

اثر درمان ترکیبی عصاره هیدروالکلی پسته کوهی و فلووکسامین بر حافظه فضایی موش صحرائی نر تحت استرس بی حرکتی

دکتر مهدی محمدزاده^۱، فاطمه بابائی فر*^۲، دکتر فرین بابائی^۱

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو موجب اختلال در فرایندهای مغزی مانند حافظه می‌گردد. پسته کوهی (*Pistacia atlantica kurdica*) حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان، اسیدهای اولئیک و لینولئیک است. فلووکسامین یک داروی ضدافسردگی است که با مهار بازجذب سروتونین عمل می‌کند. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره هیدروالکلی پسته کوهی و فلووکسامین بر حافظه فضایی موش‌های صحرائی نر تحت استرس بی حرکتی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار در ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل تحت استرس بی حرکتی قرار نگرفت. گروه استرس فقط تحت استرس بی حرکتی، گروه پسته کوهی تحت استرس بی حرکتی و تجویز عصاره هیدروالکلی پسته کوهی (40 mg/kg/bw)، گروه فلووکسامین تحت استرس بی حرکتی و تجویز فلووکسامین (120 mg/kg/bw) و گروه پسته کوهی توام با فلووکسامین تحت استرس بی حرکتی و تجویز عصاره هیدروالکلی پسته کوهی (40 mg/kg/bw) و فلووکسامین (120 mg/kg/bw) به صورت گاواژ قرار گرفتند. برای سنجش حافظه فضایی از آزمون ماز شعاعی استفاده شد. بعد از ۲۱ روز از شروع مداخله، حیوانات تحت بیهوشتی قرار گرفتند و بعد از خونگیری، میزان مالون‌دی‌آلدهید و کاتالاز در بافت هیپوکمپ و میزان کورتیکوسترون و گلوکوز سرم اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: استرس به‌طور معنی‌دار باعث افزایش زمان رسیدن به هدف، افزایش مالون‌دی‌آلدهید، کورتیکوسترون، گلوکوز سرم و کاهش کاتالاز در گروه استرس در مقایسه با گروه کنترل گردید ($P < 0/05$). در گروه دریافت‌کننده پسته کوهی و گروه پسته کوهی توام با فلووکسامین در مقایسه با گروه استرس زمان رسیدن به هدف، مالون‌دی‌آلدهید، کورتیکوسترون و گلوکوز سرم به‌طور معنی‌داری کاهش و کاتالاز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). در حالی که فلووکسامین در مقایسه با گروه کنترل زمان رسیدن به هدف، مالون‌دی‌آلدهید و گلوکوز سرم را به‌طور معنی‌داری افزایش و میزان کورتیزول و کاتالاز را کاهش داد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که استرس بی حرکتی باعث تضعیف حافظه و تیمار با فلووکسامین به‌عنوان داروی ضدافسردگی باعث تشدید ضعف حافظه و تیمار با عصاره هیدروالکلی پسته کوهی باعث بهبود حافظه می‌گردد.

کلید واژه‌ها: پسته کوهی، فلووکسامین، استرس بی حرکتی، حافظه فضایی، موش صحرائی

* نویسنده مسؤول: فاطمه بابائی فر، پست الکترونیکی fatemehbabaei706@yahoo.com

نشانی: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، تلفن و نمابر ۰۴۴۳-۱۹۴۲۱۷۴

وصول مقاله: ۱۳۹۵/۶/۲۳، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۲/۶، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۲/۹

مقدمه

هیپوکمپ دارای نقش کلیدی در پردازش اطلاعات فضایی است. استمرار نوروزنز در هیپوکمپ مانع از تحلیل این ناحیه تحت شرایط مختلف پاتولوژیکی و یا فیزیولوژیکی می‌شود و عملاً منجر به بهبود حافظه می‌گردد (۳). رسترنریکی از مدل‌های تجربی حیوانی است که با وارد کردن استرس‌های غیرقابل کنترل، تصور می‌شود باعث القاء رفتار افسردگی گردد (۴). در مطالعه انجام شده روی جوندگان گلو کوکورتیکوئیدها باعث تغییر تقویت سیناپسی دراز مدت در نورون‌های هیپوکمپ و تقویت حافظه می‌شوند (۵). این اثر به دلیل

استرس اکسیداتیو به دلیل عدم تعادل بین تشکیل و تخریب پرواکسیدان‌ها و کاهش مکانیسم‌های حفاظتی آنتی‌اکسیدان‌های سلولی بروز می‌کند که ممکن است منجر به افزایش آسیب سلولی، آپوپتوز و در نتیجه کاهش حافظه گردد (۱). استرس‌های مزمن فیزیکی یا روانی باعث فعال شدن محور HPA می‌شود و فعال شدن این محور باعث افزایش گلوکوکورتیکوئیدها و افزایش آنها باعث آسیب اکسیداتیو بافت مغز از جمله هیپوکمپ می‌گردد (۲)

(۱۱ و ۱۰). با توجه به این مطالعات و با استناد به طب سنتی پسته کوهی، برای این مطالعه انتخاب گردید. همچنین در این مطالعه بررسی اثر همزمان پسته کوهی و فلووکسامین انتخاب گردید تا مشخص شود آیا عصاره پسته کوهی می‌تواند از اثر تضعیفی این دارو بر حافظه جلوگیری کند یا خیر؟ با توجه به این که پیش از این مطالعه‌ای مبنی بر بررسی اثر پسته کوهی و فلووکسامین و اثر همزمان آنها بر حافظه فضایی انجام نگرفته است؛ لذا مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر عصاره هیدروالکلی پسته کوهی و داروی فلووکسامین بر حافظه فضایی در موش مبتلا به افسردگی ناشی از استرس بی‌حرکتی بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰-۱۵۰ گرم تهیه شده از خانه حیوانات دانشگاه ارومیه در دانشکده علوم دانشگاه ارومیه طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ انجام شد.

پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات رعایت شد. موش‌ها در شرایط استاندارد و با رعایت دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ درصد و با سیکل نوری ۱۲ ساعته روشنایی - تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به‌صورت آزاد در دسترس حیوانات قرار داشت.

برای القاء استرس بی‌حرکتی از محدود کننده‌های مخصوص (رسترینر) متناسب با اندازه حیوانات استفاده شد و حیوان در داخل آن قابلیت حرکت را تا حد ممکن از دست می‌داد. موش‌ها طی ۲۱ روز به مدت ۲ ساعت (ساعت ۹ تا ۱۱ صبح) روزانه داخل مهارکننده‌ها قرار گرفتند. پس از پایان استرس حیوانات به قفس‌های خود بازگردانده و بعد از نیم ساعت استراحت، گاواژ شدند (۱۲).

گروه‌بندی: حیوانات به صورت تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل: تحت استرس بی‌حرکتی قرار نگرفتند و فقط آب مقطر از طریق گاواژ دریافت نمودند.

گروه استرس: فقط تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند و هیچ دارو یا عصاره‌ای دریافت نمودند.

گروه پسته کوهی: تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند و عصاره هیدروالکلی پسته کوهی را با غلظت 400 mg/kg/bw دریافت کردند. گروه فلووکسامین: تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند و داروی فلووکسامین را با غلظت 120 mg/kg/bw دریافت کردند.

گروه پسته کوهی توام با فلووکسامین: تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند و عصاره هیدروالکلی پسته کوهی با غلظت 400 mg/kg/bw (۱۳ و ۱۴) و داروی فلووکسامین با غلظت 120 mg/kg/bw را همزمان دریافت کردند. عصاره هیدروالکلی پسته کوهی و داروی فلووکسامین روزانه در آب مقطر تازه حل گردید و با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر به هریک از موش‌ها گاواژ شد.

فعال‌سازی دو نوع از گیرنده‌های کورتیکوئیدی است که شامل گیرنده‌های مینرال کورتیکوئیدی (MRs) و گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی (GRs) است. غلظت گلوکوکورتیکوئیدها در شرایط استرس افزایش می‌یابد و به گیرنده‌های GRs متصل و باعث پاسخ سریع بدن به استرس می‌شود و نیز با ذخیره‌سازی اطلاعات (افزایش حافظه) برای پاسخ‌های آینده به استرس کمک می‌کند. گیرنده‌های مینرال کورتیکوئیدی که بیشتر در ساختار سیستم لیمبیک وجود دارند؛ در اثرات سریع فرایندهای شناختی مانند ارزیابی فرایندهای مورد نیاز در رمزگذاری محرک‌های جدید نقش دارند (۵). گیاهان دارویی و مشتقات آنها امروزه ۲۰ درصد تجویزهای دارویی در کشورهای صنعتی پیشرفته و ۸۰ درصد در کشورهای در حال توسعه را به خود اختصاص می‌دهند (۶). در طب سنتی گیاهان دارویی مختلف برای تقویت حافظه ذکر شده است. پسته کوهی (*Pistacia atlantica kurdica*) از گونه‌های وحشی پسته، میوه درخت بنه از خانواده آناکاردیاسه (*Anacardiaceae*) و دارای کاربردهای اقتصادی، زیست - محیطی و دارویی است. در مناطق خشک و نیمه‌خشک با میزان بارندگی کمتر از ۲۰۰ میلی‌متر می‌روید (۷).

علاوه بر هورمون‌ها و ترکیبات شیمیایی طبیعی، داروهای صنایع متعددی نیز بر بافت مغز و میزان حافظه اثر گذارند. برای مثال داروهای کولینرژیک اثرات مثبت روی حافظه دارند؛ در حالی که داروهای آنتی‌کولینرژیک و داروهای ضدافسردگی منجر به تضعیف حافظه می‌شوند (۸). فلووکسامین یکی از انواع داروهای ضدافسردگی است که اثرات خود را از طریق مهار ناقلین بازجذب کننده سروتونین در سلول‌های پیش‌سیناپسی مغز اعمال می‌نماید (۸). سروتونین از مهم‌ترین انتقال‌دهنده‌های پیام‌های عصبی است که توسط مغز تولید می‌شود و کاهش سطح سروتونین مغز منجر به بروز افسردگی می‌گردد. تحت شرایط اکسیداتیو، به علت آسیب سلول‌های سروتونرژیک مغز احتمال بروز افسردگی افزایش می‌یابد (۹). افسردگی و استرس یکی از مشکلات روزافزون جامعه امروز است و استفاده از داروهای ضدافسردگی می‌تواند حافظه را متأثر و آن را تضعیف نماید.

