

تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*) بر حافظه احترازی غیر فعال و درد ناشی از ایسکمی گلوبال در موش صحرایی

محبوبه سترکی^۱، اعظم مشفق^{۲*}، نسرين رئوفی^۳

گروه زیست شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران؛ گروه زیست شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران؛ گروه فیزیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۵

چکیده:

زمینه و هدف: ایسکمی مغزی و خون رسانی مجدد علت اصلی ناتوانی جدی و طولانی مدت در جهان است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بابونه بر اختلالات حافظه و درد ناشی از ایسکمی بود. روش بررسی: گل های خشک بابونه (*Matricaria chamomilla*) از عطاری تهیه شده و توسط الکل ۷۰٪ عصاره گیری شد. حیوانات به صورت تصادفی به ۶ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل فقط نرمال سالین دریافت کردند، گروه ایسکمی تحت ایسکمی قرار گرفته و نرمال سالین دریافت کردند، گروه شاهد (sham): تحت جراحی قرار گرفتند، بدون اینکه شریان های کاروتید آن ها بسته شود. گروه های درمانی با عصاره تحت ایسکمی قرار گرفته و عصاره بابونه را به صورت داخل صفاقی در دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. تست رفتاری توسط شاتل باکس و تست ضد درد توسط تست تیل فلیک انجام شد. یافته ها: عصاره بابونه در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم حافظه احترازی غیر فعال موش های صحرایی تحت ایسکمی را به طور معنی دار افزایش داد. علاوه بر این عصاره بابونه زمان تأخیر ظهور رفلکس دردناک دم را در تست تیل فلیک به طور معنی داری افزایش داد و غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره اثر بیش تری نسبت به غلظت های بالاتر آن نشان داد. نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثرات حفاظتی عصاره بابونه در برابر اختلال حافظه احترازی و درد ایجاد شده در اثر ایسکمی بود که احتمالاً به دلیل اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی عصاره گیاه می باشد.

واژه های کلیدی: ایسکمی مغزی، حافظه، یادگیری، درد.

مقدمه:

خون رسانی سیستمیک به وجود می آید (۳). ایسکمی کانونی (Focal ischemia) در اثر آمبولی و ترومبوز و ایسکمی گلوبال (Global ischemia) در نتیجه ایست قلبی به وقوع می پیوندد (۴). در طی ایسکمی، کاهش موقت یا دائم جریان خون به مغز سبب کاهش یا عدم انتقال گلوکز و اکسیژن مورد نیاز برای تأمین هموستازی سلولی می شود. بافت مغزی به دلیل متابولیسم بالا و ذخایر اکسیژن کم حساسیت بسیار زیادی به آسیب ایسکمی دارد (۵). طی ایسکمی، افزایش کلسیم درون سلولی سبب افزایش غلظت

سکته مغزی مهم ترین عامل از کارافتادگی افراد بالای ۶۵ سال بوده و بعد از سرطان و سکته قلبی سومین عامل مرگ و میر در جهان به شمار می رود (۱). سکته ی مغزی سندر می است که با شروع حاد علائم نورولوژیک به مدت حداقل ۲۴ ساعت مشخص می شود و به ۲ نوع ایسکمیک و هموراژیک تقسیم می گردد. مطالعات نشان می دهد که ۸۵٪ سکته های مغزی توسط ایسکمی به وقوع می پیوندد (۲). ایسکمی در اثر عواملی چون ترومبوز، آمبولی و کاهش

فضایی در مغز می باشد و LTP یکی از مهم ترین مکانیسم های سلولی است که در فرایند یادگیری و حافظه فضایی در گیر می باشد (۱۲). شواهد بالینی حاکی از آن است که هیپرفیوژن مزمن مغزی منجر به اختلال درد نیز می گردد (۲). در سال های اخیر توجه محققین به بررسی اثر محافظتی ترکیبات آنتی اکسیدانی، به خصوص از منابع گیاهی بر آسیب مغزی ایجاد شده توسط ایسکمی معطوف شده است و اثر محافظتی تعدادی از گیاهان از قبیل اسطوخودوس، چای سبز، پونه، زعفران، انگور، بومادران، پیاز و زیتون نشان داده شده است (۳-۱۹، ۱۳).

گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*) گیاهی است دائمی و کوچک به ارتفاع تقریباً ۳۰ سانتی متر دارای بویی معطر که در چمنزارها و اراضی شنی می روید (۲۰). گیاه بابونه در طب سنتی ایران به عنوان تسکین دهنده درد و تب و عامل ضد اسپاسم مورد استفاده قرار می گیرد (۲۱). مطالعات حاکی از اثرات آنتی میکروبی، آنتی اکسیدانی بهبود دهنده زخم سوختگی گیاه بابونه است (۲۴-۲۲). اثرات نورپروتکتیو گیاه بابونه شامل بهبود اختلالات حافظه و حرکتی القا شده در اثر اسکوپولامین و کاهش وابستگی به مورفین و علائم سندروم قطع آن نیز گزارش شده است (۲۱، ۲۵). در این تحقیق برانیم تا اثرات عصاره محافظتی گیاه بابونه را بر اختلالات حافظه احترازی و درد ناشی از ایسکمی گلوبال در موش های صحرائی بررسی کنیم.

