Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Winter 2021. Vol 29. Num 4

Research Paper

Effect of Jujube Extract on Acetylcholinesterase Activity and Oxidative Stress in Morphine-treated Male Rats

Zahra Haratian[1], *Bagher Seyedalipour[2], Farhad Valizadegan[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2. Department of Cellular and Molecular, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Haratian Z, Seyedalipour B, Valizadegan F. Effect of Jujube Extract on Acetylcholinesterase Activity and Oxidative Stress in Morphine-treated Male Rats. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2021; 29(4):122-133. https://doi.org/10.32598/JGUMS.29.4.2

https://doi.org/10.32598/JGUMS.29.4.2

CC BY NC

Received: 20 Jul 2020
Accepted: 24 Oct 2020
Available Online: 01 Jan 2021

Keywords:
Oxidative stress, Acetylcholinesterase, Jujube extract, Cortex, Rats

ABSTRACT

Background One of the mechanisms associated with morphine neurotoxicity is oxidative stress. Jujube fruit extract may reduce oxidative stress due to its antioxidant properties.

Objective This study aims to investigate the protective effect of jujube fruit extract on the Acetylcholinesterase (AchE) activity and oxidative stress in the cortex and serum of morphine-treated male rats.

Materials and Methods In this experimental study, 42 male Wistar rats were randomly divided into six groups of 7 which were given oral administration of jujube extract (100 and 200 mg/kg) and intraperitoneal injection of 0.5 mg/kg morphine for 30 days. After blood collection, separation of the serum, and homogenization of brain tissue, the activities of Catalase (CAT), AchE, and Superoxide Dismutase (SOD) enzymes were assessed. Collected data were analyzed using one-way ANOVA.

Results Oral administration of jujube extract at doses of 100 and 200 mg/kg significantly increased the activity of AchE, CAT, and SOD in the serum and cortex of rats compared to morphine injection ($P<0.01$). Oral administration of 200 mg/kg jujube extract plus morphine injection significantly increased the activity of cortical AchE compared to morphine injection alone ($P<0.01$).

Conclusion Jujube extract can prevent the side effects of morphine in the cortex by increasing antioxidant activity.

Extended Abstract

1. Introduction

Opioids exert their pharmacological effects by activating opioid receptors [1]. As a μ receptor agonist, morphine is the most important opium alkaloid. So far, many pharmacological properties of morphine have been reported [2]. By affecting μ receptors, morphine inhibits the release of various neurotransmitters such as noradrenaline and acetylcholine [3]. Oxidative stress is the impairment of oxidant-antioxidant balance. Biosystems have defense mechanisms that help protect against cellular damage caused by free radicals [4]. Ziziphus jujuba, commonly known as Jujube, has antioxidant activity due to its compounds such as saponins, flavonoids, and jujubosides [5-7]. This study aims to evaluate the effect of jujube extract on the activity of Acetylcholinesterase (AChE) enzyme and oxidative stress in the cortex and serum of morphine-treated male rats.

Corresponding Author:
Bagher Seyedalipour, PhD.
Address: Department of Cellular and Molecular, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
Tel: +98 (11) 35302405
E-Mail: b.alipour81@gmail.com

2. Materials and Methods

In this experimental study, 42 male Wistar rats in the weight range of 200-250 g were purchased from the Pasteur Institute of Amol Research Center and kept in standard conditions (12 hours of light and 12 hours of darkness, a humidity of 40% -50% and a temperature of 25 °C). All experiments were performed according to the guidelines of the Bioethics Committee of the University of Mazandaran. Jujube fruit was collected, dried and powdered. Then 500 ml of ethanol was added to100 g of the powder and put in a shaker for 4 days in darkness. The mixture was then filtered by using Whatman filter paper. The obtained extract was dissolved and concentrated by a rotary evaporator [8].

Animals were divided into six groups of 7 including: Control group (received normal saline by gavage intraperitoneally), morphine group (received normal saline by gavage plus 0.5 mg/kg morphine 30 minutes later intraperitoneally) [8], jujube 100 and 200 groups (received 100 and 200 mg/kg body weight of jujube extract by gavage plus normal saline 30 minutes later intraperitoneally) [9], jujube 100 + morphine and jujube 200 + morphine groups (received 100 and 200 mg/kg body weight of jujube extract by gavage plus morphine 30 minutes later intraperitoneally). All treatments were performed for 30 days. The last gavage for each rat was 24 hours before anesthesia. At the end of treatment (day 31), following blood collection, separation of serum from blood samples, and homogenization of brain tissue, the activity of Catalase (CAT), AChE, and Superoxide Dismutase (SOD) was assessed. In order to statistically analyze the collected data and compare groups, one-way ANOVA and Tukey's post hoc test were used considering a significance level of $P<0.05$.

3. Results

The results of ANOVA showed significant changes in the serum and cortical AChE in the study groups ($P<0.001$). Serum AChE activity significantly decreased in the morphine group compared to the control group ($P<0.001$). Administration of 100 and 200 mg/kg extracts of jujube plus morphine injection increased the activity of serum AChE compared to when only morphine was injected, but this increase was not significant. However, administration of 100 mg/kg ($P=0.004$) and 200 mg/kg ($P=0.036$) extracts showed significant changes compared to the control group. Cortical AChE activity showed a significant decrease in the morphine group (7.02±0.61) compared to the control group (13.56±0.73) ($P<0.001$). Administration of 100 and 200 mg/kg jujube extracts plus morphine injection increased the activity of cortical AChE compared to the morphine group, but the increase was significant only at a dose of 200 mg/kg ($P=0.002$).

Cortical CAT activity was significantly decreased in the morphine group (8.09±0.91) compared to the control group (20.79±1.31) ($P<0.001$). Administration of 100 and 200 mg/kg extracts of jujube plus morphine injection increased the cortical CAT activity compared to the morphine group but this increase was not significant ($P>0.05$). However, significant changes were observed compared to the control group ($P=0.005$ and 0.027). Serum CAT activity in the morphine group significantly decreased compared to the control group ($P<0.001$). Administration of 100 mg/kg ($P= 0.015$) and 200 mg/kg ($P=0.017$) extracts of jujube plus morphine injection increased the serum CAT activity compared to when only morphine was injected, but this increase was not significant. However, compared to the control group, the differences were significant.

