دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی– پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم– شماره ۹۹
تیر ۱۳۹۱

دریافت: ۹۱/۲/۵
آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۴/۵
پذیرش: ۹۱/۴/۱۰

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

نویسندگان: محسن خلیلی[1]*، محمدرضا واعظ مهدوی[1]
۱. استاد- گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و مرکزتحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
* نویسنده مسئول: محسن خلیلی E-mail: najafabady@yahoo.com

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 پرداخته‌شده‌است.

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 مآز Y شکل ارزیابی‌شد. حیوانات مورد تحقیق به گروه‌های کنترل، کنترل+درمان و تزریق استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین+درمان تقسیم‌شدند. موش‌های درمان، یک روز پیش از جراحی به مدت سه هفته عصاره بوزیدان را به شکل خوراکی دریافت و سپس به آزمون‌های یادگیری مآز Y شکل و آزمون احترازی وارد می‌شدند؛ درنهایت، داده‌های آزمون‌ها با تست‌های آماری مرتبط مورد مقایسه قرارمی گرفت.

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 (۳/۱۰ ± ۳۳/۱) به عدد معنی‌دار (۳/۴۸ ± ۴۳/۵) نزدیک‌کند؛ همچنین رفتار تناوبی به‌عنوان درصد حافظه فضایی، در موش‌های درمان‌شده با عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg به‌ترتیب ۵/۲۱ ± ۶۷/۶۸ و ۶/۲۷ ± ۶۳/۲۶ به‌دست‌آمد که نسبت‌به گروه کنترل (۴/۸۱ ± ۴۵/۲۱) افزایش معنی‌دار داشتند.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی، 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

مقدمه

بیماری آلزایمر، یک بیماری تحلیل‌برنده و پیش‌رونده سیتم عصبی مرکزی است که باعث زوال قوای عقلانی می‌شود؛ منشأ این بیماری به‌طور دقیق مشخص نیست ولی تغییرهایی متعدد مانند کوچک‌شدن مغز، ازبین‌رفتن 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 اتفاق‌می‌افتد و با ضعف دائم، تخریب حافظه ناشی از تخریب نورون‌های درگیر در حافظه پیش‌رونده و اضطراب‌های رفتاری شناخته‌می‌شود (۳) و بیشترین عامل رایج دمانس در بیماران مسن را تشکیل‌می‌دهد (٤). مشاهده‌شده‌است ایجاد رادیکال‌های آزاد با آسیب‌های حافظه‌ای در تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در مدل آلزایمری در موش‌های سفید آزمایشگاهی مرتبط است (۲و ۵) و نقش تزریق داخل‌بطنی استرپتوزوتوسین در ایجاد آسیب سیستم نوروترانسمیتری کولینرژیک به‌طور کامل شناخته‌شده‌است (٦)؛ به این ترتیب درحال‌حاضر، 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 ٤، ویتانوزید ٦ نشان‌داده‌شده‌است (۷). قسمت ریشه بوزیدان در طب سنتی به‌عنوان داروی ضداسپاسم، سم‌زدای عصبی استفاده‌شده‌است؛ همچنین عصاره خام و تصفیه‌شده آن در جلوگیری از تشکیل تومور (۸و ۹) اترواسکلروزیس (۱۰) و آسیب‌های کبدی نقشی بسزا دارد (۱۱). گزارش‌های موجود، نقش بوزیدان و ترکیب‌هایش را در تقویت حافظه و یادگیری نشان‌می‌دهد؛ برای نمونه مشخص شده که استفاده از عصاره بوزیدان می‌تواند آسیب‌های حافظه ناشی از اتانول را در مدل آزمون احترازی غیرفعال در موش کاهش‌دهد (۱۲و ۱۳)؛ همچنین به‌تازگی ثابت شده‌است که عصاره بوزیدان قادر است صدمه‌های حافظه شناختی را بی‌اثرکرده، اثر آسیب‌های ناشی از اسکوپالامین را در مدل احترازی غیرفعال در موش سفید آزمایشگاهی آنتاگونیزه‌کند (١٤و ١٥)؛ 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 پرداخته‌است.

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 تهیه‌شد. بوزیدان از فروشگاه محلی فراهم‌شد و سپس مطابق با اصول علمی بخش گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد، تأیید علمی و با جداسازی ناخالصی‌های احتمالی ریشه خالص خشک به‌دست‌آمد.

