

## بررسی اثر ضد اضطرابی عصاره آبی برگ اسفناج در موش سوری

حسین میلادی گرگی<sup>۱</sup>، حسینعلی صفا خواه<sup>۲</sup>، سپینود حقیقی<sup>۳</sup>

۱- مری گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران (مؤلف مسؤل)

تلفن: ۳-۰۳۳۵۴۱۷۰ (۰۳۳۱) داخلی ۵۷۱ miladi331@yahoo.com

۲- مری گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- دانشجوی رشته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** در مطالعات قبلی خواص آنتی اکسیدانی اسفناج در به تأخیر انداختن فرآیند پیری سیستم اعصاب مرکزی و یا نقایص و رفتارهای شناختی وابسته به پیری و نیز برخی بیماریهای نورودژنراتیو گزارش گردید. هدف این مطالعه ارزیابی اثرات ضد اضطرابی دوزهای مختلف عصاره آبی برگ اسفناج می باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه از ۵۰ سر موش سوری نر به وزن ۳۰-۲۵ گرم استفاده شد. حیوانات به سه گروه ده تایی آزمایش و دو گروه ده تایی کنترل تقسیم گردیدند. گروههای آزمایش سه دوز پودر عصاره آبی اسفناج ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم (به ازای هر موش در روز) و در یک گروه کنترل آب آشامیدنی و در گروه کنترل دیگر ساکاروز ۳ W/V٪ به همراه آب آشامیدنی به صورت خوراکی به مدت یک ماه دریافت کردند. سپس موشها در جهت افزایش فعالیت حرکتی و حس کنجکاوی به مدت ۵ دقیقه در یک جعبه با دیواره های مشکی قرار داده شدند. پس از آن در فواصل زمانی تنظیم شده به ماز بعلاوه ای مرتفع منتقل گردیدند و به مدت ۵ دقیقه شاخص های استاندارد ارزیابی اضطراب از طریق مشاهده در آنها بررسی و ثبت شد.

**یافته ها:** عصاره اسفناج با دوز ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم در مقایسه با گروه های شاهد به صورت معنی داری موجب افزایش درصد مدت زمان ماندن در بازوی باز و نیز با دوز ۰/۱۵ گرم موجب افزایش تعداد ورود به بازوی باز ماز بعلاوه ای شکل مرتفع شده است ( $P < 0/05$ ). هیچ اختلافی هم بین تعداد کل ورود به بازوها در بین گروه ها دیده نشد. همچنین عصاره اسفناج با دوز ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم در مقایسه با گروه شاهد بصورت معنی داری موجب کاهش تعداد SAP گردید ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** یافته های فوق نشان می دهد عصاره اسفناج در دوزهای بالاتر احتمالاً دارای اثرات ضد اضطرابی می باشد.

**کلید واژه ها:** اسفناج، ضد اضطرابی، ماز بعلاوه ای شکل مرتفع، SAP (Stretched Attend Posture)

وصول مقاله: ۸۹/۲/۲ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۵/۳ پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۱۱

### مقدمه

از اقلام پر مصرف داروها به حساب می آیند. از آنجا که اکثر داروهای ضد اضطراب موجب وابستگی فیزیکی می شوند و از نظر روانی ایجاد اعتیاد می کنند (۴) و همچنین به علت میل روز افزون مردم به سوی گیاهان دارویی در این مطالعه اثر ضد اضطرابی برگ اسفناج به عنوان سبزی ارزیابی شد.

اضطراب طبیعی یک پاسخ سازشی هیجانی به محرک های تنش زای متعدد فیزیولوژیکی، روانی و اجتماعی می باشد (۱ و ۲). اضطراب پاتولوژیک نیز شایعترین اختلالات روحی- روانی است (۳) که موجب اختلال در زندگی روزانه و رنج بیماران می گردد (۱ و ۲). به همین دلیل داروهای آرام بخش و ضد اضطراب یکی

