

ORIGINAL ARTICLE

The effect of kaempferol from flavonoids of chamomile plant (*Matricaria recutita*) on memory disorders and oxidative stress caused by streptozotocin effect in adult male rats

Reza Pourrabie*

Department of Biology, Islamic Azad University, Marand Branch Iran.

Correspondence

Reza Pourrabie

Email: Pourrabie@gmail.com

How to cite

Pourrabie, R. (2024). The effect of kaempferol from flavonoids of chamomile plant (*Matricaria recutita*) on memory disorders and oxidative stress caused by streptozotocin effect in adult male rats. *Experimental Animal Biology*, 12(48), 53-64.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative diseases. Beta-amyloid plaques and neurofibrillary tangles are two important factors in Alzheimer's disease. Many cellular changes, such as oxidative stress, neuronal inflammation, and mitochondrial disorders are also seen in Alzheimer's disease, which lead to neuronal death. Kaempferol, one of the plant flavonoids derived from the chamomile plant, has important effects on disorders related to brain diseases such as Alzheimer's disease due to the production of antioxidants. In this study, the effects of chamomile plant flavonoids on memory disorders in Alzheimer's rats were studied. For prepare and purify kaempferol, the hydroalcoholic extract of the collected chamomiles, and quantitative-qualitative analysis of the chemical substances of the chamomile extract using gas chromatograph connected to mass spectrometer (GC/MS) method were used. In this study, we used of 56 adult male rats were divided into 7 groups including control - vehicle 1 (kaempferol solvent) - vehicle 2 (streptozotocin drug solvent) - Alzheimer's - kaempferol 120mg/kg - kaempferol 250mg/kg - kaempferol 400mg/kg. Diabetes was induced by injecting a single dose of 60 mg/kg streptozotocin intraperitoneally. Kaempferol were administered for 15 days. The shuttle box device was used to measure memory and learning, and the delay time in the shuttle box was recorded. The results were analyzed by SPSS 22 software, ANOVA and Tokay tests. The significance of the data difference was considered at the $p \leq 0.05$ levels. The results of the data analysis showed that the doses of 400 mg/kg and 250 mg/kg of kaempferol of chamomile plant significantly increased the delay time in entering the dark section at $p \leq 0.001$ compared to the control group and improved spatial memory in rats. Which does this effect is probably due to the presence of compounds such as quercetin and phytoestrogens. Also, oxidative stress parameters were significantly reduced in Alzheimer's groups treated with chamomile flavonoids ($P < 0.001$). The results of the experiments show that plant flavonoids are able to restore the spatial memory and oxidative stress parameters of the groups treated with streptozotocin to normal levels.

KEYWORDS

Alzheimer, kaempferol, learning, Oxidative stress, rat.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

تأثیر کامپفرول از فلاونوئیدهای گیاه بابونه (*Matricaria recutita*) بر روی اختلالات حافظه و استرس اکسیداتیو ناشی از اثر استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی نر بالغ

سید رضا پورربی*

گروه زیست‌شناسی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران.

چکیده

بیماری آلزایمر یکی از شایع‌ترین بیماری‌های از بین برنده نورونی است. پلاک‌های بتا‌آمیلوئیدی و کلافهای نوروفیبریلاری دو عامل مهم در بیماری آلزایمر هستند تغییرات سلولی زیادی، نظیر استرس اکسیداتیو، التهاب نورونی و اختلالات میتوکندریایی نیز در آلزایمر دیده می‌شوند که منجر به مرگ نورونی می‌شوند. کامپفرول از فلاونوئیدهای گیاهی مشتق شده از گیاه بابونه به‌خاطر تولید آنتی‌اکسیدان‌ها، دارای اثرات مهم بر روی اختلالات مربوط به بیماری‌های مغزی نظیر بیماری آلزایمر می‌باشد. در این مطالعه اثرات فلاونوئیدهای گیاهی بابونه بر روی اختلالات حافظه در موش‌های صحرایی آلزایمری شده مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور از عصاره هیدروالکلی بابونه‌های جمع‌آوری شده و آنالیز کمی - کیفی مواد شیمیایی عصاره بابونه با استفاده از روش کروماتوگراف گازی متصل به اسپکترومتر جرمی (GC/MS) جهت تهیه و تخلیص کامپفرول استفاده شد. در این مطالعه از ۵۶ موش صحرایی نر بالغ که به هفت گروه شامل کنترل - حامل ۱ (حلال کامپفرول) - حامل ۲ (حلال داروی استرپتوزوتوسین) - آلزایمر - کامپفرول ۱۲۰ mg/kg - کامپفرول ۲۵۰ mg/kg - کامپفرول ۴۰۰ mg/kg - مورد استفاده قرار گرفت. القای دیابت با تزریق تک‌دوز ۶۰ mg/kg داروی استرپتوزوتوسین به‌صورت درون صفاقی صورت گرفت. تجویز کامپفرول تا ۱۵ روز انجام و برای سنجش میزان حافظه و یادگیری از دستگاه شاتل باکس استفاده شد و مدت زمان تأخیر در ورود شاتل باکس ثبت گردید. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۲ و به‌کمک آزمون‌های ANOVA و توکی آنالیز شدند. معنی‌داری اختلاف داده‌ها در سطح $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد دوزهای ۴۰۰ و ۲۵۰ mg/kg از کامپفرول گیاه بابونه باعث افزایش معنی‌دار مدت زمان تأخیر در ورود به بخش تاریک در سطح $P \leq 0.001$ نسبت به گروه کنترل شدند و باعث بهبود حافظه فضایی در موش‌های صحرایی شد. هم‌چنین پارامترهای استرس اکسیداتیو در گروه‌های آلزایمری تیمار شده با کامپفرول گیاه بابونه کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.001$). نتایج آزمایشات نشان می‌دهند که فلاونوئیدهای گیاهی قادر به بازگرداندن عملکرد حافظه فضایی و مقدار پارامترهای استرس اکسیداتیو گروه‌های تحت تیمار با داروی استرپتوزوتوسین به سطح طبیعی است.

واژه‌های کلیدی

آلزایمر، کامپفرول، یادگیری، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی.

نویسنده مسئول:

رضا پورربی

رایانامه: Pourrabie@gmail.com

استناد به این مقاله:

پورربی، رضا (۱۴۰۳). تأثیر کامپفرول از فلاونوئیدهای گیاه بابونه (*Matricaria recutita*) بر روی اختلالات حافظه و استرس اکسیداتیو ناشی از اثر استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی نر بالغ. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲ (۴۸)، ۵۳-۶۴.

