

# اثر فلاونوئید خالص برگ ازگیل بر یادگیری و حافظه اجتنابی غیرفعال در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده آلزایمری

سمیه کوهستانی<sup>۱</sup>(MSc) - دکتر صمد زارع<sup>۱</sup>(PhD) - دکتر پروین بابایی<sup>۲</sup>(PhD)

\*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گیلان، ایران

پست الکترونیک: p\_babaei@gums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۰۳/۱۶ تاریخ ارسال جهت اصلاح: ۹۶/۰۶/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۰۶

## چکیده

**مقدمه:** اوارکتومی و حذف استروژن با القای نشاتگان متابولیک سبب کاهش یادگیری و حافظه می‌شود و احتمال ابتلای به آلزایمر را افزایش می‌دهد. آلزایمر اختلال عصبی پیش رونده‌ای است که درمان قطعی ندارد. از سوی پلی‌فنل‌ها به سبب داشتن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، تأثیر مهمی بر پیشگیری از بیماری‌های تحلیل برنده عصبی و پیری دارند.

**هدف:** تعیین اثر فلاونوئید خالص برگ ازگیل بر اختلال حافظه ناشی از استرپتوزوتوسین (STZ) در موش‌های اوارکتومی شده.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم که به صورت تصادفی به ۶ گروه: جراحی شم، اوارکتومی، اوارکتومی+استرپتوزوتوسین، اوارکتومی+سالین، اوارکتومی+استرپتوزوتوسین+فلاونوئید ازگیل، اوارکتومی+استرپتوزوتوسین+سالین تقسیم شدند. نخست حیوانات اوارکتومی شدند و پس از سه هفته، با دستگاه استریوتاکسی کانول گذاری شدند. تزریق داخل بطن‌های مغزی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg، دو بار) برای القای اختلال در حافظه انجام شد. سپس، موش‌ها از روز تزریق STZ، به مدت ۲۱ روز فلاونوئید (۱۰mg/kg) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. برای ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال حیوانات از دستگاه شاتل باکس استفاده شد.

**نتایج:** اوارکتومی تأثیر معنی‌داری بر یادگیری و حافظه اجتنابی غیرفعال نشان نداد ( $p=۰/۸۷۳$ ). تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین به طور معنی‌دار یادگیری و حافظه اجتنابی غیرفعال را کاهش داد ( $p=۰/۰۰۱$ ). تیمار فلاونوئید به طور معنی‌دار موجب بهبود یادگیری و حافظه موش‌های الگوی آلزایمری شد ( $p=۰/۰۰۱$ ).

**نتیجه‌گیری:** تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین موجب تخریب حافظه اجتنابی می‌شود و درمان با فلاونوئید می‌تواند از اختلال حافظه ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین جلوگیری کند.

**کلید واژه‌ها:** اوارکتومی / حافظه / استرپتوزوتوسین / پلی فنول‌ها / موش صحرایی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و شش، شماره ۱۰۴، صفحات: ۷۱-۶۲

## مقدمه

اکسیداتیو، مرگ سلولی و اختلال سیستم کولینرژیک اشاره کرد (۵و۴). از بین رفتن تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیدانی به استرس اکسیداتیو می‌انجامد که نقش برجسته‌ای در آلزایمر دارد (۶). این بیماری بر بسیاری از بخش‌های مغز مانند هیپوکمپ، سیستم‌لیمبیک و قشر مغز تأثیر می‌گذارد (۷و۸).

اثر هورمون‌های جنسی بر کارکرد مغزی و نیز درمان اختلال عصبی مانند پارکینسون، صرع و آلزایمر گزارش شده‌است (۹-۱۴). برخی بر این باورند که کاهش میزان استروژن در دوران یائسگی با افول قوه شناختی همراه می‌شود (۱۰-۱۲)،

آلزایمر (AD) اختلالی پیش رونده، با از دست دادن تدریجی حافظه و تغییر شخصیت است (۱). نشانه‌های نوروپاتولوژی آن در برگیرنده افزوده شدن پلاک‌های پیری مربوط به رسوب پپتید آمیلوئید بتا ( $A\beta$ ) ولایه‌های نوروفیبریلاری (NFT) مربوط به هیبرفسفوریلاسیون پروتئین تائو است (۲). امروزه هر ۶۶ ثانیه یک نفر به بیماری آلزایمر دچار می‌شود و پیش‌بینی می‌شود این مدت در سال ۲۰۵۰ به ۳۳ ثانیه کاهش یابد، به بیانی، یک میلیون نفر جدید در هر سال بر آمار مبتلایان افزوده می‌شود (۳). از مکانیسم‌های دیگری که موجب آلزایمر می‌شود می‌توان به تجمع گلیاها، افزایش استرس

۱. بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳. بخش فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

