌کولین در مغز) بر افزایش حافظه به اثبات رسیده است (۳۲-۲۸). بدین ترتیب، بادرنجبویه می‌تواند از طریق تأثیر بر سیستم کولینرژیک بر حافظه فضایی مؤثر باشد. البته در این تحقیق، تأثیر مثبت عصاره بادرنجبویه بر حافظه فضایی، تنها در دوز پایین مشاهده گردید و در دوز بالا (۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) تأثیر منفی بر حافظه فضایی داشت. بنابراین، احتمالاً مکانیسم اثر بادرنجبویه در دوزهای کم و زیاد آن متفاوت است. تأثیرات متفاوت وابسته به دوز بادرنجبویه در مطالعات قبلی نیز مورد تأکید قرار گرفته است (۳۳). گیاه بادرنجبویه دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بالقوه است (۳۴) و مشابه با ویتامین C این اثرات را از طریق حذف رادیکال‌های آزاد اعمال می‌کند. اثرات آنتی‌اکسیدانی رزمارینیک اسید و بنزودیوکسول موجود در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

عصاره ملیس؛ حتی تا ۱۰ برابر قوی‌تر از اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌های B و C می‌باشد (۳۵،۳۴). عصاره آبی گیاه بادرنجبویه، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی خوبی را نشان می‌دهد و به‌عنوان یک عامل احیاکننده پرقدرت شناخته شده است. عصاره این گیاه دارای اثر حفاظتی در برابر استرس اکسیداتیو ایجادشده به‌وسیله عوامل اکسیدانی است که از طریق فرآیندهای مختلف منجر به پراکسیداسیون لیپید می‌شوند (۳۶). بافت‌های مغز حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع بوده که در مقابل حملات رادیکال‌های آزاد، آسیب‌پذیری خاصی دارند (۳۷). مطالعات بافتی بر روی هیپوکامپ، هیچ نوع آسیب نورونی و آستروسیتی در ناحیه DG گروه دریافت‌کننده دوز پایین عصاره بادرنجبویه (۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) را نشان نداده است، برعکس در گروه دوز بالا، نکروز و مرگ آستروسیت‌ها در این ناحیه قابل‌مشاهده است. آستروسیت‌ها به‌عنوان سلول اصلی پشتیبان در سیستم عصبی مطرح بوده و با داشتن بیشترین مقادیر آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند در حفاظت نورون‌ها طی شرایط آسیب از آنها حفاظت کنند (۳۸). بنابراین، مواد آنتی‌اکسیدان می‌توانند نقش مهمی در جلوگیری و درمان بیماری‌های نورودژنراتیو بازی کنند (۴۰،۳۹).

در استرس اکسیداتیو، آزادسازی گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) موجب تغییرات در اجزای سلول و از جمله پراکسیداسیون لیپیدی و متعاقباً مرگ سلولی می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله موادی هستند که به‌نظر می‌رسد با کاهش میزان ROS بتوانند از مرگ نورونی پیشگیری کنند (۴۱). در بسیاری از گیاهان دارویی، غلظت مورد استفاده می‌تواند نقش مهمی در ایجاد اثرات آن داشته باشد. در ترکیبات بادرنجبویه، فلاونوئیدها از جمله مواد آنتی‌اکسیدانی هستند که باعث کاهش آزادسازی ROS می‌شوند (۴۲).

همچنین فلاونوئیدها در غلظت پایین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی عمل می‌کنند بدین طریق که دوز پایین فلاونوئیدها سبب افزایش عملکرد آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا می‌شود، درحالی‌که دوز بالای فلاونوئیدها سبب مهار عملکرد آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد شده و بدین‌وسیله باعث مرگ سلولی می‌شود (۴۲). بنابراین آنتی‌اکسیدان‌ها شمشیر دولبه‌ای هستند که دوز و مدت زمان مصرف آنها مهم است (۴۳). استفاده از دوز نامناسب یا دوره کوتاه درمان آنها نیز اثرمعکوس دارد (۴۴). از طرفی، رادیکال‌های آزاد سبب پراکسیداسیون لیپیدی شده که منجر به آسیب غشای سلولی، تغییر فشار اسمزی و تورم سلولی و درنهایت، مرگ سلولی می‌شود. علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد با جذب واسطه‌های التهابی، در ایجاد واکنش التهابی و آسیب بافتی نقش دارند (۴۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج آنزیمی و آسیب‌شناسی می‌توان نتیجه گرفت مصرف عصاره بادرنجبویه به‌صورت وابسته به دوز متفاوت است. پس می‌توان نتیجه گرفت در تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها، دوز مصرفی بسیار مهم است؛ چراکه در این مطالعه مشاهده گردید موش‌هایی که دوز بالا دریافت کرده‌اند، نکروز زیادی در بافت هیپوکامپ نشان می‌دهند. از این‌رو لازم است بررسی‌های مختلفی با دوزهای مصرفی متفاوت بر روی مدل‌های حیوانی انجام شود تا میزان مصرف دقیق و غیرسمی داروی گیاهی بادرنجبویه مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Yosofi M, Hojjati MR, Moshtaghi E, Rahimiyan R, Dawodiyan Dehkordi A, Rafieian M, et al. The effect of hydro-alcoholic extract of Melissa officinalis on learning and spatial memory in Balb/c mice. J Shahrekord Univ Med Sci 2013;13(4):51-59. [Full Text in Persian]