Finally, the results of ANOVA showed significant changes in the serum and cortical SOD activities in the study groups ($P= 0.001$). Cortical and serum SOD activities in the morphine group significantly decreased compared to the control group ($P=0.001$ and 0.011, respectively). Administration of 100 and 200 mg/kg jujube extracts alone increased the activity of cortical SOD compared to when only morphine was injected ($P<0.01$). The morphine group after receiving jujube extracts increased the inhibition of cortical SOD, but the increase in SOD activity was significant only in the jujube 200 + morphine group ($P=0.013$).

4. Discussion and Conclusion

Intraperitoneal injection of morphine increases oxidative stress and reduces the activity of CAT, SOD, and AChE. Administration of jujube extracts improves morphine-induced oxidative stress and increases AChE activity. Therefore, jujube extract improves the activity of CAT, SOD, and AChE in morphine-treated male rats based on its antioxidant properties. The consumption of jujube fruit can prevent the reduction of oxidative stress and its complications.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Bioethics Committee of the University of Mazandaran (Code: IR.UMZ.REC.1398.003).

Funding

This article was extracted from the MA. thesis of first author at the Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran.

Authors' contributions

Conceptualization: Bagher Seyedalipour, Farhad Valizadegan; Methodology, investigation, resource, writing-original draft: Zahra Haratian; Visualization, data analysis, writing–review & editing, supervision, project administration: Bagher Seyedalipour, Farhad Valizadegan.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Vice Chancellor for Research of Mazandaran University for his financial support and Ms. Rezaei for his experimental support.

مقاله پژوهشی

اثر حفاظتی عصاره اتانولی میوه عناب برفعالیت آنزیم استیل کولین استراز و استرس اکسیداتیو در سرم و کورتکس موش صحرایی نر تیمارشده با مورفین

زهرا هراتیان[۱]، *باقر سیدعلی‌پور[۲]، فرهاد والی‌زادگان[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
۲. گروه فیزیک اتمی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

تاریخ دریافت: ۳۰ تیر ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۰۳ آبان ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۲ دی ۱۳۹۹

چکیده

زمینه یکی از مکانیسم‌های مرتبط با سمیت نورونی مورفین استرس اکسیداتیو است. عصاره میوه عناب با خواص آنتی‌اکسیدانی سبب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود.

هدف این مطالعه با هدف تعیین اثر حفاظتی عصاره میوه عناب بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و استیل کولین استراز کورتکس و سرم در موش صحرایی نر تیمارشده با مورفین انجام شد.

مواد و روش‌ها در این مطالعه تجربی ۴۲ سر موش صحرایی به صورت تصادفی به شش گروه هفت‌تایی تقسیم شده و گروه‌ها به مدت ۳۰ روز با دُزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم بر میلی‌گرم عصاره گیاهی به فرم خوراکی و مورفین ۰/۵ کیلوگرم بر میلی‌گرم به صورت درون‌صفاقی بررسی شدند. بعد از خون‌گیری و جدا کردن سرم و هموژن کردن بافت کورتکس، سنجش آنزیم‌های استیل کولین استراز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون واریانس یک‌طرفه انجام شد.

یافته‌ها تجویز خوراکی عصاره گیاه عناب با دُز ۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم بر میلی‌گرم سبب افزایش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در سرم و کورتکس نسبت به گروه مورفین شد ($P<0/01$). تجویز عصاره عناب با دُز ۲۰۰ به همراه مورفین سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نسبت به گروه مورفین در کورتکس شد ($P<0/01$).

نتیجه‌گیری نتایج نشان می‌دهد عصاره میوه عناب، احتمالاً از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، یک اثر مفید در جلوگیری از بروز اثرات مصرف مورفین در کورتکس اعمال می‌کند.

کلیدواژه‌ها:
استرس اکسیداتیو، استیل کولین استراز، عصاره میوه عناب، کورتکس، موش صحرایی

مقدمه

بعداز جداسازی گیرنده‌های اوپیوئیدی، لیگاندهای اوپیوئیدهای آندروژن شناسایی شدند. گروهی از این لیگاندها به نام انکفالین و گروهی دیگر بتا آندروفین هستند [۱]. ترکیبات اوپیوئیدی اثرات فارماکولوژیکی خود را از طریق فعال کردن گیرنده‌های اوپیوئیدی اعمال می‌کنند [۲]. مورفین به عنوان آگونیست گیرنده μ، مهم‌ترین آلکالوئید تریاک در نظر گرفته می‌شود و تاکنون خواص فارماکولوژیکی زیادی در مورد مورفین در خصوص اثرات ضددردی، کاهش حافظه و یادگیری و اضطراب معرفی شده است [۳]. مورفین با اثر روی گیرنده‌ها μ باعث مهار آزادسازی نوروترانسمیترهای مختلفی مثل نورآدرنالین، استیل کولین و نوروپپتید P می‌شود [۴]. استیل کولین یک نوروترانسمیتر است که در گانگلیون‌های اتونومیک و عقده‌های قاعده‌ای نیز یافت می‌شود. اندازه‌گیری غلظت‌های آنزیم‌های استیل کولین ترانسفراز و استیل‌کولین استراز که به ترتیب در سنتز و تجزیه استیل‌کولین درگیر هستند، نشان می‌دهد که مهار فعالیت استیل‌کولین استراز می‌تواند کاهش استیل کولین را جبران کند [۵].

استرس اکسیداتیو اختلال در تعادل اکسیدان آنتی‌اکسیدان است. بیشتر سلول‌ها درجه خفیفی از استرس اکسیداتیو را تحمل می‌کنند، چون دارای ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی کافی هستند.

* نویسنده مسئول:
دکتر باقر سیدعلی‌پور
نشانی: بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه فیزیک اتمی و مولکولی.
تلفن: ۳۵۳۰۲۴۰۵ (۱۱) ۹۸+
رایانامه: b.alipour81@gmail.com

عدم تعادل اکسیدان آنتی‌اکسیدان و اختلال در تولید و توزیع گونه‌های واکنشی اکسیژن و یا بیش از حد بودن آن‌ها نسبت به سایر فاکتورها سبب نبودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. سیستم‌های زیستی دارای مکانیسم دفاعی درونی هستند که به محافظت در برابر آسیب‌های سلولی حاصل از رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند [۶]. گلوتاتیون پراکسیداز[1]، کاتالاز[2] و سوپراکسید دیسموتاز[3] آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اصلی درگیر در دفاع و حذف رادیکال‌های اکسیژن فعال هستند. این آنزیم‌ها به کوفاکتورهایی مثل آهن، مس، روی و منگنز برای فعالیت کاتالیتیک بهینه و مکانیسم دفاعی مؤثر نیاز دارند [۷].