کارکرد شناختی مغز را بهبود بخشد و اثر سودمند بر اختلال یادگیری و حافظه داشته باشد (۳۰). بنابراین، با توجه به پیش‌بینی افزایش بیماری آلزایمر و نبود درمان قطعی برای این معضل پزشکی، در این پژوهش بر آن هستیم تا اثربخشی عصاره فلاونوئید خالص برگ ازگیل را بر اختلال حافظه ناشی از تزریق داخل بطن‌های مغزی STZ در نمونه‌های اوارکتومی شده بررسی کنیم.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش صحرایی ماده از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم از حیوانخانه بخش فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان تهیه شد. حیوانات در قفس‌های ۴ تایی، در شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در طول دوره آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوبه کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی گیلان رعایت شد (۳۱). سپس، موش‌ها به طور تصادفی به ۶ گروه ۸ تایی (۳۲) تقسیم شدند: گروه اول: (جراحی شم SHAM:؛ گروه دوم: (اوارکتومی شده: OVX؛ گروه سوم: (اوارکتومی شده + تزریق استرپتوزوتوسین: OVX+STZ؛ گروه چهارم: (اوارکتومی شده + سالین: OVX+SAL؛ گروه پنجم: (اوارکتومی شده + تزریق استرپتوزوتوسین + عصاره فلاونوئید: OVX+STZ+FLA؛ گروه ششم: (اوارکتومی شده + تزریق استرپتوزوتوسین + سالین: OVX+STZ+SAL). برگ ازگیل از مناطق جنگلی گیلان (روستای کنده لات) گردآوری و برای شناسایی در هرباریوم دانشگاه گیلان (کد هرباریومی ۶۱۵۷)، توسط کارشناس تایید شد. پس از شستشوی برگ‌ها، خشک و آسیاب کردن آنها، ۵ گرم از پودر برگ ازگیل با ۱۰۴ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ حل شد و این گام ۳ بار تکرار شد. سپس افشره در یک تبخیرکننده روتاری و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰ متر بر ثانیه قرار داده شد. پس از تهیه عصاره برای تعیین محتوای فلاونوئید برگ ازگیل از روش کروماتوگرافی استفاده شد.

هر چند بررسی‌های دیگری این باور را نقض کرده و اثر معنی‌داری از کاهش استروژن بر حافظه را گزارش نکرده‌اند (۱۳ و ۱۴). پیشنهاد شده که اثر هورمون‌های تخمدان بر یادگیری و حافظه با تاثیر بر سیستم‌های انتقال دهنده عصبی باشد (۱۵).

استرپتوزوتوسین (STZ) با نام شیمیایی ۲ داکسی ۳ متیل ۳ نیتروزوراید، سمی باکتریایی با توان آسیب به سلول‌های بتا پانکراس و القای دیابت در صورت تزریق محیطی است (۱۶)، در حالی که در صورت تزریق داخل بطن‌های مغز (ICV) موجب تغییر بیوشیمی، مورفولوژی و رفتاری مشابه آلزایمر می‌شود (۱۷)، مانند اختلال در یادگیری و حافظه که به دنبال افزایش پروتئین تائو و آمیلوئید بتا (۱۸) و استرس اکسیداتیو (۱۹) و ... در مغز ایجاد می‌شود. بنابراین، مدلی مناسب برای مطالعه بیماری آلزایمر است.

چون، در حال حاضر استراتژی درمانی آلزایمر خرسند کننده نیست؛ یافتن درمان‌های جدید اهمیت بالایی دارد. به تازگی درمان‌های گیاهی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (۲۰) و بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که درمان‌های آنتی‌اکسیدانی موفقیت کلی در مطالعات پیش‌بالینی داشته‌اند (۲۱). پلی‌فنول‌ها فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم غذایی مانند میوه‌ها، سبزی‌ها و ... هستند که با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال، ضدالتهابی و ... در درمان بیماری‌های عصبی موثرند (۲۲).

ازگیل یکی از گیاهان با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا از میوه‌های بومی مناطق شمالی ایران است. ازگیل گیاهی با نام علمی *L. Mespilus germanica* و نام عمومی Medlar از خانواده Rosacea است (۲۳). میوه و برگ ازگیل منابع بسیار غنی از مواد فعال زیستی مانند فنولیک، آنتوسیانین، اسیدهای آلی و مواد معدنی است (۲۴ و ۲۵). افزایش اهمیت ازگیل در سال‌های اخیر به علت منابع آنتی‌اکسیدانی آن است، که می‌تواند از انسان در برابر طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها محافظت کند (۲۸-۲۶). فلاونوئید اصلی در میوه و برگ ازگیل کوئرستین است (۲۴)، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی کوئرستین اثر بهبود در برابر استرس اکسیداتیو و بیماری‌ها نشان می‌دهد (۲۹). نتایج نشان داده‌است که کوئرستین می‌تواند

۱۰۰ هرتز، شدت ۰/۵ میلی آمپر به مدت ۵ ثانیه به پای حیوان وارد می‌شد. سپس، موش از اتاق خارج و به قفس برگردانده می‌شد. بازخوانی حافظه ۲۴ ساعت پس از آموزش صورت می‌گرفت. موش در اتاق روشن قرار داده شده، ۲ ثانیه پس از آن در گیوتینی باز شده و مدت زمان دیرکرد در ورود به اتاق تاریک و مدت سپری شده در اتاق تاریک به عنوان شاخص‌های اصلی ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال به مدت ۱۸۰ ثانیه بررسی می‌شد.

پس از آزمایش‌ها برای اطمینان از درستی کانول‌گذاری، ۵ میکرولیتر متیلن بلو تزریق شده و مغز همه حیوانات جدا و در فرمالین ۱۰٪ فیکس و برش‌های کرونال از منطقه بطن‌ها تهیه و زیر میکروسکوپ بررسی می‌شد. داده‌های کانول‌گذاری درست در آنالیز آماری استفاده شد.

