

## اثر باکوپا مونرو بر اختلال حافظه فضایی و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تزریق موضعی اتیدیوم بروماید در هیپوکامپ موش صحرایی

سودا آقایی نوجه ده<sup>۱</sup>، حمیرا حاتمی نعمتی<sup>۱</sup>، محمد ملک احمدی<sup>۲</sup>، سید مهدی بانان خجسته<sup>۱</sup> و حاتم احمدی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی جانوری

<sup>۲</sup> ایران، تهران، کلینیک پارسه

<sup>۳</sup> ایران، تهران، دانشگاه فرهنگیان، گروه علوم پایه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۱۳

### چکیده

بیماری مالتیپل اسکلروزیس و نیز توکسین‌هایی مانند اتیدیوم بروماید موجب تخریب میلین نوروها می‌شود. ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی باکوپا مونرو در مطالعات قبلی گزارش شده است. هدف از این مطالعه بررسی تداخل اثر باکوپا مونرو و اتیدیوم بروماید بر حافظه فضایی و پراکسیداسیون لیپیدی در تشکیلات هیپوکامپ است. این مطالعه بر روی ۸ گروه ۷ تایی موش‌های صحرایی نر صورت گرفته است. سه روز پس از تزریق اتیدیوم بروماید یا باکوپا مونرو و نیز ترکیب این داروها در ناحیه CA1 هیپوکامپ، آزمون ماز آبی موریس به‌منظور سنجش پارامترهای حافظه فضایی مورد استفاده قرار گرفت. سپس پارامتر پراکسیداسیون لیپیدی در این ناحیه سنجش گردید. تزریق ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ به ناحیه CA1 موجب کاهش پارامترهای مرتبط با حافظه فضایی ( $P < 0/01$ ) و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی شد ( $P < 0/01$ ). همچنین بکارگیری دوز بی‌اثر ۵ میکروگرم باکوپا مونرو بر رت، اثر ناشی از تزریق سه روزه اتیدیوم بروماید بر حافظه فضایی را متوقف ( $P < 0/01$  و  $P < 0/001$ ) و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داد ( $P < 0/01$ ). باکوپا مونرو با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تزریق موضعی اتیدیوم بروماید، می‌تواند در بهبودی حافظه فضایی مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** باکوپا مونرو، اتیدیوم بروماید، حافظه فضایی، پراکسیداسیون لیپیدی

\*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۴۴۲۲۹۲۴، پست الکترونیکی: hahmadi@cfu.ac.ir

### مقدمه

(۱۳). تزریق مستقیم اتیدیوم بروماید ابزاری ساده برای القاء دژنراسیون سلول‌های عصبی است و به پژوهشگران کمک می‌کند تا فرایندهای دمی‌لیناسیون و ریمیلیناسیون را مطالعه کنند (۵). این ماده با تولید رادیکال‌های آزاد و القاء استرس اکسیداتیو می‌تواند موجب از بین رفتن آستروسیت-ها و اولیگودندروسیت‌ها شده که وظیفه‌ی کنترل فرایندهای دمی‌لیناسیون و ریمیلیناسیون را بر عهده دارند و در نهایت موجب تضعیف سد خونی-مغزی و نیز دمی‌لیناسیون نورونی شود (۵). همچنین دمی‌لیناسیون سمی توسط اتیدیوم

تخریب میلین نوروها (دمی‌لیناسیون) در بیماری مالتیپل اسکلروزیس و شرایط دیگری مانند ایسکمی مغزی و در معرض سموم مختلف رخ می‌دهد (۱۸). مطالعات نشان داده است که استرس اکسیداتیو به علت عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد، احتمالاً نقشی کلیدی در مکانیسم آسیب بافتی بیماری‌های دمی‌لیناسیون دستگاہ عصبی مرکزی ایفا می‌کند (۹). گزارش مربوط به بررسی پلاک‌های مالتیپل اسکلروزیس بیانگر افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد

حافظه فضایی مدل‌های تجربی دمیلین شده ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید بررسی گردید.

### مواد و روشها

در این تحقیق از رت‌های نر نژاد ویستار، تهیه‌شده از حیوان خانه‌ی پشمینه تبریز، در محدوده وزنی  $200 \pm 50$  گرم استفاده شد. به‌منظور کاهش استرس و عادت به شرایط آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، جانوران به مدت دو هفته در گروه‌های ۵ تایی در شرایط دمای ثابت محیطی ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) و تنظیم نور با دوره‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷ صبح) نگهداری می‌شدند. هنگام کار با رت‌ها موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت می‌شد. علت انتخاب موش‌های نر، تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها بود.

