تأثیر عصاره آبی گیاه خرفه بر حافظه و یادگیری احترازی غیرفعال موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

حیدر آقابابا[1*]، فریبا جعفری شیبانی[1] و حسین عباسپور[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، گروه زیست شناسی، ارسنجان، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست شناسی، دامغان، ایران

مسئول مکاتبات: aqababa@iaua.ac.ir

چکیده

عصاره آبی گیاه خرفه (*Portulaca Oleracea*) یک منبع غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ می‌باشد که این ماده در تکامل مغز و سیستم عصبی و افزایش حافظه نقش اساسی دارد. بنابراین در این مطالعه به بررسی تأثیر عصاره آبی گیاه خرفه بر حافظه و یادگیری احترازی غیر فعال با اندازه‌گیری میزان STL (مرحله تأخیری) در ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم پرداخته شد. موش ها به مدت یک هفته جهت سازش با شرایط محیط در اتاق حیوانات در شرایط حرارتی ۲± ۲۱ درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاه خرفه ازسبزی فروشی‌ها خریداری و پس از خشک شدن، آن را آسیاب کرده و عصاره آبی آن جهت انجام آزمایشات بر روی موش‌ها در دستگاه شاتل باکس مورد استفاده قرار گرفت. از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تعیین میانگین و خطای استاندارد هر گروه و به کمک روش Scheffe و Tukey، تفسیرهای آماری صورت گرفت. سطح آماری مورد قبول برای بررسی اختلاف میانگین‌ها، P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. در این تحقیق از دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵ و mg/kg ۱/۰ استفاده گردید. دوز mg/kg ۰/ ۲۵ به عنوان دوز مؤثر انتخاب شد که هم سطح کورتیزول و هم سطح STL را افزایش می‌داد.

کلمات کلیدی : حافظه و یادگیری، خرفه، شاتل باکس، موش صحرایی

مقدمه

محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز ـ آدرنال (HPA) بر حافظه و یادگیری تأثیر مستقیم دارد و با تغییر در میزان فعالیت این محور، میزان حافظه و یادگیری را دچار تغییر می‌کند. از جمله هورمونی که در حافظه و یادگیری دخالت بسزایی دارد هورمون محور HPA یعنی کورتیزول می‌باشد [۱]. در برخی از اختلالات عصبی به منظور تقویت حافظه از برخی داروها استفاده می‌شود. این داروها اغلب روی روند عصبی موسوم به (LTP یا Long Term Potentiation) تأثیر می‌گذارند [٤]. یکی از این گیاهان که درتقویت حافظه استفاده می‌شود، گیاه خرفه است. از خواص امگا-۳ موجود در این گیاه، تکامل مغز و سیستم عصبی می‌باشد. همچنین سبب افزایش حافظه و گسترش اعمال شناختی می‌گردد. اسیدهای چرب امگا-۳، تولید پروتئین‌های پروآتروژنتیک و پیش‌التهابی را در سلول‌های آندوتلیال انسان کاهش می‌دهند. با مهار چسبندگی سلول‌های مونوسیتی و با کاهش ترومبوکسان A_2 پاسخ التهابی را در آندوتلیوم کاهش داده و اتساع عروقی را افزایش می‌دهند [٦]. مکانیسم عمل آن به این صورت است که اسیدهای چرب امگا-۳ با پیشگیری از کاهش آزادسازی نوروترانسمیتر کولین و فاکتور رشد عصبی، منجر به افزایش حافظه می‌گردد. استیل‌کولین برای القاء حافظه لازم بوده و کاهش آن در گسترش بیماری آلزایمر ضروری است چرا که سازنده استیل کوآنزیم A یعنی پیش‌ساز استیل کولین می‌باشد [۳]. این گیاه منبع غنی از اسیدهای چرب امگا-۳، اسیداسکوربیک، بتاکاروتن، گلوتاتیون، پروتئین، کربوهیدرات، ویتامین‌های A، B_1، B_2 و C، نورآدرنالین، دوپامین، مواد معدنی شامل کلسیم، پتاسیم، آهن، فسفر،

منگنز، مس و اسیدهای ارگانیک مثل کافئیک، مالیک، اگزالیک، و سیتریک می‌باشد [۲].

