

بررسی اثرات عصاره میوه عناب (*Ziziphus jujube*) بر استرس اکسیداتیو هیپوکامپی و

اختلال حافظه فضایی القاء شده با مورفین در موش صحرایی نر

زهرا هراتیان^۱، فرهاد ولی زادگان^{۱*} و باقر سید علیپور^۲^۱ ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی^۲ ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست سلولی و مولکولی

تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۶

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۱۶



چکیده

هیپوکامپ یکی از نواحی اصلی دخیل در فرآیند یادگیری و اکتساب حافظه فضایی می‌باشد. داروهای اپیوئیدی مانند مورفین سبب اختلال در حافظه فضایی می‌شود. عصاره میوه عناب با خواص آنتی‌اکسیدانی سبب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره میوه عناب بر اختلال حافظه فضایی ناشی از مورفین و سنجش آنزیم‌های هیپوکامپی می‌باشد. در این مطالعه تجربی موش‌ها بصورت تصادفی به شش گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل، گروه مورفین ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین درون صفاقی، گروه‌های عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بعلاوه سالین، گروه‌های عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بعلاوه مورفین، عصاره را بصورت گاواژ و مورفین بصورت درون صفاقی به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. حافظه فضایی توسط آزمون ماز صلیبی بالاتر از زمینه ارزیابی شد. بعد از جداسازی و هموزن کردن بافت هیپوکامپ، سنجش آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و استیل کولین استراز انجام شد. زمان ورود به بازوی بسته (Time latency) گروه مورفین بیشتر از گروه کنترل بود. گروه عصاره عناب ۲۰۰ بعلاوه مورفین کاهش معنی‌داری در روزهای ۱۵ و ۱۶ ($P < 0/05$) و ۳۰ و ۳۱ ($P < 0/01$) نسبت به گروه مورفین در Time latency نشان داد. تزریق عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ به گروه مورفین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها نسبت به گروه مورفین شد اما معنی‌دار نبود ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که عصاره عناب اختلال حافظه فضایی القا شده با مورفین و زمان ورود به بازوی بسته کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: حافظه فضایی، هیپوکامپ، عصاره عناب، استرس اکسیداتیو، موش

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۶۳۸۵۵۵۷۵، پست الکترونیکی: farhabvalizadegan@gmail.com

مقدمه

از آنجا که قشر انتورینال می‌رود. قشر انتورینال محل اصلی ورود و خروج اطلاعات برای هیپوکامپ است (۲۶). به‌طور کلی جایگاه اصلی یادگیری و حافظه فضایی در هیپوکامپ بوده و یکی از راه‌های اکتساب یادگیری افزایش کارایی پایدار در انتقال سیناپسی و استفاده مکرر از سیناپس می‌باشد (۲). شمار زیادی از مطالعات در مورد سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلفی که در یادگیری و حافظه‌ای که وابسته به هیپوکامپ است، اشاره کرده‌اند که یکی از

حافظه فضایی نوعی حافظه است که به موجود زنده کمک می‌کند تا به خاطر بیاورد که اطلاعات کسب شده را در کجا به دست آورده و در کجا استفاده خواهد کرد. پردازش حافظه فضایی عمدتاً در ساختارهایی مثل لوب گیجگاهی و دیانسفالون میانی صورت می‌گیرد (۳۶). اطلاعات مربوط به حافظه خودآگاه ابتدا توسط یکی از قشرهای ارتباطی، نظیر پری فورنتال و سیستم لیمبیک جمع‌آوری شده و سپس وارد قشرهای پری رینال و پاراهیپوکامپ می‌شود و

می‌شود. طی دوران تکامل، سیستم‌های بیولوژیکی طبیعت با طراحی و ساخت آنتی‌اکسیدان‌ها جانداران را در مقابل اثرات زیانبار رادیکال‌های آزاد محافظت نموده‌اند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، شامل عوامل آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز و نیز عوامل غیرآنزیمی، نظیر ویتامین E، ویتامین C، کاروتنوئیدها، پلی-فنل‌ها و مولکول‌های دیگر می‌باشد که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در خنثی‌سازی بسیاری از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارند (۷). باوجود پیشرفت‌هایی که در علوم داروسازی و شیمی صورت گرفته اهمیت گیاهان دارویی روز به روز در حال افزایش است و به علت اثربخشی بالای و پرهیز از عوارض جانبی ناخواسته مورد توجه زیاد قرارگرفت. گیاه عناب بانام علمی (*Ziziphus jujube*) گیاهی درختی با خواص دارویی است که ارتفاع آن به ۱۰ متر نیز می‌رسد و متعلق به تیره عنابیان (*Rhamnaceae*) است. میوه زیتونی شکل عناب در ابتدا سبز بوده و پس از رسیدن به رنگ قرمز درآمده و چروک می‌خورد. عناب را خرماي قرمز و خرماي چینی نیز می‌نامند (۲۰). عناب از گیاهان بومی فلات ایران است و در استان‌های خراسان جنوبی، اصفهان، گلستان، مازندران، فارس، یزد، همدان و قزوین و برخی مناطق دیگر کشت می‌شود (۲۴). مطالعات نشان داد میوه عناب دارای ویتامین‌های A، C، E، کاروتنوئیدها و مواد معدنی خاص مانند روی و سلنیوم است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد موثر می‌باشد (۲۸). مطالعات فیتوشیمی وجود ترکیبات آلکالوئیدهای سیکلوپپتیدی، ساپونین‌های تریپنوئید، استروئول‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند پلی‌فنل‌ها از قبیل تانن‌ها و فلاونوئید را نشان داد. همچنین نقش کلیدی ترکیبات فنولیک در پاکسازی رادیکال‌های آزاد به اثبات رسیده است (۱۲). با توجه به مصرف زیاد میوه عناب در ایران، نقش آنتی‌اکسیدانی آن و پژوهش کم در ارتباط با نقش آن در اختلال حافظه فضایی، در این تحقیق بر آن شدیم تا اثر

مهم‌ترین آنها سیستم کولی‌نرژیک و دیگری سیستم دوپامینرژیک می‌باشد (۳۴ و ۴۰).

سیستم کولینرژیک در یادگیری و حافظه وابسته به هیپوکامپ شرکت دارد. داروهای اپیوئیدی مانند مورفین سبب کاهش انتقال دهنده استیل کولین و افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود و همچنین سبب اختلال حافظه فضایی می‌گردد (۳۴). مطالعات نشان داده‌اند مورفین روی یادگیری و حافظه به طریق مختلفی اثر می‌گذارند. آگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی μ مثل مورفین و یا اندورفین ممکن است آزادسازی کولینرژیک و نیز فعالیت آن را کاهش دهند (۲۱). استفاده مزمن از اپیات‌ها (نظیر مورفین و هروئین) سبب کاهش (LTP) در قسمت CA1 هیپوکامپ می‌شود و منجر به اختلال در کسب یا حفظ حافظه فضایی می‌گردد (۱۷ و ۱۹).