حیوانات

٤٨ سر موش سفید آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ویستار (تهران، انسیتو پاستور)، به وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم در شروع آزمایش انتخاب و به‌صورت رندوم در شش قفس در دما و رطوبت کنترل‌شده قرارگرفتند. حیوانات در سراسر طول آزمایش آزادانه به آب و غذا

دسترسی‌داشتند. همه آزمایش‌های رفتاری بین ساعات ۱۱ صبح تا ٤ بعدازظهر مطابق با اصل چهارم نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (NIH) انجام‌شد. در تحقیق حاضر، ٤٨ سر موش به شش گروه هشت‌تایی شامل ۱-کنترل؛ ۲- کنترل + Ws ۱۰۰ mg/kg؛ ۳- Ws ۲۰۰ mg/kg؛ ٤- آلزایمری (SAD)؛ ٥- SAD + Ws ۱۰۰ mg/kg و ٦- SAD + Ws ۲۰۰ mg/kg تقسیم‌شدند.

تهیه عصاره طبیعی

برای تهیه عصاره ۲٥۰ گرم ریشه بوزیدان تمیزشده را به کمک دستگاه آسیاب، خرد و با ۱ لیتر الکل حجمی ۷۰ درصد مخلوط‌کردیم. مخلوط مورد نظر برای ٤٨ ساعت در شرائط دمایی آزمایشگاه قرارگرفت سپس مخلوط طی سه بار گذشتن از صافی‌هایی با درجات تخلل بزرگ به کوچک‌تر به‌طور کامل صاف شد؛ سپس محلول فیلترشده در حمام آب ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت تا آب آن به‌طور کامل تبخیر شود؛ درنهایت، حدود ۱۸ تا ۲۰ گرم عصاره عسلی در ته ظرف باقی‌ماند که از آن برای تهیه دوز مورد نظر عصاره استفاده‌شد؛ برای این منظور، عصاره عسلی در نرمال سالین با دوز ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ تهیه و به‌صورت گاواژ به حیوان خورانده‌شد (۱۳و ١٤). تجویز خوراکی عصاره برای هر دوز یک روز پیش از جراحی به‌طور روزانه شروع و به مدت سه هفته کامل انجام‌شد.

روش آزمایش

جراحی استریوتاکسی

به‌منظور جراحی، موش‌ها با مخلوطی از کتامین ۱۰۰ mg/kg (داخل‌صفاقی) و زایلازین ٥ mg/kg (داخل‌صفاقی) بیهوش شده، داخل دستگاه استریوتکس قرارگرفتند (میله نگهدارنده دندان پیش ۳/۳ mm و میله نگهدارنده گوش به شکل متقارن قرارگرفت). پوست سر با محلول یددار پاک شد، جمجمه مطابق با اطلس استریوتکس با دریل در ۰/۸ mm عقب برگما، ۱/٤mm از کنار شکاف ساجیتال و ۳/٤ میلی‌متر در عمق سوراخ‌شد (١٦). هر دو گروه استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین تحت درمان با عصاره بوزیدان، استرپتوزوتوسین را به‌صورت تزریق دوطرفه داخل بطن مغز دریافت‌کردند (۳mg/kg). استرپتوزوتوسین به شکل تازه در CSF مصنوعی سرد حل شده، با حجم ۱۰ میکرولیتر در هر طرف تزریق‌می‌شد. تزریق استرپتوزوتوسین دومرتبه در روز سوم هم تکرارشد. در گروه شم، فقط ACSF ساخته‌شده (120mM NaCl; 3 mM KCl; 1.15 mM CaCl2; 0.8 mM MgCl2; 27 mM NaH2PO4 در PH= 7.2) به‌صورت داخل بطن مغزی تزریق‌شد. پس از عمل، مراقبت‌های ویژه‌ای انجام‌می‌شد تا تغذیه حیوان به‌صورت خودبه‌خودی برقرارشود.