**وسایل و داروهای مورد استفاده:** دستگاه استریوتاکسی مدل Kopf جهت کانول‌گذاری مغز حیوان، دستگاه اسپکتروفتومتری، داروی اتیدیوم بروماید (به‌منظور دمیلیناسیون) خریداری شده از شرکت Sigma, St Louis (MO, USA)

برای تهیه عصاره از گیاه باکوپا مونرو با استفاده از حلال اتانولی، ۱۰۰ گرم پودر برگ‌های گیاه در یک لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۳ روز خیسانده شد. پس از صاف کردن محلول و حذف حلال تحت خلأ و در دمای  $50^\circ\text{C}$  تا ۶۰ در دستگاه سوکسله، عصاره بدست آمده تا زمان استفاده در یخچال و در دمای ۴ نگهداری شد. داروها بلافاصله قبل از آزمایش‌ها در محلول سالین استریل ۰/۹ درصد حل می‌شد. برای بیهوش کردن رت‌ها، تزریق درون صفاقی داروهای کتامین ( $100 \text{ mg/kg}$ ) و زایلین ( $5 \text{ mg/kg}$ ) متعلق به شرکت (Alfasan Chemical Co, Woerden, and Holland) با استفاده از سرنگ انسولینی صورت می‌گرفت و بلافاصله در دستگاه استریوتاکسی قرار داده می‌شدند. با

بروماید به طور معمول برای بررسی ظرفیت ترمیمی سیستم اعصاب مرکزی کاربرد دارد (۱۹). مطالعات تصویربرداری عصبی نشان داده که آتروفی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در اختلال حافظه‌ی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکروزیس دخیل است (۲۸). بیماری مالتیپل اسکروزیس، موجب اختلال در حافظه بلندمدت و حافظه کاری می‌شود (۶ و ۱۲). حساسیت و آسیب‌پذیری هیپوکامپ در مقایسه با دیگر نواحی مغزی، نسبت به محرک‌های تهدیدکننده و موتاژن همچون اتیدیوم بروماید بیشتر است (۷).

باکوپا مونرو (*Bacopa monirea*) (BM) که با نام براهمی (Brahmi) هم نامیده می‌شود و تشکیل‌دهنده اصلی داروهای گیاهی هند محسوب می‌شود. باکوپا مونرو گیاه کوچک خزنده‌ای با شاخه‌های بسیار، برگ‌های دراز و کوچک و گل‌های ارغوانی روشن از خانواده *Scrophulariaceae* است. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آن به طور گسترده شناخته‌شده و در مطالعات قبلی به آن اشاره شده است (۲۹). تجویز عصاره گیاه باکوپا مونرو با برگرداندن سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به سطح نرمال و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی موجب بهبودی استرس اکسیداتیو ناشی از ترکیباتی همچون دی‌هیدروژن پراکسید، سرب و سدیم نیتروپروساید می‌شود (۲۴). گزارش‌های زیادی مبنی بر اثر عصاره این گیاه در بهبودی حافظه و گسترش دندریتیک نورونی در هیپوکامپ مغزی آمده است (۲۱). آزمایشات بالینی مؤید اثر گیاه باکوپا مونرو در بهبود عملکرد حافظه‌ی افراد بالای ۵۵ سال می‌باشد (۱ و ۹).

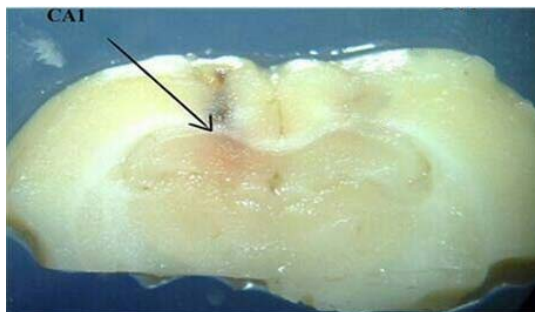
باتوجه به مطالعات پیشین مبنی بر اثرات مثبت و مفید آنتی‌اکسیدانها در درمان و بهبود علائم بیماری مالتیپل اسکروزیس (۸ و ۹) و نیز گزارش‌هایی مبنی بر اثرات حفاظتی باکوپا مونرو به‌عنوان یکی از قویترین آنتی‌اکسیدانها، در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر تزریق موضعی کوتاه‌مدت و بلندمدت عصاره الکلی این گیاه بر

شاهد که ۳ میکرولیتر سالیین را در ۳ دقیقه به مدت ۷ روز دریافت کردند. گروه‌های آزمایشی که حجم ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ را به مدت ۷ و ۳ روز دریافت کردند. گروه‌های آزمایشی دیگر، که دوزهای ۰/۱ و ۵ میکروگرم بر رت از عصاره الکلی باکوپا مونرو دریافت کردند. گروه آزمایشی آخر که یک هفته بعد از دریافت تک‌دوز ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ به مدت ۳ و یا ۷ روز، دوز بی‌اثر ۵ میکروگرم برای هر رت از عصاره الکلی باکوپا مونرو را دریافت کردند.

