

بررسی تأثیر عصاره‌ی رازیانه در پیش‌گیری از اختلال حافظه‌ی ناشی از اسکوپولامین در موش سوری نر

دکتر آزاده مصری‌پور^۱، زهرا علی بابایی^۲، عاطفه عمادی^۳، دکتر محمد رضا حجتی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استروژن از جمله هورمون‌های استروئیدی است که علاوه بر اثرات شناخته شده‌ی آن بر جنس ماده، اثرات مفیدی نیز بر روی حافظه دارد. گیاه رازیانه حاوی ترکیبات فیتواستروژنی می‌باشد و احتمال دارد که این گیاه از این طریق بتواند اثرات مثبتی بر حافظه داشته باشد. این تحقیق به منظور بررسی اثرات رازیانه بر بهبود حافظه انجام شد.

روش‌ها: حافظه، به کمک روش بررسی شیء جدید در موش‌های سوری نر نژاد Balb-c بررسی شد. این روش شامل سه مرحله‌ی خوگیری، یادگیری (T₁) و آزمایش حافظه (T₂) می‌باشد. در این روش، اختلاف زمانی که حیوان صرف شناسایی شیء قدیمی (F) و شیء جدید (N) می‌کند، به عنوان معیاری جهت ارزیابی حافظه استفاده می‌شود: شاخص تشخیص (Recognition index یا RI) $RI = \frac{(N - F)}{(N + F)} \times 100$.

یافته‌ها: تخریب حافظه به دنبال تزریق زیرجلدی ۰/۵ mg/kg اسکوپولامین ایجاد شد $[RI (\%) = -16/0 \pm 3/0]$. عصاره‌ی رازیانه (۵ دقیقه قبل از T₁) به میزان قابل توجهی مانع از اختلال حافظه گردید $[RI (\%) = 35/0 \pm 7/1]$ و حافظه‌ی حیوانات به حدود حافظه‌ی حیوانات سالم $[RI (\%) = 50/0 \pm 5/9]$ رسید. به علاوه، تزریق داخل صفاقی ۰/۲ mg/kg از ۱۷ تا استرادیول نتایج مشابهی به همراه داشت $[RI (\%) = 36/0 \pm 6/6]$ و لیتزریق داخل صفاقی ۰/۱ mg/kg تاموکسیفن اثرات مفید رازیانه در بهبود حافظه را از بین برد $[RI (\%) = -29/0 \pm 7/1]$.

نتیجه‌گیری: اثرات مفید رازیانه بر حافظه از طریق گیرنده‌های استروژنی در مغز صورت می‌گیرد؛ به صورتی که، تحریک این گیرنده‌ها منجر به افزایش سطح استیل کولین می‌شود. به همین دلیل، از اثرات آنتاگونیستی اسکوپولامین بر گیرنده‌های کلینرژیک به صورت رقابتی ممانعت می‌کند.

واژگان کلیدی: فیتواستروژن، رازیانه، استروژن، حافظه

ارجاع: مصری‌پور آزاده، علی بابایی زهرا، عمادی عاطفه، حجتی محمد رضا. بررسی تأثیر عصاره‌ی رازیانه در پیش‌گیری از اختلال

حافظه‌ی ناشی از اسکوپولامین در موش سوری نر. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۶): ۲۹۴-۳۰۴

مقدمه

نظر فیزیولوژیک، حافظه توسط تغییرات توانایی انتقال سیناپسی از یک نورون به نورون دیگر در نتیجه‌ی فعالیت عصبی قبلی ایجاد می‌شود. این تغییرات به نوبه‌ی خود، موجب تولید مسیرهای

حافظه از جنبه‌های مهم شناخت است که به فرد اجازه‌ی جمع‌آوری اطلاعات را می‌دهد و فرد را قادر می‌سازد از این اطلاعات در موقع نیاز استفاده کند. از

۱- استادیار، گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کارشناس، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- دانشیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

استروژن در غلظت‌های کم و زیاد باعث کاهش عملکرد فضایی می‌شود؛ اما در یک غلظت متوسط، یادگیری و حافظه‌ی فضایی را بهبود می‌بخشد (۹).

فیتواستروژن‌ها ترکیبات پلی‌فنلی غیراستروئیدی گیاهی می‌باشند که عملکرد بیولوژیک مشابه با استروژن دارند. بر اساس ساختمان شیمیایی، می‌توان آن‌ها را به ۴ گروه عمده تقسیم کرد که شامل ایزوفلاونوئیدها، فلاونوئیدهای پرنیله، لیگنان‌ها و استیل‌بن‌ها می‌باشند. مصرف فیتواستروژن‌ها در درمان بیماری‌های وابسته به سن مانند بیماری‌های قلبی-عروقی، پوکی استخوان و علائم یائسگی، مانند گرگرفتگی، کاربرد دارد (۱۰). به تازگی، مطالعات تجربی و اپیدمیولوژیک پیشنهاد می‌کنند که مصرف رژیم‌های غذایی غنی از فیتواستروژن ممکن است اثرات محافظتی در برابر شرایط وابسته به استروژن مثل قاعدگی، بیماری‌های وابسته به استروژن مثل پروستات و سرطان سینه داشته باشد. گیاهان خانواده‌ی نخود، به خصوص سویا، همچنین دانه‌ی کتان، رازک، شوید و رازیانه مثالی از گیاهان محتوی فیتواستروژن‌ها هستند (۱۱).

