

## اثر عصاره آبی-الکلی دانه زغال اخته بر بازخوانی حافظه و برخی پارامترهای سرم در موش‌های سوری نر آلزایمری شده

نیلوفر دربندی <sup>۱\*</sup> Ph.D.، مریم هزاوه‌ای <sup>۲</sup> M.Sc.، فاطمه قدیمی <sup>۳</sup> M.Sc.، میترا نوری <sup>۱</sup> Ph.D.

- ۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۸۳۳۹-۸-۳۸۱۵۶  
 ۲- دانشجوی دکتری، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی  
 ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: N-Darbandi@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۳

### چکیده

**هدف:** در تحقیق حاضر، تاثیر عصاره دانه زغال اخته بر یادگیری و حافظه و برخی پارامترهای سرم در موش‌های سوری نر آلزایمری بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** ۴۸ سر موش با وزن تقریبی ۲۵ تا ۳۰ گرم به ۶ گروه تقسیم شدند: سالیین-سالیین، STZ-سالیین، STZ-عصاره دانه زغال اخته (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم)، سالیین-دوز موثر عصاره دانه زغال اخته. جهت ایجاد بیماری آلزایمر از تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین (۳ میلی گرم بر کیلوگرم) استفاده شد و میزان حافظه و یادگیری از طریق آزمون احترازی غیرفعال ارزیابی شد. کلیه گروه‌ها به مدت ۳ هفته عصاره دانه زغال اخته و یا سالیین را به شکل داخل صفاقی دریافت کردند، سپس وارد آزمون‌های یادگیری شدند. در پایان تمام حیوانات کشته و خون گیری از بطن راست انجام گرفت. میزان گلوکز، تری گلیسیرید و کلسترول تام در سرم اندازه گیری شد. همچنین در طول دوره تیمار وزن گیری از موش‌ها در ابتدای هر هفته انجام شد. داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی و یا آنالیز واریانس با اندازه گیری‌های مکرر بررسی شد.

**نتایج:** تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین به طور معنی داری منجر به تخریب حافظه شد ( $p < 0/001$ ). عصاره دانه زغال اخته در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بازخوانی حافظه را بهبود بخشید ( $p < 0/001$ ) و منجر به کاهش معنی دار سطح گلوکز و تری گلیسیرید سرم شد ( $p < 0/01$ ) اما بر میزان کلسترول تام تاثیر معنی داری نداشت ( $p > 0/05$ ). کاهش وزن تنها در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم معنی دار بود ( $p < 0/01$ ).

**نتیجه گیری:** احتمالاً زغال اخته با کاهش میزان فاکتورهای خطر ساز در خون و تنظیم سوخت و ساز گلوکز و چربی‌ها، موجب تقویت حافظه در بیماری‌های تخریب کننده عصبی مانند آلزایمر می شود.

**واژگان کلیدی:** آلزایمر، زغال اخته، موش سوری

## مقدمه

میوه‌های مصرفی متداول دارای بالاترین سطح پلی فنول می‌باشد. پلی فنول‌های موجود در زغال‌اخته باعث کاهش کلسترول و حفظ LDL (Low Density Lipoprotein) خون می‌گردد. تحقیقات نشان می‌دهد آنتوسیانین‌ها می‌توانند باعث کاهش بیماری‌هایی مانند آترواسکلروز، بیماری قلبی عروقی، سرطان و دیابت گردند. زغال‌اخته دارای سطح بالایی از آنتوسیانین‌هاست. آنتوسیانین‌های موجود در زغال‌اخته شامل دلفینیدین ۳-۱- بتاگالاکتوپیرانوزونوئید و پلارگونیدین ۳-۱ و گالاکتوپیرانوزونوئید می‌باشد (۹ و ۱۲).

در دوران حاضر کمی تحرک و رژیم غذایی نامناسب در میان افراد جامعه به میزان قابل توجهی منجر به شیوع سندرم متابولیک شده است. در این حالت بیماری‌های قلبی-عروقی و دیابت نوع II افزایش می‌یابد. در نتیجه شرایط برای مرگ سلول‌ها خصوصاً در سیستم عصبی فراهم آمده و این یکی از دلایل اصلی افزایش آلزایمر حتی در سنین پایین در جوامع امروزی می‌باشد. با افزایش سن امید به زندگی، تعداد افراد مسن نیز افزایش یافته است، در این افراد علاوه بر شرایط زندگی، سن نیز زمینه را برای بروز آلزایمر فراهم می‌نماید. اگرچه برای این بیماری درمان قطعی وجود ندارد اما می‌توان از سرعت شروع و پیشرفت آن کاست. یک راه حل ساده استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها به‌عنوان سرکوب‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد و افزایش حساسیت سلول‌ها به انسولین می‌باشد. علاوه بر آن با توجه به این که لیپیدها یکی از سوبستراهای لازم برای عمل رادیکال‌های آزاد می‌باشند، به‌نظر می‌رسد اگر این ترکیب کمتر در دسترس رادیکال آزاد باشد، عوارض ناشی از استرس اکسیداتیو نیز کمتر خواهد شد.

با توجه به این‌که زغال‌اخته منبع غنی از فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها است، در این پژوهش به بررسی اثر عصاره دانه زغال‌اخته بر به‌خاطرآوری حافظه در موش‌های نر آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین پرداخته شد. همچنین تاثیر این عصاره بر کاهش وزن و پارامترهای خونی نظیر گلوکز، تری‌گلیسیرید، کلسترول که همگی از عوامل خطر ساز در سندرم متابولیک و بروز بیماری‌های سیستم عصبی هستند مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری:** در این تحقیق از ۴۸ سر موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر، نژاد NMRI (وزن تقریبی ۲۵ تا ۳۰ گرم) استفاده شد. حیوانات در حیوان‌خانه

بیماری آلزایمر نوعی بیماری نورودژنراتیو پیشرونده غیرقابل برگشت و تدریجی است که موجب اختلال حافظه، کاهش عمل‌کردهای شناختی و توانایی‌های فکری، همچنین تغییرات رفتاری می‌گردد (۱ و ۲). در آلزایمر نوع دیررس (اسپورادیک) که تقریباً ۹۰ تا ۹۵ درصد از موارد بیماری آلزایمر را تشکیل می‌دهد وراثت نقش چندانی نداشته و معمولاً در دهه ششم زندگی مشخص می‌شود. در این نوع کاهش بارزی در استفاده از گلوکز مغزی همراه با کاهش مداوم انرژی در دسترس مغز مشاهده می‌شود. این ناهنجاری به‌علت اختلال در عملکرد سیگنال‌های نورونی انسولین (مقاومت انسولینی) ایجاد می‌شود. کاهش غلظت انسولین در مغز بیماران آلزایمری پس از مرگ و در مایع مغزی-نخاعی آنان مشاهده شده است (۳).

