

اثر مصرف خوراکی عصاره الکلی گیاه بوزیدان بر کاهش حافظه ناشی از تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین در موش‌های سفید آزمایشگاهی نر

نویسندگان: محسن خلیلی^{۱*}، محمدرضا واعظ مهدوی^۱
۱. استاد - گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: najafabady@yahoo.com

* نویسنده مسئول: محسن خلیلی

چکیده

مقدمه و هدف: با توجه به شیوع و اهمیت درمان بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی از جمله بیماری‌های زوال مغز مانند آلزایمر و عدم وجود درمان قطعی برای این بیماری، در مطالعه اخیر، به بررسی اثر بوزیدان به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی بر روند پیشرفت این بیماری پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: آلزایمر با مدل تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین، ایجاد و میزان یادگیری و حافظه فضایی موش‌ها به‌ترتیب با روش آزمون احترازی غیرفعال و آزمون ماز Y شکل ارزیابی شد. حیوانات مورد تحقیق به گروه‌های کنترل، کنترل+درمان و تزریق استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین+درمان تقسیم شدند. موش‌های درمان، یک روز پیش از جراحی به مدت سه هفته عصاره بوزیدان را به شکل خوراکی دریافت و سپس به آزمون‌های یادگیری ماز Y شکل و آزمون احترازی وارد می‌شدند؛ در نهایت، داده‌های آزمون‌ها با تست‌های آماری مرتبط مورد مقایسه قرار می‌گرفت.

نتایج: درمان با دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره گیاه توانست میزان تأخیر حین عبور (STL) را به‌عنوان نماد یادآوری اطلاعات در گروه تزریق با استرپتوزوتوسین ($3/10 \pm 3/1$) به عدد معنی‌دار ($3/48 \pm 3/5$) نزدیک کند؛ همچنین رفتار تناوبی به‌عنوان درصد حافظه فضایی، در موش‌های درمان شده با عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg به‌ترتیب $5/21 \pm 67/68$ و $6/27 \pm 63/26$ به‌دست آمد که نسبت به گروه کنترل ($4/81 \pm 45/21$) افزایش معنی‌دار داشتند.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، درمان طولانی با عصاره گیاه بوزیدان در جلوگیری از کاهش حافظه ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین داخل‌بطنی اثری قابل‌توجه دارد و شاید این گیاه، عامل بالقوه‌ای در درمان بیماری‌های تخریب عصبی مانند بیماری آلزایمر باشد.

واژگان کلیدی: بوزیدان، استرپتوزوتوسین، آلزایمر، موش سفید آزمایشگاهی

دوماهنامه علمی - پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال نوزدهم - شماره ۹۹

تیر ۱۳۹۱

دریافت: ۹۱/۲/۵

آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۴/۵

پذیرش: ۹۱/۴/۱۰

مقدمه

استفاده شده است؛ همچنین عصاره خام و تصفیه شده آن در جلوگیری از تشکیل تومور (۸ و ۹) اترواسکلروزیس (۱۰) و آسیب‌های کبدی نقشی بسزا دارد (۱۱). گزارش‌های موجود، نقش بوزیدان و ترکیب‌هایش را در تقویت حافظه و یادگیری نشان می‌دهد؛ برای نمونه مشخص شده که استفاده از عصاره بوزیدان می‌تواند آسیب‌های حافظه ناشی از اتانول را در مدل آزمون احترازی غیرفعال در موش کاهش دهد (۱۲ و ۱۳)؛ همچنین به‌تازگی ثابت شده است که عصاره بوزیدان قادر است صدمه‌های حافظه شناختی را بی‌اثر کرده، اثر آسیب‌های ناشی از اسکوپالامین را در مدل احترازی غیرفعال در موش سفید آزمایشگاهی آنتاگونیزه کند (۱۴ و ۱۵)؛ به این ترتیب با توجه به اهمیت طب سنتی به‌خصوص گیاه‌درمانی، وجود ترکیب‌های غنی آنتی‌اکسیدان در گیاه بوزیدان و همچنین به دلیل وجود گزارش‌های متعدد درخصوص تأثیرهای مفید این گیاه در روند حافظه و یادگیری، مطالعه حاضر به بررسی عصاره بوزیدان روی بیماری آلزایمری با مدل تزریق داخل بطنی داروی استرپتوزوتوسین پرداخته است.

مواد و روش‌ها

مواد

استرپتوزوتوسین از شرکت شیمیایی سیگما و کتامین (۱۰ درصد) و زایلازین (۲ درصد) از شرکت آلفاسان هلند و مواد شیمیایی مورد استفاده برای تهیه ACSF از شرکت مرک آلمان تهیه شد. بوزیدان از فروشگاه محلی فراهم شد و سپس مطابق با اصول علمی بخش گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد، تأیید علمی و با جداسازی ناخالصی‌های احتمالی ریشه خالص خشک به دست آمد.