رازیانه گیاهی از خانواده چتریان و از جمله گیاهان حاوی فیتواستروژن‌ها است که کاربرد درمانی وسیعی در رفع اختلالات ناشی از کمبود استروژن دارد. ترکیبات شاخص این گیاه، ترانس‌آنتول، لیمون و فنچون هستند (۱۲). رازیانه گیاهی سرشار از فیتواستروژن‌ها شامل لیگنان است. لیگنان‌ها گروهی از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی دی‌مری هستند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدان در دانه‌ی کامل غلات، حبوبات و برخی سبزیجات و میوه‌ها نیز وجود دارند. مصرف ترکیبات مذکور به طور بارزی از بروز سرطان سینه،

جدید یا مسیرهای تسهیل شده برای انتقال سیگنال‌ها از طریق مدارهای عصبی مغز می‌شوند (۱). پیش‌تر نشان داده شده است که هورمون‌های استروئیدی نظیر کورتیزول نیز بر حافظه تأثیر می‌گذارد. استفاده از کورتیکواستروئیدها باعث ایجاد تغییرات ساختمانی و عملکردی در لوب تمپورال مغز می‌شود (۲).

اثرات گلوکوکورتیکوئیدها بر یادگیری و حافظه، وابسته به دوز می‌باشد. دوز بالای کورتیکواستروئیدها در کوتاه‌مدت باعث کاهش حافظه و یادگیری می‌شود (۳). به علاوه، مهار اثر گلوکوکورتیکوئیدها مانع از این اختلال حافظه شده است (۴). اثر استروژن بر سیستم عصبی توسط پژوهشگران مختلف بررسی شده است؛ از جمله اثراتی که برای استروژن شناخته شده است، افزایش انعطاف‌پذیری در بخش‌های مختلف سیستم عصبی و دخالت در پدیده‌هایی مانند تولید مثل، درد و حافظه است. برخی از پژوهش‌گران برای استروژن نقش نورومدولاتوری را محتمل می‌دانند (۵). همچنین، تجویز استروژن تراکم خا‌رهای دندردیتی را در برش‌های مغزی موش‌های نر افزایش می‌دهد (۶).

مطالعات متعددی در مورد استروئیدهای جنسی و اثرات آن بر سیستم اعصاب مرکزی (CNS یا Central nervous system) انجام شده است که نتایج متناقضی از تستوسترون و استروژن را بر حافظه و یادگیری فضایی نشان می‌دهد. عده‌ای معتقدند که تستوسترون و استروژن باعث کاهش و تخریب حافظه و یادگیری می‌شوند (۷). در مقابل، گروهی بر این نکته پا فشاری می‌کنند که هورمون‌های جنسی باعث بهبود حافظه و یادگیری می‌گردند (۸). علاوه بر گزارش‌های فوق، نشان داده شده است که

شهرکرد انجام شد. از هر کدام از موش‌ها فقط یک بار استفاده شد و موش‌ها بلافاصله بعد از اتمام آزمایش، کشته شدند.

در این مطالعه، بررسی حافظه به کمک روش Novel object recognition (NOR) یا بررسی شیء جدید انجام شد. آزمایشات رفتاری و تست مربوط به حافظه برای دریافت بهترین نتیجه، در محیطی کاملاً آرام انجام شد و فضای اتاق، نیمه تاریک بود. جهت به حداقل رساندن استرس و بهبود نتایج رفتاری، حیوانات قبل از روز خوگیری، حداقل دو روز در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند (۴). این روش، بر اساس تمایل ذاتی حیوان جهت شناخت شیء جدید است (۱۴) و در این آزمایش، از تمایل ذاتی حیوان جهت شناسایی اشیاء استفاده شد.

به طور خلاصه، دستگاه، یک فضای باز مکعبی به ابعاد $40 \times 35 \times 35$ سانتی‌متر با دیواره‌ی سیاه، کف سفید و بدون سقف بود. اشیای مختلف از نظر شکل و رنگ با جنس یکسان در آزمایش استفاده شدند. یک روز قبل از آزمایش، هر حیوان در حضور ۲ شیء یکسان، حداقل ۱۵ دقیقه در داخل دستگاه قرار گرفت. این مرحله، مرحله‌ی خوگیری حیوان (Habituation) بود. در روز آزمایش (۲۴ ساعت بعد)، در مرحله‌ی اول (مرحله‌ی یادگیری یا T_1)، حیوانات هر کدام در حضور ۲ شیء یکسان در دستگاه حافظه قرار گرفتند و مدت زمانی که طول می‌کشد تا اشیاء شناسایی شوند، به ثابته ثبت شد (تحت عنوان زمان T_1). شناسایی زمانی بود که حیوان بینی‌اش را به سمت شیء با فاصله‌ی کمتر از ۲ سانتی‌متر می‌رساند و با نگاه کردن و بو کردن، به شیء توجه می‌کند. حیوان طبیعی، زمان کمتری جهت

سرطان پروستات و ریزش مو می‌کاهد (۱۳). استروژن، علاوه بر اثر بر روی رفتار جنسی در پستانداران، بر روی سیستم اعصاب مرکزی و اعمال شناختی نیز مؤثر است. به تازگی، فیتواستروژن‌ها به خاطر نقش گسترده‌ای که در سلامتی دارند، تحت بررسی بیشتری قرار گرفته‌اند. استروژن‌ها بر عملکردهای شناختی (حافظه) نقش دارند و گیاه رازیانه هم به علت دارا بودن ترکیبات فیتواستروژنی، در موارد مختلف کاربرد دارد؛ ولی اثر و نقش این گیاه بر روی حافظه تا کنون مطالعه نشده است. لذا، با توجه به فراوانی گیاه رازیانه و فیتواستروژن‌های موجود در آن و تمایل روز افزون به مصرف داروهای گیاهی، اثرات این گیاه بر حافظه مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