استرپتوزوتوسین (STZ) در تزریق درون مغزی در دوز زیر دیابتی در جوندگان با ایجاد آسیب‌های استرس اکسیداتیو از طریق ایجاد مقاومت به انسولین و کاهش گلوکز و در نتیجه انرژی در دسترس مغز هم‌چنین ایجاد پروتئین بتا آمیلوئید و رادیکال‌های آزاد موجب بروز نقص در حافظه و اختلالات شناختی مشابه بیماری آلزایمر اسپورادیک در این حیوانات می‌گردد (۴). تحقیقات نشان دادند که تزریق داخل بطنی STZ با مهار سنتز ATP و استیل‌کوآنزیم A و در نتیجه سنتز استیل‌کولین موجب آسیب عمل‌کردهای شناختی شده و فعالیت آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری شده کاهش می‌یابد (۵). مطالعات نشان داده‌اند عوامل آنتی‌اکسیدانت می‌توانند در تخفیف بیماری آلزایمر موثر باشد (۶).

زغال‌اخته با نام علمی *Cornus mas L.* از خانواده Cornaceae و جز گیاهان دولپه‌ای درختی است. زغال‌اخته حاوی مقادیر کمی گلوکز و ساکارز بوده اما مقادیر زیادی آهن، کلسیم، ویتامین‌های E, B1, B2, C, اسیدفولیک و فلاونوئیدها است. زغال‌اخته حاوی بیش از ۱۰ درصد تانن، قند، پکتین، اسیدهای آلی و رنگدانه‌هاست. آنتوسیانین موجود در زغال‌اخته از گروه فلاونوئیدها می‌باشد (۷). فلاونوئیدها دارای اثرات فارماکولوژیک گوناگونی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانتی، ضد آلرژی، ضد باکتریایی، ضد سرطان، کاهنده چربی و کلسترول، مهار تجمع پلاکتی و ضد دیابت می‌باشد (۸ و ۹). آنتی‌اکسیدانت‌های زغال‌اخته شامل بوتیل هیدروکوانیل، هیدروکسی تولون بوتیرات و هیدروکسی آنیزول بوتیرات است (۱۰ و ۱۱). زغال‌اخته در میان

**روش جراحی و کانول گذاری در بطن های جانبی:** ابتدا هر موش بر اساس وزن به وسیله تزریق داخل صفاقی مخلوطی از ترکیب کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلزین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بی هوش شد. مختصات بطن های جانبی بر اساس اطلس پاکسینوس و فرانکلین به دست آمد (۰/۴ میلی متر به سمت عقب از برگما، ۱ میلی متر در طرفین شکاف ساژیتال و ۰/۷ میلی متر به طرف پایین از سطح جمجمه). در سطح جمجمه محل کانول گذاری توسط مته دندانپزشکی تا پرده مننژ سوراخ شد. کانول های راهنما به طول ۵ میلی متر از سرسوزن ۲۲ گیج تهیه شده و به صورت دو طرفه در محل های سوراخ شده، حدود ۱ میلی متر بالاتر از ناحیه مورد نظر به کمک آکریل دندانپزشکی ثابت شد.

**روش تزریق درون مغزی:** برای تهیه کانول تزریق، سر سوزن ۲۷ گیج دندان پزشکی که یک میلی متر بلندتر از کانول راهنما بریده شده، به رابط پلی اتیلنی و سرنگ هامپلتون استفاده گردید. تزریق درون بطنی با حجم ۳ میکرولیتر در روز اول و سوم جراحی انجام شد. در پایان آزمایش های مربوطه برای ارزیابی صحت عملیات و درستی مختصات محل جراحی و تزریق، مقدار ۱ میکرولیتر از محلول ۱ درصد آبی متیلن بلو به صورت دو طرفه تزریق شده، مغز حیوان از جمجمه خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت یک هفته ثابت شد. برش گیری در ناحیه تزریق و بررسی توزیع رنگ در فضای بطن های جانبی بیانگر میزان صحت کانول گذاری بود. داده های حیواناتی که محل کانول گذاری آن ها خارج از این ناحیه بود از آنالیزها حذف شد.

**دستگاه سنجش حافظه:** جهت سنجش حافظه و یادگیری از دستگاه step-down استفاده شد (۱۴). این دستگاه از جعبه ای به ابعاد ۴۰×۳۰×۳۰ سانتی متر تشکیل شده است. کف دستگاه پوشیده از میله های موازی با قطر ۰/۳ و به فاصله مساوی ۱ سانتی متر از هم است. همچنین یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد ۴×۴×۴ سانتی متر در قسمت میانی کف دستگاه روی میله های فلزی قرار دارد. این جعبه به دستگاه مولد جریان الکتریکی متصل است. هنگامی که دستگاه روشن می شود یک جریان الکتریکی با مشخصات ۱ هرتز، ۸ ثانیه و ۵۰ میلی ولت در میله های فلزی برقرار می شود.

**یادگیری اجتنابی غیر فعال:** یادگیری اجتنابی غیر فعال به روش «پایین آمدن از سکو» (Step down) برای بررسی

تحقیقاتی دانشگاه اراک تکثیر و تا رسیدن به وزن مناسب نگه داری می شدند. در طول نگه داری آب و غذای کافی در اختیار موش ها قرار گرفت. حیوانات در محیطی با دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد و با دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگه داری می شدند. آزمایش های مورد نظر در زمان معینی از روز انجام گرفت. هشت حیوان در هر گروه تجربی قرار داشت و هر حیوان فقط یک بار آزمایش شد. تمامی آزمایش ها طبق موازین اخلاقی کار با حیوانات و بر طبق دستورالعمل های نگه داری و استفاده از حیوانات انجام گرفت.

**داروها:** از کتامین هیدروکلراید و زایلزین (تهیه شده از شرکت WOERDAN- هلند) به عنوان داروهای بی هوشی و به صورت درون صفاقی استفاده شد. پودر استرپتوزوتوسین (تهیه شده از شرکت سیگما- آلمان) به صورت محلول در سالین با غلظت مورد نظر تزریق شد. برای تهیه دوزهای مختلف دانه زغال اخته عصاره مورد نظر در سالین حل شد. استرپتوزوتوسین (۳ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت درون بطن مغزی (۳ میکرولیتر در هر بطن) و عصاره دانه زغال اخته به صورت درون صفاقی (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق شد.

**تهیه عصاره هیدروالکلی دانه زغال اخته:** میوه زغال اخته از منطقه الموت قزوین تهیه و به کمک فلور رنگی ایران شناسایی شد (۱۳). پس از جدا کردن دانه ها از میوه، به ۱۰۰ گرم دانه کاملاً خرد و آسیاب شده زغال اخته مقدار ۱۰۴ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد. ارلن محتوی محلول را به ملایمت به صورت چرخشی هم زده و به مدت ۲ دقیقه روی هیتر با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس روی آن را با نسکوفیلیم پوشانده شده و به مدت ۲۴ ساعت زیر هود قرار داده شد. عصاره رویی جدا و به تفاله ها ۱۰۴ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه و مراحل فوق تکرار شد. در روز سوم محتویات رویی تفاله ها به آرامی به ظرف محتوی عصاره های قبلی اضافه شده و به ارلن حاوی تفاله ۵۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه و بعد از گذشت ۷۲ ساعت محلول رویی تفاله ها به ارلن حاوی عصاره دانه اضافه گردید. در انتها عصاره ها به دستگاه روتاری با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۴۰ متر بر ثانیه اضافه شد. بعد از اتمام تبخیر ۲۰/۶۱ گرم عصاره با استفاده از ۵۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد جمع آوری و به داخل ظرف درب دار دیگری منتقل شد. به کمک نرمال سالین دوزهای مختلف از این عصاره تام تهیه شد.