مقدمه

یادگیری و حافظه از مهم‌ترین سطوح عملکردی اعصاب مرکزی به‌شمار می‌رود و فرایندی است که با برقراری ارتباط حیوان با دنیای اطراف خود می‌شود. حافظه در اصل مکانیسمی برای کدبندی، ذخیره‌سازی و فراخوانی دوباره اطلاعات یاد گرفته شده است (Sharifzadeh, 2005). بیماری آلزایمر جزو بیماری‌های نورودژنراتیو مربوط به افراد مسن می‌باشد که در آن‌ها اختلالات حافظه (Monica, 2016)، اختلالات گویایی (Monica, 2016)، اختلالات بینایی فضایی (Luigi, 2016) و ناتوانی‌های حسی و حرکتی (Hardy, 2002) دیده می‌شود. این بیماری در نتیجه تجمع و افزایش پروتئین بتا آمیلوئید به‌وجود می‌آید که در نهایت تولید پلاک‌های مغزی و دیستروپی سلول‌های عصبی در مناطق انتهایی نئوکورتیکال و دیگر مناطق مغزی می‌باشد (Brock, 2010).

رادیکال‌ها رادیکال‌های آزاد با تخریب بافت مغز باعث ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند و عمل میانجی‌های نورونی را مختل می‌کنند، در نتیجه از عوامل اصلی در آلزایمر و تخریب نورونی می‌باشند. مغز برای خنثی کردن رادیکال‌ها رادیکال‌های آزاد به آنتی‌اکسیدان نیازمند است و هم‌چنین بتا آمیلوئید به‌واسطه ایجاد استرس اکسیداتیو باعث افزایش مرگ نورونی می‌شود (Behl, 2005).

پژوهش‌های بالینی نشان می‌دهد استرس اکسیداتیو در پاتوفیزیولوژی زوال عقل در میان دیگر اختلالات عصبی وابسته به سن نقش دارد (Nasri, 2013). یکی از عواملی که در پاتوژنز بیماری آلزایمر نقش مؤثری بازی می‌کند، استرس اکسیداتیو بوده که یک عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی‌اکسیدانی است (Rafieian-Kopaei, 2013). رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند به پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غشاهای چربی حمله کنند و در نتیجه عملکرد سلول را مختل نمایند (Nasri, 2003; Bassett, 2014). بافت مغز حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب اشباع نشده است که به‌ویژه نسبت به حملات رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیر هستند. تصور می‌شود پراکسیداسیون لیپیدی به‌صورت غالب، فرم مخرب آسیب اکسیداتیو نورونی است که به غشا آسیب رسانده و چندین محصول ثانویه تولید می‌کند (Gu, 1998). استرس اکسیداتیو اختلاف بین میزان تولید رادیکال آزاد و حذف از طریق مکانیسم آنتی‌اکسیدانی درون‌زا است که در این میان می‌توانیم به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز اشاره کنیم (Nasri, 2013). افزایش سطح مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان

شاخص معتبر پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته می‌شود (Nasri, 2013; Rafieian-Kopaei, 2013).

اختلال در یادگیری و حافظه می‌تواند به‌صورت شیمیایی با تزریق درون‌صفافی داروی استرپتوزوتوسین و دیابتی کردن آن‌ها در حیوانات آزمایشگاهی القا شود. تجمع پروتئین بتا آمیلوئید و استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بیماری‌زایی آلزایمر دارد. پپتیدهای بتا آمیلوئید به‌طور مستقیم و غیرمستقیم موجب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شوند. بتا آمیلوئید می‌تواند به‌صورت آنزیم عمل کرده و پراکسید هیدروژن را تولید نماید و از طریق احیای آهن و هم‌چنین با اتصال به پروتئین‌های میتوکندریایی رادیکال‌های آزاد تولید نموده و با القای التهاب نورونی باعث بروز استرس اکسیداتیو شود (Aslan, 2004; Lustbader, 2004).

مطالعات بسیاری نقش التهاب نورونی در بیماری‌زایی آلزایمر را بررسی کرده‌اند. به‌نظر می‌رسد که افزایش فعالیت میکروگلیاها و آستروسیت‌ها و افزایش میزان سیتوکین‌ها، ارتباط مستقیمی با پلاک‌های پیری در بیماران مبتلا به آلزایمر دارد. با وجود این که میکروگلیا توانایی فاگوسیت دارد، اما به‌دلیل حضور سیتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، قادر به فاگوسیت بتا آمیلوئید نمی‌باشد (Calsolaro, 2016; ElAli, 2016).

پژوهش‌های نتایج امیدوارکننده‌ای از اثر داروهای گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی در درمان یا پیشگیری بیماری‌های مختلف از جمله مشکلات حافظه (Rabiei, 2012, 2013, 2014)، استرس (Navidi, 2024) سکنه‌های مغزی (Rabiei, 2012, 2014)، مشکلات گوارشی (Sedighi & Moradi, 2013, 2014)، دیابت (Akbari, 2013; Nasri, 2014)، قلبی-عروقی (Shirzad, 2013, 2013)، سرطان (Khosravi-Boroujeni, 2012, 2013)، اثرات با (Azadmehr, 2009) را نشان می‌دهند. این اثرات با وجود مواد اختصاصی موجود در آن‌ها و هم‌چنین مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها ارتباط داده می‌شود. بابونه از گیاهان گلدار چند ساله است که در مناطقی از جمله اروپا، آسیا و آفریقا رشد می‌کند و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است. بابونه با نام علمی *Matricaria recutita* گیاهی است دارای بویی معطر که در چمنزارها و زمین‌های شنی می‌روید و در حال حاضر در طب سنتی ایران به‌عنوان تسکین‌دهنده درد و تب و یک عامل ضد اسپاسم مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hosseinpour, 2013).

منشأ اصلی گیاه بابونه در نواحی مختلف مدیترانه بوده ولی امروزه در تمام جهان انتشار پیدا نموده است. قسمت مورد استفاده درمانی بابونه فقط کاپیتول‌های آن بوده که وقتی رسیده یا باز

تحت تأثیر داروی استرپتوزوتوسین طراحی و تست‌های رفتاری به‌وسیله دستگاه شاتل باکس انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۵۶ سر موش سفید بزرگ نر نژاد ویستار (انستیتو پاستور، سرم سازی مرنده) در میانگین وزنی ۲۳۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. تمام حیوان‌ها در دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های هشت تایی در هر قفس چهار سر موش قرار داده شدند. حیوان‌ها آزادانه به آب و غذای مخصوص موش به‌مدت شش هفته دسترسی داشتند.

در این پژوهش‌ها موش‌های صحرایی نر بالغ که به هفت گروه شامل کنترل- گروه حامل ۱ (حلال کامپفرول)- حامل ۲ (حلال داروی استرپتوزوتوسین)- آلازایمر- کامپفرول ۴۰۰ mg/kg- ۱۲۰- کامپفرول ۲۵۰ mg/kg- کامپفرول ۴۰۰ mg/kg تقسیم شده بودند تحت آزمایش قرار گرفتند.

روش تهیه عصاره هیدروالکلی بابونه

ابتدا گیاه بابونه از مناطق مختلف شهرستان مرنده جمع‌آوری و بعد از تأیید به‌وسیله متخصصین گیاه‌شناسی، در سایه خشک و عصاره‌های هیدروالکلی (اتانل ۷۰ درصد و آب ۳۰ درصد) آن‌ها به‌روش خیساندن (ماسراسیون) به‌مدت ۴۸ ساعت در دو نوبت تهیه و با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان در دمای پایین به پودر عصاره تبدیل شدند (McDonald, 2001).