تمامی آزمایشات بین ساعت ۹ تا ۱۳ صورت گرفت. در مجموع، ۶۰ سر موش سوری نر نژاد Balb-c، با وزن بین ۲۵-۳۰ g مورد استفاده قرار گرفتند. در هر گروه، ۶ موش مورد مطالعه قرار گرفت. این گروه‌ها به شرح زیر می‌باشند: ۱- گروه نرمال‌سالین، ۲- گروه اسکوپولامین + نرمال‌سالین، ۳- گروه رازیانه، ۴- گروه اسکوپولامین + رازیانه، ۵- گروه اسکوپولامین + استرادیول، ۶- گروه اسکوپولامین + رازیانه + تاموکسیفن، ۷- گروه اسکوپولامین + رازیانه + دارونما (DMSO یا Dimethyl sulfoxide)، ۸- گروه تاموکسیفن و ۹- گروه استرادیول.

ملاحظات اخلاقی بر اساس کار کردن صحیح با حیوان آزمایشگاهی و دستورالعمل تصویب شده‌ی اخلاقی کار با حیوانات در دانشگاه علوم پزشکی

شناسایی نیاز دارد؛ بدین معنی که اغلب، شناسایی در مدت کمتر از ۵ دقیقه کامل می‌شود (۴). در مرحله‌ی دوم، تحت عنوان مرحله‌ی آزمون حافظه یا T_2 ، که به فاصله‌ی ۲۰ دقیقه از مرحله اول صورت می‌گرفت، یکی از اشیای قدیمی (F یا Familial) با یک شیء جدید (N یا Novel) جایگزین می‌شد و حیوان به مدت ۵ دقیقه در دستگاه حافظه قرار گرفته، مدت زمانی که صرف شناسایی هر کدام از اشیاء می‌شد، ثبت می‌گردید. حیوانات طبیعی مدت زمان بیشتری صرف شناسایی شیء جدید می‌کنند (۱۴، ۴).

حیواناتی که از مطالعه حذف شدند شامل حیواناتی بود که در زمان مورد نظر T_1 (حداکثر ۱۲ دقیقه) نتوانستند شناسایی شیء را به اتمام برسانند، حیواناتی که حداقل زمان لازم جهت شناسایی اشیاء جدید و قدیمی در T_2 در آن‌ها کامل نشد (زمان شناسایی شیء جدید + شیء قدیم > 3 ثانیه) و حیواناتی که به طور ذاتی حس کنجکاوی کمی داشتند (۱۴، ۴).

اطلاعات مربوط به رفتار حیوان در دستگاه حافظه، توسط دوربینی که در بالای دستگاه نصب شده بود، ثبت شد. از اطلاعات ثبت شده، زمان‌های مربوط به آزمون‌های حافظه (T_1 و T_2) اندازه‌گیری شد و معیار تشخیص (RI یا Recognition index) محاسبه گردید (۴)؛ $RI = (N - F/N + F) \times 100$ که در آن F مساوی مدت زمان شناسایی شیء قدیمی و N برابر مدت زمان شناسایی شیء جدید بر حسب ثانیه است. مقادیر RI مثبت دلالت بر حافظه‌ی خوب و مقادیر نزدیک صفر و منفی دلالت بر اختلال حافظه دارد.

از آن جایی که آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی

موسکاربینی اثر ثابت شده‌ای در ایجاد اختلال حافظه دارند (۱۵)، برای ایجاد اختلال حافظه از آمپول اسکوپولامین 20 mg/ml از شرکت دارویی ایران اکسیر استفاده شد که با دوز 0.5 mg/kg بعد از T_1 ، به صورت زیرجلدی (SC یا Subcutaneous) تزریق گردید. عصاره‌ی رازیانه به صورت قطره‌ی آماده‌ی 15 mg/ml از شرکت باریج اسانس تهیه شد. در روز آزمایش، ۱۵ دقیقه قبل از انجام T_1 ، موش‌های مورد نظر به میزان 10 ml/kg عصاره‌ی رازیانه به ازای وزن بدن به صورت داخل صفاقی (IP یا Intraperitoneal) دریافت نمودند. به گروه شاهد، نرمال‌سالین تزریق شد. تزریق استرادیول نیز به همین صورت انجام گرفت؛ ۱۵ دقیقه قبل از انجام T_1 ، به موش‌های گروه مورد نظر، 0.2 از استرادیول 10 mg/ml شرکت داروسازی ابوریحان به ازای وزن بدن به صورت IP تزریق شد (۱۶). قرص تاموکسیفن 10 mg شرکت ایران هورمون، پس از انحلال در DMSO، ۳۰ دقیقه قبل از انجام T_1 به میزان 1 mg/kg به ازای وزن بدن به صورت IP تزریق شد (۱۷). به گروه شاهد به جای تاموکسیفن، دارونما (DMSO) تزریق گردید (گروه ۷). جهت اندازه‌گیری غلظت استرادیول سرم در موش‌های تحت درمان با عصاره‌ی رازیانه و گروه شاهد، بعد از انجام آزمایش حافظه، خون‌گیری از حیوانات انجام شد و با سانتریفوژ، سرم تفکیک و تا روز آزمایش، در 20°C - درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