گرفته، به محض متوقف شدن تنفس و قبل از متوقف شدن ضربان قلب، قفسه سینه حیوان باز و به کمک سرنگ ۲ میلی لیتر از بطن راست حیوان خون گیری انجام می‌شود. سپس خون در داخل میکروتیوپ ریخته شده و به کمک سانتریفیوژ ۲ مرحله‌ای با دور ۱۶۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، سرم جدا و در داخل میکروتیوپ دیگری ریخته شد. میکروتیوپ‌ها در داخل فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و برای بررسی گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول تام به آزمایشگاه سینا در شهر اراک منتقل شدند.

**آنالیزهای آماری:** از نظر آماری، همه‌ی نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد (SEM) بیان شدند. جهت تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش رفتاری از آزمون آماری kruskal wallis و آنالیز Mann-Whitney's استفاده شد. همچنین جهت تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین پارامترهای خونی در گروه‌های آزمایشی، از روش آنالیز واریانس (Anova) یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey-test) استفاده گردید. داده‌های وزن، توسط نرم افزار SPSS و آنالیز تحلیل واریانس با اندازه گیری‌های مکرر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در این بررسی سطح  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

#### اثر تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین بر روی حافظه اجتنابی غیر فعال

آزمون آماری kruskal wallis نشان داد که تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روزهای اول و سوم پس از جراحی تاخیر در پایین آمدن از سکو را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد که به معنی تخریب حافظه است [H (۱) = ۱۱/۴۹۶،  $p < 0.001$ ]. آنالیز با-Mann Whitney's نشان داد که STZ، تاخیر در پایین آمدن از سکو یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش داده است ( $p < 0.001$ ) (نمودار ۱).

#### اثر تزریق دوزهای مختلف عصاره دانه زغال اخته در به‌خاطر آوری موش‌های آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین

تجویز مقادیر مختلف عصاره دانه زغال اخته به صورت درون صفاقی با دوزهای ۲۵ و ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ۲۱ روز پیش

حافظه در موش‌های آزمایشگاهی در دو روز پشت سر هم انجام شد. روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوانات در دستگاه می‌باشد، روز دوم یا روز آزمون شامل بررسی یا تست میزان حافظه‌ی حیوانات آموزش دیده است

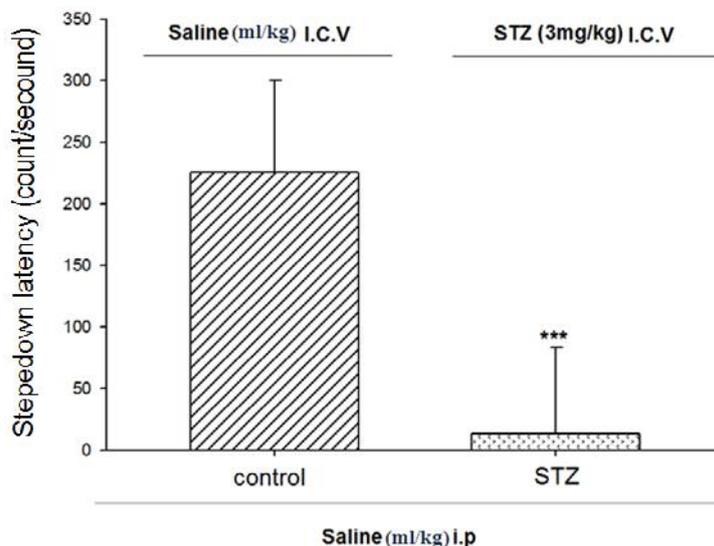
۱- هر موش با احتیاط کامل روی سکوی دستگاه قرار گرفت. به محض آن که حیوان از مکعب چوبی پائین آمده و چهار پای حیوان روی میله‌های فولادی قرار می‌گرفت، به مدت ۸ ثانیه به پاهای حیوان شوک الکتریکی وارد می‌شد. پس از آن موش از دستگاه خارج و به قفس نگه‌داری منتقل شد. مراحل آموزش بین ۸ صبح تا ۲ بعد از ظهر انجام گرفت.

۲- برای ارزیابی و اندازه گیری اثر داروها، جلسه آزمون ۲۴ ساعت بعد از آموزش بوده و از نظر روش مشابه جلسه آموزش است با این تفاوت که در این مرحله حیوان شوک نمی‌گیرد. به محض این که موش هر چهار پای خود را از سکو جدا کرده و پائین می‌آید زمان یادداشت می‌شود. مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان به طور کامل از سکو پایین بیاید، تاخیر در پایین آمدن از سکو (Step-down latency) نام دارد. حداکثر زمان آزمون ۳۰۰ ثانیه است و در صورتی که حیوان در طول این مدت از سکو پایین نمی‌آید از دستگاه خارج و زمان تاخیر برای حیوان ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شود.

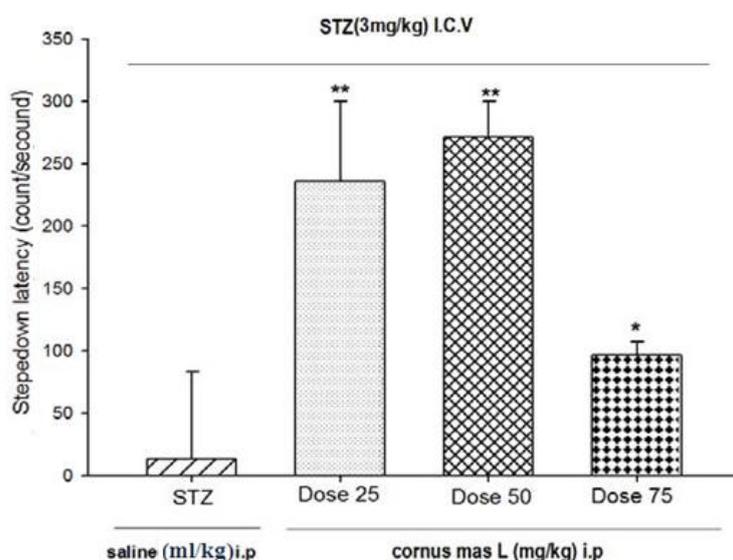
**آزمایش‌های انجام شده:** حیوانات به سه گروه کلی گروه کنترل، گروه آلزایمری و گروه‌های دریافت کننده عصاره تقسیم شدند. در تزریق درون مغزی در گروه کنترل از سالین و در مابقی گروه‌ها از STZ (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به میزان ۳ میکرولیتر در هر بطن استفاده شد (۱ و ۲۰ و ۲۵). در تزریق درون صفاقی گروه کنترل و گروه آلزایمری سالین و گروه‌های دریافت کننده عصاره، عصاره دانه زغال اخته را در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۱ روز به طور پیوسته با فاصله زمانی ۲۴ ساعت دریافت نمودند. گروه کنترل مثبت در تزریق درون مغزی سالین (میلی‌گرم بر کیلوگرم) و در تزریق درون صفاقی عصاره دانه زغال اخته را در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرد. پس از اتمام تیمار یعنی در روزهای ۲۲ و ۲۳ هر دوره، مراحل آموزش و آزمون حافظه انجام شد. در تمام گروه‌های آزمایشی حیوانات در ابتدای هر هفته وزن کشی شدند و به محض اتمام تست‌های رفتاری، حیوانات به ترتیب در داخل دسیکاتور حاوی پنبه آغشته به کلروفرم قرار

دانه زغال‌اخته تاخیر در پایین آمدن از سکو را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد [ $H(3) = 13/926, p < 0/01$ ] که به معنی بهبود حافظه است. آنالیز با Mann-Whitney's نشان داد بیش‌ترین تاثیر مربوط به دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد ( $p < 0/01$ ) (نمودار ۲).