حیوانات

۴۸ سر موش سفید آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ویستار (تهران، انسیتو پاستور)، به وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم در شروع آزمایش انتخاب و به صورت رندوم در شش قفس در دما و رطوبت کنترل شده قرار گرفتند. حیوانات در سراسر طول آزمایش آزادانه به آب و غذا

بیماری آلزایمر، یک بیماری تحلیل‌برنده و پیش‌رونده سیستم عصبی مرکزی است که باعث زوال قوای عقلانی می‌شود؛ منشأ این بیماری به‌طور دقیق مشخص نیست ولی تغییرهایی متعدد مانند کوچک شدن مغز، از بین رفتن سلول‌های مغزی، ایجاد پلاک‌های پیری و کلافه‌های ظریف در سلول‌های مغزی از مهم‌ترین علائم بیماری به شمار می‌روند (۱). تزریق داخل‌بطن مغزی استرپتوزوتوسین در موش‌های سفید آزمایشگاهی با نقص‌های بلندمدت و پیش‌رونده در یادگیری و حافظه و فعالیت‌های فضایی در آنها همراه است (۲)؛ این مدل، شبیه به نوعی از بیماری آلزایمر (Sporadic alzheimer's disease, SAD) بوده که کمتر و گاه اتفاق می‌افتد و با ضعف دائم، تخریب حافظه ناشی از تخریب نورون‌های درگیر در حافظه پیش‌رونده و اضطراب‌های رفتاری شناخته می‌شود (۳) و بیشترین عامل رایج دمانس در بیماران مسن را تشکیل می‌دهد (۴). مشاهده شده است ایجاد رادیکال‌های آزاد با آسیب‌های حافظه‌ای در تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در مدل آلزایمری در موش‌های سفید آزمایشگاهی مرتبط است (۲ و ۵) و نقش تزریق داخل‌بطنی استرپتوزوتوسین در ایجاد آسیب سیستم نوروترانسمیتری کولینرژیک به‌طور کامل شناخته شده است (۶)؛ به این ترتیب در حال حاضر، با وجود عدم دسترسی به علاج قطعی برای بیماری مذکور، با توجه به اهمیت افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش عملکرد سیستم کولینرژیک در این بیماری، شاید کاربرد ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان و تقویت‌کننده سیستم کولینرژیک در بهبود بیماری کارآمد باشند.

«بوزیدان» (*Withania Somnifera L, Ws*) یکی از گیاهان زراعی در قسمت‌های مهم جهان مانند ایران، چین، اسپانیا، ایتالیا و یونان است؛ در آنالیزهای شیمیایی این گیاه، وجود کارتنوئیدهای محلول در آب، مونوترپن آلدهید، ویتافرین A، ویتانولید E، ویتانوزید F نشان داده شده است (۷). قسمت ریشه بوزیدان در طب سنتی به‌عنوان داروی ضداسپاسم، سم‌زدای عصبی

از کنار شکاف ساجیتال و $3/4$ میلی‌متر در عمق سوراخ شد (۱۶). هر دو گروه استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین تحت درمان با عصاره بوزیدان، استرپتوزوتوسین را به صورت تزریق دوطرفه داخل بطن مغز دریافت کردند (3 mg/kg). استرپتوزوتوسین به شکل تازه در CSF مصنوعی سرد حل شده، با حجم 10 میکرولیتر در هر طرف تزریق می‌شد. تزریق استرپتوزوتوسین دومرتبه در روز سوم هم تکرار شد. در گروه شم، فقط ACSF ساخته شده (3 mM NaCl ; 120 mM KCl ; 1.15 mM CaCl_2 ; 0.8 mM MgCl_2 ; $27\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ در $\text{PH}=7.2$) به صورت داخل بطن مغزی تزریق شد. پس از عمل، مراقبت‌های ویژه‌ای انجام می‌شد تا تغذیه حیوان به صورت خودبه‌خودی برقرار شود.

آزمون‌های رفتاری

حافظه فضایی ماز Y شکل
دستگاه آزمایش ماز Y شکل از یک ماز سیاه‌رنگ متشکل از پلکسی گلاس ساخته شده است... هر بازو ماز Y شکل 40 cm طول، 30 cm ارتفاع و 15 cm پهنا داشته (۱۷ و ۱۵) و به صورت زاویه‌دار به شکل متساوی‌الاضلاع قرار می‌گیرند (که با حروف A, B, C نشان‌گذاری می‌شود)؛ هر موش در انتهای یکی از بازوها قرار گرفته، اجازه داده می‌شود تا به مدت 8 دقیقه آزادانه در طول بازوهای ماز حرکت کند؛ ورود موش به هر یک از بازوها مشاهده و به صورت دستی ثبت شد (برای نمونه: ACBABCACBCACAC , ...). برای محاسبه درصد تناوب برای نمونه بالا به عنوان معیاری برای اندازه‌گیری حافظه فضایی هر موش به شکل زیر عمل می‌شود (۱۷). ابتدا تعداد بازوهای حرکت کرده در 8 دقیقه به صورت سه‌تایی به نام تریاد دسته‌بندی می‌شوند (در نمونه بالا پنج تریاد یا پانزده بازو وجود دارد). از پنج تریاد دو تای آن غیر تکراری (زیر خط‌دارها) قرار دارند. حال طبق فرمول زیر درصد تناوب یا حافظه هر موش محاسبه می‌شود.