برای آنالیز نتایج از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. نخست با آزمون کولموگروف اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها بررسی شد، نتایج نشان داد که داده‌ها توزیع نرمال ندارند ( $p < 0/05$ ) بنابراین، برای آنالیز نتایج از آزمون‌های Kruskal-Wallis با تست تعقیبی Bonferroni و Mann-Whitney U استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ( $X \pm SD$ ) بیان و در این بررسی سطح معنی‌داری  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

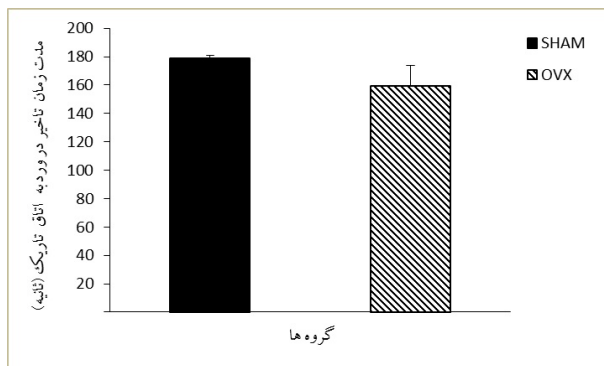
### نتایج

در مطالعات مربوط به آلزایمر، یکی از عوامل ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال مدت تاخیر در ورود به اتاق تاریک است، هر چه مدت ورود به اتاق تاریک کمتر باشد، نشان‌دهنده اختلال در یادگیری و حافظه است. در این مطالعه ۳ هفته پس از اوارکتومی، تست حافظه اجتنابی غیرفعال با دستگاه شاتل باکس برای گروه اوارکتومی شده انجام شد. نتایج نشان داد که در مدت ورود به اتاق تاریک بین گروه اوارکتومی شده در مقایسه با گروه جراحی شم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ( $p = 0/873$ ) (نمودار ۱). مدت سپری شده در اتاق تاریک نیز می‌تواند شاخص دیگری برای سنجش حافظه اجتنابی غیرفعال باشد به طوری که ماندگاری بیشتر در اتاق تاریک، نشان‌دهنده اختلال یادگیری و حافظه است. نتایج نشان دادند

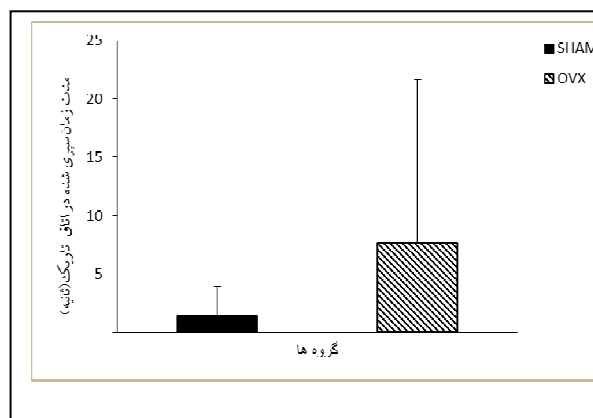
برای جراحی اوارکتومی، حیوانات با مخلوطی از کتامین (۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به روش تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند و با ایجاد برشی بر پوست و ماهیچه در ناحیه‌ی تحتانی شکم، تخمدان‌ها خارج شده و عضلات و پوست دوباره بخیه زده شد. آزمون حافظه اجتنابی غیرفعال برای گروه اوارکتومی شده پس از گذشت یک دوره بهبود ۳ هفته‌ای از جراحی اوارکتومی با دستگاه شاتل باکس انجام شد. این دوره برای ایست چرخه استروس و کاهش استروژن سرمی کافی است (۳۲). حیوانات دریافت‌کننده STZ در دستگاه استریوتاکسی برای کانول‌گذاری در بطن‌ها قرار گرفتند. با استفاده از اطلس پاکسینوس (۳۳) در بطن‌های جانبی راست و چپ با مختصات ( $AP: -0.8$ ;  $L: \pm 1.5$ ;  $V: -3.4$ ) کانول‌گذاری شد. برای القای کاهش حافظه به گروه سوم STZ با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم با حجم ۱۰ میکرولیتر با سرنگ هامیلتون دوبار به صورت یک روز در میان، به صورت داخل بطنی به آرامی تزریق شد و گروه شاهد آن به جای STZ حجم مساوی از حلال سالین دریافت کردند. پس از سه هفته از حیوانات آزمون حافظه در دستگاه شاتل باکس گرفته شد. گروه پنجم دریافت‌کننده STZ و عصاره فلاونوئید با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۳۴) به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به مدت ۲۱ روز دریافت کردند. همچنین، گروه شاهد آن حجم مساوی از سالین دریافت کردند.

حیوانات در فرآیند آموزشی منفرد (Single-trial) قرار گرفتند. جهت ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال از دستگاه شاتل باکس استفاده شد. دستگاه شاتل باکس دربرگیرنده جعبه‌ای بود که توسط دری گیوتینی به دو اتاق روشن و تاریک تقسیم می‌شد. کف جعبه با میله‌های فلزی از جنس فولاد پوشیده شده بود که شوک توسط آن‌ها در اتاق تاریک به پای حیوان وارد می‌شد (۳۵). جهت سازگاری با اتاق، ۳ روز پیش از آزمایش حافظه هندلینگ صورت گرفت. سپس، جانور به مدت ۲۰ ثانیه برای سازش در اتاق روشن دستگاه گذاشته شد در حالی که گیوتین بین دو اتاق بسته بود سپس درب گیوتینی باز شده، حیوان وارد اتاق تاریک می‌شد، بی‌درنگ پس از ورود موش به اتاق تاریک، شوک الکتریکی با فرکانس

که مدت سپری شده در اتاق تاریک بین گروه اوارکتومی شده در مقایسه با گروه جراحی شم تفاوت معنی‌داری نداشت ( $p=0/873$ ) (نمودار ۲).