از آموزش (شروع آن از یک روز قبل از جراحی) و تزریق استرپتوزوتوسین با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت درون‌معزی در روز اول و سوم جراحی، حافظه را با نسبت‌های مختلف در مقایسه با گروه STZ بهبود بخشید. آزمون آماری kruskal wallis نشان داد که تیمار با مقادیر مختلف عصاره



نمودار ۱: اثر استرپتوزوتوسین بر حافظه اجتنابی غیر فعال. این نمودار کاهش تاخیر در پایین آمدن از سکو را در موش‌های سوری‌های آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. گروه STZ این ماده را با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل بطنی با حجم ۳ میکرولیتر در هر بطن در روز اول و سوم پس از جراحی و سالیین را از یک روز قبل از جراحی به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه کنترل در تزریق داخل مغزی و صفاقی سالیین دریافت کردند ( $p < 0/001$ ).



نمودار ۲: اثر دوزهای مختلف عصاره دانه زغال‌اخته در بهبود حافظه‌ی موش‌های آلزایمری شده با استرپتوزوتوسین. این نمودار نشان‌دهنده مقایسه گروه STZ با گروه‌های آزمایشی است که به‌طور هم‌زمان عصاره دانه زغال‌اخته را به‌صورت داخل صفاقی و استرپتوزوتوسین را به‌صورت داخل بطن مغزی دریافت نمودند. تزریق درون صفاقی عصاره دانه به‌طور معنی‌داری موجب بهبود حافظه یعنی افزایش تاخیر در پایین آمدن از سکو می‌شود. این بهبود در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به سایر دوزها مشخص‌تر می‌باشد ( $p < 0/05$  و  $p < 0/01$ ).

اثر تزریق دوز موثر عصاره دانه زغال‌اخته بر به‌خاطر‌آوری حافظه

(نمودار ۳).

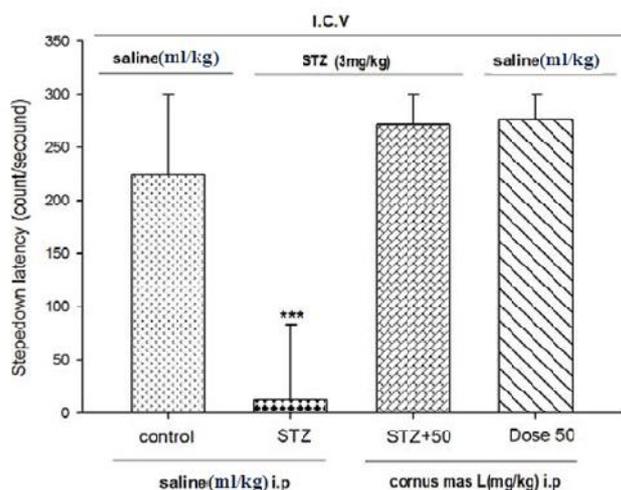
اثر تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف عصاره دانه زغال-

اخته بر سطح گلوکز سرم

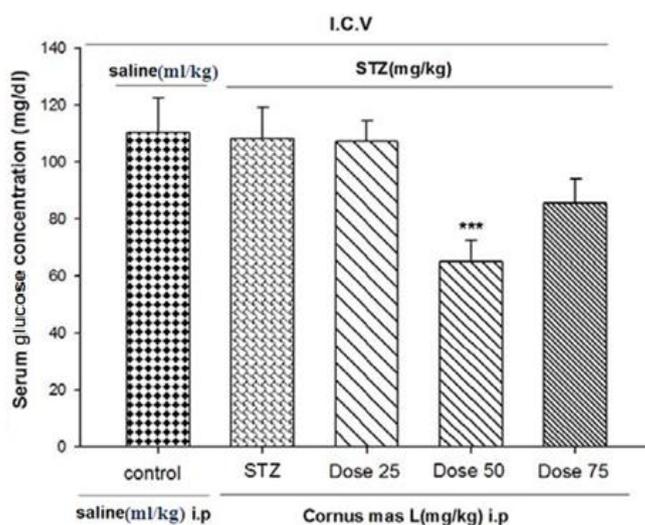
آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تجویز درون صفاقی مقادیر مختلف عصاره دانه زغال‌اخته از ۲۱ روز قبل از تهیه نمونه سرم، سبب کاهش گلوکز موجود در سرم شد. این تزریق تنها در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت معنی‌داری سبب کاهش گلوکز موجود در سرم شد [F(۳, ۱۵) = ۱۵/۸۳۰, p < ۰/۰۰۱] (نمودار ۴).

آزمون آماری wallis kruskal نشان داد که تجویز عصاره دانه زغال‌اخته به‌صورت درون صفاقی با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث بهبود حافظه نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده STZ شد [H(۳) = ۱۵/۶۲۵, P < ۰/۰۰۱].

آنالیز با Mann-Whitney's نشان داد این بهبود حافظه نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبوده (p > ۰/۰۵) ولی نسبت به گروه دریافت‌کننده استرپتوزوتوسین معنی‌دار است (p < ۰/۰۰۱).



نمودار ۳: اثر دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه زغال‌اخته به تنهایی در مقایسه با گروه‌های کنترل، STZ و گروهی که عصاره دانه زغال‌اخته را به‌صورت داخل صفاقی با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و STZ را به‌صورت داخل بطنی دریافت کرده‌اند. این نمودار نشان می‌دهد که دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به تنهایی حافظه را نسبت به گروه STZ/افزایش می‌دهد (p < ۰/۰۰۱).



نمودار ۴: اثر تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف عصاره دانه زغال‌اخته در کاهش غلظت گلوکز موجود در سرم. تزریق داخل صفاقی عصاره دانه زغال‌اخته در دوزهای ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل و STZ سبب کاهش گلوکز می‌گردد ولی این کاهش تنها در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم معنی‌دار بود (p < ۰/۰۰۱) (\*\*\*) .

