تحقیقی

اثر حفاظتی سیلی‌مارین بر نقص ایجاد شده در حافظه و یادگیری موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

دکتر مهرداد روغنی*[۱]، دکتر محسن خلیلی[۱]، دکتر توراندخت بلوچ نژاد مجرد[۲]، دکتر مصطفی احمدی[۳]

۱- استاد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران.

۲- استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳- پزشک عمومی.

چکیده

زمینه و هدف : *دیابت قندی در درازمدت با اختلالاتی در یادگیری، حافظه و شناخت همراه است. این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی سیلی‌مارین بر نقص ایجاد شده در حافظه و یادگیری موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۴۰ گرم انجام شد. موش‌ها به صورت تصادفی به پنج گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با سیلی‌مارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، دیابتی و دو گروه دیابتی تحت درمان با سیلی‌مارین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. سیلی‌مارین ۱۰ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین به مدت ٤ هفته (داخل صفاقی و روزانه) تجویز شد. در پایان، تأخیر اولیه (شاخص اکتساب) و تأخیر در حین عبور (شاخص نگهداری و به یادآوری) در آزمون اجتنابی غیرفعال و درصد رفتار تناوب به‌عنوان شاخص حافظه فضایی با استفاده از ماز Y تعیین گردید. همچنین میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت هیپوکامپ مغز حیوانات تعیین شد. داده‌ها با استفاده از برنامه سیگما استات نسخه ۳/۵ و آزمون‌های آماری ANOVA یک‌طرفه و دوطرفه، Tukey و کروسکال‌والیس تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها : *کاهش معنی‌دار تأخیر در حین عبور موش‌های دیابتی ($P<۰/۰۱$) و دیابتی تحت تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین ($P<۰/۰۵$) در پایان کار مشاهده گردید و این پارامتر به‌طور معنی‌دار در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای سیلی‌مارین بیشتر از گروه دیابتی بود ($P<۰/۰۵$). به‌علاوه درصد تناوب در حیوانات دیابتی به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه کنترل بود ($P<۰/۰۵$) و این پارامتر در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دیابتی نشان نداد. همچنین موش‌های دیابتی افزایش معنی‌دار در سطح بافتی مالون‌دی‌آلدئید نشان دادند ($P<۰/۰۵$) و درمان با سیلی‌مارین با دوز بالا (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) میزان مالون‌دی‌آلدئید را به صورت معنی‌دار کاهش داد ($P<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه نشان داد که هرچند تجویز دراز مدت سیلی‌مارین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر توانایی نگهداری اطلاعات در انبار حافظه و به یادآوری آنها در حیوانات دیابتی در آزمون اجتنابی غیرفعال اثر دارد؛ ولی موجب بهبود حافظه فضایی کوتاه‌مدت در حیوانات دیابتی نمی‌گردد و احتمالاً سودمند این ماده از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت هیپوکامپ اعمال می‌شود.*

کلید واژه‌ها : *سیلی‌مارین ، یادگیری ، حافظه ، دیابت قندی ، استرپتوزوتوسین ، پراکسیداسیون لیپیدی*

* نویسنده مسؤول : دکتر مهرداد روغنی ، پست الکترونیکی mehjour@yahoo.com

نشانی : تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدالله‌زاده (دهکده)، دانشکده پزشکی شاهد، گروه فیزیولوژی، صندوق پستی ۷٤۳۵-۱٤۱۵۵

تلفن ۸۸۹٦٤۷۹۲-۰۲۱داخلی ۲۳۳ ، نمابر ۸۸۹٦٦۳۱۰

وصول مقاله : ۹۰/۹/۱٦ ، اصلاح نهایی : ۹۱/٤/۲۸ ، پذیرش مقاله : ۹۱/٦/۱۱

مقدمه

بیماری دیابت قندی در زمره شایع‌ترین بیماری‌های سیستم غدددرون‌ریز بدن محسوب می‌شود (۱). بروز دیابت یکی از عوامل خطر مهم در ایجاد حالت دمانس در سنین بالا است (۲). در مورد اثرات دیابت بر سیستم اعصاب مرکزی به‌ویژه مغز از نظر ساختمانی و عملکردی (تغییرات رفتاری شامل یادگیری و حافظه) اطلاعات کمتری یافت می‌شود (۳). حالت دیابت به‌ویژه نوع یک موجب بروز اختلال در روندهای مرتبط با یادگیری، حافظه و شناخت در حیوانات مبتلا می‌گردد. یک ارتباط تنگاتنگ بین بروز دیابت قندی و ظهور نقایص در یادگیری و حافظه در موجودات آزمایشگاهی

است که برای دو فرضیه میکرووواسکولار و استرس اکسیداتیو شواهد زیاد یافت می‌شود (۴). حالت دیابت از نظر ساختمانی موجب کاهش بارز تراکم نورونی در ناحیه شکنج دندانه‌دار که نقش مهمی در روندهای حافظه فضایی و یادگیری دارد؛ می‌گردد (۲). حالت دیابت قندی همچنین موجب کاهش بیان آنزیم نیتریک‌اکسید سنتاز نورونی در ناحیه هیپوکامپ که نقش مهمی در پلاستیسیته سیناپسی و روندهای یادگیری و حافظه ایفا می‌کند؛ می‌گردد (۵و۶).