مورفین در ارتباط با استرس اکسیداتیو بسیار بیشتر از سایر مواد مخدر مورد توجه قرار گرفته است. به‌طور کلی، دو روش وجود دارد که چگونه مورفین می‌تواند در ایجاد استرس اکسیداتیو شرکت کند. مورفین می‌تواند تشکیل رادیکال‌های آزاد را افزایش دهد یا فعالیت اجزای مختلف سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های هدف را کاهش دهد (۳۲). بدیهی است که تشکیل ROS ناشی از مورفین و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، که در شرایط مختلفی مشاهده می‌شود می‌تواند منجر به آسیب اکسیداتیو در انواع مختلف مولکول‌های زیستی از جمله DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها شود (۲۷ و ۴۳). بنابراین استرس اکسیداتیو و آپوپتوز یکی از مکانیسم‌های سمیت عصبی ناشی از مورفین در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد و مورفین از طریق تولید رادیکال‌های آزاد سبب استرس اکسیداتیو در سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۱۴).

استرس اکسیداتیو، عبارت است از آسیب بافتی که در اثر تولید زیاد ترکیبات اکسیدکننده و یا عدم کارایی مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی یا حذف آنها ایجاد

۵- گروه عصاره ۱۰۰ بعلاوه مورفین، دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به صورت گاوآژ و ۳۰ دقیقه بعد مورفین را بصورت درون صفاقی دریافت کردند.

۶- گروه عصاره ۲۰۰ بعلاوه مورفین، دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به صورت گاوآژ و ۳۰ دقیقه بعد مورفین را بصورت درون صفاقی دریافت کردند.

تمام تیمارها به مدت سی روز و در ساعت ۸ الی ۱۰ صبح انجام شدند. آخرین گاوآژ برای هر رت ۲۴ ساعت قبل از سر بردن آن‌ها بود. تمامی حیوانات مورد آزمایش به جز گروه کنترل، طی یک بازه زمانی ۳۰ روزه، حلال‌ها و ترکیباتی که برای تیمار استفاده شدند را به صورت روزانه دریافت کردند.

در پایان دوره زمانی تیمارها (روز ۳۱)، بافت هیپوکامپ را از بافت مغزی جدا کرده، در نیتروژن مایع قرار داده و برای سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

عصاره گیری: در این تحقیق، میوه درخت عناب (*Zizyphus jujuba*) در اواخر ماه آبان سال ۱۳۹۶ (از منطقه شهرستان درگز، استان خراسان رضوی، ایران) جمع‌آوری شد و توسط دپارتمان سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران تأیید گردید. سپس میوه‌ها (دانه و پالپ) را دور از نور خورشید و در سایه خشک کرده و به وسیله آسیاب الکتریکی به پودر تبدیل شد. سپس مقدار ۱۰۰ گرم از پودر گیاه را در ظرف مخصوص ریخته و ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول به آن اضافه کرده و به مدت ۴ روز در دستگاه تکان‌دهنده (شیکر) قرار داده و سپس عمل صاف کردن با کاغذ صافی طی ۲ مرحله انجام گرفت. عصاره خالص به دست آمده بوسیله دستگاه تبخیرکن چرخان (روتاری) حلال پرانی و غلیظ گردید. عصاره خالص اتانولی به دست آمده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

عصاره میوه عناب بر استرس اکسیداتیو هیپوکامپی و اختلال حافظه فضایی القاء شده با مورفین در موش صحرایی نر را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روشها

این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران انجام شد. در این مطالعه تجربی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از پژوهشکده انستیتو پاستور آمل 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 جانوران با محیط آزمایشگاه انجام گرفت. کلیه آزمایشات مطابق آیین‌نامه اخلاقی کمیته اخلاق زیستی دانشگاه مازندران و با کد اخلاق زیستی (IR.UMZ.REC 1398.003) انجام شد.

در این تحقیق حیوانات مورد آزمایش به ۶ گروه ۷ تایی به این شرح تقسیم شدند.

۱- گروه کنترل، سالیان را بصورت درون صفاقی و به صورت گاوآژ دریافت کردند.

۲- گروه مورفین، سالیان را بصورت گاوآژ و ۳۰ دقیقه بعد مورفین را بصورت درون صفاقی دریافت کردند.

۳- گروه عصاره ۱۰۰، دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به صورت گاوآژ و ۳۰ دقیقه بعد سالیان را بصورت درون صفاقی دریافت کردند.

۴- گروه عصاره ۲۰۰، دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به صورت گاوآژ و ۳۰ دقیقه بعد سالیان را بصورت درون صفاقی دریافت کردند.

تست رفتاری

۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت مایع شفاف رویی برای سنجش آنزیم کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و استیل کولین استراز جداسازی گردید و تا زمان انجام آزمایش نمونه‌ها در فریزر نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت هیپوکامپ:
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز به روش (ابی) با استفاده از سوپسترای پراکسید هیدروژن انجام شد (۱). واکنش در کوط ۳ میلی‌لیتری انجام گرفت. حجم مخلوط واکنش شامل ۹۸۰ میکرولیتر محلول ۳۰ میلی‌مولار آب اکسیژنه و ۲ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با (pH=7) و ۲۰ میکرولیتر از نمونه آنزیم (سوپر ناتنت) می‌باشد. واکنش با افزودن سوپسترا شروع و تغییرات جذب در طول مدت ۲ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی (M-ICM-1) (۳۹/۴) براساس قانون بیرلامبرت ($A=\epsilon dc$) محاسبه و به صورت (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.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بافت هیپوکامپ: برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز از روش اتواکسیداسیون پیروگالل استفاده شد. بدین منظور از بافر تریس-هیدروکلرید ۵۰ میلی‌مولار با (pH= ۸/۲) و (EDTA) یک میلی‌مولار و پیرو گالول ۰/۲ میلی‌مولار استفاده گردید. ۲۹۰۰ میکرولیتر از بافر تریس-هیدروکلرید حاوی (EDTA) و با ۵۰ میکرولیتر سوپر ناتنت مخلوط و سپس ۵۰ میکرولیتر محلول پیروگالل به محلول فوق اضافه شده و تغییرات جذب طی ۵ دقیقه با فاصله ۳۰ ثانیه‌ی در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری اتواکسیداسیون پیروگالل به‌تنهایی به‌عنوان شاهد به‌جای سوپرناتانت ۵۰ میکرولیتر