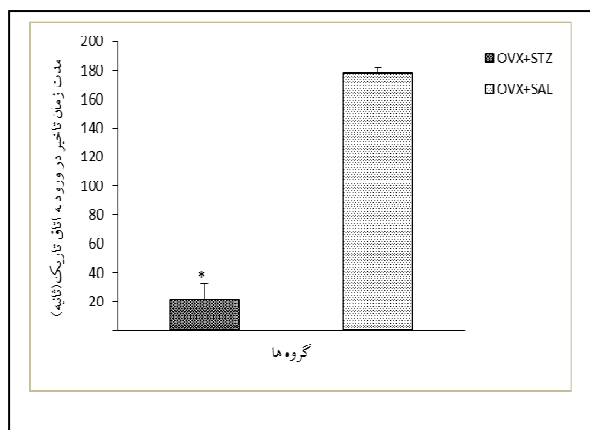


نمودار ۱. بررسی اثر اوارکتومی بر مدت زمان تاخیر در ورود به اتاق تاریک در حافظه اجتنابی غیرفعال بین دو گروه SHAM و OVX. نمودار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در مدت زمان تاخیر در ورود به اتاق تاریک گروه OVX نسبت به گروه SHAM وجود ندارد ( $p=0/873$ ) ( $N=8$ ,  $X \pm SD$ : SHAM:  $178/63 \pm 2/55$ , OVX:  $169/62 \pm 37/94$ )

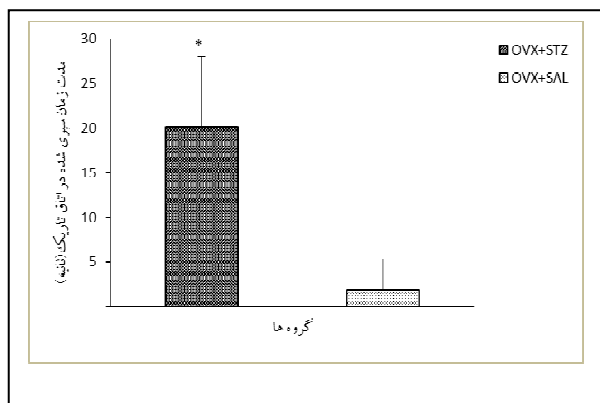


نمودار ۲. بررسی اثر اوارکتومی بر مدت زمان سپری شده در اتاق تاریک در حافظه اجتنابی غیرفعال بین دو گروه SHAM و OVX. نمودار نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در مدت زمان تاخیر در ورود به اتاق تاریک گروه OVX نسبت به گروه SHAM وجود ندارد ( $p=0/873$ ) ( $N=8$ ,  $X \pm SD$ : SHAM:  $1/37 \pm 2/56$ , OVX:  $7/63 \pm 14/24$ )

نتایج آزمایش نشان داد که گروه OVX+STZ در مقایسه با گروه OVX+STZ+FLA، در مدت کمتری وارد اتاق تاریک شدند که این زمان در سطح  $p=0/001$  معنی‌دار بود (نمودار ۳). همچنین، مدت سپری شده در اتاق تاریک گروه OVX+STZ در مقایسه با گروه OVX+STZ+FLA به طور چشمگیر افزایش یافت که این زمان در سطح  $p=0/001$  معنی‌دار بوده است (نمودار ۴).



نمودار ۳. بررسی اثر STZ بر مدت زمان تاخیر در ورود به اتاق تاریک در حافظه اجتنابی غیرفعال در دو گروه OVX+STZ و OVX+STZ+SAL. همان‌طور که نمودار نشان می‌دهد کاهش معنی‌داری در مدت زمان تاخیر در ورود به اتاق تاریک گروه OVX+STZ نسبت به گروه OVX+STZ+SAL وجود دارد ( $p=0/001$ ) ( $N=8$ ,  $X \pm SD$ : OVX+STZ:  $20/13 \pm 7/88$ , OVX+STZ+SAL:  $175/87 \pm 37/48$ )



نمودار ۴. بررسی اثر STZ بر مدت زمان سپری شده در اتاق تاریک در حافظه اجتنابی غیرفعال در دو گروه OVX+STZ و OVX+STZ+SAL. همان‌طور که نمودار نشان می‌دهد افزایش معنی‌داری در مدت سپری شده در اتاق تاریک گروه OVX+STZ نسبت به گروه OVX+STZ+SAL وجود دارد ( $p=0/001$ ) ( $N=8$ ,  $X \pm SD$ : OVX+STZ:  $21/37 \pm 10/64$ , OVX+STZ+SAL:  $178/13 \pm 37/48$ )

مدت تاخیر در ورود به اتاق تاریک در سه گروه OVX+STZ+FLA و OVX+STZ+SAL و OVX+STZ+SAL نشان می‌دهد که، افزایش معنی‌داری در مدت زمان تاخیر در ورود به اتاق تاریک گروه OVX+STZ+FLA در مقایسه با گروه OVX+STZ+SAL وجود داشت ( $p=0/001$ ). اما تفاوت معنی‌دار در مدت تاخیر در ورود به اتاق تاریک گروه OVX+STZ+FLA نسبت به گروه OVX+STZ+SAL وجود نداشت ( $p=0/710$ ) (نمودار ۵). مدت سپری شده در اتاق تاریک در سه گروه OVX+STZ+FLA

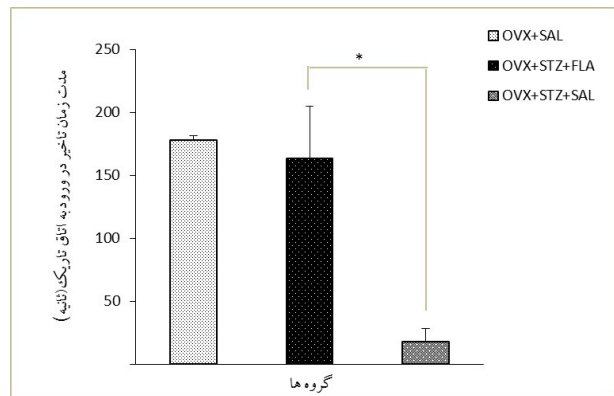
### بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه ما نشان داد که اوارکتومی سبب تفاوت معنی داری در حافظه اجتنابی غیرفعال در مقایسه با گروه جراحی شم نمی شود (نمودارهای ۲ و ۳). بر پایه مطالعات صورت گرفته، حذف استروژن به دنبال اوارکتومی نتایج متناقضی بر حافظه داشته است. یافته‌های این مطالعه، مغایر با Jiang و همکاران در سال ۲۰۱۵ بود، آن‌ها نشان داده بود، ۷ هفته پس از اوارکتومی حافظه اجتنابی غیرفعال موش‌ها در شاتل باکس کاهش یافت، بنابراین، مدت سپری شده پس از جراحی تا آزمون حافظه بیشتر از آزمایش ما بود (۳۶)، همچنین، مطالعات Velazquez-Zamora و همکاران، Daniel و همکاران نشان داد که استروژن می‌تواند اثر وارون بر فرایند یادگیری و حافظه موش‌های اوارکتومی شده داشته باشد (۳۷ و ۳۸) در حالی که Varga و همکاران گزارش کردند که اوارکتومی هیچ تاثیری بر حافظه ندارد، گفتنی است که این گروه حافظه فضایی را پس از دو هفته از اوارکتومی در ماز آبی موریس بررسی کردند (۳۹).