مواد و روش کار

در این تحقیق از ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی معین (۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم) استفاده شد و به مدت یک هفته جهت سازش با شرایط محیط در اتاق حیوانات در شرایط حرارتی ۲± ۲۱ درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در این زمان حیوانات از غذای موش صحرایی (پلت) و آب لوله‌کشی استفاده کردند. آزمایش در یک ساعت معین انجام می‌گرفت و مراحل سازش، آموزش و بیادآوری اجرا می‌شد و پاسخ شرطی احترازی غیر فعال در موش‌ها بررسی و ثبت می‌شد. روش سنجش حافظه در این تحقیق یادگیری احترازی غیرفعال (Passive Avoidance Learning) و دستگاه مورد استفاده شاتل باکس بود که توسط شرکت نورتاب ساخته می‌شود. دستگاه از دو بخش آموزش (Training Box) و بخش کنترل تشکیل شده است. جعبه آموزش دارای ابعاد ٦٢ cm × ۲۳ × ۲۳ و از ورقه‌های پلکسی گلاس (Plexy glass) شفاف ساخته شده است. جعبه آموزش دارای دو محفظه کوچک مساوی است که توسط دیوار عرضی از هم جدا شده‌اند. برای تاریک شدن، تمام سطح خارجی آن را سیاه می‌کنند. دریچه مستطیل شکل به ابعاد ۹ cm × ۷ جهت عبور حیوان از دیواره عرضی است. دریچه توسط درب گیوتینی باز و بسته می شود. کف محفظه دارای میله فلزی به قطر ۲/٥ cm و با فاصله ۱cm از هم می‌باشد. بخش کنترل کننده دارای پیچ‌های تنظیم کننده مدت زمان برقراری شوک و میزان شوک از نظر فرکانس، ولتاژ و آمپر است (تصویر ۱).

روش یادگیری احترازی غیرفعال: یادگیری احترازی غیرفعال شامل سه مرحله عادت، آموزش، بیادآوری می‌باشد.

جلسه عادت: به منظور عادت دادن، حیوان را در بخش روشن دستگاه قرارداده و پس از ٥ ثانیه درب گیوتینی را باز می‌کنیم. به محض ورود حیوان به بخش تاریک درب را می‌بندیم و پس از ۳۰ ثانیه آن را باز می‌کنیم تا حیوان به محفظه روشن برود و در صورتی که حیوان به محفظه نرفت با دست آن را هدایت می‌کنیم و بعد حیوان را از دستگاه خارج می‌کنیم. این مرحله را پس از ۳۰ دقیقه تکرار می‌کنیم. اگر حیوان پس از گذشت ۱۰۰ ثانیه در هر یک از جلسات وارد بخش تاریک نشد آن را حیوان نا آموز به حساب می‌آوریم و از ادامه آزمایشات حذف می‌کنیم.

جلسه آموزش: ۳۰ دقیقه پس از جلسه عادت برای هدایت آسان‌تر شوک الکتریکی، پای حیوان را به سرم فیزیولوژیک آغشته می‌کنیم و موش را در محفظه روشن قرار می‌دهیم. ۳۰ ثانیه بعد درب گیوتینی را باز می‌کنیم به محض ورود حیوان به بخش تاریک، درب را به آرامی بسته و شوک ملایمی به میزان یک میلی آمپر به مدت ۲۳ ثانیه و فرکانس ۱۰۰ هرتز به پای حیوان اعمال نموده و صبر می‌کنیم تا حیوان از محفظه تاریک بیرون بیاید، سپس آن را در قفس می‌اندازیم. پس از چند دقیقه حیوان را در محفظه روشن قرار می‌دهیم و پس از ۳۰ ثانیه درب گیوتینی را باز می‌کنیم. اگر در طول ۲ دقیقه حیوان وارد محفظه تاریک نگردید جلسه آموزش را خاتمه می‌دهیم. در غیر این صورت، مرحله اعمال شوک را تکرار می‌کنیم.

جلسه به یادآوری: برای تعیین میزان به یادآوری حافظه ٢٤ ساعت بعد از جلسه آموزش، حیوان را در بخش روشن دستگاه قرار می‌دهیم و پس از گذشت ۳۰ ثانیه درب گیوتینی را به آرامی باز نموده و زمانی را که طول می‌کشد تا حیوان کاملاً وارد بخش تاریک دستگاه شود را به عنوان تأخیر در ورود به بخش تاریک با STL (Step-Through Latency) ثبت می‌نماییم. حداکثر زمانی که برای ورود به محفظه تاریک در نظر می‌گیریم ٦۰۰ ثانیه است. موش‌ها به طورکلی به پنج گروه ده‌تایی تقسیم

شدند، که این گروه‌ها عبارتند از: گروه اول، گروه شاهد بود که هیچ عصاره‌ای به آنها داده نشده بود ولی تمام شرایط نگهداری و تغذیه آنها مشابه به سایر گروه‌ها بوده و در دستگاه شاتل باکس قرار گرفتند.