دسترس‌ی داشتند. همه آزمایش‌های رفتاری بین ساعات 11 صبح تا 4 بعدازظهر مطابق با اصل چهارم نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (NIH) انجام شد. در تحقیق حاضر، 48 سر موش به شش گروه هشت‌تایی شامل ۱- کنترل؛ ۲- کنترل + 100 mg/kg Ws؛ ۳- 200 mg/kg Ws؛ ۴- آلزایمری (SAD)؛ ۵- SAD + 100 mg/kg Ws و ۶- SAD + 200 mg/kg Ws تقسیم شدند.

تهیه عصاره طبیعی

برای تهیه عصاره 250 گرم ریشه بوزیدان تمیز شده را به کمک دستگاه آسیاب، خرد و با 1 لیتر الکل حجمی 70 درصد مخلوط کردیم. مخلوط مورد نظر برای 48 ساعت در شرایط دمایی آزمایشگاه قرار گرفت سپس مخلوط طی سه بار گذشتن از صافی‌هایی با درجات تخلخل بزرگ به کوچک‌تر به‌طور کامل صاف شد؛ سپس محلول فیلتر شده در حمام آب 65 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آب آن به‌طور کامل تبخیر شود؛ در نهایت، حدود 18 تا 20 گرم عصاره عسلی در ته ظرف باقی ماند که از آن برای تهیه دوز مورد نظر عصاره استفاده شد؛ برای این منظور، عصاره عسلی در نرمال سالین با دوز 100 و 200 mg/kg تهیه و به صورت گاواژ به حیوان خوراند شد (۱۳ و ۱۴). تجویز خوراکی عصاره برای هر دوز یک روز پیش از جراحی به‌طور روزانه شروع و به مدت سه هفته کامل انجام شد.

روش آزمایش

جراحی استریوتاکسی
به‌منظور جراحی، موش‌ها با مخلوطی از کتامین 100 mg/kg (داخل صفاقی) و زایلازین 5 mg/kg (داخل صفاقی) بیهوش شده، داخل دستگاه استریوتکس قرار گرفتند (میله نگهدارنده دندان پیش $3/3\text{ mm}$ و میله نگهدارنده گوش به شکل متقارن قرار گرفت). پوست سر با محلول یددار پاک شد، مجموعه مطابق با اطلس استریوتکس با دریل در $0/8\text{ mm}$ عقب برگما، $1/4\text{ mm}$

$$\text{درصد تناوب} = \frac{3=6 \times \text{تربادهای غیر تکراری (در مثال بالا ۲ (ACB,BCA)} \times 100}{\text{تعداد کل تربادهای (} 5 \times 3 - 2 = 13 \text{)} = \frac{6}{13} \times 100 = 46\%$$

هر آزمون فقط یک بار برای هر حیوان انجام شد.

rpm، مدت زمان سرعت اولیه تا نهایی = ۴ دقیقه، شدت شوک = ۱/۱ میلی آمپر، مدت زمان شوک = ۸/۸. ثانیه، مدت زمان آزمایش = ۵ دقیقه، فاصله میان آزمایش‌ها = ۲ دقیقه. میانگین زمان ایستادن روی میله را به عنوان اندکس PMC ارزیابی می‌شود (۱۷)؛ میانگین تعداد افتادن هر حیوان نیز ثبت می‌شود.

آنالیزهای آماری

تمامی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار از میانگین بیان شده‌اند. با توجه به غیر پارامتریک بودن داده‌ها برای آزمون احترازی غیرفعال از آزمون غیر پارامتریک کروسکال-والیس استفاده شد که در صورت معنی دار بودن، آزمون من-ویتنی برای مقایسه به کار رفت. داده‌های آزمون ماز Y شکل، توسط آزمون ویلکاکسون ارزیابی شدند. در پایان $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر مصرف خوراکی عصاره هیدروالکی ریشه بوزیدان بر میزان تأخیر اولیه (IL)

همان‌طور که در نمودار شماره ۱ نشان داده می‌شود، ایجاد تأخیر اولیه در گروه‌های کنترل، بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg، استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg به ترتیب به میزان ۲۹/۹، ۲۷/۱، ۲۵/۴۸، ۳۹/۵۵، ۳۲/۴۵ و ۳۳/۲۱ ثانیه به دست آمد که با توجه به آنالز آماری این نتایج، میان میانگین تأخیر اولیه در گروه استرپتوزوتوسین و گروه کنترل اختلافی معنی دار وجود داشت ($P < 0/05$).