2. Lopez V, Martin S, Gomez-Serranillos MP, Carretero ME, Jager AK, Calvo MI. Neuroprotective and neurological properties of Melissa officinalis. Neurochem Res 2009;34(11):1955-61.

3. Varposhti MH. Plant medicine. Esfahan: Charbagh Pub; 2007. [Text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

4. Bisset NG, Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. 2nd ed. Stuttgart: Med pharm Pub; 2001.

5. Ibarra A, Feuillere N, Roller M, Lesburgere E, Beracochea D. Effects of chronic administration of Melissa officinalis L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. Phytomedicine 2010;17(6):397-403.

6. Kennedy DO, Wightman EL. Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. Adv Nutr 2011;2(1):32-50.

7. Page CC, Michael C, Sutter M, Walker M, Hoffman BB. Integrated pharmacology. 2nd ed. Louis Missouri: Mosby; 2002.

8. Bianchi M, Fone KF, Azmi N, Heidbreder CA, Hagan JJ, Marsden CA. Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. Eur J Neurosci 2006;24(10):2894-902.

9. Markowitsch HJ. Anatomical basis of memory disorders. In: MS Gazzaniga, Editor. The Cognitive neurosci. Cambridge: Mit Press; 1995. p. 665-79.

10. Kandel ER, Schavart JH, Jessel TM. Pricipels of neural science. 4th ed. NewYork: McGraw Hill; 2000.

11. Gorden MS. Neurobiology. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.

12. Jackson C, McCabe B, Nicol A, Brown M, Horn G. Dynamic of memory trace: Effects of sleep on consolidation. J Curr Biol 2008;18(6):393-400.

13. Knowles WD. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. J Clin Neurophysiol 1992;9(2):252-63.

14. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE. Nervous system. In: Gray H. Gray's Anatomy. 8th ed. London: Barnes & Noble Pub; 1995. p. 1123-29.

15. Amaral DG, Witter MP. The hippocampal formation. In: The rat nervous system. Paxinos G, editor. 2nd ed. New York. Academic; 1995. p .443-493.

16. Langton CG. Computation at the edge of chaos: phase transitions and emergent computation. Physica D Nonlinear Phenom 1990;42(1-3):12-37.

17. Dubreuil D, Tixier C, Dutrieux G, Edeline JM. Does the radial arm maze necessarily test spatial memory. Neurobiol Learn Mem 2003;79(1):109-17.

18. Behnam-Rasouli M, Hoseinzadeh H, Ghaffari G. The effect of olibanum aqueous extraction during pregnancy and lactation on the learning behavior andmemory near rat newborns. J Sci Kharazmi Univ 2001;18(55):1-13. [Full Text in Persian]

19. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol 1984;105:121-6.

20. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta 1978;90(1):37-43.

21. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guavafruit extracts. J Food Compos Anal 2006;19(6-7):669-75.

22. Pereira P, Tysca D, Oliveira P, da Silva Brum LF, Picada JN, Ardenghi P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. Pharmacol Res 2005;52(3):199-203.

23. Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (Melissa officinalis L. subsp. officinalis) tea. Pharm Acta Helvetiae 1998;72(5):301-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

24. Hohmann J, Zupko I, Redei D, Csanyi M, Falkay G, Mathe I, et al. Protective effects of the aerial parts of Salvia officinalis, Melissa officinalis and lavandula angustifolia and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. Planta Med 1999;65(6):576-8.

25. Perry NSL, Houghton PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes. J Pharm Pharmacol 2000;52(7):895-902.

26. Perry N, Court G, Bidet N, Court J, Perry E. European Herbs with cholinergic activities: Potential in dementia therapy. Int J Geriatr Psychiatry 1996;11(12):1063-9.

27. Orhan I, Aslan M. Appraisal of scopolamine-induced antiamnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used lamiaceae plants. J Ethnopharmacol 2009;122(2):327-32.

28. Beeri R, Andres C, Lev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, et al. Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. Curr Biol 1995;5(9):1063-71.