به دلیل کاربرد زیاد پسته کوهی در مناطق محلی و کم بودن تحقیقات انجام شده مرتبط با آن و با توجه به مطالعات انجام شده در اثبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی و وجود اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در پسته کوهی و بیان نقش اسیدهای چرب غیراشباع در افزایش فعالیت گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین در هیپوکمپ از طریق پروتئین کیناز C در نورون پیش‌سیناپسی و افزایش سیالیت غشاء و فعالیت گیرنده‌ها و کانال‌های عصبی منجر به تقویت حافظه و تسریع فرایند یادگیری و ترکیبات آنتی‌اکسیدان باعث حفاظت بافت مغز در برابر حملات رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیر می‌گردد

عصاره گیری: پسته کوهی جمع آوری شده از منطقه دالاهو استان کرمانشاه در مرکز تحقیقات - آموزشی کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی شناسایی (کد هرباریمی ۹۶۸۱) شد. پس از خشک کردن در سایه، به وسیله آسیاب برقی پودر گردید و ۵۰۰ گرم پودر حاصله به مدت ۴۸ ساعت در ۴ لیتر حلال هیدروالکلی (با نسبت ۱۷۰ اتانول به ۳۰ آب) خیسانده شد. سپس از طریق قیف بوخنر صاف شد و اتانول آن با دستگاه روتاری در شرایط خلأ تبخیر گردید. مایع تغلیظ شده در پلیت‌های شیشه‌ای در داخل آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کریستالیزه شود و ماده نهایی که عصاره هیدروالکلی پسته کوهی است؛ به دست آمد. از عصاره هیدروالکلی پسته کوهی با غلظت ۴۰۰ mg/kg/bw به دلیل داشتن خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی در این غلظت، برای گاوآژ حیوانات به مدت ۲۱ روز استفاده شد (۱۵).

ارزیابی حافظه با ماز شعاعی (Radial arm maize): از ماز شعاعی که از سال‌ها پیش برای سنجش حافظه فضایی در جوندگان رایج شده استفاده گردید. این دستگاه دارای ۸ بازوی کاملاً یکسان (۴۸×۱۲cm) است که به‌طور شعاعی از یک بخش دایره‌ای (به قطر ۳۲ سانتی‌متر) منشعب می‌شوند و باید حداقل ۶۰ سانتی‌متر از سطح زمین ارتفاع داشته باشد. آزمون در یک اتاق ساکت بین ساعات ۸ صبح تا ۴ بعدازظهر انجام شد. روز اول (روز آموزش) شامل آشنایی و سازگاری حیوانات با دستگاه بود. در روز آموزش غذا در بازوی مورد نظر قرار داده شد و به منظور فراهم آوردن انگیزه لازم در حیوان برای جستجو کردن غذا، مقدار غذای حیوان از ۱۲ ساعت قبل از آموزش به میزان ۸۵ درصد کاهش داده شد. وقتی حیوان غذا را پیدا کرد؛ به او اجازه داده شد که کمی غذا بخورد و سپس به قفس بازگردانده شد. در این مرحله چندین علامت قابل دید مانند عروسک، پوستر و اشیاء مختلف بر روی دیوار نصب گردید تا این علائم حیوان را برای پیدا کردن غذا کمک کند. چنانچه حیوان از قدرت یادگیری و حافظه قوی‌تری برخوردار باشد؛ به کمک علائم روی دیوارها بازوی محتوی غذا را به خاطر خواهد سپرد. بعد از یک روز استراحت، در روز سوم (مرحله آزمایش) غذا در همان بازوی معین و حیوان نیز در همان جهت که در روز آموزش قرار گرفته بود؛ قرار گرفت و ارزیابی حافظه فضایی حیوان به عمل آمد. بدین منظور فاصله زمانی از هنگام قرار دادن حیوان در مرکز ماز تا زمانی که حیوان با هر چهار پنجه خود وارد بازوی محتوی غذا شد؛ محاسبه گردید. پس از انجام هر آزمون، ماز شعاعی با محلول الکلی ۱۰ درصد تمیز شد.

سنجش‌های بیوشیمیایی و هورمونی: ۲۴ ساعت بعد از آخرین روز گاوآژ، حیوان با استفاده از اثر بیهوش و عمل خونگیری از قلب انجام گردید. بعد از عمل خونگیری نمونه‌های خونی به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس نمونه‌های سرم

جدا گردید و تا زمان انجام آزمایش در فریزر تحت دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هورمون کورتیکوسترون و میزان گلوکز سرم (میزان طبیعی ۱۰۰ mg/dl) (۱۶) با روش الایزا در سرم‌های جدا شده اندازه‌گیری گردید. همچنین بافت مغز خارج شد و برای سنجش‌های بیوشیمیایی به فریزر تحت دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید و برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید [MDA]) و فعالیت آنزیم کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت. درجه پراکسیداسیون لیپیدها بر مبنای میزان تشکیل مالون‌دی‌آلدهید به کمک ضریب جذب MDA در طول موج ۵۳۵ نانومتر محاسبه و به صورت nmol/g wet tissue بیان شد (۱۷). فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس توانایی آن در تجزیه پراکسید هیدروژن به روش Aebi تعیین گردید. تجزیه H₂O₂ با کاهش جذب در مدت ۳۰ ثانیه در طیف جذب ۲۴۰ نانومتر بررسی شد و در پایان، مقادیر بر حسب U/g wet tissue بیان گردید (۱۸).

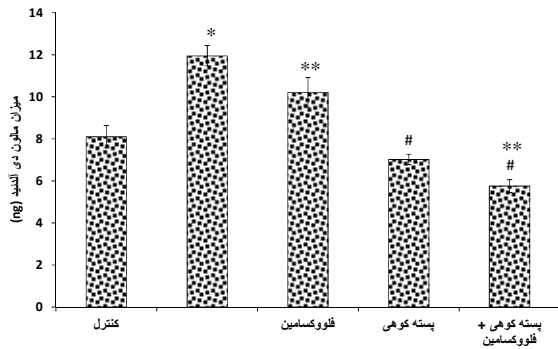
پس از بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها، نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-22 و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Tukey با ضریب اطمینان ($P < 0/05$) تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها برحسب میانگین و انحراف معیار بیان شدند و نمودارها با نرم‌افزار Excell رسم گردید.

یافته‌ها

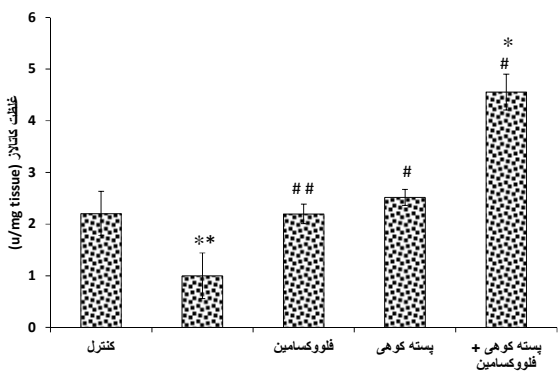
نتایج بررسی حافظه و یادگیری با استفاده از ماز شعاعی نشان داد که فاصله زمانی از هنگام قرار دادن موش در مرکز ماز تا زمان پیدا کردن غذا در گروه استرس به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0/001$). تجویز فلووکسامین به موش‌های تحت استرس بی‌حرکتی منجر به افزایش قابل توجه و معنی‌دار زمان پیدا کردن غذا در مقایسه با حیوانات گروه‌های کنترل و استرس گردید ($P < 0/001$). این در حالی است که تجویز عصاره هیدروالکلی پسته کوهی به تنهایی یا همراه با فلووکسامین فاصله زمانی افزایش یافته را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های استرس و فلووکسامین کاهش داد ($P < 0/001$) (نمودار یک).

غلظت هورمون کورتیکوسترون در حیوانات تحت استرس بی‌حرکتی (گروه استرس) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0/001$). تیمار حیوانات با فلووکسامین به تنهایی یا با عصاره هیدروالکلی پسته کوهی به تنهایی غلظت کورتیکوسترون را در حیوانات تحت استرس بی‌حرکتی به حد گروه کنترل بازگرداند. همچنین تجویز هم‌زمان فلووکسامین و عصاره هیدروالکلی پسته کوهی میانگین غلظت کورتیکوسترون در موش‌های تحت تیمار را در مقایسه با گروه استرس کاهش داد ($P < 0/001$) و آن را به حد کورتیکوسترون موش‌های گروه کنترل رساند (نمودار ۲).

فلوکسامین به تنهایی اثر معنی داری در کاهش میزان گلوکز سرم در مقایسه با گروه استرس نداشت. در حالی که تجویز پسته کوهی به تنهایی یا همراه با فلوکسامین گلوکز سرم را در حیوانات تحت استرس بی حرکتی به طور معنی داری در مقایسه با گروه استرس کاهش داد ($P < 0.001$) (نمودار ۳).

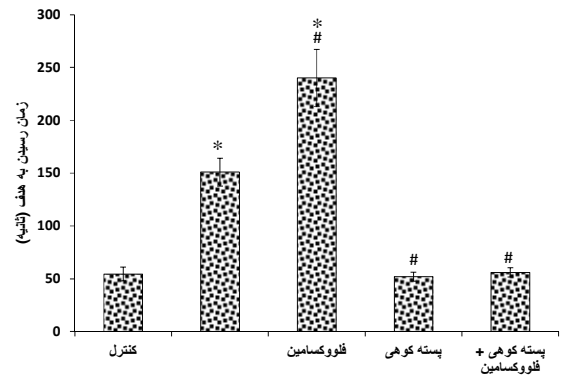


نمودار ۴: مقایسه میانگین و انحراف معیار میزان مالون دی آلدئید در گروه های تحت تیمار
* $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، ** $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل، # $P < 0.001$ در مقایسه با گروه استرس

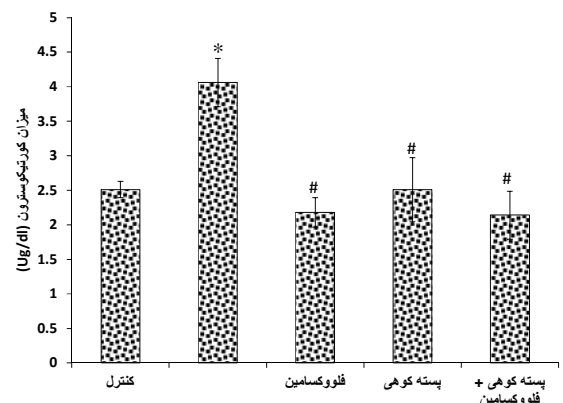


نمودار ۵: مقایسه میانگین و انحراف معیار میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بین گروه های تحت تیمار
* $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، ** $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل، # $P < 0.001$ در مقایسه با گروه استرس ## $P < 0.01$ در مقایسه با گروه استرس