در دهه‌های اخیر استفاده از مکمل‌های گیاهی و گیاهان دارویی (به علت دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی) برای درمان بیماری‌ها به شدت افزایش یافته است. یکی از مهم‌ترین حوزه‌های طب سنتی در سراسر جهان حوزه مربوط به گیاه درمانی است و عصاره‌های تهیه‌شده از گیاهان برای تعیین یک منبع درمانی آزمایش می‌شوند. عناب با نام علمی Ziziphus jujuba گیاهی درختی با خواص دارویی است که ارتفاع آن به ۱۰ متر نیز می‌رسد و متعلق به تیره عنابیان[4] است. میوه زیتونی شکل عناب در ابتدا سبز بوده و پس از رسیدن به رنگ قرمز درآمده و چروک می‌خورد. عناب را خرمای قرمز و خرمای چینی نیز می‌نامند که در نواحی با درجه حرارت پایین پراکنده شده و در آسیا، برزیل و نپال یافت می‌شود [۸].

عناب از گیاهان بومی فلات ایران است و در مناطق وسیعی از ایران کشت می‌شود. میوه عناب دارای ویتامین‌های C، A و E و ترکیباتی مانند ساپونین‌ها، الکالوئیدها، فلاونوئیدها، تری ترپنوئید، جوجوبا، مشتقات اسید بتولینیک است. قرارگیری این ترکیبات در کنار هم موجب ایجاد اثرات هم‌افزایی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌شود [۹-۱۱]، بنابراین در طی دوران تکامل، سیستم‌های بیولوژیکی با طراحی و ساخت آنتی‌اکسیدان‌ها، جانداران را در مقابل اثرات زیان‌بار رادیکال‌های آزاد محافظت کرده‌اند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، شامل عوامل آنزیمی نظیر CAT، SOD و GPx و عوامل غیرآنزیمی نظیر ویتامین E، ویتامین C، کاروتنوئیدها، پلی‌فنل‌ها و مولکول‌های دیگر است که به عنوان آنتی‌اکسیدان در خنثی‌سازی بسیاری از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارند [۱۲]. مطالعات نشان داد عصاره میوه عناب باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx در موش‌های تیمارشده با اتانول در مغز [۱۳] و افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD در موش‌های تیمارشده با ایبوپروفن می‌شود [۱۴].

اعتیاد به مورفین و سایر اوپیات‌ها یکی از مشکلات مهم جوامع امروزی است. بنابراین شناسایی و یافتن داروهای گیاهی مؤثر با نقش محافظتی از اهمیت زیادی برخوردار است. این پژوهش به منظور بررسی اثرات محافظتی عصاره عناب و تعیین اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی میوه عناب بر روی فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و استیل کولین استراز[5] بخش کورتکس مغز و سرم موش صحرایی نر تیمارشده با مورفین انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران در سال ۱۳۹۶ انجام شد. در این مطالعه تجربی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم از پژوهشکده انستیتو پاستور آمل خریداری شدند و در اتاق حیوانات دانشکده زیست‌شناسی در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت ۴۰-۵۰ درصد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آب و غذای مخصوص حیوانات به میزان کافی در دسترس آن‌ها قرار گرفت. برای سازگاری جانوران با محیط، آزمایش‌ها یک هفته بعد از انتقال موش‌ها به آزمایشگاه انجام گرفت.

تهیه عصاره گیاهی اتانولی: در این تحقیق، میوه درخت عناب در اواخر آبان ماه سال ۱۳۹۶ (از منطقه شهرستان درگز، استان خراسان رضوی، ایران) جمع‌آوری شد و توسط گروه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران تأیید شد. سپس میوه‌ها (دانه و پالپ) را دور از نور خورشید و در سایه خشک کرده و به وسیله آسیاب الکتریکی (Moulinex, model AR1066Q) به پودر تبدیل شد. سپس مقدار ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در ظرف مخصوص ریخته شده و ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول به آن اضافه شد و به مدت ۴ روز در دستگاه تکان‌دهنده (شیکر) (IRK، آمریکا) قرار داده شد و سپس عمل صاف کردن با کاغذ صافی طی دو مرحله انجام گرفت. عصاره خالص به دست آمده به وسیله دستگاه تبخیرکن چرخان Laborota ، (Heidolph ۴۰۰۰، آلمان) حلال‌پرانی و غلیظ شد [۱۵]. عصاره خالص اتانولی به‌دست‌آمده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد (ElectroSteel ES35، ایران) نگهداری شد.

طراحی و گروه‌بندی: در این تحقیق حیوانات به شش گروه هفت‌تایی تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل: گروه کنترل، نرمال سالین را به صورت درون‌صفاقی و به صورت گاواژ دریافت کردند. گروه آزمایش مورفین، نرمال سالین را به صورت گاواژ و ۳۰ دقیقه بعد مورفین (۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون‌صفاقی دریافت کردند [۱۵]. گروه آزمایش عصاره ۱۰۰، دُز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به صورت گاواژ و ۳۰ دقیقه بعد نرمال سالین را به صورت درون‌صفاقی دریافت کردند [۱۶]. گروه آزمایش عصاره ۲۰۰،

1. Glutathione Peroxidase (GPx)
2. Catalase (CAT)
3. Superoxide dismutase(SOD)
4. Rhamnaceae
5. Acetylcholinesterase (AChE)

دُز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به صورت گاواژ و ۳۰ دقیقه بعد نرمال سالین را به صورت درون‌صفاقی دریافت کردند، گروه آزمایش عصاره ۱۰۰ به علاوه مورفین، دُز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به صورت گاواژ و ۳۰ دقیقه بعد مورفین را به صورت درون‌صفاقی دریافت کردند. گروه آزمایش عصاره ۲۰۰ به علاوه مورفین، دُز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره میوه گیاه عناب را به صورت گاواژ و ۳۰ دقیقه بعد مورفین را به صورت درون‌صفاقی دریافت کردند. تمام تیمارها به مدت ۳۰ روز و در ساعت ۸ الی ۱۰ صبح انجام شدند. آخرین گاواژ برای هر موش صحرایی ۲۴ ساعت قبل از بی‌هوشی بود. در پایان دوره زمانی تیمارها (روز ۳۱) خون‌گیری و نمونه‌برداری انجام شد و برای سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