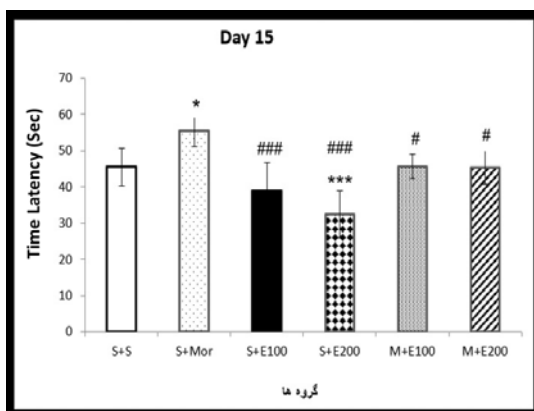
تست ماز صلیبی بالاتر از زمینه یا (Elevated EPM):
(Plus-Maze) برای سنجش میزان حافظه، دستگاه تست (Elevated Plus Maze) مورد استفاده قرار می‌گیرد که یک مدل انتخابی برای تعیین اثرات اضطرابی در جوندگان است. این ابزار یک ماز چوبی به شکل بعلاوه که بر چهار پایه استوار است. دو تا از بازوها فاقد دیواره جانبی و انتهایی هستند (بازوهای باز: 10×50 سانتی‌متر). دو بازوی دیگر، دارای دو دیواره جانبی و یک دیواره انتهایی هستند (بازوهای بسته: $40 \times 10 \times 50$ سانتی‌متر). در محل برخورد این چهار بازو، یک صفحه مربع شکل به ابعاد 10×10 سانتی‌متر قرار دارد. ارتفاع ماز از زمین، ۵۰ سانتی‌متر است. پیش از ورود به داخل ماز، حیوان به مدت ۵ دقیقه در یک جعبه چوبی به ابعاد ($35 \times 50 \times 50$) قرار داده می‌شود. هر حیوان به‌تنهایی در مرکز (EPM) به صورتی گذاشته می‌شود که صورت حیوان به سمت بازوی باز باشد و ۲ دقیقه در ماز به‌صورت آزاد حرکت کند. در این مدت ۲ دقیقه‌ی، فاصله زمانی که حیوان از بازوی باز وارد بازوی بسته می‌شود، ثبت می‌شود. در این پژوهش ما در روزهای ۱۵، ۱۶، ۳۰ و ۳۱ فاصله زمانی که حیوان طی کرده را برای ورود به بازوی بسته ثبت کردیم (۱۶).

تست‌های بیوشیمیایی

هموزن سازی بافت: جهت هموزن سازی ابتدا بافت هیپوکامپ را از بافت مغزی جدا کرده و در تانک نیتروژن مایع قرار داده شد. سپس بافت را از تانک خارج کرده و به هاون چینی منتقل گردید و با فاصله زمانی، چندین بار ازت مایع روی بافت ریخته شد تا بافت سفت و شکننده باقی بماند و همزمان بافت را کوبیده، به طوریکه بافت کاملاً خورد و پودری شکل شد. سپس بعد از تعیین وزن بافت هموزن شده آن را به لوله فالکون انتقال داده و به ازای هر گرم از بافت ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار با (pH= ۷/۴) اضافه شد. سپس با سرعت

نتایج

نتایج تأثیر دوزهای مختلف عصاره میوه گیاه عناب بر اختلال حافظه فضایی القاء شده با مورفین در روزهای ۱۵ و ۱۶: باتوجه به نمودار ۱، نتایج حاصل از تزریق درون صفاقی مورفین (۰/۵ mg/kg) و گاواژ دوزهای عصاره بر حافظه فضایی نشان داد که در دوز (۲۰۰ mg/kg) عصاره، زمان سپری شده ورود به بازوی بسته (Time latency) کاهش معناداری ($P < 0/001$) با گروه کنترل داشته است در حالیکه در گروه مورفین افزایش در (Time latency) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0/05$). در گروه‌های دریافت کننده عصاره، دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ در مقایسه با گروه مورفین تفاوت معنی‌داری نشان دادند ($P < 0/001$). در حالیکه تزریق عصاره‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به همراه مورفین کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) نشان دادند.



نمودار ۱- اثر عصاره عناب بر مدت زمان رسیدن به بازوی بسته در تست ماز صلیبی بالاتر از زمینه در روز ۱۵ تست رفتاری
* $P < 0/05$ نسبت به گروه کنترل *** $P < 0/001$ نسبت به گروه کنترل
$P < 0/05$ نسبت به گروه مورفین ### $P < 0/001$ نسبت به گروه مورفین

گروه کنترل، سالیین بعلاوه سالیین (S+S)، گروه سالیین به همراه مورفین (S+Mor)، گروه سالیین بعلاوه عصاره ۱۰۰ mg/kg (S+E100)، گروه سالیین بعلاوه عصاره ۲۰۰ mg/kg (S+E200)، گروه مورفین بعلاوه عصاره ۱۰۰ mg/kg (M+E100) و گروه مورفین

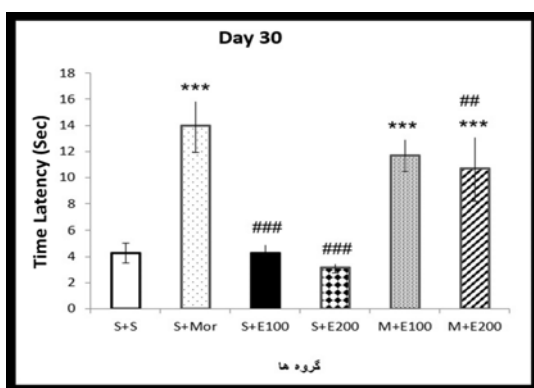
آب مقطر اضافه گردیده و به ترتیب فوق جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد و در صد مهار اتو اکسیداسیون پیروگالال از رابطه زیر محاسبه گردید (۲۵).

$$\text{درصد مهار پیروگالال} = \frac{(dA/dt_{\text{blank}} - dA/dt_{\text{sample}})}{dA/dt_{\text{blank}}} \times 100$$

سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بافت هیپوکامپ: اساس این روش اندازه‌گیری سرعت تولید تیوکولین به‌عنوان محصول کاتالیز آنزیمی به روی استیل تیوکولین به‌عنوان سوبسترا می‌باشد (۱۰). تیوکولین به‌محض تولید با ۵- دی تیو بیس- ۲- نیترو بنزوئیک اسید واکنش می‌دهد تا آنیون زرد رنگ ایجاد شود. ۱۰ میکرولیتر از نمونه آنزیم و ۲۹۵۰ میکرولیتر از بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار با (pH= ۷/۵) با ۲۰ میکرولیتر از معرف (DTNB) ۱۰ میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر استیل تیوکولین پدید با غلظت ۷۵ میلی مولار به‌عنوان سوبسترا اضافه گردید. پس از افزودن سوبسترا، سرعت تولید تیوکولین با پیگیری واکنش آن با (DTNB) و تولید آنیون زرد رنگ ۲- نیترو -۵- مرکاپتو بنزوئیک اسید در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب برحسب زمان (دقیقه) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۵ دقیقه در هر ۳۰ ثانیه یکبار خوانده و ثبت شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه دارای آنزیم است تنها تفاوت اینکه نمونه شاهد فاقد آنزیم بوده و به‌جای آنزیم از بافر استفاده شد. فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه در هر گرم بافت هیپو کمپ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) گزارش شد.

آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها: پس از جمع‌آوری داده‌ها تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار آماری (SPSS) نسخه ۲۱ انجام شد. برای بررسی وجود اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش و اختلاف بین گروه‌ها با ۰/۰۵ $P <$ معنی‌دار تلقی شده است.

عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هیچ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد. درحالی‌که تزریق دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره به همراه مورفین در مقایسه با گروه کنترل کاهش قابل‌توجهی در پارامتر مورد مطالعه ایجاد کرد ($P < 0/001$). گروه‌های دریافت‌کننده عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مورفین کاهش معنی‌داری در مدت زمان ورود به بازوی بسته ($P < 0/001$). تزریق دوز ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره همراه مورفین سبب کاهش اثر تخریب‌کنندگی ناشی از مورفین شد ($P < 0/01$).



نمودار ۳- تأثیر عصاره میوه گیاه عناب بر اختلال حافظه فضایی القاء

شده با مورفین در روز ۳۰ تست رفتاری

*** $P < 0/001$ نسبت به گروه کنترل

$P < 0/001$ نسبت به گروه مورفین

$P < 0/001$

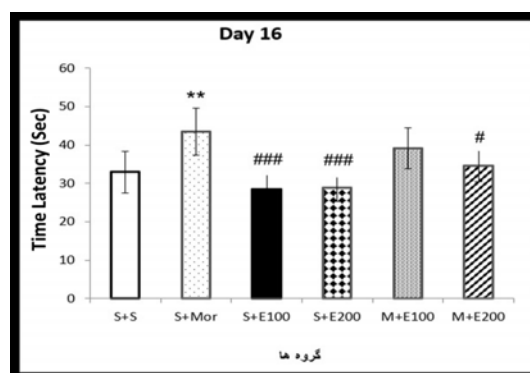
نسبت به گروه مورفین

گروه کنترل، سالین بعلاوه سالین (S+S)، گروه سالین به همراه مورفین (S+Mor)، گروه سالین بعلاوه عصاره ۱۰۰ mg/kg (S+E100)، گروه سالین بعلاوه عصاره ۲۰۰ mg/kg (S+E200)، گروه مورفین بعلاوه عصاره ۱۰۰ mg/kg (M+E100) و گروه مورفین بعلاوه عصاره ۲۰۰ mg/kg (M+E200). داده‌ها به صورت (Mean±SD) گزارش شد.

باتوجه به نمودار ۴ (تست در روز ۳۱)، گروه دریافت‌کننده مورفین در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که مورفین سبب کاهش در میزان حافظه فضایی گردید ($P < 0/01$). تزریق دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مورفین تفاوت چشمگیری را نشان داد ($P < 0/001$). تزریق دوز ۲۰۰

بعلاوه عصاره ۲۰۰ mg/kg (M+E200). داده‌ها به صورت (Mean±SD) گزارش شد.

باتوجه به نمودار ۲ (مربوط به تست روز ۱۶)، گروه دریافت‌کننده مورفین افزایشی را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0/01$). در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره، دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مورفین کاهش معنی‌داری در مدت زمان ورود به بازوی بسته ($P < 0/001$). تزریق دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره به همراه مورفین سبب برگرداندن اثر افزایشی مورفین بر پارامتر ذکر شده داشت ($P < 0/05$).



نمودار ۲- اثر عصاره عناب بر مدت زمان رسیدن به بازوی بسته در

تست ماز صلیبی بالاتر از زمینه در روز ۱۶ تست رفتاری

** $P < 0/01$ نسبت به گروه کنترل

$P < 0/05$ نسبت به گروه مورفین

$P < 0/001$ نسبت به

گروه مورفین

گروه کنترل، سالین بعلاوه سالین (S+S)، گروه سالین به همراه مورفین (S+Mor)، گروه سالین بعلاوه عصاره ۱۰۰ mg/kg (S+E100)، گروه سالین بعلاوه عصاره ۲۰۰ mg/kg (S+E200)، گروه مورفین بعلاوه عصاره ۱۰۰ mg/kg (M+E100) و گروه مورفین بعلاوه عصاره ۲۰۰ mg/kg (M+E200). داده‌ها به صورت (Mean±SD) گزارش شد.

تأثیر دوزهای مختلف عصاره میوه گیاه عناب بر اختلال حافظه فضایی القاء شده با مورفین در روزهای ۳۰ و ۳۱:

باتوجه به نمودار ۳ (تست در روز ۳۰)، تزریق مورفین سبب افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در مدت زمان ورود به بازوی بسته گردید که نشان دهنده کاهش میزان حافظه فضایی در تست به عمل‌آمده است ($P < 0/001$). تزریق دوزهای

*** $P < 0.001$ نسبت به گروه کنترل ** $P < 0.01$

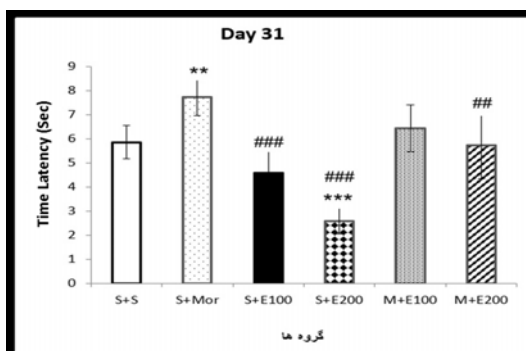
نسبت به گروه کنترل

$P < 0.001$ نسبت به گروه مورفین ## $P < 0.01$

نسبت به گروه مورفین

گروه کنترل، سالین بعلاوه سالین (S+S)، گروه سالین به همراه مورفین (S+Mor)، گروه سالین بعلاوه عصاره ۱۰۰ mg/kg (S+) E100، گروه سالین بعلاوه عصاره ۲۰۰ mg/kg (S+ E200)، گروه مورفین بعلاوه عصاره ۱۰۰ mg/kg (M+ E100) و گروه مورفین بعلاوه عصاره ۲۰۰ mg/kg (M+ E200). داده‌ها به صورت (Mean \pm SD) گزارش شد.

میلی‌گرم عصاره به همراه مورفین موجب برگرداندن اثرات تخریبی مورفین بر حافظه فضایی را نشان داد ($P < 0.01$).