گروه دوم (گروه شم) گروهی بود که به آنها محلول نرمال سالین که حلال دارو می‌باشد از طریق گاواژ خورانده شد. به گروه سوم عصاره با دوز ۰/۲۵ mg/kg، به گروه چهارم، عصاره با دوز ۰/۵ mg/kg و به گروه پنجم عصاره با دوز ۱/۰ mg/kg از طریق گاواژ و به مدت یک هفته خورانده شد. بعد از یک هفته موش‌ها را در دستگاه شاتل باکس قرار داده و مرحله عادت، آموزش، بیادآوری انجام گرفت. در مرحله به یادآوری مدت زمان ورود به محفظه تاریک را یادداشت کرده و بعد از خونگیری از قلب (یک الی دو سی‌سی)، سرم‌های خونی در فریزر قرار داده شد. پس از اتمام آمایش، اندازه‌گیری هورمون کورتیزول توسط کیت هورمونی انجام شد.

تست هورمونی کورتیزول: پس از خونگیری، خون را درون لوله‌های آزمایش قرار داده و پس از اتمام آزمایش، نمونه‌های جمع آوری شده توسط کیت به روش RIA در انستیتو غدد و متابولیسم بیمارستان نمازی شیراز اندازه‌گیری شد و نتایج بدست آمده مستقیماً مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

روش آماری: به منظور بررسی سطح حافظه و بیادآوری زمان ورود به اتاق تاریک (STL) که حداکثر زمانی که برای ورود به محفظه تاریک در نظر گرفته شد۶۰۰ ثانیه بود، سطح پلاسمایی کورتیزول (برحسب Mg/dI) اندازه‌گیری شد. با استفاده از آنالیزهای آماری به روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA)، میانگین و خطای استاندارد (mean ± SE) هر گروه تعیین شد. مرز آماری مورد قبول برای بررسی اختلاف میانگین‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نتایج بدست آمده از آزمایشات به صورت هیستوگرام ارائه شد و تفسیرهای آماری به روش Scheffe و Tukey صورت گرفت.

نتایج

نتایج آنالیز واریانس داده‌های بدست آمده از مقایسه گروه شاهد و گروه Sham نشان داد که بین این دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. نتایج آنالیز واریانس داده‌های بدست آمده از مصرف عصاره گیاه خرفه با دوزهای مختلف ۱/۰، ۰/۵ و ۰/۲۵ mg/kg نسبت به زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که مصرف ۰/۲۵ mg/kg و ۰/۵mg/kg عصاره خرفه روزانه به مدت یک هفته قبل از آموزش در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشتند ولی دوز ۰/۲۵ mg/kg بعنوان دوز مؤثر شناخته شد.

جدول ۱ـ خلاصه آمار توصیفی برای متغیر STL به تفکیک گروه

Statistics / Group	N	Mean	Std. Error of Mean
A	10	269.50	58.65
B	10	201.60	51.53
C	10	115.70	45.38
Control	10	33.60	6.10

جدول ۲ـ خلاصه آمار توصیفی برای متغیر Cortisol به تفکیک گروه

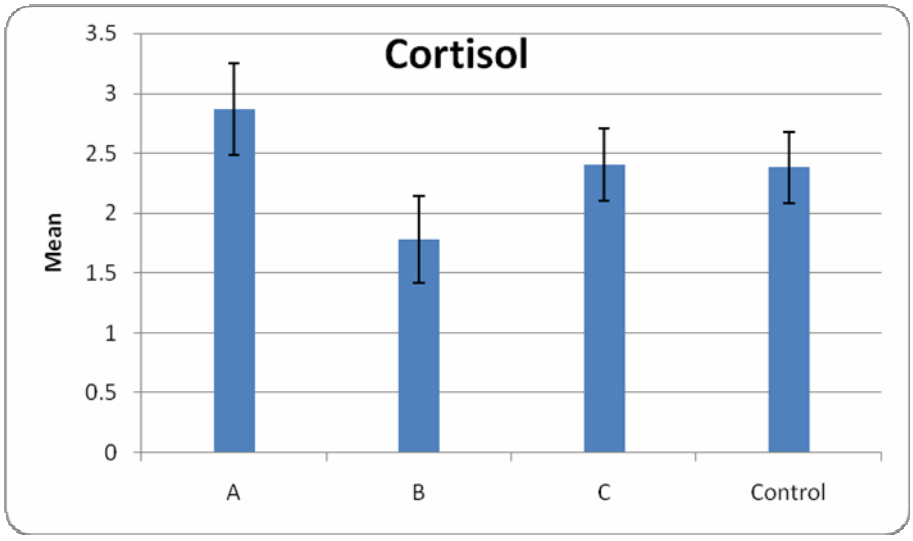
Statistics / Group	N	Mean	Std. Error of Mean
A	10	2.868	0.380
B	10	1.783	0.361
C	10	2.403	0.301
Control	10	2.382	0.297

