تحقیقی

اثر عصاره دانه انگور بر بهبود اختلالات حافظه و یادگیری ناشی از تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین در موش صحرایی

دکتر یعقوب فربود*[۱]، دکتر علیرضا سرکاکی[۲]، دکتر مهرداد شهرانی کرانی[۳]، مریم سعادت فرد[٤]

۱- استادیار، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی؛ دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران. ۲- استاد، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران. ۳- استادیار، مراکز تحقیقات گیاهان دارویی و سلولی- مولکولی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
٤- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *آلزایمر یک بیماری مرتبط با سن است و با دمانس و کاهش نورون‌ها در مغز مشخص می‌شود. استرس اکسیداتیو مغز نقش مهمی در پیری و اختلالات نورودژنراتیو دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره دانه انگور بر بهبود اختلالات حافظه و یادگیری ناشی از تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین (STZ) در موش صحرایی نر انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه تجربی ۸۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۱٦ تایی کنترل، شم، دریافت کننده STZ، دریافت کننده عصاره دانه انگور (۱۰۰ mg/kg، ۳۰ روز، گاواژ) به‌علاوه STZ و دریافت کننده STZ به‌علاوه عصاره دانه انگور تقسیم شدند. حافظه حیوانات به‌وسیله تست‌های ماز آبی موریس، شاتل باکس و ماز T ارزیابی شد.*

یافته‌ها : *تزریق STZ به‌صورت داخل بطنی موجب تخریب حافظه حیوانات در تمامی تست‌ها گردید. تجویز عصاره دانه انگور قبل و بعد از تجویز داخل بطنی STZ زمان رسیدن به سکوی مخفی در تست ماز آبی موریس را نسبت به گروه آلزایمری کاهش داد (P<۰/۰۵). همچنین زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک در تست حافظه اجتنابی غیرفعال نسبت به گروه آلزایمری افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). به‌علاوه درصد انتخاب بازوی صحیح در تست ماز T در حیوانات دریافت کننده عصاره دانه انگور قبل و بعد از تجویز STZ ، نسبت به گروه آلزایمری افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *عصاره دانه انگور اثر مهمی در پیشگیری و بهبود اختلال حافظه ناشی از تزریق داخل بطنی STZ دارد.*

کلید واژه‌ها : *بیماری آلزایمر ، عصاره دانه انگور ، استرپتوزوتوسین ، موش صحرایی*

* نویسنده مسؤول : دکتر یعقوب فربود ، پست الکترونیکی farbood_y@yahoo.com

نشانی : اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، کدپستی ۱۵۷۹٤-٦۱۳۵۷، تلفن و نمابر ۳۳۷۳۸۲٦۸-۰٦۱

وصول مقاله : ۱۳۹۳/۱۲/۱٦ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٤/۳/۱٦ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/٤/٦

مقدمه

بیماری آلزایمر یک بیماری مرتبط با سن است که با دمانس و کاهش نورون‌ها در مغز مشخص می‌شود و از نوع تحلیل برنده نورون‌ها است که با اختلال عصبی - رفتاری همراه می‌شود (۱و۲). آلزایمر با اختلال و ضعف پیشرونده در حافظه و شناخت مشخص می‌شود. پیشنهاد شده است که تجمع خارج سلولی اولیگومرهای بتاآمیلوئید که مولکول‌های محلول با وزن بالا هستند؛ مسؤول بیماری آلزایمر و کاهش حافظه هستند (۳). دمانس یک سندرم ناتوان کننده پیشرونده است که بر حافظه فرد اثر می‌گذارد. بیماری آلزایمر شایع‌ترین علت دمانس است (۴). بیماری آلزایمر یک بیماری نورودژنراتیو پیشرونده هست که قشر و هیپوکامپ افراد مبتلا را درگیر می‌نماید. اگرچه جزئیات دقیق آن مشخص نیست؛ ولی مجموعه پیچیده‌ای از عوامل ژنتیکی، محیطی و پیری در ایجاد آن دخالت دارند (۵). استرس اکسیداتیو هنگامی رخ می‌دهد که بین تولید و از بین رفتن رادیکال‌های آزاد از گونه‌های اکسیژن عدم تعادل وجود داشته باشد. این گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله بیماری‌های نورودژنراتیو نقش دارند (۶و۷). استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیری و اختلالات نورو دژنراتیو دارد. تغییرات پروتئینی یکی از پیامدهای مهم استرس اکسیداتیو است (۸). اگرچه عامل اصلی دخیل در بیماری آلزایمر ناشناخته است؛ اما شواهد فراوانی وجود دارند که از فرضیه آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد و نقش توسعه بیماری آلزایمر

حمایت می‌نمایند (۹). استرس اکسیداتیو منجر به اختلال عملکرد نورونی و مرگ سلولی می‌شود (۷).