**بررسی حافظه فضایی:** سه روز پس از اتمام تیمار با دوزهای دارویی اتیدیوم بروماید یا عصاره الکلی باکوپا مونرو و نیز ترکیب آنها با همدیگر، به‌منظور سنجش پارامترهای مرتبط با حافظه فضایی، روش ماز آبی موریس مورد استفاده قرار گرفت. این دستگاه ساخت شرکت برج صنعت آزما از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه‌رنگ با قطر ۱۳۶ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متری از آب  $25 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد پر شده است. سکوی فلزی سیاه‌رنگ به قطر ۱۰ سانتی‌متر به‌طور ثابت و به‌صورت قراردادی در مرکز ربع دایره جنوب غربی قرار گرفته است. به‌این ترتیب که هر موش به مدت ۵ روز و هرروز در یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) در دستگاه ماز آبی موریس تحت آزمایش قرار می‌گرفت. پس از اتمام تجربه چهارم در هر نوبت، رت‌ها از دستگاه خارج و خشک می‌شدند. پارامترهای قابل اندازه‌گیری و مرتبط با حافظه فضایی در ماز آبی موریس عبارتند از: ۱- زمان پیدا کردن سکو ۲- مسافت طی شده برای پیدا کردن سکو، که این پارامترها به کمک دوربین نصب شده و نرم‌افزار Maze Router ثبت می‌شد (۳).

**سنجش پراکسیداسیون لیپیدی:** ابتدا موش‌ها با پنبه‌ی آغشته به اتر بی‌هوش می‌شدند و سر حیوان توسط گیوتین جدا و هیپوکامپ از مغز جدا شده و بلافاصله در نیتروژن مایع  $80^{\circ}C$  - به‌صورت فریزر نگه‌داری می‌شد. به‌منظور تهیه

استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات مغز رت (۲۵)، مشخصات ناحیه CA1 هیپوکامپ  $\{AP = -3/8\}$  (قدامی- خلفی)، از خط وسط  $ML = +2/2mm$  (میانی- جانبی)، از سطح حجمه  $DV = +2/7mm$  (شکمی- پشتی) به‌صورت یکطرفه را به‌دست آورده و کانول‌های راهنما با ضخامت ۲۳ گیج در ناحیه مذکور با دقت وارد می‌شد، طوری که درست در سطح بالایی ناحیه CA1 قرار گیرد (شکل ۱). اطراف کانول‌های روی استخوان حجمه، ترکیب آکریل مخصوص دندانپزشکی و مونومر آن ریخته می‌شد، طوری که کانول‌ها در بالای ماده آکریل جهت تزریق قابل دسترس باشد. در پنج تا هفتمین روز دوره بهبودی بعد از جراحی، موش‌ها آماده تزریق و آزمون بودند. برای تزریق دارو در روز اجرای آزمون از سر سوزن ۲۷ گیج دندان‌پزشکی (شرکت سوپا، ایران) که طول آن ۲mm بلندتر از کانول راهنما بوده و به لوله پلاستیکی متصل به سرنگ همپلتون ۱۰ میکرولیتری بود استفاده می‌شد.

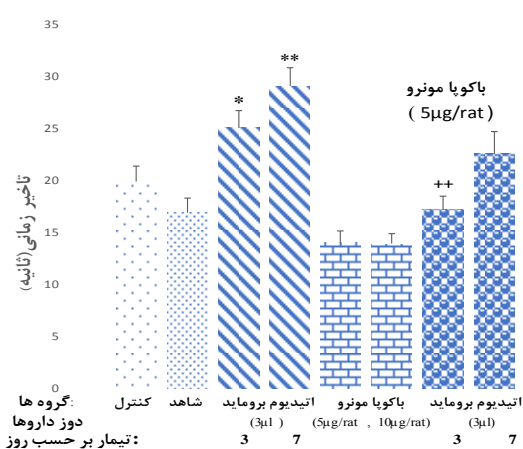


شکل ۱- جایگاه تقریبی محل کانول وارد شده به‌طرف چپ ناحیه CA1 هیپوکامپ

حجم تزریق برای تمام داروها در هر نوبت ۳ میکرولیتر به مدت ۳ دقیقه (۱ میکرولیتر در هر دقیقه) بود. الگوی حجم تزریق و مدت‌زمان آن، بر پایه تحقیقات قبلی و نیز پاسخ دوزی دارویی بوده است (۲ و ۱۰). تمام تزریق‌های دارویی در ناحیه CA1 هیپوکامپ صورت گرفت.