جدول ۳ـ آزمون t برای مقایسه میانگین STL در دو گروه کنترل و Sham

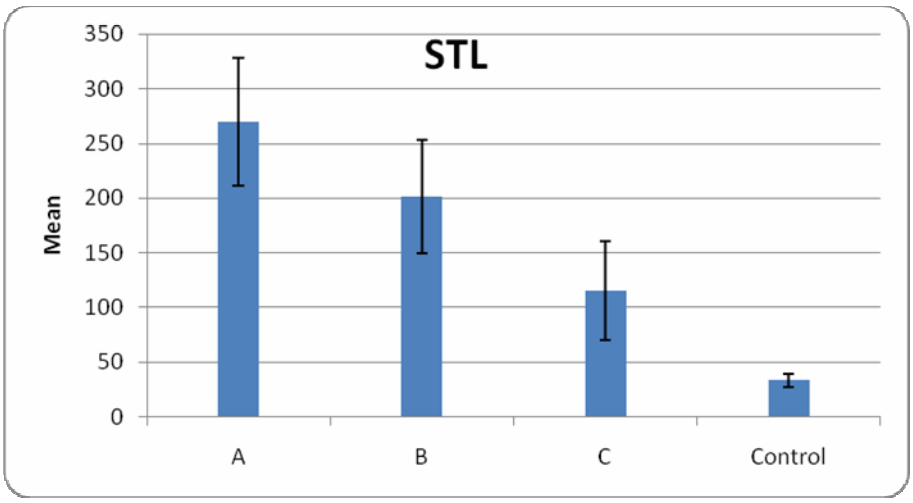
Statistics / Group	N	Mean	SD	SE	Mean Diff.	t	df	sig. (p)
Sham	10	23.40	11.18	3.54	-10.20	-1.45	18	0.165
Control	10	33.60	19.28	6.10				

جدول ٤ـ آزمون t برای مقایسه میانگین Cortisol در دو گروه کنترل و Sham

Statistics / Group	N	Mean	SD	SE	Mean Diff.	t	df	sig. (p)
Sham	10	2.89	1.735	0.549	-13.70	-2.04	18	0.057
Control	10	2.38	0.940	0.297				



نمودار ۱ـ مقایسه میانگین متغیر Cortisol در گروه‌های مختلف



نمودار ۲ـ مقایسه میانگین متغیر STL در گروه‌های مختلف

بحث

موضوع یادگیری و حافظه و بهبود آن از مسائل مهم زندگی انسان‌هاست که بدلیل پیچیدگی و دخالت فاکتورهای متعدد، تحقیقات مربوط به آن همچنان ادامه دارد. از طرفی امروزه استفاده از داروهای گیاهی در معالجه بیماری‌هایی مانند فراموشی و همچنین تقویت حافظه شایع می‌باشد که برای شناخت عوارض و چگونگی تأثیر آن، انجام تحقیقات بیشتر ضروری است. یکی از گیاهان مطرح برای تقویت حافظه و جلوگیری از فراموشی و آلزایمر، عصاره گیاه خرفه می‌باشد. عصاره گیاه خرفه یک منبع غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ بوده که این اسیدهای چرب نقش اساسی در ساخت نوروترانسمیتر استیل کولین دارند، و استیل کولین نیز در مغز نقش مهمی در یادگیری دارد.