پلی‌فنول‌های طبیعی مشتق شده از GSE می‌توانند به‌طور معنی‌داری باعث مهار تجمع پروتئین A-beta با الیگومرهایی با وزن مولکولی بالا در شرایط in vitro شوند. محققین نشان دادند که پلی‌فنول‌های مشتق شده از GSE ممکن است عوامل مفیدی برای پیشگیری یا درمان بیماری آلزایمر باشند (۳). ۷۰- ۶۰درصد پلی‌فنول‌های موجود در انگور در دانه انگور است (۱۰). پلی‌فنول‌های دانه انگور از لحاظ ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان و بهبوددهنده سلامتی به‌خوبی شناخته شده‌اند (۱۱). دانه‌های انگور حاوی پلی‌فنول‌هایی شامل کاتچین، اپی‌کاتچین، پروآنتوسیانیدین‌ها، پروسیانیدها و نیز اسیدهای فنولی نظیر اسیدگالیک و اسید الاژیک هستند. پلی‌فنول‌های دانه موجود در انگور دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال، ضدسرطان، ضدالتهابی و جاروب‌کنندگی قوی رادیکال‌های آزاد هستند (۱۲و۱۳). دانه انگور همچنین حاوی آلفا، بتا و گاما توکوفرول و همچنین آلفا و بتا توکوترینول‌ها است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند (۱۴).

عصاره هسته انگور (GSE) دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و موجب کاهش رادیکال‌های آزادی می‌شود که خود سبب اکسیداسیون پروتئین‌ها در موش‌های پیر می‌گردند. این عصاره در مقابل انواع اکسیژن‌های فعال در سیستم اعصاب مرکزی نقش حفاظتی دارد (۸). GSE یک مکمل غذایی رایج در دسترس است که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و این خاصیت مربوط به ترکیب Proanthocyanidin است. GSE دارای فعالیت حفاظتی نورون‌ها از طریق اثرگذاری بر پروتئین‌های خاص است (۱۵). GSE حاوی تعدادی از پلی‌فنول‌ها شامل پروسیانیدین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها بوده و جاروب کننده قوی رادیکال آزاد است (۱۶).

با توجه به این که بیماری آلزایمر یک بیماری نورودژنراتیو است و استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد آن دارد و STZ هم ماده‌ای است که از طریق ایجاد اختلالات متابولیکی و در نتیجه ایجاد استرس اکسیداتیو متعاقب آن باعث القای این بیماری می‌گردد؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره دانه انگور بر بهبود اختلالات حافظه و یادگیری ناشی از تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین (STZ) در موش صحرایی نر انجام شد.

روش بررسی

حیوانات: در این مطالعه تجربی حیوانات به صورت تصادفی از بین موش‌های صحرایی مرکز تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه جندی شاپور اهواز انتخاب شدند. در این مطالعه از ۸۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. تمامی حیوانات در مدت قبل و طی مدت انجام آزمایشات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (دمای ۱±۲۲ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد، دوره ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی و دسترسی آسان به آب لوله‌کشی شهر و غذای استاندارد مخصوص کافی) نگهداری شدند. پس از سپری نمودن دوره زمانی انطباق با شرایط محیطی آزمایشگاه و انجام مطالعات پایلوت و محاسبه پارامترهای موردنظر براساس رفرنس‌های موجود برای هر گروه تعداد ۱۶ سر انتخاب گردید و به ۵ گروه اصلی زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل : موش‌هایی که کاملاً سالم بودند.

گروه Sham : موش‌های صحرایی که به آنها حلال STZ (نرمال سالین) به صورت داخل بطنی تزریق شد.

گروه AD : موش‌های صحرایی که به‌وسیله تزریق داخل بطنی STZ به دمانس دچار شدند و به‌مدت یک‌ماه سرم فیزیولوژی را به‌عنوان حلال دریافت نمودند.

گروه AD+GSE : موش‌های صحرایی که با تجویز STZ مبتلا به دمانس شدند و GSE برای درمان دریافت کردند.

گروه GSE+AD : موش‌های صحرایی که به صورت پروفیلاکسی به آنها GSE گاواژ شد و یک‌ماه بعد با تزریق داخل بطنی STZ به دمانس مبتلا شدند.

هر گروه اصلی به دو زیر گروه ۸ تایی تقسیم شد و یک زیرگروه برای تست ماز آبی موریس و زیر گروه دیگر برای تست‌های شاتل باکس و ماز T استفاده شدند.

ملاحظات اخلاقی: در این مطالعه برای رعایت ملاحظات اخلاقی سعی شد از کمترین تعداد نمونه قابل قبول استفاده شود و تمام روش‌های استفاده شده بر طبق روش‌های علمی استاندارد بود. همچنین تمامی اعمال جراحی تحت بیهوشی کامل انجام شد.