نمودار ۴- تأثیر عصاره میوه گیاه عناب بر اختلال حافظه فضایی القاء

شده با مورفین در روز ۳۱ تست رفتاری

جدول ۱- تغییرات سطوح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و استیل کولین استراز (AChE) هیپوکامپ در

موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار در ۶ (n=۷)

بافت	آنزیم	گروه‌ها			
		کنترل	مورفین	عصاره ۱۰۰	عصاره ۲۰۰
	CAT	۵۵/۵۲ \pm ۲/۷۹	۳۶/۵۲ \pm ۴/۲۴ * *	۵۰/۸۲ \pm ۴/۹۷#	۵۴/۵۷ \pm ۲/۳۴###
هیپوکامپ	SOD	۴۷/۰۱ \pm ۳/۰۵	۳۲/۸۲ \pm ۴/۷۳ *	۴۷/۰۷ \pm ۱/۸۶#	۴۶/۹۶ \pm ۲/۵۹#
	AChE	۱۰/۷۵ \pm ۱/۱۳	۶/۱۷ \pm ۰/۲۹ * *	۱۰/۱۵ \pm ۱/۴۸#	۱۰/۰۶ \pm ۰/۵۵#

مقادیر نشان دهنده انحراف معیار \pm میانگین، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey

فعالیت آنزیم AChE برحسب $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ و فعالیت آنزیم CAT برحسب U/g tissue برای بافت هیپوکامپ گزارش شد.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل

$P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ تفاوت معنی‌دار با گروه مورفین

به ترتیب تغییرات معنی‌داری در سطح ($P = 0.046$) و ($P = 0.012$) نسبت به گروه مورفین نشان دادند. بین بقیه گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از آنالیز آماری نشان داد در گروه‌های مورد مطالعه تغییراتی معنی‌داری در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مشاهده شد ($P = 0.024$). تزریق عصاره عناب در گروه عصاره (mg/kg) ۱۰۰ و گروه عصاره (۲۰۰ mg/kg) افزایش معنی‌داری در سطح ($P = 0.033$) و ($P = 0.048$) به ترتیب نسبت به گروه مورفین نشان دادند. همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه مورفین ($32/82 \pm 4/7$) در مقایسه با گروه کنترل

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و استیل کولین استراز هیپوکامپ: نتایج این تحقیق نشان داد در گروه‌های مورد مطالعه، براساس آنالیز آماری همه گروه‌ها نسبت به هم تفاوت معنی‌داری در سطح ($P = 0.004$) نشان دادند. همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه مورفین ($36/52 \pm 4/24$) نسبت به گروه کنترل ($55/52 \pm 2/79$) کاهش معنی‌داری در سطح ($P = 0.007$) نشان داد. تزریق عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به گروه مورفین باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به گروه مورفین گردید اما این تغییرات معنی نبود. گروه‌هایی که عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌تنهایی دریافت کردند

فضایی و تأثیراتی که مورفین و عصاره عناب بر روی حافظه داشتند پرداختیم.

یافته‌های ما نشان می‌دهند که تجویز مورفین در روزهای ۱۵، ۱۶، ۳۰ و ۳۱ سبب کاهش یادگیری و حافظه گردید. در روز ۱۵، ۱۶ و ۳۰ تزریق دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ عصاره عناب سبب بهبود حافظه گردید و تزریق دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ عصاره به همراه مورفین اثرات مورفین را برگرداند. در همین راستا گزارش شده تجویز مورفین قبل از آموزش، یادگیری حیوانات را در (ماز Y) شکل و مدل‌های یادگیری احترازی فعال و غیرفعال مهار می‌کند. از طرفی دیگر تجویز مورفین باعث فراموشی در یادگیری احترازی غیرفعال می‌شود و چنانچه حیوانات مجدد تحت تجویز مورفین قرار بگیرند اختلال ذکر شده بهبود می‌یابد (۳). مکانیسم اثر تجویز حاد مورفین بر تخریب روندهای یادگیری و حافظه، در اثر وابستگی سیستم اپیوئیدی با سیستم کولینرژیک است. اپیوئیدها از جمله مورفین که تمایل بالایی برای گیرنده‌های μ اپیوئیدی دارند در پایانه‌های کولینرژیک در هیپوکامپ وجود دارند و اتصال مورفین به این گیرنده‌ها باعث مهار آزادسازی استیل کولین می‌گردد (۳۰). مطالعه ما نشان داد، دوز بالای عصاره سبب بازگرداندن اثرات منفی مورفین بر حافظه شد بطوریکه نسبت به گروه دریافت کننده مورفین کاهش قابل توجهی در مدت زمان ورود به بازوی بسته مشاهده شد. از یافته‌های فوق می‌توان نتیجه گرفت که تزریق عصاره گیاه عناب سبب بهبود حافظه می‌گردد و از سوی دیگر سبب برگرداندن آثار مورفین در کاهش حافظه می‌شود. در راستای این مطالعه، پژوهش کنرات و همکاران نیز نشان داد که استفاده مزمن مورفین یا هروئین منجر به اختلال در (LTP) در قسمت CA_1 هیپوکامپ می‌گردد (۱۸). مطالعات (in vivo) و (in vitro) نشان می‌دهد که مورفین تراکم خارهای محرک در هیپوکامپ را تنظیم می‌کند و باعث کاهش قابل توجهی در خارهای دندریتی هیپوکامپ می‌شود (۶). همانطوری که در نمودار ۱ تا ۴ تست رفتاری ماز

($47/01 \pm 3/05$) کاهش معنی‌داری در سطح ($P=0/035$) نشان داد. نتایج ما همچنین نشان داد گروه‌های مورفین بعد از دریافت عصاره میوه گیاه عناب، باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به گروه مورفین شدند اما این تغییرات معنی‌دار نبود.

نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از آنالیز آماری نشان داد در گروه‌های مورد مطالعه تغییراتی معنی‌داری در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مشاهده شد ($P=0/009$). همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در گروه مورفین ($6/7 \pm 0/29$) نسبت به گروه کنترل ($10/75 \pm 1/13$) کاهش معنی‌داری در سطح ($P=0/01$) نشان داد. تزریق عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به گروه مورفین باعث افزایش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نسبت به گروه مورفین گردید اما این افزایش معنی‌دار نبود. گروه‌هایی که عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌تنهایی دریافت کردند تغییرات معنی‌داری به ترتیب در سطح ($P=0/033$) و ($P=0/04$) نسبت به گروه مورفین نشان دادند. بین بقیه گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، مطالعات زیستی و رفتاری نشان می‌دهند که یادگیری و حافظه از فرایندهایی مجزا اما مرتبط با یکدیگر تشکیل شده‌اند. استیل کولین و گلوتامات نقش اساسی در تغییر شکل سیناپس، یادگیری و حافظه دارند. نشان داده شده است که آگونیست‌های سیستم کولینرژیک باعث تقویت یادگیری و حافظه می‌شوند ولی آنتاگونیست‌های آن تخریب حافظه را در پی دارند (۴۱). مهار گیرنده‌های موسکاربینی ناحیه CA_1 هیپوکامپ پستی توسط آتروپین، از ترجیح مکان القاء شده توسط مورفین ممانعت می‌کند که به نظر می‌رسد این اثر با کاهش یادگیری وابسته به پاداش میانجی‌گری می‌شود (۵). در این پژوهش ما به بررسی سیستم کولینرژیک و انتقال دهنده استیل کولین در حافظه

نقش مهمی در مهار آنزیم استیل کولین، افزایش سطح استیل کولین مغز و بهبود اختلالات یادگیری اجتنابی غیرفعال در هیپوکامپ موش صحرایی نر نژاد ویستار دارد (۱۱). عصاره جوجوبا اثرات نیروبخشی را در یادگیری و حافظه، تناسب حرکتی و اختلال رفتاری می‌گذارد. این اثر ممکن است ناشی از تأثیر عصاره جوجوبا بر روی فعالیت انتقال دهنده استیل کولین باشد (۳۵). استفاده از عصاره جوجوبا می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای گران‌قیمت و سنتتیک، برای درمان بیماری‌های مانند آلزایمر باشد (۴۲). بنابراین مطابق پژوهش حاضر در تست‌های رفتاری و آنزیمی مشاهده شد که عصاره جوجوبا اثرات تقویت‌کننده در یادگیری رفتار و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت استیل کولین استراز دارد.

مطالعات دیه و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد گالاتامین و فیزوستگمین دو ترکیب با ساختار آلکالوئیدی که همانند مهارکننده آنزیم کولین استراز می‌باشند، از طریق افزایش استیل کولین باعث کاهش اعتیاد به سیگار می‌شوند (۸). تحقیق پیاپی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ منجر به یافتن ترکیبات کومارینی با اثرات قوی مهار دو آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز شد (۳۰). مطالعات اینستروز و همکارانش مکانیسم اثر حفاظتی عصاره‌های گیاهی در مهار آنزیم کولین استراز را نشان داد. مشخص شده است که استیل کولین استراز باعث تسریع روند تشکیل فیبریل‌های بتا آمیلوئید می‌شود (۱۵).

نتایج پژوهش حاضر کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز گروه مورفین نسبت به گروه کنترل را تأیید کرد که نشان دهنده افزایش استرس اکسیداتیو ایجاد شده بوسیله مورفین در کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. تاتی و همکاران نشان دادند فعالیت کبدی و کلیوی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گروه دریافت‌کننده اتانول در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبد

صلیبی بالاتر از زمینه مشاهده می‌شود زمان سپری شده برای ورود به بازوی بسته (Time latency) گروه مورفین در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت که نشان دهنده اختلال در حافظه فضایی است. شواهد موجود نشان می‌دهند که مواد اویپوئیدی خروجی استیل کولین را از نواحی مغزی دخیل در یادگیری و حافظه کاهش می‌دهند. اما در برخی موارد دیده شده است با ثابت نگه داشتن دوز یک دارو و تکرار استفاده از آن، اثرات رفتاری متفاوتی بروز می‌کند (۱۲).

با توجه به نتایج به دست آمده فعالیت آنزیم استیل کولین استراز هیپوکامپ در گروه مورفین در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت. در نتیجه مورفین با کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و کاهش آزادسازی استیل کولین در فضای سیناپسی سبب کاهش حافظه فضایی می‌شود. سلیمان و همکاران نشان دادند مصرف زیاد اتانول، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را در هیپوکامپ حیوانات افزایش می‌دهد که با نتایج ما همخوانی ندارد (۳۳). همانطوریکه در نمودار ۷ نشان می‌دهد فعالیت آنزیم استیل کولین استراز هیپوکامپ در گروه عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ نسبت به گروه مورفین افزایش نشان داد. عناب با داشتن ویتامین‌های A، C، آلفا توکوفرول، کاروتین و ترکیبات فنولی دارای سطح بالای آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بطوریکه قرارگیری این ترکیبات در کنار هم موجب ایجاد اثرات هم‌افزایی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عناب می‌شود. گوی چچی و همکاران نیز در مطالعات خود اثرات آنتی‌اکسیدانی عناب و توانایی آن در کاهش استرس اکسیداتیو را تأیید کردند (۱۳).

مطالعات نشان داد که عصاره آلکالوئیدی (Lycopodium clavatum) و (Lycopodium thyoide) با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی باعث مهار آنزیم استیل کولین استراز دریافت‌های قشر مغز، هیپوکامپ و استریاتوم موش صحرایی می‌شود که با نتایج ما همخوانی ندارد (۱۸). پژوهش دیگر نشان داد عصاره هیدرو الکلی گل ختمی

مورفین باعث فعال شدن گیرنده‌های اوپیوئیدی μ (MOR) در نرون‌های هیپوکامپی، یک مرکز مهم برای یادگیری و حافظه، می‌شود. مطالعات کای و همکارانش نشان داد تغییرات سیناپسی ناشی از مورفین شامل یک مکانیسم جدید و مسیر مهم سیگنالینگ است که نیاز به فعال‌سازی متوالی گیرنده‌های اوپیوئیدی μ ، استرس اکسیداتیو، تولید گونه‌های اکسیژن فعال، استرس ER و اتوفازی می‌باشد (۴). شیانگچون و همکاران گزارش نمودند که ترکیبات موجود در عناب توانایی اتصال به رادیکال‌های آزاد کونجوگه را دارا می‌باشد از طرف دیگر عناب میزان تولید رادیکال‌های آزاد را کاهش داده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را بهبود می‌بخشد (۳۸). در سالهای اخیر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و یا غیرآزمی می‌مانند (BHT), (BHA), (TBHQ) به دلیل ایجاد سمیت و احتمال بروز سرطان‌زایی کم شده است و بیشتر از منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مخصوصاً گیاهی که سرشار از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می‌باشند استفاده می‌شود (۲۲). از این رو عصاره میوه عناب به‌عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهاب قوی طبیعی نقش مهمی را در پیشگیری و درمان بیماری ایفا می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که تزریق درون صفاقی مورفین، حافظه فضایی را کاهش داد. از طرفی بررسی میزان شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد که تزریق درون صفاقی مورفین به‌عنوان ماده‌ای که سبب افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود، موجب کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و استیل کولین استراز شده است. تجویز خوراکی عصاره عناب به موش‌های دریافت‌کننده مورفین موجب بهبود اختلالات حافظه القاء شده با مورفین و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم استیل کولین استراز گردید. همچنین تست‌های رفتاری نشان داد عصاره

