Effect of alfaalfa (Medicago sativa) extract on spatial memory and anxiety like behaviors of ovariectomized rats

Hadi Semizeh[1]*, Seyed Reza Fatemi Tabatabaei[2], Naeem Erfanimajd[2], Ali Shahriari[2]

1 graduate student of Physiology (MSc) in Physiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Veterinary Medicine,
2 Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Basic Sciences

Received, june 9.2020
Accepted, september 5.2020

Abstract

Introduction: According to the high phytoestrogens content of alfalfa and the effect of phytoestrogens on CNS, the effect of ethyl acetate extract of alfalfa on spatial memory and anxiety like behaviors of ovariectomized rats were accessed.

Methods: Forty-five female Wistar rats (three-month old) were accidentally divided into 5 groups, including sham, ovariectomy (ovx), sham+4 (4g/kg extract in diet), ovx+2 (2g/kg extract in diet) and ovx+4 (4g/kg extract in diet) two weeks after ovariectomy or sham operation. Memory and anxiety like behavior were elevate using Morris water maze and plus maze, respectively. MDA and antioxidant enzymes were also measured in hippocampus.

Results: concentration of estrogen in plasma and superoxide dismutase activity (SOD) in hippocampus were reduced in ovx group, but consumption of alfalfa extract increased SOD activity while decreased catalase activity. Performance of ovx+2 group was decreased in training trial of Morris water maze, while consumption of alfalfa extract in ovariectomized rat increased percentage of open arm time (OAT%) in elevated plus maze.

Conclusion: The findings revealed that the five-factor model of the Mc health-related quality of life questionnaire (SF-36) has satisfactory validity and reliability. Thus, this questionnaire can be used in future studies to assess the quality of life of patient's type 2 diabetes.

Key words:
Health-related quality of life; Validity, Reliability, Psychometrics; Type 2 diabetes.

*Corresponding Author: hadi.semizeh@gmail.com
Address: Golestan Blvd. Ahvaz, Iran
Telephone: +98 6133367008
ORCID Code: 0000-0003-4411-5961

اثر عصاره یونجه بر حافظه فضایی و رفتارهای شبه اضطرابی در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده

هادی سمیزه[1*]، سید رضا فاطمی طباطبایی[2]، نعیم عرفانی مجد[2]، علی شهریاری[2]،

۱ فارغ التحصیل کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی
۲ دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

چکیده

مقدمه: با توجه به غنی بودن یونجه از فیتواستروژن‌ها و تاثیر فیتواستروژن‌ها بر سیستم عصبی مرکزی، مطالعه حاضر تاثیر عصاره اتیل استاتی یونجه بر حافظه فضایی و رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از برداشت تخمدان را مورد بررسی قرار داده است.

روش: ۴۵ سر موش صحرایی ماده ۳ ماهه نژاد ویستار، دو هفته پس از اواریکتومی به طور تصافی به گروه های sham(شاهد)، اواریکتومی (sham+۴، ovx (شاهد g/kg۴ عصاره در جیره)، ovx+۲ اواریکتومی g/kg۲ عصاره در جیره) و ovx+۴ اواریکتومی g/kg۴ عصاره در جیره) تقسیم شدند. پس از ۷۵ روز تیمار برای ارزیابی حافظه از ماز آبی موریس و برای اضطراب از آزمون ماز بعلاوه مرتفع استفاده شد. همچنین غلظت استروژن سرم، مالون دی آلدیید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز در هیپوکمپ اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: اواریکتومی غلظت استروژن سرم و سوپراکسید دیسموتاز هیپوکمپ را کاهش داد و استفاده از عصاره یونجه فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش ولی فعالیت کاتالاز را کاهش داد. عملکرد موش‌های گروه ovx+۲ در مرحله آموزش در آزمون ماز آبی موریس کاهش یافت، درحالی‌که درصد زمان سپری‌شده در بازوی باز ماز بعلاوه مرتفع در پی استفاده از عصاره یونجه درگروه ovx بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: به نظر میرسد هرچند عصاره یونجه اضطراب را در موش های اواریکتومی شده کاهش می‌دهد ولی ممکن است باعث کاهش یادگیری فضایی آن‌ها شود.

دریافت: ۲۰ خرداد ۹۹
پذیرش: ۱۵ شهریور ۹۹

واژه‌های کلیدی:
حافظه فضایی، اضطراب، فیتواستروژن، اواریکتومی، یونجه

مقدمه

فیتواستروژن‌ها[1] ترکیبات گیاهی پلیفنولیک غیراستروئیدی هستند که فعالیت بیولوژیکی شبه استروژنی از خود نشان می‌دهند. مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین ترکیبات فیتواستروژنیک عبارتند از: ایزوفلاون‌ها[2] (جنستئین[3]، دایدزئین[4]، بیوچنین A[5])،

1 phytoestrogens

2 isoflavones
3 genistein
4 daidzein
5 Biochanin A

*نویسنده مسئول: hadi.semizeh@gmail.com
آدرس: اهواز، بلوار گلستان، دانشگاه شهید چمران اهواز
تلفن: ۳۳۳۳۰۰۱۱
کد ORCID: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۴۴۱۱-۵۹۶۱