اثر مصرف خوراکی عصاره هیدروالکی ریشه بوزیدان بر میزان تأخیر حین عبور (STL)

میزان تأخیر حین عبور (STL) در گروه کنترل (۴۸/۸۸)، در گروه بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg

آزمون احترازی غیرفعال

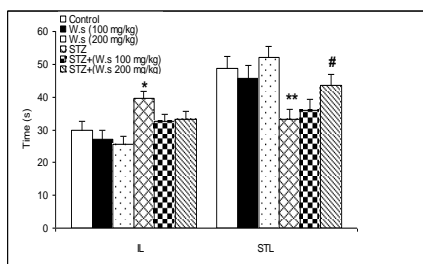
دستگاه از یک اتاقک روشن تشکیل شده است که به یک درب گیوتینی به یک اتاقک تاریک متصل می‌شود. شوک‌های الکتریکی توسط یک محرک به میله‌های کف اتاقک منتقل می‌شوند. در روزهای اول و دوم آزمایش، موش‌ها به مدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار داده می‌شوند تا به دستگاه عادت کنند؛ در روز سوم، آزمایشی اکتسابی انجام شد. موش‌ها به صورت انفرادی در اتاقک روشن قرار گرفتند. پس از گذشت ۲ دقیقه و عادت کردن آنها به محیط، درب گیوتینی باز شد و پس از ورود موش به اتاقک تاریک، درب بسته شده و یک شوک الکتریکی به دست و پای حیوان وارد شد (۱ میلی آمپر، ۱ ثانیه)؛ در اینجا تأخیر اولیه (Initial latency, IL) ورود به اتاقک تاریک ثبت شده، موش‌های با تأخیر اولیه بیشتر از ۶۰ ثانیه از مطالعه خارج شدند. یک روز بعد (روز چهارم)، موش‌های آزمون شده و دارای ثبت زمان تأخیر اولیه دو مرتبه در اتاقک روشن قرار داده شوند و فاصله زمانی میان قرارگیری در اتاقک روشن و ورود به اتاقک تاریک را با زمان تأخیر حین عبور (Step through latency, STL) می‌نامند. پارامترهای زمانی IL و STL به ترتیب میزان اکتساب (Acquisition) و یادآوری (Retention) اطلاعات را سنجش می‌کنند. لازم به یادآوری است آزمون‌های حافظه و یادگیری سه هفته بعد از عمل جراحی استریوتاکسی انجام می‌شود.

اندکس تطابق روانی- حرکتی (Psychomotor Index, PMC)

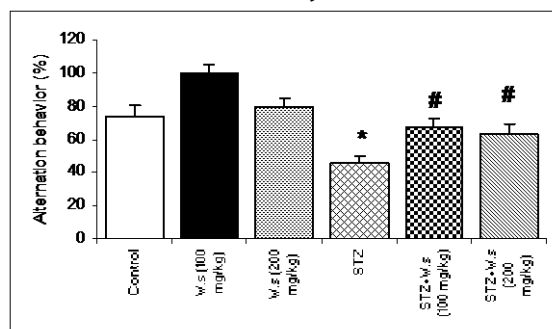
پس از انجام آزمون ماز Y شکل، این آزمایش با دستگاه تردمیل (Treadmill) روتارود همراه با دستگاه تحریک کننده انجام شد؛ ابتدا موش‌ها روی میله چرخان قرار می‌گرفتند تا راه رفتن را روی آن تمرین کنند؛ سپس به مدت ۵ دقیقه در جعبه‌ای با مشخصات زیر قرار گرفتند: سرعت اولیه = 4rpm، سرعت نهایی = ۳۰

استرپتوزوتوسین + بوزیدان نسبت به گروه کنترل است، نشان می‌دهد درمان با دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره از کاهش STL در گروه استرپتوزوتوسینی به میزان معنی‌داری می‌کاهد.

(به ترتیب ۵۱/۹۸ و ۴۵/۸)، در گروه استرپتوزوتوسین (۳۳/۱) و استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ به ترتیب ۳۵/۹۸ و ۴۳/۵ به دست آمد (نمودار ۱). مقایسه داده‌ها اگرچه بیان‌کننده کاهش معنی‌دار در میزان تأخیر حین عبور (STL) در گروه‌های استرپتوزوتوسین و



نمودار ۱. اثر عصاره هیدرو الکلی ریشه بوزیدان (۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg) بر میزان تأخیر اولیه (Initial latency, IL) و تأخیر حین عبور (Step through latency, STL) در موش‌های صحرائی نر. * و # ($P < 0.05$) به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف با گروه کنترل و STZ است. ** ($P < 0.01$). $n=7$. ستون‌ها نشان‌دهنده Mean \pm SEM است.



نمودار ۲. درصد رفتار تناوبی (Alternation behavior) در آزمون ماز Y در سه هفته پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های استرپتوزوتوسینی (STZ). * و # ($P < 0.05$) به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف با گروه کنترل و STZ است. $n=7$. ستون‌ها نشان‌دهنده Mean \pm SEM است.

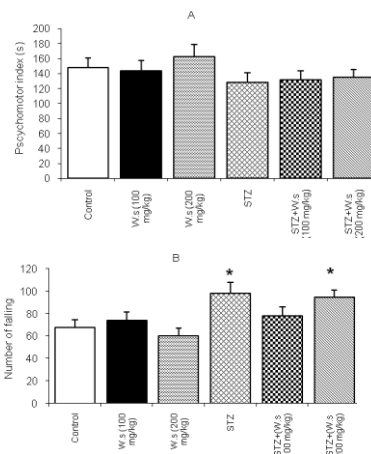
البته کاهش در گروه استرپتوزوتوسین و گروه‌های استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل دیده می‌شود ولی در گروه استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg، عصاره هیدرو الکلی ریشه بوزیدان به طور معنی‌داری توانسته است مانع کاهش حافظه ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین شود ($p < 0.05$).