و کلیه که عصاره عناب با دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ را به تنهایی و یا در کنار الکل دریافت کردند تأثیر معنی‌داری در مقایسه با گروه اتانول در کبد مشاهده نشد که با مطالعات ما هم‌خوانی دارد ولی در کلیه افزایش معنی‌داری مشاهده گردید که در تناقض با مطالعات ما می‌باشد (۳۷). مطالعات نشان داد که تجویز عصاره میوه گیاه عناب سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز هیپوکامپی می‌شود بطوریکه یافته‌های ما نقش آنتی‌اکسیدانی عصاره عناب و نقش محافظتی در پاسخ به (ROS) را تقویت می‌کند (۳۱). مطالعات نشان داده است که مصرف عصاره میوه (Z. Jujuba) با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی باعث افزایش فعالیت گلوکوتیون پراکسیداز در هیپوکامپ موش‌های تحت درمان با اتانول می‌شود (۲۹). محمدنژاد و همکاران نشان دادند مصرف نانوکریستال کوئرستین باعث افزایش میزان فعالیت حرکتی و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در مغز و همچنین اختلالات افسردگی و استرس اکسیداتیو القاء شده با کتامین را در مدل اسکیزوفرنی بهبود می‌دهد (۲۳). مطالعه شن و همکاران نشان داد موش‌های تیمار شده با کربن تتراکلرید بعد از دریافت عصاره الکی عناب در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش معنی‌دار فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کربن تتراکلرید شد که با نتایج ما مطابقت ندارد (۳۱). زو و همکارانش نشان دادند که تزریق مزمن هروئین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتیون پراکسیداز مغز کاهش می‌دهد (۳۹). مطالعات نقش اوپیوئیدها را در تضعیف مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی با ایجاد گونه‌هایی فعال اکسیژن مشخص کرد (۹). بنابراین مصرف عصاره عناب پاکسازی رادیکال‌های آزاد و نقش احتمالی آن در بهبود وضعیت سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی را مطرح می‌کند. بنابراین پاسخ‌های متفاوت در مطالعات مختلف می‌تواند به علت زمان، دوز، مسیر تزریق و حتی نوع بافت باشد.

این مقاله حاصل کار پایان‌نامه خانم زهرا هراتیان کارشناس ارشد فیزیولوژی می‌باشد. بدین‌وسیله از گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران و کارشناس آزمایشگاه خانم سارا رضایی که در امور آزمایش ما را یاری نمودند نهایت تشکر به عمل می‌آید.

عناّب با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش انتقال دهنده استیل کولین سبب کاهش زمان ورود به بازوی بسته شد. بنابراین عصاره میوه عناّب می‌تواند مغز را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از مورفین محافظت کند.

سپاسگزاری

منابع

- 1- Aebi, H., 1984. *Methods Enzymol*, 105, PP: 121 – 126.
- 2- Blokland, A., 1995. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Brain Res Rev*, 21(3), PP: 285-300.
- 3- Brühlmann, C., Ooms, F., Carrupt, P. A., Testa, B., Catto, M., Leonetti, F., and Carotti, A., 2001. Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase, *J Med Chem*, 44(19), PP: 3195-3198.
- 4- Cai, Y., Yang, L., Hu, G., Chen, X., Niu, F., Yuan, L., and Liu, H., 2016. Regulation of morphine-induced synaptic alterations: Role of oxidative stress, ER stress, and autophagy, *J Cell Biol*, 215(2), PP: 245–258.
- 5- Carrera, M. P., Carey, R. J., Dias, F. R. C., and De Matos, L.W., 2011. Reversal of apomorphine locomotor sensitization by a single post-conditioning trial treatment with a low autoreceptor dose of apomorphine: a memory re-consolidation approach. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 99(1), PP: 29-34.
- 6- Ceriello, A., Testa, R., and Genovese, S., 2016. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 26(4), PP: 285-292.
- 7- Da Silva Lopes, L., Marques, R. B., Fernandes, H. B., and Da Silva Pereira, S., Ayres, M. C., and Chaves, M. H., 2012. Mechanisms of the antinociceptive action of (–) Epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eic in rodents. *J Biomed Sci*, 19(1), 68 p.
- 8- Diehl, A., Nakovics, H., Croissant, B., Smolka, M. N., Batra, A., and Mann, K., 2006. Galantamine reduces smoking in alcohol-dependent patients: a randomized, placebo-controlled trial, *Int J Clin Pharmacol Ther*, 44(12), PP: 614-622.
- 9- Doyle, T., Bryant, L., Batinic-Haberle, I., Little, J., Cuzzocrea, S., Masini, E., Spasojevic, I., and Salvemini, D., 2009. Supraspinal inactivation of mitochondrial superoxide dismutase is a source of peroxynitrite in the development of morphine antinociceptive tolerance *Neuroscience*, 164, PP: 702-710.
- 10- Ellman, G. L., Courtney, D. K., Andreas, V., and Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*, 7, PP: 88–95.
- 11- Eslimi Esfahani, D., Oryan, S., and 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), PP: 1-15.
- 12- Giacobini, E., 2003. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 28(3-4), PP: 515-522.
- 13- Guiche, R., Tahrouch, S., Amri, O., El Mehrach, K., and Hatimie, A., 2015. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of 30 medicinal and aromatic plants located in the South of Morocco *Int j new technol res*, 1(3), PP: 7-11.
- 14- Guzmán, D. C., Va'zquez, I. E., Brizuela, N. O., Alvarez, R. G., Meji'a, G. B., Garcí'a, E. H., Santamarí'a, D., De Apreza, M. I., and Olguí'n, H. J., 2006. Assessment of oxidative damage induced by acute doses of morphine sulfate in postnatal and adult rat brain. *Neurochem Res*, 31, PP: 549–554.
- 15- Inestrosa, N. C., Urra, S., and Colombres, M., 2004. Acetylcholinesterase (AChE)-amyloid- β -peptide complexes in Alzheimer's disease. The Wnt signaling pathway, *Curr Alzheimer Res*, 1(4), PP: 249-254.
- 16- Itoh, J., Nabeshima, T., and Kameyama, T., 1990. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of

- nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology*, 101, PP: 27–33.
- 17- Kao, M., Ang, D., Pall, A. A., and Struthers, A., 2010. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J Hum Hypertens*, 24(1), PP: 1-8.
 - 18- Konrath, E. L., Neves, B. M., Lunardi, P. S., Dos Santos Passos, C., Simões-Pires, A., Ortega, M. G., and Henriques, A. T., 2012. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts. *J Ethnopharmacol*, 139(1), PP: 58-67.
 - 19- Kurutas, E. B., 2015. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress. *Nutr J*, 15(1), 71 p.
 - 20- Li, J. W., Fan, L. P., Ding, S. D., and Ding, X. L., 2007. Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujuba. *Food Chem*, 103, PP: 454-460.
 - 21- Li, Z., Wu, C. F., Pei, G., and Xu, N. J., 2001. Reversal of morphine-induced memory impairment in mice by withdrawal in Morris water maze: possible involvement of cholinergic system. *Pharmacol Biochem Behav*, 68, PP: 507–513.
 - 22- Mohamed, S. A., and Khan, J. A., 2013. Antioxidant capacity of chewing stick miswak *Salvadora persica*, *BMC Complement Altern Med*, 13(1), 40 p.
 - 23- Mohammadnejad bazkiyaei, S., Hajizadeh moghaddam, A., and Valizadegan, F., 2017. Antidepressant effects of quercetin and its nanocrystal on schizophrenia animal model with using forced swimming test. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 30(3), PP: 365-376.
 - 24- Mousavi, S. S., Miri, S. M., and Moradi, P., 2017. Optimization of micropropagation of jujube (*Zizyphus jujuba* cv. Tian-yuzao). *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 4(13), PP: 1-11.
 - 25- Marklund, S., and Marklund, G., 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, PP: 469-474.
 - 26- Nestler, E. J., 2004. Historical review: molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci*, 25, PP: 210–218.
 - 27- Ozmen, I., Naziroglu, M., Alici, H. A., Sahin, F., Cengiz, M., and Eren, I., 2007. Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress. *Neurochem. Res.*, 32(1), PP: 19-25.
 - 28- Pahuja, M., Mehla, J., Reeta, K. H., Joshi, S., and Gupta, Y. K., 2011. Hydroalcoholic extract of *Zizyphus jujuba* ameliorates seizures, oxidative stress, and cognitive impairment in experimental models of epilepsy in rats. *Epilepsy Behav*, 21(4), PP: 356-63.
 - 29- Pawlowska, A. M., Camangi, F., and Bader, A., 2009. Braca AFlavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chem*, 112(4), PP: 858-862.
 - 30- Piazzini, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M., Mancini, F., and Rampa, A., 2008. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(1), PP: 423-426.
 - 31- Shen, X., Tang, Y., Yang, R., Yu, L., Fang, T., and Duan, J. A., 2009. The protective effect of *Zizyphus jujube* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. *J Ethnopharmacol*, 122(3), PP: 555-560.
 - 32- Skrabalova, J., Drastichova, Z., and Novotny, J., 2013. Morphine as a Potential Oxidative Stress-Causing Agent. *Mini Rev Org Chem*, 10(4), PP: 367–372.
 - 33- Soliman, K. F., and Gabriel, N. N., 1985. Brain cholinergic involvement in the rapid development of tolerance to the hypothermic action of ethanol. *Gen. Pharmacol*, 16(2), PP: 137-140.
 - 34- Stancampiano, R., Cocco, S., Cugusi, C., Sarais, L., and Fadda, F., 1999. Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Neuroscience*, 89 (4), PP: 1135-43.
 - 35- Stark, G., 2005. Functional consequences of oxidative membrane damage, *J Membr Biol*, 205(1), PP: 1-16.
 - 36- Sweatt, J. D., 1999. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn Mem*, 6(5), PP: 399-416.
 - 37- Taati, M., Alirezaei, M., Meshkatsadat, M. H., Rasoulizadeh, B., Dezfolian, O., and Neamati, S.,

2011. Antioxidant effects of aqueous fruit extract of *Ziziphus jujuba* on ethanol-induced oxidative stress in the liver and kidney of male rats, *yafte*, 13 (2), PP: 54-68.
- 38- Xiangchun, S., Yuping, T., Ruihui, Y., Li, Y., Taihui, F., and Jin-ao, D., 2009. The protective effect of *Zizyphus jujube* fruit on carbon tetrachloride induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. *J Ethnopharmacol*, 122(3), PP: 555-60.
- 39- Xu, B., Wang, Z., Li, G., Li, B., Lin, H., Zheng, R., and Zheng, Q., 2006. Heroin administered mice involved in oxidative stress and exogenous antioxidant alleviated withdrawal syndrome, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 1, 99, PP: 153-161.
- 40- Zarrindast, M. R., Bakhsha, A., Rostami, P., and Shafaghi, B., 2002. Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *J Psychopharmacol*, 16(4), PP: 313-9.
- 41- Zarrindast, M. R., and Rezayof, A., 2004. Morphine state dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol*, 497, PP: 197-204.
- 42- Zhao, J., Li, S. P., Yang, F. Q., Li, P., and Wang, Y. T., 2006. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujuba* (*Suanzaoren*) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. *J Chromatogr A*, 1108(2), PP: 188-194.
- 43- Zhang, Y. T., Zheng, Q. S., Pan, J., and Zheng, R. L., 2004. Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants. *Basic Clin. Pharmacol, Toxicol* 95(2), PP: 53- 58.

Protective effects of "*Ziziphus jujuba*" fruit extract on morphine-induced hippocampal oxidative stress and spatial memory impairment in rats

Haratian Z¹., Valizadegan F¹. and Seyedalipour B².

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

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

Abstract

The hippocampus is one of the main areas involved in the learning and acquisition of spatial memory. Opioid drugs such as morphine cause spatial memory impairment. Jujube fruit extract with antioxidant properties reduces oxidative stress. The aim of the present study was to investigate the effect of jujube fruit extract on morphine-induced spatial memory impairment and enzyme assay in hippocampus of rats. In this experimental study, Forty two male rats were classified randomly into six groups of seven. The control group (saline and gavage), Morphine group: (0.5 mg / kg morphine ip), Group 3 and 4; (100 and 200 mg/kg extract + saline), Groups 5 and 6 (100 and 200 mg/kg extract + 0.5 mg/kg morphine) received extract as gavage and morphine intraperitoneally for 30 days. Space memory was evaluated by elevated plus maze test. After separation and hippocampus tissue homogenates, acetylcholinesterase, catalase and superoxide dismutase activity were measured. The time latency in morphine-treated group was higher than control. The extract group of 200 plus morphine showed a significant decrease in time latency on days 15 and 16 ($P < 0.05$) and on days 30 and 31 ($P < 0.01$) compared to morphine group. In the enzyme tests, injection of 100 and 200 extracts to morphine group increased enzyme activity compared to morphine group, but was not significant ($P > 0.05$). The results revealed that that jujube extracts attenuated morphine-induced memory impairment and time latency in rats.

Key words: Oxidative Stress, Jujube fruit extract, Hippocampus, Rat, spatial memory