روش بررسی:

گل های تازه و خشک بابونه از عطاری خریداری شده و توسط گیاه شناس مرکز تحقیقات گیاهی در دانشگاه آزاد واحد لاهیجان مورد تأیید قرار گرفت. گل های خشک شده گیاه به وسیله آسیاب برقی در حد ملایم پودر شده و ۵۰ گرم از پودر حاصل با ۵۰۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۷۰٪ (۷۰٪ اتانول و ۳۰٪ آب مقطر) مخلوط شده و پس از گذشت ۴۸ ساعت (۱۲ ساعت ۱ بار شیک به مدت ۵ دقیقه) محتویات داخل ظرف به وسیله قیف

کلسیم درون میتوکندری ها و در نتیجه تشکیل کمپلکس نفوذپذیری میتوکندریایی و تولید ROS (رادیکال های فعال اکسیژن) می شود (۶). رادیکال های ROS سبب آسیب اکسیداتیو اجزای سلولی، تغییر در بازهای اسیدهای نوکلئیک، شکستن زنجیره DNA و شکستن باندهای گلیکوزیلی بین ریبوز و بازها می شوند (۷). ایسکمی مغزی توسط آبخاری از وقایع متابولیکی رخ داده و با تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن، سبب تشدید آسیب سلولی می شود (۸). آسیب رادیکال های آزاد مکانیسمی است که در فازهای اولیه ایسکمی شروع می شود و یکی از وقایع اصلی در این زمان وقوع پراکسیداسیون لیپدهاست. افزایش کلسیم درون سلولی سبب فعال شدن فسفولیپاز C و A می گردد که این آنزیم ها فسفولیپیدها را هیدرولیز می کنند و این در حالی است که سنتز مجدد فسفولیپیدها نیازمند حضور ATP است. در نتیجه به دنبال افزایش غلظت کلسیم درون سلولی و کاهش ATP در ایسکمی، اسیدهای چرب آزاد، رها شده و غشا آسیب می بیند. در این مرحله که پاسخ حاد ایسکمی نامیده می شود مرگ سلولی از نوع نکروز اتفاق می افتد (۹). در فاز تأخیری ایسکمی مرگ سلولی از نوع آپتوز می باشد که با علائمی چون انقباض کروماتین هسته ای، تکه تکه شدن DNA، چروک شدن سیتوپلاسم و حبایی شکل شدن غشا اتفاق می افتد (۱۰). آپتوز توسط فاکتورهای متعدد و از طریق مسیر داخلی (intrinsic pathway) با واسطه میتوکندری و یا مسیر خارجی (extrinsic pathway) با واسطه گیرنده های مرگ سلولی، فعال می شود. آپتوز مرگی است که مانع رها شدن محتوی اندامک هایی چون لیزوزوم به ماتریکس خارج سلولی و در نتیجه آسیب ثانویه به بافت ها از طریق التهاب می شود. مرگ از نوع آپتوز بیشتر زمانی به وقوع می پیوندد که انرژی به میزان کافی وجود دارد (مثلاً هنگام خون رسانی مجدد) (۱۱).

در ایسکمی مغزی گلوبال افزایش تولید ROS به عنوان یک عامل اساسی میانجی گری کننده مرگ تأخیری نوروں ها، به ویژه به نوروں های هرمی در هیپوکامپ منطقه CA1 در نظر گرفته می شود. هیپوکامپ جایگاه یادگیری

منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونول هر عصاره بر حسب میلی گرم در هر گرم محلول کومبوجا خشک محاسبه شد. نتایج ترکیبات فنولی، فلاونولی، فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی بر اساس مقدار میانگین و انحراف معیار در هر عصاره گیاهی محاسبه و گزارش شد (۲۶).

برای تعیین قدرت آنتی اکسیدانی عصاره به روش DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)، ابتدا هر یک از استوک های عصاره و BHT در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر و DPPH در غلظت ۰/۱ میلی مول (در اتانول) تهیه شد؛ سپس با استفاده از استوک های به دست آمده غلظت های مختلف (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰) برای عصاره و BHT آماده شد. مقدار ۲ میلی لیتر DPPH به ۲ میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره یا BHT اضافه و در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد؛ همچنین نمونه کنترل حاوی ۲ میلی لیتر اتانول و ۲ میلی لیتر DPPH کنار نمونه ها آماده شد. پس از ۱۵ دقیقه، اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر با بلانک اتانول ۰ شد و جذب نمونه ها قرائت شد. درصد مهار رادیکال های DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$I(\%) = 100 \times \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}$$

$A_{control}$ = جذب کنترل

A_{sample} = جذب نمونه

با رسم نمودار، غلظتی که در آن ۵۰٪ رادیکال های DPPH خنثی شده باشند، به دست آمد که در آن محور Y درصد مهار و X غلظت عصاره می باشد. غلظتی که در آن ۵۰٪ DPPH ها خنثی شده باشند، به عنوان IC_{50} به صورت میلی گرم ماده خشک عصاره (میلی مولار از ماده آنتی اکسیدانت) یا به صورت تعداد مولکول های DPPH خنثی شده به ازای هر مولکول ماده آنتی اکسیدانت گزارش شد (۲۶).