روش جراحی: ابتدا موش‌های صحرایی توزین و سپس با تزریق داخل صفاقی کتامین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زیلازین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس حیوان در دستگاه استرئوتاکس قرار گرفت و توسط قطعه دهانی و میله‌های داخل گوشی بر روی میز جراحی ثابت شدند. موهای سر حیوان تراشیده و محل جراحی به‌وسیله الکل ضدعفونی شد. سپس به‌وسیله کوتر جراحی یک برش طولی از میان دو چشم تا میان گوش‌ها ایجاد گردید. بافت‌های پیوندی روی جمجمه به‌وسیله پنبه آغشته به آب اکسیژنه رقیق زدوده شد و نقاط برگما و لامبدا آشکار گردید. پس از همسان‌سازی، ارتفاع نقاط برگما و لامبدا، نشاگر دستگاه بر روی برگما تنظیم شد. در ادامه با توجه به مختصات استخراج شده از اطلس Paxinos و Watson (۱۷) مختصات استرئوتاکسیک بطن‌های جانبی راست و چپ (AP=0.8, ML=±1.5, DV=3.5) بر روی جمجمه علامت‌گذاری شد و جمجمه توسط دریل دندانپزشکی

سوراخ شد. سپس کانول راهنما درون جمجمه قرار داده شد و توسط دو پیچ کوچک در جمجمه (برای فیکس نمودن کانول در استخوان جمجمه و جلوگیری از کنده شدن) کاشته شد و به‌وسیله آکریل دندانپزشکی در محل خود محکم شد. بعد از خشک شدن و محکم شدن آکریل دندانپزشکی حیوانات از دستگاه استرئوتاکس خارج شدند و به محل گرمی منتقل و پس به‌هوش آمدن تا بهبودی کامل و آماده شدن برای دریافت عصاره در قفس‌های انفرادی نگهداری شدند (۱۸و۱۹).

تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوسین: برای ایجاد دمانس تجربی در موش سوری از استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت تزریق داخل بطن جانبی (ICV) استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر داروی STZ با دوز ۱/۵ mg/kg که در نرمال سالین حل شده بود؛ یک بار در بطن جانبی هر نیمکره مغز موش تزریق شد. برای تزریق STZ از سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری و سرسوزن شماره۲۶ یا ۲۸ استفاده شد (۱۸).

گاواژ عصاره دانه انگور (GSE): در دو گروه جداگانه قبل و یا بعد از ابتلا به دمانس ناشی از تجویز داخل بطن مغزی STZ ، عصاره دانه انگور با دوز ۱۰۰ mg/kg (۱۰۰mg/ml) برای مدت یک ماه به صورت گاواژ (داخل معدی) تجویز گردید (۸).

تست‌های رفتاری

حافظه اجتنابی غیرفعال: برای ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال از از بساط shuttle box استفاده شد. در این روش که حافظه اجتنابی غیرفعال بررسی می‌شود؛ وسایل آموزش شامل دو جعبه روشن و تاریک بود که به‌وسیله یک تیغه گیوتینی از هم جدا شده بودند. کف جعبه تاریک با میله‌های فلزی استیل شوک‌دهنده پوشیده شده بود. در هنگام آزمایش هر موش در جعبه روشن قرار داده شد و ۶۰ ثانیه بعد از سازگاری تیغه جدا کننده باز شد و زمان تاخیر تا ورود موش به جعبه تاریک ثبت شد. بلافاصله بعد از ورود موش به جعبه تاریک تیغه پایین آمد و شوکی معادل ۷۵ولت، ۰/۲میلی‌آمپر و ۵۰هرتز برای ۳ ثانیه داده شود. ۵ ثانیه بعد موش از جعبه برداشته شد و به قفس خود بازگردانده شد. ۲۴ ساعت بعد همین کار تکرار شد؛ اما هیچ شوکی داده نشد. حافظه تاخیری برای حداکثر ۶۰۰ ثانیه محاسبه شد (۱).

حافظه فضایی: حافظه فضایی با استفاده از ماز آبی موریس (Morris Water Maze) مورد ارزیابی قرار گرفت. بساط ماز آبی متشکل از یک تانک بود که درون آن به‌وسیله رنگ سیاه نقاشی شد و با آب تا ارتفاع ۸۰ سانتی‌متری پر شد. درون تانک و در یکی از ربع‌ها یک سکوی مخفی به قطر ۱۰ سانتی‌متر و حدود ۲ سانتی‌متر زیر آب وجود داشت. حیوان به‌صورت تصادفی در یکی از ربع‌ها رها شد و به‌مدت یک دقیقه به جستجوی سکوی مخفی پرداخت. زمان لازم برای پیدا کردن سکو، مسافت طی شده به‌وسیله حیوان و سرعت شنا کردن حیوان توسط نرم‌افزار مخصوص ثبت شد. حیوانات به مدت ۴ روز و هر روز یک جلسه و هر جلسه ۴ مرحله درون ماز آبی آموزش دیدند و روز پنجم نیز با یک مرحله به عنوان Probe trial بررسی شدند (۲۰).