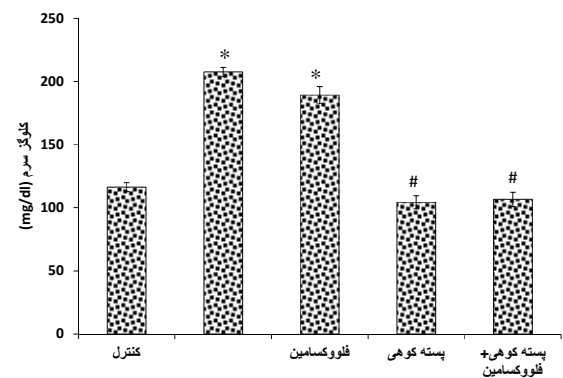
سنجش میزان مالون دی آلدئید در مغز نشان دهنده افزایش معنی دار میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه استرس در مقایسه با گروه کنترل بود ($P < 0.001$). همچنین تجویز فلوکسامین به تنهایی نیز میزان پراکسیداسیون لیپیدها را در مغز موش های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش داد ($P < 0.01$). این در حالی است که تجویز عصاره هیدروالکلی پسته کوهی میزان مالون دی آلدئید را در مقایسه با گروه استرس به طور معنی داری کاهش داد ($P < 0.001$). تجویز همزمان عصاره هیدروالکلی پسته کوهی و فلوکسامین نیز منجر به کاهش معنی دار پراکسیداسیون لیپیدها در مقایسه با گروه استرس ($P < 0.001$) و گروه کنترل ($P < 0.05$) گردید (نمودار ۴).



نمودار ۱: میانگین و انحراف معیار فاصله زمانی از هنگام قرار گرفتن حیوان در ماز تا زمان پیدا کردن غذا در گروه های تحت تیمار
* $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل # $P < 0.001$ در مقایسه با گروه استرس



نمودار ۲: مقایسه میانگین و انحراف معیار میزان هورمون کورتیکوسترون در گروه های تحت تیمار
* $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل # $P < 0.001$ در مقایسه با گروه استرس



نمودار ۳: مقایسه میانگین و انحراف معیار میزان گلوکز سرم در گروه های تحت تیمار
* $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل # $P < 0.001$ در مقایسه با گروه استرس

اندازه گیری میزان گلوکز سرم نشان داد که این شاخص در حیوانات تحت استرس بی حرکتی (گروه استرس) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است ($P < 0.001$). تجویز

غلظت آنزیم کاتالاز در مغز موش های تحت استرس بی حرکتی (گروه استرس) به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0/05$). تجویز فلووکسامین یا عصاره هیدروالکلی پسته کوهی به تنهایی منجر به افزایش غلظت کاتالاز در حیوانات تحت استرس گردید و سطح این آنزیم به حد گروه کنترل رسید. تجویز همزمان فلووکسامین و عصاره هیدروالکلی پسته کوهی میانگین غلظت کاتالاز را در مغز موش های تحت استرس بی حرکتی به طور معنی دار در مقایسه با سایر گروه ها افزایش داد ($P < 0/001$) (نمودار ۵).

بحث

در مطالعه حاضر اعمال استرس بی حرکتی به موش های صحرایی نر بالغ منجر به افزایش ترشح کورتیکوسترون و گلوکز سرم گردید. از طرفی استرس باعث کاهش قدرت آنتی اکسیدانی و افزایش پراکسیداسیون سلول های مغزی و در نهایت تضعیف قدرت یادگیری و حافظه گردید. در موش های تحت استرس عصاره هیدروالکلی پسته کوهی باعث کاهش زمان پیدا کردن غذا، کاهش میزان کورتیکوسترون، کاهش میزان گلوکز سرم، کاهش میزان مالون دی آلدئید و افزایش غلظت کاتالاز گردید. همچنین در موش های تحت استرس داروی فلووکسامین باعث افزایش زمان پیدا کردن غذا، کاهش میزان کورتیکوسترون شد؛ ولی اثر کاهشی بر گلوکز سرم نداشت و سبب افزایش میزان مالون دی آلدئید و افزایش غلظت کاتالاز گردید. تجویز همزمان پسته کوهی و فلووکسامین باعث کاهش زمان پیدا کردن غذا، کاهش میزان کورتیکوسترون، کاهش گلوکز سرم، کاهش میزان مالون دی آلدئید و افزایش غلظت کاتالاز در موش های تحت استرس گردید.

استرس بی حرکتی منجر به القاء افسردگی در حیوانات تحت آزمون می گردد و مکانیسم این فرایند می تواند ناشی از بهم ریختگی سیستم آنتی اکسیدانی بدن و به دنبال آن آسیب سلول های منوآمینرژیک مغز باشد. در حالی که تعادل منوآمین های مغز برای جلوگیری از افسردگی ضروری است (۱۹ و ۲۰). استرس های فیزیکی یا روانی می توانند سطوح هورمون کورتیکوسترون را در موش های تحت بررسی افزایش دهند. افزایش این هورمون، افزایش گلیکوژنولیز و گلوکونئوزنز را در سلول ها به دنبال دارد و در نتیجه سطوح گلوکز سرم نیز افزایش می یابد (۱۹). به این ترتیب نتایج حاصل از این مطالعه مبنی بر کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی مغز و افزایش سطوح کورتیکوسترون و گلوکز سرم در موش های گروه استرس (تحت استرس) هم راستا با نتایج مطالعه Pawar و Hugar بود (۱۹). اگرچه کورتیکوئیدها در کوتاه مدت قادر به تنظیم فعالیت های نورونی هیپو کمپ و تقویت حافظه هستند (۵ و ۴)؛ اما احتمال دارد در بلندمدت به واسطه افزایش گلوکز سرم و تشدید شرایط پراکسیداسیونی در سلول های عصبی، اثرات مخرب بر بافت