بوخنر صاف شده و در نهایت جمع آوری شد. عصاره به دست آمده توسط دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ گردیده و سپس با قرار دادن در آن ۴۰ درجه سانتی گراد خشک گردید. جهت تهیه غلظت های مختلف، پودر خشک عصاره (۱۴ گرم) توزین شده و توسط سرم فیزیولوژی به فرم سوسپانسیون رقیق شد (۲۱).

به طور خلاصه به ۰/۱ میلی لیتر از عصاره رقیق شده (۰/۱۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر متانول ۶۰ درجه) مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول فولین سیوکالتیو اضافه گردید و پس از ۳ تا ۵ دقیقه مقدار ۰/۴ میلی لیتر از کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نمونه ها در مقابل بلانک آب مقطر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش رقت های مختلف اسید گالیک تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه گردید. جذب نمونه ها در ۴۱۵ نانومتر تعیین شده و با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فنل تام هر عصاره بر حسب میلی گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه شد (۲۶).

به طور خلاصه ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر عصاره (۰/۱۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر متانول ۶۰ درجه) با ۰/۵ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ مخلوط و مقدار ۳ میلی لیتر استات پتاسیم ۵٪ به آن ها اضافه شد. پس از ۴۰ دقیقه جذب نمونه ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. همزمان با انجام آزمایش رقت های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونوئید هر عصاره بر حسب میلی گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه شد (۲۶).

جهت اندازه گیری ترکیبات فلاونولی ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر عصاره (۰/۱۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر متانول ۶۰ درجه) با ۰/۵ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ مخلوط و مقدار ۳ میلی لیتر استات سدیم ۵٪ به آن ها اضافه شد. پس از ۲/۵ ساعت جذب نمونه ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۴۰ نانومتر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش رقت های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و

نگه داشته شد. این روش جراحی به میزان کافی ایسکمی در مغز موش ها (forebrain) ایجاد می کند (۱۴). تزریق عصاره بابونه بعد از القای ایسکمی به صورت روزانه به مدت ۱۵ روز انجام شد (۱۸).

آزمون احترازی غیر فعال از طریق جعبه شاتل باکس انجام شد. این دستگاه شامل یک شوکر الکتریکی و ۲ محفظه روشن و تاریک است که به وسیله درب کشویی جدا شده‌اند. ته دستگاه از ۱ شبکه فلزی رسانا ساخته شده است. این تست که بر اساس ترس طراحی شده است، در ۴ روز پیاپی انجام می شود. روز اول و دوم برای آموزش و آشنایی حیوان با دستگاه می باشد. در روز اول حیوان در شاتل باکس رها شده و درب گیوتینی بین ۲ اتاق به مدت ۵ دقیقه برداشته می شود. به طور معمول به خاطر نور اتاقک روشن و تمایل ذاتی جوندگان به محیط تاریک، حیوان به اتاقک تاریک رفته و در آنجا ۵ دقیقه می ماند و در نهایت از دستگاه خارج می شود. روز دوم کاملاً شبیه روز اول آزمایش ادامه می یابد. در روز سوم نیز موش در اتاق روشن رها می شود و ۲۰ ثانیه بعد درب گیوتینی بین ۲ اتاق برداشته شده و مدت زمانی که طول می کشد تا موش وارد اتاق تاریک شود، به عنوان زمان تأخیر اولیه یا T1 ثبت می شود. با ورود حیوان به اتاقک تاریک شوک الکتریکی در حد دست و پا زدن به حیوان داده می شود (۱ میلی آمپر، ۱ ثانیه، ۱ بار) و سپس حیوان از دستگاه خارج می شود. در روز چهارم با باز شدن دریچه بین ۲ اتاقک مدت زمانی طول می کشد تا حیوان وارد اتاق تاریک شود که به عنوان زمان تأخیر در حین عبور (Step through latency) (حداکثر ۶۰ ثانیه) بیان ثبت می گردد (۱۸).

