

Alpha-Pinene Effect on the Improvement of Working and Spatial memory in Rats

Paria Hashemi¹, Helia Rahmani^{2,3}, Mohammad Raman Moloudi⁴, Zakaria Vahabzadeh⁵, Esmael Izadpanah⁶

1. Ph.D of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2813-0803

2. MSc student, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4093-7626

3. MSc student, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4093-7626

4. Associate Professor of Physiology, Neurosciences Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2883-5213

5. Associate Professor of Clinical Biochemistry, Liver and Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. (Corresponding Author Tel: +98-87-33664674-8358, Email: zakariav@gmail.com) ORCID ID: 0000-0002-9854-9653

6. Associate Professor of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. (Corresponding Author, Tel: +98-87-33664674-8498, Email: eizadpanah2000@muk.ac.ir). ORCID ID: 0000-0001-8090-906X

ABSTRACT

Background and Aim: Oxidative stress is an important factor in the development of memory and learning disorder which can cause neuronal damage in the hippocampus. Alpha-pinene is a polyphenolic compound from the terpene family that has shown important anti-inflammatory, anti-anxiety, antioxidant and neuroprotective effects in the central nervous system and can affect memory. The aim of the present study was to investigate the effect of alpha-pinene on the improvement of working and spatial memory in rats.

Materials and Methods: In this study, 24 male rats were randomly divided into 3 groups: control and 2 alpha-pinene groups (5 and 10 mg/kg IP) for 3 weeks. Spatial and working memories were assessed by Morris water maze and Y maze, respectively. Then, malondialdehyde level and total antioxidant capacity in hippocampal tissue were measured. Data were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test.

Results: The percentage of alternation in the Y maze increased in the group which had received 10 mg/kg alpha-pinene group compared to those in the control group and the group which had received 5 mg/kg alpha-pinene. The time spent in the target area at the dose of 10 mg/kg of alpha-pinene showed a significant increase compared to that in the control group, but there was no significant difference among the groups in terms of the time to reach the target platform. Alpha-pinene at the dose of 10 mg/kg decreased the level of malondialdehyde in hippocampal tissue compared to the control group, but no significant difference was observed between the groups in terms of total antioxidant capacity.

Conclusion: Alpha-pinene increased spatial and working memory performance in rats. One of the possible mechanisms of memory improvement in the present study could be due to the reduction of malondialdehyde in the hippocampal tissue, as one of the important indicators of oxidative stress in the central nervous system.

Keywords: Oxidative stress, Alpha-pinene, Working memory, Spatial memory, Malondialdehyde, Total antioxidant capacity

Received: April 19, 2022

Accepted: July 19, 2022

How to cite the article: Paria Hashemi, Helia Rahmani, Mohammad Raman Moloudi, Zakaria Vahabzadeh, Esmael Izadpanah. Alpha-Pinene Effect on Improving Working and Spatial memory in Rats. SJKU 2023;28(2):28-39.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثر آلفاپاینن بر بهبود حافظه کاری و فضایی در موش‌های صحرایی

پریا هاشمی^۱، هلیا رحمانی^{۲،۳}، محمد رمان مولودی^۴، ذکریا وهاب زاده^۵، اسماعیل ایزدپناه^۶

۱. دکترای فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید:

۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۸۱۳-۰۸۰۳

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۴۰۹۳-۷۶۲۶

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۴. دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۸۸۳-۵۲۱۳

۵. دانشیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (نویسنده مسئول) تلفن:

۰۸۳۳۶۶۶۷۴ داخلی ۸۳۵۸ پست الکترونیک zakariav@gmail.com کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۹۸۵۴-۹۶۵۳

۶. دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (نویسنده مسئول) تلفن:

۰۸۳۳۶۶۶۷۴ داخلی ۸۴۹۸ پست الکترونیک eizadpanah2000@muk.ac.ir کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۸۰۹۰-۹۰۶x

چکیده

زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو از عوامل مهم در بروز اختلال در حافظه و یادگیری است که سبب آسیب نورونی در ناحیه هیپوکامپ می‌گردد. آلفا پاپین ترکیبی پلی فنولیک از خانواده ترپن‌ها است که اثرات ضدالتهابی، ضد اضطرابی، آنتی اکسیدانی و حفاظت عصبی مهمی را در سیستم عصبی مرکزی نشان داده است که می‌تواند بر حافظه مؤثر باشد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر آلفا پاپین بر بهبود حافظه کاری و فضایی در موش‌های صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۲۴ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی به ۳ گروه کنترل، آلفا پاپین دوز ۵ mg/kg و ۱۰ (به مدت ۳ هفته، تزریق داخل صفاقی) تقسیم شدند. حافظه فضایی و کاری به ترتیب، از طریق ماز آبی موریس و ماز Y ارزیابی شدند. سپس، میزان مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در بافت هیپوکامپ اندازه گیری گردید. یافته‌ها با استفاده از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شدند.

یافته‌ها: درصد تناوب در ماز Y در گروه آلفا پاپین ۱۰ mg/kg نسبت به گروه‌های کنترل و دریافت کننده آلفا پاپین با دوز ۵ mg/kg افزایش یافت. همچنین مدت زمان سپری شده در ناحیه هدف در دوز ۱۰ mg/kg آلفا پاپین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد، اما تفاوت معنی داری میان گروه‌ها از نظر مدت زمان رسیدن به سکوی هدف وجود نداشت. همچنین آلفا پاپین ۱۰ mg/kg میزان مالون دی آلدئید بافت هیپوکامپ را نسبت به گروه کنترل کاهش داد، اما تفاوت معنی داری میان گروه‌ها از نظر میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام مشاهده نشد.