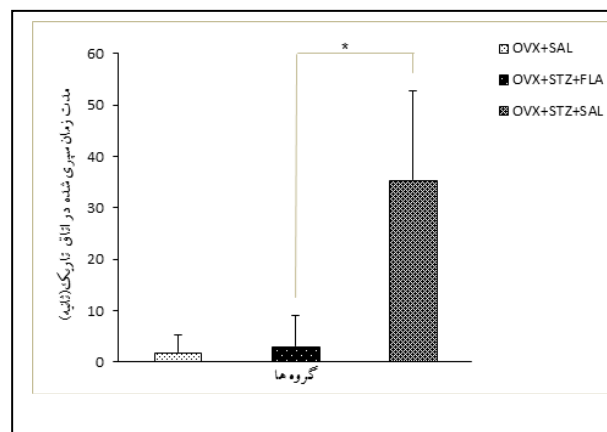
از سوی دیگر، تزریق داخل بطنی STZ بعد از ۳ هفته، باعث تخریب حافظه اجتنابی غیرفعال در موش‌های اوارکتومی شده، شد به گونه‌ای که تفاوت معنی دار هم در مدت ورود به اتاق تاریک (نمودار ۳) و هم در مدت سپری شده در اتاق تاریک نسبت به گروه شاهد دیده شد (نمودار ۴).

مطالعات صورت گرفته پیشین نیز یافته‌های ما را تایید می‌کند به طوری که یافته‌های قبلی نشان می‌دهد که تزریق داخل بطنی STZ اختلال شدیدی در متابولیسم انرژی و گلوکز مغز ایجاد می‌کند و مصرف گلوکز در مناطق مغز کاهش می‌یابد (۴۰-۴۲)، فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیک به طور چشمگیر کاهش می‌یابد (۴۳) که خود موجب کاهش غلظت ATP و کراتین فسفات می‌شود (۴۴ و ۴۵). این فرآیندها ممکن است اساس بیولوژی برای کاهش قابل توجه در گنجایش یادگیری و حافظه باشد (۴۵). همچنین، کاهش فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیک باعث کاهش تشکیل استیل کوآنزیم A و در نتیجه کاهش استیل کولین می‌شود. استیل کولین یکی از انتقال‌دهنده‌های عصبی مهم در پایانه‌های عصبی هیپوکمپ است و جنبه‌های جانبی از حافظه و

و OVX+STZ+FLA و OVX+SAL نشان می‌دهد که گروه OVX+STZ+FLA مدت بیشتری نسبت به گروه OVX+STZ+SAL گذراند که این زمان در سطح  $p=0/001$  معنی دار بوده است، در حالی که تفاوت معنی داری در مدت زمان سپری شده در اتاق تاریک گروه OVX+STZ+FLA در مقایسه با گروه OVX+SAL وجود نداشت ( $p=0/880$ ) (نمودار ۶).



نمودار ۵. بررسی اثر فلاونوئید بر مدت زمان تاخیر در ورود به اتاق تاریک در حافظه اجتنابی غیرفعال. همان طور که نمودار نشان می‌دهد افزایش معنی داری در مدت زمان ورود به اتاق تاریک گروه OVX+STZ+FLA نسبت به گروه OVX+STZ+SAL وجود دارد ( $p=0/001$ )  
( $N=8$ , OVX+STZ+FLA:  $163/12 \pm 41/83$ , OVX+STZ+SAL:  $17/05 \pm 10/86$ )



نمودار ۶. بررسی اثر فلاونوئید بر مدت زمان سپری شده در اتاق تاریک در حافظه اجتنابی غیرفعال. همان طور که نمودار نشان می‌دهد کاهش معنی داری در مدت سپری شده در اتاق تاریک گروه OVX+STZ+FLA نسبت به گروه OVX+STZ+SAL وجود دارد ( $p=0/001$ )  
( $N=8$ , OVX+STZ+FLA:  $3/12 \pm 0/94$ , OVX+STZ+SAL:  $35/05 \pm 17/17$ )

عملکردهای شناختی دیگر را کنترل می‌کند (۴۷ و ۴۶). بنابراین، نارسایی کولی‌نرژیک می‌تواند یک مشخصه شیمیایی آلزایمر باشد (۴۸ و ۴۹). هیپرفسفوریلاسیون پروتئین تائو نیز پیامد دیگر تزریق داخل بطن مغزی STZ است (۳۱) که باعث آسیب عصبی و کاهش نورون‌ها و افزایش تشکیل و تجمع آمیلوئیدبتا و افزایش کل پروتئین تائو در مغز به دنبال افزایش رادیکال‌های آزاد و روند التهابی می‌شود (۵۰)، افزایش رادیکال‌های آزاد استرس اکسیداتیو در مغز با اختلال عملکرد شناختی و حافظه همراه است (۵۱).