رت‌ها در قالب ۸ گروه آزمایشی ۷ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل، که هیچ‌گونه تیماری اعمال نگردد. گروه آزمایشی

اتیدیدوم بروماید ۰/۰۱ به ناحیه CAI هیپوکامپ مغزی باعث افزایش زمان یافتن سکو در دوره‌های ۳ روزه ( $P < 0/05$ ) نمودار ۱، طرف چپ) و ۷ روزه ( $P < 0/01$ )، نمودار ۱، طرف چپ) و نیز افزایش مسافت طی شده در دوره ۷ روزه ( $P < 0/01$ )، نمودار ۲، طرف چپ) نسبت به گروه کنترل شد. نتایج نشان داد که تزریق ۳ میکرولیتر اتیدیدوم بروماید در ناحیه CAI هیپوکامپ در دوره کوتاه مدت و بلندمدت موجب کاهش عملکرد حافظه فضایی موش‌های صحرایی در ماز آبی موریس می‌شود. دوزهای بکار رفته ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر رت از عصاره الکلی باکوپا مونرو تغییری معنی‌دار در زمان پیدا کردن سکو (نمودار ۱، وسط) و مسافت طی شده برای یافتن سکو در روز پنجم آزمایش ایجاد نکرد (نمودار ۲، وسط).



نمودار ۱- اثر تزریق اتیدیدوم بروماید، باکوپا مونرو و برهم کنش آنها در ناحیه CAI هیپوکامپ بر زمان سپری شده برای یافتن سکو در ماز آبی موریس در موش صحرایی نر.  $P < 0/01$  \* و  $P < 0/05$  \* در مقایسه با گروه کنترل و  $P < 0/01$  ++ در مقایسه با گروه‌هایی که فقط اتیدیدوم بروماید دریافت کردند.

نتایج مطالعه همچنین نشان داد که تزریق دوز بی‌اثر ۵ میکروگرم برای هر رت از عصاره الکلی باکوپا مونرو موجب توقف اثر سه روزه حجم ۳ میکرولیتر اتیدیدوم بروماید بر زمان سپری شده ( $P < 0/01$ )، نمودار ۱، طرف راست) و نیز مسافت طی شده برای رسیدن به سکو شد ( $P < 0/01$ )، نمودار ۲، طرف راست)، در صورتیکه تزریق

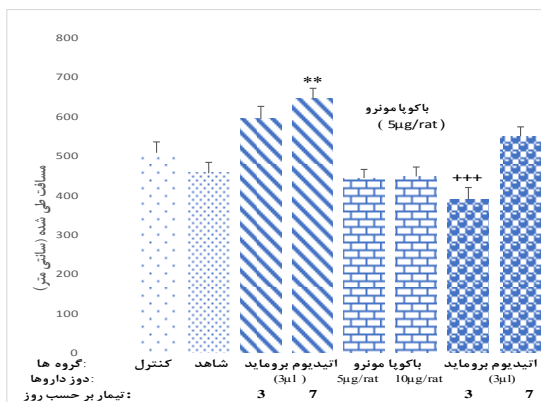
هموزن بافتی از هیپوکامپ، روی هریک از نمونه‌ها محلول سرد KCL ۱۵٪ با نسبت (۱:۱۰w/v) اضافه گردید. هموزن بافتی با استفاده از هموزنایزر مکانیکی تهیه شد. بعد از سانتریفیوژ کردن در دور ۳۰۰۰RPM به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C، محلول شفاف رویی از رسوب زیرین جدا شد تا برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد (۲). مالون دی آلدئید (MDA) حاصل تجزیه پلی اسیدهای چرب غیراشباع است و اندازه‌گیری آن شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی است. اندازه‌گیری MDA در بافت هموزنیزه هیپوکامپ بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید و ایجاد TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance) است، که جذب نوری آن در دستگاه اسپکترومتر در طول موج ۵۳۲ nm تعیین گردید. نتایج به صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (۱۷).

به منظور تأیید محل تزریق داروها، از هر گروه آزمایشی یک رتبه طور تصادفی انتخاب و توسط کلروفورم کشته می‌شد، سپس مغز آن توسط دستگاه میکروتوم و بیرواسلایس برش داده می‌شد و تصاویر این برش‌ها با اطلس پاکسینوس و واتسون مقایسه می‌شد (شکل ۱).

**مطالعات آماری:** داده‌های به دست آمده در نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری می‌شد. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آنالیز Post Hoc Tukey برای مقایسه اثرات دوزهای مختلف هر دارو با گروه کنترل و نیز اثرات برهم کنش بین داروها با گروه مربوطه استفاده می‌شد.  $P < 0/05$  به عنوان تفاوت مقدار معنی‌دار گروه‌ها مورد ملاک قرار می‌گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2016 صورت می‌گرفت.