بیماری‌های دژنراتیو مختلف در سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد که می‌تواند موجب تسریع روند پیری گردد (۱۰). استرس‌های مختلف می‌تواند موجب استرس اکسیداتیو و رفتارهای وابسته به اضطراب شوند (۱۵). آنتی‌اکسیدانها مثل اسفناج ممکن است در بهبود فعالیت سیستم اعصاب مرکزی و مهار روند پیری و یا نقایص و رفتارهای شناختی وابسته به پیری و نیز در بهبود بیماریهای نورودژنراتیو مؤثر و مفید باشد (۱۷ و ۱۶ و ۹). با توجه به مطالعات فوق این احتمال مطرح می‌باشد که اسفناج به عنوان یک سبزی حاوی آنتی‌اکسیدان از طریق کاهش استرس اکسیداتیو احتمالاً می‌تواند باعث بهبود رفتارهای شبه اضطرابی گردد. لذا در این مطالعه اثر اسفناج در دوزهای مختلف به صورت خوراکی بر میزان واکنش‌های اضطرابی بر اساس مدل ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع (EMP) در موش سوری ارزیابی گردید.

### روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی بود که در آن از ۵۰ سر موش سوری نر با وزن ۳۰-۲۵ گرم به صورت تصادفی انتخاب و استفاده شد. موشها در سراسر دوره آزمایش تحت شرایط محیطی و درجه حرارت مطلوب تقریباً ۲۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و با مصرف آزاد غذا و محلول آماده شده هر گروه نگهداری می‌شدند.

عصاره آبی اسفناج توسط آزمایشگاه مرکز تحقیقات علمی و کاربردی جهاد کشاورزی استان سمنان با روش استاندارد تهیه شده است. روش تهیه به شیوه رفلاکس حرارتی (تقطیر برگشتی) بود که در آن ابتدا یک کیلوگرم اسفناج به همراه ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب تا رسیدن به دمایی در حد جوش حرارت داده شد. سپس

پرورش اسفناج به علت اهمیت غذایی در اغلب نواحی جهان معمول می‌باشد (۵ و ۶). اسفناج از جمله سبزی‌های معتدل بوده که با هر مزاجی سازگار می‌باشد (۷). ترکیبات مؤثر موجود در اسفناج عبارتند از: املاح کلسیم، سدیم، پتاسیم، مس، آرسنیک، منیزیم و آهن، ویتامین‌های A, B, C, D, K، لیستین، سکرین، ساپونین (بخصوص در ریشه)، پرو ویتامین و اسید فولیک (۸ و ۷ و ۵)، اسیدهای چرب غیر اشباع فراوان (به عنوان آنتی‌اکسیدان) شامل اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک و اسید لینولنیک، اسید هگزا دکاترینوئیک، کلروفیل ۲، بتا کاروتن، لیکوپن (۹ و ۱۰)، مشتقات فلاوینوئیدها، مشتقات اسید کوماریک، نوکلئوزید پورین، ویتامین E (۱۱ و ۱۰)، پپتید رایسکو و مشتقات آن مثل پپتید اپیوئیدی δ بنام رایسکولین ۶ (آنزیمی کلیدی جهت تثبیت دی‌اکسید کربن و فوتوسپیراسیون) (۱۲) و رابی متید (Met-Arg-Trp) (۱۳).

در طب سنتی از اسفناج به عنوان تقویت اعصاب برای کسانی که کارهای فکری دارند توصیه شده است (۸ و ۵). از اسفناج به عنوان اشتهاآور، ملین و تسکین دهنده درد سر و کمر، ضد سرفه، رفع تشنج و همچنین جهت رشد و فعالیت سلول‌ها در اطفال استفاده شده است (۸ و ۵ و ۱۴).

برگ اسفناج شامل اجزاء فعال متعدد مثل فلاوینوئیدها می‌باشد که از آنتی‌اکسیدانهای قوی بوده و اعمال وسیع فارماکولوژیکی و بیوشیمیایی شامل ضد التهابی، ضد آلرژیک، ضد ویروسی، محافظت از سیستم اعصاب مرکزی، ضد سرطان و ضد پیری دارد (۱۱ و ۱۰).

استرس اکسیداتیو که توسط رادیکالهای آزاد اکسیژن ایجاد می‌شود اولین فاکتور مؤثر در ایجاد

به مدت ۴۵ دقیقه در این دما تحت حرارت قرار گرفت. پس از آن عصاره بدست آمده توسط صافی پارچه ای صاف شد و در نهایت توسط دستگاه دیالیز تغلیظ و به پودر اسفناج تبدیل گشت (۲۱-۱۸).

