

بررسی عصاره گیاه زیرفون (*Tilia platyphyllos*) بر تخریب حافظه کاری القاء شده

با اسکوپولامین در موش های بزرگ سفید آزمایشگاهی نر نژاد ویستار:

مشارکت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی



سیاوش خیاط‌عمرانی^۱، فرهاد ولی‌زادگان^۱، باقر سیدعلیپور^{۲*} و احسان نظیفی^۳

^۱ ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه علوم جانوری

^۲ ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست سلولی و مولکولی

^۳ ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: تاریخ پذیرش:

چکیده

اسکوپولامین با ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های مغز، به ویژه کورتکس و هیپوکامپ، سبب ایجاد اختلال در حافظه می‌شود. گیاهان دارویی با ترکیبات موثر مختلف می‌توانند اثرات آنتی‌اکسیدانی داشته باشند. هدف این مطالعه تاثیر عصاره متانولی گیاه زیرفون بر استرس اکسیداتیو و اختلال حافظه کاری القاء شده با اسکوپولامین در موش های نژاد نر ویستار می‌باشد. در این مطالعه تجربی، ۳۶ موش نر ویستار به‌طور اتفاقی به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل، گروه اسکوپولامین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، گروه عصاره (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه های عصاره ۱۰۰، ۲۲۵ و ۳۰۰ به همراه اسکوپولامین که عصاره ها را به صورت گاواژ و اسکوپولامین را به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۰ روز دریافت کردند. پس از آزمون رفتاری تست شناسایی شی جدید (Novel Object Recognition Test)، نمونه برداری از بافت هیپوکامپ و کورتکس برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و استیل کولین استراز (AChE) انجام شد. نتایج ما نشان داد تزریق اسکوپولامین باعث کاهش شاخص تبعیض در NORT می‌شود. دوز ۳۰۰ عصاره دارای بالاترین تاثیر بود، به‌طوری که حتی در تجویز آن به همراه اسکوپولامین نیز کاهش معنی‌داری ($p < 0.001$) در تعداد خطاهای حافظه کاری ایجاد گردید. یافته های بیوشیمیایی در بافت‌های هیپوکامپ و کورتکس نشان داد که اسکوپولامین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT و SOD را کاهش و فعالیت AChE را افزایش داد. تیمار با عصاره زیرفون سبب برگرداندن فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و AChE شد. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که عصاره زیرفون دارای اثر تقویت‌کنندگی بر حافظه کاری بوده و اثر خود را عموماً از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌کند.

واژه های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسکوپولامین، حافظه کاری، زیرفون، کورتکس

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۰۵، پست الکترونیکی: b.seyedalipour@umz.ac.ir

مقدمه

شناختی است که مسئول حفظ اطلاعات آتی، دستکاری و استفاده از آنها در فرآیند تفکر، ادراک و استدلال می‌باشد (۳۵) قشر پیش‌پیشانی (PFC) به عنوان ساختاری شناخته شده است که به طور گسترده در فرآیندهای شناختی مثل

حافظه توانایی ثبت، حفظ اطلاعات و بازیابی همان اطلاعات در صورت نیاز است در حالی که یادگیری فرآیندی است برای کسب اطلاعات جدید در مورد رویدادهایی که رخ داده است (۸) حافظه کاری، کارکردی

نشان دهنده حساسیت مغز به استرس اکسیداتیو القا شده با مورفین، است (۱۹). ترکیبات طبیعی سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است مهمترین عامل در پیشگیری از بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو باشند. در همین راستا حاجی زاده و همکاران نشان دادند تیمار عصاره سیانوباکتری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز قشر مغز را بطور معنی‌داری تغییر می‌دهد (۱۷).

بسیاری از مطالعات اخیر نشان داد که اختلال در حافظه مدل حیوانی ناشی از اسکوپولامین، با افزایش استرس اکسیداتیو در مغز و تغییر در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مغز مرتبط است (۱۱). تولید بیش از حد ترکیبات اکسیدکننده همچون گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و یا عدم کارایی مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی سبب آسیب بافتی می‌شود (۳۳). در شرایط طبیعی، اغلب بین تولید رادیکال‌های آزاد از یک سو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر حالت تعادل وجود دارد (۳۹). یکی از مکانیسم‌هایی که ممکن است در بهبود اختلال حافظه ناشی از اسکوپولامین توسط ترکیبات فلاونوئیدی موثر باشد، بهبود عملکرد سیستم کولینرژیک و مهار آنزیم استیل کولین استراز، توسط این ترکیبات می‌باشد (۳۴). گیاه زیرفون (*Tilia platyphyllos*) متعلق به خانواده Tiliaceae است، که از چندین گونه تشکیل شده است، که در اروپا، آمریکای شمالی و آسیا توزیع شده است (۱۶). گیاه زیرفون یک درخت برگ‌ریز بزرگ است. در ایران بیشتر در سفیدرود گیلان، کجور، مینودشت، جنگل گلستان، جنگل‌های کوهستانی تنکابن و همین‌طور بلوچستان و بندرعباس پراکندگی دارند (۴۰). نام اروپایی آن Lime tree و Linden tree نام ایرانی آن زیرفون می‌باشد (۳۶). از مواد مؤثره این گیاه می‌توان به فلاونوئیدهای مختلف مانند تیلروزید، کوئرستین، ایزوکوئرستین، هایپروسید، روتون، کاتچین و آمینواسیدهای مختلف شامل آلانین و سیستین اشاره کرد (۴). فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدتوموری در