نحوه خون‌گیری و هموژن کردن بافت

برای تهیه نمونه آزمایش، پس از آخرین تزریق با رعایت شرایط ناشتا، حیوان را در ظرف شیشه‌ای مخصوص دیسیکاتور با کلروفرم بی‌هوش کرده و سپس با خواباندن حیوان به پشت با نوک انگشتان محل قلب مشخص می‌شد و با سرنگ‌های ۵ سی‌سی مستقیم از قلب حیوان خون‌گیری انجام شد. برای جداسازی سرم، نمونه خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ ×g سانتریفیوژ (Sigma 3-30 Ks، آلمان) شد. بعد از جداسازی سرم خون از لخته به وسیله سمپلر، نمونه‌ها برای سنجش آنزیم‌CAT، AChE و SOD در فریزر نگهداری شدند. برای هموژن‌سازی بافت کورتکس مغز، ابتدا موش صحرایی با کلروفرم بی‌هوش شده و سپس جمجمه شکافته شد و قسمت کورتکس مطابق با اطلس پاکسینوس و واتسون جدا شد. نمونه‌ها در تانک نیتروژن مایع قرار داده شد، سپس بافت‌ها از تانک خارج و به هاون چینی انتقال داده شد، به طوری که با فاصله زمانی، چندین بار ازت مایع روی بافت ریخته شد تا بافت سفت و شکننده باقی بماند و هم‌زمان بافت را کوبیده، به طوری که بافت کاملاً خرد و به شکل پودر شد. بعد از تعیین وزن بافت هموژن‌شده آن را به لوله فالکون انتقال داده و به ازای هر گرم از بافت ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=4/7 اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و درنهایت مایع شفاف رویی برای سنجش آنزیم SOD، CAT و AChE جداسازی شد و تا زمان انجام آزمایش نمونه‌ها در فریزر نگهداری شدند [۱۶].

سنجش فعالیت پارامترهای بیوشیمی

تعیین فعالیت کاتالاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT با استفاده از سوبسترای پراکسید هیدروژن انجام شد. واکنش در کوت ۳ میلی‌لیتری انجام گرفت. حجم مخلوط واکنش شامل ۹۸۰ میکرولیتر محلول ۳۰ میلی‌مولار آب اکسیژنه و ۲ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=7 و ۲۰ میکرولیتر از نمونه سرم است. واکنش با افزودن سوبسترا شروع و تغییرات جذب در طول مدت ۲ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی ۳۹/M-1CM-1 بر اساس قانون بیرلامبرت (A=εdc) محاسبه و به صورت U/ml برای سرم و U/g tissue برای بافت‌ها گزارش شد. بر طبق تعریف، یک واحد CAT مقدار آنزیمی است که موجب تجزیه یک میکرومول H_2O_2 در مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شود [۱۷].

تعیین فعالیت انزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

برای سنجش فعالیت آنزیم SOD از روش اتواکسیداسیون پیروگالل استفاده شد. بدین‌منظور از بافرتریس هیدروکلرید ۵۰ میلی‌مولار با pH=2/8 و اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) یک میلی‌مولار و پیرو گالول ۰/۲ میلی‌مولار استفاده شد. ۲۹۰۰ میکرولیتر لیتراز بافر تریس هیدروکلرید حاوی EDTA و با ۵۰ میکرولیتر محلول رویی مخلوط و سپس ۵۰ میکرولیتر محلول پیروگالل به محلول فوق اضافه شده و تغییرات جذب طی ۵ دقیقه با فاصله ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری اتواکسیداسیون پیرو گالل به تنهایی به عنوان شاهد به جای سوپر ناتانت ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و به ترتیب فوق جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد و درصد مهار اتو اکسیداسیون پیروگالل از فرمول شماره ۱ محاسبه شد [۱۸].

۱.

درصد مهار پیروگالل = (dA/dt_blank – dA/dt_sample) / dA/dt_blank ×۱۰۰

dA/dt_blank= تغییرات جذب در واحد زمان (بلانک)

dA/dt_sample= تغییرات جذب در واحد زمان (نمونه)

تعیین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE)

برای سنجش فعالیت آنزیم AChE، با اندازه‌گیری سرعت تولید تیوکولین به منزله محصول کاتالیز آنزیمی به روی استیل تیوکولین به عنوان سوبسترا انجام شد. تیوکولین به محض تولید با ۵ دی تیو بیس ۲ نیتروبنزوئیک اسید[6] واکنش می‌دهد تا آنیون زرد رنگ ایجاد شود. ۱۰ میکرولیتر از نمونه آنزیم و ۲۹۵۰ میکرولیتر از بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH=5/7 به ۲۰ میکرولیتر از معرف DTNB ۱۰میلی‌مولار و ۲۰ میکرولیتر استیل تیوکولین یداید با غلظت ۷۵ میلی‌مولار به عنوان سوبسترا اضافه شد. پس از افزودن سوبسترا، سرعت تولید تیوکولین با پیگیری واکنش آن با DTNB و تولید آنیون زردرنگ ۲ نیترو ۵ مرکاپتو بنزوئیک اسید در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب بر حسب زمان (دقیقه) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Biotek Epoch, USA) به مدت ۵ دقیقه در هر ۳۰ ثانیه یک‌بار خوانش

6. 5,5′-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)

و ثبت شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه دارای آنزیم است. تنها تفاوت اینکه نمونه شاهد فاقد آنزیم بوده و به جای آنزیم از بافر استفاده شد. فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول بر دقیقه در هر میلی‌لیتر و میکرومول بر دقیقه در هر گرم بافت کورتکس (µmol/min/g) گزارش شد [۱۹].

تجزیه و تحلیل آنالیز آماری

نتایج به صورت انحراف معیار±میانگین برای نمونه‌های موجود در هر گروه بیان شد. برای بررسی فرض برابری واریانس‌ها از آزمون لون استفاده شد. پس از تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها و برقراری فرض برابری واریانس‌ها، برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه بین‌گروهی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن از آزمون تعقیبی Tukey با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ استفاده شد. تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