هیپو کمپ و در نتیجه بر قدرت یادگیری و حافظه داشته باشند. همچنان که در این بررسی مشاهده گردید اعمال استرس مزمن، علاوه بر افزایش ترشح کورتیکوسترون، توان یادگیری و حافظه را در حیوانات مورد مطالعه کاهش داد. پیش از این موسوی و همکاران اختلال در یادگیری و حافظه را در حیوانات متاثر از استرس نشان داده اند (۲۰) که مویده یافته های مطالعه حاضر است. همچنین استرس باعث کاهش نورونز و افزایش تخریب سلول ها در هیپو کمپ می شود (۲۳-۲۱). در مطالعه کنونی همزمان با القاء استرس و افسردگی در حیوانات، داروی ضد افسردگی فلووکسامین تجویز گردید. نتایج حاصل بیانگر اثرات کاهشی این دارو بر توان یادگیری و حافظه و تاثیر نسبی این دارو بر توان آنتی اکسیدانی مغز بود. به نحوی که منجر به افزایش غلظت کاتالاز گردید. اما از سوی دیگر اثر معنی داری بر کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها نداشت. به این ترتیب فلووکسامین (ضد افسردگی SSRI) با مهار بازجذب سروتونین مانع از تشدید افسردگی در مبتلایان می شود؛ اما به طور توانمند قادر به کاهش تخریب سلول های مغزی ناشی از القاء استرس نیست. پیش از این مطالعه ای مبنی بر اثر فلووکسامین بر حافظه انجام نشده است. احتمال می رود اثر کاهشی فلووکسامین بر حافظه ناشی از ناتوانی آن در پیشگیری از شرایط پراکسیداسیونی مغز به خصوص در ناحیه هیپو کمپ به عنوان مرکز حافظه باشد. تیمار حیوانات تحت استرس بی حرکتی با عصاره هیدروالکلی پسته کوهی مبین تقویت حافظه در مقایسه با گروه استرس بود. یافته های بیوشیمیایی نشان دادند که عصاره هیدروالکلی پسته کوهی ظرفیت آنتی اکسیدانی مغز را در حیوانات تحت استرس به طور معنی داری بهبود بخشیده است. لذا احتمال دارد پسته کوهی از طریق ممانعت از تخریب سلول های مغز و به خصوص هیپو کمپ از کاهش حافظه در حیوانات تحت استرس جلوگیری کند. پیش از این مطالعه ای مبنی بر اثر پسته کوهی بر حافظه فضایی حیوانات تحت استرس اعم از استرس فیزیکی یا روانی انجام نگرفته است و در این مطالعه برای اولین بار اثرات بهبودبخش پسته کوهی بر قدرت یادگیری و حافظه نشان داده شد. استرس اکسیداتیو با افزایش تولید رادیکال های فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون بیومولکول ها نقش مهمی در بروز بیماری های نورودژنراتیو مانند افسردگی و تضعیف حافظه ایفا می کنند. ترکیبات آنتی اکسیدان نقش محافظتی مهمی در برابر رادیکال های فعال اکسیژن دارند. همچنین این ترکیبات با افزایش تولید میانجی عصبی نیتریک اکساید و با افزایش آزادسازی دوپامین و استیل کولین در تقویت حافظه نیز نقش دارند (۲۴). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در پسته کوهی بیان کننده فعالیت آنتی اکسیدانی این گیاه است. فلاونوئیدها نقش مستقیمی در پاک سازی ROS و بهبود فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بدن دارند (۲۳ و ۲۵ و ۲۶). به این ترتیب احتمالاً پسته کوهی به واسطه

گلو کو کورتیکوئیدی منجر به کاهش گلوکز سرم گردد. بنابراین افت غلظت گلوکز سرم در گروه تحت درمان با پسته کوهی و همزمان با فلوو کسامین قابل توجه است. احتمالاً پسته کوهی از طریق مکانیسم‌های دیگری نیز علاوه بر کاهش گلوکز کورتیکوئیدها بر میزان کاهش گلوکز سرم موثر است. پیش از این نشان داده شده تجویز عصاره پسته کوهی می‌تواند میزان گلوکز سرم را به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد. احتمالاً کاهش گلوکز سرم در مصرف همزمان پسته کوهی و فلوو کسامین به دلیل مکانیسم‌های احتمالی پسته کوهی است (۲۷). در مطالعه حاضر، داروی فلوو کسامین اثر معنی‌داری بر کاهش میزان گلوکز سرم نداشت. احتمالاً فلوو کسامین بر مکانیسم‌های باز جذب گلوکز اثر چندانی نداشته است که این یافته هم راستا با نتایج مطالعه حاضر است؛ اما تاکنون اثرات کاهش‌دهنده پسته کوهی بر میزان ترشح کورتیکوسترون نشان داده نشده بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که القاء استرس ناشی از بی‌حرکتی در موش‌های صحرایی منجر به تضعیف سیستم یادگیری و حافظه می‌گردد. علی‌رغم آن که فلوو کسامین منجر به کاهش عوارض افسردگی در مبتلایان می‌گردد؛ اما عوارض جانبی مانند کاهش شدید حافظه را به دنبال دارد. استفاده از گیاهان از جمله پسته کوهی می‌تواند علاوه بر تعدیل شرایط آنتی‌اکسیدانی و هورمونی بدن، تضعیف حافظه ناشی از مصرف داروهای شیمیایی را در موش‌های صحرایی کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم فاطمه بابائی فر (شماره ۳۶-۲ ع) برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشکده علوم دانشگاه ارومیه و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به انجام رسید. بدین وسیله از همه همکاران گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, Bégin M, Féart C, Barberger-Gateau P. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res.* 2009 Sep; 48(5): 239-56. doi: 10.1016/j.plipres.2009.04.001
- Ghadroost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, et al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011 Sep; 667(1-3): 222-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.012
- Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian A. [Effect of royal jelly on improving passive avoidance learning and spatial learning and memory in rats]. *J Shahid Sadoughi Univer of Med Scien.* 2012; 20(2): 211-19. [Article in Persian]
- Poleszak E, Wla P, Kedzierska E, Nieoczym D, Wyska E, Szymura-Oleksiak J, et al. Immobility stress induces