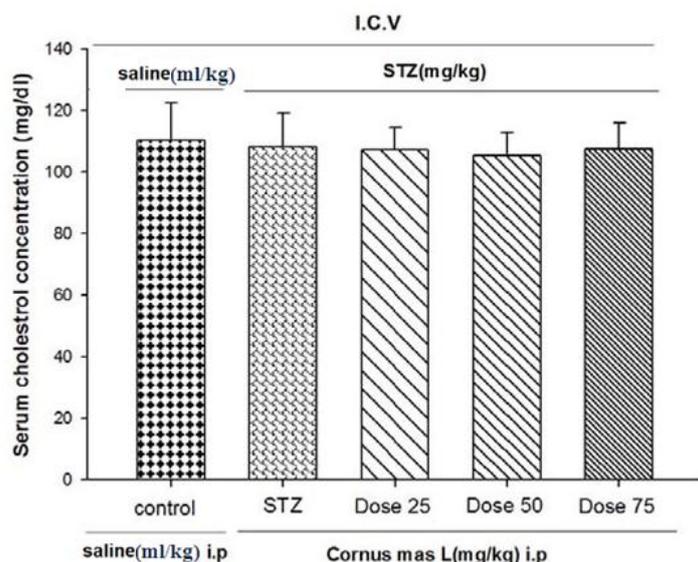
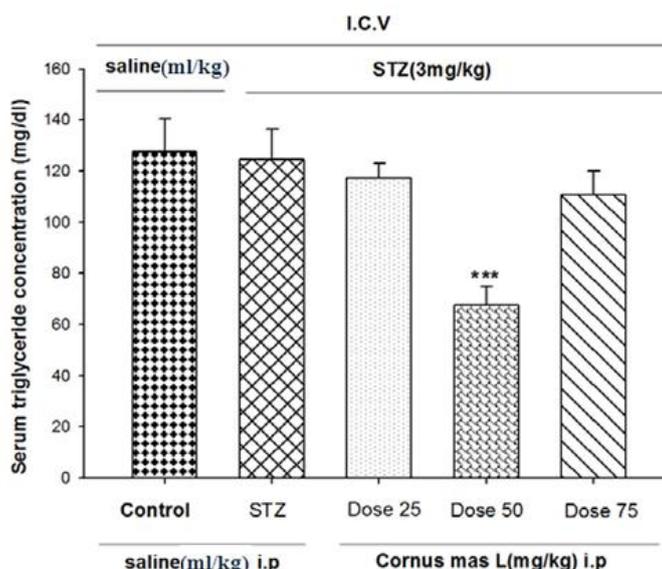
$F(3, 15) = 34/607$  (نمودار ۵، الف).

ب) کلسترول: آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تجویز درون‌صفافی مقادیر مختلف عصاره دانه زغال‌اخته از ۲۱ روز قبل از تهیه نمونه سرم، تاثیر معنی‌داری بر کاهش سطح کلسترول موجود در سرم نداشت [ $F(3, 15) = 0/250, p > 0/05$ ] (نمودار ۵، ب).

اثر تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف عصاره دانه زغال-

اخته بر سطح ذرات چربی سرم

الف) تری‌گلیسیرید: آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تجویز درون‌صفافی مقادیر مختلف عصاره دانه زغال‌اخته از ۲۱ روز قبل از تهیه نمونه سرم، در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت معنی‌داری سبب کاهش سطح تری‌گلیسیرید موجود در سرم شد [ $p < 0/001$ ].



نمودار ۵: الف): اثر تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف عصاره دانه زغال‌اخته در کاهش غلظت تری‌گلیسیرید موجود در سرم. این نمودار نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی عصاره دانه زغال‌اخته در طی ۲۱ روز تیمار در تمام دوزها نسبت به گروه‌های کنترل و STZ سبب کاهش تری‌گلیسیرید می‌شود ولی این کاهش تنها در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم معنی‌دار بود ( $p < 0/001$ ). ب): اثر تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف عصاره دانه زغال-اخته بر غلظت کلسترول موجود در سرم. این نمودار نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف عصاره دانه زغال‌اخته نسبت به گروه‌های کنترل و STZ تاثیر معنی‌داری بر سطح کلسترول تام در سرم ندارد ( $p > 0/05$ ).

### اثر تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف عصاره دانه زغال- اخته بر وزن بدن

آزمون آماری اندازه‌گیری‌های تکراری (Repeated Measures) نشان داد که تجویز درون صفاقی مقادیر مختلف

عصاره دانه زغال‌اخته در طول مدت ۲۱ روزه تیمار نسبت به گروه‌های کنترل و STZ، سبب کاهش وزن در تمام دوزها گردید. اما این کاهش وزن تنها در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین  $\pm$  خطای معیار وزن بر حسب گرم در طول هفته‌های تیمار بین گروه‌های کنترل، STZ، گروه STZ + دوزهای مختلف عصاره دانه زغال‌اخته و دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه زغال‌اخته به تنهایی در طی ۳ هفته تیمار. این جدول همچنین نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی عصاره دانه زغال‌اخته، در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به تنهایی و همراه با STZ سبب کاهش معنی‌دار در وزن موش‌ها نسبت به گروه‌های کنترل و STZ می‌گردد ( $p < 0.01$  و  $***p < 0.001$ ).

گروه	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
Control	۲/۹۵±۳۰/۷	۲/۸۵±۳۱/۵۹	۲/۴۲±۳۷/۶۵
STZ	۲/۹۱±۳۰/۸۴	۲/۳۴±۳۴/۱	۲/۳۴±۳۶/۹۴
STZ +25	۱/۷۹±۳۱/۲۴	۲/۱۶±۲۹/۱۴	۰/۷۴±۳۰/۱۱
STZ +50	۲/۸۴±۲۹/۰۵	۳/۸۷±۲۷/۳۷۵***	۴/۸۶±۲۷/۲***
STZ +75	۲/۹۵±۳۲/۴۶	۳/۶۷±۳۰/۰۵	۴/۱۵±۲۸/۵۹
Dose 50	۱/۳۴±۳۲/۰۹	۱/۳۸±۲۷/۸۲**	۰/۶۵±۲۵/۸۹**

### بحث

الگوهای رفتاری متعددی برای سنجش حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد. از این بین مدل یادگیری اجتنابی مهارتی به‌صورت گسترده در بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی، جهت بررسی حافظه بلندمدت همچنین اثر نوروترانسمیترها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵ و ۱۶).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با حجم ۳ میکرولیتر در هر بطن در روز اول و سوم جراحی بعد از ۲۱ روز، باعث تخریب حافظه در موش‌های سوری نر شد (نمودار ۱). مطالعات صورت گرفته در گذشته نیز یافته ما را تایید می‌کند (۱۷ و ۱۸ و ۱۹).

تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین موجب بروز مقاومت انسولینی، کاهش میزان انرژی در دسترس سلول‌های عصبی و افزایش میزان گلوکز در مغز می‌گردد (۲۰). به‌دنبال مقاومت انسولینی و کاهش انرژی در دسترس با اختلال در تولید پروتئین‌های پیش‌ساز آمیلوئید منجر به تجمع پلاک‌های -

آمیلوئیدی می‌گردد (۲۱). تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین از یک طرف موجب کاهش فعالیت پروتئین کیناز C و ایجاد استرس اکسیداتیو و از طرف دیگر افزایش سطح کلسیم درون سلولی می‌شود. در چنین شرایطی میزان کاسپاز ۳ در قشر و هیپوکامپ افزایش یافته و آپوپتوز سلول‌های عصبی رخ می‌دهد (۲۲).

در این پروژه برای جبران اثرات منفی ناشی از تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین بر بازخوانی حافظه از دوزهای مختلف عصاره دانه زغال‌اخته (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) استفاده شد که منجر به تغییرات معنی‌دار در روند بهبود حافظه گردید. در این میان تاثیر دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به سایر دوز-ها بیش‌تر بود (نمودار ۲).