نتیجه گیری: آلفا پاپین سبب افزایش در عملکرد حافظه فضایی و کاری در موش‌های صحرایی گردید. یکی از مکانیسم‌های احتمالی بهبود حافظه در مطالعه حاضر، می‌تواند ناشی از کاهش میزان مالون دی آلدئید بافت هیپوکامپ، به عنوان یکی از شاخص‌های مهم استرس اکسیداتیو سیستم اعصاب مرکزی باشد.

واژه های کلیدی: استرس اکسیداتیو، آلفا پاپین، حافظه کاری، حافظه فضایی، مالون دی آلدئید، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱/۳۰ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۴/۲۶ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲۸

مقدمه

سعی در حفظ و بهبود آن دارد(۱). فرآیند حافظه و

یادگیری یکی از مهم‌ترین سطوح عملکردی سیستم عصبی

حافظه یکی از توانایی‌های شناختی اصلی در ایجاد احساس

هویت شخصی است که هر فردی در طول زندگی خود

مرکزی به شمار می‌رود که با رمزگذاری، ذخیره، حفظ و یادآوری اطلاعات در مغز منجر به تسهیل و تنظیم این فرآیند می‌شود (۲). یکی از اجزای مهم ساختار سیستم لیمبیک در مغز که وظیفه مهمی در تولید یادگیری و حافظه را بر عهده دارد، هیپوکامپ است (۳). هیپوکامپ در ایجاد حافظه کوتاه مدت، بلند مدت و حافظه فضایی نقش مهمی ایفا می‌نماید (۴). ساختار آناتومیک هیپوکامپ به گونه‌ای است که به دلیل ارتباطات سیناپسی متعدد، نواحی مختلف آن به ویژه نواحی CA3 و شکنج دنداندار می‌توانند در پردازش اطلاعات مرتبط با حافظه مؤثر باشند (۱). اسکروز هیپوکامپ که با از بین رفتن نورون‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ ایجاد می‌شود عامل مهمی در بروز اختلال حافظه در بسیاری از اختلالات نورودژنراتیو از جمله صرع است (۵). این ناحیه از مغز نسبت به عوامل ایسکمیک، هیپوکسیک و نوروتوکسیک بسیار آسیب پذیر است (۶). تحقیقات نشان داده‌اند که اختلال در روند حافظه و یادگیری جزء کلیدی و مشترک برخی از بیماری‌های نورولوژیک و روانشناختی محسوب می‌گردد (۷-۹). نشان داده شده است که عملکرد حافظه و یادگیری پس از استرس اکسیداتیو دچار اختلال می‌شود و استرس اکسیداتیو نقش بارزی در بروز این نواقص به دنبال آسیب‌های مغزی اکسیداتیو ایفا می‌نماید (۱۰). استرس اکسیداتیو به شرایطی گفته می‌شود که در آن به دلیل تولید زیاد گونه‌های فعال اکسیژن و یا پایین آمدن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن، میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از توان آنتی‌اکسیدانی بدن بیشتر است (۱۱). گونه‌های فعال اکسیژن نسبت به مولکول اکسیژن، واکنش‌پذیری بیشتری داشته و از جمله آن‌ها می‌توان به پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، سوپر اکسید ($O_2^{\cdot-}$) و هیدروکسیل (OH^{\cdot}) اشاره کرد. سیستم اعصاب

مرکزی به علت سیستم آنتی‌اکسیدانی ضعیف، مصرف زیاد اکسیژن و داشتن چربی‌های غیر اشباع در معرض بالای استرس اکسیداتیو قرار دارد (۱۱). در جریان استرس اکسیداتیو، برخی شاخص‌های بیوشیمیایی نظیر مالون دی‌آلدئید در بافت هیپوکامپ افزایش می‌یابد و سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کاهش نشان می‌دهد (۱۲). استرس اکسیداتیو با آسیب‌های عصبی و مرگ نورونی در ناحیه هیپوکامپ مغز منجر به بروز اختلال در عملکرد حافظه و یادگیری می‌شود (۱۳). پژوهش‌های متنوعی نشان داده‌اند که شرایط یا هر عاملی که سبب ممانعت از آسیب‌های نورونی ناشی از عوامل اکسیداتیو در این ناحیه از مغز گردد، می‌تواند سبب بهبود وضعیت حافظه و یادگیری شوند (۱۵ و ۱۴ و ۵). در همین راستا گزارش شده است که بعضی ترکیبات طبیعی با منشأ گیاهی به علت دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و با افزایش تولید و ظرفیت عوامل آنتی‌اکسیدان در مغز می‌توانند جزو ترکیبات مفید و مؤثری در درمان و بهبود مشکلات یادگیری و حافظه باشند (۱۷ و ۱۶). نقش گیاهان دارویی در بهبود عملکرد حافظه و یادگیری اخیراً مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. گیاهان دارویی با توجه به قابلیتی که در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های مختلف از جمله اختلالات نورولوژیک دارند می‌توانند اهمیت بسزایی در سیستم‌های مراقبت بهداشتی جوامع مختلف داشته باشند (۱۸). اخیراً خواص بیولوژیکی آلفاپاین به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است و توجه برخی از محققین به سمت کشف اثرات مفید آلفاپاین در حوزه علوم اعصاب جلب شده است. آلفاپاین یک ترکیب آلی و پلی فنولیک از خانواده ترپن‌ها است که در گیاهان مختلفی از رده مخروطیان، از جمله درخت بنه کردستانی و