حافظه کاری (working memory): حافظه کاری با استفاده از T-maze مورد ارزیابی قرار گرفت. این ماز متشکل از سه بازو بوده که یک بازو نقطه شروع و دو بازوی دیگر بازوهای هدف هستند. حیوان درون بازوی شروع قرار داده شد و برای یافتن بازوی هدف آموزش داده شد. یک بازوی ماز به‌عنوان بازوی پاداش در نظر گرفته شد که در طول تمام آزمایشات ثابت بود. درصد ترایال‌های صحیح در این آزمایش ثبت شد. حیوانات به‌مدت یک شب گرسنه نگهداشته شدند، سپس تست T-maze هر هفته در مورد آنها انجام شد. غذای معمولی به‌عنوان پاداش در نظر گرفته شد. پاداش به حیواناتی داده شد که به بازوی صحیح رسیده بودند. برای ارزیابی ظرفیت یادگیری هر حیوان به‌مدت ۴ روز و هر روز ۳ بار آموزش داده شد. در سرتاسر آزمایش به منظور جلوگیری از ایجاد اشکال موقعیت آزمایشگر در انتخاب حیوان آزمایشگر پشت جعبه شروع قرار گرفت (۲۱).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-15 و آزمون‌های t-test ، ANOVA و Tukey با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

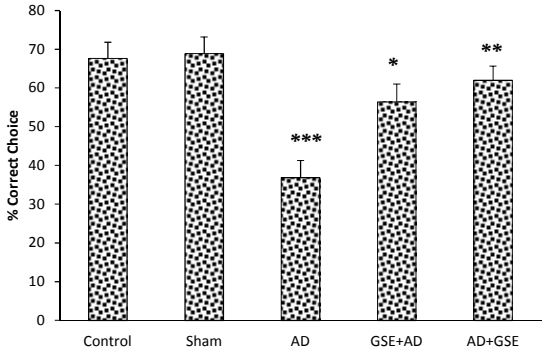
تزریق STZ درصد انتخاب بازوی صحیح در تست ماز T را نسبت به گروه شم کاهش داد (P<۰/۰۰۱). همچنین مصرف عصاره دانه انگور قبل و بعد از ایجاد دمانس در گروه‌های GSE+AD (P<۰/۰۱) و AD+GSE (P<۰/۰۵) درصد انتخاب بازوی صحیح را در این حیوانات افزایش داد (نمودار یک).

در تست ماز آبی موریس تجویز STZ در حیوانات گروه دوم درصد زمان حضور در ربع هدف را نسبت به گروه شم افزایش داد (P<۰/۰۰۱) (نمودار ۲). همچنین تجویز STZ در حیوانات زمان تاخیر رسیدن به سکوی آشکار را در روزهای متوالی نسبت به گروه شم افزایش داد (P<۰/۰۱) (نمودار ۳). تجویز عصاره دانه انگور قبل و بعد از تزریق STZ در حیوانات گروه‌های چهارم (P<۰/۰۰۱) و پنجم (P<۰/۰۱) زمان تاخیر رسیدن به سکوی هدف در روزهای متوالی را افزایش داد و این افزایش از لحاظ آماری نسبت به گروهی که در آن دمانس ایجاد شده بود؛ معنی‌دار بود (نمودار ۳).

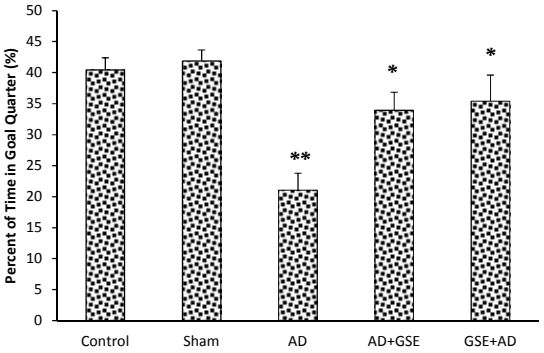
تجویز عصاره دانه انگور قبل و بعد از ایجاد دمانس درصد حضور حیوان در ربع هدف را در گروه‌های چهارم و پنجم نسبت به گروه دمانس افزایش داد و این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود

(P<۰/۰۵) (نمودار ۲).

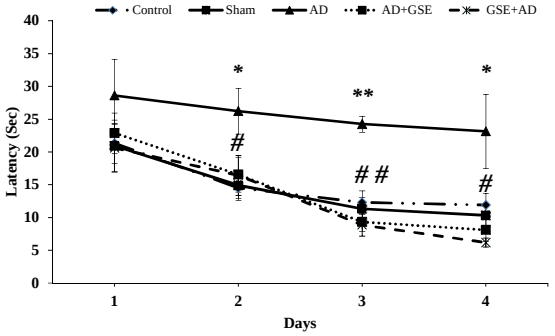
تزریق STZ در هیپوکامپ حیوانات گروه دوم زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک در تست شاتل باکس را کاهش داد و این کاهش از لحاظ آماری نسبت به گروه شم معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). تجویز عصاره دانه انگور قبل از ایجاد دمانس در حیوانات گروه سوم زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک را اندکی تغییر داد؛ ولی این تغییر از لحاظ آماری نسبت به گروه دمانس معنی‌دار نبود. تجویز عصاره دانه انگور به‌مدت یک‌ماه پس از ایجاد دمانس در حیوانات گروه ۵ زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک را نسبت به گروه دمانس افزایش داد و این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۴).