اگرچه مواد طبیعی مشتق از گیاهان دارویی طی دو دهه اخیر در درمان دیابت قندی و عوارض ناشی از آن مطرح بوده‌اند؛ ولی در مورد اثربخشی قطعی بسیاری از آنها تاکنون شواهد تحقیقاتی و معتبر یافت نمی‌شود (۷). در این خصوص سیلی‌مارین به‌عنوان مهم‌ترین ماده موثر گیاه ماریتیغال با نام علمی *Silybum marianum* است که از گروهی از عناصر به نام فلاوونو لیگنان‌ها تشکیل شده است (۸). نتایج مطالعات نشان داده اند که سیلی‌مارین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی بوده و سبب مقاومت در برابر تخلیه ذخایر گلوتاتیون شده و به هنگام آسیب پارانشیم کبد، سنتز پروتئین توسط هپاتوسیت‌ها را افزایش می‌دهد (۹و۱۰). اثربخشی آن در درمان بیماری کبد الکلی مزمن، سیروز، کبد چرب و هپاتیت‌های ویروسی با ارزیابی مارکرهای متابولیک، بالینی و بافت‌شناسی نشان داده شده است (۱۱). همچنین مطالعات نشان می‌دهند که سیلی‌مارین دارای اثرات کاهندگی کلسترول و قند خون، ضد سرطان‌زایی و تعدیل کنندگی ایمنی است (۱۴-۱۲). مطالعه بلوچ‌نژاد و همکاران نیز اثر مطلوب تجویز درازمدت سیلی‌مارین بر میزان گلوکز و چربی‌های سرم و برخی عوامل استرس اکسیداتیو در سرم موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین را نشان داده است (۱۵). اثرات سودمند تجویز سیلی‌مارین بر حافظه فضایی موش‌های حامله و دارای اختلال حافظه بر اثر مصرف الکل نیز مورد تایید قرار گرفته است (۱۶و۱۷).

این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی سیلی‌مارین بر نقص ایجاد شده در حافظه و یادگیری موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار (تهیه شده از انستیتو پاستور تهران) در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۴۰ گرم انجام شد. حیوانات در دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های ۳ تا ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. موش‌ها به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش (تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس کرج) به مدت ۶ هفته دسترسی آزادانه داشتند. در این مطالعه پروتکل‌ها و دستورالعمل‌های توصیه شده توسط انستیتو ملی بهداشت آمریکا (NIH) برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و راهکارهای عملی موجود در داخل کشور رعایت شد.

در این مطالعه از آن دسته موش‌هایی استفاده شد که در شرایط طبیعی و در حالت روزه‌داری (به مدت یک شب)، میزان گلوکز سرم آنها کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر بود. در این خصوص از شبکه رتروااوربیتال و لوله موئینه برای خونگیری استفاده شد. حجم خون اخذ شده از هر حیوان نیز حدود یک میلی‌لیتر بود. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با سیلی مارین (سیگما، آلمان) (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. سیلی‌مارین ۱۰ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین به مدت ۴ هفته (داخل صفاقی و روزانه) تجویز شد. برای حل کردن سیلی‌مارین از حلال کروموفور (سیگما، آمریکا) استفاده شد و حجم تزریق در مورد هر حیوان ۰/۳ میلی‌لیتر بود. دوز سیلی‌مارین براساس مطالعه Shaker و همکاران (۱۸) تعیین شد.

برای دیابتی نمودن موش ها، از داروی استرپتوزوتوسین (سیگما، آمریکا) به صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده شد. یک هفته پس از تزریق، برای اطمینان از دیابتی بودن حیوانات، قند ادرار به روش نوار ادراری (شرکت گلوکو یاب، تهران) کنترل شد و فقط حیوانات دیابتی با میزان قند ادرار بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر که با میزان قندخون بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر با در نظر گرفتن آستانه فیزیولوژیک ظهور قند در ادرار برابری می‌کند به مرحله بعدی برای شروع تیمار راه یافتند. البته در روزهای بعد علایم بارز دیابت نظیر پرخوری، پرنوشی، دیورز و کاهش وزن نیز در برخی موش‌ها به تدریج دیده شد.