در بسیاری از گونه‌های درختان سوزنی برگ به ویژه کاج یافت می‌شود (۱۹). روغن‌های رزماری، اکالیپتوس، کافور و سایر روغن‌های ضروری نیز به عنوان منابع گیاهی غنی از آلفاپاین به شمار می‌آیند (۲۰). این ترکیب پلی فنولیک ارزش تجاری و صنعتی فوق العاده مهمی را در سال‌های اخیر به دست آورده است، به طوری که کاربردهای فراوانی در زمینه فرآورده‌های صنعتی نظیر صنعت عطر، طعم دهنده غذایی، تولید کاغذ، چاپ و داروسازی داشته است (۲۱). گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که آلفاپاین اثرات آرام‌بخشی، ضد اضطرابی (۲۲)، آنتی‌اکسیدانی (۲۳) و ضدالتهابی (۲۴) قابل توجهی را در برخی از مدل‌های عصبی و اختلالات نورودژنراتیو نشان داده است. آلفاپاین عملکرد حافظه و یادگیری را در مدل اختلال حافظه القا شده با اسکوپولامین در موش سوری (۲۵) و همچنین، در مدل حیوانی پارکینسون را با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهبود بخشیده است (۲۶). با وجود مطالعات گسترده‌ای که در زمینه شناخت اثرات این ماده صورت گرفته (۲۴-۲۱)؛ اما هنوز مکانیسم عملکرد آلفاپاین به طور کامل شناخته نشده است. اکثر پژوهش‌ها به بررسی اثرات آلفاپاین بر بهبود اختلال حافظه در مدل‌های نورودژنراتیو پرداخته‌اند (۲۷-۲۵) و تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثربخشی آلفاپاین بر افزایش میزان حافظه فضایی و کاری در حیوانات سالم انجام نشده است. از این رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر آلفاپاین بر بهبود حافظه کاری و فضایی به وسیله ماز Y و ماز آبی موریس، با تأکید بر نقش شاخص‌های بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو نظیر مالون دی آلدئید (به عنوان یک شاخص مهم پراکسیداسیون لیپیدی مغز مؤثر بر حافظه) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در موش‌های صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی کردستان تهیه شدند. در مدت آزمایش، تمام موش‌ها در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی، در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد و در قفس‌های پلاستیکی مخصوص (گروه ۴ تایی در هر قفس) با دسترسی کامل به آب و غذا نگهداری شدند. بررسی‌ها و آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل‌های انستیتوی ملی بهداشت آمریکا (NIH) برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید. حیوانات به صورت تصادفی به ۳ گروه ۸ تایی کنترل، دریافت کننده دوزهای ۵ mg/kg و ۱۰ (تهیه شده از شرکت سقز سازی کردستان) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی در هر گروه به مدت ۳ هفته و به صورت داخل صفاقی داروها یا حامل آلفاپاین (دی متیل سولفوکساید) را دریافت کردند. پس از پایان دوره تیمار بین ساعت ۸ تا ۱۲ ظهر و تحت شرایط استاندارد آزمون‌های رفتاری زیر از حیوانات جهت سنجش میزان حافظه کاری و فضایی به عمل آمد.

آزمون ماز Y:

برای ارزیابی حافظه، از دستگاه ماز Y که یک مدل استاندارد جهت بررسی حافظه کاری در جوندگان است استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از اتمام دوره تیمار، حافظه کاری حیوانات با مشاهده و ثبت رفتار تناوب خود به خودی طی یک جلسه کاری بررسی شد. این دستگاه (خریداری شده از شرکت Maze Router تبریز) از جنس پلکسی گلاس مشکی رنگ است و دارای سه بازو است که با هم زاویه ۱۲۰ درجه می‌سازند که هر کدام با یکی از حروف A, B و C علامت گذاری شده‌اند. بازوها طولی برابر ۶۰ سانتی‌متر، ارتفاعی برابر ۳۰ سانتی‌متر و پهنایی برابر ۱۵

سانتی متر دارند. در هنگام اجرای تست اتاق نسبتاً تاریک و بدون سر و صدا بود. نحوه انجام تست بدین صورت بود که ابتدا موش داخل محفظه‌ای در بازوی A که دارای درب گیوتینی است، قرار داده شد. بعد از گذشت یک دقیقه سازگاری و کاهش استرس، درب گیوتینی برداشته شد و به مدت ده دقیقه تعداد دفعات ورود موش به هر یک از بازوها مشاهده و یادداشت گردید. شرط ورود موش به داخل بازوها، گذاشتن پاهای عقبی و قاعده دم به طور کامل به داخل بازو بود. بعد از اتمام کار برای هر موش درصد تناوب بر اساس ورودی‌های موفق و ممتد به داخل بازوها در مجموعه‌هایی ۳ تایی محاسبه شد. درصد تناوب از نسبت تناوب مشاهده شده به حداکثر تناوب منهای ۲ ضرب در ۱۰۰ به دست آمد (۵).