آزمون‌های رفتاری

حافظه فضایی ماز Y شکل

دستگاه آزمایش ماز Y شکل از یک ماز سیاه‌رنگ متشکل از پلکسی گلاس ساخته‌شده‌است... هر بازو مآز Y شکل ٤۰cm طول، ۳۰cm ارتفاع و۱٥cm پهناداشته (۱٥و۱۷) و به‌صورت زاویه‌دار به شکل متساوی‌الاضلاع قرارمی‌گیرند (که با حروف A, B, C نشانه‌گذاری می‌شود)؛ هر موش در انتهای یکی از بازوها قرارگرفته، اجازه‌داده‌می‌شود تا به مدت ۸ دقیقه آزادانه در طول بازوهای ماز حرکت‌کند؛ ورود موش به هریک از بازوها مشاهده و به‌صورت دستی ثبت‌شد (برای نمونه: ... ,ACBABACACBCACAC). برای محاسبه درصد تناوب برای نمونه بالا به‌عنوان معیاری برای اندازه‌گیری حافظه فضایی هر موش به شکل زیر عمل‌می‌شود (۱۷). ابتدا تعداد بازوهای حرکت‌کرده در ۸ دقیقه به‌صورت سه‌تایی به نام ترياد دسته‌بندی‌می‌شوند (در نمونه بالا پنج ترياد یا پانزده بازو وجوددارد). از پنج ترياد دو تای آن غیرتکراری (زیر خط‌دارها) قراردارند. حال طبق فرمول زیر درصد تناوب یا حافظه هر موش محاسبه می‌شود.

$$\text{درصد تناوب} = \frac{\text{تریادهای غیرتکراری (در مثال بالا ۲ } \underline{ACB}, \underline{BCA}) = 6 \times 3}{\text{تعداد کل تریادها} = 5\times3-2=13)\ ACBABACACBCACAC} \times 100$$

$\%46/15 = 100\times6/13$ هر آزمون فقط یک بار برای هر حیوان انجام شد.

آزمون احترازی غیرفعال

دستگاه از یک اتاقک روشن تشکیل شده‌است که با 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 قرارداده‌می‌شوند تا به دستگاه عادت‌کنند؛ در روز سوم، آزمایشی اکتسابی انجام شد. موش‌ها به‌صورت انفرادی در اتاقک روشن قرارگرفتند. پس از گذشت ۲ دقیقه و عادت‌کردن آنها به محیط، درب گیوتینی باز شد و پس از ورود موش به اتاقک تاریک، درب بسته‌شده و یک شوک الکتریکی به دست و پای حیوان وارد شد (۱ میلی‌آمپر، ۱ ثانیه)؛ در اینجا تأخیر اولیه (Initial latency, IL) ورود به اتاقک تاریک ثبت‌شده، موش‌های با تأخیر اولیه بیشتر از ٦٠ ثانیه از مطالعه خارج شدند. یک روز بعد (روز چهارم)، موش‌های آزمون‌شده و دارای ثبت زمان تأخیر اولیه دومرتبه در اتاقک روشن قرارداده‌شوند 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 به‌ترتیب میزان اکتساب (Acquisition) و یادآوری (Retention) اطلاعات را سنجش‌می‌کنند. لازم به یادآوری است آزمون‌های حافظه و یادگیری سه هفته بعد از عمل جراحی استریوتاکسی انجام‌می‌شد.

اندکس تطابق روانی- حرکتی (Psychomotor Index, PMC)

پس از انجام آزمون ماز Y شکل، این آزمایش با دستگاه تردمیل (Treadmill) روتارود همراه با دستگاه تحریک‌کننده انجام‌شد؛ ابتدا موش‌ها روی میله چرخان قرارمی‌گرفتند تا راه‌رفتن را روی آن تمرین‌کنند؛ سپس به مدت ۵ دقیقه در جعبه‌ای با مشخصات زیر قرارگرفتند: سرعت اولیه=4rpm، سرعت نهایی= ۳۰ rpm، مدت زمان سرعت اولیه تا نهایی= ٤ دقیقه، شدت شوک= ۱/۱ میلی‌آمپر، مدت زمان شوک= ۸/. ثانیه، مدت زمان آزمایش= ۵ دقیقه، فاصله میان آزمایش‌ها= ۲ دقیقه. میانگین زمان ایستادن روی میله را به‌عنوان اندکس PMC ارزیابی می‌شود (۱۷)؛ میانگین تعداد افتادن هر حیوان نیز ثبت‌می‌شود.

آنالیزهای آماری

تمامی نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف‌معیار از میانگین بیان‌شده‌اند. با توجه به غیرپارامتریک‌بودن داده‌ها برای آزمون احترازی غیرفعال از آزمون غیرپارامتریک کروسکال-والیس استفاده‌شد که در صورت معنی‌داربودن، آزمون من-ویتنی برای مقایسه به‌کاررفت. داده‌های آزمون ماز Y شکل، توسط آزمون ویلکاکسون ارزیابی‌شدند. در پایان $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظرگرفته شد.