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خود از نورودژنراسیون هیپوکمپ و در نتیجه از تضعیف حافظه جلوگیری کرده است. همچنین در مطالعه حاضر اثرات تجویز همزمان عصاره هیدروالکلی پسته کوهی با داروی ضدافسردگی فلوو کسامین بر حافظه فضایی موش‌های تحت استرس فیزیکی بررسی گردید. نتایج نشان داد علی‌رغم آنکه فلوو کسامین به تنهایی منجر به تضعیف شدید حافظه شده است؛ اما مصرف همزمان آن با عصاره هیدروالکلی پسته کوهی از بروز چنین اثراتی جلوگیری نمود. بر اساس یافته‌های بیوشیمیایی حاضر، تجویز همزمان این دو ماده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز را به میزان قابل توجهی افزایش داد. به نظر می‌رسد که مصرف همزمان فلوو کسامین و پسته کوهی اثرات سینرژیستی بر غلظت کاتالاز مغز دارند. همچنین فلوو کسامین به تنهایی اثری بر کاهش سطوح مالون دی‌آلدئید نداشت؛ اما با همراهی پسته کوهی این شاخص به‌طور کاملاً معنی‌داری کاهش یافت. لذا بهبود حافظه فضایی در اثر تجویز همزمان فلوو کسامین و پسته کوهی منطقی به نظر می‌رسد. همانطور که در مقدمه ذکر گردید به دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع و ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در پسته کوهی باعث افزایش سیالیته غشاء، فعالیت گیرنده‌ها و کانال‌های عصبی و جلوگیری از تخریب بافت مغز در برابر استرس اکسیداتیو منجر به بهبود حافظه گردید و احتمالاً به‌واسطه همین مکانیسم‌ها از اثرات تضعیفی داروی فلوو کسامین بر حافظه جلوگیری نموده است (۱۰ و ۱۱). در خصوص تغییرات هورمون کورتیکوسترون می‌توان گفت اساساً تحت شرایط استرس، میزان ترشح گلو کو کورتیکوئیدها افزایش می‌یابد. بنابراین انتظار می‌رود داروهای کاهش‌دهنده استرس، میزان ترشح کورتیکوسترون را در حیوانات تحت استرس بی‌حرکتی کاهش دهد و آن را تعدیل نماید. چنین نتیجه‌ای در مطالعه حاضر در گروه دریافت‌کننده پسته کوهی به‌تنهایی و یا گروه دریافت‌کننده فلوو کسامین و پسته کوهی به‌طور همزمان مشاهده شد؛ اما در گروه تحت تیمار با داروی فلوو کسامین افت گلوکز سرم مشاهده نگردید. از دیدگاه فیزیولوژیکی، طبیعی است که کاهش هورمون‌های

depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. *Pharmacol Rep.* 2006 Sep-Oct; 58(5): 746-52.

5. Van Ast VA, Cornelisses S, Marin MF, Ackermann S, Garfinkel S, Abercrombie HC. Modulatory mechanisms of cortisol effects on emotional learning and memory: Novel perspectives. *Psychoneuroendocrinology.* 2013 Sep; 38(9): 1874-82. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.06.012

6. Ameri F, Vahabi MR, Khatoun Abadi A, Andalibi L. [On the relevance of medicinal plants consumers in Iran: investigating statistics for consumers, states of consumption, informative and source area]. *Teb va Tazkieh.* 2013; 22(3): 37-42. [Article in Persian]

7. Ben Hamed S, Lefi E. Dynamics of growth and phytomass allocation in seedlings of *Pistacia atlantica* desf versus *Pistacia vera* L under salt stress. *International Journal of Agronomy and*