حیوانات قبل از انجام کار و در طی هفته های ۳ و ۶ پس از بررسی با استفاده از ترازوی دیجیتال (سارتوریوس، آلمان) توزین شدند. همه موش‌ها در پایان کار کاهش وزن داشتند.همچنین اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، تهران) با استفاده از اسپکتروفتومتر (اسپکترونیک ۲۰، آمریکا) انجام شد.

آزمون رفتار اجتنابی غیرفعال (Passive avoidance test)

برای بررسی رفتار احترازی غیرفعال از یک دستگاه به ابعاد ۲۰×۸۰×۲۰ سانتی‌متر (شاتل باکس) دارای یک محفظه روشن و یک محفظه تاریک استفاده شد. میله‌های فلزی موجود در کف محفظه تاریک برای شوک دادن به پای حیوان‌استفاده شد. برای اعمال تحریک به محفظه تاریک از دستگاه استیمولاتور خاص (بهبودپرداز، تهران) استفاده گردید. بدین منظور، تک تحریکی به

شدت یک میلی‌آمپر و به مدت یک ثانیه اعمال گردید. در این تحقیق روش بررسی رفتار احترازی غیرفعال در سه مرحله سازش (Adaptation)، اکتساب (Acquisition) و نگهداری و به یادآوری اطلاعات (Retention and Recall) انجام شد و دو پارامتر تاخیر اولیه یا IL (Initial latency) و تاخیر در حین عبور یا STL (Step-through latency) اندازه‌گیری گردید. روش اجرا نیز براساس کارهای قبلی بود (۱۹).

آزمون Y-maze و اندازه‌گیری درصد تناوب (Alternation)

این آزمون در پایان کار ۳-۲ روز قبل از تست رفتار اجتنابی و براساس مطالعه قبلی انجام پذیرفت (۱۹). در این ارتباط میزان عملکرد حیوانات از نظر حافظه کاری از طریق مشاهده و اندازه‌گیری نمودن رفتار تناوب خودبخودی حیوان در یک جلسه کاری مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش مالون دی آلدئید بافت هیپوکامپ

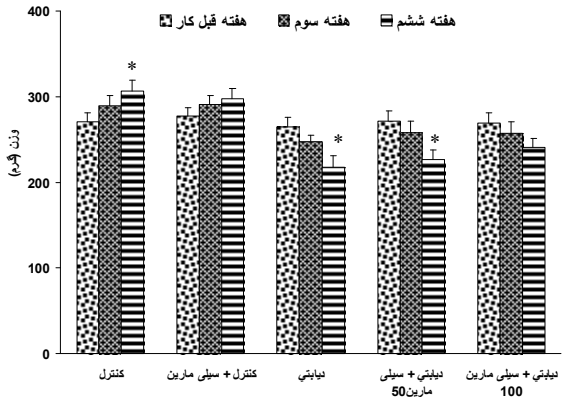
با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات بلوک هیپوکامپ مغز از حیوان جدا شده و پس از شستشو با محلول سالین سرد و خشک نمودن سریعاً توزین شده و سپس بافت به همراه بافرتریس به مدت ۲ دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه (۱۰ درصد) گردید و محلول هموژنیزه شده، سانتریفوژ شد. پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محلول جدا شده، بخش زیرین رسوب کرده دور ریخته شد و از محلول شفاف رویی برای سنجش استفاده شد. اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید براساس مطالعات قبلی انجام پذیرفت (۱۹). منحنی استاندارد براساس رقت‌های تترا اتوکسی پروپان تهیه شد و جذب‌های نوری به دست آمده از نمونه‌ها بر روی منحنی استاندارد تطبیق داده شد.

آنالیز آماری

تمام نتایج به صورت انحراف معیار و میانگین بیان شد. در مورد وزن و میزان گلوکز سرم حیوانات و پراکسیداسیون لیپیدی، برای مقایسه بین گروهی نتایج از آزمون یک طرفه ANOVA و پست‌تست توکی و مقایسه داده‌ها در زمان‌های مختلف از آزمون ANOVA با اندازه‌گیری مکرر استفاده شد. به‌علاوه از آزمون غیرپارامتریک کروسکال‌والیس برای آنالیز داده تست‌های رفتاری استفاده گردید. داده‌ها با استفاده برنامه سیگما استات نسخه ۳/۵ تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