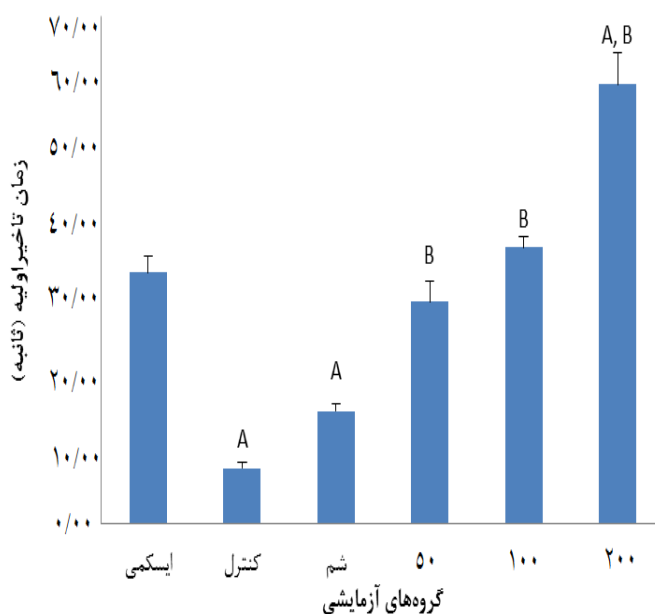
برای اندازه گیری تغییر آستانه درد حرارتی از آزمون تیل فلیک استفاده شد. این آزمایش با استفاده از دستگاه پرش دم ساخت شرکت برج صنعت ایران، انجام شد. شدت نور مورد استفاده ۷ درجه و مدت زمان قطع نوردهی به ثلث میانی دم حیوان ۱۰ ثانیه بود. چنانچه حیوان تا مدت ۱۰ ثانیه پس از تابش نور سوزان، دم خود را نمی

موش های صحرائی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی (۲۵۰-۳۰۰ گرم) از انیستیتو پاستور تهران خریداری شدند. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی در دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد) با دسترسی آزاد به آب و غذای یکسان نگهداری شدند. به منظور انجام آزمایشات حیوانات به صورت تصادفی به ۶ گروه (۷ تایی تقسیم شدند: ۱) گروه کنترل ($n=7$): گروهی که بدون عمل جراحی و دریافت دارو فقط نرمال سالین دریافت می کنند؛ ۲) گروه شاهد (sham) ($n=7$): گروهی که بدون دریافت دارو تحت عمل جراحی قرار گرفتند، ولی شریان های کاروتید بسته نشد؛ ۳) گروه ایسکمی ($n=7$): گروهی که بدون دریافت دارو تحت ایسکمی قرار گرفتند و فقط نرمال سالین دریافت کردند؛ ۴) گروه تیمار شده با عصاره بابونه ($n=7$): گروهی که در آن ها ایسکمی ایجاد شد و عصاره بابونه را به صورت داخل صفاقی در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند؛ ۵) گروه تیمار شده با عصاره بابونه ($n=7$): گروهی که در آن ها ایسکمی ایجاد شد و عصاره بابونه را به صورت داخل صفاقی در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند؛ ۶) گروه تیمار شده با عصاره بابونه ($n=7$): گروهی که در آن ها ایسکمی ایجاد شد و عصاره بابونه را به صورت داخل صفاقی در دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند.

موش های صحرائی نر نژاد ویستار به وسیله ی تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات (۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. به دنبال دریافت داروی بیهوشی، برشی در ناحیه ی قدامی طرفی گردن ایجاد شد و با مشخص شدن غلاف کاروتید، شریان های کاروتید مشترک با دقت از عصب واگوسمپاتیک شناسایی و جدا شدند. برای ایجاد ایسکمی حاد موقت، به مدت ۶۰ دقیقه شریان های کاروتید بسته شد و بعد از ۶۰ دقیقه مجدداً جریان خون برقرار شد. دمای بدن موش ها در طول دوره به کمک لامپ حرارتی در حدود ۳۷ درجه سانتی گراد

یافته ها:

نمودار شماره ۱ نتایج مربوط به میانگین زمان تأخیر اولیه (آزمون رفتاری شاتل باکس) برای تیمارهای مختلف را نشان می دهد. زمان تأخیر اولیه در موش های تیمار کنترل به طور معنی داری کم تر از گروه ایسکمی بود ($P < 0/001$). تزریق عصاره هیدروالکلی بابونه در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به موش های تحت ایسکمی زمان ثبت شده را افزایش داد و این افزایش فقط برای غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم معنی دار بود ($P < 0/001$). زمان تأخیر اولیه در موش های دریافت کننده عصاره بابونه به طور معنی داری بیش تر از گروه کنترل بود ($P < 0/001$).