نتایج

نتایج فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در سرم و کورتکس

نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از آنالیز واریانس ANO-VA نشان داد در گروه‌های مورد مطالعه تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم AChE سرم و کورتکس مشاهده شد (P>۰/۰۰۱). همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم AChE سرم در گروه آزمایش مورفین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (P>۰/۰۰۱). تزریق عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به گروه مورفین باعث افزایش فعالیت آنزیم AChE نسبت به گروه مورفین شد اما این تغییرات معنی‌دار نبود، در صورتی که دُزهای ۱۰۰ (P=۰/۰۰۴) و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (P=۰/۰۳۶) نسبت به گروه کنترل به ترتیب تغییرات معنی‌داری را نشان دادند. گروه‌هایی که عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به‌تنهایی دریافت کردند، به ترتیب تغییرات معنی‌داری در سطح (P=۰/۰۱۵) و (P=۰/۰۰۴) نسبت به گروه مورفین نشان دادند. در سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم AChE کورتکس در گروه مورفین (۷/۰۲±۰/۶۱) نسبت به گروه کنترل (۱۳/۵۶±۰/۷۳) کاهش معنی‌داری نشان داد (P>۰/۰۰۱). تزریق عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به گروه مورفین باعث افزایش فعالیت آنزیم AChE نسبت به گروه مورفین شد، به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد اما در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییرات معنی‌داری مشاهده شد (P=۰/۰۰۲). گروه‌هایی که عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به‌تنهایی دریافت کردند، تغییرات معنی‌داری نسبت به گروه آزمایش مورفین نشان دادند (P=۰/۰۰۱).

نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز در سرم و کورتکس

نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از آنالیز آماری نشان داد در گروه‌های مورد مطالعه تغییراتی معنی‌داری در فعالیت آنزیم CAT سرم و کورتکس مشاهده شد (P>۰/۰۰۱). همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم CAT کورتکس در گروه مورفین (۸/۰۹±۰/۹۱) نسبت به گروه کنترل

جدول ۱. تغییرات سطوح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و استیل کولین استراز (AChE) سرم و کورتکس در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در شش گروه (n=7)

	آنزیم	گروه‌ها					
		میانگین±انحراف معیار					
		کنترل	مورفین	عصاره ۱۰۰	عصاره ۲۰۰	عصاره ۱۰۰ + مورفین	عصاره ۲۰۰ + مورفین
سرم	CAT	۵۸/۸۳±۲/۹۹	۳۱/۶±۶/۱۹***	۵۲/۴۸±۲/۷۹###	۵۵/۱۹±۳/۹۵###	۴۱/۹۳±۳/۰۲*	۴۲/۲±۰۴/۲۶*
	SOD	۴۸/۹۵±۲/۳۷	۳۳/۸۷±۳/۱۳**	۴۷/۳۰±۳/۹#	۴۷/۶۱±۴/۳۴#	۴۲/۴۶±۱/۳۶	۴۳/۵۷±۰/۹۴
	AchE	۵/۸۲±۰/۴۱	۳/۰۰±۰/۳۰***	۵/۰۱±۰/۳۱#	۵/۲۷±۰/۳۷##	۳/۵۶±۰/۶۲**	۳/۹۵±۰/۳۷*
کورتکس	CAT	۲۰/۵۶±۱/۳۱	۸/۰۹±۰/۹۱***	۱۹/۳۱±۱/۵۲###	۱۹/۳۹±۰/۹۷###	۱۲/۵۰±۲/۳۳**	۱۳/۸۸±۱/۳۲*
	SOD	۵۱/۳۵±۳/۴۷	۳۱/۶۳±۲/۶۳***	۴۷/۹۴±۳/۰۹##	۴۸/۴۸±۳/۰۳##	۴۰/۵۴±۱/۷۴	۴۶/۸۵±۳/۷۶
	AchE	۱۳/۵۶±۰/۷۳	۷/۰۲±۰/۶۱***	۱۲/۷۹±۱/۱۴###	۱۳/۰۶±۰/۹۱###	۹/۱۰ ±۱/۰۲*	۱۲/۵۱±۱/۰##

آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey، فعالیت آنزیم AChE برحسب µmol/min/ml برای سرم و µmol/min/g برای بافت کورتکس، فعالیت آنزیم CAT به صورت U/ml برای سرم و U/g tissue برای بافت کورتکس و فعالیت آنزیم SOD به صورت U/ml برای سرم و U/g tissue برای بافت کورتکس.
*P>۰/۰۵، ** P>۰/۰۱، *** P>۰/۰۰۱ تفاوت معنی دار با گروه کنترل؛ #P>۰/۰۵، ## P>۰/۰۱، ### P>۰/۰۰۱ تفاوت معنی دار با گروه مورفین.

(۲۰/۷۹±۱/۳۱) کاهش معنی‌داری پیدا کرد (P>۰/۰۰۱). تزریق عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به گروه مورفین باعث افزایش غیرمعنی‌دار فعالیت آنزیم CAT نسبت به گروه مورفین شد (P<۰/۰۵)، در حالی که نسبت به گروه کنترل تغییرات معنی‌داری در سطح (P=۰/۰۰۵) و (P=۰/۰۲۷) مشاهده شد. گروه‌هایی که عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به تنهایی دریافت کردند، تغییرات معنی‌داری نسبت به مورفین نشان دادند (P>۰/۰۰۱). فعالیت آنزیم CAT سرم در گروه آزمایش مورفین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (P>۰/۰۰۱). همچنین تزریق عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به تنهایی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه مورفین نشان داد (P>۰/۰۰۱). با تزریق عصاره ۱۰۰ (P=۰/۰۱۵) و ۲۰۰ (P=۰/۰۱۷) میلی‌گرم بر کیلوگرم به گروه مورفین باعث افزایش فعالیت آنزیم نسبت به گروه مورفین شد، اما این افزایش معنی‌دار نبود، در حالی که نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول شماره ۱).