## نتایج

**نتایج مربوط به حافظه فضایی:** نمودار ۱ و ۲: تحلیل واریانس یک‌طرفه و Post hoc Tukey در روز پنجم آزمون ماز آبی موریس نشان داد که تزریق دوطرفه ۳ میکرولیتر

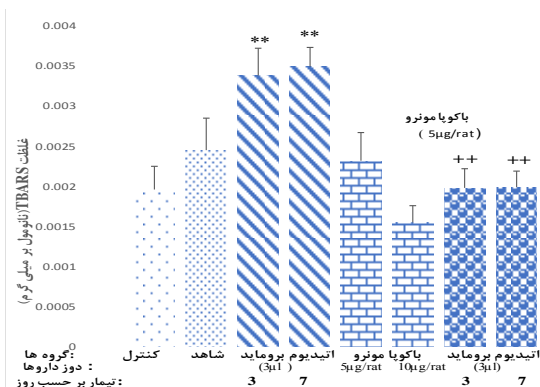


نمودار ۳- اثر تزریق اتیدیوم بروماید، باکوپا مونرو و برهم کنش آنها در ناحیه CA1 هیپوکامپ بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی (TBARS) در موش صحرایی نر.  $P < 0.01$  \*\* در مقایسه با گروه کنترل و  $P < 0.01$  ++ در مقایسه با گروههایی که فقط اتیدیوم بروماید دریافت کردند.

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق اتیدیوم بروماید (به‌عنوان عامل دمیپلناسیون) در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بالغ منجر به پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد. داده‌های این پژوهش با نتایج تحقیقات قبلی همخوانی دارد. تزریق موضعی اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ رت‌های نر، میزان آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد (۳ و ۳۰). ممکن است کاهش فعالیت آنزیم‌ها به علت استفاده بیش‌ازحد از آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد تولیدشده ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید باشد (۲۰). همچنین گزارش شده که اتیدیوم بروماید با افزایش MDA موجب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۱). از دیگر عوارض ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ در مطالعه حاضر، کاهش پارامترهای مرتبط با حافظه فضایی است. در گروه دریافت‌کننده‌ی بلندمدت اتیدیوم بروماید، زمان و مسافت لازم برای یافتن سکو افزایش یافت. همچنین اثر کوتاه مدت این دارو بر زمان یافتن سکو افزایشی بود. نتایج مطالعه حاضر بیانگر اثر نامناسب این ماده بر یادگیری، حافظه‌ی فضایی و نیز

دوز بی‌اثر ۵ میکروگرم بر رت از عصاره الکلی باکوپا مونرو قادر به برگشت پاسخ اتیدیوم بروماید در دوره هفت‌روزه بر زمان سپری شده (نمودار ۱، طرف راست) و مسافت طی شده (نمودار ۲، طرف راست) برای یافتن سکو نشد. نتایج برهم‌کنش داروها نشان می‌دهد که تزریق دوز بی‌اثر باکوپا مونرو در ناحیه CA1 هیپوکامپ قادر به بهبودی حافظه رت‌های مسموم شده ناشی از مصرف اتیدیوم بروماید در مصرف کوتاه مدت می‌شود.



نمودار ۲- اثر تزریق اتیدیوم بروماید، باکوپا مونرو و برهم کنش آنها در ناحیه CA1 هیپوکامپ بر مسافت طی شده برای یافتن سکو در ماز آبی موریس در موش صحرایی نر.  $P < 0.01$  \*\* در مقایسه با گروه کنترل و  $P < 0.001$  +++ در مقایسه با گروهی که فقط اتیدیوم بروماید دریافت کردند

نتایج پراکسیداسیون لیپیدی: نمودار ۳- نشان می‌دهد که مقدار TBARS (به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی) گروه‌های دریافت‌کننده ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ در دوره کوتاه‌مدت ۳ روزه ( $P < 0.01$ ) و بلندمدت ۷ روزه ( $P < 0.01$ ) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد (نمودار ۳، طرف چپ). دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم بر رت عصاره‌ی الکلی باکوپا مونرو تغییری معنی‌دار در TBARS ایجاد نکرد (نمودار ۳، وسط). همچنین تزریق دوز بی‌اثر ۵ میکروگرم بر رت باکوپا مونرو قادر به برگشت پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تزریق ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید در دوره کوتاه‌مدت ۳ روزه ( $P < 0.01$ ) و بلندمدت ۷ روزه شد ( $P < 0.01$ ) (نمودار ۳، طرف راست).