استرادیول نمونه‌های سرم با استفاده از کیت (Enzyme-linked immunosorbent assay) ELISA اندازه‌گیری شد (مدل ۳۰۰-۴۹۲۵، شرکت Accu-Bind). در این روش، چاهک‌های میکروپلیت

با آنتی‌بادی منوکلونال ضد استرادیول پوشش داده شد. استرادیول سرم و استرادیول نشان‌دار (استرادیول آنزیم کنژوگه) به چاهک‌ها اضافه گردید. پس از یک ساعت، محتوی چاهک‌ها خالی و چاهک‌ها شست و شو داده شد. استرادیول سرم و استرادیول کنژوگه به صورت رقابتی به آنتی‌بادی جدار چاهک‌ها اتصال می‌یابد. با افزودن محلول سوبسترا (کوموژن)، رنگ آبی پدید آمد؛ سپس، با اضافه کردن محلول متوقف‌کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل شد. شدت رنگ زرد حاصل، ارتباط معکوس با غلظت استرادیول موجود در نمونه‌ها داشت. رنگ حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر، در برابر طول موج رفرانس ۶۳۰ نانومتر در دستگاه ELISA خوانده شد و مقادیر استرادیول نمونه‌ها بر اساس غلظت‌های استاندارد کیت، محاسبه گردید.

نتایج در گروه‌ها به صورت میانگین گروه \pm انحراف معیار محاسبه شد و به کمک روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (Analysis of variance) یا ANOVA با آزمون Tukey's Post-hoc مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر استرادیول پلاسما از طریق آزمون Student-t مورد مقایسه قرار گرفت. مقادیر $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. بیان نتایج آماری و رسم نمودار، با استفاده از نرم‌افزار Prism₅ GraphPad (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) انجام گرفت.

یافته‌ها

متوسط زمان یادگیری در موش‌های دریافت‌کننده هر کدام از داروهای رازیانه، استرادیول و دارونما به تنهایی تفاوتی با گروه شاهد نداشت (شکل ۱). متوسط زمان

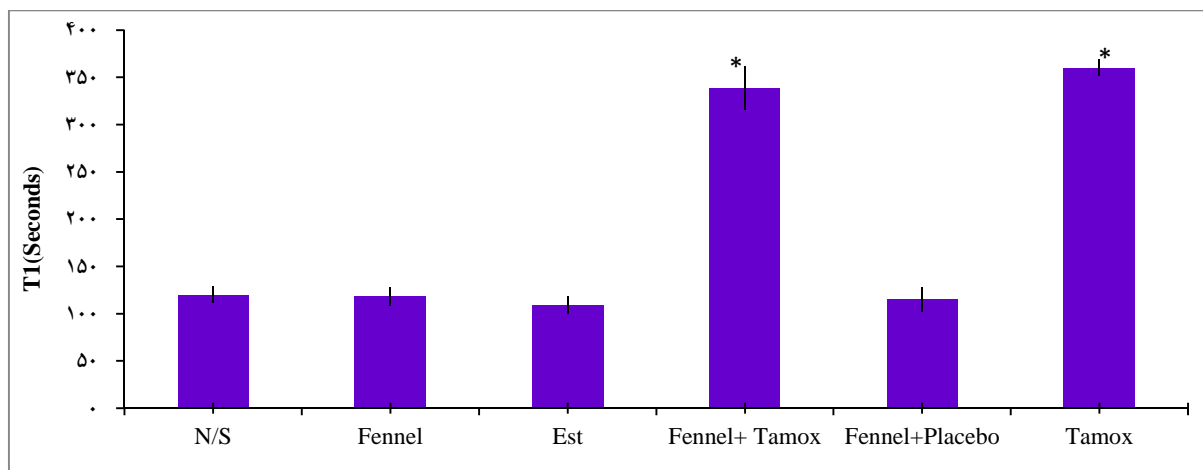
یادگیری در موش‌های دریافت‌کننده تاموکسیفن برابر با $9/2 \pm 360/0$ ثانیه بود که در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). موش‌های دریافت‌کننده رازیانه + تاموکسیفن نیز مدت زمان بیش‌تری جهت یادگیری نیاز داشتند.

نتایج حاصل از تست حافظه نشان داد که متوسط RI در موش‌های دریافت‌کننده رازیانه یا استرادیول، در مقایسه با گروه شاهد ($5/9 \pm 50/0$ درصد) تفاوت معنی‌داری نداشت (نمودار ۲). به دنبال تزریق اسکوپولامین، RI به صورت قابل توجهی کاهش یافت ($3/0 \pm 16/0$ - درصد و $P < 0/001$) که این امر، نشان‌دهنده کاهش حافظه در موش‌های دریافت‌کننده اسکوپولامین در مقایسه با گروه شاهد بود. متوسط RI در موش‌هایی که علاوه بر اسکوپولامین، رازیانه نیز دریافت کردند ($7/1 \pm 35/0$ درصد)، در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت؛ ولی در مقایسه با گروه اسکوپولامین، ($3/0 \pm 16/0$ - درصد) به صورت قابل توجهی افزایش یافت ($P < 0/001$). در گروهی که علاوه بر اسکوپولامین، استرادیول دریافت نمودند، RI افزایش یافت و مقادیر نزدیک به گروه شاهد حاصل شد. این در حالی است که، حافظه به صورت قابل توجهی در مقایسه با گروه اسکوپولامین افزایش داشت ($P < 0/001$) (شکل ۲).