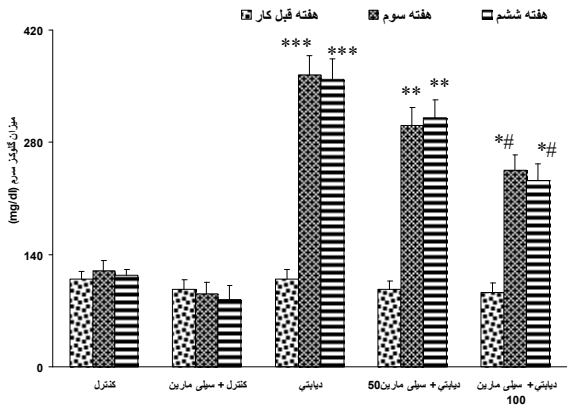
یافته‌ها

گروه کنترل تحت تیمار با سیلی‌مارین در حد کمتر از گروه کنترل دریافت کننده حلال، یک افزایش وزن (تغییر وزن از ۹/۷±۲۷۷/۶ به ۱۱/۸±۲۹۸/۱ گرم) را در پایان هفته ششم نشان دادند. در گروه دیابتی دریافت کننده حلال در هفته ششم یک کاهش معنی‌دار در مقایسه با هفته قبل بررسی (P<۰/۰۲۸) مشاهده گردید. همین وضعیت در مورد گروه دیابتی دریافت کننده سیلی‌مارین (تغییر وزن از ۱۲/۳±۲۷۱/۵ به ۱۲±۲۲۶/۴ گرم) به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز وجود داشت. از طرف دیگر، کاهش وزن (تغییر وزن از ۱۱/۸±۲۶۹/۳ به ۱۱/۲±۲۴۰/۷ گرم) در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای سیلی‌مارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه دیابتی دریافت کننده حلال (تغییر وزن از ۱۰/۲±۲۶۵/۳ به ۱۳/۷±۲۱۷/۶ گرم) در هفته ششم در حد معنی‌دار کمتر بود (P<۰/۰۳۹) (نمودار یک).



نمودار ۱ : تغییرات وزن در هفته قبل از مطالعه و هفته‌های سوم و ششم پس از تزریق در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین

**** p<۰/۰۵ : در مقایسه با هفته قبل از مطالعه در همان گروه***

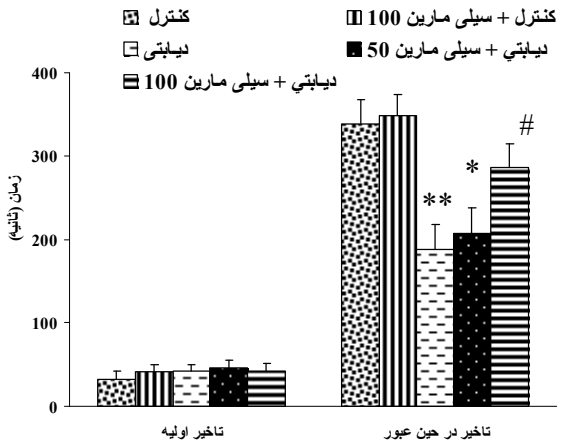


نمودار ۲ : تغییرات گلوکز سرم در هفته قبل از مطالعه و هفته‌های سوم و ششم پس از تزریق در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین

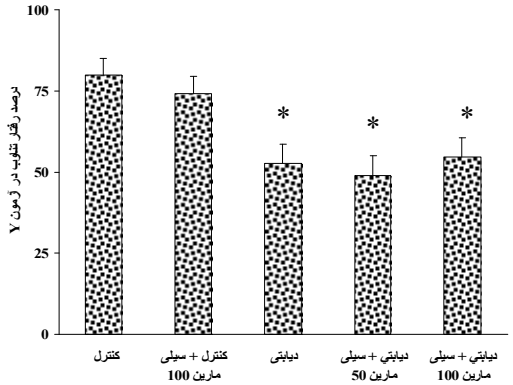
**** P<۰/۰۱ ، ** P<۰/۰۰۱ ، *** P<۰/۰۰۰۵ : در مقایسه با هفته قبل از مطالعه در همان گروه، # P<۰/۰۱ : در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده در همان هفته***

میزان گلوکز سرم در گروه دیابتی دریافت کننده حلال و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین در حد معنی‌دار (p<۰/۰۰۰۵ تا p<۰/۰۱) بیشتر از گروه کنترل بود. در گروه دیابتی

تحت درمان با دوز بالای سیلی‌مارین، میزان گلوکز سرم در هفته ششم به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه دیابتی دریافت کننده حلال بود (P<۰/۰۰۸) (نمودار ۲).