تفکر، استدلال، تصمیم‌گیری و برنامه‌ریزی نقش دارد (۳۸). جدیدترین مطالعات در زمینه‌ی تصویربرداری مغزی که با استفاده از پرتونگاری مقطعی با پرتو پوزیترون (PET) و تصویرسازی تشدید مغناطیسی کارکردی (fMRI) روی انسان انجام گرفته نشان دهنده‌ی افزایش جریان خون در قشر پیشانی در حین دوره‌ی تاخیری آزمون‌های مرتبط با حافظه‌ی کاری است (۲۱). شمار زیادی از نوروترانسمیترها برای عملکرد حافظه ضروری هستند. از جمله این نوروترانسمیترها می‌توان به استیل کولین، دوپامین و گلوتامات اشاره کرد (۲۲). انتقال عصبی دوپامین در قشر پیشانی برای حافظه‌ی کاری در انسان و جانوران اهمیت دارد. پژوهش انجام شده توسط برازوسکی برای نخستین بار نقش کاتکول آمین‌ها (دوپامین) را در حافظه‌ی کاری نشان داد. علاوه بر دوپامین، پژوهش‌های انجام شده روی میمون‌ها، رت‌ها و انسان نشان داد که سایر نوروترانسمیترهای تنظیم‌کننده بر حافظه‌ی کاری تأثیر می‌گذارند. برای مثال نوراپی نفرین از طریق آلفا-آدرنورسپتور و استیل کولین از طریق گیرنده‌های موسکارینی عمل می‌کنند (۵). طبق شواهد بدست آمده از مطالعات اخیر، داروهای آنتی‌کولینرژیک حافظه و یادگیری را در مدل‌های مختلف یادگیری تخریب می‌نمایند. به گونه‌ای که آگونیست رسپتورهای کولینرژیک و یا مهارکننده‌های استیل کولین استراز اثر مثبت و تقویت‌کننده‌ای بر حافظه دارند، در حالیکه آنتاگونیست رسپتورهای کولینرژیک نظیر اسکوپولامین باعث اختلال در حافظه می‌شوند (۴۱). اسکوپولامین از نظر ساختاری شبیه به انتقال دهنده عصبی استیل کولین است و عملکرد خود را با مسدود کردن گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین که منجر به اختلال عملکرد کولینرژیک و اختلال در یادگیری و حافظه می‌شود، انجام می‌دهد (۲۸). وقوع استرس اکسیداتیو در هیپو کامپ بعد از تیمار با مورفین مشاهده شد که با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز همراه بود. نتایج حاصل

بصورت گاوآژ دریافت کردند (۳۰). ۴- گروه عصاره ۱۵۰ به‌علاوه اسکوپولامین که اسکوپولامین را بصورت درون صفاقی و عصاره گیاه زیرفون (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت گاوآژ دریافت کردند. ۵- گروه عصاره ۲۲۵ به‌علاوه اسکوپولامین که اسکوپولامین را بصورت درون صفاقی و عصاره گیاه زیرفون (۲۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت گاوآژ دریافت کردند. ۶- گروه عصاره ۳۰۰ به‌علاوه اسکوپولامین که اسکوپولامین را بصورت درون صفاقی و عصاره گیاه زیرفون (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت گاوآژ دریافت کردند. تمام تیمارها به مدت ۱۰ روز و در ساعت ۸ الی ۱۰ صبح انجام شدند. آخرین گاوآژ برای هر حیوان ۲۴ ساعت قبل از کالبدشکافی آنها بود. تمامی حیوانات مورد آزمایش به جز گروه کنترل، طی یک بازه زمانی ۱۰ روزه، حلال‌ها و ترکیباتی که برای تیمار استفاده شدند را به صورت روزانه دریافت کردند. بعد از انجام تست رفتاری در روز یازدهم، بافت هیپوکامپ و کورتکس از بافت مغزی جدا و در نیتروژن مایع قرار داده شد و برای سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

عصاره گیری: در این تحقیق، گل‌ها و برگ‌های درخت زیرفون (نمدار) در اوایل تیر ماه سال ۱۳۹۸ (از شهرستان تنکابن، استان مازندران، ایران) جمع‌آوری شد. گل‌ها و برگ‌ها در شرایط سایه خشک و با آسیاب الکتریکی پودر شدند. سپس ۱۰۰ گرم از پودر گیاه با ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان، عصاره حاصل به‌وسیله کاغذ صافی و قیف بوخنر طی دو مرحله صاف گردید و با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی (LABFREEZ, RE-SPRO, TIWAN) در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد و تحت فشار خلا پایین تغلیظ شد. در نهایت عصاره تغلیظ شده با قرار دادن در دستگاه آون با دمای ۳۹ درجه سانتیگراد خشک گردید. پودر خشک عصاره توزین و توسط نرمال سالین برای به دست آوردن غلظت‌های مختلف حل گردید.

گیاهانی از جمله زیرفون دیده می‌شود (۶). گل و برگ زیرفون به دلیل داشتن مواد موثره از جمله فلاونوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی عمل می‌کنند (۷). با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی گیاه زیرفون، در این تحقیق بر آن شدیم تا اثر عصاره گیاه زیرفون بر تخریب حافظه کاری و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و استیل کولین استراز در کورتکس و هیپوکامپ القاء شده با اسکوپولامین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر پیردازیم.

مواد و روشها

طراحی آزمایش: این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران انجام شد. در این مطالعه تجربی ۳۶ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و محدوده سنی ۱۴-۱۲ هفته از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بابل خریداری شد و در اتاق حیوانات دانشکده زیست‌شناسی در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و آب و غذای مخصوص حیوانات به میزان کافی در دسترس آنها قرار گرفت. آزمایشات یک هفته بعد از انتقال موش‌ها به آزمایشگاه به منظور سازگاری با محیط آزمایشگاه انجام گرفت. کلیه آزمایشات مطابق آیین‌نامه اخلاقی کمیته اخلاق زیستی دانشگاه مازندران و با کد اخلاق زیستی (IR.U.M.Z.REC.1400.041) انجام شد.

در این تحقیق حیوانات مورد آزمایش به ۶ گروه ۶ تایی به این شرح تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل، که سالین را بصورت درون صفاقی و به صورت گاوآژ دریافت کردند. ۲- گروه عصاره ۳۰۰، که غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه زیرفون را به صورت گاوآژ دریافت کردند و سالین را بصورت درون صفاقی دریافت کردند (۱۹). ۳- گروه اسکوپولامین (بیمار)، که اسکوپولامین با غلظت یک میلی‌گرم بر کیلوگرم را بصورت درون صفاقی و سالین را

تست رفتاری

تست شناسایی شیء جدید (Novel Object Recognition Test)

تست شناسایی شیء جدید (Novel Object Recognition Test): تست شناسایی شیء جدید یک آزمون رفتاری است که به بررسی جنبه‌های مختلف یادگیری و حافظه در موش‌ها می‌پردازد. این آزمون در سه روز کامل می‌شود:

روز عادت در این دوره موش در محیط قرار گرفته و آن را شناسایی می‌کند.

روز تمرین در این روز که ۲۴ ساعت بعد از روز عادت است، حیوان در محیط قبلی با دو شیء جدید هم شکل قرار می‌گیرد.

روز آزمون موش در محیط قبلی با دو شیء، یکی آشنا و دیگری جدید قرار می‌گیرد.