آزمون ماز آبی موریس:

برای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی حیوانات آزمون ماز آبی موریس که جزو معتبرترین و رایج ترین آزمون‌های رفتاری جهت بررسی حافظه فضایی است، انجام شد. این ماز حوضچه سیاه رنگی به قطر ۱۳۶ سانتی متر و به ارتفاع ۱۳۰ سانتی متر است که تقریباً تا ارتفاع ۱۲۰ سانتی متر از آب ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) پر می‌شود، به طوری که سکوی نجات که صفحه‌ای به ابعاد ۱۰ سانتی متر است تقریباً به اندازه ۱ سانتی متر در زیر آب قرار می‌گیرد. در هنگام آزمایش اتاق نیمه تاریک بود، به طوری که سکوی قابل دیدن نبود و حیوان از طریق حافظه فضایی می‌بایست مکان سکوی را یاد بگیرد. حوضچه به صورت فرضی به چهار ربع تقسیم شد (شمال شرقی - شمال غربی - جنوب شرقی و جنوب غربی) و در بالای حوضچه دوربین فیلم برداری قرار داده شد. سکوی نجات در مرکز یکی از ۴ ربع فرضی به عنوان ناحیه هدف قرار گرفت. مسیر حرکت حیوان از طریق ویدیو، مانیتور شد

و پس از انتقال به کامپیوتر از طریق نرم افزار Maze Router مورد بررسی قرار گرفت. بر روی دیوارهای اطراف حوضچه صفحاتی با اشکال متفاوت به عنوان سرخ‌های فضایی نصب شدند. سپس، موش‌های صحرایی در هر گروه تحت کارآزمایی به مدت ۴ روز متوالی قرار گرفتند. موقعیت سکوی این مدت ثابت باقی ماند و هر روز از ۴ ربع کارآزمایی تشکیل شده بود. حیوان هر بار از یکی از ۴ ربع فرضی به صورت تصادفی به داخل آب انداخته می‌شد و حداکثر ۲ دقیقه به حیوان فرصت داده شد تا با کمک سرخ‌های فضایی نصب شده بر روی دیوار بتواند موقعیت سکوی نجات را پیدا کند. در صورتی که طی این مدت حیوان موفق به یافتن سکوی نمی‌شد توسط آزمایشگر به آرامی به مدت ۲۰ ثانیه روی سکوی قرار می‌گرفت. بعد از اتمام کارآزمایی‌ها حیوان با حوله خشک و سپس، به قفس خود برگردانده می‌شد. پارامتر مورد بررسی در این مرحله از آزمون، مدت زمان تأخیر تا رسیدن به سکوی بود که به عنوان شاخصی از سنجش یادگیری فضایی در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ آنالیز گردید. ۲۴ ساعت بعد، در روز شانزدهم آزمایش، آزمون پروب انجام شد. در طول این مرحله، سکوی نجات برداشته شد و حیوان یک بار به صورت تصادفی از یکی از ربع‌های فرضی به مدت ۲ دقیقه به داخل آب رها شد تا مدت زمان سپری شده در ناحیه هدف (جایی که سکوی نجات قرار داشت) جهت ارزیابی فراخوانی حافظه فضایی حیوانات ثبت و مورد بررسی قرار گیرد (۲۸).

یک روز پس از اتمام مطالعات رفتاری، به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو، مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در بافت هیپوکامپ، تمامی حیوانات تحت بیهوشی عمیق با مخلوطی از کتامین و زایلازین قرار گرفتند. سپس با استفاده از گیوتین سر حیوان

یافته‌ها

تأثیر آلفاپاین بر حافظه کاری در آزمون ماز Y: میزان درصد تناوب در ماز Y که معیاری جهت سنجش حافظه کاری است، در گروه دریافت‌کننده آلفاپاین با دوز ۱۰ mg/kg افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل ($p=0/0013$) و گروه دریافت‌کننده آلفاپاین با دوز ۵ mg/kg ($p=0/0002$) نشان داد (نمودار ۱).

تأثیر آلفاپاین بر حافظه فضایی در آزمون ماز آبی موریس: نتایج نشان داد که مدت زمان رسیدن به سکوی هدف در گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپاین تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد (نمودار ۲ الف)؛ اما مدت زمان سپری شده در ناحیه هدف (نمودار ۲ ب) در دوز ۱۰ mg/kg آلفاپاین نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی را نشان داد ($p=0/0008$).

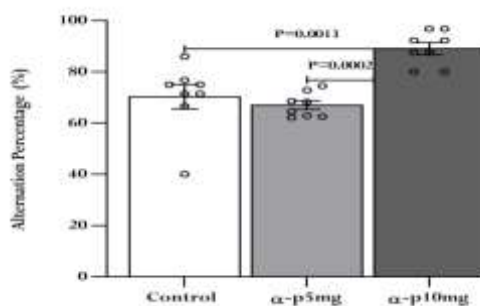
تأثیر آلفاپاین بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام بافت هیپوکامپ: همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، تزریق داخل صفاقی آلفاپاین به مدت ۳ هفته بر شاخص ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام بافت هیپوکامپ تغییر معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد.

تأثیر آلفاپاین بر میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت هیپوکامپ: در مطالعه حاضر میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت هیپوکامپ به عنوان یکی از فاکتورهای مهم استرس اکسیداتیو سیستم اعصاب مرکزی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که آلفاپاین در هر دو دوز ۵ mg/kg ($p=0/0017$) و ۱۰ mg/kg ($p=0/0115$) میزان مالون‌دی‌آلدئید را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد (نمودار ۴).