در مطالعه ما برای پیشگیری اثر تخریبی ناشی از تزریق داخل بطن‌های مغزی STZ بر یادگیری و حافظه از فلاونوئید خالص برگ ازگیل استفاده شد. نتایج نشان داد که تیمار با فلاونوئید خالص برگ ازگیل به مدت ۲۱ روز حافظه اجتنابی غیرفعال را در موش‌های اوارکتومی شده‌ی دریافت‌کننده STZ بهبود بخشید به گونه‌ای که تفاوت معنی‌دار هم در مدت ورود به اتاق تاریک (نمودار ۵) و هم در مدت زمان سپری شده در اتاق تاریک نسبت به گروه شاهد دیده شد (نمودار ۶)، گرچه فلاونوئید موجب بهبود یادگیری و حافظه موش‌های الگوی آلزایمری شد، اما گروه کنترل (OVX+Sal) عملکرد مناسب‌تری نشان داد. از مطالعات مشابه در راستای مطالعه ما، مطالعه Sun و همکاران در سال ۲۰۰۷، که اثر مثبت ضدپیری کوئرستین (خالص خریداری شده از سیگما) را با افزایش گلوکوتاتیون و مهار رادیکال هیدروکسیل در بهبود رفتار شناختی بر مغز موش صحرایی گزارش کردند (۵۲). همچنین Tota و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز اثر سودمند سیلیبینین را بر اختلال حافظه ناشی از STZ نشان دادند. آنها گزارش کردند سیلیبینین بر بهبود مکانیسم متابولیسم انرژی و سیستم کولی‌نرژیک موثر بوده است (۵۳). Vinitha و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴، اثر محافظتی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی *Prunus avium* (گوجه سبز) را، بر بهبود شناختی بر آلزایمر ناشی از STZ گزارش کردند (۵۴). پلی‌فنول‌ها فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم غذایی هستند که شامل دو گروه فلاونوئیدها و غیرفلاونوئیدها هستند (۲۱).

کوئرستین، یک فلاونوئید موجود در میوه و سبزی‌ها و همچنین برگ است، کوئرستین نیز در ترکیب گیاهی دارویی مانند جینکو بیلوبا، گل راعی و ... پیدا شده است که ویژگی‌های بیولوژی منحصربه‌فرد در بهبود عملکرد ذهنی و فیزیکی و کاهش خطر ابتلا به عفونت دارد (۵۵ و ۵۶). به ویژگی‌های ضدسرطان، ضدالتهاب، ضدویروس، آنتی‌اکسیدانی و همچنین توانایی مهار پراکسیداسیون لیپیدی، تجمع پلاکتی و نفوذپذیری مویرگی آن نیز در مطالعات مختلف اشاره شده است (۵۷ و ۵۸).

ازگیل سرشار از فلاونوئید است، فلاونوئید اصلی در میوه و برگ ازگیل کوئرستین است (۲۴ و ۲۵)، کوئرستین بر عملکرد شناختی و بهبود حافظه موثر است (۵۹). ویژگی‌ها آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی کوئرستین با کاهش اثر استرس اکسیداتیو در ارتباط است (۶۰). کوئرستین به عنوان رابنده نیرومندی برای رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند و مطالعات اثر سودمند آن را در محافظت عصبی نشان داده‌اند (۶۱ و ۶۲). یکی از مکانیسم‌های بالقوه در اثر تقویت حافظه ناشی از کوئرستین ارتباط آن با گیرنده‌های غشا است. کوئرستین ممکن است با گیرنده‌های آدرنرژیک و گلوتامات تعامل برقرار کند (۶۳). همچنین، کوئرستین می‌تواند با افزایش مقاومت در مقابل سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو از راه مدولاسیون مکانیسم‌های مرگ سلولی عمل کند (۶۴). فلاونوئیدها به طریق وابسته به دوز تشکیل نوروفیبریلار آمیلوئید بتا را مهار می‌کنند. مدولاسیون سیکلواکسیژناز-۲ و نیتریک سنتتاز القایی توسط فلاونوئیدها ممکن است در پیشگیری از نارسائی حافظه، یکی از نشانه‌های مربوط به AD موثر باشد (۶۵). از دیدگاه بالینی می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد، از آنجایی که مدل آلزایمر ناشی از استرپتوزوسین بسیار شبیه فرایندهای مقاومت انسولینی مغز بیماران دیابتی است (۶۶)، استفاده از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی ازگیل می‌تواند در پیشگیری اختلال شناختی موثر باشد (۲۵).

بهبود حافظه ارتباطی ناشی از تزریق داخل صفاقی عصاره خالص فلاونوئید برگ ازگیل در مدل آلزایمری STZ اثر دارد. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