نتایج

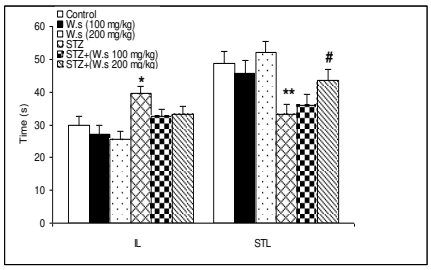
اثر مصرف خوراکی عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان بر میزان تأخیر اولیه (IL)

همان‌طورکه در نمودار شماره ۱ نشان‌داده‌می‌شود، ایجاد تأخیر اولیه در گروه‌های کنترل، بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg، استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین+ بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg به‌ترتیب به میزان ۲۹/۹، ۲۷/۱، ۲۵/٤۸، ۳۹/۵۵، ۳۲/٤۵و ۳۳/۲۱ ثانیه به‌دست‌آمد که با توجه به آنالز آماری این نتایج، میان میانگین تأخیر اولیه در گروه استرپتوزوتوسین و گروه کنترل اختلافی معنی‌دار وجودداشت ($P < ./۵$).

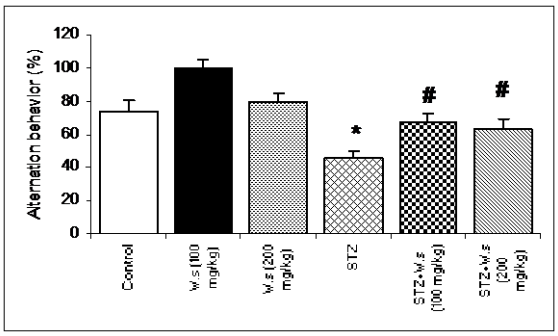
اثر مصرف خوراکی عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان بر میزان تأخیر حین عبور (STL)

میزان تأخیر حین عبور (STL) در گروه کنترل (٤۸/۸۸)، در گروه بوزیدان ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg

(به‌ترتیب ۴۵/۸و۵۱/۹۸)، در گروه استرپتوزوتوسین (۳۳/۱) و استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ به‌ترتیب ۳۵/۹۸ و۴۳/۵ به‌دست‌آمد (نمودار ۱). مقایسه داده‌ها اگرچه بیان‌کننده کاهش معنی‌دار در میزان تأخیر حین عبور (STL) در گروه‌های استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین + بوزیدان نسبت‌به گروه کنترل است، نشان‌می‌دهد درمان با دوز mg/kg ۲۰۰ عصاره از کاهش STL در گروه استرپتوزوتوسینی به میزان معنی‌داری می‌کاهد.



نمودار ۱. اثر عصاره هیدرو الکلی ریشه بوزیدان (۱۰۰و mg/kg ۲۰۰) برمیزان تأخیر اولیه (Initial latency, IL) و تأخیر حین عبور (Step through latency, STL) در موش‌های صحرایی نر. *و # (P< ۰/۰۵) به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف با گروه کنترل و STZ است. ** (P <۰,۰۱). n=۷. ستون‌ها نشان‌دهنده Mean± SEM است.



نمودار ۲. درصد رفتار تناوبی (Alternation behavior) در آزمون مآز Y در سه هفته پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های استرپتوزوتوسینی (STZ) . *و # (P< ۰/۰۵) به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف با گروه کنترل و STZ است. n=۷.ستون‌ها نشان‌دهنده Mean± SEM است.

اثر مصرف خوراکی عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه بوزیدان بر نقص حافظه فضایی در آزمون ماز

نمودار شماره ۲ میانگین خطوط رفتار تناوبی برای گروه‌های کنترل، بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰، استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ را به‌ترتیب ۷۳/۹، ۹۹/۹۸، ۷۹/۶۳، ۴۵/۲۱، ۶۷/۶۸ و۶۳/۲۶ درصد نشان‌می‌دهد؛ این نمودار بیان‌می‌کند که میانگین درصد رفتار تناوبی در گروه بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ نسبت‌به گروه کنترل افزایش‌داشته‌است.