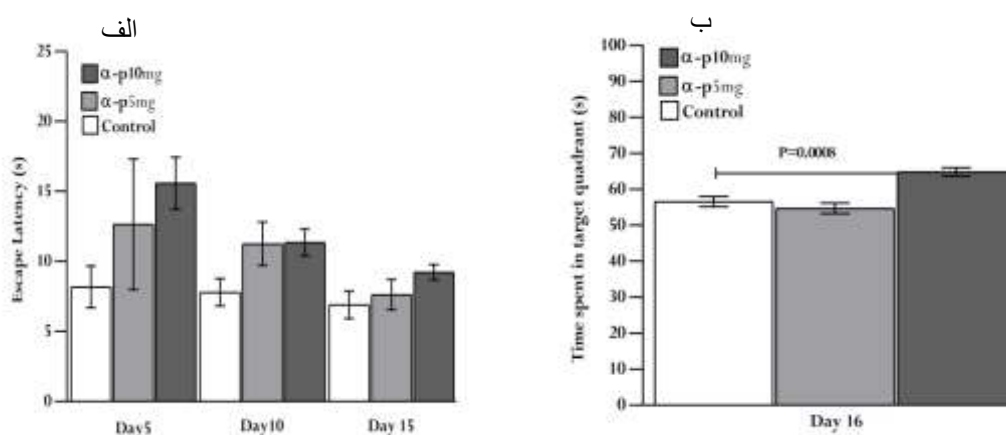
جدا و پس از خارج کردن مغز از جمجمه، هیپوکامپ روی یخ استخراج گردید. در نهایت، نمونه‌های هیپوکامپ به فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. جهت تعیین و سنجش غلظت پروتئین در هر یک از نمونه‌های بافتی، ابتدا بافت هیپوکامپ وزن گردید و سپس با اضافه کردن بافر فسفات سالین به میزان ده برابر وزن بافت مورد نظر، نمونه‌های هیپوکامپ به مدت ۱ دقیقه با دستگاه هموژنایزر به منظور یکسان‌سازی و یکنواخت شدن بافت‌ها لیز شدند. نمونه‌های لیزشده به مدت ۵ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰ در ثانیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت جداسازی سوپرناتانت سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت‌ها در داخل فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام نگهداری شدند. اندازه‌گیری این شاخص‌ها بر اساس دستورالعمل کیت‌های تهیه شده از شرکت کیازیت انجام شد.

آنالیز آماری:

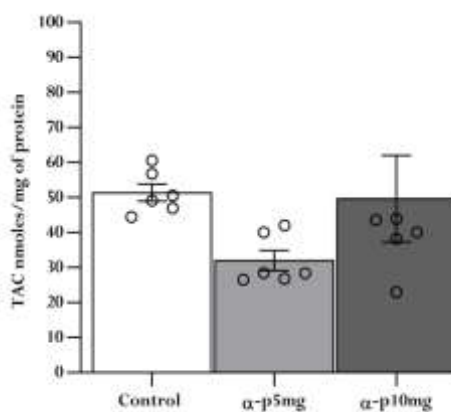
تمامی نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SEM) بیان گردید. پس از مشخص نمودن توزیع داده‌ها، در صورت نرمال بودن، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل یافته‌های مطالعه استفاده گردید. همچنین زمان سپری شده تا رسیدن به سکوی در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ با تست آماری Repeated M. ANOVA تحلیل شد. برای بررسی‌های آماری و رسم نمودار از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۶ استفاده شد. سطح معناداری $P<0.05$ در نظر گرفته شد.



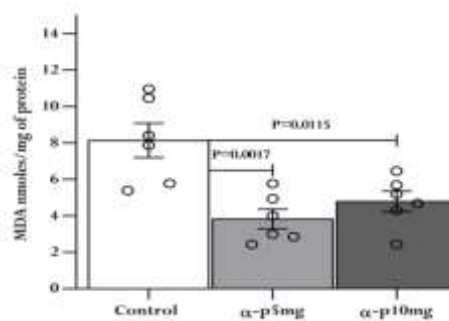
نمودار ۱. اثر آلفا پاتین بر درصد تناوب در ماز Y. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان شده است (n=8). مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است. α -p: alpha pinene



نمودار ۲. اثر آلفا پاتین بر تأخیر در رسیدن به سکو در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ (الف) و زمان صرف شده در ربع هدف در روز ۱۶ (ب) در ماز آبی مورس. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان شده است (n=8). مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است. α -p: alpha pinene



نمودار ۳. تأثیر آلفا پاتین بر ظرفیت انتی اکسیدانی تام بافت هیپوکامپ. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان شده است (n=8). مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است. α -p: alpha pinene. TAC= total antioxidant capacity



نمودار ۴. تأثیر آلفاپاین بر میزان مالون دی آلدئید بافت هیپوکامپ. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان شده است (n=8). مقادیر

MDA= malondialdehyde, α -p: alpha pinene. P<0.05 معنی دار در نظر گرفته شده است.

بحث

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که آلفاپاین توانسته است به طرز قابل ملاحظه‌ای میزان مالون دی آلدئید بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی را در هر دو دوز مورد استفاده (۵ و ۱۰ mg/kg) نسبت به گروه کنترل کاهش دهد؛ اما تفاوت معنی داری میان گروه‌ها از نظر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام مشاهده نشد. همچنین، بررسی‌های رفتاری نشان داد که میزان درصد تناوب در ماز Y که معیاری جهت سنجش حافظه کاری است، در گروه دریافت کننده آلفاپاین در دوز ۱۰ mg/kg افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل و گروه دریافت کننده آلفاپاین با دوز ۵ mg/kg نشان داد. علاوه بر این، مدت زمان سپری شده در ناحیه هدف در این دوز از آلفاپاین نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی را نشان داد؛ اما مدت زمان رسیدن به سکوی هدف در گروه‌های دریافت کننده آلفاپاین تفاوت معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد.