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین زمان تأخیر اولیه بین گروه های مختلف دریافت کننده عصاره بابونه با گروه

ایسکمی و کنترل

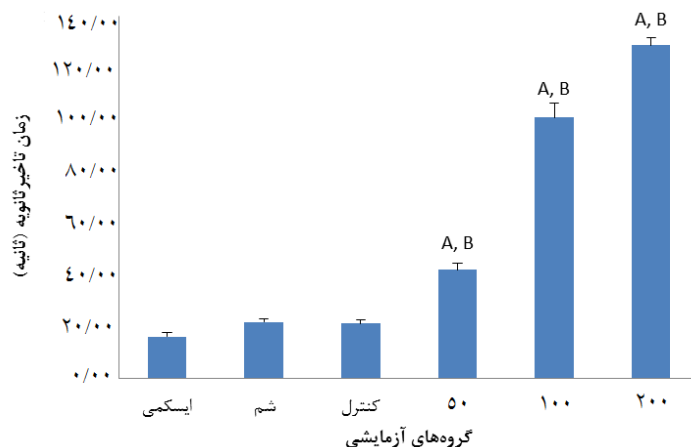
A: تفاوت معنی دار با گروه ایسکمی؛ B: تفاوت معنی دار با گروه کنترل؛ A, B: تفاوت معنی دار با گروه کنترل و ایسکمی.

نمودار شماره ۲ نتایج مربوط به زمان تأخیر ثانویه را برای تیمارهای مختلف نشان می دهد. بر اساس آزمون توکی، زمان تأخیر ثانویه برای رفتن به اتاق تاریک (پس از القای شوک) در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل معنی دار نیست. تزریق عصاره بابونه در غلظت های ۵۰،

کشید، به منظور جلوگیری از آسیب بافتی محرک قطع می شد. حیوان به صورت افقی در حالتی که دم آن آزاد باشد، در محفظه مخصوص نگهداری قرار گرفت. مدت زمان تأخیر در کشیدن دم در ۳ مرتبه (بعد از ۲ دقیقه، قبل از ۲۰ دقیقه و بعد از ۲۰ دقیقه از تزریق عصاره) اندازه گیری شد و میانگین آن ها به عنوان زمان تأخیر قبل و بعد از عصاره محسوب و ثبت گردید (۲۷).

آنالیز آماری داده ها توسط نرم افزار SPSS انجام شد. بررسی نرمال بودن داده ها توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف صورت گرفت. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-Way ANOVA) و به دنبال آن آزمون توکی برای تعیین اختلاف معنی دار بین میانگین ها استفاده شد.

۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به موش های تحت ایسکمی مدت زمان اندازه گیری شده را به طور معنی داری افزایش داد ($P < 0/001$). زمان تأخیر ثانویه در موش های دریافت کننده عصاره بابونه به طور معنی داری بیش تر از گروه کنترل نیز بود ($P < 0/001$).

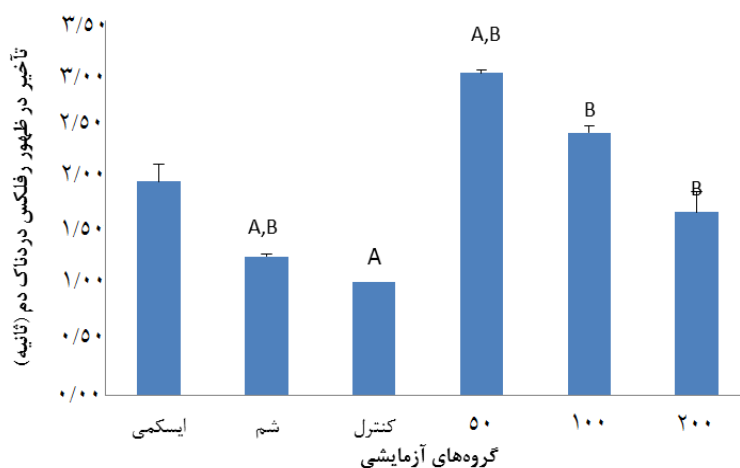


نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین زمان تأخیر ثانویه بین گروه‌های مختلف دریافت کننده عصاره بابونه با گروه ایسکمی و کنترل

A تفاوت معنی دار با گروه ایسکمی؛ B تفاوت معنی دار با گروه کنترل؛ A,B تفاوت معنی دار با گروه کنترل و ایسکمی.

۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به موش‌های ایسکمیک مدت زمان پاسخ تأخیری را به طور معنی داری افزایش داد ($P < 0.001$). عصاره در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ نیز سبب افزایش مدت زمان پاسخ تأخیری شد. هرچند این افزایش معنی دار نبود ($P > 0.001$).

میانگین پاسخ تأخیری (تست تیل فلیک) برای تیمارهای مختلف در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج میانگین پاسخ تأخیری در موش‌های صحرائی ایسکمیک به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($P < 0.001$). تزریق عصاره بابونه با غلظت



نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین زمان تأخیر ظهور رفلکس دردناک دم بین گروه‌های مختلف دریافت کننده عصاره بابونه با گروه ایسکمی و کنترل

A تفاوت معنی دار با گروه ایسکمی؛ B تفاوت معنی دار با گروه کنترل؛ A,B تفاوت معنی دار با گروه کنترل و ایسکمی.

غلظتی از عصاره که در آن ۵۰٪ رادیکال‌های DPPH خنثی شدند IC_{50} (۶۷/۲۹) میکروگرم بر میلی لیتر) بود.