از ساکاروز w/v ۳٪ (وزنی- حجمی) جهت بهتر کردن طعم و مزه عصاره اسفناج استفاده گردید. دوزهای مختلف عصاره اسفناج در آب آشامیدنی هر گروه (به میزان ۱۲۵ میلی لیتر برای ۲۴ ساعت برای ۱۰ سر موش سوری) اضافه و به عنوان آب روزانه بصورت خوراکی تجویز شد.

۱- دو گروه ۱۰ تایی به عنوان گروه شاهد کاذب (shame) و اصلی به ترتیب از آب آشامیدنی و محلول ساکاروز w/v ۳٪ به مدت یک ماه دریافت کردند.

۲- سه گروه ۱۰ تایی آزمایشی دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم عصاره اسفناج (به ازای هر موش در روز) به همراه ساکاروز ۳٪ به مدت یک ماه دریافت کردند.

برای ارزیابی میزان اضطراب از دستگاه ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع، (EPM) Elevated Plus Maze که یک مدل استاندارد جهت ارزیابی سطح اضطراب در جوندگان است استفاده شد. این دستگاه از چوب ساخته شده و شامل دو بازوی باز (هر یک ۵۰×۵ سانتی‌متر) و دو بازوی بسته (هر یک ۵۰×۵×۴۰ سانتی‌متر) و یک کفه مرکزی (۵×۵ سانتی‌متر) می‌باشد. به طوری که بازوهای باز روبروی هم و بازوهای بسته هم روبروی یکدیگر قرار دارند و حدود ۵۰ سانتی‌متر از کف اطاق بالاتر قرار می‌گیرد. این مدل تجربی سنجش اضطراب غیر شرطی بوده و نیازی به آموزش و یادگیری حیوان ندارد (۲۲ و ۲۳).

بعد از یک ماه از تجویز عصاره، در صبح روز آزمون حیوانات به آزمایشگاه منتقل شدند و هر موش بطور جداگانه ۵ دقیقه قبل از آزمایش در جعبه‌ای با دیوار مشکی از جنس پلکسی گلس به ابعاد ۴۰×۴۰×۳۰ سانتی‌متر قرار گرفت تا فعالیت جستجوگرانه (Explorative Activity) حیوان افزایش یابد. سپس برای سنجش اضطراب، حیوان در ماز بعلاوه‌ای مرتفع (در قسمت کفه و رو به بازوی باز) قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه شاخص‌های مهم ارزیابی اضطراب شامل: تعداد ورود به بازوی باز و بسته، تعداد کل ورود به بازوهای باز و بسته، مدت زمان ماندن در بازوهای باز و بسته و صفحه مرکزی و نیز تعداد SAP (Stretched Attend Posture) ارزیابی و ثبت گردید (۲۸-۲۲).

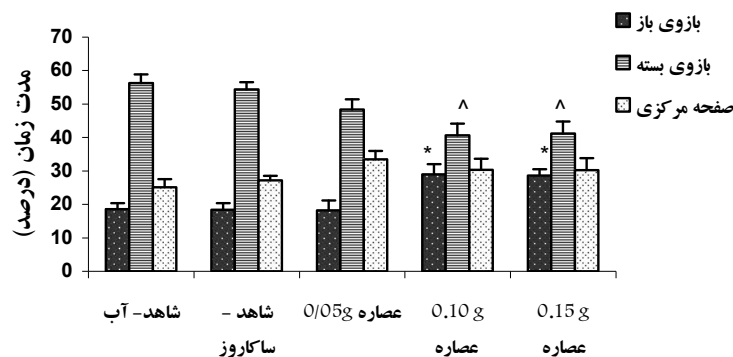
شایان ذکر است که کاهش ورود به بازوی باز و مدت زمان ماندن در بازوی باز و افزایش ورود به بازوی بسته و نیز افزایش تعداد SAP شاخص افزایش اضطراب در موش تلقی می‌شود (۲۸-۲۵). تعداد کل ورود به دو بازو به عنوان فعالیت عمومی حرکتی و تعداد SAP و مدت زمان ماندن در صفحه مرکزی به عنوان رفتار پرهیز از فعالیت جستجوگرانه و یا رفتار تصمیم‌گیری در نظر گرفته می‌شود (۲۸).