محیط این آزمون، محیطی هندسی (مربعی شکل) با ابعاد ۶۰×۶۰×۴۰ سانتی‌متر و بدون هیچ شیء می‌باشد. در طول دوره تمرین موش‌ها اجازه دارند دو شیء را شناسایی کنند. جهت بررسی دقیق رفتارهای حیوان در طول مدت آزمون، دوربینی دیجیتالی در بالای محفظه تعبیه شد. در روز آزمون، یکی از اشیاء دوره تمرین با یک شیء جدید جایگزین می‌شود. موش‌ها معمولاً گرایش به شیء جدید دارند و اگر موش شیء آشنا را شناسایی کند، بیشتر زمانش را برای شناسایی شیء جدید صرف خواهد کرد. مداخلات درمانی می‌تواند قبل و بعد از تمرین یا پیش از به یاد آوردن آن چه یاد گرفته شده است، استفاده شود. پس از هر آزمون، کف محیط آزمایش با الکل تمیز شد. به طور کلی می‌توان اشاره کرد که آزمون Novel Object یک آزمون کم‌استرس و کارآمد برای ارزیابی حافظه، تغییرات روان‌شناختی - عصبی به دنبال اعمال مداخلات زیستی و ژنتیکی در حیوان می‌باشد. همچنین، این آزمون به منظور ارزیابی شناختی به خصوص بازیابی حافظه کاری در مدل‌های حیوانی موش دارای اختلالات سیستم عصبی

مرکزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای سنجش شاخص شناسایی از فرمول زیر استفاده شد (۲۴).

$$\text{شاخص شناسایی} = \frac{\text{زمان لمس شیء جدید}}{\text{زمان لمس شیء جدید} + \text{زمان لمس شیء قدیم}} \times 100$$

معادله محاسبه‌ی شاخص شناسایی

تهیه، جدا سازی و هموژن سازی بافت: پس از پایان آخرین تست های رفتاری، به منظور تعیین سنجش فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و استیل کولین استراز، موش های بزرگ سفید آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با استفاده از کلروفورم بیهوش و ناحیه هیپوکامپ و کورتکس مغز جدا سازی شد. جهت هموژن سازی هر یک از بافت‌ها (کورتکس و هیپوکامپ) از نیتروژن مایع استفاده شد. ابتدا بافت مورد نظر را در تانک نیتروژن مایع قرار داده، سپس بافت را از تانک خارج کرده و به هاون چینی انتقال داده، با فاصله زمانی چندین بار ازت مایع روی بافت ریخته تا بافت سفت و شکننده باقی بماند. همزمان بافت را کوبیده، به طوریکه بافت کاملاً خرد و پودری شکل شود. سپس بعد از تعیین وزن بافت هموژن شده آن را به لوله فالکون انتقال داده و به ازای هر گرم از بافت ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ مولار با pH=7/4 اضافه شد. سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت مایع شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های مورد نظر جداسازی گردید و تا زمان انجام آزمایش نمونه‌ها در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

تست های بیوشیمیایی

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت کورتکس و هیپوکامپ: اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز به روش (Aebi) با استفاده از سوبسترای پراکسید هیدروژن انجام شد. واکنش در کورت ۳ میلی‌لیتری انجام گرفت. حجم مخلوط واکنش شامل ۹۸۰ میکرولیتر محلول ۳۰ میلی‌مولار آب اکسیژنه و ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰

فسفات ۵۰ میلی مولار (pH 7.5) به همراه ۲۰ میکرولیتر از معرف ۱۰ میلی مولار DTNB و در نهایت با ۲۰ میکرولیتر استیل تیوکولین یداید با غلظت ۷۵ میلی مولار مخلوط گردید. پس از افزودن سوبسترا، سرعت تولید تیوکولین با پیگیری واکنش آن با DTNB و تولید آنیون زردرنگ ۲- نیترو-۵- مرکاپتو بنزوئیک اسید در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۵ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یکبار خوانده و ثبت شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه دارای آنزیم است. تنها تفاوت اینک نمونه شاهد فاقد آنزیم بوده و به جای آنزیم از بافر استفاده شد. فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول بر دقیقه در هر گرم بافت ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) گزارش شد (۱۲).

آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها: پس از جمع‌آوری داده‌ها تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. برای بررسی وجود اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و به دنبال آن از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش و اختلاف بین گروه‌ها با $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی شده است. برای آنالیز رفتاری و رسم نمودارها از نرم افزار PRISM و Excel استفاده گردید.

نتایج

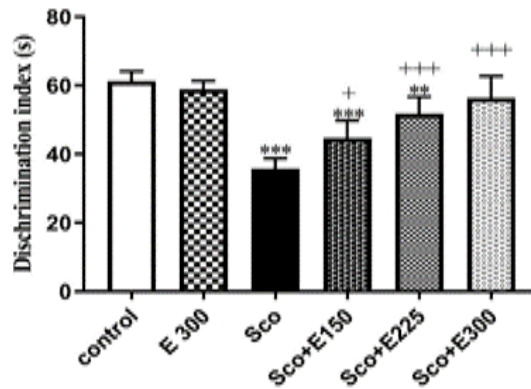
اثر عصاره زیرفون بر اختلالات حافظه کاری القا شده با اسکوپولامین در تست شناسایی شیء جدید: شاخص شناسایی شیء جدید (شاخص تبعیض) در گروه بیمار کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0.001$). گروه‌های اسکوپولامین تیمار شده با عصاره زیرفون در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در سطح ($P < 0.05$) و در غلظت‌های ۲۲۵ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در سطح ($P < 0.001$) افزایش معنی‌داری را نسبت به بیمار نشان دادند (شکل ۱).

میلی مولار با (pH 7) و ۲۰ میکرولیتر از نمونه آنزیم (سوپر ناتنت) بود. واکنش با افزودن سوبسترا شروع و تغییرات جذب در طول مدت ۲ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی ($39.4 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) براساس قانون بیرلامبرت ($A = \epsilon dc$) محاسبه و به صورت واحد بر گرم بافت (U/g tissue) گزارش شد. بر طبق تعریف، یک واحد کاتالاز مقدار آنزیمی است که موجب تجزیه یک میکرومول H_2O_2 در مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شود (۱).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در بافت کورتکس و هیپوکامپ: برای سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از روش اتواکسیداسیون پیروگالال استفاده شد. بدین منظور از بافر تریس-هیدروکلرید ۵۰ میلی مولار (pH 8.2) و EDTA یک میلی مولار و پیروگالال ۰.۲/۰ میلی مولار استفاده گردید. حجم ۲۹۰۰ میلی لیتر از بافر تریس-هیدروکلرید حاوی EDTA با ۵۰ میکرولیتر سوپرناتنت مخلوط و سپس ۵۰ میکرولیتر محلول پیروگالال به محلول فوق اضافه شد و سریعاً جذب در ۵ دقیقه با فاصله ۳۰ ثانیه‌ای در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری شاهد از اتواکسیداسیون پیروگالال به تنهایی استفاده شد و به جای آنزیم ۵۰ میکرولیتر بافر اضافه گردید و جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از اعداد بدست آمده درصد فعالیت آنزیم محاسبه شد. میزان فعالیت به صورت درصد مهارکنندگی آنزیم بیان شد (۲۵).