- Agricultural Research. 2015; 6(1): 16-27.
8. Yamauchi M, Miyara T, Matsushima T, Imanishi T. Desensitization of 5-HT_{2A} receptor function by chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res.* 2006 Jan; 1067(1): 164-9. doi:10.1016/j.brainres.2005.10.075
 9. Hashemi S S, Jelodar G A, Rafati A. [Investigating the effects of Fluoxetine on Cortisol and thyroid hormone levels in rats]. *J Arak Univ Med Sci.* 2014; 17(2): 82-89. [Article in Persian]
 10. Tamadonfard Z, Sepehrara L, Johari H. [The effect of nigella sativa extract on learning and spatial memory of adult male rats]. *Pars Journal of Medical Sciences.* 2014; 12(1): 29-37. [Article in Persian]
 11. Rashidi S, Askari N, Abbasnejad M. Anxiolytic-like effect of Pistacia atlantica fruit in intact and gonadectomized rats subjected to chronic stress. *J Occu Health Epidemiol.* 2014; 3(3): 152-59.
 12. Mozafar A, Keshavarz M, Zareian P, Johary H, Kargarjahromi H, Hoseini S. [The effect of immobilization stress on the HPG axis (hypothalamic-pituitary-gonad) hormones and the number of spermatogonia]. *J Fasa Uni Med Sci.* 2013; 3(3): 280-84. [Article in Persian]
 13. Bahrebar M, Mirzaei A, Mantegheyan E, Bahrebar A. [In vivo and in vitro antioxidant activity of hydro-alcoholic extract of Pistacia Atlantica]. *Armaghane Danesh.* 2013; 17(6): 540-51. [Article in Persian]
 14. Mokhtari M, Shariatie M, Tavakoli F. [Effect of fluvoxamine on concentration of testosterone, FSH, LH and histological changes in testis in adult male rat]. *Feyz.* 2007; 10(4): 31-36. [Article in Persian]
 15. Hosseini M, Shemshaki A, Saghebjoo M, Gharari Arefi R. [Effect of aerobic training and Pistacia atlantica extract consumption on plasma levels of lipocalin-2 and insulin resistance index in Streptozotocin-induced diabetic rats]. *Horizon Med Sci.* 2016; 22(1): 27-33. [Article in Persian]
 16. Braslasu ED, Bradatan C, Cornila M, Savulescu I, Cojmaleata R, Braslasu MC. Normal blood glucose in white wistar rat and its changes following anesthesia. *Lucari Stiintifice Medicina Veterinara.* 2007; 40: 120-23.
 17. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-21.
 18. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-26.
 19. Pawar VS, Hugar S. Adaptogenic activity of Trigonella foenumgraecum (Linn) seeds in rodents exposed to anoxia and immobilization stress. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2(1): S208-S211. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60161-0
 20. Moosavi M, Naghdi N, Maghsoudi N, Zahedi Asl S. Insulin protects against stress-induced impairments in water maze performance. *Behav Brain Res.* 2007 Jan; 176(2): 230-36. doi: 10.1016/j.bbr.2006.10.011
 21. LI SQ, SU ZH, PENG JB, ZOU ZM, YU CY. In vitro and in vivo antioxidant effects and the possible relationship between the antidepressant efficacy of traditional chinese medicine formulation chaihu Shugan San. *Chin J Nat Med.* 2010; 8(5): 353-61. https://doi.org/10.1016/S1875-5364(10)60042-8
 22. Abdel-Salam OME, Morsy SMY, Sleem AA. The effect of different antidepressant drugs of oxidative stress after lipopolysaccharide administration in mice. *EXCLI Journal.* 2011; 10: 290-302. http://dx.doi.org/10.17877/DE290R-5131
 23. Afshari M, Farokhi F, Ebrahimi S, Larti B. [Histopathological study of the hippocampal neurons in male rats treated with citalopram and aqueous extract of saffron]. *J Rafsanjan Univ Med Sci.* 2013; 12(1): 27-34. [Article in Persian]
 24. Rahimi Asl F, Farbood Y, Sarkaki AR, Hosseini SE. [Effect of gallic acid on passive avoidance memory under brain ischemia conditions in mature female rats]. *Horizon of Medical Sciences.* 2014; 20(1): 23-27. [Article in Persian]
 25. Ghasemloo E, Rahnema M, Bigdeli M. [Brain edema and neurologic deficits in rat stroke model: the effect of hydroalcoholic extract of Salvia officinalis]. *J Fasa Univ Med Sci.* 2015; 5(3): 378-86. [Article in Persian]
 26. Hatamnia AA, Abbaspour N, Darvishzadeh R. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (Pistacia atlantica subsp. kurdica) fruits. *Food Chem.* 2014 Feb; 145: 306-11. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.031
 27. Hamdan II, Afifi FU. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2004 Jul; 93(1): 117-21.

Original Paper

Combination therapy of hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica kurdica* and fluvoxamine on spatial memory of immobilization rat

Mohammadzadeh M (Ph.D)¹, Babaeifar F (B.Sc)^{*2}, Babaei F (Ph.D)¹

¹Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

²M.Sc Student in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Background and Objective: Oxidative stress causes disorder in the brain processes including memory. *Pistacia atlantica kurdica* (pistachio) contains antioxidant compounds, oleic and linoleic acid. Fluvoxamine is an antidepressant medicine which inhibits serotonin reuptake. This study was done to determine the effect of hydroalcoholic extract of pistachio and fluvoxamine on spatial memory of male rats under immobilization stress.

Methods: This experimental study was done on 30 adult male Wistar rats in 5 groups (n=6). The control group was not under immobilization stress. Animals in the stress group were just under immobilization stress. Animals in the pistachio group were under immobilization stress and were received 400 mg/kg/bw hydroalcoholic extract of pistachio. Animals in the fluvoxamine group under immobilization stress were received 120 mg/kg/bw fluvoxamine. Animals under immobilization stress, in the pistachio plus fluvoxamine group were received 400 mg/kg/bw hydroalcoholic extract of pistachio and fluvoxamine 120 mg/kg/bw. The radial arm maze test was used for evaluation of spatial memory. After the animals' decapitation, the malondialdehyde and catalase level in hippocampus and the serum level of corticosterone and blood glucose were measured.

Results: The stress significantly increased the time of reaching to target, malondialdehyde, corticosterone and blood glucose level, and reduced the catalase in stress group in comparison with controls (P<0.05). In the pistachio and the pistachio+fluvoxamine treated groups, the time of reaching to target, malondialdehyde, corticosterone and blood glucose level significantly reduced and the catalase level significantly increased in comparison with stress group (P<0.05) but fluvoxamine significantly increased the time of reaching to target, malondialdehyde and blood glucose, and reduced the corticosterone and catalase in compared to controls (P<0.05).

Conclusion: The immobilization stress led to attenuation of spatial memory and the fluvoxamine administration as an antidepressant drug caused to deterioration of memory, while the treatment with pistachio extract lead to improve the memory.

Keywords: *Pistacia atlantica kurdica*, Fluvoxamine, Immobilization stress, Spatial memory, Rat

* Corresponding Author: Babaeifar F (B.Sc), E-mail: fatemehbabaei706@yahoo.com

Received 13 Sep 2016

Revised 26 Apr 2017

Accepted 29 Apr 2017