افزایش محصولات پروکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های سرم رت‌های دمیلینه شده با سم اتیدیوم بروماید می‌گردد (۱۰). همچنین در برخی از مطالعات پیشین، اثر مفید اعمال باکوپا مونرو در تداخل با داروهای دیگر بررسی شده است. روند فراموشی القاء شده با دیاپام به طور قابل توجهی با باکوپا مونرو که به صورت خوراکی به موش داده شد بود، معکوس شد (۲۷). گیاه باکوپا مونرو قادر به معکوس شدن فراموشی پیش‌گرا و پس‌گرای ناشی از تجویز اسکوپولامین و بهبودی حافظه‌ی فضایی موش است (۲۶). اختلال حافظه و مهارت یادگیری موش‌های صحرایی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های درون مغزی، به طور معنی‌داری با تجویز عصاره‌ی گیاه باکوپا مونرو بهبود پیدا کرد (۱۶). گیاه باکوپا مونرو در بهبود سمیت ناشی از دی فنیل اتر دکربناته (PBDE-209) در نوزادان و موش‌های ماده جوان نقش دارد (۳۲). فعالیت آنزیمی کاتالاز (CAT)، سوپراکسیددسموتاز (SOD) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) به طور معنی‌داری در موش‌های دیابتی القاء شده با آلوسون که با عصاره باکوپا مونرو تیمار شده بودند بهبود یافت (۱۴). نتایج برهم کنش داروها در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق درون مغزی دوز بی‌اثر باکوپا مونرو در ناحیه CA1 هیپوکامپ، اگرچه موجب ترمیم پراکسیداسیون لیپیدی القاء شده ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید ۳ و ۷ روزه در همین ناحیه شده است، اما صرفاً قادر به بهبودی حافظه رت‌های مسموم شده ناشی از مصرف سه روزه اتیدیوم بروماید می‌شود و قادر به توقف اثر نامناسب تزریق ۷ روزه اتیدیوم بروماید روی حافظه فضایی نیست. به نظر می‌رسد دامنه اثرات نامناسب تزریق ۷ روزه اتیدیوم بروماید ممکن است موجب اختلال در دیگر مکانیسم‌های سلولی مرتبط با حافظه مانند تغییر در نوروترانسمیترهای مغزی و نیز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده که تزریق باکوپا و ترمیم پراکسیداسیون لیپیدی در این مطالعه برای بهبودی حافظه کافی نبوده است.

فعالیت حرکتی رت‌ها است. تزریق اتیدیوم بروماید به ساقه مغزی رت‌ها موجب دمیلیناسیون نورون‌های این ناحیه و کاهش رفتار حرکتی آنها می‌شود، طوری که این رت‌ها در تست پیاده‌روی شعاعی در محفظه آبی، قدم‌های کمتری نسبت به حیوانات دمیلینه نشده برداشتند (۲۳). مطالعات متعددی ارتباط عوامل اکسیداتیو را به تخریب و تضعیف حافظه نشان داده‌اند (۱۲). التهاب و همچنین استرس اکسیداتیو مغزی با اختلال در تثبیت حافظه در مدل تجربی انسفالومیلیت خود ایمن (EAE) بیماری مالتیپل اسکلروزیس مرتبط است (۱۵).

همچنین نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق باکوپا مونرو در ناحیه CA1 هیپوکامپ بر حافظه فضایی و پراکسیداسیون لیپیدی اثری معنی‌دار ندارد. داده‌های این پژوهش با نتایج تحقیقات قبلی در برخی موارد همخوانی و در برخی موارد در تناقض است. گزارش شده که پراکسیداسیون لیپیدی در پری فرونتال و هیپوکامپ تحت تیمار با باکوپا مونرو مهار می‌شود (۴). باکوپا مونرو با اثرات ضد پراکسیداسیون لیپیدی که اعمال می‌کند، احتمالاً موجب بهبودی نقص شناختی می‌شود (۳۱). عدم همخوانی نتایج حاصل از تزریق باکوپا مونرو در این مطالعه با برخی از نتایج محققین قبلی ممکن است مربوط به دوز مصرفی، مدت‌زمان تجویز دارو و نیز نوع تیمار دارویی باشد.

در تحقیقات قبلی تاکنون تداخل اثر باکوپا مونرو با اتیدیوم بروماید بر روی حافظه فضایی و استرس اکسیداتیو یا پراکسیداسیون لیپیدی بررسی نشده است. اگرچه در مطالعات قبلی، تداخل اثر اتیدیوم بروماید با داروهای دیگر بررسی شده است. گزارش شده که تیمار بلندمدت با استفاده از ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی D3 و E، وسعت دمیلیناسیون القا شده با اتیدیوم بروماید در هیپوکامپ را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (۱۱). تزریق داخل صفاقی ویتامین آنتی‌اکسیدانی E به مدت یک هفته، مانع از

می‌شود که برهم کنش اثر داروها در دیگر مناطق مغزی و نیز به صورت درون صفاقی بر مقدار نوروترانسمیترهای دستگاه عصبی مرکزی و نیز تغییرات دندریت نورونی مورد بررسی قرارگیرد.

### سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل طرح پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد می‌باشد. از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز بابت تأمین اعتبار لازم قدردانی می‌گردد.