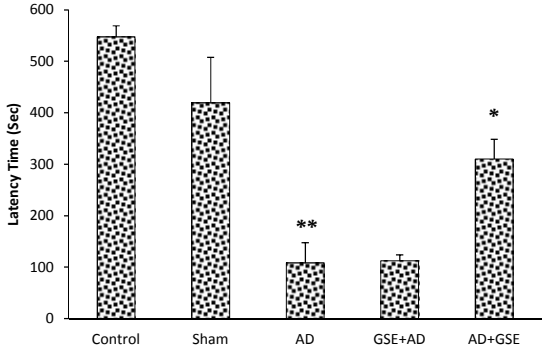
نمودار ۱ : اثر عصاره دانه انگور بر درصد انتخاب صحیح با تست T maze (n=۸)
داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار بیان شده‌اند.
P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه آلزایمری (AD)، P<۰/۰۱** در مقایسه با گروه آلزایمری، P<۰/۰۰۱*** در مقایسه با گروه شم*
AD= گروه آلزیمری، GSE+AD= گروهی که عصاره هسته انگور را قبل از ایجاد دمانس دریافت کردند، AD+GSE= گروه آلزایمری که بعد از ایجاد دمانس عصاره هسته انگور را دریافت کردند.



نمودار ۲ : اثر عصاره دانه انگور بر درصد زمان حضور در ربع هدف در تست ماز آبی موریس (MWM)
داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار بیان شده‌اند.
P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه آلزایمری (AD)*
*P<۰/۰۰۱** در مقایسه با گروه شم*
AD= گروه آلزیمری، GSE+AD= گروهی که عصاره هسته انگور را قبل از ایجاد دمانس دریافت کردند، AD+GSE= گروه آلزایمری که بعد از ایجاد دمانس عصاره هسته انگور را دریافت کردند.



نمودار ۳ : اثر عصاره دانه انگور بر زمان زمان تاخیر در رسیدن به سکوی مخفی در روزهای متوالی در تست ماز آبی موریس (MWM)
داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار بیان شده‌اند.
*P<۰/۰۱ * در مقایسه با گروه شم، P<۰/۰۰۱ ** در مقایسه با گروه شم، P<۰/۰۱ # در مقایسه با گروه آلزایمری، P<۰/۰۰۱ # # در مقایسه با گروه آلزایمری*
AD= گروه آلزیمری، GSE+AD= گروهی که عصاره هسته انگور را قبل از ایجاد دمانس دریافت کردند، AD+GSE= گروه آلزایمری که بعد از ایجاد دمانس عصاره هسته انگور را دریافت کردند.



نمودار ٤ : اثر عصاره دانه انگور بر زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک در تست شاتل باکس (Shuttle Box)
داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار بیان شده‌اند.
*P<۰/۰۵ * در مقایسه با گروه آلزایمری*
*P<۰/۰۰۱ ** در مقایسه با گروه شم*
AD= گروه آلزیمری، GSE+AD= گروهی که عصاره هسته انگور را قبل از ایجاد دمانس دریافت کردند، AD+GSE= گروه آلزایمری که بعد از ایجاد دمانس عصاره هسته انگور را دریافت کردند.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه تجویز داخل بطنی STZ در موش‌های صحرایی موجب اختلال حافظه در تست‌های ماز آبی موریس، ماز T و حافظه اجتنابی غیرفعال گردید. در واقع تجویز STZ موجب ایجاد دمانس در موش‌ها گردید. مطالعات قبلی نیز اثر تزریق STZ به‌صورت داخل بطنی در ایجاد اختلال حافظه و ایجاد دمانس را تایید نموده‌اند و استفاده از تزریق داخل بطنی STZ به عنوان مدلی برای ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو نظیر بیماری آلزایمر مورد قبول واقع شده است (۲۲). در واقع تزریق داخل بطنی STZ مدلی شبیه به بیماری آلزایمر از نوع اسپورادیک ایجاد

می‌نماید (۲۳و۲۴). STZ هنگامی که به صورت ICV تجویز شود؛ باعث طیف گسترده‌ای از تغییرات بیوشیمیایی و رفتاری ویژه در مورد عملکردهای شناخت، غذا خوردن، درک درد و متابولیسم گلوکز مغز، نوروترانسمیترها و استرس اکسیداتیو بدون ایجاد هایپرگلیسمی شریانی (مشابه بیماری آلزایمر) می‌شود (۱۹).