لیگنانها[1] (اینترولاکتون[2]،اینترودیول[3])، کامستنس[4] (کامسترول[5]) و فلاونوئیدها[6] (۱). ایزوفلاون‌ها عمدتا در غلات و حبوبات ازجمله سویا وجود دارند لیگنان‌ها دردانه‌های روغنی، غلات، حبوبات، میوه و سبزیجات یافت می‌شوند و کامسترول در ماش، جوانه لوبیا، بذر کتان، جوانه شبدر و به‌خصوص در یونجه موجود است (۲). با توجه به شباهت ساختاری فیتواستروژن‌ها به استروژن، اثرات مثبت فیتواستروژن‌ها در علائم بعد از یائسگی، بیماری‌های قلبی عروقی، مشکلات استخوانی و سرطان پستان نشان داده‌شده است (۳). شواهد به‌دست‌آمده از مطالعات اپیدمیولوژیکی و کلینیکی نشان داده است که فیتواستروژن‌ها باعث بهبود عملکردهای شناختی در مغز می‌شوند (۴). مکانیسم عمل فیتواستروژن‌ها بر مغز و دستگاه عصبی نیاز به مطالعات بیشتر دارد. به‌عنوان‌مثال ایزوفلاون سویا از طریق اثر برگیرنده‌های استروئیدی و ۵-هیدروکسی تریپتامین یا از طریق تشویق برداشت سروتونین اثرات خود را اعمال می‌کند (۵). تحقیقات روی حیوانات تأثیرات نوروپروتکتیو[7] استرادیول و فیتواستروژن‌ها در جلوگیری از استرس اکسیداتیو[8] در نورون‌ها و دژنره[9] شدن آنها را اثبات نموده است (۶). فیتواستروژن‌ها برگیرنده‌های استروژن در هیپوکمپ[10] و کورتکس پیش پیشانی[11] که در یادگیری و حافظه نقش اساسی دارند تأثیر می‌گذارند (۷).

فقدان استروژن باعث مستعد شدن خانم‌ها به بیماریهای نورودژنراتیو[12] ازجمله آلزایمر[13] می‌شود (۸). یونجه[14] یکی از مهم‌ترین گیاهان فیتواستروژنیک است که دارای ترکیبات متنوعی مانند استروژن‌های گیاهی و دارای خواص آنتیاکسیدان[15] است (۹). مطالعات انجام‌شده در خصوص مصرف سویا و مکمل‌های فیتواستروژن، بیشتر براثر آنها پس از یائسگی زنان و با تأکید بر نقش استروژن درمانی متمرکزشده‌اند. فیتواستروژن آلفا زرانالول به‌صورت مؤثری از آسیب اکسیداتیو القاشده به‌وسیله‌ی بتاآمیلوئید[16] در نورون‌های هیپوکمپ موش جلوگیری میکند. همچنین افزایش اضطراب به دنبال اواریکتومی[17] مورداشاره قرارگرفته است. اضطراب یک علامت خلقی رایج است که توسط زنان یائسه تجربه می‌شود (۱۰).

با توجه به کاهش شدید هورمون استروژن و عوارض ناشی از آن در بانوان یائسه و غنی بودن یونجه از ترکیبات فیتواستروژنیک، در این مطالعه اثر عصاره این گیاه بر یادگیری فضایی و اضطراب با استفاده از ماز آبی موریسو ماز بعلاوه مرتفع در موش‌های اواریکتومی شده مورد بررسی قرار گرفت. همچنین وضعیت استرس اکسیداتیو نیز در هیپوکمپ به‌عنوان بخشی از مغز که در یادگیری و اضطراب دارای نقشی مهم بررسی شد (۱۰).

روش کار

مطالعه روی ۴۵ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با حداقل سن ۳ ماهه در محدوده وزنی ۱۷۰ تا ۲۲۰ گرم انجام شد. حیوانات در طول مطالعه در حیوانخانه دانشکده دامپزشکی در شرایط استاندارد، دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت روشنایی،۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. همچنین روش تحقیق و رفتار با حیوانات در مراحل مختلف مطالعه با تائید شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی اهواز و طبق دستورالعملهای مربوطه به انجام رسید. حیوانات دو هفته بعد از جراحی به‌طور تصادفی به گروه‌هایی ۹ تایی شامل گروه‌های شاهد (sham)، اواریکتومی (ovx)، شاهد درمان (sham+۴)، اواریکتومی+درمان با دوز پایین (۲+ ovx) و اواریکتومی+ درمان با دوز بالا (۴+ ovx) تقسیم شدند. گروه‌های شاهد و شاهد درمان جراحی شدند و تخمدان آنها پس از لمس به محل اصلی بازگردانده شد. سایر گروه‌ها مورد جراحی اواریکتومی قرار گرفتند. به غذای گروه ovx+۲ مقدار mg/kg۲ و به غذای گروه‌های sham+۴ و ovx+۴ مقدار mg/kg۴ عصاره یونجه اضافه شد.

روش عصاره گیری گیاه یونجه

در هر مرحله از عصاره‌گیری میزان ۱۵۰ گرم یونجه خشک پودر شده با ۱۰۰۰ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد و ۵۰۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط و توسط دستگاه همزن به مدت ۷۲ ساعت مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل به‌وسیله کاغذ صافی صاف و درون بن ماری گذاشته شد تا الکل آن تبخیر شود و پس از تبخیر الکل به میزان ۱/۵ برابر حجم عصاره باقی‌مانده اتیل استات اضافه و حدود ۳۰ دقیقه توسط دستگاه شیکر مگنت مخلوط شد. مخلوط حاصل

1 lignans
2 enterolactone
3 enterodiol
4 coumestanes
5 coumestrol
6 flavonoids
7 neuroprotective
8 Oxidative stress
9 degeneration
10 hippocampus
11 Forehead cortex
12 neurodgenerative
13 Alzheimer's disease
14 Medicaco Sativa
15 antioxidants
16 Bete-amyloid
17 ovariectomy

به مدت حداقل ۳۰ دقیقه بدون حرکت قرار داده شد تا حالت دوفازی ایجاد شود و فاز رویی با استفاده از پیپت جدا و درون آون تغلیظ گردید. درنهایت پس از محاسبه مقدار ماده خشک، عصاره تغلیظ شده به نسبت لازم با جیره پودر شده مخلوط و حداقل طی ۲۴ ساعت رطوبت‌گیری شد (۱۱). برای تعیین LD۵۰ خوراکی عصاره تهیه‌شده از راهنمای شماره ۴۲۵ استفاده شد. حداکثر دوزهای قابل‌استفاده در این آزمون ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم بود ولی استفاده خوراکی این دوزها منجر به تلف شدن حتی یک حیوان هم نشد. لذا محدودیت دوز در این مطالعه در نظر گرفته نشد (۱۳).

ماز آبی موریس[1]: ماز آبی از یک مخزن آب استوانه‌ای سیاه‌رنگ به قطر ۱۴۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر تشکیل‌شده که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر از آب پر می‌شد. استخر به شکل فرضی به ۴ ربع تقسیم می‌شد. یک سکوی قابل جابجایی در یک جایگاه مشخص از استخر قرار داده می‌شد به شکلی که به‌اندازه‌ی ۲ سانتی‌متر زیرآب قرار می‌گرفت. استخر در اتاقی قرار داشت که اشکالی در خارج از ماز بر روی دیوار آن نصب‌شده بود. حرکات حیوانی توسط دوربینی در بالای ماز ثبت و ردیابی و توسط نرم‌افزار اتوویژن (برج صنعت آزما- ایران) مسیر، سرعت و زمان سپری‌شده تا یافتن سکو ثبت می‌شد.

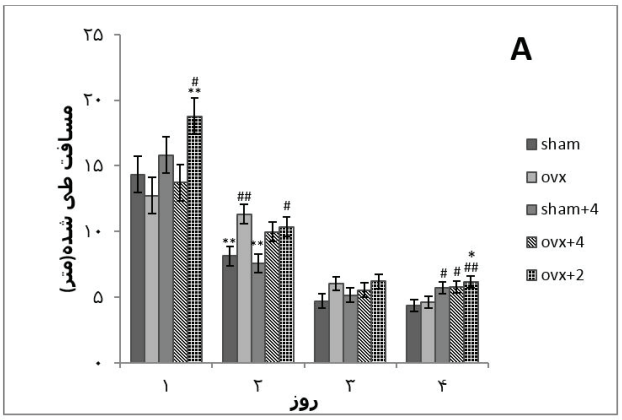
هر موش طی ۴ روز و هرروز ۴ بار متوالی بافاصله‌ی زمانی ۱۰ دقیقه در ماز تحت آموزش قرار میگرفت. در هر بار آموزش در حالیکه سر حیوان به سمت دیواره استخر بود از یکی از قسمت‌های چهارگانه به داخل آب رها می‌شد. به حیوان مدت‌زمان یک دقیقه زمان داده می‌شد تا برای پیدا کردن سکو تلاش کند. اگر در این مدت سکو را پیدا می‌کرد به مدت ۲۰ ثانیه روی سکو قرار می‌گرفت و سپس از استخر خارج می‌شد. موش‌هایی که محل سکو را پیدا نمی‌کردند توسط آزمایشگر با دست به سمت سکو راهنمایی شده و پس‌ازاینکه ۲۰ ثانیه روی سکو می‌ماندند از ماز خارج‌شده به‌آرامی خشک و به قفس منتقل می‌شدند. در روز پنجم، سکو از داخل استخر خارج و هر حیوان به‌صورت تصادفی دریکی از ربع‌های استخر رها می‌شد. یک دقیقه به حیوان‌ها فرصت داده می‌شد تا در استخر شنا کنند و مدت‌زمانی که حیوان در یک‌چهارم هدف (قسمتی که سکو در آن قرار داشت) سپری می‌کرد برای بررسی میزان حافظه حیوان مورد ارزیابی قرار گرفت.

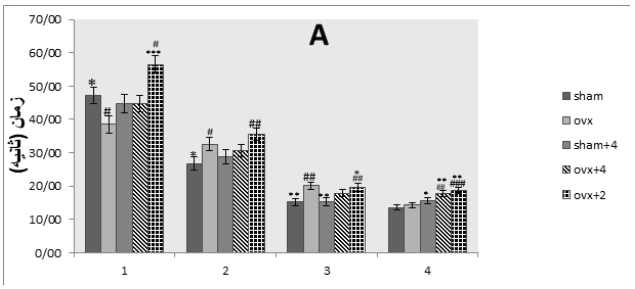
ماز بعلاوه مرتفع[2]: ماز بعلاوه مرتفع در این مطالعه از دو بازوی باز و دو بازوی بسته (هر بازو ۵۰ × ۱۰ سانتیمتر) بود که توسط یک مربع مرکزی (۱۰ × ۱۰ سانتیمتر) به هم متصل شده بودند. ماز توسط پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ سانتیمتری از سطح زمین قرار داشت. در ابتدای آزمون، موش‌های صحرایی بر روی مربع مرکزی قرار داده شدند، به‌طوری‌که سر حیوان رو به یکی از راهروهای بسته قرار گرفت و به مدت ۵ دقیقه حیوان در ماز قرار گرفت. ماز پس از هر آزمون توسط اتانول ۷۰ درصد تمیز شد. مسیر حرکت هر موش توسط یک دوربین ردیاب فیلم‌برداری و با استفاده از نرم‌افزار اتوویژن زمان سپری‌شده در بازوهای باز و بسته و همچنین تعداد ورود به بازوهای باز و بسته ثبت شد و درنهایت درصد زمان سپری‌شده در بازوهای باز و درصد ورود به بازوی باز محاسبه شد و این پارامترها به‌عنوان معیار و میزان سنجش اضطراب در نظر گرفته شدند. همچنین تعداد ورود به هر دو بازو به‌عنوان شاخص حرکت در نظر گرفته شد (۱۲).

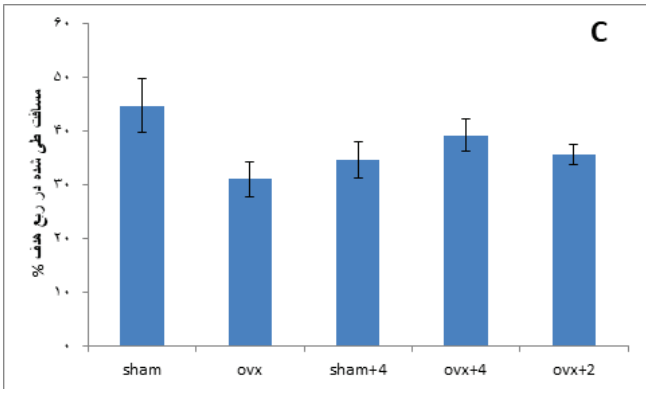
برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین± میانگین خطای معیار، بیان شد. برای بررسی احتمال وجود اختلاف آماری از آزمون ANOVA یک‌طرفه و در صورت تائید وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از پس‌آزمون LSD برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد.

ماز آبی موریس: مسافت طی شده در طی چهار روز آموزش درمجموع روند کاهشی قابل‌توجهی را نشان داد (p<۰/۰۱). همچنین تیمارهای موردمطالعه تأثیر متفاوتی بر مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان داشتند (p<۰/۰۱). مقایسه مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در هریک از روزهای آموزش به‌غیراز روز سوم تفاوت معنی‌داری را آشکار ساخت (نمودار A۱). به‌گونه‌ای که مسافت طی شده تا رسیدن به سکوی پنهان[3] در گروه ovx +۲ در روزهای اول و دوم و در تمامی گروه‌های تیمار شده با عصاره یونجه در روز چهارم نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (p<۰/۰۵). مدت‌زمان سپری‌شده در طی چهار روز آموزش درمجموع روند کاهشی قابل‌توجهی را نشان داد (p<۰/۰۰۱). مدت‌زمان سپری‌شده برای رسیدن به سکوی پنهان در هریک از روزهای آموزش تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها آشکار ساخت (نمودار B۱). این مدت زمان در گروه ovx +۲ در تمامی روزهای آموزش، در گروه ovx در روزهای دوم، سوم و چهارم آموزش و در گروه sham+۴ در روز چهارم آموزش بیشتر از گروه شاهد بود

1 Morris water maze
2 Elevated plus maze
3 Traveled distance



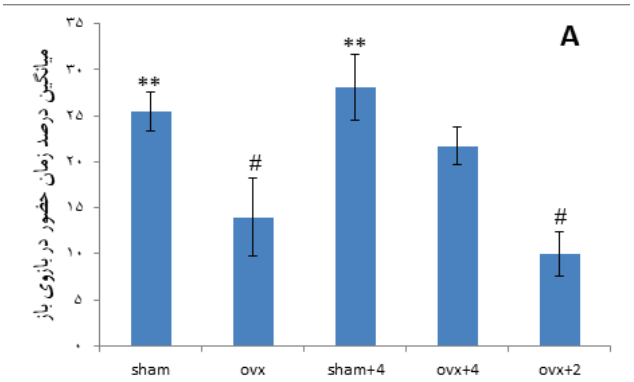


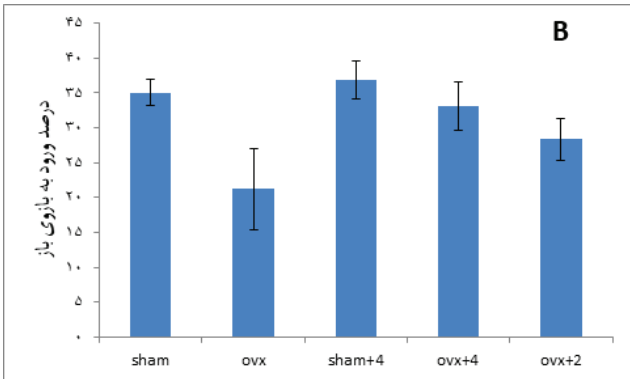


شکل ۱: مقایسه میانگین±خطای مسافت طی شده (A)، مدت زمان سپری‌شده (B) در مرحله یادگیری و درصد مسافت طی شده در ربع هدف در مرحله آزمون (C). گروه‌های ovx+۴، sham+۴ و ovx+۲ به ترتیب با ۴، ۴ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه تیمار شدند. و گروه‌های ovx و sham بدون اضافه نمودن عصاره یونجه در جیره غذایی تیمار شدند. *: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه ovx (*:۰/۰۵>p، **:۰/۰۱>p، *:۰/۰۰۱>p). #: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه شم(#:۰/۰۵>p، ##:۰/۰۱>p، ###:۰/۰۰۱>p).**

(۰/۰۵<p). همچنین درصد مسافت طی شده در ربع هدف[1] در مرحله آزمون اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار C۱).

ماز بعلاوه مرتفع: میانگین درصد زمان حضور در بازوی باز[2] (OAT٪) در گروه‌های ovx و ovx+۲ نسبت به گروه‌های sham و sham+۴ کمتر بود (۰/۰۱>p) ولی در گروه ovx+۴ با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار A۲). درصد ورود به بازوی باز[3] (OAE٪) ازلحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها نداشت (۰/۰۵<P؛ نمودار B۲). هرچند درصد ورود به بازوهای باز در گروه‌های اواریکتومی شده دریافت‌کننده عصاره یونجه نسبت به گروه ovx بیشتر بودند ولی بررسی‌های آماری بیانگر اختلاف نبود.





نمودار ۲: مقایسه میانگین±خطای معیار میانگین درصد زمان حضور در بازوی باز (نمودار A) و درصد ورود به بازوی باز (نمودار B) در ماز بعلاوه مرتفع. گروه‌های ovx+۴، sham+۴ و ovx+۲ به ترتیب با ۴، ۴ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه تیمار شدند. و گروه‌های ovx و sham بدون اضافه نمودن عصاره یونجه در جیره غذایی تیمار شدند. *: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه ovx است (: ۰/۰۱> p)؛#: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه sham است (#:۰/۰۵>p).**

میزان استروژن[4] در گروه‌های sham و sham+۴ از گروه ovx بیشتر بود. با مقایسه مقدار مالون دی آلدهید[5](MDA) در گروه‌های موردمطالعه، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، هرچند که در گروه ovx+۲ افزایش بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها وجود داشت. میانگین فعالیت کاتالاز[6] در گروه ovx+۴ به‌صورت معنی‌داری کمتر از گروه‌های sham و ovx بود (۰/۰۰۱>p). فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز[7](SOD) در گروه ovx کاهش و در گروه‌های ovx+۲ و ovx+۴ نسبت به گروه ovx افزایش یافت. اگرچه فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز[8](GPx) بین گروه‌ها متعلق به گروه sham+۴ بود ولی در بررسی‌های آماری اختلاف معنی‌داری با گروه

1 Target quadrant travel%
2 Open Arm time%
3 Open Arm Entry%

4 estrogen
5 Malondialdehyde
6 catalase
7 Superoxide dismutase
8 Glutathione peroxidase

جدول ۱: مقایسه میانگین±خطای معیار استروژن خون و متغیرهای اندازهگیری شده مرتبط با وضعیت اکسیداتیو در هیپوکمپ. گروه‌های sham+۴، ovx+۴ و ovx+۲ به ترتیب با ۴، ۴ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه تیمار شدند. و گروه‌های ovx و sham بدون اضافه نمودن عصاره یونجه در جیره غذایی تیمار شدند.

متغیر	sham	Ovx	sham+4	ovx+4	ovx+2
استروژن (pg/ml)	۵۶/۶۲±۹/۲۸ *	۲۳/۴۲±۲/۶۲ #	۴۰/۵±۴/۴۱ *	۳۰/۲۵±۴/۰۵	۲۸±۳/۲۲
مالون دی آلدئید (um/g tissue)	۴۸۳±۲۴	۵۲۲±۱۸	۴۹۱±۲۹	۴۹۷±۲۲	۵۷۶±۲۰
کاتالاز (um/g tissue)	۱/۴۴±۰/۱۱	۱/۴۵±۰/۰۹	۱/۴۴±۰/۰۹	۰/۸۴±۰۵۰ ###***	۱/۳۳±۰/۰۳
سوپر اکسید دیسموتاز (IU/g tissue)	۳۴۹/۱۲±۱۱/۷۸	۲۹۱/۷۵±۱۱/۵۹ #	۳۲۴/۲۵±۱۹/۴۹	۳۶۸/۱۲±۲۵/۸۳ **	۳۵۳/۲۵±۱۱/۱۰ *
گلوتاتیون پراکسیداز (IU/g tissue)	۰/۹۹±۰/۰۵	۱/۰۳±۰/۰۵	۱/۲۶±۰/۰۷	۱/۱۹±۰/۰۷	۱/۱۳±۰/۲۲

: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه ovx(: p<۰/۰۵، **: p<۰/۰۱، ***: p<۰/۰۰۱). #: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه sham(#: p<۰/۰۵، ###: p<۰/۰۰۱).

ovx و sham مشاهده نگردید.

بحث

یکی از اختلالات رایج در یائسگی کاهش حافظه و یادگیری است. این افراد حافظه قدیمی را حفظ میکنند و همچنین می‌توانند یادگیری جدید داشته باشند ولی برای تشکیل حافظه بلندمدت دچار مشکل می‌شوند. مطالعات نشان میدهد که اختلال حافظه و یادگیری به دلیل کاهش سطح استروژن بعد از یائسگی میباشد (۲). فیتواستروژن‌ها ممکن است هر دو اثر مفید و مخرب را بر عملکردهای شناختی داشته باشند (۱۲).

در مطالعه حاضر در ماز آبی موریس میانگین مسافت طی شده و زمان سپری‌شده برای یافتن سکوی پنهان در گروه ovx+۲ بیشتر بود. همچنین پیشرفت یادگیری در ۴ روز متوالی آموزش نیز در هر دو گروه اواریکتومی درمان شده کمتر بود، ولی در روز آزمون مدت زمان سپری‌شده و مسافت طی شده در ربع هدف در این گروه‌ها با گروه شاهد تفاوتی نداشت. بنابراین اواریکتومی در طی ۷۵ روز منجر به اختلال حافظه نشد، ولی استفاده از عصاره اتیل استاتی یونجه در حیوانات اواریکتومی، نه حیوانات سالم، یادگیری را کاهش داد. البته بر اساس این نتایج میزان یادآوری در روز آزمون در این گروه‌ها متفاوت نبود. شاید در مطالعه حاضر زمان سپری‌شده (۷۵ روز) برای تأثیر اواریکتومی بر حافظه کافی نبوده است.

در مطالعهی حاضر از ماز بعلاوه مرتفع برای بررسی رفتارهای مرتبط با اضطراب استفاده شد. در مطالعه ما مشاهده شد موش‌هایی که اواریکتومی شده بودند ولی عصاره یونجه دریافت نکردند نسبت به موش‌های گروه شاهد، مدت زمان کمتری در بازوی باز ماز بعلاوه مرتفع قرار گرفتند؛ که نشان‌دهنده افزایش اضطراب به دلیل اواریکتومی میباشد. به‌هرحال عصاره مورداستفاده در حیوانات دست‌نخورده تأثیر قابل‌توجهی بر اضطراب نداشت، ولی تیمار با عصاره در حیوانات اواریکتومی شده توانست این پارامترها را بهبود ببخشد که به معنی کاهش اثرات اضطراب زایی اواریکتومی در پی مصرف عصاره یونجه میباشد. اثرات ضد اضطرابی مقادیر بالای هورمونهای استروییدی جنسی در مرحله پرواستروس و یا به دنبال تزریق اگزوژنیک[1] آنها در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده در ماز بعلاوه مرتفع نشان داده‌شده است(۱۴).

به نظر می‌رسد که تأثیر رفتاری فیتواستروژن‌ها با میانجیگری گیرنده‌های $GABA_A$ و یا با اثر روی پیامرسانهای[2] شیمیایی که بر فعالیتGABA[3] مؤثر میباشند، انجام شود (۱۳). داروهای ضد اضطراب نظیر بنزودیازپینها با باندشدن به گیرنده‌های $GABA_A$ باعث القای رفتارهای ضد اضطرابی در ماز بعلاوه مرتفع می‌شوند. استروژن، پروژسترون و آندروژن‌ها(علی‌الخصوص پروژسترون و متابولیتهای اندروژن) از طریق افزایش محلهای اتصال بنزودیازپینها روی گیرنده‌های $GABA_A$، افزایش تعداد گیرنده‌های $GABA_A$ و افزایش تحریک ورود کلر از طریق گیرنده‌های $GABA_A$ بر گیرندهی $GABA_A$ اثر می‌گذارند. قابل‌توجه اینکه تحریک گیرنده‌های $GABA_A$ یا افزایش اثر GABA به‌واسطه‌ی استروئیدهای جنسی معمولاً با کاهش اضطراب، تسکین و کاهش رفتار حرکتی همراه است(۱۶ و۱۷). با توجه به نتایج این مطالعه که مصرف عصاره اتیل استاتی یونجه باعث کاهش رفتارهای اضطرابی در آزمون ماز بعلاوه مرتفع شده ولی تأثیر منفی بر حافظه داشت می‌توان نتیجه گرفت که شاید مصرف ماده فیتواستروژنی در مطالعهی حاضر با تشدید

1 exogenic
2 neurotransmitters
3 Gamma-Aminobutyric Acid

اثرات گابائرژیک باعث کاهش اضطراب و اختلال حافظه شده است.

در مطالعه حاضر غلظت استروژن در گروه اواریکتومی کمتر از گروه شاهد و گروه شاهد دریافت‌کننده یونجه با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم بود که نشان می‌دهد اواریکتومی سبب کاهش استروژن شده است. عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های اواریکتومی تیمار شده و گروه‌های غیر اواریکتومی، علیرغم نداشتن تخمدان، احتمالاً ناشی از تداخل فیتواستروژن‌های موجود در یونجه با آزمون الایزای رقابتی برای اندازه‌گیری استروژن بوده است. از طرف دیگر هرچند مقدار استروژن در گروه شاهد و گروه شاهد تیمار شده با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت، ولی مقدار آن در گروه شاهد تیمار شده کمتر بود. این درحالی است که در صورت پذیرش فرض تداخل فیتواستروژن درمانی با استروژن درون‌زا در زمان اندازه‌گیری باید مقدار استروژن در این گروه بالاتر می‌بود.

در مطالعات مختلفی استرس اکسیداتیو باعث کاهش حافظه و یادگیری شده است. نورون‌های مغز به استرس اکسیداتیو بسیار حساس هستند. SOD باعث تبدیل سوپراکسید[1] به H_2O_2 و اکسیژن می‌شود (۱۶). SOD یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در سیستم دفاع آنتیاکسیدانی است (۱۹). آنتی‌اکسیدان‌ها اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد را به حداقل رسانده و از سلول‌های بدن در برابر آسیبهای ناشی از این رادیکال‌ها محافظت می‌کنند. ازجمله این رادیکال‌های آزاد، یون پراکسید ناپایدار و فعال است که منجر به آسیبهای غشای سلولی در سلولهای مصرف‌کننده اکسیژن می‌شود. برای از بین بردن سمیت اکسیژن فعال، طیف وسیعی از مکانیسم‌های دفاعی بدن ازجمله آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) علیه اکسیدانت‌ها فعال می‌شوند. جایگاه SOD در سیتوزول بیشتر بافت‌های بدن می‌باشد. گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) تبدیل پراکسید هیدروژن به آب را کاتالیز می‌کند (۱۸).

مالوندیآلدئید (MDA) محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است که مارکر خوبی برای نورون‌های دژنره شده می‌باشد (۱۸). گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) که از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و دیگر ترکیبات شیمیایی ساخته‌شده‌اند می‌توانند منجر به پیشرفت استرس اکسیداتیو در بدن و درنتیجه سبب مرگ نورونی گردند (۲۰). بافت مغز غنی از فسفولیپیدهایی است که می‌تواند موردحمله گونه‌های بسیار واکنش‌پذیر اکسیژن برای شروع پراکسیداسیون لیپید قرار گیرد. پراکسیداسیون لیپید منجر به تولید آلدئیدهای سمی گردیده که یکی از سمی‌ترین آن‌ها MDA است. MDA در حال حاضر به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته می‌شود. ازاین‌رو می‌توان با اندازه‌گیری میزان MDA به مقدار آسیب لیپیدهای سلولی در برابر اکسیداسیون پی برد (۲۰،۲۱)

هیپوکامپ یکی از بخش‌های مهم عهده‌دار فعالیت عصبی تشکیل حافظه است و برای تشکیل چندین نوع از یادگیری و حافظه در موش و دیگر پستانداران ضروری است، هم‌چنین نقش مهمی در پردازش و به خاطر آوری اطلاعات حافظه و جهت‌یابی، تثبیت حافظه و تبدیل حافظه کوتاه‌مدت[2] به حافظه بلندمدت[3] دارد(۲۰). در مطالعه حاضر غلظت MDA در هیپوکمپ تحت تأثیر اواریکتومی و تیمار با عصاره قرار نگرفت ولی در گروه ovx+۴ نسبت به گروه شاهد فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش و فعالیت SOD افزایش یافت. این نتایج بیانگر آن است که اواریکتومی باعث استرس اکسیداتیو نشده است و استفاده از عصاره اتیل استاتی[4] یونجه نیز خاصیت آنتیاکسیدانی نداشته است.

ازآنجایی‌که فیتواستروژن‌ها توانایی اتصال به گیرنده‌های آلفا و بتای استروژن را دارند، احتمالاً با تأثیر برگیرنده‌های هیپوتالاموسی و هیپوفیزی و اعمال فیدبک منفی منجر به کاهش سطح استروژن شده‌اند. برخی فیتواستروژن‌ها دارای توانایی تشدید اثر استروژن‌ها هستند و بنابراین استروژن آگونیست نامیده می‌شوند و برخی اثرات استروژن‌های آندوژن را کاهش می‌دهند و بنابراین استروژن آنتاگونیست نامیده می‌شوند. زمانی که فیتواستروژن‌ها نقش آگونیستی داشته باشند همانند یک استروژن داخلی پستاندار عمل کرده و سبب افزایش اثر استروژن‌ها در بدن می‌شوند. ولی درجایی که نقش آنتاگونیستی داشته باشند بااتصال به گیرنده‌های استروژنی و ایجاد تغییر شکل در آنها مانع از برقراری اتصال بین استروژن‌ها با گیرنده‌ها شده و به این طریق باعث کاهش عملکرد استروژن‌های داخلی می‌شوند. بنابراین فیتواستروژن‌ها مشابه با ترکیبات غیراستروئیدی که سبب افزایش یا کاهش فعالیت استروژن‌ها می‌شوند، رفتار می‌کنند.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه عصاره اتیل استاتی یونجه علی‌رغم اینکه اضطراب ناشی از اواریکتومی در موش‌های صحرایی موردمطالعه (به‌عنوان مدلی از یائسگی) را کاهش داد، یادگیری و حافظه فضایی را به دنبال اواریکتومی تخریب نمود. در ضمن اواریکتومی به‌صورت مستقل منجر به کاهش حافظه نشد.

1 superoxide

2 Short-term memory
3 Long-term memory
4 Ethyl acetate

تشکر و قدردانی

از دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پایان‌نامه دوره ارشد فیزیولوژی تأمین نمود تشکر و قدردانی می‌شود

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

منابع

1. Moutsatsou P, The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones Athens*. 2007;93-173.
2. Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N, Phytoestrogen content of foods consumed in anada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutrition and Cancer*. 54. 2017; 184-201.
3. Anderson LN, Cotterchio M, Boucher BA, Kreiger N, Phytoestrogen intake from foods, during adolescence and adulthood, and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor tumor subgroup among Ontario women. *International Journal of Cancer*. 2013; (132), 92-1683.
4. Sumien N, Chaudhari K, Sidhu A, Forster, Does phytoestrogen supplementation affect cognition differentially in males and females? *Brain Research*. 2013; (1514),123-127.
5. Hajirahimkhan, Dietz,Bolton,J.L. Botanical modulation of meno- pausal symptoms:mechanisms of action?. *Planta Medica*. 2013; (79),538–553.
6. Bourque, M., Dluzen, DE., Di Paolo, T, Signaling pathways mediating the neuroprotective effects of sex steroids and SERMs in Parkinson's disease. Front. *Neuroendocrinology*. 2017; (33), 169-178.
7. Shanmugan S, Epperson CN. Estrogen and the prefrontal cortex: Towards a new understanding of estrogen's effects on executive functions in the menopause transition. Human Brain Mapping.2012.
8. A.M. Barron, C.J. Pike, Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease, *Frontier in Bioscience*, 2012; (4),976-997.
9. AssinderS; Davis R; Fenwic M And Glover A, Adult-only exposure of male rats to a dite of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and postmeiotic germ, cells.reproduction 2007; (133),11-19.
10. Omrani, A.; Ghadani, MR.; Fathi, N.; Tahmasian, M.; Fatholllahi, Y. and Touhidi, Naloxone improves impalrment of spatial performance induced dy pentylenetetrazol kindling in Rats, *Neuroscience*. 2007;824-831.
11. Kadifkova, PT., Kulevanova, S, and Stefova, M. in vitro antioxidant activity of some T. pulim species. *Acta Pharmaceutica*. 2005.
12. Diaz-Veliz.G, T. Alarcon, C. Espinoza, N. Dussaubat, S. Mora, Ketanserin and anxiety levels: Influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1997; (58), 637-642.
13. OECD guideline for testing of chemicals (2001)
14. Frye.C.A, S.M. Petralia, M.E. Rhodes, Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3a, 5a-THP, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2000; (67),1–10.
15. Zimmerberg.B, M.J. Farley, Sex differences in anxiety behavior in rats: Role of gonadal hormones, *Physiology & Behavior*. 1993; (54),1119-1124.
16. Lephart.E.D, A review of brain 5a-reductase: Cellular, enzymatic, and molecular perspectives and implications for biological function, Mol. *Cell. Neuroscience*. 1993; (4),473-484.
17. Kanamaru, T.; Kamimura, N.; Yokota, T.; Iuchi, K.; Nishimaki, K, Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 2015;126-131.
18. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA: The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochim Biophys Acta. 2018(1804); 245-262.
۱۹. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H: Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2011; (134),1914-1924.
۲۰. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are Oxidative Stress− Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β-Cell Dysfunction? Diabetes. 2003(54),1-8.
21. Smith, C.U.M. "Memory, in elements of molecular neurobiology, John Wiley & Sons Ltd, Ed. Smith C.U.M, 2002;447-506.