نتایج حاصل از تداخل دارویی در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق دوز بکار رفته باکوپا مونرو در ناحیه CA1 هیپوکامپ با مهار پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش آسیب‌های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد در شرایط تخریب میلین نورونی، اثرات نامناسب ناشی از تزریق دوزهای بکار رفته سم اتیدیوم بروماید در این ناحیه را کاهش می‌دهد، اما در بهبودی حافظه فضایی رت‌های تیمار شده با تزریق اتیدیوم بروماید در دوره مصرفی کوتاه مدت مفید است و اثرات نامناسب تزریق بلندمدت اتیدیوم بروماید را روی حافظه تغییر نمی‌دهد. جهت تأیید نتایج مطالعه حاضر، پیشنهاد

### منابع

- 1- Abdel-salam, O. M. E., Khadrawy, Y. A., and Mohammed, N. A., 2012. Neuroprotective effect of nitric oxide donor isosorbide-dinitrate against oxidative stress induced by ethidium bromide in rat brain, EXCLI Journal, 11, PP: 125-141.
- 2- Abdel-Salam, O. M. E., Khadrawy, Y. A., Mohammed, N. A., and Youness, E. R., 2012. The effect of gabapentin on oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain, Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 23(2), PP:61-8.
- 3- Abdel- Sleem, O. M. E., Khadrawy, Y. A., and Salem, N. A., 2011. Oxidative stress in a model of demyelination in rat brain: the effect of piracetam and vinpocetine, Neurochemical Research, 36(6), PP: 1062-1072.
- 4- Bhattacharya, K., Bhattacharya, A., Kumar, A., and Ghosal, S., 2000. Antioxidant activity of Bacopa monniera in rat frontal cortex, striatum and hippocampus, Phytotherapy Research, 14(3), PP: 174-179.
- 5- Bondan, E., Lallo, M., Trigueiro, A., Ribeir, C., Sinhorini, I., and Graça, D., 2006. Delayed Schwann cell and oligodendrocyte remyelination after ethidium bromide injection in the brainstem of Wistar rats submitted to streptozotocin diabetogenic treatment, Brazilian Journal of Medical & Biological Research, 39(5), PP: 637-646.
- 6- Calabrese, C., Gregory, W. L., Leo, M., Kraemer, D., Bone, K., and Oken, B., 2008. Effects of a standardized bacopa monnieri extract on cognitive performance, anxiety, and depression in the elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 14, PP: 707-713.
- 7- Emeterio, E. P. S., Tramullas, M., and Hurlé, M. A., 2006. Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal, Journal of Neuroscience, 83(7), PP: 1352-1361.
- 8- Ghaffary, S., Hatami Nemati, H., and Dehghan, G., 2013. Protective effects of Short-term Administration of Saffron Extraction on Improvement of Cognitive Deficits and Decrement of Lipid Peroxidation Induced by Ethidium Bromide in Experimental Models of MS, Journal of Physiology and Pharmacology, 17(3), PP: 315-327.
- 9- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., and Offen, D., 2004. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy, Journal of Neurology, 251(3), PP:261-8.
- 10- Goudarzvand, M., Choopani, S., Shams, A., Javan, M., Khodaii, Z., and Ghamsari, F., et al., 2016. Focal injection of ethidium bromide as a simple model to study cognitive deficit and its improvement. Basic and Clinical Neuroscience, 7(1), PP: 63-72.
- 11- Goudarzvand, M., Javan, M., Mirnajafi-Zadeh, J., Mozafari, S., and Tiraihi, T., 2010. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide, Cellular and Molecular Neurobiology, 30(2), PP: 289-299.