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و برای مقایسه دو به دو گروه‌ها از تست توکی استفاده گردید. اختلاف  $P < 0/05$  بین گروه‌های مورد آزمایش از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

نمودار ۱ نشان می‌دهد درصد مدت زمان ماندن در بازوی باز در گروه‌های ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم اسفناج

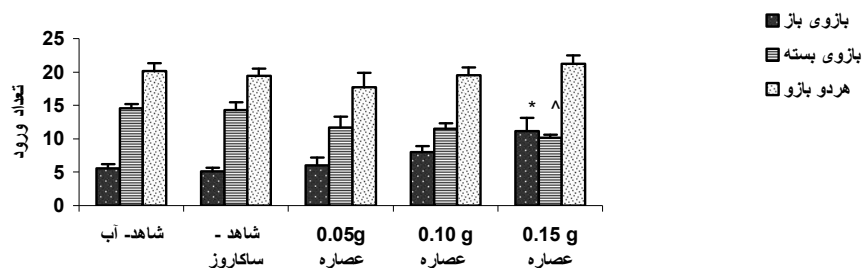
بصورت معنی‌داری بیشتر از گروه‌های شاهد (گروه آب و ساکاروز) می‌باشد ( $P < 0.05$ ). همچنین مدت زمان ماندن در بازوی بسته در گروه‌های ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم اسفناج بصورت معنی‌داری کمتر از گروه‌های شاهد (گروه آب و ساکاروز) است ( $P < 0.05$ ). مدت زمان ماندن در صفحه مرکزی تفاوتی بین گروه‌ها نداشت ( $p = 0.263$ ). همچنین دوز ۰/۰۵ گرم اسفناج در شاخص‌های فوق تفاوتی با گروه‌های شاهد نداشت.



**نمودار ۱: تأثیر دوزهای متفاوت عصاره اسفناج بر مدت زمان ماندن در بازوی باز، بسته و صفحه مرکزی EPM**

\* درصد مدت زمان ماندن در بازوی باز در گروه دریافت‌کننده اسفناج با دوز ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم در مقایسه با آب بترتیب ( $p = 0.05$  و  $p = 0.040$ ) و گروه ساکاروز ( $p = 0.047$  و  $p = 0.037$ ) اختلاف معنی‌داری دارد.  
 ^ درصد مدت زمان ماندن در بازوی بسته در گروه دریافت‌کننده اسفناج با دوز ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم در مقایسه با آب بترتیب ( $p = 0.015$  و  $p = 0.020$ ) و گروه ساکاروز ( $p = 0.040$  و  $p = 0.05$ ) اختلاف معنی‌داری دارد.

تعداد ورود به بازوی باز با دوز ۰/۱۵ گرم اسفناج بصورت معنی‌داری بیشتر و تعداد ورود به بازوی بسته بصورت معنی‌داری کمتر از گروه‌های شاهد بود ( $P < 0.05$ ). هیچ اختلافی هم بین تعداد کل ورود به هر دو بازو در بین گروه‌ها دیده نشد ( $p = 0.735$ ) (نمودار ۲).

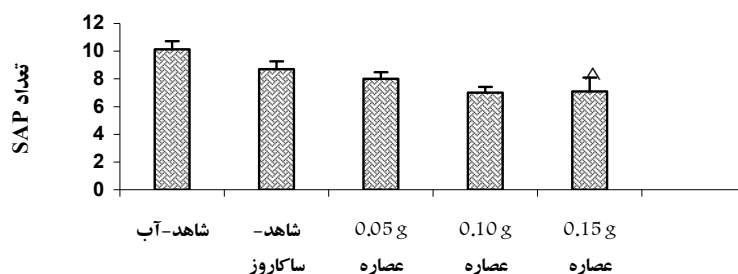


**نمودار ۲: تأثیر دوزهای متفاوت عصاره اسفناج بر تعداد ورود به بازوی باز، بسته و تعداد کل ورود به بازوها در EPM**

\* تعداد ورود به بازوی باز در گروه دریافت کننده اسفناج با دوز ۰/۱۵ گرم در مقایسه با آب و ساکاروز بترتیب  $P = ۰/۰۱۴$  و  $P = ۰/۰۲۵$  اختلاف معنی داری را نشان می دهد.