تعیین ترکیبات فنلی

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده (۰/۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فولین سیوکالتیو اضافه گردید و پس از ۳ تا ۵ دقیقه مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر از کربنات سدیم ۷۵ درصد اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه آنکوباسیون در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در مقابل بلانک آب مقطر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف اسید گالیک تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فنل تام هر عصاره برحسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه گردید (Karimi, 2013).

هستند جمع‌آوری می‌شوند. اثرات ضد دردی و ضدتشنجی این گیاه نیز به خواص آنتی‌اکسیدانی و فلاونوئیدهای موجود در گیاه نسبت داده شده است (Hosseinpour, 2013).

یکی از رویدادهای سلولی و مولکولی که در بیماری آلازایمر موجب تحلیل عصبی می‌شود، استرس اکسیداتیو است (Mu, 2013; Höglund, 2011). پلی فنول‌ها به‌دلیل تواناییشان در تعدیل این رویدادهای سلولی به‌عنوان ترکیبات محافظت‌کننده نوروئی موردتوجه قرار گرفته‌اند. از فراوان‌ترین پلی فنول‌ها، فلاونوئیدها می‌باشند که به‌وفور در عصاره هیدروالکلی بابونه وجود دارند و از فلاونوئیدهای غالب گیاه بابونه می‌توان به کامپفرول اشاره کرد. بررسی‌های اپیدمیولوژیک، مشاهده‌ای و تجربی پیشنهاد می‌کنند که رژیم‌های غنی از، عملکرد شناختی را بهبود داده و مانع از تحلیل رفتن شدید نوروئی در موش‌های صحرایی نر بالغ آلازایمری شده می‌شود. استرس اکسیداتیو به‌عنوان عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد و آسیب اکسیداتیو نتیجه این عملکرد است که شامل اکسیداتیو ماکرومولکول‌های سلول، مرگ سلولی نظیر آپوپتوز یا نکروز و تخریب بافتی است (Lykkesfeldt, 2007). گستره وسیع و متفاوت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نوروئها اندازه‌گیری تک‌تک آن‌ها را مشکل می‌سازد و از طرفی به‌خاطر هم‌پوشانی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها اندازه‌گیری جداگانه آن‌ها نمی‌تواند گویای عملکرد کامل آن‌ها شد. بنابراین اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی محلول هموئین تهیه‌شده از سیستم لیمیک گروه‌های مختلف از نمونه‌های تحت آزمایش پارامتر مناسبی برای ارزیابی وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی عصاره بابونه می‌باشد (Cao & Prior, 1998).

براساس شواهد به‌دست‌آمده از بررسی‌های حیوانی و مدل‌های سلولی، فلاونوئیدهایی از قبیل نارنجین^۱ کم‌ترین اثرات و فلاونول‌ها از قبیل کوئرستین^۲، کامپفرول^۳ و میرستین^۴ قوی‌ترین اثرات ضدالتهابی را نشان می‌دهند (Youdim, 2003; Khan, 2020). عمده‌ترین ترکیب از زیرگروه فلاونول، کامپفرول است که ۶۰ درصد تا ۷۵ درصد از فلاونوئیدهای رژیم غذایی را شامل می‌شود.

این مطالعه با هدف بررسی اثر درمانی کامپفرول از فلاونوئیدهای گیاهی بر اختلالات حافظه و یادگیری و تعیین میزان استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر آلازایمری شده

1. Naringenin
2. Quercetin
3. Kaempferol
4. Myricetin

تعیین ترکیبات فلاونوئید

برای اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئید، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هر عصاره (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد مخلوط و مقدار ۳ میلی‌لیتر اسنات‌پتاسیم ۵ درصد به آن‌ها اضافه گردید. پس از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش، رقت‌های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه گردید. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونوئید هر عصاره برحسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه گردید (Parsaei, 2013).

تعیین ترکیبات فلاونولی

جهت اندازه‌گیری ترکیبات فلاونولی ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هر عصاره (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد مخلوط و مقدار ۳ میلی‌لیتر اسنات سدیم ۵ درصد به آن‌ها اضافه گردید. پس از ۲/۵ ساعت جذب نمونه‌ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۴۰ نانومتر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه گردید. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونول هر عصاره برحسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه گردید (Asadi, 2013).

روش آزمایش

کامپفرول از فلاونوئیدهای گیاهی، بعد از رقیق‌سازی با آب استریل دو بار تقطیر شده، هفت روز پس از تزریق استریل‌توزوسین به‌مدت دو هفته به‌صورت داخل صفاقی و روزانه تزریق گردید (Sharma & Kulkarni, 2006). برای دیابتی کردن موش‌ها جهت القای بیماری آلزایمر، از داروی استریل‌توزوسین (سیگما، آمریکا) تک‌دوز ۶۰ mg/kg و محلول در نرمال سالین استریل به‌صورت داخل صفاقی مورد استفاده قرار گرفت. یک هفته پس از تزریق، برای اطمینان از دیابتی بودن حیوانات، قند خون آن‌ها اندازه‌گیری گردید، فقط حیوانات دیابتی با میزان قند خون بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به مراحل بعدی راه یافتند، البته در روزهای بعد، علائم بارز پرخوری، پرنوشی، دیورز و کاهش وزن نیز در موش‌ها به‌تدریج دیده شد. درضمن، کاهش وزن در پایان کار در تمامی موش‌ها مشاهده گردید. وزن حیوانات قبل از شروع آزمایش‌ها و همچنین در طی هفته‌های

سوم و ششم حین آزمایش‌ها نیز تعیین گردید. همچنین اندازه‌گیری میزان گلوکز سرمی توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست‌شیمی، تهران) با استفاده از اسپکتروفوتومتر انجام شد. برای سنجش میزان حافظه و یادگیری از دستگاه شاتل باکس استفاده گردید و مدت زمان تأخیر در ورود شاتل باکس ثبت شد. بعد از آخرین تست رفتاری با ازمون احترازی غیر فعال، رت‌ها با پنبه آغشته به اثر بی‌هوش و سر آن‌ها توسط گیوتین جدا و بر روی تخته یخ بسته قرار داده شد. هیپوکامپ از مغز جدا شده و بلافاصله در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. هموژن بافتی با استفاده از هموژنایزر مکانیکی تهیه شد. بعد از سانتریفیوژ کردن در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، محلول شفاف رویی از رسوب زیرین جدا شده و برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت (Ghadrdoost et al., 2011).