مطالعات مشابه نتایج حاصل از این بررسی را تایید می‌کنند. رژیم‌های غذایی غنی از فلاونوئیدها می‌تواند تاثیر مثبتی بر مغز و اختلالات تخریب نورونی نظیر آلزایمر و پارکینسون داشته باشد (۲۳ و ۲۴ و ۲۵). تیمار موش‌های سوری ماده بالغ، پس از دو هفته با بلوبری (۲۶ و ۲۷ و ۲۸)، عصاره انگور قرمز (۲۹) و چای سبز منجر به بهبود حافظه می‌شود. استفاده از عصاره

ژینکوبیلوبا در موش‌های سوری ترانسژنیک سبب بهبود حافظه فضایی شد (۳۰).

به نظر می‌رسد که فلاونوئیدها موجب حفاظت از نورون‌ها در برابر آسیب ناشی از نوروتوکسین‌ها و عوامل التهاب‌زای سیستم عصبی شده همچنین دارای توانایی بالقوه در بهبود حافظه و یادگیری و عمل‌کردهای شناختی می‌باشند. در مرحله اول این ترکیبات منجر به رگ‌زایی و نورورژنز خصوصا در هیپوکامپ و مهار آپوپتوزیس ناشی از گونه‌های نوروتوکسیک می‌شوند (۳۱ و ۳۲). فلاونوئیدها همچنین با اثر بر پروتئین کینازها، لیپید کینازها (PI3/Akt) phosphoinositide-3-kinase-protein kinase و مسیر MAP کینازها (Mitogen Activated Protein kinases) و مسیر MAP موجب بهبود ارتباطات نورونی در مناطق شکنج دندانه‌ای و CA3 هیپوکامپ و بهبود ارتباطات نورونی و به دنبال آن منجر به بهبود (Long Term LTP Potentiation) می‌شوند (۳۳ و ۳۴). این ترکیبات روی مسیر ERK/CREB (cAMP response element-binding Extracellular signal-regulated kinases/protein kinase) اثر کرده و آن را فعال می‌کنند. زغال‌اخته منبع غنی از فلاونوئیدها است (۷). لذا به نظر می‌رسد که اثرات عصاره دانه زغال‌اخته بر بهبود حافظه و یادگیری ناشی از ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدهای موجود در این عصاره باشد.

همچنین تزریق داخل صفاقی عصاره دانه زغال‌اخته سبب کاهش میزان گلوکز در سرم می‌گردد. این کاهش در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم معنی‌دار است ( $p < 0.001$ ) استفاده از عصاره *Cornus officinalis* از خانواده زغال‌اخته در رت‌های دیابتی شده نشان داد که مصرف خوراکی این عصاره موجب کاهش میزان گلوکز خون می‌گردد (۳۵). تحقیقات نشان داده است که عصاره الکلی این گیاه سبب افزایش بیان ژن مربوط به GLUT4 (Glucose Transporter 4) می‌شود (۳۵). استفاده از پلی فنول Rutin باعث کاهش معنی‌دار سطح گلوکز ناشتا و هموگلوبین گلیکوزیله شد (۳۶). استفاده از کامفرول تهیه شده از برگ درخت گل ابریشم یا *Bauhinia forficata* در رت‌های دیابتی شده با آلوکسان سبب کاهش قند خون و در رت‌های سالم سبب افت گلوکز موجود در خون می‌گردد (۳۷). آنتوسیانین‌ها موجب کاهش مقاومت به انسولین و بهبود تنظیم‌کننده‌های گلوکز می‌شوند (۳۸) از طرف دیگر آنتی‌اکسیدانت‌های گیاهی خاصیت شبه انسولینی دارند و جذب

گلوکز را در بافت‌های محیطی افزایش می‌دهند (۳۹). همچنین آنتی‌اکسیدانت‌ها از طریق اثر بر سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس موجب افزایش جذب گلوکز و تولید انسولین بیشتر می‌گردند (۴۰ و ۴۱).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، تزریق داخل صفاقی عصاره دانه زغال‌اخته با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن به مدت ۲۱ روز سبب کاهش میزان تری‌گلیسیرید در سرم می‌گردد. این کاهش در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.001$ ) (نمودار ۴). اما تغییر معنی‌داری در سطح کلسترول تام در هیچ یک از گروه‌ها مشاهده نشد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۵). مطالعات انجام شده در گذشته نیز، نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد (۴۲ و ۴۳ و ۴۴ و ۴۵ و ۴۶).

به‌طور خلاصه ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدها از طریق اثر بر سطح آنزیم‌های گوارشی دخیل در هضم چربی‌ها مانند لیپاز پانکراسی و فسفولیپاز A2 سبب کاهش هضم و در نهایت جذب چربی‌ها می‌گردد. این ترکیبات موجب کاهش سطح تری-گلیسیرید موجود در خون می‌شوند. فلاونوئیدها از طریق اثر کاهشی بر میزان فعالیت و سطح آنزیم‌های کبدی دخیل در بیوسنتز لیپیدها و افزایش سطح فعالیت ترکیبات موثر در مسیر بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب، سبب کاهش تولید اسیدهای چرب و تری‌گلیسیرید و افزایش دفع کلسترول از طریق مدفوع می‌گردند.

از طرفی این ترکیبات با افزایش بیان PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) و کاهش بیان PPAR در کبد باعث کاهش تری‌گلیسیریدها می‌شوند. این شرایط از یک‌طرف موجب افزایش نفوذپذیری سلول‌ها به تری-گلیسیرید و افزایش تولید HDL (High Density Lipoprotein) می‌گردد و از طرف دیگر موجب افزایش میزان برداشت کلسترول در ماکروفاژها می‌گردد. همچنین این ترکیبات با افزایش بیان و مقدار آنزیم پاراکسوناز در کبد، با کاهش اکسیداسیون HDL سبب افزایش مقدار آن در خون می‌گردد.

زغال‌اخته با داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی قادر به کاهش استرس اکسیداتیو و ایجاد تغییرات بیوشیمیایی در خون می‌باشد. آنتوسیانین‌های موجود در عصاره دانه این گیاه قادر به القای تغییرات متابولیک مطلوب در جهت تنظیم فعالیت آنزیم‌های کبدی و کاهش سطح گلوکز و چربی خون می‌باشند.

به دلیل داشتن ترکیبات فوق توانست منجر به کاهش وزن در موش‌های سوری تحت تیمار شود.

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی یادگیری اجتنابی مهارتی نشان داد که تجویز عصاره دانه زغال‌اخته (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۲۱ روز به‌طور معنی‌داری زمان تاخیر در پایین آمدن از سکو را نسبت به گروه آلازایمری شده با STZ افزایش داده، منجر به کاهش میزان گلوکز و تری‌گلیسیرید سرم و کاهش وزن شد اما بر میزان کلسترول تام اثر معنی‌داری نداشت. مقادیر بالای پلی‌فنول، آنتوسیانین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی این عصاره را دارای توان بالقوه در جهت بهبود حافظه داشته و ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی آن قادر به کاهش استرس‌اکسیداتیو و ایجاد تغییرات بیوشیمیایی در خون می‌باشد. آنتوسیانین‌های موجود در این گیاه با تنظیم فعالیت آنزیم‌های کبدی، کاهش سطح گلوکز و چربی خون، دژنره کردن چربی‌ها در سلول‌های کبدی و تنظیم افزایشی ژن‌های مربوط به بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب و تنظیم کاهش‌ی ژن‌های مربوط به سنتز اسیدهای چرب در سلول‌های کبدی اثر نموده‌اند. این ترکیبات احتمالاً از طریق کاهش هضم و جذب چربی‌های موجود در رژیم غذایی، افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب در کبد، کاهش تولید بافت چربی به‌خصوص چربی سفید دور شکم، کاهش میزان گلوکز موجود در خون و افزایش متابولیسم گلوکز در سلول‌ها سبب کاهش وزن می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل طرح تحقیقاتی با شماره ۹۲/۴۷ و با حمایت مالی حوزه‌ی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک انجام شده است. در این خصوص از مسئولین مربوطه تشکر به‌عمل می‌آید.