از بین دوزهای استفاده شده در این تحقیق (۱/۰ mg/kg، ۰/۵ mg/kg، ۰/۲۵ mg/kg) دوزی که بیشترین تأثیر را داشت، دوز ۰/۲۵ mg/kg بود که هم از نظر سطح کورتیزول بالاترین سطح را داشته و هم از نظر تأخیر در پا گذاشتن و ورود حیوان به بخش تاریک دستگاه شاتل باکس بیشترین تأثیر را دارد. در واقع حیوان در جلسه عادت و آموزش یاد گرفته بود که وقتی از بخش روشن

به بخش تاریک برود به پای او شوک وارد می‌شود. در نتیجه در جلسه به یادآوری از رفتن به بخش تاریک ممانعت می‌کند و مدت زمان بیشتری طول می‌کشد که حیوان به بخش تاریک برود. علت این که دوز ۰/۲۵mg/kg بعنوان دوز مؤثر در این تحقیق استفاده شد، احتمالاً می‌تواند این باشد که عصاره آبی گیاه خرفه با کمک به ساخت پیش‌سازهای نوروترانسمیتر استیل کولین، یعنی مهم‌ترین نوروتررانسمیتری که در مغز باعث یادگیری می‌شود، سبب افزایش حافظه و یادگیری می‌گردد. فریمانتل و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که جذب کم اسیدهای چرب امگا-۳ بخصوص DHA، با کاهش درک در پیری به خصوص آلزایمر ارتباط دارد. امگا-۳، یک پیشگیری کننده از پیری و ضد التهاب است که به عنوان مکمل برای پیشگیری از اختلالات هوشی و آلزایمر مؤثر است [۵]. همچنین وینوت و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که بیشترین میزان تشکیلات غشاهای سلولی مغزی امگا-۳ می باشد. میزان کافی امگا-۳، از اختلالات شدید شناختی (یادگیری و خاطره) که بر روی تغییرات میزان مصرف گلوکز یا تغییرات پروسه نروترانسمیترها اعمال می‌شود، جلوگیری می‌نماید [۸]. دانیلز در سال ۲۰۱۰ نشان داد که اسیدهای چرب با پیشگیری و ممانعت از کاهش آزادسازی استیل کولین و کاهش فاکتور رشد عصبی منجر به افزایش حافظه می‌گردد [۳]. مولکول‌های اسید چرب در میتوکندری با آزاد شدن تدریجی قطعات دو کربنه به صورت مولکول-های استیل کوآنزیم A در می‌آیند. ماده میانجی استیل کولین در حضور آنزیم کولین استیل ترانسفراز، از استیل کوآنزیم A و کولین ساخته می‌شود [۱]. در نتیجه با توجه به نقش اسیدهای چرب امگا-۳ در تولید و آزادسازی نوروترانسمیتر استیل کولین، و همچنین تأثیر این اسیدهای چرب در افزایش حافظه و اعمال شناختی، عصاره آبی گیاه خرفه باعث افزایش میزان حافظه و یادگیری شده است.

تشکر و قدردانی

از متصدیان مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان نمازی شیراز، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

۱. گایتون، آ.، هال، ج.، ترجمه بیگدلی، م. ۱۳۸۷. فیزیولوژی پزشکی، جلد ۱، انتشارات تیمورزاده.

2. Antony C. (2001), Purslane (*Portulaca Oleracea*), Personal care magazine. 2(4): 7-15.

3. Daniells S. (2010), Omega-3 may reduce risk of Alzheimer's. Neurochemistry, 112(4): 1054-1064.

4. Dash P. K., Mach S. A., Blum S. and Moore A. N., (2002). Intrahippocampal Wortmannin Infusion Enhances Long _Term Spatial and contextual Memories. Research paper, 90(4):167-177.

5. Freemantle E., Vandel M., Trembly-Mercier J., Tremblay S., Blachere J. C., Michel E., Begin J., Brenna T., Windust A. and Stephene C. (2006), Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during again. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty Acids. 75: 213-220.

6. Kris Etherton P. M., Grieger J. A. and Etherton T. D. (2009), Dietary refrence intakes for DHA and EPA. Prostaglandins Leukotrienes Essential fatty Acids. 12.

7. Rashidpour A., Motaghed-Larigani Z. and Bures J. (1996), Reversible in activation of the medial septal avea impairs consolidation but not retrieval of passive avoidance learning in rats. Brain Res. 72: 185-188.

8. Vinot N., Jouin M. L., Homme D. A., Guesnet P., Allessandri M. H., Aujard F., and Pifferi F. (2011), Omega-3 fatty acids from fish oil lower Anxiety; improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate. Poneoo, 20491(6): 105.