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون DPPH^۱

در این روش برای ترکیب رادیکالی پایداراز DPPH به‌عنوان معرف استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ میکروگرم در سی‌سی عصاره‌ها در متانول به ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH در متانول اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه در دمای معمول اتاق جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانو متر بر علیه بلانک قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد $I(\%) = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}$ با استفاده از فرمول DPPH محاسبه گردید. در این فرمول A_{control} جذب نوری کنترل منفی را که فاقد عصاره می‌باشد نشان می‌دهد A_{sample} میزان جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره را بیان می‌کند. پس از آن غلظتی از عصاره که دارای درصد مهار رادیکالی ۵۰ بود توسط نمودار محاسبه گردید. بدیهی است که هرچه این عدد کوچک‌تر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیش‌تر می‌شود که در این آزمایش به‌عنوان کنترل مثبت آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی تولون بوتیل‌شده در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها دو بار تکرار شدند (Sharafati, 2011).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده در نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری شدند. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه برای مقایسه اثرات

سه روز و پس از آن در پایان هر هفته با رعایت هشت ساعت محرومیت از غذا انجام و گلوکز خون ثبت می‌شد. همچنین جهت اطمینان، نمونه‌های خون ۱۵ دقیقه پس از خون‌گیری با ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شده و میزان گلوکز سرم به روش آنزیمی - رنگ‌سنجی روش گلوکز اکسیداز-پراکسیداز توسط دستگاه اتو آنالیزور مدل RA1000 ساخت شرکت تیچینکو آمریکا و کیت شرکت پارس‌آزمون (ایران) اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey بررسی شدند.

گروه‌های کنترل، حامل‌ها تغییرات معنی‌داری را نسبت به گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین نشان داد. هر یک از هیستوگرام‌ها نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار (mean $\pm$ SD) از زمان STLs می‌باشد. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه هشت عدد و تغییرات $P < 0.01$ معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل می‌باشند (شکل ۱- ب).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که دیابت، سبب تخریب فرایندهای یادگیری و حافظه می‌شود زیرا میانگین مدت زمان STL1, 2 در این گروه به‌صورت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد که نشان‌دهنده عملکرد ضعیف و کاهش یادگیری در موش‌های دیابتی است. نقص در اعمال شناختی در حیوانات دیابتی‌شده توسط STZ ممکن است ناشی از تغییرات سطح گلوکزی یا هیپرگلیسمی نوروٹوکسیک در ارتباط با نوروٹرانسمیتر استیل کولین باشد.

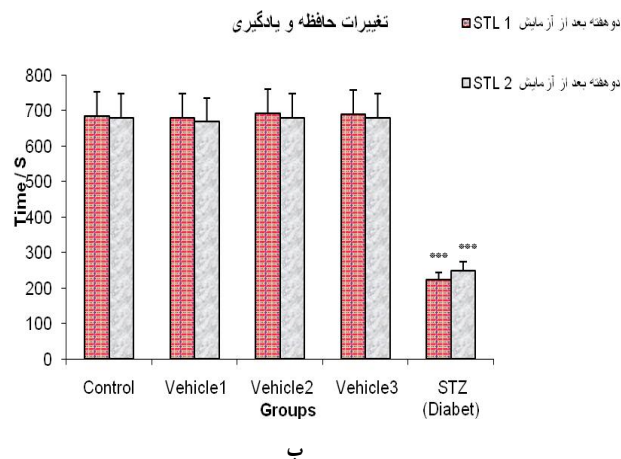
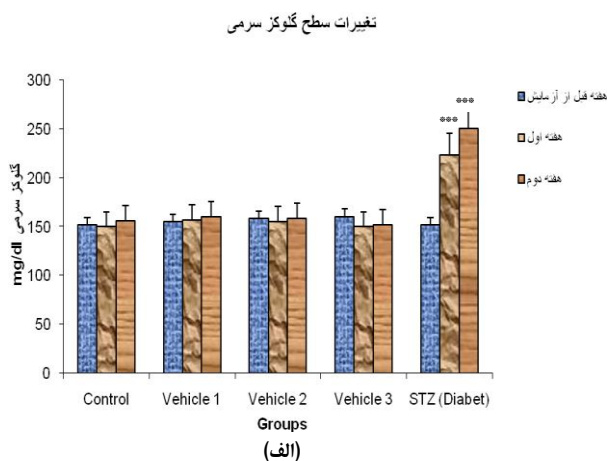
دوزهای مختلف هر دارو با گروه مربوطه و از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه برای بررسی اثرات برهم‌کنش بین داروها استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار ارائه گردید بعد از معنی‌داربودن تفاوت‌ها، برای مقایسه تفاوت گروه‌های آزمایشی از پس آزمون توکی استفاده شد $P < 0.05$ به‌عنوان تفاوت معنی‌دار گروه‌ها مورد ملاک قرار گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2021 صورت گرفت.

نتایج

نتایج تزریق داروی استرپتوزوتوسین

میزان گلوکز سرم، در گروه‌های تیمار شده با داروی استرپتوزوتوسین (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی) در هفته‌های اول و دوم تفاوت معنی‌داری $P < 0.005$ را نسبت به گروه‌های کنترل و حامل‌ها نشان داد (شکل ۱- الف).

نتایج اخذ شده نشان داد، میانگین سطح قند خون در گروه‌های کنترل و حامل، در سطح پایین، یعنی ۱۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر قرار داشت. در صورتی که میزان قند خون در گروه تیمار شده با داروی استرپتوزوتوسین در محدوده ۲۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر رسید که نشان‌دهنده دیابتی‌بودن حیوان بود. قبل از انجام آزمایش تمامی موش‌ها با استفاده از دستگاه گلوکومتر Accu-check مدل Active ساخت کارخانه Roche آلمان و با اخذ یک قطره خون از دم، گلوکز خون آن‌ها اندازه‌گیری شد. این کار پس از دیابتی کردن موش‌ها تا



شکل ۱. الف) تغییرات سطح گلوکز سرمی در هفته‌های اول و دوم آزمایش‌ها پس از تزریق داروی استرپتوزوتوسین نسبت به موش‌های صحرایی کنترل و حامل‌ها $P < 0.005$ ***

ب) نتایج آزمون احترازی غیر فعال STL1 (حافظه کوتاه‌مدت) و STL2 (حافظه بلندمدت) گروه‌های کنترل، حامل‌ها و گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین تک‌تک هیستوگرام‌ها نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار (mean $\pm$ SD) از زمان STLs می‌باشد. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه هشت عدد و تغییرات $P < 0.01$ معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