$$\text{درصد مهار پیروگالال} = (dA/dt_{\text{blank}} - dA/dt_{\text{sample}}) / dA/dt_{\text{blank}}$$

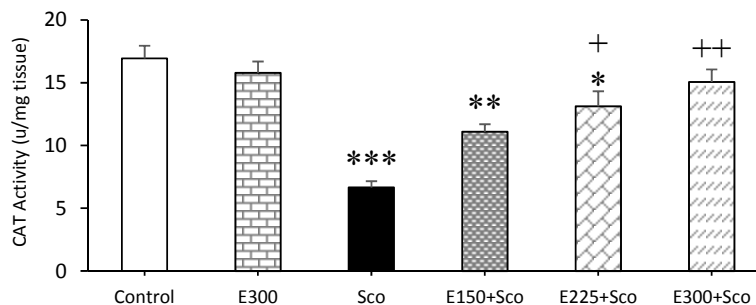
سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در بافت‌های کورتکس و هیپوکامپ: اساس این روش اندازه‌گیری سرعت تولید تیوکولین به عنوان محصول کاتالیز آنزیمی با استفاده از سوبسترای استیل تیوکولین می‌باشد. حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه آنزیم، ۲۹۵۰ میکرولیتر از بافر سدیم



شکل ۱- اثر تیمار عصاره گیاه زیرفون بر اختلالات حافظه القاء شده با اسکوپولامین در آزمون شناسایی شیء جدید. گروه سالین + سالین (Control)، گروه عصاره ۳۰۰ mg/kg + سالین (E300)، گروه اسکوپولامین + سالین (Sco)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۱۵۰ mg/kg (Sco+E150)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۲۲۵ mg/kg (Sco+E225)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۳۰۰ mg/kg (Sco+E300). جهت آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و برای مقایسه میانگین‌ها از تست تعقیبی توکی استفاده شد. در مقایسه با گروه کنترل $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ؛ در مقایسه با گروه تیمار $p < 0.001$ ، $p < 0.05$.

هیپوکمپ گروه‌های اسکوپولامین تیمار شده با عصاره زیرفون در غلظت ۲۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح $(p < 0.05)$ و در غلظت‌های ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح $(p < 0.01)$ افزایش معنی‌داری را نسبت به بیمار نشان داد (شکل ۲).

اثر عصاره زیرفون بر فعالیت آنزیم کاتالاز در هیپوکمپ موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین: فعالیت آنزیم کاتالاز در هیپوکمپ گروه اسکوپولامین (بیمار) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد $(p < 0.001)$. فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت

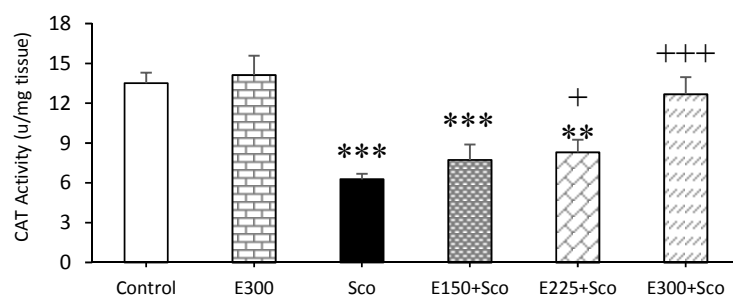


شکل ۲- اثر تیمار عصاره گیاه زیرفون بر فعالیت آنزیم کاتالاز در هیپوکامپ موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین

گروه سالین + سالین (Control)، گروه عصاره ۳۰۰ mg/kg + سالین (E300)، گروه اسکوپولامین + سالین (Sco)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۱۵۰ mg/kg (Sco+E150)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۲۲۵ mg/kg (Sco+E225)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۳۰۰ mg/kg (Sco+E300). جهت آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و برای مقایسه میانگین‌ها از تست تعقیبی توکی استفاده شد. در مقایسه با گروه کنترل $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$ ؛ در مقایسه با گروه تیمار $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$.

کورتکس گروه‌های اسکوپولامین تیمار شده با عصاره زیرفون در غلظت ۲۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح ($p < 0.05$) و در غلظت‌های ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح ($p < 0.001$) افزایش معنی‌داری را نسبت به بیمار نشان داد (شکل ۳).

اثر عصاره زیرفون بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کورتکس موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین: فعالیت آنزیم کاتالاز در کورتکس گروه اسکوپولامین (بیمار) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p < 0.001$). فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت



شکل ۳- اثر تیمار عصاره گیاه زیرفون بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کورتکس موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین

گروه سالیین + سالیین (Control)، گروه عصاره ۳۰۰ mg/kg + سالیین (E300)، گروه اسکوپولامین + سالیین (Sco)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۱۵۰ mg/kg (Sco+E150)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۲۲۵ mg/kg (Sco+E225)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۳۰۰ mg/kg (Sco+E300).

جهت آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و برای مقایسه میانگین‌ها از تست تعقیبی توکی استفاده شد.

$p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل

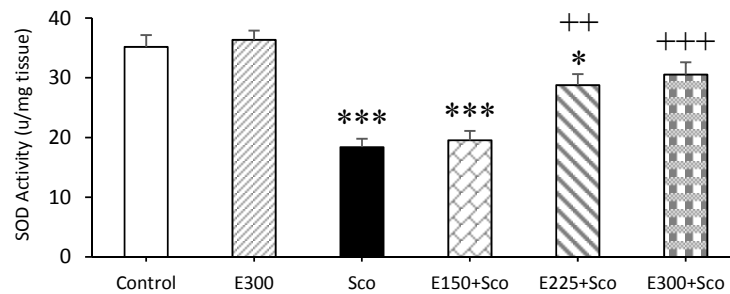
$p < 0.05$ +, $p < 0.001$ +++ در مقایسه با گروه اسکوپولامین (بیمار)

داری نشان داد ($P < 0.001$). فعالیت آنزیم SOD در بافت هیپوکمپ گروه‌های اسکوپولامین تیمار شده با عصاره زیرفون در غلظت ۲۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح ($p < 0.05$) و در غلظت‌های ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح ($p < 0.01$) افزایش معنی‌داری را نسبت به بیمار نشان داد (شکل ۵).