اثر مصرف خوراکی عصاره هیدرو الکلی ریشه بوزیدان بر اندکس روانی حرکتی همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های آزمایش دیده نمی‌شود.

اثر مصرف خوراکی عصاره هیدرو الکلی ریشه بوزیدان بر نقص حافظه فضایی در آزمون ماز نمودار شماره ۲ میانگین خطوط رفتار تناوبی برای گروه‌های کنترل، بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg را به ترتیب ۷۳/۹، ۹۹/۹۸، ۷۹/۶۳، ۴۵/۲۱، ۶۳/۲۶ و ۶۷/۶۸ درصد نشان می‌دهد؛ این نمودار بیان می‌کند که میانگین درصد رفتار تناوبی در گروه بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است.

(۹۸) و در گروه استرپتوزوتوسین+ بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg (به ترتیب ۷۸ و ۹۵) به دست آمد. مقایسه داده‌ها نشان داد تعداد افتادن حیوان در گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین+ بوزیدان ۲۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی دار دارد ($p < ۰/۰۵$).

میانگین اندکس روانی حرکتی در تمام پنج زمان آزمایش‌ها برای گروه‌های کنترل، بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰، استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین+ بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg به ترتیب ۱۴۸، ۱۴۴، ۱۶۳، ۱۲۸، ۱۳۲ و ۱۳۵ محاسبه شد. تعداد افتادن حیوان در گروه کنترل (۶۸)، بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg (به ترتیب ۷۴ و ۶۰)، استرپتوزوتوسین



نمودار ۳. A- اندکس روانی حرکتی (Psychomotor index) اندازه گیری شده توسط دستگاه روتارود. B- تعداد افتادن حیوانات از میله روتارود. * ($P < ۰/۰۵$) نشان دهنده اختلاف با گروه کنترل و استرپتوزوتوسین (STZ) است. $n=۷$. ستون‌ها نشان دهنده $Mean \pm SEM$ است.

بر اساس یافته‌های پیشین، مشخص شده در موجودات آزمایشگاهی (نظیر موش صحرایی) و جامعه انسانی اختلال در روندهای شناختی و حافظه و یادگیری با افزایش دمانس و آتروفی مغز همراه است. هرچند که مکانیسم بروز این اختلال‌ها به خوبی شناخته نشده است به طور کامل، مشخص شده است که دو ناحیه قشر مغز و هیپوکامپ که از نواحی اصلی مرتبط با این روندها محسوب می‌شوند به میزان زیادی به دنبال تقویت یا اضمحلال حافظه تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱۸)؛ در این ارتباط، تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در برخی نواحی مغزی به خصوص هیپوکامپ (۱۹) و از طرفی دیگر، کاهش سطح فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGF)^۱ و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)^۲ در برخی نواحی مغز می‌توانند برکسب اطلاعات، ذخیره و یادآوری اطلاعات (با اثرگذاری بر

بحث

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در مدل احترازی غیرفعال در موش‌های سفید آزمایشگاهی، کاهش معنی دار در حافظه و یادگیری نشان داده، یک نقص حافظه فضایی در مدل ماز Y شکل ایجاد کرد و درمان موش‌های سفید آزمایشگاهی با عصاره گیاه بوزیدان به خصوص با دوز ۲۰۰ mg/kg به مدت سه هفته می‌تواند این وضعیت غیرنرمال را بهبود بخشد. با توجه به اینکه تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین به دنبال تخریب هیستولوژیک مغز، تخریب حافظه و مدلی مشابه بیماری آلزایمر را ایجاد می‌کند و برای این منظور دست کم سه هفته زمان لازم است، بنابراین در تحقیق حاضر، طول درمان موش‌ها با عصاره سه هفته در نظر گرفته شد.

1. Insulin Like Growth Factor
2. Brain Deprived Neurotrophic Factor

عصاره بوزیدان در این تحقیق می‌تواند به این مکانیسم‌ها نسبت داده شود: اول، مشخص شده است که آسیب مغزی ناشی از استرس اکسیداسیون موجب نقص در توانایی‌های حافظه و یادگیری و افزایش اختلال در فعالیت‌های حافظه فضایی می‌شود که با ماز آبی و مدل‌های ماز هشت پر (Radial arm maze) بررسی شده است (۲۴)؛ بنابراین خواص عصاره بوزیدان به عنوان محافظت‌کننده عصبی، آنتی‌اکسیدان و کاهش رادیکال‌های آزاد (۲۵) می‌تواند نقش آنتاگونیست‌کنندگی بوزیدان در کاهش فعالیت شناختی حافظه‌ای را توجیه کند؛ همچنین درمان با عصاره بوزیدان موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه تخفیف دژنراسیون در نواحی قشری و هیپوکامپ می‌شود (۲۶) و (۲۷)؛ از طرفی، نتایج تحقیق‌های کوپتا و همکارانش (۲۰۰۷) نشان داد که تیمار با بوزیدان به یک فرم وابسته به دوز موجب کاهش فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز و مهار پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئینی القاشده توسط مس در موش کوچک آزمایشگاهی می‌شود که بر این اساس در برقراری سلامت جسم و روان مؤثر خواهد بود (۲۸)؛ دوم اینکه بیماری آلزایمر توسط سطوح نوروترانسمیترهای مختلف و گیرنده‌ها و مارکرهای مرتبط مشخص می‌شود؛ جدا از این به شدت تحت تأثیر سیستم کولینرژیک است (۲۹). سیستم کولینرژیک، مسئول ذخیره و بازیابی موضوع‌ها در حافظه بوده، کاهش آن، مرتبط با افزایش آسیب حافظه است؛ بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش سطح استیل کولین در بهبود علائم نقص حافظه در آلزایمر مفید باشد (۳۰).