همچنین نتایج نشان دادند تجویز عصاره دانه انگور (۱۰۰ mg/kg) قبل و بعد از ایجاد دمانس در موش‌های صحرایی یادگیری و حافظه را در تست‌های ماز آبی موریس، ماز T و حافظه اجتنابی غیرفعال نسبت به حیواناتی که به‌علت تزریق STZ دچار دمانس شده بودند را بهبود می‌بخشد. در خصوص استفاده از گیاهانی که حاوی مقادیر زیادی از پلی‌فنول‌ها هستند؛ تحقیقات زیادی انجام شد که همگی اثر مثبت این مواد را در بهبود اختلال شناختی در حیوانات نشان داده‌اند (۲۷-۲۵) و همه آنها نتایج حاصل از این تحقیق را تایید می‌نمایند. آنتی‌اکسیدان‌هایی که در بافت‌های عصبی تجمع می‌یابند؛ کاندیداهای بالقوه‌ای برای جلوگیری یا درمان اختلالاتی مانند آسیب اکسیداتیو هستند. مدل‌های حیوانی اطلاعات با ارزشی راجع به اثرات موادشیمیایی گیاهی که از میوه‌ها و سبزیجات به‌دست می‌آیند؛ بر آسیب اکسیداتیو طی پیری ارایه نموده‌اند (۲۸).

مطالعات مختلف با استفاده از مداخلات تغذیه‌ای در گونه‌های مختلف پستانداران از جمله انسان‌ها، با استفاده از گیاهان غنی از فلاونوییدها یا عصاره‌های غذایی، توانایی این ترکیبات غذایی در بهبود یادگیری و حافظه به‌وسیله محافظت از نورون‌های آسیب‌پذیر، افزایش عملکرد نورون‌های موجود یا به‌وسیله تحریک زایش مجدد نورونی را نشان داده‌اند. اثرات بالقوه محافظت نورونی فلاونوییدها هم در مدل‌های استرس اکسیداتیو و هم در مدل‌های مرگ نورونی ناشی از تزریق بتا آمیلوئید نشان داده شده است (۳۱-۲۹). همچنین شواهدی از اثرات مفید و تعدیل کننده نورونی عصاره جینکو بیلوبا به‌ویژه در ارتباط با دمانس ناشی از سن و بیماری آلزایمر وجود دارند (۳۲).

علاقه رو به رشدی در خصوص پتانسیل مواد شیمیایی گیاهی برای بهبود حافظه و یادگیری و توانایی شناخت عمومی وجود دارد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند غذاهای غنی از مواد شیمیایی گیاهی نظیر توت‌ها و اسفناج در بهبود نقایص عملکرد حرکتی و اختلال حافظه کاری فضایی ناشی از سن موثرند؛ اما چگونگی اعمال این اثرات واضح نیست. اگرچه این اثرات ممکن است مربوط به اثرات آنتی‌اکسیدانی، تعدیل کننده رهایش نوروترانسمیترها، تحریک کننده زایش مجدد نورون‌ها در هیپوکامپ از طریق تعدیل سیگنالینگ یا توانایی بهبود جریان خون عروق مغزی باشد (۳۵-۳۳).

استفاده از مکمل‌های غذایی مانند پلی‌فنول‌ها به‌صورت طولانی مدت عملکرد شناختی را در موش‌های پیر بهبود می‌بخشد (۳۶) که نتایج به‌دست آمده در این تحقیق را تایید می‌نمایند.

آسیب اکسیداتیو با پیری در ارتباط است و در مغز بیماران آلزایمری به‌طور گسترده‌ای دیده می‌شود. گونه‌های مختلف رادیکال‌های آزاد موجب آسیب پروتئین‌ها، چربی‌ها، میتوکندری‌ها و DNA می‌شوند و ممکن است فرایندهای سلولی را فعال نمایند که بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درون سلولی غلبه کرده و موجب آسیب نورونی می‌شوند (۳۷). همچنین پیشنهاد کرده‌اند رژیم غنی از آنتی‌اکسیدان ممکن است خطر ابتلا به آلزایمر را کاهش دهد (۳۸).

عصاره دانه انگور حاوی تعدادی از پلی‌فنول‌ها مانند پروآنتوسیانیدینها و پروسیانیدینها است. این ترکیبات دارای خواصی چون جاروب کنندگی قوی رادیکال‌های آزاد، خواص ضدالتهاب، کاهش دهنده مرگ سلولی و جلوگیری کننده از آسیب کروموزمی ناشی از پراکسید هیدروژن هستند (۸و۱۶و۳۹). مطالعات قبلی اثر محافظت کنندگی عصاره دانه انگور را در موش‌هایی که به آنها آمیلوئید بتا تزریق شده بود را نشان دادند. آنها این اثرات را به خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره دانه انگور نسبت دادند (۴۰و۴۱).