اثر عصاره زیرفون بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) در هیپوکمپ موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین: فعالیت آنزیم AChE در هیپوکمپ گروه اسکوپولامین (بیمار) در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.01$). تیمار گروه اسکوپولامین با غلظت‌های مختلف عصاره زیرفون، تنها در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه بیمار ($P < 0.01$) مشاهده شد (شکل ۶).

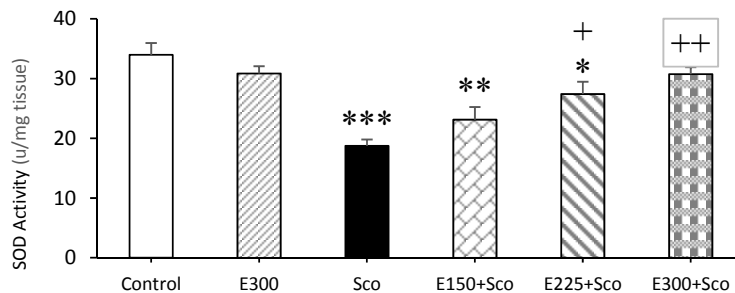
اثر عصاره زیرفون بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در هیپوکمپ موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین: فعالیت آنزیم SOD در هیپوکمپ گروه اسکوپولامین (بیمار) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.001$). فعالیت آنزیم SOD در بافت هیپوکمپ گروه‌های اسکوپولامین تیمار شده با عصاره زیرفون در غلظت ۲۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح ($p < 0.01$) و در غلظت‌های ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح ($p < 0.001$) افزایش معنی‌داری را نسبت به بیمار نشان داد (شکل ۴).

اثر عصاره زیرفون بر فعالیت آنزیم SOD در کورتکس موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین: فعالیت آنزیم SOD در کورتکس گروه اسکوپولامین (بیمار) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی



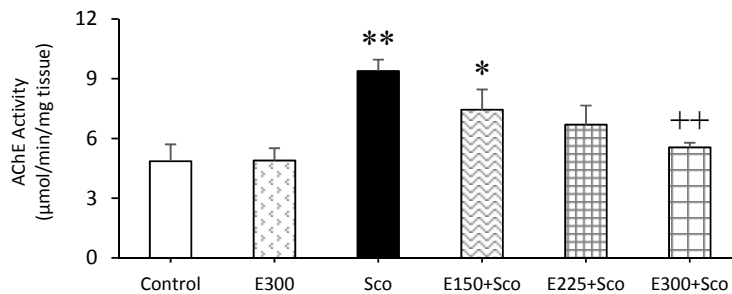
شکل ۴- اثر تیمار عصاره گیاه زیرفون بر فعالیت آنزیم SOD در هیپوکامپ موش های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین گروه سالین + سالین (Control)، گروه عصاره ۳۰۰ mg/kg + سالین (E300)، گروه اسکوپولامین + سالین (Sco)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۱۵۰ mg/kg (Sco+E150)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۲۲۵ mg/kg (Sco+E225)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۳۰۰ mg/kg (Sco+E300). جهت آنالیز داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و برای مقایسه میانگین ها از تست تعقیبی توکی استفاده شد. $p < 0.05$ ، $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل

$p < 0.01$ ، $p < 0.001$ در مقایسه با گروه اسکوپولامین (بیمار)



شکل ۵- اثر تیمار عصاره گیاه زیرفون بر فعالیت آنزیم SOD در کورتکس موش های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین گروه سالین + سالین (Control)، گروه عصاره ۳۰۰ mg/kg + سالین (E300)، گروه اسکوپولامین + سالین (Sco)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۱۵۰ mg/kg (Sco+E150)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۲۲۵ mg/kg (Sco+E225)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۳۰۰ mg/kg (Sco+E300). جهت آنالیز داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و برای مقایسه میانگین ها از تست تعقیبی توکی استفاده شد. $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل

$p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ در مقایسه با گروه اسکوپولامین (بیمار)

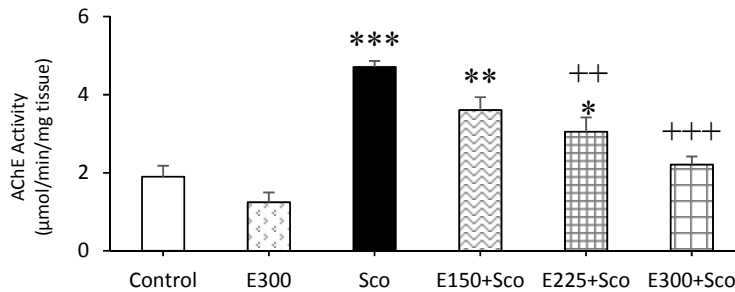


شکل ۶- اثر تیمار عصاره گیاه زیرفون بر فعالیت آنزیم AChE در هیپوکامپ موش های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین گروه سالین + سالین (Control)، گروه عصاره ۳۰۰ mg/kg + سالین (E300)، گروه اسکوپولامین + سالین (Sco)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۱۵۰ mg/kg (Sco+E150)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۲۲۵ mg/kg (Sco+E225)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۳۰۰ mg/kg (Sco+E300). جهت آنالیز داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و برای مقایسه میانگین ها از تست تعقیبی توکی استفاده شد. $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل

$p < 0.01$ در مقایسه با گروه اسکوپولامین (بیمار)

افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل داشت. گروه بیمار تیمار شده با عصاره زیرفون با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه بیمار کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم AChE کورتکس ($P < 0.001$) نشان داد (شکل ۷).

اثر عصاره زیرفون بر فعالیت آنزیم AChE در کورتکس موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین: فعالیت آنزیم AChE در کورتکس گروه اسکوپولامین (بیمار) تیمار شده با عصاره زیرفون در غلظت ۲۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار ($P < 0.01$) نشان داد در حالی که همچنان



شکل ۷. اثر تیمار عصاره گیاه زیرفون بر فعالیت آنزیم AChE در کورتکس موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القاء شده با اسکوپولامین. گروه سالیین + سالیین (Control)، گروه عصاره ۳۰۰ mg/kg + سالیین (E300)، گروه اسکوپولامین + سالیین (Sco)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۱۵۰ mg/kg (E150+Sco)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۲۲۵ mg/kg (Sco+E225)، گروه اسکوپولامین + عصاره ۳۰۰ mg/kg (Sco+E300). جهت آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و برای مقایسه میانگین‌ها از تست تعقیبی توکی استفاده شد. $p < 0.05$ ، * $p < 0.01$ ، ** $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. $p < 0.01$ ، †† $p < 0.001$ در مقایسه با گروه اسکوپولامین (بیمار).