گزارش‌های مربوط به آثار آنتاگونیست‌کننده بوزیدان بر کاهش اثرهای نقص حافظه، فرضیه فعالیت کولینرژیک عصاره بوزیدان را تقویت می‌کند (۳۰)؛ سوم، گزارش‌هایی قوی، دال بر این واقعیت وجود دارند که پروسه‌های التهابی با شناخت فیزیولوژی بیماری آلزایمر مرتبط بوده، درمان با داروهای NSAIDs و ترکیب‌های فنلی طبیعی می‌تواند ریسک بیماری آلزایمر را

عملکرد سیناپس و انتقال سیناپسی) مؤثر باشند (۲۰)؛ به علاوه، فعالیت در سیستم کولینرژیک مسئول فرایندهای مهمی نظیر حافظه و تثبیت اطلاعات در سطح هیپوکامپ است (۲۱).

در حقیقت، تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین با اختلالی پیش‌رونده در حافظه و یادگیری، گلوکز مغزی و متابولیسم انرژی مشخص می‌شود؛ این روش، نشانگر یک مدل آزمایشی مناسب برای بیماری آلزایمر است (۲۲ و ۲۳). در تحقیق حاضر که از استرپتوزوتوسین با دوز ۳ mg/kg استفاده شد، نشان داده شد که این دوز هیچ‌گونه تغییری در سطح گلوکز خون محیطی ایجاد نمی‌کند (داده‌ها چون هدف اصلی این تحقیق نبوده‌اند بیان نشده‌اند)؛ البته این دوز، نقصی معنی‌دار در حافظه همه حیوانات ایجاد می‌کند (۲۴). در این تحقیق، احتمال افزایش فشار CSF در تزریق داخل بطن مغزی رد شد زیرا تغییرهای رفتاری به دنبال افزایش فشار داخل مغزی یا برآمدگی چشم‌ها مشاهده نشد. نتایج آزمون احترازی غیرفعال نشان داد که عبور تأخیری (STL) موش‌های سفید آزمایشگاهی استرپتوزوتوسینی به‌طور معنی‌دار کاهش یافت که به نظر می‌رسد نشانگر آسیب به پروسه‌های حافظه و یادگیری باشد و بر این اساس، نتایج حاصل از آزمون احترازی غیرفعال است که نشان داد در موش‌های استرپتوزوتوسینی میزان خطای بیشتر و انتخاب‌های صحیح کمتری وجود دارد که نشانگر حالتی غیرنرمال در پروسه‌های حافظه فضایی است. بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که نقص در رفتار احترازی غیرفعال، منعکس‌کننده اکتساب یا حفظ حافظه ضعیف‌تر پس از تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین باشد؛ نتایج آزمون احترازی غیرفعال در موش‌های استرپتوزوتوسینی نیز نشانگر یک نقص حافظه فضایی است.

در این مطالعه، درمان موش‌های سفید آزمایشگاهی استرپتوزوتوسینی با عصاره بوزیدان از یک روز قبل از جراحی به مدت سه هفته، بهبودی معنی‌دار در حافظه و یادگیری و مهارت‌های حافظه فضایی ایجاد کرد. اثر مفید

رفتاری عصاره بوزیدان و مکانیسم‌های احتمالی آن، بررسی‌های پاراکلینیک و استفاده از مدل‌های واقعی اختلال‌های حافظه (برای نمونه، موش‌های سفید آزمایشگاهی پیر) مورد نیاز است.