تحقیقات انجام شده در سال‌های گذشته گویای آن است که مغز به دلیل مصرف مقادیر زیاد اکسیژن و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد، ارگانی بسیار حساس نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو به شمار می‌رود (۲۹). افزایش عوامل اکسیداتیو ویژگی مشترک بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو و

مرتبط با پیری و دوران کهنسالی نظیر آلزایمر، صرع، هانتینگتون و پارکینسون است (۳۰ و ۱۴). مشخص شده است که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بروز اختلالات رفتاری از جمله مشکلات حافظه و یادگیری در بیماری‌های عصبی ایفا می‌نماید (۱۴). نوروئ‌های مختلف مغز پاسخ‌های متفاوتی را نسبت به استرس اکسیداتیو نشان داده‌اند و هر کدام دارای سطح خاصی از آسیب‌پذیری هستند (۳۱). گزارش شده است که از میان نواحی مختلف مغز، هیپوکامپ که جایگاه اصلی حافظه و یادگیری در مغز محسوب می‌شود، بیشترین میزان آسیب‌پذیری را در برابر استرس اکسیداتیو داشته است (۳۲). سیستم DG-CA هیپوکامپ نقش مهمی در تنظیم پلاستیستی سیناپسی، رژراسیون و همچنین، نوروژنر ایفا می‌نماید (۳۳). سلول‌های پیرامیدال و گرانولار این سیستم از هیپوکامپ آسیب‌پذیری زیادی نسبت به عوامل اکسیداتیو نشان داده‌اند و به دنبال این آسیب‌ها، عملکرد طبیعی این سلول‌ها مختل می‌گردد (۳۴). آسیب‌های اکسیداتیو با کاهش در میزان پرولیفراسیون سلول‌های هیپوکامپ، اختلال در نوروژنر و پلاستیستی ساختاری منجر به بروز نقایصی در انتقالات سیناپسی می‌گردند (۳۳). رادیکال‌های آزاد با القای اکسیداسیون در بخش خارج سلولی رسپتورهای گلوتاماترژیک سبب

تضعیف مکانیسم‌های تقویت طولانی مدت می‌شوند که در نهایت، این وقایع مخرب که به واسطه افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی به وجود آمده‌اند می‌توانند عامل مؤثری در بروز اختلالات رفتاری از جمله نقایص شناختی و اختلال در روند یادگیری و حافظه باشند (۳۲). رستپورهای گلوتاماترژیک به عنوان رستپورهای نوروترنسمیتری واقع در غشای نورون‌های مغزی، نقش مهمی در تشکیل حافظه و یادگیری به واسطه تحریکات سیناپسی ایفا می‌نمایند (۳۵). همچنین مشخص شده است که افزایش رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نورون‌ها در بسیاری از بیماری‌های عصبی با بروز آسیب‌های جدی به پایانه‌های عصبی و فعال شدن بیش‌ازحد رستپورهای گلوتاماترژیک از طریق عدم تعادل در هوموستاز کلسم داخل سلولی، افزایش در آزادسازی نوروترنسمیترهای گلوتامات و همچنین، با تغییر در مسیر رونویسی و یا ترجمه رستپورهای نوروترنسمیتری سبب اختلال در عملکرد سیناپسی، مشکلات شناختی و حافظه و یادگیری می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها با تعدیل در میزان فعالیت این رستپورها، کاهش در تخلیه و آزادسازی نوروترنسمیترهای گلوتامات و پیشگیری از افزایش ورود کلسم به داخل نورون‌ها می‌توانند سبب بهبود در عملکرد حافظه و یادگیری گردند (۳۶).

بعضی گیاهان دارویی با ایجاد فعالیت‌های آنتی اکسیدانی می‌توانند در پیشگیری از بروز مشکلات حافظه و یادگیری و درمان این بیماری‌ها مؤثر واقع شوند (۱۴). بشر از دیرباز ارزش گیاهان دارویی را کشف کرده و از آن‌ها در رفع دردهای مزمن و درمان بسیاری از بیماری‌ها بهره برده است (۳۷). نقش گیاهان دارویی در یادگیری و حافظه توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (۱۴).

مونوترپن‌های بسیاری در اسانس‌های گیاهی وجود دارند که نقش مهمی در بهبود عملکرد حافظه بازی می‌کنند (۳۸). از معروف‌ترین این مونوترپن‌ها می‌توان به نقش آلفاپاین اشاره کرد. آلفاپاین یک ترکیب ترپن ارگانیک بوده که به عنوان مونوترپن اصلی در درخت کاج به شمار می‌آید (۳۹). اثرات حفاظت نوروئی و بهبود دهندگی حافظه آلفاپاین به واسطه اثرات آنتی اکسیدانی آن در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. در همین راستا، مطالعه Lee و همکاران نشان داده‌اند که آلفاپاین با اثرات آنتی اکسیداتیو سبب افزایش و بهبود در عملکرد حافظه و یادگیری در موش‌های سوری که به واسطه اسکوپولامین در آن‌ها اختلال حافظه القا شده بود، گردید (۲۵). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر که توسط گودرزی و رفیعی راد انجام شد، آلفاپاین توانسته بود از طریق فعالیت‌های آنتی اکسیدانی اختلال حافظه را در مدل پارکینسون موش‌های صحرایی به طرز قابل توجهی بهبود بخشد (۲۶). یافته‌های مطالعه حاضر از این نظر با نتایج مطالعات این محققین مطابقت دارد. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که آلفاپاین می‌تواند اثرات افزایشی قابل توجهی را در عملکرد حافظه کاری و فضایی موش‌های صحرایی احتمالاً به واسطه کاهش میزان مالون دی آلدئید بافت هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل نشان دهد اختلاف معنی‌داری بین میزان مالون دی آلدئید در دو دوز مذکور مشاهده نشد. از طرفی زمان سپری شده در ربع هدف هر چند که مقدار p در گروه دریافت کننده دوز ۵ از گروه دریافت کننده دوز ۱۰ آلفا پاین نسبت به گروه کنترل کمتر بود؛ ولی در آزمون ماز آبی موریس و میزان درصد تناوب در ماز Y در دوز ۱۰ معنی دار ولی در دوز ۵ نبود و این احتمال وجود دارد که عوامل اکسیدان یا آنتی اکسیدان دیگر هم در این اثر دخیل بوده باشند که در این

مطالعه اندازه‌گیری نشده‌اند. هم‌راستا با یافته‌های مطالعه حاضر، گزارش شده است که آلفاپاین با اعمال خواص آنتی‌اکسیدانی و پیشگیری از التهاب نورون‌های هیپوکامپ می‌تواند سبب بهبود در عملکرد یادگیری و حافظه فضایی در ماز آبی موریس و همچنین، کاهش رفتارهای شبه اضطرابی در مدل آلزایمری موش‌های صحرایی گردد (۲۷). در مطالعه ما نیز، مدت زمان سپری شده در ناحیه هدف (جایی که سکوی نجات قرار داشت) در گروه آلفاپاین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر که توسط احمدی کنه‌علی و همکاران انجام شد، مشخص گردید که تزریق داخل هیپوکامپی آلفاپاین (با دوز ۰/۴، ۰/۲ و ۰/۱ میکروگرم به مدت چهار روز متوالی) مدت زمان رسیدن به سکوی هدف را در تست آبی موریس کاهش داد که در مطالعه ما این شاخص معنی دار نبود (نمودار ۲ الف). علت این تفاوت می‌تواند به اختلاف در شیوه تجویز و دوز تجویزی مربوط باشد (۴۰).

منابع

1. Bartsch T, Arzy S. Human memory: insights into hippocampal networks in epilepsy. *Brain*. 2014;137(7):1856-7.
2. Lee JL. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci*. 2008;11(11):1264-6.
3. Barry DN, Maguire EA. Remote memory and the hippocampus: A constructive critique. *Trends Cogn Sci*. 2019;23(2):128-42.
4. Bartsch T. The clinical neurobiology of the hippocampus: An integrative view: Oxford University Press; 2012: 214-9
5. Hashemi P, Babaei JF, Vazifekhhah S, Nikbakht F. Evaluation of the neuroprotective, anticonvulsant, and cognition-improvement effects of apigenin in temporal lobe epilepsy: Involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. *Iran J Basic Med Sci*. 2019; 22(7): 752-8.
6. Vazifekhhah S, Ali MK, Babae JF, Hashemi P, Alireza MS, Nikbakht F. Evaluation of the ameliorative effects of oral administration of metformin on epileptogenesis in the temporal lobe epilepsy model in rats. *Life Sci*. 2020;257:11806.
7. Coras R, Pauli E, Li J, Schwarz M, Rössler K, Buchfelder M, et al. Differential influence of hippocampal subfields to memory formation: insights from patients with temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2014;137(7):1945-57.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق داخل صفاقی آلفاپاین سبب افزایش در عملکرد حافظه فضایی و کاری در موش‌های صحرایی گردید. یکی از مکانیسم‌های احتمالی افزایش حافظه در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از کاهش میزان مالون دی‌آلدئید بافت هیپوکامپ، به عنوان یکی از فاکتورهای مهم استرس اکسیداتیو سیستم اعصاب مرکزی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان و دانشکده پزشکی بابت حمایت‌های مالی و تأمین امکانات انجام مطالعه حاضر تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه خانم هلیا رحمانی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی با کد R.MUK.REC.1398.251 است.

8. Panegyres P. The contribution of the study of neurodegenerative disorders to the understanding of human memory. *Qjm*. 2004;97(9):555-67.
9. Hernandez-Rapp J, Rainone S, Hébert SS. MicroRNAs underlying memory deficits in neurodegenerative disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;73:79-86.
10. Alzoubi KH, Khabour OF, Salah HA, Rashid BEA. The combined effect of sleep deprivation and Western diet on spatial learning and memory: role of BDNF and oxidative stress. *J Mol Neurosci*. 2013 May;50(1):124-33.
11. Shin E-J, Jeong JH, Chung YH, Kim W-K, Ko K-H, Bach J-H, et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int*. 2011;59(2):122-37.
12. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Coenzyme q10 ameliorates neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy in rat. *J Mol Neurosci*. 2013;49(1):194-201.
13. Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;928(1):168-75.
14. Saki K, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M, Hassanzadazar H, Dehghan K, Bahmani F, et al. The most common native medicinal plants used for psychiatric and neurological disorders in Urmia city, northwest of Iran. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014;4:S895-S901.
15. Ciobica A, Olteanu Z, Padurariu M, Hritcu L. The effects of pergolide on memory and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease. *J Physiol Biochem*. 2012;68(1):59-69.
16. Nikfarjam M, Bahmani M, Naimi A. Native medicinal plants of Iran effective on Memory and Learning: A Review. *Int J Pharmtech Res*. 2016;9(5):466-73.
17. Nikbakht F, Khadem Y, Haghani S, Hoseininia H, Sadat AM, Heshemi P, et al. Protective role of apigenin against A β 25–35 toxicity via inhibition of mitochondrial cytochrome c release. *Basic Clin Neurosci*. 2019;10(6):557-66.
18. Rahnama S, Rabiei Z, Alibabaei Z, Mokhtari S, Rafieian-Kopaei M, Deris F. Anti-amnesic activity of Citrus aurantium flowers extract against scopolamine-induced memory impairments in rats. *Neurol Sci*. 2015;36(4):553-60.
19. Him A, Ozbek H, Turel I, Oner AC. Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. *Pharmacologyonline*. 2008;3:363-9.
20. Türkez H, Aydın E. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of α -pinene. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(1):168-76.
21. Bertouche S, Tomao V, Ruiz K, Hellal A, Boutekedjiret C, Chemat F. First approach on moisture determination in food products using alpha-pinene as an alternative solvent for Dean–Stark distillation. *Food Chem*. 2012;134(1):602-5.
22. Saedipour S, Rafieirad M. Anti-anxiety effect of Alpha-pinene in comparison with Diazepam in adult male rats. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2020;24(3):253-45.
23. Ho C-L, Tseng Y-H, Wang EI-C, Liao P-C, Chou J-C, Lin C-N, et al. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of the seed essential oil of *Calocedrus formosana* from Taiwan. *Nat Prod Commun*. 2011;6(1):1934578X1100600132.
24. Kim D-S, Lee H-J, Jeon Y-D, Han Y-H, Kee J-Y, Kim H-J, et al. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *Am J Chin Med*. 2015;43(04):731-42.
25. Lee G-Y, Lee C, Park GH, Jang J-H. Amelioration of Scopolamine-Induced Learning and Memory Impairment by Multiple Bioactivities of Traditional Medicinal Herbs for Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Evid Based Complement Alternat Med*. Available from: vol. 2017, Article ID 4926815, 9 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4926815>.

26. Goudarzi S, Rafieirad M. Evaluating the effect of α -pinene on motor activity, avoidance memory and lipid peroxidation in animal model of Parkinson disease in adult male rats. *RJP*. 2017;4(2):53-63.
27. Khan-Mohammadi-Khorrami MK, Asle-Rousta M, Rahnema M, Amini R. Neuroprotective effect of alpha-pinene is mediated by suppression of the TNF- α /NF- κ B pathway in Alzheimer's disease rat model. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022;36(5):e23006. doi: 10.1002/jbt.23006.
28. Malik J, Karan M, Dogra R. Ameliorating effect of *Celastrus paniculatus* standardized extract and its fractions on 3-nitropropionic acid induced neuronal damage in rats: possible antioxidant mechanism. *Pharm Biol*. 2017;55(1):980-90.
29. Tashakori-Miyanroudi M, Ramazi S, Hashemi P, Nazari-Serenjeh M, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Acetyl-L-Carnitine Exerts Neuroprotective and Anticonvulsant Effect in Kainate Murine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J Mol Neurosci*. 2022; 72: 1224–1233.
30. Tashakori-Miyanroudi M, Souresrafil A, Hashemi P, Ehsanzadeh SJ, Farrahizadeh M, Behrooz Z. Prevalence of depression, anxiety, and psychological distress in patients with epilepsy during COVID-19: A systematic review. *Epilepsy Behav*. 2021;125:108410.
31. Salim S. Oxidative stress and psychological disorders. *Curr Neuropsychopharmacol*. 2014;12(2):140-7.
32. Salim S. Oxidative stress and the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017; 360(1):201-5.
33. Huang Y, Coupland NJ, Lebel RM, Carter R, Seres P, Wilman AH, et al. Structural changes in hippocampal subfields in major depressive disorder: a high-field magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*. 2013;74(1):62-8.
34. Huang T-T, Zou Y, Corniola R, editors. Oxidative stress and adult neurogenesis—effects of radiation and superoxide dismutase deficiency. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23(7):738-744.
35. Guan Z-z. Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutaminergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(7):773-80.
36. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Nath C, et al. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: understanding the therapeutics strategies. *Mol Neurobiol*. 2016;53(1):648-61.
37. Mohsenzadeh A, Ahmadipour S, Ahmadipour S, Asadi-Samani M. Iran's medicinal plants effective on fever in children: A review. *Pharm Lett*. 2016;8(1):129-34.
38. Ueno H, Shimada A, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, et al. Alpha-pinene and dizocilpine (MK-801) attenuate kindling development and astrogliosis in an experimental mouse model of epilepsy. *IBRO Rep*. 2020;9:102-14.
39. Allenspach M, Steuer C. α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry*. 2021;190:112857.
40. Ahmadi-kanali R, Abbasnejad M, Esmaeili-Mahani S, Pourrahimi AM, Kooshki R. Effects of Intra-hippocampal Administration of Alpha-pinene on Learning and Memory Performances in Adult Male Rats. *JMUMS*. 2021;31(200):26-37.