29. Buccafusco JJ, Letchworth SR, Bencherif M, Lippiello PM. Long-lasting cognitive improvement with nicotinic receptor agonists: Mechanisms of pharmacokinetic-pharmacodynamic discordance. Trends Pharmacol Sci 2005;26(7):352-60.

30. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. Curr Opin Neurobiol 2006;16(6):710-15.

31. Eidi M, Zarrindast MR, Eidi A, Oryan S, Parivar K. Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. Eur J Pharmacol. 2003;465(1-2):91-6.

32. Eidi M, Eidi A, Bahar M. Effects of Salvia officinalis L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. Nutrition 2006;22(3):321-6.

33. Kennedy DO, Wake G, Savelev S, Tildesley NT, Perry EK, Wesnes KA, et al. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of Melissa officinalis (Lemon Balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptor-binding properties. Neuropsychopharmacol 2003;28(10):1871-81.

34. Dastmalchi K, Damien Dorman HJ, Oinonen PP, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (Melissa officinalis L.) extract. LWT- Food Sci Technol Bull 2008;41(3):391-400.

35. Tagashira M, Ohtake Y. A new antioxidative 1, 3-benzodioxole from Melissa officinalis. Planta Med 1998;64(04):555-8.

36. Pereira RP, Fachinetto R, de Souza Prestes A, Puntel RL, Santos da Silva GN, Heinzmann BM, et al. Antoxidant effects of different extracts from Melissa officinalis, Matricaria recutita and Cymbopogon citrates. Neurochem Res 2008;34(6):973-83.

37. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995;41(12 pt 2):1819-28.

38. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol 2000;62(6):649-71.

39. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. Coenzym Pe Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. Behav Brain Res 2006;171(1):9-16.

40. Ishrat T, Parveen K, Moshahid Khan M, Khuwaja G, Badruzzaman Khan M, Yousuf S, et al. Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. Brain Res 2009;1281:117-27.

41. Fraschini F, Demartini G, Exposit D. Pharmacology of Silymarin. Clin Drug Invest 2002;22(1):51-65.

www.SID.ir

Archive of SID

42. Wätjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, et al. Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. J Nutr 2005;135(3):525-31.

43. Kaur R, Kaur K. Effects of dietary selenium on morphology of testis and cauda epididymis in rats. Indian J physiol Pharmacol 2000;44(3):265-72.

44. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SR, Said TM. Role of antioxidant in treatment of male infertility: An overview of the literature. Reprod Biomed Online 2004;8(6):616-27.

45. Halliwell B. How to characterize an antioxidant: An update. Biochem Soc Symp 1995;61:73-101.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Qom Univ Med Sci 2016 June

Original Article

The Effect of Lorazepam and Aqueous Extract of Melissa officinalis on Histological Changes in the Hippocampus and Spatial Memory in Male Rats

Sakine Heydarifar[1], Minoo Ilkhanipour[1], Farah Farokhi[2], Mahdi Mohammadzadeh[1]*

[1]*Department of Animal Physiology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.*

[2]*Department of Histology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Sakine Heydarifar,
Department of Animal Physiology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

Email:
heydarifar68@gmail.com

Received: 8 Jun, 2015

Accepted: 6 Oct, 2015

Abstract

Background and Objectives: Hippocampus is the most important part of learning and memory in the brain. *Melissa officinalis* naturally affects the nervous system and induces calmness. Lorazepam is also used in the treatment of insomnia and anxiety. In this study, the effect of Lorazepam and aqueous extract of *Melissa officinalis* (AEMO) was investigated on hippocampus tissue and spatial memory in male rats using radial maze method.

Methods: In this experimental study, 24 male Wistar rats were randomly divided into four groups. Control group received normal diet and water, the second group received lorazepam (dose. 10mg/kg), and two other groups received AEMO (at doses of 10 and 100mg/kg) by gavage for 18 days. Then, their spatial memory were tested in an 8 arm radial maze (RAM). The level of lipid peroxidation of homogenized brain tissue was assessed, and hippocampal tissue sections were prepared and after H&E staining, DG area was investigated under a microscope. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey statistical tests. The level of significance was set at $p<0.05$.

Results: There was no significant difference in learning level between animals received lorazepam and control group. The results of the experiments showed the positive effect of low dose of AEMO (10mg/kg) on spatial memory, while high dose of *Melissa officinalis* (100mg/kg) prevented memory formation.

Conclusion: The results of this research showed that AEMO can increase short-term memory at low dose (10mg/kg), but it may prevent spatial memory formation at high doses.

Keywords: Melissa; Memory; Hippocampus; Lipid peroxidation; Rat.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:27 IRST on Saturday October 1st 2016

www.SID.ir