کاهش‌دهنده (۳۱ و ۳۲)؛ به‌علاوه به‌تازگی بیان‌شده که استرپتوزوتوسین داخل بطن مغزی در موش‌های سفید آزمایشگاهی توانسته بیان بتا آمیلوئید را در مغز حیوان افزایش‌دهد که خود ممکن است پروسه‌های التهابی در سیستم عصبی مرکزی را تقویت کند (۳۲) و رادیکال‌های آزاد به‌عنوان واسطه مسمومیت عصبی ناشی از پروتئین بتا آمیلوئید فرضیه‌ای مهم در ایجاد بیماری آلزایمر شناخته‌شده است. طبق گزارش‌های موجود، بتا آمیلوئید تولید رادیکال آزاد و اکسیداسیون لیپیدها را در سلول‌های عصبی PC12 افزایش‌داده، به مرگ سلولی منجر می‌شود و درمان با عصاره بوزیدان مانع ایجاد واکنش‌های اکسیداسیون ناشی از بتا آمیلوئید می‌شود (۳۳)؛ چهارم، در میان مکانیسم‌ها، پیشرفت LTP هیپوکامپ، نوعی فعالیت وابسته به تغییر شکل سیناپسی است که به‌احتمال، تحت حافظه و یادگیری قرار دارد (۳۴)؛ بنابراین با توجه به آثار مثبت بوزیدان بر روند LTP مکانیسم تقویت حافظه از این مسیر قوت‌می‌گیرد (۳۵).

در ادامه به‌منظور پاسخگویی به چگونگی اثردهی عصاره هیدرو الکلی گیاه بر بخش‌های حرکتی حیوانات مورد آزمایش، موش‌ها تحت آزمون با دستگاه روتارود قرار گرفتند. عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان اندیکس روانی-حرکتی گروه‌های مورد تحقیق نشان‌می‌دهد آثار مثبت گیاه بوزیدان بر حافظه و یادگیری ناشی از تغییرهای بنیادی در مکانیسم‌های حافظه و یادگیری است و ارتباطی خاص با وضعیت حرکتی حیوان ندارد، اگرچه تعداد سقوط بیشتر حیوانات در گروه استرپتوزوتوسینی و بوزیدان را نمی‌توان از نظر دورداشت.

درنهایت، تحقیق حاضر نشان‌داد که درمان با عصاره بوزیدان توانسته به‌طور معنی‌داری، مانع آسیب‌های حافظه ایجادشده از تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین شود؛ این نتیجه نشان‌دهنده توانایی احتمالی عصاره بوزیدان در جلوگیری از فراموشی پیری و اختلال‌های تخریب عصبی وابسته به سن و اختلال‌های شناختی است؛ به‌هرحال برای دیگر آثار

منابع

1. Squir LR, Kandle ER. Memory; from mind to molecules. Scientific American Library, 2000; 3-7.
2. Kandle ER, Schwarts JH, Jessell MT. Principles of neural Science. 4th ed. McGraw-Hill. 2000; 1130-275.
3. Thompson RF, Kim JJ. Memory systems in the brain and localization of a memory. Prot. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 438-44.
4. Zigmond O, Dar DE. Neuroactive steroids: their mechanism of action and their function in the stress response. Acta. Physiol. Scand. 1999; 167: 181-8.
5. Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 515-22.
6. Hamann S. Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. Trends in Cognitive Sciences. 2001; 5(9): 394-400.
7. Walsh TJ, Tilson HA, Dehaven DL, Mallman RB, Fisher A, Hanin I. AF64A, a cholinergic neurotoxin, selectively depletes acetylcholine in hippocampus and cortex, and produces long-term passive avoidance and radial arm maze deficits in the rat. Brain Res. 1984; 321(1): 91-102.
8. Lathe R. Hormones and the hippocampus. J Endocrinology. 2001; 196: 205-31.
9. Suzuki WA, Clayton NS. The hippocampus and memory: a cooperative and ethological perspective. Current Opinion in Neurobiology; 2000; 10: 766-73.
10. Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. Current Opinion on Neurobiology. 2001; 11: 180-7.
11. Akbarsha MA, Vijendrakumar S, Kadalmani B, Girija R, Faridha A. Curative property of Withania somnifera Dunal root in the context of carbendazim-induced histopathological changes in the liver and kidney of rat. Phytomedicine. 2000; 7(6): 499-507.
12. Gupta GL, Rana AC. Effect of Withania somnifera Dunal in ethanol-induced anxiety and withdrawal anxiety in rats. Indian J Exp Biol. 2008; 46(6): 470-5.
13. Prasad S, Malhotra CL. Studies on Withania ashwagandha Kaul. VI. The effect of the alkaloidal fractions (acetone, alcohol and water soluble) on the central nervous system. Indian J Physiol Pharmacol. 1968; 12(4): 175-81.
14. Konar A, Shah N, Singh R, Saxena N, Kaul SC, Wadhwa R, et al. Protective role of Ashwagandha leaf extract and its component withanone on scopolamine-induced changes in the brain and brain-derived cells. PLoS One. 2011; 6(11):272-5.
15. Nair V, Arjuman A, Gopalakrishna HN, Nandini M. Effect of Withania somnifera root extract on haloperidol-induced catalepsy in albino mice. Phytother Res. 2008; 22(2): 243-6.
16. Rasoolijazi H, Joghataie MT, Roghani M, Nobakht M. The beneficial effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate in an experimental model of Alzheimer's disease in rat: a behavioral analysis. Iran Biomed J. 2007; 11(4): 237-43.
17. Bhika R, Abdolhaq M. Tib b. Traditional roots of medicine in modern routes to health. Mountain of light publisher; South AFICA, 2001: 8-12.
18. Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity J Ethnopharmacol 2000; 71:23-43.
19. Nakamura-Craig M, Follenfant RL. Effect of lamotrigine in the acute and chronic hyperalgesia induced by PGE2 and in the chronic hyperalgesia in rats with streptozotocin-induced diabetes. Pain. 1995; 63: 33-7.
20. Swanston Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. Acta Diabetol Lat. 1989; 26(1): 51-5.
21. Mishra LC, Singh BB, Dagenais S. Scientific basis for the therapeutic use of Withania somnifera (ashwagandha): a review. Altern Med Rev. 2000; 5: 334-46.
22. Andallu B, Radhika B. Hypoglycemic, diuretic and hypocholesterolemic effect of winter cherry (Withania somnifera, Dunal) root. Indian J Exp Biol. 2000; 38:607-9.
23. Labak M, Foniok T, Kirk D, Rushforth D, Tomanek B, Jasiński A, et al. Metabolic changes in rat brain following intracerebroventricular injections of streptozotocin: a model of sporadic Alzheimer's disease. Acta Neurochir Suppl. 2010; 106: 177-81.
24. Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S, Roghani M. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid $\beta(1-40)$ rat model of Alzheimer's disease. Neurobiol Learn Mem. 2011; 95(3): 270-6.
25. Matsumoto M, Togashi H, Mori K, Ueno K, Ohashi S, Kojima T, et al. Evidence for involvement of central 5HT₄ receptors in cholinergic function associated with cognitive processes: behavioral, electrophysiological and neurochemical studies. J Pharmacol. Exp. Ther. 2001; 296(3): 676-82.
26. Parihar MS, Chaudhary M, Shetty R, Hemnani T. Susceptibility of hippocampus and cerebral cortex to oxidative damage in streptozotocin treated mice: prevention by extracts of Withania somnifera and Aloe vera. J Clin Neurosci. 2004; 11(4): 397-402.
27. Dhuley JN. Effect of ashwagandha on lipid peroxidation in stress-induced animals. J Ethnopharmacol. 1998; 60: 173-8.
28. Gupta GL, Rana AC. Protective effect of Withania somnifera dunal root extract against protracted social isolation induced behavior in rats. 2007; 51(4): 345-53.
29. Kuboyama T, Tohda C, Komatsu K. Neuritic regeneration and synaptic reconstruction induced by withanolide A. Br J Pharmacol. 2005; 144: 961-71.
30. Dhuley JN. Effect of ashwagandha on lipid peroxidation in stress-induced animals. J Ethnopharmacol. 1998; 60: 173-178.