قدرت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره بابونه در حذف کردن رادیکال‌های آزاد DPPH در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: قدرت آنتی اکسیدانی عصاره بابونه به روش DPPH

فعالیت حذف کنندگی رادیکال های DPPH بر حسب درصد	
۷۴/۸	۸۰
۶۵/۳	۷۰
۵۶/۹	۶۰
۴۹/۲	۵۰
۴۱/۲۹	۴۰
۳۲/۴	۳۰
۲۷/۵	۲۵
۲۲/۱۵	۲۰
۱۸	۱۵
۶۲/۲۷	IC ₅₀
۸/۸	۲۰
۱۴/۴	۵۰
۳۰/۷ (IC ₅₀)	۱۰۰
۶۸/۲	۲۵۰
۷۹/۳	۵۰۰
۹۵/۳	۷۰۰
۳۰/۷ (IC ₃₀)	IC ₅₀ میکروگرم بر میلی لیتر (%)

بحث:

وجود اثرات عصاره بابونه بر روی اختلال حافظه و درد ایجاد شده در اثر ایسکمی بررسی نشده است که در مطالعه حاضر به آن پرداخته شد. به منظور شبیه سازی ایسکمی مغزی ایجاد شده در اثر سکته قلبی در موش های صحرایی، مدل ایسکمی گذاری مغزی و خون رسانی به کار گرفته شد. مطالعات مختلف نشان داده اند که ایسکمی مغزی می تواند با آسیب نورون های مغز سبب اختلال در حافظه کوتاه مدت، حافظه احترازی و تعادل حرکتی موش های صحرایی گردد (Hong, ۲۰۱۸, ۳۲). و همکاران گزارش کردند که القای ایسکمی فراگیر (گلوبال) در موش صحرایی سبب افزایش میزان مرگ سلولی در قشر گیجگاهی هیپوکامپ و در نتیجه ایجاد اختلالات حافظه و یادگیری می گردد (۱۴). رادیکال های آزاد تولید شده در جریان فرآیند ایسکمی / خون رسانی قادرند با آسیب

سکته مغزی سومین عامل مرگ و میر افراد و اولین عامل ناتوانی افراد بالای ۶۵ سال به شمار می رود (۳). مبتلایان در صورت زنده ماندن با عوارضی چون فلج ناحیه ای از بدن و اختلال در حافظه، فکر کردن، حرف زدن و حرکت کردن درگیر هستند (۱۷). ۸۵٪ سکته های مغزی به دلیل ایسکمی به وقوع می پیوندد و تاکنون درمان قطعی برای آن یافت نشده است؛ بنابراین محققان در جستجوی ترکیبات دارویی مؤثر برای درمان و یا کاهش عوارض ایسکمی هستند. در سال های اخیر گیاهان دارویی نتایج چشمگیری در درمان و کاهش علائم بیماری نشان داده اند (۲۸). در مطالعات پیشین اثرات محافظتی عصاره بابونه بر سیستم عصبی مرکزی همانند اثرات آرام بخشی، ضد تشنج، بهبود اختلالات حرکتی و اختلالات خواب گزارش شده است (۲۹-۳۱). با این

الفا شده توسط ایسکمی ممانعت کرد (۳۶). گل های خشک بابونه حاوی ترپنوئیدها (آلفایسابل، آلفایسابل، اکساید، سزکوئی ترین ها)، فلاونوئیدها (کوئرستین، لوتولین، آپی ژنین)، تانن و فیتواسترول می باشد که اثرات بهبود دهندگی حافظه تعدادی از آن ها همانند آپی ژنین و کوئرستین در مطالعات گزارش شده است (۳۸،۳۷). اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه در برابر درد الفا شده توسط ایسکمی احتمالاً به دلیل اثرات ضد التهابی آن می باشد. اثرات ضد التهابی عصاره گیاه در مطالعه Al-Hindawi و همکاران گزارش شده است. با این وجود نیاز است اثرات عصاره این گیاه بر علیه فاکتورهای التهابی آزاد شده در طی روند ایسکمی نیز مورد مطالعه قرار گیرد تا مکانیسم اثرات ضد دردی آن به درستی آشکار کرد (۳۹).

نتیجه گیری:

نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که عصاره هیدروالکلی گل بابونه دارای اثرات ترمیمی بر نقصان حافظه ایجاد شده توسط ایسکمی دارد و ممکن است علائم درد را در بیماران درگیر کاهش دهد. تأثیر بهبود دهندگی حافظه عصاره بابونه ممکن است به دلیل خاصیت پاک کنندگی رادیکال های آزاد باشد که توسط ترکیبات فعال موجود در عصاره ایجاد شده است.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق مستخرج از طرح پژوهشی بوده و توسط معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان حمایت مالی شده است. کد طرح به شماره ۵۲۰۲۱۸۸۰۹۰۱۰۰۲ و تاریخ تصویب طرح خرداد ماه ۱۳۹۴ می باشد.