شمار گسترده‌ای از پروسه‌های شناختی مثل برنامه ریزی، حل مسئله و تمرین در مدرسه، خواندن و درک مفاهیم ریاضی، هوش نقش دارد (۳). مطالعات بالینی قویا نقش کورتکس پیش‌پیشانی (PFC) را به عنوان مرکز اصلی پردازش فرایندهای مرتبط با حافظه کاری تایید می‌کنند. آدرین اون و همکارانش نشان دادند در بیمارانی که کورتکس پیش‌پیشانی آن‌ها آسیب دیده، اثرات اختلال در حافظه کاری را در تست برج لندن از خود نشان دادند (۲۹). مطالعات واکین فوستر در قشر پیش‌پیشانی نشان داد که در PFC چندین سیستم انتقال دهنده عصبی، به ویژه سیستم‌های دوپامینرژیک و کولینرژیک ارائه شده است (۱۸). لیان رابینسون و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نقش سیستم کولینرژیک بخصوص گیرنده‌های موسکارینی را در حافظه ادراکی، حافظه کاری و یادگیری تایید کردند

بحث و نتیجه‌گیری

یادگیری یک پدیده عصبی است که طی آن موجودات زنده از طریق تمرین، رفتار خود را تغییر می‌دهند، در حالی که حافظه به روند ذخیره سازی آموخته‌ها اطلاق می‌شود (۲۶). از این رو یادگیری و حافظه از عالی‌ترین سطوح عملکردی سیستم عصبی مرکزی محسوب می‌شوند (۱۳). علی‌رغم آنکه از دیرباز مطالعات و تحقیقات وسیعی بر روی حافظه صورت گرفته است، ولی از آنجایی که حافظه انواع بسیار گوناگونی دارد و مکانیسم‌های آن بخوبی شناخته نشده است، بنابراین همچنان جز مسائل مهم و مورد بحث و پژوهش است (۳۷). حافظه کاری مسئول پردازش و دست‌کاری اطلاعات در پروسه‌های شناختی بالاتر است. نشان داده شده که حافظه کاری در

مالون دی آلدئید در ناحیه هیپوکامپ شده است (۱۵). ساکورای و همکارانش در سال ۱۹۹۸ بر پایه ایجاد حالت استرس اکسیداتیو از اسکوپولامین (دوز ۱ mg/kg) استفاده کردند. نتایج حاصل از کار آنها نشان داد اسکوپولامین به طور قابل توجهی سطوح استیل کولین استراز (AChE) و مالون دی آلدئید (MDA) را در قشر و هیپوکامپ افزایش می‌دهد، همچنین سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همانند SOD و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) در اثر تجویز اسکوپولامین کاهش می‌یابد (۳۱). در این پژوهش به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه زیرفون بر تخریب حافظه کاری القا شده با اسکوپولامین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر برای اولین بار پرداخته شده است.

ماتسودا و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در بررسی اثر محافظ کبدی، عصاره گیاه زیرفون (در دوزهای ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نشان دادند که ترکیبات مختلفی از جمله آلانین، آلفاپینن، اوژنول، موسیلاژ، اسیدفنولیک، پروآنتوسیانیدین، ترکیبات فنولی، الکل‌های آروماتیک، آمینواسیدهایی مانند تیروزین و گلیسین، تربینول، توکوفرول در آن وجود دارد. با جداسازی هدایت شده با سنجش زیستی، شش گلیکوزید فلاونول مانند تیلروزوئید را از عصاره متانولی آن جدا کردند که خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی را در برابر استرس اکسیداتیو نشان دادند (۲۷). نتایج حاصل از درمان توسط عصاره ی زیرفون نشان داد، فلاونوئیدها مانند کورستین، ایزوکورستین، کاتچین و روتین و اسیدهای فنولیک مانند پروتوکاتکوتیک اسید و اپی‌کاتچین موجود در عصاره اتانولی گیاه زیرفون مانع از کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کورتکس و هیپوکامپ مغز موش می‌شود. همچنین، در روند افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش‌های تیمار شده با زیرفون، دوز ۳۰۰ اثرات افزایشی بهتری را نسبت به دوزهای ۱۵۰ و ۲۲۵ از خود نشان می‌دهد.

(۳۰). نشان داده شده است که آگونیست‌های سیستم کولینرژیک باعث تقویت یادگیری و حافظه می‌شوند ولی آنتاگونیست‌های آن باعث تخریب حافظه می‌شوند (۹).

اسکوپولامین یک آنتاگونیست کولینرژیک است که در انتقال استیل کولین در سیستم عصبی مرکزی اختلال ایجاد می‌کند (۳۲). در پژوهش حاضر، از اسکوپولامین به منظور تخریب حافظه کاری در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر استفاده شده است. در این پژوهش ۱۰ روز پس از تزریق اسکوپولامین جهت ارزیابی عملکرد حافظه کاری و یادگیری موش‌ها از آزمون شناسایی شی جدید استفاده گردید. در نتایج بدست آمده از این آزمون مشاهده شد شاخص تبعیض در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است که به خوبی اختلالات حافظه کاری را در موش‌های تیمار شده با اسکوپولامین را نشان می‌دهد. در همین راستا دودچنکو و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به منظور بررسی وظایف مرتبط با حافظه کاری در جوندگان از تست رفتاری شی جدید استفاده کردند (۱۰). در مطالعه ی کوبایاشی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ از آزمون شناسایی شی جدید برای سنجش حافظه کاری و یادگیری موش‌ها، استفاده شد. نتایج کار آنها نشان داد که شاخص تبعیض بعد از القای گابا در موش‌ها کاهش می‌یابد که نشان دهنده اختلال حافظه کاری در آنها می‌باشد (۲۳). آنالیزهای بیوشیمیایی در مطالعه حاضر نشان می‌دهند که اسکوپولامین باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت‌های هیپوکامپ و کورتکس مغز موش‌های گروه دریافت‌کننده شده است. نتایج حاصل از پژوهش فان و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با بررسی تأثیر زنجیره قند الیگوساکارید اسیدی بر اختلال حافظه ناشی از اسکوپولامین در موش بزرگ آزمایشگاهی اینطور نشان می‌دهد که، اسکوپولامین در موش‌های دریافت‌کننده آن موجب اختلال در حافظه، کاهش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) و افزایش سطح