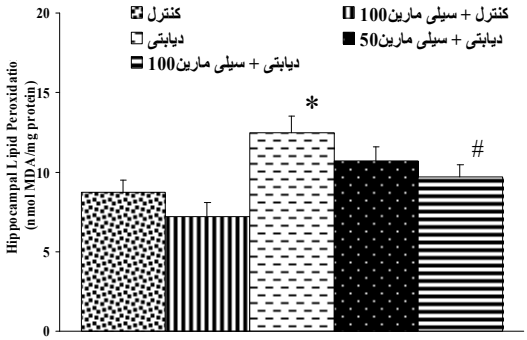


نمودار ۳ : میزان تأخیر اولیه و تأخیر در حین عبور در آزمون اجتنابی غیرفعال در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین پس از گذشت ٦ هفته
P<۰/۰۵ ، **P<۰/۰۱ : در مقایسه با گروه کنترل*
 # P<۰/۰۵ : در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده در همان هفته



نمودار ٤ : درصد تناوب در آزمون ماز Y موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین پس از گذشت ٦ هفته
*P<۰/۰۵ * : در مقایسه با گروه کنترل*

در موش‌های دیابتی دریافت‌کننده حلال و دیابتی‌های تحت تیمار با دوز پایین و دوز بالای سیلی‌مارین افزایش مختصر و غیرمعنی‌دار در مورد تأخیر اولیه در مقایسه با گروه کنترل دریافت کننده حلال به‌دست آمد. همچنین تأخیر در حین عبور که شاخصی از توانایی حیوان برای نگهداری اطلاعات در انبارهای حافظه و به‌یادآوری است؛ یک کاهش معنی‌دار در موش‌های دیابتی دریافت کننده حلال (P<۰/۰۰۷) و دیابتی تحت تیمار با دوز پایین سیلی‌مارین (P<۰/۰۲۹) نشان داد و این پارامتر در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای سیلی‌مارین در حد معنی‌دار بیشتر از گروه دیابتی دریافت کننده حلال بود (P<۰/۰۲۱) (نمودار ۳).



نمودار ۵ : میزان مالون دی آلدئید بافت هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین
*P<۰/۰۵ * : در مقایسه با گروه کنترل*
P<۰/۰۵ # : در مقایسه با گروه دیابتی

نتایج آزمون ماز Y که شاخصی از حافظه فضایی کوتاه‌مدت از نوع بازشناختی (Recognition) در جوندگانی نظیر موش صحرایی است؛ نشان داد که درصد تناوب در حیوانات گروه دیابتی دریافت کننده حلال به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه کنترل دریافت کننده حلال بوده (P<۰/۰۳۱) و درصد تناوب در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین در دو دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز عملاً تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دیابتی دریافت کننده حلال نشان نداد (نمودار ۴). به‌علاوه از نظر تعداد کل بازوی وارد شده برای هر موش در آزمون Y که شاخصی از میزان توانایی حرکتی حیوان است؛ عملاً تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها یافت نشد. هرچند در گروه‌های دیابتی تیمار نشده و دیابتی‌های تیمار شده با سیلی‌مارین این پارامتر در حد مختصر و به‌طور غیرمعنی‌دار از گروه کنترل دریافت کننده حلال کمتر بود.

با اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید در بافت هیپوکامپ مشخص شد که در گروه دیابتی دریافت کننده حلال در هفته ششم سطح مالون دی آلدئید یک افزایش قابل ملاحظه و معنی‌دار نسبت به گروه کنترل دریافت کننده حلال نشان می‌دهد (P<۰/۰۲۲) و در گروه دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین در هر دو دوز میزان افزایش مالون دی آلدئید نسبت به گروه دیابتی دریافت کننده حلال و به صورت وابسته به دوز کمتر بود. به علاوه در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای سیلی‌مارین، سطح مالون دی آلدئید در هفته ششم به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دیابتی دریافت کننده حلال بود (P<۰/۰۲۵) (نمودار ۵).

بحث

نتایج این مطالعه کاهش معنی‌دار تأخیر در حین عبور در موش‌های دیابتی و دیابتی تحت تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین را در پایان کار نشان داد و این پارامتر به‌طور معنی‌دار در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای سیلی‌مارین بیشتر

از گروه دیابتی بود. به‌علاوه درصد تناوب در حیوانات دیابتی به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه کنترل بود و این پارامتر در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دیابتی نشان نداد. همچنین موش‌های دیابتی یک افزایش معنی‌دار در سطح بافتی مالون دی آلدئید نشان دادند و درمان با سیلی‌مارین در دوز بالا (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) میزان مالون دی آلدئید را به‌طور معنی‌دار کاهش داد.