نتایج تزریق عصاره هیدروالکلی بابونه

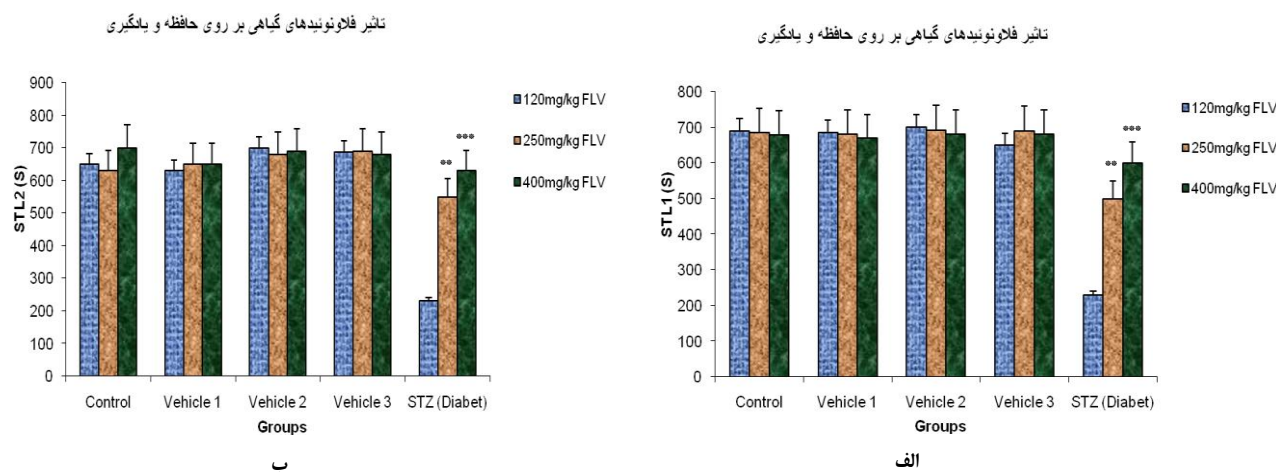
با توجه به نتایج مطالعات آماری موجود در شکل (۲) بیان می‌کند که تأثیر فلاونوئیدهای گیاهی با دوزهای مختلف، هیچ‌گونه تغییرات معنی‌دار، در گروه‌های کنترل، حلال شماره ۱ (حلال آبی)، حلال شماره ۲ (حلال اتانولی ماده مؤثره عصاره بابونه) و حلال شماره ۳ (حلال داروی استرپتوزوتوسین) نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی‌شود، این موضوع بیان می‌کند که حلال قادر به افزایش میانگین زمان حافظه کوتاه‌مدت (STL1) و حافظه بلندمدت (STL2) نیست و تنها ماده مؤثره عصاره بابونه، کامپفرول قادر به افزایش زمان 2، STL1 می‌باشد. هم‌چنین شکل‌های (۱) و (۲) نشان می‌دهد، هیچ‌گونه تأثیر مواد آزمایشگاهی بر روی گروه کنترل، انجام نشده و این گروه تنها برای مقایسه گروه‌های دیگر در راستای مطالعه تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه در نظر گرفته شده است در این گروه میزان عملکرد حافظه کوتاه‌مدت (STL1) و حافظه بلندمدت (STL2) مقادیر بالایی را نشان می‌دهد.

نتایج آماری مربوط به تأثیر کامپفرول از فلاونوئیدهای گیاهی با دوز ۱۲۰ mg/kg بر روی گروه دیابتی نشان می‌دهد که عملکرد حافظه کوتاه‌مدت (STL1) و حافظه بلندمدت (STL2) نسبت به گروه دیابتی تغییرات معنی‌داری پیدا نکرده است و بیانگر این موضوع است که عملکرد حافظه کوتاه‌مدت و بلندمدت گروه‌های دیابتی با تأثیر کامپفرول با دوز ۱۲۰ mg/kg افزایش

پیدا نمی‌کند و اختلالات حافظه و یادگیری همانند گروه دیابتی باقی می‌ماند.

نتایج آماری مربوط به تأثیر کامپفرول با دوز ۲۵۰ mg/kg بر روی گروه دیابتی نشان می‌دهد که عملکرد حافظه کوتاه‌مدت (STL1) و حافظه بلندمدت (STL2) نسبت به گروه دیابتی تغییرات معنی‌دار $P \leq 0.01$ کرده است. بنابراین، اثرات تخریبی هیپرگلیسمی که در عملکرد شناختی و حافظه و یادگیری نمونه‌های موردآزمایش به‌جای گذاشته است با تأثیر کامپفرول با دوز ۲۵۰ mg/kg به‌صورت معنی‌دار در محدوده $P \leq 0.01$ تغییر پیدا می‌کند و تظاهرات حافظه و یادگیری در این گروه نسبت به گروه دیابتی بهبود می‌یابد.

با بررسی نتایج آماری مربوط به گروه دیابتی تیمار شده با کامپفرول ۴۰۰ mg/kg نشان می‌دهد که عملکرد حافظه کوتاه‌مدت (STL1) و حافظه بلندمدت (STL2) نسبت به گروه دیابتی تغییر معنی‌دار $P \leq 0.001$ کرده است، به‌طوری‌که اثرات تخریبی هیپرگلیسمی که در قسمت‌های مختلف مغز به‌جای گذاشته است و عملکردهای شناختی و حافظه و یادگیری را تحت تأثیر قرار داده است، با تأثیر کامپفرول با دوز ۴۰۰ mg/kg به‌صورت معنی‌دار در محدوده $P \leq 0.001$ افزایش پیدا می‌کند و علائم بالینی مربوط به اختلالات حافظه و یادگیری در این گروه از بین رفته و حافظه کوتاه‌مدت و بلندمدت همانند گروه کنترل مشاهده می‌شود (شکل ۲- الف و ب).



شکل ۲. تأثیر کامپفرول از فلاونوئیدهای گیاه بابونه در گروه‌های کنترل، دیابتی و حلال‌های مواد بر روی میزان عملکرد.

(الف) حافظه کوتاه‌مدت (STL1) و (ب) حافظه بلندمدت (STL2).

در آزمون یادگیری احترازی غیر فعال. داده‌ها به شکل $SEM \pm Mean$ و $n=8$ حیوان در هر گروه می‌باشد.

*** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ در مقایسه با گروه دیابتی Cut of time = 900s

استانداردسازی عصاره اتانولی بابونه

میزان ترکیبات فنولی، فلاونولی و فلاونوئیدی در عصاره بابونه به ترتیب ۷۸/۴، ۲۶/۵ و ۴۷/۶ میلی گرم بر گرم خشک عصاره گیاه بابونه است. در ارتباط با فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه بابونه میزان IC50^۱ برای فعالیت مهار رادیکالی برای عصاره گیاه بابونه در جدول (۱) بیان شده است

جدول ۱. فعالیت آنتی اکسیدانی کامپفرول از فلاونوئیدهای گیاه بابونه

با بوتیلید هیدروکسی تولوئن به عنوان کنترل مثبت در روش DPPH داده‌ها به صورت میانگین گرم‌های غلظتی می‌باشند.