در مطالعه حاضر به بررسی اثرات محافظت عصبی عصاره زیرفون در دوزهای مختلف، بر شاخص‌های رفتاری، وضعیت آنتی‌اکسیدانی در بافت کورتکس و هیپوکامپ پرداخته شد. نتایج حاصل از داده‌های رفتاری نشان دهنده ی بهبود در اختلالات حافظه و یادگیری القا شده با اسکوپولامین در گروه درمان شده با عصاره زیرفون می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کورتکس و هیپوکامپ حاکی از آن است که تیمار با عصاره زیرفون در غلظت‌های ۲۲۵ و ۳۰۰ موجب افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD می‌گردد. عصاره زیرفون غنی از ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. همچنین نتایج نشان دهنده ی اثر مهارى عصاره زیرفون بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در دوز ۳۰۰ می‌باشد. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مصرف عصاره زیرفون می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی برای درمان اختلالات حافظه و یادگیری القا شده با اسکوپولامین باشد. بنابراین با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و استفاده گسترده گل و برگ عصاره زیرفون در درمان بسیاری از بیماری‌ها، بررسی بخش‌های دیگر گیاه و همچنین ماده موثره گیاه زیرفون و مطالعه مکانیسم‌های مولکولی در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف اسکوپولامین به سایر پژوهشگران علاقمند به این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله نویسندگان این مقاله از مجموعه علوم زیستی دانشگاه مازندران برای فراهم نمودن امکانات مورد نیاز و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران به دلیل حمایت‌های مالی کمال سپاسگزاری را دارند.

بررسی‌های هم‌تیمی و همکاری‌ها در سال ۲۰۲۰ اثرات درمانی عصاره زیرفون (در دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را بر آسیب بافت بیضه القا شده توسط کلرید کادمیوم در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار نشان داده است. تیمار با عصاره اتانولی گیاه زیرفون با دوز ۴۰۰ آثار ناشی از سمیت کلرید کادمیوم ایجاد شده در بافت بیضه را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره گیاه زیرفون با اثر محافظتی خود سطح رادیکال‌های آزاد ناشی از کادمیوم را در بافت بیضه کاهش داد (۲۰). همانطور که می‌دانید، سیستم کولینرژیک نقش مهمی را در یادگیری و حافظه ایفا می‌کند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که اختلالات حافظه‌ای که با سیستم کولینرژیک مغز در ارتباط هستند مانند اختلالات حافظه ناشی از مصرف داروی اسکوپولامین، را می‌توان از طریق افزایش غلظت استیل‌کولین در شکاف سیناپسی، درمان نمود. این عمل را می‌توان با استفاده از مهار کننده‌های استیل‌کولین استراز (AChE) که از هیدرولیز استیل‌کولین جلوگیری می‌کنند، انجام داد (۲). ترکیبات عصاره گیاه ختمی دارای خاصیت ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و خاصیت مهار کننده‌ی آنزیم استیل‌کولین استراز می‌باشد و مطالعات نشان داد این ترکیبات سبب بهبود اختلالات حافظه اجتنابی در هیپوکامپ موش صحرایی نر نژاد ویستار می‌شوند (۱۴). در مطالعه‌ی پیش رو نیز فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در گروه دریافت کننده عصاره گیاه زیرفون به همراه دارو اسکوپولامین، کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه بیمار نشان داد. این نتایج نشان دهنده ی اثر مهارى ترکیبات موجود در گیاه زیرفون بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز می‌باشد.

منابع

- 1- Aebi H (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*, Academic press, 105: 121-126.
- 2- Ahmed T, & Gilani A.H (2009). Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity

and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(4): 554-559. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.09.010>

- 3- Benton A.L(1991). The prefrontal region: Its early history. In Levin, Harvey, S.; Eisenberg, Howard, M.; Benton, Arthur, L. (eds.). *Frontal lobe function and dysfunction*. New York: Oxford University Press: 19.
- 4- Brickman G (2000). *Herbal Medicine*. London, Integrative Medicine Communication:pp 240-242
- 5- Brozoski T.J, Brown R.M, Rosvold H.E, & Goldman P.S (1979). Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*, 205(4409): 929-932. <https://doi.org/10.1126/science.112679>
- 6- Cárdenas-Rodríguez N, González-Trujano M. E, Aguirre-Hernández E, Ruíz-García M, Sampieri A, Coballase-Urrutia E, & Carmona-Aparicio L (2014). Anticonvulsant and antioxidant effects of *Tilia americana* var. *mexicana* and flavonoids constituents in the pentylenetetrazole-induced seizures. *Oxidative medicine and cellular longevity*: 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/329172>
- 7- Czygan FC (1997). Linden (*Tilia spec.*)-Linden flowers. *Z Phytoter* 18: pp 242-246.
- 8- Devi W. B, Sengottuvelu S, Haja S. S, Lalitha V, & Sivakumar T (2011). Memory enhancing activities of *Ficus religiosa* leaves in rodents. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy (IJRAP)*, 2(3): 834-838.
- 9- Drevets W. C, & Furey M. L (2010). Replication of scopolamine's antidepressant efficacy in major depressive disorder: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Biological psychiatry*, 67(5): 432-438. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.11.021>
- 10- Dudchenko P. A (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(7): 699-709. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.002>
- 11- El-Sherbiny D.A, Khalifa A.E, Attia A.S, & Eldenshary E.S (2003). Hypericum perforatum Extract Demonstrates Antioxidant Properties against Elevated Rat Brain Oxidative Status Induced by Amnestic Dose of Scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76: 525-533. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.09.014>
- 12- Elluman G. L, Courtney D. K, Andreas V, & Featherstone R. M (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- 13- Eric R. Kandel, Yadin Dudai, & Mark R. Mayford (2014). *The Molecular and Systems Biology of Memory*. *Cell*, 157(1):163-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
- 14- Esllimi Esfahani, D., Oryan, S., & Hatami, M. (2018). Effect of Marshmallow extract on improving passive avoidance memory disorders in male Wistar rats. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(1), 14-24.
- 15- Fan Y, Hu J, Li J, Yang Z, Xin X, Wang J, & Geng M (2005). Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms. *Neuroscience letters*. 374(3): 222-226. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.10.063>
- 16- Fluke H (2000). *Medicinal plants*, 5th ed, Tehran, Roozbahan Publication: pp 97.
- 17- Fuster J. M (2008). *The prefrontal cortex*. London: Academic Press/ Elsevier.
- 18- Hajizadeh Moghaddam A, Amini S, Ebrahimi S, & Nazifi E (2021). Antidepressant and antioxidant effects of cyanobacteria *Nostoc commune* in a rat brain ischemia/reperfusion model. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(4): 319-331.
- 19- Haratian Z, Valizadegan F, & Seyedalipour B (2020). Protective effects of "Ziziphus jujuba" fruit extract on morphine-induced hippocampal oxidative stress and spatial memory impairment in rats. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 33(3): 244-256.
- 20- Hemmati Borujeni N, Eidi A, Oryan S, & Mortazavi P (2020). Effect of *Tilia platyphyllos* on Cadmium Chloride-Induced Testicular Damage in Adult Male Wistar Rats. *Research in Medicine*, 44(1): 270-275.
- 21- Jonides J, Smith E.E, Koeppel R.A, Awh E, Minoshima S, & Mintun M.A (1993). Spatial working memory in humans as revealed by PET. *Nature* 363: 623-625. <https://doi.org/10.1038/363623a0>
- 22- Kim, J. S., & Levin, E. D. (1996). Nicotinic, muscarinic and dopaminergic actions in the ventral hippocampus and the nucleus accumbens: effects on spatial working memory in rats. *Brain research*, 725(2), 231-240. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00213-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00213-2)
- 23- Kobayashi H, Thanapreedawat P, Inui N, Sakamoto K, Kim M, Yoto A, & Yokogoshi H (2013). GABA affects novel object recognition