نرون های ناحیه هیپوکامپ سبب اختلال در یادگیری و حافظه احترازی و کوتاه مدت شوند (۵). بیان شده که افزایش تولید فاکتورهای التهابی همانند سیتوکین ها و کموسیتوکین ها در سیستم عصبی مرکزی به دنبال آسیب ایسکمیک سبب القای احساس درد در بیماران می گردد (۳۳). در مطالعه Yabuuchi و همکاران تزریق فاکتور التهابی اینترکولین بتا در دوز ۱۰ و ۱۰۰ pg به ازای هر موش سبب القای رفتارهای پردردی گردید (۳۴). پروستاگلاندین PGE2 نیز سبب القای پردردی در موش های صحرايي در آزمون صفحه داغ شده است (۳۵). نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن بود که عصاره بابونه در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم قادر است، حافظه احترازی غیر فعال موش های صحرايي تحت ایسکمی را به طور معنی دار افزایش دهد. علاوه بر این عصاره بابونه زمان تأخیر ظهور رفلکس دردناک دم را در تست تیل فلیک به طور معنی داری افزایش داد و غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره اثر بیش تری نسبت به غلظت های بالاتر آن نشان داد. نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثرات حفاظتی عصاره هیدروالکلی بابونه در برابر اختلال حافظه احترازی و درد ایجاد شده در اثر ایسکمی بود. احتمالاً ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در عصاره با حذف رادیکال های آزاد سبب بهبود آسیب نورونی و در نتیجه بهبود یادگیری احترازی می شوند. اثرات آنتی اکسیدانی عصاره گیاه بابونه در مطالعه حاضر با استفاده از تست DPPH نشان داده شد. علاوه بر این در مطالعه صورت گرفته بر روی اثرات نروپروتکتیو عصاره متانولی گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria recutita*)، عصاره گیاه با کاهش معنی دار پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش معنی دار آنزیم های آنتی اکسیدانی و گروه های تیول از استرس اکسیداتیو و آسیب نورونی

منابع:

1. Masoud SA, Dastmalchi F, Mousavi SGA, Daneshvar-Kakhaki R. Evaluating the relationship between highly sensitive- C reactive protein and acute cerebral ischemia. Feyz J Kashan Univ Med Sci. 2012; 16(5).

2. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 2000; 179(S 1-2): 1-33.
3. Fathi F, Oryan S, Rafieian M, Eidi A. Neuroprotective effect of *Mentha longifolia* L. extract on ischemia/reperfusion-induced brain injury in male wistar rats. *J Med Plant.* 2015; 2(14): 169-81.
4. Lakhan S, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Trans Med.* 2009; 7(1): 79-89.
5. Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 2004; 207(Pt 18): 3221-31.
6. Obrenovitch TP, Urenjak J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol.* 1997; 51(1): 39-87.
7. Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma.* 2000; 17(10): 871-90.
8. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 2000; 179(S 1-2): 1-33.
9. Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. CDP-choline: neuroprotection in transient forebrain ischemia of gerbils. *J Neurosci Res.* 1999; 58(5): 697-705.
10. Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, McCarty DR, Medhi S, Koehl JR, et al. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1998; 29(1): 152-8.
11. Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis.* 2008; 29(1): 132-41.
12. Hara A, Mori H. Novel apoptotic evidence for delayed neuronal death in the hippocampal CA1 pyramidal cells after transient ischemia. *Stroke.* 2000; 31(1): 231-9.
13. Wang D, Yuan X, Liu T, Liu L, Hu Y, Wang Z, et al. Neuroprotective activity of lavender oil on transient focal cerebral ischemia in mice. *Molecules.* 2012; 17(8): 9803-17.
14. Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim DB, et al. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull.* 2000; 53(6): 743-9.
15. Vakili A, Eianali MR, Bandegi AR. The protective effects of Saffron against the oxidative damage in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. *Tehran Univ Med J.* 2011; 7(69): 405-12.
16. Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Miller DK, Smith RE, Luchtefeld RG, et al. Oral administration of grape polyphenol extract ameliorates cerebral ischemia/reperfusion-induced neuronal damage and behavioral deficits in gerbils: comparison of pre- and post-ischemic administration. *J Nutr Biochem.* 2009; 20(5): 369-77.
17. Imani E, Esmaili A, Alimohammadi R, Ehsani V, Shamsizadeh A, Mobini M. Effects of *Achillea millefolium* on the consequences of stroke in ovariectomized rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci.* 2015; 22(6): 1725-36.
18. Shri R, Singh Bora K. Neuroprotective effect of methanolic extracts of *Allium cepa* on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Fitoterapia.* 2008; 79(2): 86-96.
19. Sarshoori J, Asadi M, Mohammadi M. Effect of olive oil on the cerebral reperfusion following ischemia injuries in rats. *J Birjand Univ Med Sci.* 2014; 21(1): 56-67.
20. Chandrashekhar VM, Ranpariya VL, Ganapaty S, Parashar A, Muchandi AA. Neuroprotective activity of *Matricaria recutita* Linn against global model of ischemia in rats. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127(3): 645-51.
21. Rabiei Z, Alibabaei Z, Rafieian-Kopaei M. Determining the antioxidant properties of chamomile and investigating the effects of chamomile ethanol extract on motor coordination disorders in rats. *J Babol Univ Med Sci.* 2015; 17(4): 44-50.
22. Kazemi M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Matricaria chamomilla*. *Bull Env Pharmacol Life Sci.* 2014; 3(2): 148-53.
23. Roby MHH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *J Ethnopharmacol.* 2013; 44: 437-45.