نمونه	غلظت برحسب (µg/ml)	درصد مهار رادیکالی DPPH (IC50%)
عصاره بابونه	۱۰	۵/۸
	۱۵	۱۸
	۲۰	۲۲/۵
	۲۵	۲۷/۵
	۳۰	۳۲/۴
	۴۰	۴۱/۲۹
	۵۰	۴۹/۲ IC50
	۶۰	۵۶/۹
	۷۰	۶۳/۵
	۸۰	۷۴/۸
بوتیلین هیدروکسی تولوئن	۲۰	۸/۸
	۵۰	۱۴/۴
	۱۰۰	۳۰/۷ IC50
	۲۵۰	۶۸/۲
	۵۰۰	۷۹/۳
	۷۰۰	۹۵/۳

بحث و نتیجه گیری

بیماری آلزایمر، بیماری نورودژنراتیوی است که به علت تخریب نورون‌های مناطق مختلف کورتکس مغزی، به ویژه نورون‌های کولینرژیک بخش هیپوکامپ و کورتکس مغز جلویی ایجاد می‌گردد (Villemagne, 2013). بیماری مذکور با اختلالات حافظه و یادگیری از قبیل اختلال در یادآوری، اختلال در یادگیری - اختلال در حافظه کوتاه مدت و درازمدت و ... همراه است (Schneider, 2009). در این مطالعه بررسی ماده مؤثره عصاره هیدرو الکلی بابونه (کامپفرول) بر روی اختلالات حافظه و یادگیری در موش‌های صحرایی دیابتی شده با داروی

استرپتوزوتوسین بررسی شد، که یکی از روش‌های معمول برای ایجاد بیماری آلزایمر می‌باشد (Agrawal, 2009; Grünblatt, 2006). داروی استرپتوزوتوسین، به عنوان داروی مؤثر در سیستم عصبی مرکزی و سیستم محیطی می‌باشد (Szkudelski, 2001)، از داروی استرپتوزوتوسین، برای اولین بار برای ایجاد مدل آزمایشی بیماری آلزایمر در جوندگان استفاده نمودند، به طوری که کاربرد فرایند حافظه و یادگیری ظرف دو هفته دچار اختلال شد (Weinstock, 2004). نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز همین مسئله را تأیید نمود. نتایج مطالعات در این زمینه نشان می‌دهد که تزریق درون صفاقی داروی استرپتوزوتوسین باعث اختلال در گیرنده‌های انسولین مغزی می‌شود. در این راستا، اختلال در مصرف گلوکز، اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها، کاهش تولید ATP و در نهایت عدم تنظیم انرژی که به وسیله گیرنده‌های انسولین مغزی مشاهده می‌شود که در بیماری آلزایمر زودرس نیز دیده می‌شود (Hayashi, 1998)، این عمل باعث ایجاد اختلالاتی در فعالیت غشای سلولی و عامل تجمع فرایندهای آمیلوئید و ژنتیک و هیپرفسفوریلاسیون پروتئین تائو می‌شود. با توجه به پژوهش‌های بیان شده، استفاده از داروی استرپتوزوتوسین با دوز پایین باعث ایجاد اختلال و آسیب به پیام‌های مربوط به گیرنده‌های انسولینی مغز شده که عامل ایجاد تیپ دوم دیابت ملیتوس می‌باشد، در صورتی که دوز بالای داروی استرپتوزوتوسین، باعث اختلال در ساختمان سلول‌های بتا جزائر لانگرهانس شده که در نهایت باعث کاهش تولید انسولین شده و بیماری تیپ اول دیابت ملیتوس را ایجاد می‌نماید (Becker, 1994; Szkudelski, 2001). داروی استرپتوزوتوسین در درون سلول‌های مغزی، رادیکال‌های آزاد، نیتریک اکسید و پراکسید هیدروژن را به وجود می‌آورد که عامل ایجاد تغییرات ساختاری، نورو شیمیایی و رفتاری است که در ارتباط با بیماری آلزایمر نیز دیده می‌شود. (Szkudelski, 2001; Shoham, 2003).

نتایج آزمون احترازی غیرفعال STL1 (حافظه کوتاه مدت) و STL2 (حافظه بلندمدت) گروه دریافت کننده داروی استرپتوزوتوسین نسبت به گروه‌های کنترل و حامل‌ها تغییرات معنی داری را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از این مطالعه در شکل (۱-ب) نشان می‌دهد که دیابت، سبب تخریب فرایندهای یادگیری و حافظه می‌شود چون میانگین مدت زمان مربوط به حافظه کوتاه مدت و بلندمدت

1. Half-maximal inhibitory concentration

آثار حفاظت نوروونی در به‌کارگیری عصاره گیاه بابونه در ایسکمی‌های مغزی در موش صحرایی گزارش شده است (Chandrashekhar, 2010).

هم‌چنین مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که اثر حفاظت نوروونی عصاره متانولی گیاه بابونه در استرس اکسیداتیو ناشی از تأثیر آلومینیوم فلوراید دیده می‌شود (Ranpariya, 2011).

با توجه به نتایج آماری مربوط به شکل (۲)، تأثیر کامپفرول گیاهی با دوزهای ۲۵۰ mg/kg و ۴۰۰ بر روی گروه دیابتی نشان می‌دهد که عملکرد حافظه کوتاه‌مدت و حافظه بلندمدت نسبت به گروه دیابتی تغییرات معنی‌داری پیدا کرده است و اثرات تخریبی هیپرگلیسمی که در عملکرد شناختی و حافظه و یادگیری نمونه‌های مورد آزمایش به‌جای گذاشته است با تأثیر ماده مؤثره عصاره بابونه بهبود یافته و تظاهرات حافظه و یادگیری در این گروه نسبت به گروه دیابتی افزایش می‌یابد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ماده مؤثره عصاره بابونه باعث بهبود حافظه کوتاه‌مدت و حافظه بلندمدت در موش‌های صحرایی می‌شود که این اثر را به‌خاطر داشتن ترکیبات فلاونوئیدی نظیر کامپفرول و آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌نماید.

پیشنهادهات

برای اطمینان از اثرات قطعی کامپفرول بر روی اختلالات حافظه و یادگیری، مطالعات بافت‌شناسی قسمت‌های مختلف مغزی به‌ویژه منطقه هیپوکامپ و در نتیجه مطالعات کارآزمایی بالینی پیشنهاد می‌شود.

در این گروه به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا می‌کند. نقص در اعمال شناختی در حیوانات دیابتی‌شده توسط STZ ممکن است ناشی از تغییرات سطح گلوکزی یا هیپرگلیسمی نوروٹوکسیک در ارتباط با نوروون‌های کولینرژیک و میزان ترشح نوروٹرانسمیتر استیل کولین باشد.

تجمع بتا آمیلوئید نقش مهمی در بیماری‌زایی آلزایمر دارد. اگرچه استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد بیماری آلزایمر داشته و به‌طور وسیعی در این بیماری ایجاد می‌شود. پپتیدهای بتا آمیلوئید به‌طور مستقیم و غیرمستقیم موجب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شوند. بتا آمیلوئید می‌تواند به‌صورت آنزیماتیک عمل کرده و پراکسید هیدروژن را تولید نماید و از طریق احیای آهن، رادیکال‌های آزاد را تولید کند. علاوه بر این، با اتصال به پروتئین‌های میتوکندریایی در تولید رادیکال‌های آزاد نقش داشته و موجب القای التهاب نوروونی شده و از این طریق باعث بروز استرس اکسیداتیو شود. استرس اکسیداتیو منجر به تخریب غشای سلول، شکست DNA، اکسیداسیون پروتئین و در نهایت آپوپتوز می‌شود. آپوپتوز عمده‌ترین روش مرگ نوروونی در آلزایمر است.