براساس یافته‌های قبلی، بروز دیابت قندی در موجودات آزمایشگاهی (نظیر موش صحرایی) و جامعه انسانی با اختلالاتی در روندهای شناختی و حافظه و یادگیری، آتروفی مغز و افزایش احتمال ابتلا به دمانس همراه است (۲۰). هرچند مکانیسم بروز این اختلالات در جامعه دیابتی به خوبی شناخته نشده؛ ولی مشخص شده است که دو ناحیه قشر مغز و هیپوکامپ که از نواحی اصلی مرتبط با این روندها محسوب می‌شوند؛ به میزان زیاد به‌دنبال دیابتی شدن تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۲۰). در این ارتباط بروز دیابت قندی موجب تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در برخی نواحی مغزی شامل هیپوکامپ شده (۲۰و۲۱) و سطح عوامل رشد شبه‌انسولین و عوامل نوروتروفیک مشتق از مغز در برخی نواحی مغز کاهش می‌یابد (۲۲و۲۳). همچنین کاهش توانایی حیوانات دیابتی در ارتباط با تثبیت و به یادآوری اطلاعات انبار شده پس از یک ماه گزارش شده است (۱۹) که همین نتیجه در بررسی حاضر نیز در هفته ششم به‌دست آمد. براساس شواهد موجود، تغییرات حاصله در این توانایی‌ها را می‌توان به تغییرات پلاستیسیته سیناپسی در ناحیه هیپوکامپ و در نتیجه ایجاد اختلال در روند تقویت درازمدت نسبت داد. البته شایان ذکر است که این تغییرات بیشتر در تثبیت اطلاعات دخالت دارند؛ ولی براساس شواهد تحقیقاتی جدید به میزان کمتر در فراگیری مهارت‌های جدید و پیچیده نیز می‌توانند دخالت داشته باشند (۲۴و۲۵).

در مطالعه حاضر تجویز دراز مدت سیلی‌مارین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب بهبود یادگیری و حافظه در آزمون اجتنابی غیرفعال گردید. در توجیه اثرات سودمند سیلی‌مارین در این تحقیق مشخص شد که بروز دیابت در موجودات آزمایشگاهی پس از گذشت چند هفته موجب افزایش فعالیت نورون‌های تولیدکننده نیتریک‌اکسید و تشدید تولید این میانجی در برخی نواحی مغز به‌ویژه هیپوکامپ می‌گردد (۲۶) و از طرف دیگر سیلی‌مارین قادر به کاهش بیان آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در برخی نواحی بدن است (۲۷) که این می‌تواند بهبود حافظه در موش‌های دیابتی در این بررسی را تا حدی موجب شده باشد. همچنین بروز دیابت قندی در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین موجب افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از تشدید تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در برخی نواحی مغز به‌خصوص در دو ناحیه هیپوکامپ و قشر مغز که خود از نواحی اصلی یادگیری و حافظه محسوب می‌گردند؛ می‌شود (۲۰) و از طرف دیگر سیلی‌مارین موجب کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و حفاظت نورون‌ها در برابر عوامل آسیب‌رسان می‌گردد (۲۸) و از این طریق می‌تواند موجب بهبودی در خصوص برخی روندها گردد. همچنین، سیلی‌مارین قادر است موجب کاهش بتااکسیداسیون اسیدهای چرب در بافت مغز گردد (۲۹). با توجه به این که تشدید اکسیداسیون چنین موادی خود می‌تواند بخشی از اختلال یادگیری و حافظه را در موش‌های دیابتی توجیه نماید؛ لذا بخشی از اثر سودمند سیلی‌مارین در دوز بالا بر یادگیری و حافظه را می‌توان به مهار اکسیداسیون اسیدهای چرب نسبت داد (۳۰و۳۱). به‌علاوه تشدید فعالیت میکروگلیا در نواحی مختلف مغز از جمله هیپوکامپ در موش‌های دیابتی مشاهده می‌شود (۳۲) که این روند می‌تواند در حضور تجویز سیلی‌مارین تخفیف یافته باشد. در این بررسی با اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید در بافت هیپوکامپ مغز که خود یکی از شاخص‌های بارز پراکسیداسیون لیپیدی در نواحی بافتی است؛ مشخص شد که با تجویز سیلی‌مارین در دوز بالا سطح این پارامتر در مغز حیوانات دیابتی کاهش می‌یابد که این خود بخشی از بهبود یادگیری و حافظه مشاهده شده در این تحقیق را توجیه می‌نماید. در این رابطه دیابت قندی با تشدید روند استرس اکسیداتیو در بافت‌های بدن همراه بوده و بخشی از تغییرات بیوشیمیایی خون در دیابت قندی به‌ویژه در دیابت وابسته به انسولین از این طریق توجیه می‌گردد (۱). لذا بخشی از اثرات سودمند این ماده را می‌توان به کاهش دادن پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو نسبت داد که این با نتایج تحقیقات قبلی در مورد اثرات این ماده هم‌خوانی دارد (۸و۲۸).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که هرچند تجویز دراز مدت سیلی‌مارین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر توانایی نگهداری اطلاعات در انبار حافظه و به یادآوری آنها در حیوانات دیابتی در آزمون اجتنابی غیرفعال اثر دارد؛ ولی موجب بهبود حافظه فضایی کوتاه‌مدت در حیوانات دیابتی نمی‌گردد و بخشی از اثرات سودمند این ماده از طریق کاهش پراکسیداسیون‌لیپیدی دربافت‌هیپوکامپ اعمال‌می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای مصطفی احمدی برای اخذ درجه دکتری عمومی در رشته پزشکی از دانشگاه شاهد بود. بدین‌وسیله به‌خاطر تصویب و حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. Med Sci Monit. 2006 Jul;12(7):RA130-47.