مصرف تاموکسیفن کاهش معنی‌داری در RI ($4/6 \pm 19/0$ - درصد) در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P < 0/001$) (شکل ۳). به طور مشابه، در موش‌هایی که هم‌زمان با رازیانه و اسکوپولامین، تاموکسیفن نیز دریافت نمودند، RI به طور معنی‌داری از حد طبیعی کمتر شد ($7/1 \pm 29/0$ - درصد) ($P < 0/001$). این امر، نشان‌دهنده تأثیر منفی

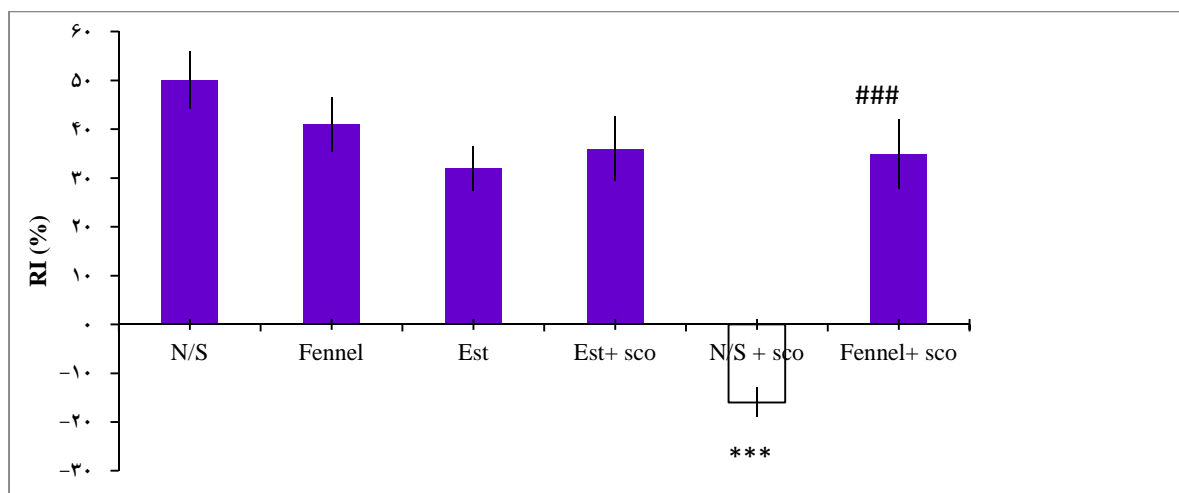
غلظت استرادیول سرم در گروه رازیانه
 $(119/0 \pm 15/0 \text{ pg/ml})$ به میزان چشم‌گیری بیشتر
 از گروه شاهد بود ($P < 0/010$).

تاموکسیفن بر حافظه‌ی حیوانات است.
 شکل شماره‌ی ۴، نتایج حاصل از اندازه‌گیری
 غلظت استرادیول سرم حیوانات را نشان می‌دهد.



شکل ۱. اثر داروهای مصرفی شامل رازیانه، استرادیول و تاموکسیفن بر مرحله‌ی یادگیری (مرحله‌ی اول آزمایش یا T1)

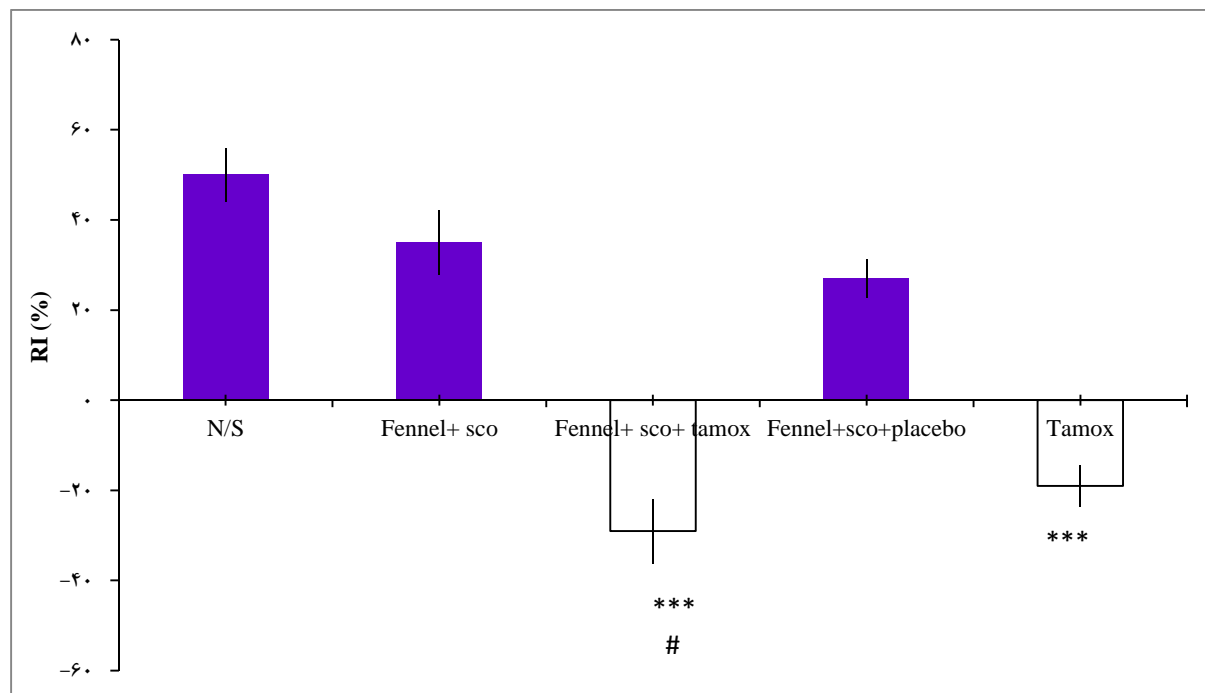
در این مرحله، حیوانات هر کدام در حضور ۲ شیء یکسان، در دستگاه قرار گرفتند و مدت زمانی که طول می‌کشید تا اشیا شناسایی شوند، ثبت می‌شد. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ عدد بود. علامت * نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین یادگیری با $P < 0/050$ ، در مقایسه با گروه شاهد است؛ N/S: نرمال‌سالین، Fennel: رازیانه، Est: استرادیول، Tamox: تاموکسیفن و Placebo: دارونما



شکل ۲. تأثیر داروهای مصرفی شامل رازیانه، استرادیول و اسکوپولامین بر حافظه‌ی حیوانات از طریق شاخص تشخیص

(RI یا Recognition Index)

مرحله‌ی آزمون حافظه با T2، به فاصله‌ی ۲۰ دقیقه از مرحله‌ی اول (T1) صورت می‌گرفت؛ یکی از اشیا قدیمی (F) با یک شیء جدید (N) جایگزین می‌شد و حیوان به مدت ۵ دقیقه در دستگاه حافظه قرار گرفته، مدت زمانی که صرف شناسایی هر کدام از اشیا می‌شد، ثبت می‌گردید. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ عدد بود. علامت *** نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین RI با $P < 0/001$ ، در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. علامت ### نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین RI در مقایسه با گروه نقص حافظه‌ی ناشی از اسکوپولامین با $P < 0/001$ است؛ N/S: نرمال‌سالین، Fennel: رازیانه، Est: استرادیول، Sco: اسکوپولامین.



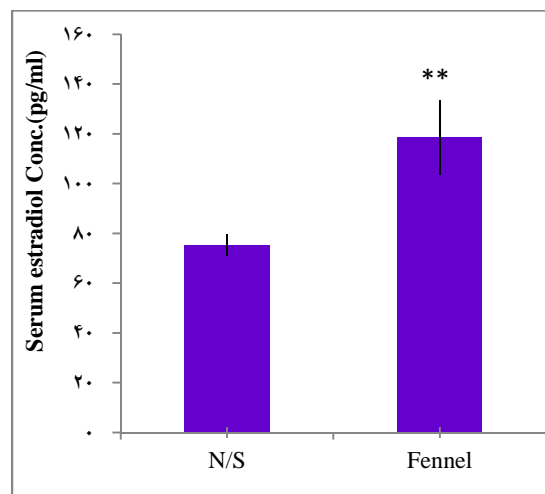
شکل ۳: تأثیر مصرف تاموکسیفن بر اندکس حافظه

در آزمون حافظه (T2) که به فاصله ۲۰ دقیقه از مرحله اول (T1) صورت می‌گرفت، یکی از اشیای قدیمی (F) با یک شیء جدید (N) جایگزین می‌شد و حیوان به مدت ۵ دقیقه در دستگاه حافظه قرار گرفته، مدت زمانی که صرف شناسایی هر کدام از اشیاء می‌شد، ثبت می‌گردید. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ عدد بود. علامت *** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میانگین RI $P < 0/001$ ، در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. علامت # نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میانگین RI $P < 0/05$ ، در مقایسه با گروه دارونما (رازیانه + اسکوپولامین + دارونما) است؛ N/S: نرمال‌سالین، Fennel: رازیانه، Est: استرادیول، Tamox: تاموکسیفن، Placibo: دارونما، Sco: اسکوپولامین

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که رازیانه می‌تواند مانع از ایجاد نقص حافظه ناشی از اسکوپولامین شود و این امر، هم‌راستا با اثر استرادیول در بهبود حافظه بود؛ در حالی که تاموکسیفن توانست اثرات مفید رازیانه بر بهبود حافظه را از بین ببرد.

روش بررسی شیء جدید، اولین بار توسط روش‌های Ennaceur و Delacour پایه‌ریزی شد و بر اساس تمایل ذاتی حیوان جهت شناخت شیء جدید است (۱۴). این روش شباهت زیادی به روش‌های بررسی حافظه در انسان دارد و نسبت به سایر روش‌های بررسی حافظه، استرس کم‌تری به حیوان وارد می‌کند؛



شکل ۴: تأثیر مصرف رازیانه بر سطح استرادیول پلاسما
علامت ** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میانگین غلظت استرادیول سرم $P < 0/010$ ، در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد؛ N/S: نرمال‌سالین، Fennel: رازیانه

ضمن این که، روش سریعی جهت بررسی حافظه می‌باشد (۴). مطالعات نشان داده است که اسکوپولامین می‌تواند باعث نقص حافظه شود (۱۵). در مطالعه‌ی حاضر، با تزریق اسکوپولامین، شاخص تشخیص به مقادیر زیر صفر رسید که بیانگر نقص حافظه بود. از آن جایی که این یافته‌ها در راستای مطالعات قبلی است (۴)، از این طریق، درستی روش کار و مناسب بودن شرایط انجام آزمایش مورد تایید قرار می‌گیرد.

به جز در مورد حیواناتی که تاموکسیفن دریافت کردند، مدت زمان مورد نیاز جهت یادگیری حیوانات، مشابه گروه شاهد بود. در حیواناتی که تاموکسیفن را به تنهایی یا به همراه رازیانه دریافت نمودند، مدت زمان مورد نیاز برای یادگیری افزایش یافت. این امر نشان می‌دهد که تاموکسیفن می‌تواند، موجب تأخیر در یادگیری شود. هیپوکمپ، در مغز نقش مهمی در یادگیری و حافظه دارد. مطالعات گروهی از محققین بر تعیین حجم هیپوکمپ با مداخله‌ی استروژن و تاموکسیفن نشان داده است که افزایش استروژن، موجب افزایش حجم هیپوکمپ و افزایش تاموکسیفن، موجب کاهش حجم آن می‌شود (۱۸). وجود استروژن برای تکامل هیپوکمپ ضروری است. با استفاده از تاموکسیفن، به عنوان آنتاگونیست استروژن، در عملکرد استروژن اختلالی پیش می‌آید که تکامل هیپوکمپ، سیر طبیعی خود را طی نمی‌کند (۱۷). اختلال یادگیری ناشی از تاموکسیفن، در مطالعه‌ی حاضر با مطالعات قبل در یک راستا می‌باشد.

در بررسی ما، رازیانه و استرادیول هر دو مانع از اثرات مخرب اسکوپولامین بر حافظه شدند. در این

راستا، مطالعات نشان داده است که مصرف استروژن به صورت حاد یا کوتاه مدت می‌تواند به طور قابل توجهی عملکرد کولینرژیک را در Basal forebrain، از طریق افزایش برداشت کولین به داخل پایانه‌ی عصبی و آزاد شدن استیل کولین وابسته به پتاسیم، افزایش دهد (۱۹). به علاوه، نشان داده شده است که تخریب انتخابی انشعابات کولینرژیک در این قسمت از مغز، مانع از اثرات مفید استروژن بر بهبود حافظه‌ی فضایی می‌شود (۱۹). به نظر می‌رسد رازیانه، همانند استرادیول، از طریق افزایش سطح استیل کولین در مغز، مانع از اثرات آنتاگونیستی اسکوپولامین به صورت رقابتی بشود.

جهت بررسی بیشتر مکانیسم اثر رازیانه، در گروهی از حیوانات، تاموکسیفن نیز به درمان اضافه شد. اگرچه، رازیانه مانع از نقص حافظه به دنبال اسکوپولامین می‌شود، ولی این اثر به دنبال مصرف تاموکسیفن معکوس شد (RI کمتر از حد طبیعی). بنا بر این، تاموکسیفن قادر است اثرات رازیانه را در بهبود حافظه از بین ببرد. این اثر در گروهی از حیوانات که دارونما دریافت کردند، مشاهده نشد. محققان دیگر به این نتیجه رسیده‌اند که تاموکسیفن از طریق بلوک گیرنده‌های استروژنی، باعث مهار اثر ضد اضطرابی رازیانه نسبت به گروه شاهد می‌شود (۲۰). آن‌ها به این نتیجه رسیده‌اند که با غیرفعال شدن گیرنده‌های استروژنی توسط تاموکسیفن، سایر عوامل یا فاکتورهای موجود در رازیانه باعث تغییر در فعالیت حرکتی می‌شوند. به عبارت دیگر، بلوک گیرنده‌های استروژن توسط تاموکسیفن، مانع از اثر ترکیبات فیتواستروژنیک رازیانه بر گیرنده‌های استروژنیک می‌شود؛ چرا که، فیتواستروژن‌ها اثراتی

ممانعت می‌کند. بنا بر این، با وجودی که فیتواستروژن‌ها فاقد ساختمان استروئیدی می‌باشند، واضح است که می‌توانند ترکیبات مؤثری در پیش‌گیری از اختلالات شناختی و حافظه، به خصوص در خانم‌های مسن بعد از یائسگی، باشند. از این رو، مطالعاتی وسیع‌تر در زمینه‌ی اثر فیتواستروژن‌ها بر واسطه‌های شیمیایی دخیل در حافظه می‌تواند، افق‌های تازه‌ای را در زمینه‌ی حافظه و روش‌های بهبود و پیش‌گیری از اختلالات شناختی نشان دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق، حاصل پایان‌نامه‌ی پزشکی به شماره‌ی ۱۰۱۵ می‌باشد که پس از تصویب معاونت تحقیقات و فناوری، در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی به انجام رسید.

بدین وسیله، از رئیس مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، آقای دکتر محمود رفیعیان، که در به ثمر رسیدن بهینه‌ی این پایان‌نامه یاری فرمودند، سپاسگزاری می‌نماییم.

شبه استروژن ایجاد می‌کنند و از طریق گیرنده‌های استروژنی بتا-ER عمل می‌کنند (۲۱). می‌توان عنوان کرد که تاموکسیفن به علت خواص آنتی‌استروژنی که دارد، مانع از اثر فیتواستروژن‌های رازیانه بر حافظه می‌گردد؛ لذا، بخشی از اثرات مفید رازیانه بر حافظه، ناشی از تأثیر آن بر گیرنده‌های استروژنی مغز می‌باشد.

سطح استرادیول سرم حیوانات دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی رازیانه به طور قابل توجهی از گروه شاهد بیشتر بود. این امر تاییدی است بر این که عصاره‌ی رازیانه، حاوی فیتواستروژن‌های فراوانی است که می‌تواند، اثرات مشابه استرادیول داشته باشد. عصاره‌ی رازیانه با افزایش سطح استرادیول اندازه‌گیری شده‌ی سرم، تأثیرات مفیدی بر حافظه اعمال کرده است.

نتیجه‌گیری

اثرات مفید رازیانه بر حافظه از طریق گیرنده‌های استروژنی صورت می‌گیرد؛ تحریک این گیرنده‌ها منجر به افزایش سطح استیل کولین در مغز می‌شود و از اثرات آنتاگونیستی اسکوپولامین به صورت رقابتی

References

- McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* 1995; 102(3): 419-57.
- Brown ES. Effects of glucocorticoids on mood, memory, and the hippocampus. Treatment and preventive therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1179: 41-55.
- Naber D, Sand P, Heigl B. Psychopathological and neuropsychological effects of 8-days' corticosteroid treatment. A prospective study. *Psychoneuroendocrinology* 1996; 21(1): 25-31.
- Mesripour A, Hajhashemi V, Rabbani M. Metyrapone and mifepristone reverse recognition memory loss induced by spontaneous morphine withdrawal in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102(4): 377-81.
- Kesmati M, Namayandeh H. Effect of acute and chronically administrated estradiol benzoate on the withdrawal syndrome in morphine dependent ovariectomized mice. *Iran J Endocrinol Metab* 2006; 8(1): 91-6. [In Persian].

6. Packard MG, Kohlmaier JR, Alexander GM. Posttraining intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic systems. *Behav Neurosci* 1996; 110(3): 626-32.
7. Naghdi N, Oryan S, Etemadi R. The study of spatial memory in adult male rats with injection of testosterone enanthate and flutamide into the basolateral nucleus of the amygdala in Morris water maze. *Brain Res* 2003; 972(1-2): 1-8.
8. Joseph R, Hess S, Birecree E. Effects of hormone manipulations and exploration on sex differences in maze learning. *Behav Biol* 1978; 24(3): 364-77.
9. Balthazart J, Cornil CA, Taziaux M, Charlier TD, Baillien M, Ball GF. Rapid changes in production and behavioral action of estrogens. *Neuroscience* 2006; 138(3): 783-91.
10. Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* 2003; 17(8): 845-69.
11. Cos P, de Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* 2003; 69(7): 589-99.
12. Marotti M, Dellacecca V, Piccaglia R, Giovanelli E, Palevitch D, Simon J. Agronomic and chemical of tree varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. *Acta Horticulture*, 1993; 331: 63-9.
13. Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer* 1991; 16(1): 43-52.
14. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; 31(1): 47-59.
15. Dodart JC, Mathis C, Ungerer A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport* 1997; 8(5): 1173-8.
16. Packard MG, Teather LA. Posttraining estradiol injections enhance memory in ovariectomized rats: cholinergic blockade and synergism. *Neurobiol Learn Mem* 1997; 68(2): 172-88.
17. Nobakht M, Shafiee M, Tabatabaee P, Rastegar T. Assessment of tamoxifen effects on Nitric Oxide Synthase (NOS) in rat's developing hippocampus. *Razi j Med Sci* 2008; 15(59): 181-90. [In Persian].
18. Patrone C, Andersson S, Korhonen L, Lindholm D. Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(19): 10905-10.
19. Gabor R, Nagle R, Johnson DA, Gibbs RB. Estrogen enhances potassium-stimulated acetylcholine release in the rat hippocampus. *Brain Res* 2003; 962(1-2): 244-7.
20. Pourabbas S, Kesmati M, Rasekh A. Study of the the anxiolytic effects of fennel and possible roles of both gabaergic system and estrogen receptors in these effects in adult female rat. *Physiol Pharmacol* 2011; 15(1): 134-43.

Evaluating the Effect of *Foeniculum Vulgar* on Scopolamin-Induced Memory Impairment in Male Mice

Azadeh Mesripour PharmD, PhD¹, Zahra Alibabaei², Atefeh Emadi³,
Mohammad Reza Hojjati PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Estrogen is a steroid that regardless of its obvious effects on females' reproductive functions shows beneficial effects on cognition. *Foeniculum vulgare* (fennel) has phytoestrogen compounds that might be beneficial in memory performance. This research was performed to understand if this plant can improve memory.

Methods: To evaluate memory, novel object recognition task was used in male Balb-c mice, which comprised of three sections: habituation, learning trial (T1) and the test trial (T2). In this method, the difference in the exploration time between a familiar (F) and a novel (N) object is taken as an index of memory performance [recognition index (RI) = $(N - F)/(N + F) \times 100$].

Findings: Memory was harmed using 0.5 mg/kg subcutaneous scopolamine [RI (%) = -16.0 ± 3.0]. 50 mg/kg intraperitoneal fennel considerably prevented memory impairment of scopolamine [RI (%) = 35.0 ± 7.1] and this was parallel with the memory index in normal animals [RI (%) = 50.0 ± 5.8]. In addition, 0.2 mg/kg intraperitoneal 17- β estradiol showed similar results as fennel on memory protection [RI (%) = 36.0 ± 6.6]. However, the beneficial effects of fennel were impaired by prior intraperitoneal injection of 1 mg/kg tamoxifen [RI (%) = -29.0 ± 7.1].

Conclusion: The beneficial effect of fennel on memory is achieved by estrogenic receptors present in the brain; by stimulating these receptors, they could cause an increase in acetylcholine release. Therefore, it can competitively prevent the antagonizing effect of scopolamine on cholinergic receptors.

Keywords: Estrogen, *Foeniculum vulgare*, Memory, Phytoestrogen

Citation: Mesripour A, Alibabaei Z, Emadi A, Hojjati MR. **Evaluating the Effect of *Foeniculum Vulgare* on Scopolamin-Induced Memory Impairment in Male Mice.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(326): 294-304

1- Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Medical Plants Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

3- Student of Medicine, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

4- Associate Professor, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Azadeh Mesripour PharmD, PhD, Email: a_mesripour@yahoo.com