با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در روند توسعه و تکامل بیماری آلزایمر، مواد شیمیایی حاوی پلی‌فنول‌ها از جمله عصاره دانه انگور می‌توانند در پیشگیری از این بیماری و یا در درمان این بیماری مفید واقع شوند. در تحقیق حاضر نیز استفاده عصاره دانه انگور به‌صورت قبل و بعد از ایجاد دمانس ناشی از تزریق STZ اختلال حافظه را در این حیوانات بهبود بخشید. با توجه به این که عصاره دانه انگور حاوی مواد زیادی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی است؛ احتمالاً این اثرات بهبودی اختلال حافظه قبل و بعد از تزریق STZ ناشی از خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره دانه انگور است. البته تحقیقات بیشتر در این زمینه برای تعیین مکانیسم دقیق آن لازم است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق اثر عصاره دانه انگور در پیشگیری و بهبود اختلال حافظه ناشی از تزریق درون بطنی STZ را نشان داد. همچنین تجویز عصاره دانه انگور پس از ایجاد آلزایمر (دمانس)، اثر بیشتری بر بهبود حافظه داشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره PRC-50) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم به انجام رسید. بدین‌وسیله از خانم فاطمه زارع به خاطر همکاری فراوان در انجام این مطالعه و از کارکنان مرکز تحقیقات و پرورش حیوانات

آزمایشگاهی که در تهیه حیوانات همکاری نمودند؛ سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Jee YS, Ko IG, Sung YH, Lee JW, Kim YS, Kim SE, et al. Effects of treadmill exercise on memory and c-Fos expression in the hippocampus of the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. Neurosci Lett. 2008 Oct; 443(3): 188-92. doi: 10.1016/j.neulet.2008.07.078

2. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. Dis Mon. 2010 Sep;56(9):484-546. doi: 10.1016/j.disamonth.2010.06.001

3. Wang J, Ho L, Zhao W, Ono K, Rosensweig C, Chen L, et al. Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci. 2008 Jun; 28(25): 6388-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0364-08.2008

4. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2010 Jan; 362(4): 329-44. doi: 10.1056/NEJMra0909142

5. Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. Neuron. 2010 Oct; 68(2): 270-81. doi: 10.1016/j.neuron.2010.10.013

6. Skulachev VP, Anisimov VN, Antonenko YN, Bakeeva LE, Chernyak BV, Erichev VP, et al. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. Biochim Biophys Acta. 2009 May; 1787(5): 437-61. doi: 10.1016/j.bbabio.2008.12.008

7. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. Mol Cell Biochem. 2010 Dec; 345(1-2): 91-104. doi: 10.1007/s11010-010-0563-x

8. Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. Int J Dev Neurosci. 2005 Oct; 23(6): 501-7.

9. Zhao Y, Zhao B. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2013 (2013); Article ID 316523. http://dx.doi.org/10.1155/2013/316523

10. Choi SK, Zhang XH and Seo JS. Suppression of oxidative stress by grape seed supplementation in rats. Nutr Res Pract. 2012; 6(1): 3-8. doi: 10.4162/nrp.2012.6.1.3

11. Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. Nutr Res. 2008 Nov; 28(11): 729-37. doi: 10.1016/j.nutres.2008.08.007

12. Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. J Food Comp Anal. 2006; 19(1): 41-8.

13. Nandakumar V, Singh T, Katiyar SK. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. Cancer Lett. 2008 Oct; 269(2): 378-87. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.049

14. Beveridge TH, Girard B, Kopp T, Drover JC. Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: varietal effects. J Agric Food Chem. 2005 Mar; 53(5): 1799-804.

15. Kim H, Deshane J, Barnes S, Meleth S. Proteomics analysis of the actions of grape seed extract in rat brain: technological and biological implications for the study of the actions of psychoactive compounds. Life Sci. 2006 Mar; 78(18): 2060-5.

16. Feng Y, Liu YM, Fratkins JD, LeBlanc MH. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. Brain Res Bull. 2005 Jul; 66(2):120-7.

17. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th ed. London: Academic Press. 2007; pp: 110-11.

18. Sharma B, Singh N, Singh M. Modulation of celecoxib- and streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. J Psychopharmacol. 2008 Mar; 22(2): 162-71. doi: 10.1177/0269881107081553

19. Grünblatt E, Koutsilieri E, Hoyer S, Riederer P. Gene expression alterations in brain areas of intracerebroventricular streptozotocin treated rat. J Alzheimers Dis. 2006 Aug; 9(3): 261-71.

20. Farbood Y, Sarkaki A, Badavi M. Preventive effect of Grape Seed hydroalcholic extract on Dementia type of Alzheimer's disease in aged male rats. Int J Pharm. 2009; 5: 257-62. doi: 10.3923/ijp.2009.257.262

21. Mathangi DC, Namasivayam A. Effect of chronic cyanide intoxication on memory in albino rats. Food Chem Toxicol. 2000 Jan; 38(1):51-5.

22. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. Life Sci. 2005 May; 77(1): 1-14.

23. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. Behav Brain Res. 2006 Jul; 171(1): 9-16.

24. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. Life Sci. 2005 May; 77(1): 1-14.

25. Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. Am J Epidemiol. 2007 Jun; 165(12): 1364-71.

26. Spencer JP. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. Proc Nutr Soc. 2010 May; 69(2): 244-60. doi: 10.1017/S0029665110000054

27. Spencer JP. Flavonoids: modulators of brain function? Br J Nutr. 2008 May; 99E (Suppl 1): ES60-77. doi: 10.1017/S0007114508965776

28. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. Am J Clin Nutr. 2005 Jan; 81(1 Suppl): 313S-316S.

29. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. J Nutr. 2006 Apr; 136(4):1043-7.

30. Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Shimazu T, Matsui T, Ebihara S, et al. Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. Am J Clin Nutr. 2006 Feb; 83(2): 355-61.

31. Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J. The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. Br J Pharmacol. 2006 May; 148(2): 147-53.

32. Zimmermann M, Colciaghi F, Cattabeni F, Di Luca M. Ginkgo

biloba extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzhelmer's disease. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2002 Sep; 48(6): 613-23.

33. Nirmala GJ, Narendhirakannan RT. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of grapes (Vitis Vinifera. L) seed and skin extracts-muscat Variety. Int J Pharm Pharm Sci. 2011; 3(4): 242-49.

34. Ramirez MR, Izquierdo I, do Carmo Bassols Raseira M, Zuanazzi JA, Barros D, et al. Effect of lyophilised Vaccinium berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. Pharmacol Res. 2005 Dec; 52(6): 457-62.

35. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, et al. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jan; 103(4): 1024-9.

36. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. Am J Clin Nutr. 2005 Jan; 81(1 Suppl): 313S-16S.

37. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. J Neurosci Res. 2007 Nov; 85(14): 3036-40.

38. Morris MC. The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. Eur J Neurol. 2009 Sep; 16 (Suppl 1): 1-7. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02735.x

39. Lu M, Xu L, Li B, Zhang W, Zhang C, Feng H, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidin extracts on cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats through modulating AGEs/RAGE/NF-kappaB pathway. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2010; 56(2): 87-97.

40. Deshane J, Chaves L, Sarikonda KV, Isbell S, Wilson L, Kirk M, et al. Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract. J Agric Food Chem. 2004 Dec; 52(26):7872-83.

41. Bagchi D, Bagchi M, Stohs Sj, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. Ann N Y Acad Sci. 2002 May; 957: 260-70.

Original Paper

Effect of grape seed extract on improving memory and learning impairment induced by streptozotocin in male rat

Farbood Y (Ph.D)*[1], Sarkaki AR (Ph.D)[2]
Shahrani Korrani M (Ph.D)[3], Saadatfard M (B.Sc)[4]

[1]Assistant Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. [2]Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. [3]Assistant Professor, School of Medicine, Medicinal Plant and cellular-Molecular Research Centers, Department of Physiology, Shahrekord University of Medical Sciences, Sharekord, Iran. [4]M.Sc Student of Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background and Objective: Alzheimer's disease is an age-related disease that is characterized by dementia and loss of neurons in the brain. It has been shown that brain oxidative stress plays an important role in aging and neurodegenerative disorders. This study was done to evaluate the effect of grape seed extract (GSE) on memory impairment induced by intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ) in animal model of Alzheimer's disease.

Methods: In this experimental study, Eighty adult male Wistar rats were randomly allocated into control, sham, grape seed extract (100 mg/kg/bw, 30 days, orally) plus STZ and STZ plus grape seed extract. Animals memory were evaluated using Morris water maze, shuttle box and T maze tests.

Results: Intracerebroventricular injection of STZ caused memory corruption in all tests. Administration of GSE before and after of administration of intracerebroventricular STZ in the Morris water maze test, significantly reduced latency to get to the hidden platform compared to Alzheimer's group ($P<0.05$). The latency to enter the dark compartment in passive avoidance memory test significantly increased in compare to animal model of Alzheimer's disease ($P<0.05$). The selection of the right arm of the T-maze test in animals that received grape seed extract before and after of STZ injection significantly increased compared to animal model of Alzheimer's disease($P<0.05$).

Conclusion: Grape seed extract has important effect in prevention and improving memory impairment induced by intracerebventricular injection of STZ.

Keywords: Alzheimer's disease, Grape seed, Streptozotocin, Rat

*** Corresponding Author: Farbood Y (Ph.D), E-mail: farbood_y@yahoo.com**

Received 7 Mar 2015 **Revised** 6 Jun 2015 **Accepted** 27 Jun 2015

Cite this article as: Farbood Y, Sarkaki AR, Shahrani Korrani M, Saadatfard M. [Effect of grape seed extract on improving memory and learning impairment induced by streptozotocin in male rat]. J Gorgan Uni Med Sci. Summer 2016; 18(2): 27-34. [Article in Persian]