1. Sullivan GP, Brown MR. Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. *Prog Neuro-Psychopharm Biol Psy* 2005; 29: 407-10.
2. Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29(6): 427-41.
3. Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2016; 12(4): 459-509.
4. Biessels GJ, Kappelle LJ. Utrecht diabetic encephalopathy study G: increased risk of Alzheimer's disease in type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? . *Biochem Soc Trans* 2005; 33: (pt 5)1041-5.
5. Hoyer S, Lannert H, Latteier E, Meisel T. Relationship between cerebral energy metabolism in parietotemporal cortex and hippocampus and mental activity during aging in rats. *J Neural Transm* 2004; 111(5): 575-89.
6. Butterfield DA, et al. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(5): 658-77.
7. Kumar A, Dogra S and Parkash A: Neuroprotective Effects of Centella asiatica against Intracerebroventricula Colchicine-Induced Cognitive Impairment and Oxidative Stress. *Int J Alzheimers Dis* 2009; 2009: 972178.
8. McIlroy S and Craig D. Neurobiology and genetics of behavioural syndromes of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 2004; 1: 135-142.
9. Hosseini M, Tairani Z, Hadjzadeh MA, Salehabadi S, Tehranipour M, Alaei HA. Different responses of nitric oxide synthase inhibition on morphine-induced antinociception in male and female rats. *Pathophysiology* 2011; 18: 143-9.
10. Duff SJ, Hampson E. A beneficial effect of estrogen on working memory in postmenopausal women taking hormone replacement therapy. *Horm Behav* 2000; 38: 262-76.
11. Duka T, Tasker R, McGowan JF. The effects of 3-week estrogen hormone replacement on cognition in elderly healthy females. *Psychopharmacology (Berlin)* 2000; 149: 129-39.
12. Maki PM, Zonderman AB, Resnick SM. Enhanced verbal memory in nondemented elderly women receiving hormone-replacement therapy. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 227-33.
13. Hogervorst E, Williams J, Budge M, Riedel W, Jolles J. The nature of the effect of female gonadal hormone replacement therapy on cognitive function in post-menopausal women: a meta-analysis. *Neuroscience* 2000; 458: 101-512.
14. Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 1998; 688: 279-95
15. Azizi-Malekabadi H, Hosseini M, Soukhtanloo M, Sadeghian R, Fereidoni M, Khodabandehloo F. Different effects of scopolamine on learning, memory, and nitric oxide metabolite levels in hippocampal tissues of ovariectomized and Sham-operated rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2012; 70: 447-52.
16. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 336-346.
17. Duelli R, Schrock H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci* 1994; 12(8): 737-43.
18. De Oliveira Santos T, et al. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiology & behavior* 2013; 107(3): 401-413.
19. Hancock RD, Viola R. Improving the nutritional value of crops through enhancement of L-ascorbic acid (vitamin C) content: rationale and biotechnological opportunities. *J. Agric. Food Chem* 2005; 53: 5248-57.
20. Ng Y P, et al. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 2015; 89: 260-270.
21. Feng Y, Wang X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 1-17.
22. Singh M, et al. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56(13): 4855-4873.
23. Mamashloo S, et al. The evaluation of antioxidant properties and stability of phenolic compounds from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit. *EIPP* 2012; 2(4): 57-69.
24. Navabi F, Navabi M, Ebrahimzadeh M, Aagrairad H. The antioxidant activity of wild medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit, stem bark

- and leaf. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10(2):283-289.
25. Guicin I, et al. Polyphenol Contents and Antioxidant Properties of Medlar (*Mespilus germanica* L.). *Rec Nat Prod* 2011; 5(3): 158-175.
26. Deighton N, Brennan R, Finn C, Davies HV. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1307-1313.
27. Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 519-525.
28. Stewart D, McDougall GJ, Sungurtas J, Verrall S, Graham J, Martinussen H. Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: Advances toward fruit nutritional enhancement. *Mol Nutr. Food Res* 2007; 51: 645-6451.
29. Li Y, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* 2016; 8(3): 167-91.
30. Ashraf pour M, et al. Quercetin improved spatial memory dysfunctions in rat model of intracerebroventricular streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease. *National Journal of Physiology Pharmacy and Pharmacology* 2015; 5(5): 411-415.
31. Pourmir M, Babaei P, Soltani Tehrani B. Kisspeptin-13 ameliorates memory impairment induced by streptozotocin in male rats via cholinergic system. *Physiol pharmacol* 2016; 20: 38-47.
32. T. Menze E, Esmat AG, Tadros M B, Abdel-Naim A E, Khalifa A. Genistein Improves 3-NPA-Induced Memory Impairment in Ovariectomized Rats: Impact of Its Antioxidant, Anti-Inflammatory and Acetylcholinesterase Modulatory Properties. *Journal pone* 2015; 10(2):1-21.
33. Labak M, et al. Metabolic changes in rat brain following intracerebroventricular injections of streptozotocin: a model of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurochirurgica Supplementum* 2010; 106: 177-181.
34. Ramezani M, Darbandi N, Khodaghali F, Hashemi A. Myricetin protects hippocampal CA3 pyramidal neurons and improves learning and memory impairments in rats with Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research* 2016, 11(12): 1976.
35. Jee Y, et al. Effects of treadmill exercise on memory and c-Fos expression in the hippocampus of the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. *Neuroscience letters* 2008; 443(3): 188-192.
36. Jiang ZJ, Wang CY, Xie X, Yang JF, Huang JN, Cao ZP, Xiao P, Li CH. Schizandrin ameliorates ovariectomy-induced memory impairment, potentiates neurotransmission and exhibits antioxidant properties. *British Journal of Pharmacology* 2015, 172: 2479-2492.
37. Velázquez-Zamora DA, Garcia-Segura LM, González-Burgos I. Effects of selective estrogen receptor modulators on allocentric working memory performance and on dendritic spines in medial prefrontal cortex pyramidal neurons of ovariectomized rats. *Horm Behav* 2012; 61: 512-7.
38. Daniel JM, Lee CD. Estrogen replacement in ovariectomized rats affects strategy selection in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 82: 142-9.
39. Varga H, Nemeth H, Toth T, Kis Z, Farkas T, Toldi J. Weak if any effect of estrogen on spatial memory in rats. *Acta Biologica Szegediensis* 2002; 46(1-2): 13-16.
40. Duelli R, Schrock H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci* 1994; 12: 737-43.
41. Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neuroscience Letters* 1991; 128: 199-202.
42. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Research* 1990; 532: 95-100.
43. Plaschke K, Hoyer S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 1993; 11: 477-83.
44. Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in the brain cortex. *Neurosci Lett* 1991; 128: 199-202.
45. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long term diminution in learning and memory abilities and cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 1998; 112: 1199-1208.
46. Blokland A, Jolles J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 47: 833-37.
47. Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats



- after an icv injection of streptozotocin. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 44: 491-94.
48. Weinstock M, Kirschbaum-Slager N, Lazarovici P, Bejar C, Youdim MB, Shoham S. Neuroprotective effects of novel cholinesterase inhibitors derived from rasagiline as potential anti-Alzheimer drugs. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 939: 148-61.
49. Wang XC, Du XX, Tian Q, Wang JZ. Correlation between choline signal intensity and acetylcholine level in different brain regions of rat. *Neurochem Res* 2008; 33: 814-819.
50. Grunblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P and Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of Neurochemistry* 2007; 101: 757-770.
51. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Effect of Naringenin on Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Cognitive Deficits in Rat: A Behavioural Analysis. *Pharmacol* 2006; 78: 193-97.
52. Sun S W, et al. Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in d-galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity. *Nutrition Research* 2007; 27(3): 169-175.
53. Tota S, Kamat PK, Shukla R, Nath C. Improvement of brain energy metabolism and cholinergic functions contributes to the beneficial effects of silibinin against streptozotocin induced memory impairment. *Behavioural Brain Research* 2011; 221(1): 207-215.
54. Vinitha E, et al. Neuroprotective effect of *Prunus avium* on streptozotocin induced neurotoxicity in mice. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2014; 4(4): 519-525.
55. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 243S-255S.
56. Wiczkowski W, Romaszko J, Bucinski A, Szawara-Nowak D, Honke J, Zielinski H, Piskula M.K. Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr* 2008; 138: 885-888.
57. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD. Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr. Sports Med Rep* 2009; 8: 206-213.
58. Aguirre L, Arias N, Macarulla MT, Gracia A, Portillo MP. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *Open Nutraceuticals J* 2011; 4: 189-198.
59. Wang DM, Li SQ, Wu WL, Zhu XY, Wang Y, Yuan HY. Effects of longterm treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2014; 39(8): 1533-43.
60. Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Jeong CH, Jeong HR, Lee U, et al. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chem* 2012; 132(2): 1019-24.
61. Ossola B, Kääriäinen TM, Männistö PT. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opin Drug Saf* 2009; 8(4): 397-409.
62. Haleagrahara N, Siew CJ, Mitra NK, Kumari M. Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. *Neurosci Lett* 2011; 500(2): 139-43.
63. Wagner C, Fachinetti R, Dalla Corte CL, Brito VB, Severo D, de Oliveira Costa Dias G, et al. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res* 2006; 1107(1): 192-8.
64. Bate C, Salmona M, Williams A. Ginkgolide B inhibits the neurotoxicity of prions or amyloid-beta1-42. *J Neuroinflammation* 2004; 1(1): 4.
65. Schroeter H, et al. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J* 2001; 358(Pt 3): 547-57.
66. Shingo AS, Kanabayashi T, Kito SH, Murase T. Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced cognitive decline in rats. *Behavioural Brain Research* 2013; 241: 105-111.

# Effects of Pure Flavonoid of Medlar Leaves on Passive Avoidance Learning and Memory In Alzheimer Model of Ovariectomized Rats

Kouhestani S (Msc)<sup>1,3</sup>- Zare S (PhD)<sup>1</sup>- \*Babaei P (PhD)<sup>2,3</sup>

\*Corresponding Address: Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Email: p\_babaei@gums.ac.ir

Received: 06/Jun/2017 Revised: 28/Aug/2017 Accepted: 28/Oct/2017

## Abstract

**Introduction:** Ovariectomy and estrogen removal by inducing metabolic syndrome reduce learning and memory and increase the likelihood of developing Alzheimer's disease (AD). AD is a progressive neurological disorder with no definite cure. Polyphenols have shown important effects in preventing neurological disorders, due to antioxidant properties.

**Objective:** The goal of this study was to investigate the effect of pure flavonoid of medlar leaves, on STZ-induced memory impairment in ovariectomized rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, forty eight female Wistar rats weighing 200-250 g, were divided into six groups including: SHAM, OVX, OVX+STZ(3mg/kg), OVX+SAL, OVX+STZ+FLA, OVX+STZ+SAL. At the initial of the experiment, rats were ovariectomized, and after three weeks they were cannulated using stereotaxic apparatus. Intracerebroventricular injection of STZ(3mg/kg, 2times) was used to induce memory impairment. Rats received pure flavonoid(10mg/kg, Intraperitoneal), in the STZ injection day for 21 days. All rats were tested for passive avoidance learning and memory in the shuttle box. Latency to enter to dark compartment and total time spent in that compartment were used as passive avoidance memory indices.

**Results:** There was no significant difference in the acquisition and retrieval of memory between OVX ,SHAM groups(p=0.873). ICV injection of STZ significantly decreased latency to enter to dark compartment and increased total time spent in that compartment(p=0.001). The OVX+STZ+FLA group receiving pure flavonoid of medlar showed a significant improvement in passive avoidance learning and memory, compared with OVX+STZ+SAL group(P=0.001) .

**Conclusion:** ICV injection of STZ disturbs passive avoidance learning and memory and treatment with pure flavonoid of medlar improves memory impairment induced by ICV injection of STZ.

**Conflict of interest:** non declared

**Key words:** Ovariectomy\ Memory\ Streptozotocin\ Polyphenols\ Rats

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 104, Pages: 62-71

**Please cite this article as:** Kouhestani S, Zare S, Babaei P. Effects of Pure Flavonoid of Medlar Leaves on Passive Avoidance Learning and Memory In Alzheimer Model of Ovariectomized Rats. J of Guilan Univ of Med Sci 2017; 26(104):62-71. [Text in Persian]

1. Department of Biology, Faculty of basic Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

2. Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

3. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran