بررسی اثرات عصاره میوه عناب (Ziziphus jujube) بر استرس اکسیداتیو هیپو کامپی 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 دریافت:۹۸/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۶

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. دراین مطالعه تجربی موش‌ها بصورت تصادفی به شش گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل، گروه مورفین ۰/۵میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین بصورت 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 هموژن 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 ۱۵و ۱۶ ($P<0/05$) 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

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 جمع آوری شده و سپس وارد قشرهای پری رینال و پاراهیپوکامپ می‌شود و ازآنجا به 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

مهم‌ترین آنها سیستم کولی نرژیک و دیگری سیستم دوپامینرژیک می‌باشد (۳۴و 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 اوپیوئیدی 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 (۱۷و ۱۹).

مورفین در ارتباط با استرس اکسیداتیو بسیار بیشتر از سایر مواد مخدر مورد توجه قرارگرفته است. به‌طور کلی، دو روش وجود دارد که چگونه مرفین 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 مرفین و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، که در شرایط مختلفی مشاهده می‌شود می‌تواند منجر به آسیب اکسیداتیو در انواع مختلف مولکول‌های زیستی ازجمله DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها شود (۲۷و 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 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 وگلوتاتیون پراکسیداز و نیز عوامل غیرآنزیمی، نظیر ویتامینE، ویتامینC، کاروتنوئیدها، پلی-فنل ها 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 خرمای قرمز و خرمای 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 موثرمی باشد (۲۸). مطالعات فیتوشیمی وجود ترکیبات آلکالوئیدهای سیکلوپپتیدی، ساپونین‌های تریپنوئید، استرول‌ها 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). باتوجه به مصرف زیاد میوه عناب در ایران، نقش آنتی‌اکسیدانی آن و پژوهش کم در ارتباط با نقش آن در اختلال حافظه فضایی، دراین تحقیق بر آن شدیم تا اثر

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. دراین 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 ۱۲ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و آب و غذای مخصوص حیوانات به میزان کافی در دسترس آنها قرارگرفت. آزمایشات یک هفته بعد از انتقال موش‌ها به آزمایشگاه به‌منظور 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.

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

۱- گروه کنترل، سالین را بصورت درون صفاقی و به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

۲- گروه مورفین، سالین را بصورت گاواژ 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 به‌صورت گاواژ و۳۰ دقیقه بعد سالین را بصورت درون صفاقی دریافت کردند.

۴- گروه عصاره ۲۰۰، دوز۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به‌صورت گاواژ و۳۰ دقیقه بعد سالین را بصورت درون صفاقی دریافت کردند.

۵- گروه عصاره ۱۰۰ بعلاوه مورفین، دوز۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به‌صورت گاواژ و۳۰ دقیقه بعد مورفین را بصورت درون صفاقی دریافت کردند.

۶- گروه عصاره ۲۰۰ بعلاوه مورفین، دوز۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به‌صورت گاواژ و۳۰ 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 گاواژ برای هر رت ۲۴ ساعت قبل از سر بریدن آن‌ها بود. تمامی حیوانات مورد آزمایش به‌جز گروه کنترل، طی یک بازه زمانی ۳۰ روزه، حلال‌ها و ترکیباتی که برای تیمار استفاده شدند را به‌صورت 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 قرارگرفت.

عصاره گیری: دراین 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 به‌وسیله آسیاب الکتریکی به پودر تبدیل شد. سپس مقدار ۱۰۰گرم از پودر گیاه را در ظرف مخصوص ریخته و۵۰۰ 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 فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تست رفتاری

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:۱۰×۵۰ سانتی‌متر). دو بازوی دیگر، دارای دو دیواره جانبی و یک دیواره انتهایی هستند (بازوهای بسته:۴۰ ×۱۰×۵۰ سانتی‌متر). در محل برخورد این چهار بازو، یک صفحه مربع شکل به ابعاد ۱۰×۱۰ 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 (۵۰×۵۰×۳۵) 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

هموژن سازی بافت: جهت هموژن 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 هموژن 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 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 سوبسترای پراکسید هیدروژن انجام شد (۱). واکنش در کوت 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 سوبسترا شروع و تغییرات جذب در طول مدت ۲ دقیقه در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی (M-1CM-1 ۳۹/۴) براساس قانون بیرلامبرت (A=εdc) محاسبه و به‌صورت (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 سوپراکسید دیسموتاز از روش اتواکسیداسیون پیروگالل استفاده شد. بدین منظور از بافر تریس-هیدروکلرید ۵۰ میلی مولار با (pH= ۸/۲) و (EDTA) یک میلی مولار و پیرو گالول ۰/۲ میلی‌مولار استفاده گردید. ۲۹۰۰ میکرولیتر لیتر 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 طول‌موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری اتواکسیداسیون پیروگالل به‌تنهایی به‌عنوان شاهد به‌جای سوپرناتانت ۵۰ میکرولیتر

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

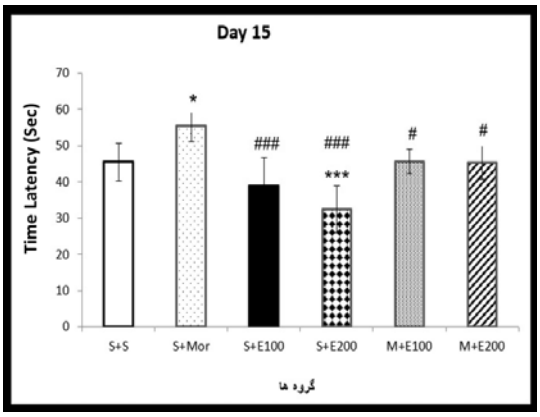
درصد مهار پیروگالل = (dA/dt_blank - dA/dt_sample) / dA/dt_blank *100

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 – نیتروبنزوئیک اسید واکنش می‌دهد تا آنیون زرد رنگ ایجاد شود. ۱۰ میکرولیتر از نمونه آنزیم و ۲۹۵۰میکرولیتر از بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار با (pH= ۷/۵) با۲۰ میکرولیتر از معرف (DTNB) ۱۰میلی مولار و۲۰ میکرولیتر استیل تیوکولین یداید 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 طول‌موج 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 (µmol/min/g) گزارش شد.

آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها: پس از جمع‌آوری داده‌ها تجزیه‌وتحلیل 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 ± انحراف معیار گزارش و اختلاف بین گروه‌ها با ۰/۰۵ >Pمعنی‌دار تلقی شده است.

نتایج

نتایج تأثیر دوزهای مختلف عصاره میوه گیاه عناب بر اختلال حافظه فضایی القاء شده با مورفین در روزهای ۱۵ و۱۶: باتوجه به نمودار۱، نتایج حاصل از تزریق درون صفاقی مورفین(۰/۵ mg/kg) و گاواژ دوزهای عصاره بر حافظه فضایی نشان داد که در دوز(۲۰۰mg/kg) عصاره، زمان سپری شده ورود به بازوی بسته (Time latency) کاهش معناداری (P<۰/۰۰۱) با گروه کنترل داشته است در حالیکه درگروه مورفین افزایش در (Time latency) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۵). در گروه‌های دریافت کننده عصاره، دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ در مقایسه با گروه مورفین تفاوت معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۰۱). درحالیکه تزریق عصاره‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به همراه مورفین کاهشی معنی‌داری (P<۰/۰۵) نشان دادند.