- memory and working memory in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 59(2): 152-157. <https://doi.org/10.3177/jnsv.59.152>
- 24- Lueptow L.M (2017). Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 126: 55718. <https://dx.doi.org/10.3791/55718>
- 25- MarKlund S, & Marklund G (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- 26- Martinez JR, Joe L, & Raymond PK (1998). *Neurobiology of learning and memory*. San Diego: Academic Press.
- 27- Matsuda H, Ninomiya K, Shimoda H, & Yoshikawa M (2002). Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 10(3): 707-712. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00321-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00321-2)
- 28- Oh J.H, Choi B.J, Chang M.S, & Park S.K (2009). Nelumbo nucifera Semen Extract Improves Memory in Rats with Scopolamine-Induced Amnesia through the Induction of Choline Acetyltransferase Expression. *Neuroscience Letters*, 461: 41-44. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.045>
- 29- Owen A.M, Downes J.J, Sahakian B.J, Polkey C.E, & Robbins T.W (1990). Planning and spatial working memory following frontal lobe lesions in man. *Neuropsychologia*, 28(10): 1021-1034. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(90\)90137-d](https://doi.org/10.1016/0028-3932(90)90137-d)
- 30- Robinson L, Platt B, & Riedel G (2011). Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behavioural brain research*, 221(2): 443-465. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.055>
- 31- Sakurai T, Kato T, Mori K, Takano E, Watabe S, & Nabeshima T (1998). Nefiracetam elevates extracellular acetylcholine level in the frontal cortex of rats with cerebral cholinergic dysfunctions: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience letters*, 246(2): 69-72. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00244-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00244-4)
- 32- Shi J, Xue W, Zhao W. J, & Li K. X (2013). Pharmacokinetics and dopamine/acetylcholine releasing effects of ginsenoside Re in hippocampus and mPFC of freely moving rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(2): 2. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.147>
- 33- Sies H (1985). Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. *Oxidative Stress*: pp 73-90.
- 34- Tsai F-S, Peng W-H, & Wang W-H (2007). Effects of luteolin on learning acquisition in rats: involvement of the central cholinergic system. *Life sciences*, 80(18): 1692-8. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.055>
- 35- Vandierendonck A (2016). A Working Memory System with Distributed Executive Control. *Perspectives on psychological science: a journal of the Association for Psychological Science*, 11(1): 74-100. <https://doi.org/10.1177/1745691615596790>
- 36- Volak J Stodola JIRI (1997). *Text of medicinal plants*, Translator: Par Saed Zaman, 4th ed, Grund edition, Tehran: pp 322-3.
- 37- Weiten W (2013). *Variations in psychology* (9 ed.). Belmont, CA: Wadsworth: pp 281-282.
- 38- Yang Y, & Raine A (2009). Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis. *Psychiatry research*, 174(2): 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2009.03.012>
- 39- Zarban A, Malkaneh M, Hasanpour M, Najari M, & Abad M (2004). Evaluation of antioxidant properties in 28 herbs in Iran. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 11(1): 5-12.
- 40- Zargari A (1997). *Medicinal plants*, 7th ed, Vol 1, Tehran, Tehran University Publications: pp 399-402.
- 41- Zarrindast MR, Bakhsha A, Rostami P, & Shafaghi B (2002). Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Journal of psychopharmacology*, 16(4): 313-319. <https://doi.org/10.1177/026988110201600405>

Evaluation of Zirfon (*Tilia platyphyllos*) extract on scopolamine-induced working memory impairment in male Wistar rats; Involvement of antioxidant mechanisms

Khayatomrani S.¹, Valizadegan F.¹, Seyedalipour B.^{2*} and Nazifi E.³

¹ Dept. of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

² Dept. of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

³ Dept. of Plant Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

Abstract

Scopolamine impairs memory by causing oxidative stress in brain cells, especially the cortex and hippocampus. Medicinal plants with various effective compounds can have antioxidant effects. The aim of this study is to investigate the effect of the methanolic extract of Zirfon plant on oxidative stress and working memory impairment induced by scopolamine in male Wistar rats. In this experimental study, thirty-six male Wistar rats were randomly divided into six groups of 6. The control group, Scopolamine group (1 mg/kg), Extract Group (300 mg/kg), and Extract groups 100, 225, and 300 mg/kg together with scopolamine which received extracts as gavage and scopolamine intraperitoneally for 10 days. After performing the behavioral test of the New Object Identification Test (NORT), hippocampal and cortex tissues were sampled to measure the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and acetylcholinesterase (AChE). Our results showed that injection of scopolamine reduces the discrimination index in NORT. The dose of 300 extracts had the highest effect, so even in its administration together with scopolamine, a significant ($p < 0.001$) reduction in the number of working memory errors was created. Biochemical findings in hippocampus and Cortex Tissues showed that scopolamine decreased the activity of antioxidant enzymes (CAT and SOD) and increased the activity of AChE. Treatment with Zirfon extract restored the activity of SOD, CAT, and AChE. The results of this research indicate that Zirfon extract has a strengthening effect on working memory and generally exerts its effect through antioxidant activity.

Key words: Working memory; cortex; Scopolamine; Antioxidant; Zirfon