^ تعداد ورود به بازوی بسته در گروه دریافت کننده اسفناج با دوز ۰/۱۵ گرم در مقایسه با آب و ساکاروز بترتیب  $P = ۰/۰۴۰$  و  $P = ۰/۰۲۴$  اختلاف معنی داری را نشان می دهد.

تعداد SAP در گروه دریافت کنندگان عصاره اسفناج با دوز ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم در مقایسه با گروه شاهد (گروه آب) بصورت معنی داری کمتر است ( $P < ۰/۰۵$ ) ولی با گروه ساکاروز اختلاف معنی داری نداشت (نمودار ۳).



### نمودار ۳: تأثیر دوزهای متفاوت عصاره اسفناج بر تعداد SAP در EPM

تعداد SAP در گروه دریافت کنندگان عصاره اسفناج با دوز ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم در مقایسه با گروه شاهد (گروه آب)

اختلاف معنی داری را نشان می دهد. ( $P = ۰/۰۲۵$  \* و  $P = ۰/۰۱۸$  ^)

موش های دریافت کننده عصاره اسفناج با دوز ۰/۱۵ گرم به صورت معنی داری بترتیب بیشتر و کمتر بود، این شاخصها ممکن است وابسته به خصوصیات ضد اضطرابی عصاره اسفناج باشد.

همچنین هیچ اختلافی هم بین تعداد کل ورود به هر دو بازو در بین گروهها دیده نشد که این شاخص نشان دهنده فعالیت عمومی حرکتی حیوان می باشد (۲۸). به عبارتی دیگر کاهش فعالیت حرکتی و یا بی حرکتی در هیچ گروه از حیوانات مشاهده نشد. در تایید این یافته در مطالعه ای نشان داده شد که اسفناج سبب بهبود عملکرد مخچه و حفظ تعادل و هماهنگی حرکتی بدن می شود (۱۶).

همچنین وزن حیوانات دریافت کننده دوزهای متفاوت اسفناج در روز اول قبل از تجویز عصاره ( $p = ۰/۱۶۷$ ) و نیز یک ماه بعد از تجویز عصاره ( $p = ۰/۰۹۵$ ) در مقایسه با گروه های کنترل (آب و ساکاروز) اختلاف معنی داری نداشت.

### بحث

یافته های این مطالعه نشان می دهد موشهای دریافت کننده عصاره اسفناج با دوزهای ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم مدت زمان بیشتری را نسبت به گروه های شاهد در بازوی باز سپری کردند به عبارتی دیگر جستجوی بیشتری را در داخل بازوی باز ماز بعلاوه ای شکل مرتفع داشتند. همچنین تعداد ورود به بازوی باز و بسته در

می باشد (۹) احتمالاً با مهار ژنهای فوق دارای فعالیت ضد اضطرابی است.

در گزارشی دیگر نشان داده شد وجود فیتو کمیکالها در غذاهای غنی از آنتی اکسیدان مثل اسفناج ممکن است در به تأخیر انداختن فرایند پیری سیستم اعصاب مرکزی و یا نقایص و رفتارهای شناختی وابسته به پیری شامل یادگیری حرکتی و حافظه و در بهبود برخی بیماریهای نورودژنراتیو مؤثر و مفید باشد (۱۶ و ۱۷). لذا اسفناج ممکن است اثرات تعدیلی بر واکنشهای اضطرابی داشته باشد.

در گزارشی آمده است که فلاوونوئیدها از آنتی اکسیدانهای قوی در اسفناج بوده و اعمال وسیع فارماکولوژیکی و بیوشیمیایی دارند (۱۰). فلاوونوئیدها تولید میانجی نیتربیک اکساید (NO) و نیز بیان mRNA آنزیم سنتزکننده NO القایی ناشی از ماکروفاژ موشی را مهار می کند (۳۰). تولید NO نیز میزان اضطراب را افزایش می دهد همچنانکه نشان داده شد داروی مهار کننده سنتز NO (L-Name) موجب افزایش اثرات ضد اضطرابی مورفین می گردد (۳۱). لذا فلاوونوئیدهای اسفناج نیز ممکن است اثرات ضد اضطرابی داشته باشد.