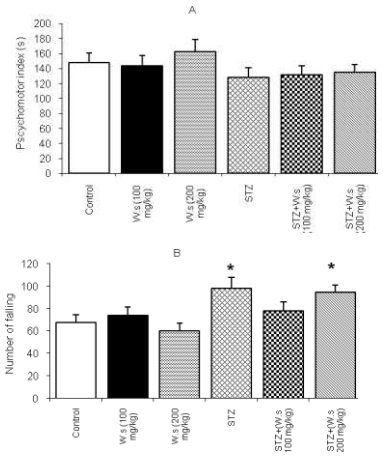
البته کاهش در گروه استرپتوزوتوسین وگروه‌های استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ وmg/kg ۲۰۰ نسبت‌به گروه کنترل دیده‌می‌شود ولی در گروه استرپتوزوتوسین + بوزیدان ۱۰۰ وmg/kg ۲۰۰ ، عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان به‌طور معنی‌داری توانسته‌است مانع کاهش حافظه ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین شود (p<۰,۰۵).

اثر مصرف خوراکی عصاره هیدروالکلی ریشه بوزیدان بر اندکس روانی حرکتی

همان‌طورکه در نمودار ۳ مشاهده‌می‌شود، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های آزمایش دیده‌نمی‌شود.

میانگین اندکس روانی حرکتی در تمام پنج زمان آزمایش‌ها برای گروه‌های کنترل، بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰، استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین+ بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ به‌ترتیب ۱۴۸، ۱۴۴، ۱۶۳، ۱۲۸، ۱۳۲و۱۳۵ محاسبه شد.

تعداد افتادن حیوان در گروه کنترل (۶۸)، بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ (به‌ترتیب ۷۴و۶۰)، استرپتوزوتوسین (۹۸) و در گروه استرپتوزوتوسین+ بوزیدان ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ (به‌ترتیب ۷۸و۹۵) به‌دست‌آمد. مقایسه داده‌ها نشان‌داد تعداد افتادن حیوان در گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین+ بوزیدان mg/kg ۲۰۰ نسبت‌به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار دارد ($p < ۰/۰۵$).



نمودار ۳. A- اندکس روانی حرکتی (Pscychomotor index) اندازه‌گیری‌شده توسط دستگاه روتارود.B- تعداد افتادن حیوانات از میله روتارود. * (P<۰/۰۵) نشان‌دهنده اختلاف با گروه کنترل و استرپتوزوتوسین (STZ) است. n=۷. ستون‌ها نشان‌دهنده Mean± SEM است.

بحث

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان‌می‌دهد که تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در مدل احترازی غیرفعال در موش‌های سفید آزمایشگاهی، کاهشی معنی‌دار در حافظه و یادگیری نشان‌داده، یک نقص حافظه فضایی در مدل مآزY شکل ایجادکرد و درمان موش‌های سفید آزمایشگاهی با عصاره گیاه بوزیدان به‌خصوص با دوز mg/kg ۲۰۰ به مدت سه هفته می‌تواند این وضعیت غیرنرمال را بهبودبخشد. با توجه به اینکه تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین به دنبال تخریب هیستولوژیک مغز، تخریب حافظه و مدلی مشابه بیماری آلزیمر را ایجادمی‌کند و برای این منظور دست‌کم سه هفته زمان لازم است، بنابراین در تحقیق حاضر، طول درمان موش‌ها با عصاره سه هفته درنظرگرفته‌شد.

براساس 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. هرچندکه مکانیسم بروز این اختلال‌ها به‌خوبی شناخته‌نشده‌است به‌طور کامل، مشخص شده‌است 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 قرارمی‌گیرند (۱۸)؛ در این ارتباط، تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در برخی نواحی مغزی به‌خصوص هیپوکامپ (۱۹) و ازطرفی‌دیگر، کاهش سطح فاکتورهای رشد شبه‌انسولین (IGF)[1] و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)[2] در برخی نواحی مغز می‌توانند برکسب اطلاعات، ذخیره و یادآوری اطلاعات (با اثرگذاری بر