- 12- Guimarães, J., and Sá, M. J., 2012. Cognitive dysfunction in Multiple Sclerosis, *Front in Neurology*, 3(74), PP: 1-8.
- 13- Haider, L., Fischer, M. T., Frischer, J. M., Bauer, J., Höftberger, R., and Botond, G., 2011. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions, *Brain*, 134, PP: 1914-24.
- 14- Kapoor, R., Srivastava, S., and Kakkar, P., 2009. Bacopa monnieri modulates antio responses in brain and kidney of diabetic rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27, PP: 62-69.
- 15- Kim, D., Hao, J., Liu, R., Turner, G., Shi, F. D., and Rho, J. M., 2012. Inflammation-Mediated Memory Dysfunction and Effects of a Ketogenic Diet in a Murine Model of Multiple Sclerosis, *Pharmacology*, 667(1), PP:222-229.
- 16- Khan, M. B., Ahmad, M., Ahmad, S., Ishrat, T., Vaibhav, K., and Khuwaja, G., 2015. Bacopa monniera ameliorates cognitive impairment and neurodegeneration induced by intra- cerebro-ventricular-streptozotocin in rat: behavioral, biochemical, immune-histochemical and histopathological evidences, *Metabolic, Brain Discovery*, 30, PP: 115-127.
- 17- Kuloghi, M., Ustundag, B., Atmaca, M., Canatan, H., Tezean, A. E, and Cinkiline, N., 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder, *Cell Biochemistry*, 20(2), PP: 171-175.
- 18- Lassmann, H., 2001. Classification of demyelinating diseases at the interface between etiology and pathogenesis, *Current Opinion in Neurology*, 14, PP: 253-8.
- 19- Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Ahmed, M., Schmatz, R., Mazzanti, A., and Salbego, F. Z., et al., 2007. Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *International Journal of Development Neuroscience*, 25(4), PP: 259-264.
- 20- Mitosek-Szewczyk, K., Gordon-Krajcer, W., Walendzik, P., and Stelmasiak, Z., 2010. Free radical peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid therapy, *Folia Neuropathologica*, 48, PP:116-22.
- 21- Mohandas, K. G., Muddanna, S., and Gurumadhva, S., 2009. Enhancement of amygdaloid neuronal dendritic arborization by fresh leaf juice of *Centella asiatica* (Linn) during growth spurt period in rats, *Evidence-Based Complementary and Alternative in Medicine*, 6(2), PP: 203-210.
- 22- Morgan, A., Stevens, J., 2010. Does Bacopa monnieri improve memory performance in older persons? Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16, PP: 753-759.
- 23- Nassar, C. C. S., Bondan, E., and Alouche, S. R., 2009. Effects of aquatic exercises in a rat model of brainstem demyelination with ethidium bromide on the beam walking test, *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 67(3A), PP: 652-656.
- 24- Pandareesh, M. D., Anand, T., and Bhat, P. V., 2014. Cytoprotective propensity of bacopa monniera against hydrogen peroxide induced oxidative damage in neuronal and lung epithelial cells, *Cytotechnology*, 68, PP: 157-172.
- 25- Paxinos, G., and Watson, C., 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition: Academic press.*
- 26- Saraf, M. K., Prabhakar, S., Khanduja, K. L., and Anand, A., 2011. Bacopa monniera attenuates scopolamine-induced impairment of spatial memory in mice. *Evidence- Based Complementary and Alternative in Medicin*, 186, PP:38-48.
- 27- Saraf, M., Prabhakar, S., Pandhi., and Anand, A., 2008. Bacopa monniera ameliorates amnesic effects of diazepam qualifying behavioral-molecular partitioning. *Neuroscience*, 155, PP: 476-484.
- 28- Sicotte, N., Kern, K., Giesser, B., Arshanapalli, A., Schultz, A., and Montag, M., et al., 2008. Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis. *Brain*, 131(4), PP: 1134-1141.
- 29- Simpson, T., Pase, M., and Stough, C., 2015. Bacopa monnieri as an Antioxidant therapy to reduce oxidative stress in the baging Brain, *Medicine*, 21(36), PP: 1-9.
- 30- Spanevello, R., Mazzanti, C. M., Schmatz, R., Bagatini, M., Stefanello, N., and Correa, M., et al., 2009. Effect of vitamin E on ectonucleoti daseactivities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated, *Brain research bulletin*, 80(1), PP: 45-51.
- 31- Vani, K. G., Balakrishna, K., and Devi, C. S. S., 2000. Effect of bacoside A on brain antioxidant, Anbarasi status in cigarette smoke exposed rats,” *Life Sciences*, 78(12), PP: 1378-1384.



- 32- Verma, P., Singh, P., and Gandhi, B. S., 2014. Neuromodulatory role of bacopa monnieri on oxidative stress induced by postnatal exposure to decabromodiphenyl ether (pbde-209) in neonate and young female mice. Iranian Journal of Basic Medical Science, 17(4), PP: 307- 311.

## **The effect of Bacopa monnieri on spatial memory impairment and lipid peroxidation induced by local injection of ethidium bromide in the hippocampus of rat.**

Aghayi S.,<sup>1</sup> Hatami Nemati H.,<sup>1</sup> Ahmadi M.M.,<sup>2</sup> Banan Khojasteh S.M.<sup>1</sup> and Ahmadi H.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Parseh Clinic, Tehran, I.R. of Iran.

<sup>3</sup> Dept. of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, I.R. of Iran.

### **Abstract**

Multiple sclerosis, as well as toxins such as ethidium bromide, can damage the myelin of neurons. The antioxidant properties of Bacopa monnieri have been reported in previous studies. The aim of this study was to investigate the interaction of Bacopa monnieri and ethidium bromide on spatial memory and lipid peroxidation in the hippocampal formation. This study was performed on eight groups of seven-member male rats. Three days after injection of ethidium bromide or Bacopa monnieri, and also combination of these drugs in the CA1 region of the hippocampus, Morris Water Maze test was employed to measure spatial memory parameters. Then the lipid peroxidation parameter was measured in this region. Injection 3  $\mu$ L of ethidium bromide 1% reduced the parameters related to spatial memory ( $P < 0.01$ ) and increased lipid peroxidation ( $P < 0.01$ ). In addition, administration of the subthreshold dose of 5  $\mu$ g/rat of Bacopa monnieri stopped the effect of three-days injection of ethidium bromide on parameters of spatial memory ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) and decreased lipid peroxidation ( $P < 0.01$ ). Bacopa monnieri can improve spatial memory by decreasing the amount of lipid peroxidation induced by local injection of ethidium bromide.

**Key words:** Bacopa monnieri, ethidium bromide, spatial memory, lipid peroxidation