آنالیزهای آزمایشگاهی و سنجش‌های داروشناسی نشان داده که گل‌های بابونه محتوی اسانس‌های روغنی ترپنوئیدی (آزلن، کامازولن، اکسید بیسابولون، سزکویی و ترپین‌های A و B، فلاونوئیدهای (آپی‌ژنین، کامپفرول، کریزین، ولوتولین، کورستین، کومهارین‌ها (امبلی‌فرون، اسپیرواترها و مواد موسیلاژی، املاح، پلی‌ساکاریدها، تاننها و اسیدهای چرب است (Gomaa, 2003).

References

- Agrawal, R., Tyagi E., Shukla, R., & Nath, C. (2009). A Study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology*, 56, 779-787.
- Akbari, F., Ansari-Samani, R., Karimi, A., Mortazaei, S., Shahinfard, N., & Rafieian-kopaei, M. (2013). Effect of turnip on glucose and lipid profiles of alloxan-induced diabetic rats. *Iran J Endocrinol Metab*, 14(5), 492-7. [In Persian]
- Asadi, S.Y., Parsaei, P., Karimi, M., Ezzati, S., Zamiri, A., Mohammadzadeh, F., et al. (2013). Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on healing process of surgical wounds in rat. *Int J Surg*, 11 (4), 332-7.
- Aslan, M., & Ozben, T. (2004). Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 1(2), 111-9.
- Azadmehr, A., Hajiaghaee, R., Afshari, A., Amirghofran, Z., Refieian-Kopaei, M., Yousofi-Darani, H., et al. (2011). Evaluation of in vivo immune response activity and in vitro anti-cancer effect by *Scrophularia megalantha*. *J Med Plants Res*, 5(11), 2365-8.
- Bassett, C.N., & Montine, T.J. (2003). Lipoproteins and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging*, 7(1), 24-9.
- Becker, D.J., & Henquin, J.C. (1994). Comparison of the effects of various vanadium salts on glucose homeostasis in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 260(2-3), 169-75.
- Behl, C. (2005). Oxidative stress in Alzheimer's disease, Implications for prevention and therapy. *Subcell Biochem*, 38, 65-78. [DOI, 10.1007/0-387-23226-5_3] [PMID]
- Benzie, I.F., & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay, Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 31(299), 15-27.

- Brock, O., Douhard, Q., Baum, M. J., & Bakker, J. (2010). Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female aromatase knockout mice. *Endocrinology* 151, 1814-1821. doi, 10.1210/en.2009-1379
- Calsolaro, V., & Edison, P. (2016), Neuroinflammation in Alzheimer's disease, current evidence and future directions. *Alzheimers Dement*, 12(6), 719-32.
- Cao, G., & Prior, R.L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*, 1;44(6), , 1309-15.
- Chandrashekhkar, V.M., Ranpariya, V.L., Ganapaty, S., Parashar, A., & Muchandi, A.A. (2010). Neuroprotective activity of *Matricaria recutita* Linn against global model of ischemia in rats. *J Ethnopharmacol*, 127(3), 645-51.
- Duelli, R., Schrock, H., Kuschinsky, W., & Hoyer S. (1994). Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int. J. Dev Neurosci*, 12, 737-743.
- ElAli, A., & Rivest, S. (2016). Microglia in Alzheimer's disease, a multifaceted relationship. *Brain Behav Immun*, 55, 138-50.
- Esteban-Santillan, C., Praditsuwan, R., Ueda, H., et al. (1998). Clock drawing test in very mild Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc*, 46, 1266-1269.
- Gomaa, A., Hashem, T., Mohamed, M., & Ashry, E. (2003). *Matricaria chamomilla* extract inhibits both development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in rats. *J Pharmacol Sci*, 92(1), 50-55.
- Grünblatt, E., Koutsilieri, E., Hoyer, S., & Riederer, P., (2006). Gene expression alterations in brain areas of intracerebroventricular streptozotocin treated rat. *J. Alzheimers Dis*, 9, 261-271.
- Gu, M., Owen, A., Toffa, S., Cooper, J.M., Dexter, D.T., Jenner, P., et al. (1998). Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci*, 158(1), 24-9.
- Hardy, J., & Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease, progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353-356.
- Hayashi, T., Nozawa, M., Sohmiya, K., Toko, H., Nakao, M., Okabe, M., et al. (1998). Efficacy of pancreatic transplantation on cardiovascular alterations in diabetic rats, an ultrastructural and immunohistochemical study. *Transplant Proc*, 30(2), 335-8.
- Höglund, K., & Salter, H. (2013). Molecular biomarkers of neurodegeneration. *Expert Rev Mol Diagn*, 13(8), 845-61.
- Honari, N., Pourabolli, I., Hakimi zadeh, E., Shamsizadeh, A., Amin, F., & Allatavakoli, M. (2012). Effect of *Vitex Agnus-Castus* Extract on Learning and Memory in Ovariectomized Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci*, 22 (93), 2-10
- Hosseinpour, M., Mobini-Dehkordi, M., Saffar, B., & Teimori, H. (2013). Antiproliferative effects of *Matricaria chamomilla* on *Saccharomyces cerevisiae*. *J Herb Med Pharmacol*, 2(2), 49-51.
- Karimi, M., Parsaei, P., Asadi, S.Y., Ezzati, S., Khadivi Boroujeni, R., Zamiri, A., et al. (2013). Effects of *Camellia sinensis* ethanolic extract on histometric and histopathological healing process of burn wound in rat. *Middle-East J Sci Res*, 13(1), 14-9.
- Kesmati, M., Raei, H., & Zadkarami, M. (2007). Effect of *Matricaria chamomilla* hydroalcoholic extract on locomotor activity in the presence and absence of sex gland in male and female adult mice. *Shahid Chamran University Journal of Science*, 17(1), 73-83.
- Khan, H., Ullah, H., Aschner, M., Cheang, W.S., & Akkol, E.K. (2020). Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease. *Biomolecules*, 10(1), 59.
- Khosravi-Boroujeni, H., Mohammadifard, N., Sarrafzadegan, N., Sajjadi, F., Maghroun, M., Khosravi, A., et al. (2012). Potato consumption and cardiovascular disease risk factors among Iranian population. *Int J Food Sci Nutr*, 63(8), 913- 20.
- Khosravi-Boroujeni, H., Sarrafzadegan, N., Mohammadifard, N., Sajjadi, F., Maghroun, M., Asgari, S., et al. (2013). White rice consumption and CVD risk factors among Iranian population. *J Health Popul Nutr*, 31(2), 252-61
- Kirk, A., & Kertesz, A. (1991). On drawing impairment in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 48, 73-77.
- Luigi, T., & Guido, G. (2016). Drawing Disorders in Alzheimer's Disease and Other Forms of Dementia. *National library of medicine*, 21;53(1), 31-52. doi, 10.3233/JAD-160009.
- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., et al. (2004). Aβ directly links Aβ to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science*, 304(5669), 448-52.
- Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease, oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 31;173(3), 502-11.
- Martini, L., Melcangi, R.C., & Maggi, R. (1993). Androgen and progesterone metabolism in the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 47, 195-205.
- McDonald, S., & Prenzler, P.D. (2001). Autolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73, 73-84.
- Merzouk, H., Madani, S., Chabane Sari, D., Prost, J., Bouchenak, M., & Belleville, J. (2000). Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macroscopic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci*, 98(1), 21-30.
- Monica, R., & Monica, P. (2016). The clock drawing test as a screening tool in mild cognitive impairment and very mild dementia, a new brief method of scoring and normative data in the elderly. *Noural Sci*, 37(6), 867-73. doi, 10.1007/s10072-016-2480-6.
- Moradi, M.T., Rafieian-Koupaei, M., Imani-Rastabi, R., Nasiri, J., Shahrani, M., Rabiei, Z., et al. (2013). Antispasmodic effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract in the isolated ileum of rat. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10(6), 499-503.