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

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

درحقیقت، 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 (۲۲و ۲۳). در تحقیق حاضر که از استرپتوزوتوسین با دوز ۳mg/kg استفاده‌شد، نشان‌داده‌شد که این دوز هیچ‌گونه تغییری در سطح گلوکز خون محیطی ایجادنمی‌کند (داده‌ها چون هدف اصلی این تحقیق نبوده‌اند بیان‌نشده‌اند)؛ البته این دوز، نقصی معنی‌دار در حافظه همه حیوانات ایجادمی‌کند (۲٤). 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 مشاهده‌نشد. نتایج آزمون احترازی غیرفعال نشان‌داد که عبور تأخیری (STL) موش‌های سفید آزمایشگاهی استرپتوزوتوسینی به‌طور معنی‌دار کاهش‌یافت که به‌نظرمی‌رسد نشانگر آسیب به پروسه‌های حافظه و یادگیری باشد و بر این اساس، نتایج حاصل از آزمون احترازی غیرفعال است که نشان‌داد در موش‌های استرپتوزوتوسینی میزان خطای بیشتر و انتخاب‌های صحیح کمتری وجوددارد که نشانگر حالتی غیرنرمال در پروسه‌های حافظه فضایی است. براساس نتایج به‌دست‌آمده به‌نظرمی‌رسد 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 ایجادکرد. اثر مفید عصاره بوزیدان در این تحقیق می‌تواند به این مکانیسم‌ها نسبت‌داده‌شود: اول، مشخص شده‌است 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 مآز هشت پر (Radial arm maze) بررسی‌شده‌است (۲٤)؛ بنابراین خواص عصاره بوزیدان به‌عنوان محافظت‌کننده عصبی، آنتی‌اکسیدان و کاهش رادیکال‌های آزاد (۲۵) می‌تواند نقش آنتاگونیزه‌کنندگی بوزیدان درکاهش فعالیت شناختی حافظه‌ای را توجیه‌کند؛ همچنین درمان با عصاره بوزیدان موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و درنتیجه تخفیف دژنراسیون در نواحی قشری و هیپوکامپ می‌شود (۲٦و ۲۷)؛ ازطرفی، نتایج تحقیق‌های *کوپتا و همکارانش* (۲۰۰۷) نشان‌داد که تیمار با بوزیدان به یک فرم وابسته به دوز موجب کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون 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 خواهدبود (۲۸)؛ دوم اینکه بیماری آلزایمر توسط سطوح نوروترانسمیترهای مختلف و گیرنده‌ها و مارکرهای مرتبط مشخص می‌شود؛ جدا از این به‌شدت 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 به‌نظرمی‌رسد که افزایش سطح استیل کولین در بهبود علائم نقص حافظه در آلزایمر مفید باشد (۳۰).

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

کاهش‌دهد (۳۱و ۳۲)؛ به‌علاوه به‌تازگی بیان‌شده که استرپتوزوتوسین داخل بطن مغزی در موش‌های سفید آزمایشگاهی توانسته بیان بتا آمیلویید را در مغز حیوان افزایش‌دهد که خود ممکن است پروسه‌های التهابی در سیستم عصبی مرکزی را تقویت‌کند (۳۲) و رادیکال‌های آزاد به‌عنوان واسطه مسمومیت عصبی ناشی از پروتئین بتا آمیلویید فرضیه‌ای مهم در ایجاد بیماری آلزایمر شناخته‌شده‌است. طبق گزارش‌های موجود، بتا آمیلوئید تولید رادیکال آزاد و اکسیداسیون لیپیدها را در سلول‌های عصبی PC12 افزایش‌داده، به مرگ سلولی منجرمی‌شود و درمان با عصاره بوزیدان مانع ایجاد واکنش‌های اکسیداسیون ناشی از بتا آمیلویید می‌شود (۳۳)؛ چهارم، در میان مکانیسم‌ها، پیشرفت LTP هیپوکامپ، نوعی فعالیت وابسته به تغییر شکل سیناپسی است که به‌احتمال، تحت حافظه و یادگیری قراردارد (۳٤)؛ بنابراین با توجه به آثار مثبت بوزیدان بر روند LTP مکانسیم 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 قرارگرفتند. 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 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.

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 produses long-term passive avoidance and radial arm maze deficits in the rat. Brain Res. 1984; 321(1): 91-102.

8. Lathe R. Homones and the hippocampus. J Endocrinology. 2001; 196: 205-31.

9. Suzuki WA, Clayton NS. The hippocampus and memory: a cooparative 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 anxiolysis 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 β(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, etal. Evidence for involvement of central $5HT_4$ 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

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

Mohsen Khalili[1*] , Mohammadreza Vaez Mahdavi[1]

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, Alzhiemer's disease, Rat

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

Received: 24/4/2012
Last revised: 25/6/2012
Accepted: 30/6/2012

Daneshvar(medicine) shahed University/ 19th year/2012/NO.99