2. Jackson-Guilford J, Leander JD, Nisenbaum LK. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus. Neurosci Lett. 2000 Oct 27;293(2):91-4.

3. Biessels GJ, Smale S, Duis SE, Kamal A, Gispen WH. The effect of gamma-linolenic acid-alpha-lipoic acid on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. J Neurol Sci. 2001 Jan;182(2):99-106.

4. Parihar MS, Chaudhary M, Shetty R, Hemnani T. Susceptibility of hippocampus and cerebral cortex to oxidative damage in streptozotocin treated mice: prevention by extracts of Withania somnifera and Aloe vera. J Clin Neurosci. 2004 May;11(4):397-402.

5. Reagan LP, McEwen BS. Diabetes, but not stress, reduces neuronal nitric oxide synthase expression in rat hippocampus: implications for hippocampal synaptic plasticity. Neuroreport. 2002 Oct;13(14):1801-4.

6. Baydas G, Nedzvetskii VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Yoldas T. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Life Sci. 2003 Aug;73(15):1907-16.

7. Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. J Ethnopharmacol. 2000 Jul;71(1-2):23-43.

8. Toklu HZ, Tunali-Akbay T, Erkanli G, Yüksel M, Ercan F, Sener G. Silymarin, the antioxidant component of Silybum marianum, protects against burn-induced oxidative skin injury. Burns. 2007 Nov;33(7):908-16.

9. Láng I, Deák G, Nékám K, Müzes G, González-Cabello R, et al. Hepatoprotective and immunomodulatory effects of antioxidant therapy. Acta Med Hung. 1988;45(3-4):287-95.

10. Soto C, Recoba R, Barrón H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2003 Nov;136(3):205-12.

11. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (Silybum marianum) for the therapy of liver disease. Am J Gastroenterol. 1998 Feb;93(2):139-43.

12. Abascal K, Yarnell E. The many faces of Silybum marirnum. Alternat Complement Ther. 2003; 9(4): 170-5.

13. Sharma DK, Hall IH. Hypolipidemic, anti-inflammatory, and antineoplastic activity and cytotoxicity of flavonolignans isolated from Hydnocarpus wightiana seeds. J Nat Prod. 1991 Sep-Oct; 54(5):1298-302.

14. Sobolová L, Skottová N, Vecera R, Urbánek K. Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. Pharmacol Res. 2006 Feb;53(2):104-12.

15. Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Homayounfar H, Khaste Khodaie Z. [Protective effects of chronic administration of silymarin on blood glucose and lipids and oxidative stress in diabetic rats]. Koomesh. 2009; 10(2):143-50. [Article in Persian]

16. Neese S, La Grange L, Trujillo E, Romero D. The effects of ethanol and silymarin treatment during gestation on spatial working memory. BMC Complement Altern Med. 2004 Feb;4:4.

17. Reid C, Edwards J, Wang M, Manybeads Y, Mike L, Martinez N, et al. Prevention by a silymarin/phospholipid compound of ethanol-induced social learning deficits in rats. Planta Med. 1999 Jun; 65(5):421-4.

18. Shaker ME, Shiha GE, Ibrahim TM. Comparison of early treatment with low doses of nilotinib, imatinib and a clinically relevant dose of silymarin in thioacetamide-induced liver fibrosis. Eur J Pharmacol. 2011 Nov;670(2-3):593-600.

19. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Chronic epigallocatechin-3-gallate ameliorates learning and memory deficits in diabetic rats via modulation of nitric oxide and oxidative stress. Behav Brain Res. 2011 Oct;224(2):305-10.

20. Lupien SB, Bluhm EJ, Ishii DN. Systemic insulin-like growth factor-I administration prevents cognitive impairment in diabetic rats, and brain IGF regulates learning/memory in normal adult rats. J Neurosci Res. 2003 Nov;74(4):512-23.

21. Biessels GJ, ter Laak MP, Kamal A, Gispen WH. Effects of the Ca2+ antagonist nimodipine on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Brain Res. 2005 Feb;1035(1):86-93.

22. Nitta A, Murai R, Suzuki N, Ito H, Nomoto H, Katoh G, et al. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. Neurotoxicol Teratol. 2002 Sep-Oct;24(5):695-701.

23. 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 Res. 1990 Nov 5; 532(1-2):95-100.

24. Artola A, Kamal A, Ramakers GM, Biessels GJ, Gispen WH. Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long-term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus. Eur J Neurosci. 2005 Jul;22(1):169-78.

25. Sima AA, Li ZG. The effect of C-peptide on cognitive dysfunction and hippocampal apoptosis in type 1 diabetic rats. Diabetes. 2005 May;54(5):1497-505.

26. Comin D, Gazarini L, Zanoni JN, Milani H, de Oliveira RM. Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric oxide-producing neurons in the brains of diabetic rats. Behav Brain Res. 2010 Jun;210(1):38-45.

27. Cho YK, Yun JW, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, et al. Deleterious effects of silymarin on the expression of genes controlling endothelial nitric oxide synthase activity in carbon tetrachloride-treated rat livers. Life Sci. 2009 Aug;85(7-8): 281-90.

28. Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. Neurosci Lett. 2010 Aug;480(3):206-10.

29. Chtourou Y, Fetoui H, Sefi M, Trabelsi K, Barkallah M, Boudawara T, et al. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. Biometals. 2010 Dec;23(6):985-96.

30. Galhardi F, Mesquita K, Monserrat JM, Barros DM. Effect of silymarin on biochemical parameters of oxidative stress in aged and young rat brain. Food Chem Toxicol. 2009 Oct;47(10): 2655-60.

31. Vengerovskiĭ AI, Khazanov VA. [Effects of silymarin and its combination with succinic acid on brain bioenergetics in rats with experimental inhibition of beta-oxidation of fatty acids]. Eksp Klin Farmakol. 2007 Mar-Apr;70(2):51-5. [Article in Russian]

32. Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, et al. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. Eur J Neurosci. 2002 Dec;16(11):2103-12.

Original Paper

Protective effect of silymarin on learning and memory deficiency in streptozotocin-diabetic Rats

Roghani M (PhD)*[1], Khalili M (PhD)[1], Baluchnejadmojarad T (PhD)[2], Ahmadi M (MD)[3]

[1]Professor, Department of Physiology, Medicinal Plant Research Center, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran. [2]Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]General Phisician.

Abstract

Background and Objective: Diabetes mellitus cause learning, memory and cognitive skills disorders in the long term. This study was conducted to determine the protective effect of silymarin on the learning and memory deficiency in streptozotocin-diabetic rats.

Materials and Methods: This experimental study was conducted on 40 male Wistar rats weighing 240-300 grams. The rats were randomly allocated into 5 groups: control, silymarin -treated control (100 mg/kg), diabetic, and two silymarin -treated diabetic groups (50 and 100 mg/kg). Silymarin was daily administered (i.p. and daily) ten days after streptozotocin injection for 4 weeks. Finally, initial (acquisition index) and step-through latencies (retention and recall index) were measured using passive avoidance test and alternation behavior percentage as an index of spatial memory was determined using Y maze. The level of malondialdehyde in the homogenate hippocampal tissue of the animals brains was measured. Data were analyzed using Sigma Stat-3.5, one-way and two-way ANOVA, Tukey, and Kruskall-Wallis tests.

Results: A significant reduction of STL was observed in diabetic ($P<0.01$) and silymarin-treated (50mg/kg) diabetic ($P<0.05$) groups and this parameter was significantly higher in diabetic group receiving a high dose of silymarin compared to diabetic group ($P<0.05$). Meanwhile, alternation percentage in diabetic animals was significantly lower than control group ($P<0.05$) and this index did not show a significant difference in silymarin-treated diabetic groups in comparison with diabetic group. In diabetic rats, there was a significant increase in the tissue level of malondialdehyde ($P<0.05$) and silymarin treatment with dosage of (100 mg/kg) significantly reduced the level of MDA ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed that although long-term administration of silymarin at a high dose (100 mg/kg) affects the ability to store data in memory and to recall it in diabetic animals in passive avoidance test, it does not improve short-term spatial memory in diabetic animals. The beneficial effects of silymarin may be via attenuation of lipid peroxidation in hippocampus tissue.

Keywords: Silymarin, Learning, Memory, Diabetes Mellitus, Streptozotocin, Lipid peroxidation

---

*** Corresponding Author: Roghani M (PhD), E-mail: mehjour@yahoo.com**

Received 7 December 2011 **Revised** 18 July 2012 **Accepted** 1 September 2012

This paper should be cited as: Roghani M, Khalili M, Baluchnejadmojarad T, Ahmadi M. [Protective effect of silymarin on learning and memory deficiency in streptozotocin-diabetic Rats]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 15(2): 35-41. [Article in Persian]