نتایج فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سرم و کورتکس

نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA نشان داد در گروه‌های مورد مطالعه تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سرم و کورتکس مشاهده شد (P=۰/۰۰۱). همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم SOD کورتکس در گروه مورفین در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۰۱) در حالی که دیگر گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل تغییرات معنی‌داری را نشان ندادند (P<۰/۰۵). تزریق عصاره میوه گیاه عناب در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌تنهایی فعالیت آنزیم SOD را نسبت به گروه مورفین افزایش داد (P>۰/۰۱). نتایج ما همچنین نشان داد گروه‌های آزمایش مورفین بعد از دریافت عصاره میوه گیاه عناب، میزان بازدارندگی آنزیم SOD را نسبت به گروه آزمایش مورفین افزایش دادند، به طوری که فقط در گروه آزمایش مورفین+عصاره ۲۰۰ افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم SOD مشاهده شد (P=۰/۰۱۳). فعالیت آنزیم SOD سرم در گروه مورفین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۱۱). نتایج ما نشان داد تزریق عصاره میوه گیاه عناب در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فعالیت آنزیم SOD را نسبت به گروه مورفین افزایش داد (P>۰/۰۵). با تزریق عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ به گروه مورفین فعالیت آنزیم نسبت به مورفین افزایش یافت اما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها با گروه کنترل مشاهده نشد (جدول شماره ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره اتانولی میوه عناب بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافت کورتکس و سرم در موش‌های صحرایی نر تیمارشده با مورفین صورت پذیرفت. روش استخراج با حلال‌های مختلف در کمیت و کیفیت استخراج متابولیت‌های ثانویه فنلی و فلاونوئیدها نقش به سزایی دارد، به طوری که مطالعات پیشین نشان دادند، حلال‌های متانول و اتانول نسبت به حلال آبی با قدرت نفوذ بیشتر به داخل سلول‌های گیاه داشته و ترکیبات طبیعی ثانویه شامل فنول‌ها و فلاونوئیدهای بیشتری را استخراج می‌کند [۲۰]. قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد کاملاً وابسته به غلظت ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها بوده و با افزایش آن بیشتر می‌شوند [۲۱]. بنابراین در پژوهش حاضر برای یافتن ترکیبات جدید با منشأ گیاهی و همچنین کیفیت استخراج بیشتر از حلال اتانول برای عصاره‌گیری میوه عناب استفاده شد.

در پژوهش حاضر مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و SOD در گروه‌های دریافت‌کننده مورفین کاهش یافته است که نشان‌دهنده افزایش استرس اکسیداتیو است. ایکسو و همکارانش نشان دادند که تزریق مزمن هروئین، ظرفیت کل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند CAT، SOD و GPx که سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی بدن هستند را در سرم و مغز کاهش می‌دهند [۲۲]. التهاب نورونی و استرس اکسیداتیو همچنین کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دنبال مصرف مزمن اوپیوئیدها از جمله مکانیسم‌های بروز تحمل و وابستگی اوپیوئیدی بوده و مهار هریک از موارد فوق نقش تعیین‌کننده‌ای در کاهش عوارض اوپیوئیدی دارند [۲۳، ۲۴]. برای بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی طبیعی بدن، ترکیبات پلی‌فنلی موجود در عصاره میوه عناب با خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند نقش مهمی داشته باشند.

SOD یک متالوآنزیم مهم است که به عنوان نخستین خط دفاعی بدن علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل کرده و باعث حذف رادیکال‌های سوپراکسید از طریق تبدیل آن به آب اکسیژنه می‌شود. SOD به شکل وسیعی در مغز توزیع شده و به طور پیوسته و یکنواخت در تمام عمر فعالیت می‌کند. از طرفی بررسی میزان شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد که تزریق درون‌صفاقی مورفین به عنوان ماده‌ای که سبب افزایش استرس اکسیداتیو به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید می‌شود، موجب کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز، درصد بازدارندگی فعالیت آنزیم SOD و فعالیت آنزیم AChE شده است. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن SOD توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید منجر به غیرفعال شدن کاتالاز می‌شود. در این پژوهش گاواژ عصاره عناب موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد که این امر ممکن است در اثر پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد توسط عصاره اتانولی عناب باشد. همسو با نتایج پژوهش حاضر، دلال و همکارانش تجویز خوراکی ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی میوه عناب به موش‌های تیمارشده با ایبوپروفن را ارزیابی کرده و افزایش فعالیت SOD

و CAT را مشاهده کردند [۱۴]. تاتی و همکارانش نشان دادند که تجویز خوراکی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی میوه عناب به مدت ۸ هفته باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD در موش‌های تیمارشده با اتانول در هیپوکمپ می‌شود؛ با این تفاوت که به جای مورفین از اتانول استفاده شد [۱۳]. CAT یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی و سیتوزولی و با سطح پایین در میتوکندری است و برای پایین نگه داشتن سطح آب‌اکسیژنه سلولی نقش حیاتی دارد. سطح این آنزیم در مناطقی از مغز که مستعد آسیب‌های اکسیداتیو است، بالاست [۲۵]. بنابراین اعتقاد بر این است که سطح پایین CAT ممکن است منجر به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن و همچنین باعث آسیب سلولی شود.

تست‌های بیوشیمیایی نشان داد عصاره عناب با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش انتقال‌دهنده استیل کولین، سبب افزایش فعالیت AChE شد. همچنین با توجه به نتایج حاضر سطح فعالیت آنزیم AChE سرم و کورتکس بعد از تزریق مورفین در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. مورفین با کاهش آزادسازی استیل کولین در فضای سیناپسی سبب کاهش فعالیت آنزیم AChE می‌شود. در واقع مصرف عصاره عناب باعث افزایش آزادسازی انتقال‌دهنده استیل کولین و افزایش فعالیت آنزیم AChE نسبت به گروه مورفین شد. مطالعات نشان داد که عصاره‌های آلکالوئیدهای Lycopodium clavatum و Lycopo-dium thyoides با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی باعث مهار آنزیم AChE دربافت‌های قشر مغز، هیپوکامپ و استریاتوم موش صحرایی شد که با نتایج ما هم‌خوانی ندارد؛ دلیل این مغایرت احتمالاً می‌تواند مربوط به گونه گیاهی و نوع عصاره (آلکالوئیدی)، مدت زمان، نوع تزریق (درون‌صفاقی) و غلظت عصاره (۱، ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر گیلوگرم) باشد [۲۶]. مصرف اتانول مزمن و حاد منجر به کاهش قابل توجه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، افزایش پراکسیداسیون لیپید و افزایش فعالیت آنزیم AChE در کل مغز و یا درهیپوکامپ می‌شود [۲۹-۲۷].

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات فنولی فعالیت آنتی‌کولین استرازی دارند [۳۱، ۳۰]. دیهل و همکاران نشان دادند گالانتامین و فیزوستگمین دو ترکیب با ساختار آلکالوئیدی و منشأ گیاهی دارای اثرات مهارکنندگی آنزیم AChE هستند که از طریق افزایش استیل‌کولین باعث کاهش اعتیاد به سیگار می‌شوند [۳۲]. بنابراین ممکن است آلکالوئیدهای موجود در عصاره میوه عناب نیز باعث بروز خاصیت مهاری شوند، اما تحقیقات و مطالعه ما نشان داد عصاره اتانولی میوه عناب خاصیت فعال‌کنندگی استیل کولین استراز دارد. مطالعات هئو و همکارانش نشان داد، عصاره متانولی گیاه عناب بیشترین اثر فعال‌کنندگی را بر فعالیت استیل‌کولین استراز دارد و باعث کاهش سطح استیل‌کولین در پایانه‌های کولینرژیک می‌شود که با نتایج ما هم‌خوانی دارد [۳۳]. مطالعات اینستروسا و همکارانش مکانیسم اثر حفاظتی عصاره‌های گیاهی در مهار آنزیم کولین‌استراز را نشان داد [۳۴].