نمودار۱- اثر عصاره عناب بر مدت زمان رسیدن به بازوی بسته در تست ماز صلیبی بالاتر از زمینه در روز ۱۵ تست رفتاری

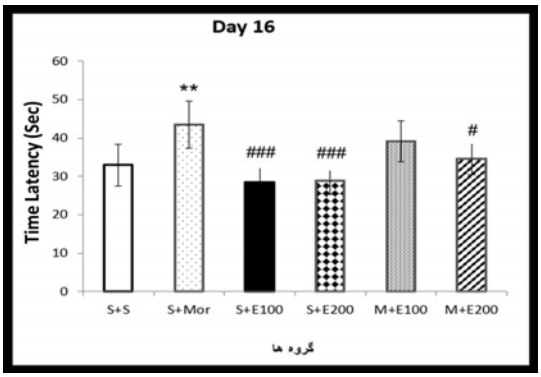
* P<۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل *** P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل

P<۰/۰۵ نسبت به گروه مورفین..... ### P<۰/۰۰۱ 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 به‌صورت (SD ±Mean) گزارش شد.

باتوجه به نمودار۲ (مربوط به تست روز ۱۶)، گروه دریافت کننده مورفین افزایشی را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۱). در گروه‌های دریافت کننده عصاره، دوزهای۱۰۰ و۲۰۰ در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین کاهش معنی‌داری در مدت زمان ورود به بازوی بسته (P<۰/۰۰۱). تزریق دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره به همراه مورفین سبب برگرداندن اثر افزایشی مورفین بر پارامتر ذکر شده داشت (P<۰/۰۵).



نمودار ۲- اثر عصاره عناب بر مدت زمان رسیدن به بازوی بسته در تست ماز صلیبی بالاتر از زمینه در روز ۱۶ تست رفتاری

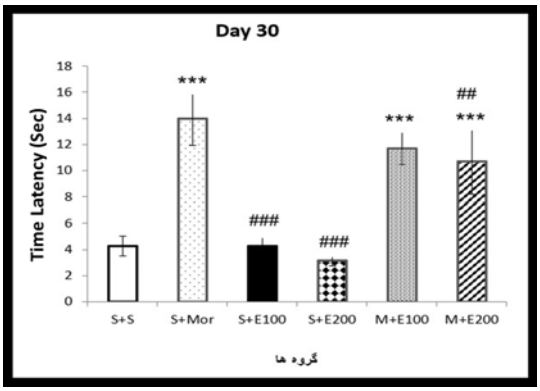
** P<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل

P<۰/۰۵ نسبت به گروه مورفین ### P<۰/۰۰۱ 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 به‌صورت (SD ±Mean) گزارش شد.

تأثیر دوزهای مختلف عصاره میوه گیاه عناب بر اختلال حافظه فضایی القاء شده با مورفین در روزهای۳۰ 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<۰/۰۰۱). تزریق دوزهای 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 کنتل کاهش قابل‌توجهی در پارامتر مورد مطالعه ایجاد کرد (P<۰/۰۰۱). گروه‌های دریافت کننده عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین کاهش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۰۱). تزریق دوز ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره همراه مورفین سبب کاهش اثر تخریب‌کنندگی ناشی از مورفین شد (P<۰/۰۱).



نمودار۳-تأثیر عصاره میوه گیاه عناب بر اختلال حافظه فضایی القاء شده با مورفین در روز ۳۰ تست رفتاری

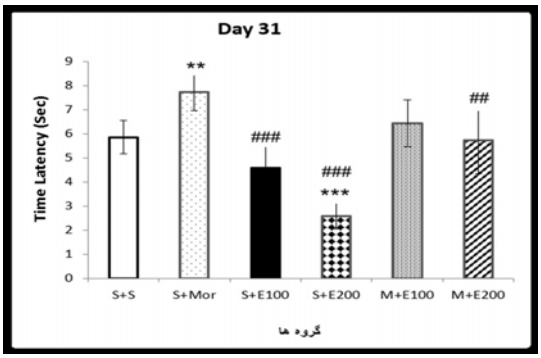
*** P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل

P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه مورفین ### P<۰/۰۰۱ 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 (SD ±Mean) گزارش شد.

باتوجه به نمودار ۴ (تست در روز ۳۱)، گروه دریافت کننده مورفین در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که مورفین سبب کاهش در میزان حافظه فضایی گردید (P<۰/۰۱). تزریق دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین تفاوت چشمگیری را نشان داد (P<۰/۰۰۱). تزریق دوز ۲۰۰

میلی‌گرم عصاره به همراه مورفین موجب برگرداندن اثرات تخریبی مورفین بر حافظه فضایی را نشان داد (P<۰/۰۱).



نمودار۴- تأثیر عصاره میوه گیاه عناب بر اختلال حافظه فضایی القاء شده با مورفین در روز ۳۱ تست رفتاری

*** P< ۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل ** P<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل

P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه مورفین ## P<۰/۰۱ 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 (SD ±Mean) گزارش شد.

جدول ۱- تغییرات سطوح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز(SOD) و استیل کولین استراز(AchE) هیپوکامب در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در ۶ (n=۷)

بافت	آنزیم	گروه‌ها					
		کنترل	مورفین	عصاره ۱۰۰	عصاره ۲۰۰	عصاره ۱۰۰+ مورفین	عصاره ۲۰۰ + مورفین
	CAT	۵۵/۵۲±۲/۷۹	۳۶/۵۲±۴/۲۴ ✷✷	۵۰/۸۲± ۴/۹۷#	۵۴/۵۷±۲/۳۴##	۴۲/۲۰± ۳/ ۰۲	۴۶/۳۵± ۳/ ۳۹
هیپو کامپ	SOD	۴۷/۰۱±۳/۰۵	۳۲/۸۲±۴/۷۳✷	۴۷/۰۷± ۱/۸۶#	۴۶/۹۶± ۲/۵۹#	۴۳/۹۶± ۳/۹۲	۴۴/۰۱± ۲/۳۳
	AchE	۱۰/۷۵± ۱/۱۳	۶/۱۷± ۰/۲۹ ✷✷	۱۰/۱۵± ۱/۴۸#	۱۰/۰۶± ۰/۵۵#	۸/۱۲± ۰/ ۷۶	۹/۱۹± ۰/۴۲

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

فعالیت آنزیم AchE برحسب µmol/min/g و فعالیت آنزیم CAT برحسب U/g tissue برای بافت هیپوکامپ گزارش شد.

*P< ۰/۰۵، ** P<۰/۰۱ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل

P≤ ۰/۰۵، ## P≤۰/۰۱ تفاوت معنی‌دار با گروه مورفین

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و استیل کولین استراز هیپوکامب: نتایج این تحقیق نشان داد در گروه‌های مورد مطالعه، براساس آنالیز آماری همه گروه‌ها نسبت به هم تفاوت معنی‌داری در سطح (P=۰/۰۰۴) نشان دادند. همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه مورفین (۳۶/۵۲± ۴/۲۴) نسبت به گروه کنترل (۵۵/۵۲± ۲/۷) کاهش معنی‌داری در سطح (P=۰/۰۰۷) 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 به ترتیب تغییرات معنی‌داری در سطح (P=۰/۰۴۶) و (P=۰/۰۱۲) 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 سوپر اکسید دیسموتاز مشاهده شد (P=۰/۰۲۴). تزریق عصاره عناب درگروه عصاره (mg/kg ۱۰۰) و گروه عصاره (mg/kg ۲۰۰) افزایش معنی‌داری در سطح (P=۰/۰۳۳) و (P=۰/۰۴۸) به ترتیب نسبت به گروه مورفین نشان دادند. همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه مورفین (۳۲/۸۲± ۴/۷) در مقایسه با گروه کنترل

(۴۷/۰۱± ۳/۰۵) کاهش معنی‌داری در سطح (P=۰/۰۳۵) 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 معنی‌دارنبود.

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=۰/۰۰۹). همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در گروه مورفین (۰/۲۹ ±۶/۷) نسبت به گروه کنترل (۱/۱۳ ±۱۰/۷۵) کاهش معنی‌داری در سطح (P=۰/۰۱) 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=۰/۰۳۳) و (P=۰/۰۴) 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 موسکارینی ناحیه CA_1 هیپوکامپ پشتی توسط آتروپین، از ترجیح مکان القاء شده توسط مورفین ممانعت می‌کند که به نظر می‌رسد این اثر با کاهش یادگیری وابسته به پاداش میانجی گری می‌شود (۵). دراین پژوهش ما به بررسی سیستم کولینرژیک و انتقال دهنده استیل کولین در حافظه فضایی و تأثیراتی که مورفین و عصاره عناب بر روی حافظه داشتند پرداختیم.

یافته‌های ما نشان می‌دهند که تجویز مورفین در روزهای ۱۵، ۱۶، ۳۰و ۳۱ سبب کاهش یادگیری و حافظه گردید. در روز ۱۵، ۱۶و۳۰ تزریق دوزهای ۱۰۰و۲۰۰ عصاره عناب سبب بهبود حافظه گردید و تزریق دوز ۱۰۰و ۲۰۰ عصاره به همراه مورفین اثرات مورفین را برگرداند. در همین راستا گزارش‌شده 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 کولینرژیکی است. اپیوئیدها ازجمله مورفین که تمایل بالایی برای گیرنده‌های μ اپیوئیدی دارند در پایانه‌های کولینرژیکی 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 قابل‌توجهی 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 (invitro) نشان می‌دهد که مورفین تراکم خارهای محرک در هیپوکامپ را تنظیم می‌کند و باعث کاهش قابل‌توجهی در خارهای دندریتی هیپوکامپ می‌شود (۶). همانطوری که در نمودار ۱ تا ۴ تست رفتاری ماز

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 اوپیوئیدی 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. درنتیجه 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 نمودار۷ نشان می‌دهد فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز هیپوکامپ درگروه عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ نسبت به گروه مورفین افزایش نشان داد. عناب با داشتن ویتامین‌های A، C ، آلفا توکوفرول، کاروتن 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 چی 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 thyoides) با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی باعث مهار آنزیم استیل کولین استراز دربافت های قشر مغز، هیپوکامپ و استریاتوم موش صحرایی می‌شود که با نتایج ما همخوانی ندارد (۱۸). پژوهش دیگر نشان داد عصاره هیدرو الکلی گل ختمی 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 ازتأثیر 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 دریادگیری رفتار و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت استیل کولین استراز دارد .

مطالعات دیه و همکاران در سال ۲۰۰۶نشان داد گالانتامین 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 پیازی 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 فیبریل های بتا آمیلوئید می‌شود (۱۵).

نتایج پژوهش حاضر کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتازگروه مورفین نسبت به گروه کنترل را تائید کرد که نشان دهنده افزایش استرس اکسیداتیوایجاد شده بوسیله مورفین در کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می باشد. تاتی و همکاران نشان دادند فعالیت کبدی و کلیوی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گروه دریافت کننده اتانول در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتازدر بافت کبد

و کلیه که عصاره عناب با دوز۱۰۰ و۲۰۰ 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 تناقص با مطالعات ما می‌باشد (۳۷). مطالعات نشان داد که تجویز عصاره میوه گیاه عناب سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالازهیپوکامپی 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 گلوتاتیون 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 الکلی عناب در دوز های ۱۰۰و۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش معنی‌دار فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در مقایسه با گروه دریافت کننده 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 گلوتاتیون 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.

مورفین باعث فعال شدن گیرنده‌های اوپیوئیدی μ (MOR) در نرون های 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 اتوفاژی 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 غیرآنزیمی مانند (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). ازاین‌رو 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 دریافت کننده 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

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

سپاسگزاری

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.

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- Guzma´n, D. C., Va´zquez, I. E., Brizuela, N. O., Alvarez, R. G., Mejı´a, G. B., Garcı´a, E. H., Santamarı´a, D., De Apreza, M. I., and Olguı´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. Nturitional 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 it 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 (Ziziphus 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 Autoxidationof 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- Piazzi, 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 Ethnopharmaco, 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., Meshkatalsadat, M. H., Rasoulian, 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 hepaic 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 Toxico, l, 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 Z[1]., Valizadegan F[1]. and Seyedalipour B[2].

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

[2]Dept. 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