### نتیجه گیری

به نظر می رسد عصاره اسفناج در دوزهای بالاتر احتمالاً دارای اثرات ضد اضطرابی می باشد. با توجه به اینکه عصاره اسفناج حاوی مواد آنتی اکسیدان بوده و بصورت خوراکی به مدت یک ماه تجویز گردید احتمالاً با کاهش فعالیت آنزیمهای اکسیداتیو می تواند اثرات ضد اضطرابی داشته باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

از یافته های دیگر مطالعه حاضر کاهش معنی دار تعداد SAP در موشهای دریافت کننده عصاره اسفناج با دوزهای ۰/۱۰ و ۰/۱۵ گرم در مقایسه با گروه شاهد می باشد. تعداد SAP و نیز مدت زمان ماندن در صفحه مرکزی ممکن است به رفتار تصمیم گیری بر گردد (۲۸) یعنی زمانی که حیوان تصمیم به رفتن به داخل بازوی باز را می گیرد. هر چه حیوان مدت زمان بیشتری را در صفحه مرکزی بماند کمتر به جستجوی بازوی باز می پردازد و پرهیز از جستجوی بازوی باز ممکن است نشانه رفتار شبه اضطراب زایی حیوانات باشد. لذا با توجه به اینکه تعداد SAP در موشهای دریافت کننده عصاره اسفناج کمتر است، بنابراین حیوانات برای رفتن به داخل بازوی باز و فعالیت جستجوگرانه در آن اجتناب ندارند. این یافته نیز ممکن است به اثرات ضد اضطرابی عصاره اسفناج بر گردد. هر چند در مدت زمان ماندن در صفحه مرکزی تفاوتی بین گروهها مشاهده نشد.

در تایید یافته های مطالعه حاضر در گزارشی مشتقات پروتئین رایبیسکو موجود در برگهای سبز گیاهان از جمله اسفناج به نام رایبیسکولین ۶ (یک پپتید اوپوئیدی  $\delta$ ) (۱۲) و رایبیتید (۱۳) بصورت خوراکی در موشهای سوری فعالیت ضد اضطرابی نشان داده است. بنابراین می توان نتیجه گرفت که اسفناج با داشتن برگهای سبز و نیز پپتیدهای رایبیسکولین ۶ و رایبیتید می تواند اثرات ضد اضطرابی داشته باشد.

در مطالعه ای دیگر مشاهده شده است بیان بیش از اندازه ژنهای گلیو کسپلازا و گلو تاتیون ردوکتاز ۱ در مغز موش با نقشی که در متابولیسم استرس اکسیداتیو دارند سبب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی می گردد (۲۹). با توجه به اینکه اسفناج حاوی مواد آنتی اکسیدان فراوانی از جمله اسیدهای چرب غیراشباع و کلروفیل ۲

## تشکر و قدردانی

فیزیولوژی به خصوص آقایان دکتر علی رشیدی پور، دکتر عباسعلی وفایی، دکتر طاهریان و همکاران بخش، آقای صادقی و خانم پاکدل تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

این مقاله از پایان‌نامه دکتر سپینود حقیقی که جهت اخذ درجه دکتری حرفه‌ای پزشکی طراحی شده بود، استخراج شده است. از کلیه اساتید محترم گروه و مرکز تحقیقات