مطالعات نشان داد مواد شیمیایی اصلی عناب ساپونین شامل جوجوبوساید A، جوجوبوساید B و اسیدهای چرب شامل لوریک اسید، میریستیک اسید، پالمتیک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید [۳۵] و همچنین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها هستند که اثرات آنتی‌اکسیدانی را به این ترکیبات نسبت می‌دهند [۱۰]. نتایج مطالعه خیانکچون و همکارانش نشان داد که عصاره عناب می‌تواند با رادیکال آزاد ترکیب شده و اثرات توکسیک آن را کاهش دهد [۱۱]. مطالعات اندکی تأثیر میوه عناب را روی آنزیم SOD و CAT بررسی کرده‌اند. به نظر می‌رسد، دلایل ناهم‌خوانی نتایج دیگران با پژوهش حاضر، تفاوت در دُز مصرفی میوه عناب، نوع تزریق و طول دوره مصرفی عناب، نوع ماده تیمارشده و نوع بافت است. از جمله محدویت‌های این تحقیق می‌توان به کمبود نسبی تعداد نمونه‌ها و گروه‌های تحقیق برای آزمایش دُزهای مختلف عناب اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود از دُزهای مختلف میوه عناب و تعداد نمونه بیشتر برای جامعه آماری بزرگ‌تر استفاده شود تا نتایج دقیق‌تری حاصل شود.

نتایج داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که تزریق درون‌صفاقی مورفین، سبب افزایش استرس اکسیداتیو، کاهش فعالیت آنزیم CAT، درصد بازدارندگی فعالیت آنزیم SOD و کاهش فعالیت آنزیم AChE می‌شود. تجویز عصاره عناب موجب بهبود استرس اکسیداتیو القاشده با مورفین و افزایش فعالیت آنزیم AChE شد، بنابراین تست‌های بیوشیمیایی نشان داد عصاره عناب با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش انتقال دهنده استیل کولین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و AChE شد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که مصرف میوه عناب با توان آنتی‌اکسیدانی بالا می‌تواند یک عامل مهم و پیشگیری‌کننده در کاهش استرس اکسیداتیو و جلوگیری از بروز عوارض ناشی از آن باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق زیستی دانشگاه مازندران تأیید شد (کد اخلاق: IR.UMZ.REC.1398.003).

حامی مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در گروه زیست شناسی دانشگاه مازندران است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: باقر سید علیپور و فرهاد ولی‌زادگان؛ روش‌شناسی، تحقیق و بررسی منابع، نگارش پیش‌نویس: زهرا هراتیان؛ بصری‌سازی، تحلیل داده‌ها، نگارش پیش‌نویس و ویراستاری، نظارت و مدیریت پروژه: باقر سید علیپور و فرهاد ولی‌زادگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران به دلیل حمایت‌های مالی تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین از کارشناس آزمایشگاه خانم سارا رضایی که در امور آزمایش ما را یاری کردند تشکر می‌کنیم.

References

[1] Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, et al. International: Union: Of pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. Pharmacological Reviews. 1996; 48(4):567-92. [PMID]

[2] Wang JH, Rizak JD, Chen YM, Li L, Hu XT, Ma YY. Interactive effects of morphine and dopaminergic compounds on spatial working memory in rhesus monkeys. Neuroscience Bulletin. 2013; 29(1):37-46. [DOI:10.1007/s12264-013-1305-3] [PMID] [PMCID]

[3] Wang J, Chen Y, Carlson S, Li L, Hu X, Ma Y. Interactive effects of morphine and scopolamine, MK-801, propranolol on spatial working memory in rhesus monkeys. Neuroscience Letters. 2012; 523(2):119-24. [DOI:10.1016/S0304-3940(96)13134-7] [PMID]

[4] Katona I, Sperlágh B, Sík A, Käfalvi A, Vizi ES, Mackie K. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. The Journal of Neuroscience. 1999; 19(11):4544-58. [DOI:10.1523/JNEUROSCI.19-11-04544.1999] [PMID] [PMCID]

[5] Naderi G, Hajhossini R, Abasi M, Mehrabian A. [Inhibitory effects of ethanolic extract of Cyperus rotandus on acetylcholinesrerase activity (Persian)]. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2015; 20(5):102-9. [DOI: 10.22102/20.5.102]

[6] Khalili M, Ebrahimzadeh MA. [A review on antioxidants and some of their common evaluation methods (Persian)]. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2015; 24(120):188-208. http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-4858-en.html

[7] Khoshvaghti A, Darya GH, Hushmandi K, Musavi SM, Salami S. [The effect of Glaucium Flavum extract on the activity of three Liver and Kidney Oxido reductase enzymes in Alloxan induced diabetic rats: A short report (Persian)]. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2019; 18(2):193-200. http://eprints.rums.ac.ir/6724/

[8] Khakdaman H, Pourmeydani A. [The study f Geografic distribution and Morphologic characters of Jujube in Iran (Persian)]. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2004; 20(1):69-87. https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=113513

[9] Pahuja M, Mehla J, Reeta KH, Joshi S, Gupta YK. Hydroalcoholic extract of Zizyphus jujuba ameliorates seizures, oxidative stress, and cognitive impairment in experimental models of epilepsy in rats. Epilepsy & Behavior. 2011; 21(4):356-63. [DOI:10.1016/j.yebeh.2011.05.013] [PMID]

[10] Gao QH, Wu CS, Wang M. The jujube (Ziziphus jujuba Mill) fruit: A review of current knowledge of fruit composition and health benefits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013; 61(14):3351-63. [DOI:10.1021/jf4007032] [PMID]

[11] Shen X, Tang Y, Yang R, Yu L, Fang T, Duan JA. The protective effect of Zizyphus jujube fruit on carbon tetrarch lorideinduced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. Journal of Ethnopharmacology. 2009; 122(3):555-60. [DOI:10.1016/j.jep.2009.01.027] [PMID]