### منابع

1. Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. A Study on Neuroinflammation and Nmda Receptor Function in Stz (Icv) Induced Memory Impaired Rats. *J Neuroimmunol.* 2013; 254(1-2): 1-9.
2. Ruffi MS, Aisen PS. Recent Developments in Alzheimer's Disease Therapeutics. *BMC Med.* 2009; 7: 7.

پژوهش‌ها نشان داده است که افزایش تری‌گلیسیرید داخل سلولی منجر به افزایش غیر مستقیم میزان VLDP (Very Low protein Density) می‌گردد. پس هر عاملی که بتواند سطح تری‌گلیسیرید خون را افزایش دهد منجر به افزایش VLDP خواهد شد. در عین حال غلظت تری‌گلیسیرید و HDL در سرم خون رابطه عکس دارد. (۱۰). در این پژوهش عصاره دانه زغال‌اخته توانست میزان تری‌گلیسیرید سرم را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد اما بر میزان کلسترول تام اثر معنی‌داری نداشت. در واقع کاهش تری‌گلیسیرید منجر به کاهش VLDP اما افزایش HDL شده است و در مجموع کلسترول تام تغییری نکرده است. نتیجه حاصل به‌خوبی با نتایج سایر تحقیقات هم‌خوانی دارد.

براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، وزن موش‌های سوری در طول دوره تیمار در هر سه دوز کاهش یافته است ولی این کاهش در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به تنهایی ( $p < 0.05$ ) و همراه با STZ معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.01$ ) (جدول ۱). نتایج حاصل از مطالعات گذشته نیز این کاهش وزن را تایید می‌کنند (۴۷).

با توجه به مکانیسم‌های بیان شده در مورد کاهش گلوکز و ذرات چربی خون انتظار کاهش وزن دور از ذهن نیست. مطالعات نشان می‌دهند که بین چاقی و سطح حافظه و یادگیری رابطه وجود دارد. افزایش بافت چربی از طریق افزایش اینترلوکین 1 سبب کاهش میزان حافظه و یادگیری می‌گردد. در افراد چاق یکی از گیرنده‌های مهم هیپوکامپی دخیل در حافظه و یادگیری (NMDA) کاهش می‌یابد (۴۸).

به‌نظر می‌رسد که آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فلاونوئیدی از نظر بافت‌شناسی سبب کوچک شدن سلول‌های چربی و دژنره شدن چربی‌ها در سلول‌های کبدی شده و از نظر مولکولی سبب تنظیم افزایشی ژن‌های مربوط به بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب و تنظیم کاهش‌ی ژن‌های مربوط به سنتز اسیدهای چرب در سلول‌های کبدی می‌گردد (۴۷).

بنابراین این ترکیبات احتمالاً از طریق کاهش هضم و جذب چربی‌های موجود در رژیم غذایی، افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب در کبد، کاهش تولید بافت چربی به‌خصوص چربی سفید دور شکم و اثراتش در کوچک کردن سلول‌های چربی، همچنین کاهش میزان گلوکز موجود در خون، افزایش متابولیسم گلوکز در سلول‌ها سبب کاهش وزن می‌گردد. عصاره دانه زغال‌اخته نیز

- 56(8): 417-28.
4. Williams RJ, Spencer JP. Flavonoids, Cognition, and Dementia: Actions, Mechanisms, and Potential Therapeutic Utility for Alzheimer Disease. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(1): 35-45.
  5. Ling L. Streptozocin. free radical and radiation biology program. 2001; 22(777): 1-10.
  6. Matsui T, Ueda T, Oki T, Sugita K, et al. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(4): 1948-51.
  7. Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, et al. Neurogenesis May Relate to Some but Not All Types of Hippocampal-Dependent Learning. *Hippocampus.* 2002; 12(5): 578-84.
  8. Ghahreman, A. Colored Flora Iranica. Tehran: Tehran University co: 1358- 87 9.
  9. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the Neocortex of Adult Primates. *Science.* 1999; 286(5439): 548-52.
  10. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin Causes Long-Term Diminutions in Learning and Memory Abilities and in Cerebral Energy Metabolism in Adult Rats. *Behav Neurosci.* 1998; 112(5): 1199-208.
  11. Serteser A, Kargioglu M, Gok V, Bagci Y, et al. Antioxidant Properties of Some Plant Growing Wild in Turkey. *Grasas Y Aceites.* 2009; 60(2): 147-154.
  12. Jeremy P. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr.* 2007; 2(3): 257-273.
  13. Ghosh D, Konishi T. Anthocyanins and Anthocyanin-Rich Extracts: Role in Diabetes and Eye Function. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007; 16(2): 200-8.
  14. Jayaprakasam B, Olson LK, Schutzki RE, Tai MH, et al. Amelioration of Obesity and Glucose Intolerance in High-Fat-Fed C57bl/6 Mice by Anthocyanins and Ursolic Acid in Cornelian Cherry (*Cornus Mas*). *J Agric Food Chem.* 2006; 54(1): 243-8.
  15. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. Fast Access of Some Grape Pigments to the Brain. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(18): 7029-34.
  16. Wein S, Behm N, Petersen RK, Kristiansen K, et al. Quercetin Enhances Adiponectin Secretion by a Ppar-Gamma Independent Mechanism. *Eur J Pharm Sci.* 2010; 41(1): 16-22.
  17. Agrawal RE, Tyagi R, Shukla CN. Insulin Receptor Signaling in Rat Hippocampus: A Study in
  3. Nagasako Akazome Y, Kanda T, Ohtake Y, Shimasaki H, et al. Apple Polyphenols Influence Cholesterol Metabolism in Healthy Subjects with Relatively High Body Mass Index. *J Oleo Sci.* 2007; Stz (Icv) Induced Memory Deficit Model. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011; 21(3): 261-73.
  18. Kocyigit M, Ozhatay N. Wild Plants Used as Medicinal Purpose in Yalova( Northwestturkey). *Turkish J Pharm.* 2006; 3(2): 91-103.
  19. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, et al. International Union of Pharmacology. Lxi. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(4): 726-41.
  20. Rasoolijazi H, Joghataie MT, Roghani M, Nobakht M. The Beneficial Effect of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in an Experimental Model of Alzheimer's Disease in Rat: A Behavioral Analysis. *Iran Biomed J.* 2007; 11(4): 237-43.
  21. Yamabe N, Kang KS, Goto E, Tanaka T, et al. Beneficial effect of Corni Fructus, a constituent of Hachimi-jio-gan, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in Streptozotocin-treated diabetic rats. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30(3): 520-6.
  22. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JA. Plant Polyphenols in Cancer and Heart Disease: Implications as Nutritional Antioxidants. *Nutr Res Rev.* 2000; 13(1): 79-106.
  23. Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, et al. Intake of Flavonoids and Risk of Dementia. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16(4): 357-63.
  24. Roza JM, Xian-Liu Z, Guthrie N. Effect of Citrus Flavonoids and Tocotrienols on Serum Cholesterol Levels in Hypercholesterolemic Subjects. *Altern Ther Health Med.* 2007; 13(6): 44-8.
  25. Williams R, Spencer J. Flavonoids. cognition and dementia: actions, mechanisms and potential therapeutic utility for Alzheimer's disease. *Free Radical Bio Med.* 2011; 127(3): 210-213.
  26. Andres-Lacueva CB, Shukitt-Hale RL, Galli O, Jauregui RM, et al. Anthocyanins in Aged Blueberry-Fed Rats Are Found Centrally and May Enhance Memory. *Nutr Neurosci.* 2005; 8(2): 111-20.
  27. Kamalakkannan N, Prince PS. Antihyperglycaemic and Antioxidant Effect of Rutin, a Polyphenolic Flavonoid, in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006; 98(1): 97-103.
  28. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic System During the Progression of Alzheimer's Disease: Therapeutic Implications.