## Reference

1. Clement Y and Chapouthier G. Biological basis of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1998; 5: 623-633.
2. Clement Y, Calataynd F and Blzung C. Genetic basis of anxiety-like behavior: A critical review. *Brain Research Bulletin* 2002; 1: 57-71.
3. Finn DA, Rutledge-Gorman MT, Crabbe JC. Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics* 2003; 4: 109-135.
4. Rabbani M, Sajjadi SE, Jafarian A and Zarei HR. Effects of stachy iavandulifolia vahl on the EPM model of anxiety in mice. 8th Iranian Seminar of Pharmaceutical Sciences, Shiraz, Aug 27-29, 2002; PP: 294.
5. Zargari A, Medicinal plants. Vol 4, Fourth Ed. Tehran, Tehran: University Publications, 1997. p. 222-225.
6. Nafisi A. The property of eatable and drinks in between of world various nations during centuries and eras. First Ed. Esfahan, Esfahan University Publications 1989. p. 272-274.
7. Jazaheri G, The language of edibles. Vol 1, 6 th ed. Tehran: Sepeher, 1980, p. 113-115.
8. Samsam-Shariat H. Collection of medicinal plants. First Ed Tehran, Mani, 2007. p. 19.
9. Lee J, Lee S, Lee H, Park K and Choe E. Spinach (*Spinacia Oleracea*) powder as a natural food-grade antioxidant in deep-fat-fried products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 5664-5669.
10. Bergman M, Varshavsky LE, Gottlieb H and Grossman S. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry* 2001; 58: 143-152.
11. Lamnitski L, Bergman M, Nyska A, Ben-Shaul V and Grossman S. Composition, efficacy and safety of spinach extracts. *Nutr Cancer* 2003; 46: 222-31.
12. Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K and Yoshikawa M. Rubiscolin-6, an opioid peptid derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating and dopamine D1 receptors. *Devision of Food Science and Biotechnology* 2007; 28: 1998-2003.
13. Zhao H, Ohinata K and Yoshikawa M. Rubimetide (Met- Arg-Trp) derived from Rubisco exhibits anxiolytic-like activity via the DP1 receptor in male ddY mice. *Division of Food Science and Biotechnology* 2008; 29: 629-632.
14. Akhonzadeh S. Encyclopedia of Iranian Medicinal Plants. Vol 1, First Ed. Tehran: Arjmand, 2000. p. 131.
15. Narita M, Miagawa K, Narita M, Mizuo K, Miyataka M and Tsutomu S. The functional change in the 5-HT1A receptor induced by stress and the role of 5-HT1A receptor in neuroprotection. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2005; 15: 91-104.
16. Joseph JA, Bickford PC, Gould T, Briederick L, Chadman K, Pollock A, and et al. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology motor learning in aged rats. *Brain Res* 2000; 66: 211-7.
17. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisora NA, Prior RL, Cao G, Martin A and et al. Long-term dietary strawberry, spinach or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *The Journal of Behavioral Deficits* 1998; 18: 8047-8055.
18. Bai X, Qui A, and Guan J. Optimization of microvave-assited extraction of antihepatotoxic triterpenoid from *actinidia deliciosa* root and its comparison with conventional extraction methods. *Food Technol Biotechnol* 2007; 45: 174-180.

19. Shu YY, Ko MY, Chang YS. Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. *Microchemical Journal* 2003; 74: 131-139.
20. Pan X, Liu H, Jia G, Shu YY. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Biochem Eng J* 2000; 5: 173-177.
21. Davarpanah Z, Shey zeinodin M, Dokhani SH and Saeedi GH. Effects of harvesting season and location on the sugar, ash and glycyrrhizic acid content of licorice Root. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Researches*. 2009; 13: 27-34.
22. Miladi-Gorji H, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Taherian AA, Jarrahi M, Emami abarghoii M, and et al. Anxiolytic effects of the aqueous extracts of portulaca oleracea in mice. *J of Medicinal Plants* 2007; 19: 23-8.
23. Miladi Gorji H, Rashidy-pour A, Fathollahi Y, Vafahi AA, Taherian AA. The role of morphine dependence on the level of anxiety in rat. *J of Gorgan University of med. Scie* 2008; 10: 5-10.
24. Zhang Z, Schulteis G. Withdrawal from acute morphine dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 89: 392-403.
25. Tsuda M, Suzuki T, Misawa M, Nagase H. Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. *Eur J Pharmacol* 1996; 307: 7-14.
26. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in a rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 149-169.
27. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in the elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 24: 525-529.
28. Clement Y, Joubert C, Kopp C, Lepicard EM, Venault P, Misslin R, and et al. Anxiety in mice: a principal component analysis study. *Neural Plast*, 2007; 2007; 1- 8.
29. Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Singer O, Redwine JM, Ellison JA, C. Glyoxalase 1 and Glutathion reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 2005; 438: 662-6.
30. Cartford M, Gemma C and Bickford PC. Eighteen-Month-Old Fischer 344 rats fed spinach-enriched diet show improved delay classical eyeblink conditioning and reduced expression of tumor necrosis factor alpha and TNF beta in the cerebellum. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22: 5813-5816.
31. Shin IC, Kim HC, Swanson J, Hong JT and Oh KW. Anxiolytic effects of acute morphine can be modulated by nitric oxide systems. *Pharmacology* 2003; 68: 183-9.