[12] Karthishwaran K, Shamisi SO, Kurup SS, Sakkir S, Cheruth AJ. Free-radical-scavenging and antioxidant capacities with special emphasis on enzyme activities and in vitro studies in Caralluma flava N. E. Br. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2018; 32(1):156-62. [DOI:10.1080/13102818.2017.1379362]

[13] Taati M, Alirezaei M, Meshkatalsadat MH, Rasoulian B, Kheradmand A, Eamati Sh. Protective effects of Ziziphus jujuba fruit extract against ethanol-induced hippocampal oxidative stress and spatial memory impairment in rats. Journal of Medicinal Plants Research. 2011; 5(6):921-5. [doi:10.5897/JMPR.9001062]

[14] Awad DS, Ali RM, Mhaidat NM, Shotar AM. Shotar (2014) Zizyphusjujuba protects against ibuprofen-induced nephrotoxicity in rats. Pharmaceutical Biology. 2014; 52(2):182-6. [DOI:10.3109/13880209.2013.821665] [PMID]

[15] Etebari M, Zolfaghari B, Jafarian-Dehkordi A, Mirzaei A. Hydroalcoholic and polyphenolic extracts of Ziziphus jujuba mill fruits prevent methyl methanesulfonate-induced DNA damage in HepG2 cells. Pharmaceutical and Biomedical Research. 2015; 1(3):20-30. [DOI:10.18869/acadpub.pbr.1.3.20]

[16] Burden DW. Guide to the homogenization of biological samples. Random Primers. 2008; (7):1-14. https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/Homogenization%20Guide%20ver.1.pdf

[17] Aebi H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 1984; 105:121-6. [DOI:10.1016/S0076-6879(84)05016-3]

[18] Li X. Improved pyrogallol autoxidation method: A reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012; 60(25):6418-24. [DOI:10.1021/jf204970r] [PMID]

[19] Benabent M, Vilanova E, Sogorb MÁ, Estévez J. Cholinesterase assay by an efficient fixed time endpoint method. MethodsX. 2014; 1:258-63. [DOI:10.1016/j.mex.2014.10.010] [PMID] [PMCID]

[20] Khorasani Esmaeili A, Mat Taha R, Mohajer S, Banisalam B. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from in vivo and in vitro grown Trifolium pratense L. (Red Clover). BioMed Research International. 2015; 2015:643285. [DOI:10.1155/2015/643285] [PMID] [PMCID]

[21] El Guiche R, Tahrouch S, Amri O, El Mehrach K, Hatimie A. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of 30 medicinal and aromatic plants located in the South of Morocco. International Journal of New Technology and Research. 2015; 1(3):7-11. https://www.neliti.com/publications/263695/antioxidant-activity-and-total-phenolic-and-flavonoid-contents-of-30-medicinal-a

[22] Xu B, Wang Z, Li G, Li B, Lin H, Zheng R, et al. Heroin administered mice involved in oxidative stress and exogenous antioxidant alleviated withdrawal syndrome. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2006; 99(2):153-61. [DOI:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_461.x] [PMID]

[23] Hassanzadeh K, Habibi-asl B, Farajnia S, Roshangar L. Minocycline prevents morphine-induced apoptosis in rat cerebral cortex and lumbar spinal cord: A possible mechanism for attenuating morphine tolerance. Neurotoxicity Research. 2011; 19(4):649-59. [DOI:10.1007/s12640-010-9212-0] [PMID]

[24] Jin H, Li YH, Xu JS, Guo GQ, Chen DL, Bo Y. Lipoxin A4 analog attenuates morphine antinociceptive tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia, and glial reaction and cytokine expression in the spinal cord of rat. Neuroscience. 2012; 208:1-10. [DOI:10.1016/j.neuroscience.2012.02.009] [PMID]

[25] Hemnani A, Parihar MS. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. Indian Journal of Physiology and Pharmacology. 1998; 42:440-52. [PMID]

[26] Konrath EL, Neves BM, Lunardi PS, Dos Santos Passos C, Simões-Pires A, Ortega MG. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used Lycopodium species from South America on alkaloid extracts. Journal of Ethnopharmacology. 2012; 139(1):58-67. [DOI:10.1016/j.jep.2011.10.042] [PMID] https://ijpp.com/

[27] De Freitas V, Da Silva Porto P, Assuncao M, Cadete-Leite A, Andrade JP, Paula-Barbosa MM. Flavonoids from grape seeds prevent increased alcohol-induced neuronal Lipofuscin formation. Alcohol and Alcoholism. 2004; 39(4):303-11. [DOI:10.1093/alcalc/agh069] [PMID]

[28] Gonenc S, Uysal N, Acikgoz O, Kayatekin BM, Sonmez A, Kiray M. Effects of Melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats. Physiological Research. 2005; 54(3):341-8. https://europepmc.org/article/med/15588163

[29] Soliman KF, Gabriel NN. Brain cholinergic involvement in the rapid development of tolerance to the hypothermic action of ethanol. General Pharmacology. 1985; 16(2):137-40. [DOI:10.1016/0306-3623(85)90051-5]

[30] Hostettmann K, Borloz A, Urbain A, Marston A. Natural product inhibitors of Aetylcholinesterase. Current Organic Chemistry. 2006; 10(8):825-47. [DOI:10.2174/138527206776894410]

[31] Hernandez MF, Fale PL, Araujo ME, Serralheiro ML. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several Hypericum species. Food Chemistry. 2010; 120(4):1076-82. [DOI:10.1016/j.foodchem.2009.11.055]

[32] Diehl A, Nakovics H, Croissant B, Smolka MN, Batra A, Mann K. Galantamine reduces smoking in alcohol-dependent patients: A randomized, placebo-controlled trial. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2006; 44(12):614-22. [DOI:10.5414/CPP44614] [PMID]

[33] Heo HJ, Park YJ, Suh YM, Choi SJ, Kim MJ, Cho HY. Effects of oleamide on choline acetyltransferase and cognitive activities. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2003; 67(6):1284-91. [DOI:10.1271/bbb.67.1284] [PMID]

[34] Inestrosa NC, Urra S, Colombres M. Acetylcholinesterase (AChE)-amyloid-β-peptide complexes in Alzheimer's disease. The Wnt signaling pathway. Current Alzheimer Research. 2004; 1(4):249-54. [DOI:10.2174/1567205043332063] [PMID]

[35] Zhao J, Li SP, Yang FQ, Li P, Wang YT. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in Ziziphus jujuba (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. Journal of Chromatography A. 2006; 1108(2):188-94. [DOI:10.1016/j.chroma.2005.12.104] [PMID]