31. Jain S, Shukla SD, Sharma K, Bhatnagar M . Neuroprotective effects of *Withania somnifera* Dunn. in hippocampal sub-regions of female albino rat. *Phytother Res.* 2001; 15(6): 544-8.
32. Kumar P, Kumar A . Possible neuroprotective effect of *Withania somnifera* root extract against 3-nitropropionic acid-induced behavioral, biochemical, and mitochondrial dysfunction in an animal model of Huntington disease. *J Med Food.* 2009; 12(3): 591-600.
33. Bhattacharya SK, Muruganandam AV. Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. 2003 ; 75(3): 547-55.
34. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Exploring the brain. Williams and Wilkins; 1996:402-432
35. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. The effect of naringenin on intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in rat. *Pharmacology.* 2006; 78(3): 193-97.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Seventeenth Year,
No.99
June, July
2012*

Received: 24/4/2012

Last revised: 25/6/2012

Accepted: 30/6/2012

The effect of oral feeding of *Withania somnifera* L. alcoholic extract on intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in male rat

Mohsen Khalili^{*}, Mohammadreza Vaez Mahdavi¹

1. Neurophysiology Research Center and Dept. Physiology, Shahed University, Tehran, Iran.

E-mail: najafabady@yahoo.com

Asbtract

Background and Objective: Alzheimer's disease is a prevalent central nervous system disease with no definitive treatment till now. So, in the present study the effect of an important herbal medicine, *withania somnifera* (Ws), was investigated on progression of Alzheimer's disease.

Materials and Methods: We used intracerebroventricular streptozotocin (STZ) injection as a model for Alzheimer's disease. Learning and memory performance was assessed using passive avoidance paradigm and for spatial cognition evaluation, Y maze task was used. The studied animals were divided into control, control+Ws, STZ and STZ+Ws. The STZ-injected rats received Ws extract (p.o) one day pre-surgery for three weeks and were then subjected to Y maze and passive avoidance learning and memory tests. Finally, the acquired data were subjected to proper statistical analysis.

Results: It was found out that treatment with the extract (200 mg/kg) could markedly increase the step through latency (STL) time (43.5 ± 3.48) as an index of recall in comparison to STZ-injected rats (33.1 ± 3.1). Also, alternation behavior as spatial memory index was augmented from 45.21 ± 4.81 in control animals to 67.68 ± 5.21 and 63.26 ± 6.27 in 100 and 200 mg/kg treated animal groups, respectively.

Conclusion: Therefore, chronic treatment with Ws extract could antagonize memory deficits induced by STZ-ICV injection in rats. Perhaps, this plant could be a potential factor in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD).

Key words: *Withania somnifera*, Streptozotocin, Alzheimer's disease, Rat