- Expert Rev Neurother. 2008; 8(11): 1703-18.
29. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2010; 362(4): 329-44.
30. Tahmasebi S, Heidari N, Mohagerani HR. Effects of Crataegus Aronia on Passive Avoidance Learning in Wistar Male Rats. *Journal of Cellular and Molecular Biotechnology News*. 2013: 79-86.
31. Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, et al. Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(3): 705-12.
32. Mehla J, Pahuja M, Gupta YK. Streptozotocin-Induced Sporadic Alzheimer's Disease: Selection of Appropriate Dose. *J Alzheimers Dis*. 2013; 33(1): 17-21.
33. Gunstad J, Paul RH, Cohen RA, Tate DF, et al. Obesity Is Associated with Memory Deficits in Young and Middle-Aged Adults. *Eat Weight Disord*. 2006; 11(1): e15-9.
34. Srivastava RA, Jahagirdar R, Azhar S, Sharma S, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha Selective Ligand Reduces Adiposity, Improves Insulin Sensitivity and Inhibits Atherosclerosis in Ldl Receptor-Deficient Mice. *Mol Cell Biochem*. 2006; 285 (1-2): 35-50.
35. Zou Y, Lu Y, Wei D. Hypocholesterolemic Effects of a Flavonoid-Rich Extract of Hypericum Perforatum L. In Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(7): 2462-6.
36. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, et al. Beneficial Effects of Antioxidants in Diabetes: Possible Protection of Pancreatic Beta-Cells against Glucose Toxicity. *Diabetes*. 1999; 48(12): 2398-406.
37. Drapeau E, Mayo W. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis". *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100(24): 14385-87.
38. Milbury PE, Kalt W. Xenobiotic Metabolism and Berry Flavonoid Transport across the Blood-Brain Barrier. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(7): 3950-6.
39. Wenk GL. An Hypothesis on the Role of Glucose in the Mechanism of Action of Cognitive Enhancers. *Psychopharmacology*. 1989; 99(4): 431-8.
40. Khalili M, Hamzeh F. Effects of Active Constituents of Crocus Sativus L., Crocin on Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Male Rats. *Iran Biomed J*. 2010; 14 (1-2): 59-65.
41. Yamahara J, Mibu H, Sawada T, Fujimura H, et al. Biologically Active Principles of Crude Drugs. Antidiabetic Principles of Corni Fructus in Experimental Diabetes Induced by Streptozotocin (Author's Transl). *Yakugaku Zasshi*. 1981; 101(1): 86-90.
42. Cha JY, Cho YS, Kim I, Anno T, et al. Effect of Hesperetin, a Citrus Flavonoid, on the Liver Triacylglycerol Content and Phosphatidate Phosphohydrolase Activity in Orotic Acid-Fed Rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2001; 56 (4): 349-58.
43. Izquierdo I, McGaugh JI. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol*. 2000 ; 11:517-34.
44. Nasri S, The Effect of Resveratrol Flavonoid on Learning and Memory in Passive Avoidance and Y Maze in Diabetic Rat. *ISMJ*. 2012; 17 (1): 11-20.
45. Seeram NP, Schutzki R, Chandra A, Nair MG. Characterization, Quantification, and Bioactivities of Anthocyanins in Cornus Species. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(9): 2519-23.
46. Stackman RW, Eckenstein F, Frei B, Kulhanek D, et al. Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment. *Exp Neurol*. 2003; 184(1): 510-20.
47. Aoki F, Honda S, Kishida H, Kitano M, et al. Suppression by Licorice Flavonoids of Abdominal Fat Accumulation and Body Weight Gain in High-Fat Diet-Induced Obese C57bl/6j Mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007; 71(1): 206-14.
48. Huong DT, Takahashi Y, Ide T. Activity and Mrna Levels of Enzymes Involved in Hepatic Fatty Acid Oxidation in Mice Fed Citrus Flavonoids. *Nutrition*. 2006; 22(5): 546-52.

## The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Cornus mas L.* Seed on Memory Retention and Some Serum Parameters in Alzheimer Induced Male Mice

Darbandi N, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Hezavehi M, M.Sc.<sup>2</sup>, Ghadimi F, M.Sc.<sup>3</sup>, Noori M, Ph.D.<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran

2. Ph.D. Student in cellular and Developmental Biology Kharazmi University, Tehran, Iran

3. M.Sc. Graduated Student in Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: N-Darbandi@araku.ac.ir

Received: 13 Jan. 2015

Accepted: 19 May. 2015

---

### Abstract

**Aim:** In the present study we examine the effect of *C. mas L.* seed extract on learning, memory and some serum parameters in alzheimer induced male mice.

**Material and Methods:** 48 male mice weighing 25-30 gram divided into six groups including 1- Saline-Saline, 2-STZ-Saline, 3- STZ- Extract 25 mg/kg, 4- STZ-Extract 50 mg/kg, 5- STZ-Extract 75 mg/kg, 6- Saline- Effective dosages of Extract (50 mg/kg). For inducing Alzheimer's disease i.c.v. injection of Streptozotocine (3 mg/kg) was used and learning as well as memory was evaluated through passive avoidance test model. All groups received *C.mas* seed extract or saline intraperitoneally for 3weeks. Then they entered into learning testes. Finally all animals were killed and blood was taken from right ventricle. Level of glucose, Triglyceride, and total cholestole in serum were measured. Also during treatment period, weights of the mice were measured at beginning of each week. The data were analyzed using unilateral variance analysis and Tukey test or Analysis of variance with repeated measures.

**Results:** ICV administration of STZ significantly decreased memory ( $P<0/0001$ ). *C. mas* seed extract (50mg/kg) improved memory retrieval ( $P<0/0001$ ) and decreased glucose as well as triglyceride level significantly ( $P<0/01$ ), but didn't have significant effect on total cholesterol ( $P>0.05$ ). Reduction of mice weight was Significant ( $P<0/01$ ) only in 50 mg/kg dosage.

**Conclusion:** It seems that *C. mas* seed extract improved memory in disorders neuronal damage such as Alzheimer's due to reduction of risk factors in the blood and adjustment of the glucose and fatty acid metabolism.

**Keywords:** Alzheimer, *Cornus mas L.*, Mouse