- Mu, Y., & Gage, F.H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 6(1), 1-9.
- Navidi, A., & Abbasi Maleki, S. (2024). Involvement of the Dopaminergic and Serotonergic Systems in the Antidepressant-like Effect Caused by Ethanolic Extract of Pistacia lentiscus in Tail Suspension Test. *Arch Neurosci*, 11(1), e140852. <https://doi.org/10.5812/ans-140852>.
- Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2013). Oxidative stress and aging prevention. *Int J Prev Med*, 4(9), 1101-2.
- Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Protective effects of herbal antioxidants on diabetic kidney disease. *J Res Med Sci*, 19(1), 82-3.
- Parsaei, P., Karimi, M., Asadi, S.Y., & Rafieian-kopaei, M. (2013). Bioactive components and preventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on post-laparotomy intra-abdominal adhesion in rats. *Int J Surg*, 11(9), 811 5.
- Parizad, M., & Abbasi Maleki, S. (2023). Potential Antidepressant-Like Activity of Rhus coriaria L. (Sumac) Ethanolic Extract, The Mechanism of Action via the Monoaminergic System in a Mouse Model. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 18(3), e139330. <https://doi.org/10.5812/jjnpp-139330>
- Pereira, R.P., Fachinetto, R., de Souza Prestes, A., Puntel, R.L., Santos da Silva, G.N., Heinzmann, B.M., et al. (2009). Antioxidant effects of different extracts from Melissa officinalis, Matricaria recutita and Cymbopogon citratus. *Neurochem Res*, 34(5), 973- 83
- Price, B.H., Gurvit, H., Weintraub, S., et al. (1993). Neuropsychological patterns and language deficits in 20 consecutive cases of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 50, 931-937.
- Rabiei, Z., Bigdeli, M.R., Mohagheghi, F., & Rasolian, B. (2012). Relationship between dietary virgin Olive oil on brain Cholesterol, Cholesteryl ester and Triglyceride levels and Blood Brain Barrier (BBB) permeability in a rat stroke model. *Physiol Pharmacol*, 16(3), 245-54. [In Persian]
- Rabiei, Z., Bigdeli, M.R., Mohagheghi, F., Rasouljan, B., & Sharifi, A. (2013). Effect of dietary olive leaf extract on brain cholesterol, cholesterol ester and triglyceride levels and of brain edema in rat stroke model. *Razi J Med Sci*, 19(103), 18-25. [In Persian]
- Rabiei, Z., Bigdeli, M.R., Rasouljan, B., Mohagheghi, F., & Sharifi, A. (2012). The effect of various doses of olive leaf extract on brain lipid levels and blood brain barrier permeability in rat stroke model. *Pajoohandeh*, 17(2), 67 72. [In Persian]
- Rabiei, Z., Bigdeli, M.R., & Rasouljan, B. (2013). Neuroprotection of dietary virgin olive oil on brain lipidomics during stroke. *Curr Neurovasc Res*, 10(3), 231-7.
- Rabiei, Z., Rafieian-kopaei, M., Heidarian, E., Saghaei, E., & Mokhtari, S. (2014). Effects of Zizyphus jujube extract on memory and learning impairment induced by bilateral electric lesions of the nucleus Basalis of Meynert in rat. *Neurochem Res*, 39(2), 353-60.
- Rabiei, Z., Rafieian-Kopaei, M., Mokhtari, S., Alibabaei, Z., & Shahrani, M. (2014). The effect of pretreatment with different doses of Lavandula officinalis ethanolic extract on memory, learning and nociception. *Biomed Aging Pathol*, 4(1), 71-6.
- Rafieian-Kopaei, M., Baradaran, A., & Rafieian, M. (2013). Plants antioxidants, From laboratory to clinic. *J Nephropathol*, 2(2), 152-3.
- Ranpariya, V.L., Parmar, S.K., Sheth, N.R., & Chandrashekhar, V.M. (2011). Neuroprotective activity of Matricaria recutita against fluoride-induced stress in rats. *Pharm Biol*, 49(7), 696-701.
- Schneider, J.A., Arvanitakis, Z., Leurgans, S.E., & Bennett, D.A. (2009). The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Ann Neurol*, 66(2), 200-8.
- Sedighi, M., Nasri, H., Rafieian-kopaei, M., & Mortazaei, S. (2013). Reversal effect of Achillea millefolium extract on ileum contractions. *J Herb Med Pharmacol*, 2(1), 5-8.
- Sharafati Chaleshtori, R., Sharafati Chaleshtori, F., & Rafieian-kopaei, M. (2011). Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves. *Turk J Biol*, 35(5), 635-9.
- Sharifzadeh, M., Sharifzadeh, K., Naghdi, N., Ghahremani, M.H., & Roghani, A. (2005). Posttraining intrahippocampal infusion of a protein kinase AII inhibitor impairs spatial memory retention in rats. *J Neurosci Res*, 79(3), 392-400.
- Shirzad, H., Shahrani, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2009). Comparison of morphine and tramadol effects on phagocytic activity of mice peritoneal phagocytes in vivo. *Int Immunopharmacol*, 9(7-8), 968-70.
- Shoham, S., Bejar, C., Kovalev, E., Schorer-Apelbaum, D., & Weinstock, M. (2007). Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology*, 52, 836-843.
- Shoham, S., Bejar, C., Kovalev, E., & Weinstock, M. (2003). Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol*, 184, 1043-1052.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50, 336-346.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50, 336-346.
- Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., et al. (2013). Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease, A prospective cohort study. *Lancet Neurol*, 12(4), 357-67.

Weinstock, M., & Shoham, S., (2004). Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. *J. Neural Transm*, 111, 347-366.

Youdim, K.A., Dobbie, M.S., Kuhnle, G., Prottogente, A.R., Abbott, N.J., & Rice-Evans, C. (2003).

Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier, in vitro studies. *J Neurochem*, 85(1), 180-92.

Zand, R.S., Jenkins, D.J., & Diamandis, E.P. (2001). Effects of natural products and nutraceuticals on steroid hormone-regulated gene expression. *Clin Chim Acta*, 312(1-2), 213-219.