24. Jarrahi M. An experimental study of the effects of *Matricaria chamomilla* extract on cutaneous burn wound healing in albino rats. *Nat Prod Res.* 2008; 22(5): 422-7.
25. Gomaa A, Hashem T, Mohamed M, Ashry E. *Matricaria chamomilla* extract inhibits both development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in rats. *J Pharmacol Sci.* 2003; 92(1): 50-5.
26. Rabiei Z, Rafieian-Kopaei M, Heidarian E, Saghaei E, Mokhtari S. 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.* 2014; 39(2): 353-60.
27. D'Amour F, Smith D. A method of determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1941; 27: 74-7.
28. Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim DB, et al. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Research Bulletin.* 2000; 53(6).
29. Bozorgmehr B, Mojab F, Faizi M. Evaluation of sedative-hypnotic effect of ethanolic extract of five medicinal plants; *Nepeta menthoides*, *Matricaria chamomilla*, *Asperugo procumbens*, *Lippia citriodora* and *Withania somnifera*. *Res Pharm Sci.* 2012; 7(5): 831.
30. Sofiabadi M, Esmaeili MH, Haghdoost Yazdy H, Azhdari Zarmehri H. The effect of intraperitoneally injection of *Matricaria Chamomilla* ethanolic extract on seizure. *J Med Plants* 2011; 11(44): 86-92.
31. Abdollahzadeh M, Naji S. The effect of *Matricaria Chamomilla* on sleep quality of elderly people admitted to nursing homes. *Iran J Nurs.* 2014; 27(89): 69-79.
32. Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulilian B, Zeinanloo AA, Khoshbaten A. Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain injury in rats subjected to ischemia-reperfusion. *Scien World J.* 2010; 10: 1180-91.
33. Minami M, Katayama T, Satoh M. Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100(5): 461-70.
34. Yabuuchi K, Nishiyori A, Minami M, Satoh M. Biphasic effects of intracerebroventricular interleukin-1 beta on mechanical nociception in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1996; 300(1-2): 59-65.
35. Oka T, Aou S, Hori T. Intracerebroventricular injection of prostaglandin E2 induces thermal hyperalgesia in rats: the possible involvement of EP3 receptors. *Brain Res.* 1994; 663(2): 287-92.
36. Chandrashekhar VM, Ranpariya VL, Ganapaty S, Parashar A, Muchandi AA. Neuroprotective activity of *Matricaria recutita* Linn against global model of ischemia in rats. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127(3): 645-51.
37. Liu R, Zhang T, Yang H, Lan X, Ying J, Du G. The flavonoid apigenin protects brain neurovascular coupling against amyloid-beta(2)(5)(-)(3)(5)-induced toxicity in mice. *J Alzheimers Dis.* 2011; 24(1): 85-100.
38. Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacogn Rev.* 2011; 5(9): 82-95.
39. Al-Hindawi M, Al-Deen I, Nabi M, Ismail M. Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. *J Ethnopharmacol.* 1989; 26: 163-8.

Effect of hydroalcoholic extract of *Matricaria chamomilla* on passive avoidance memory and pain induced by global cerebral ischemia in Wistar rat

Setorki M¹, Moshfegh A^{2*}, Raoufi N³

¹Biology Dept., Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, I.R. Iran; ²Biology Dept., Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R. Iran; ³Physiology Dept., Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 6/Jan/2016 Accepted: 25/Jan/2016

Backgrounds and aims: Brain ischemia and reperfusion is a leading cause of serious and long- range disability in the world. The present study aimed to investigate the effect of hydroalcoholic extract of *Matricaria chamomilla* on memory impairments and pain induced by global cerebral ischemia.

Methods: *Matricaria chamomilla* flowers were purchased from herbal store and extracted with 70% alcohol. Animals were randomly divided into 6 groups of 7 rats. Control group received saline. Ischemia group underwent ischemia and received saline. Sham group underwent surgery without occlusion of carotid artery. Extract treated groups underwent ischemia and received *M. chamomilla* extract at doses of 50, 100, 200 mg/kg via ip injection. Behavioral test performed with shuttle box and analgesia test performed with tail flick test.

Results: Chamomile extract at doses of 50, 100 and 200 mg/kg significantly improved memory and learning impairments induced by ischemia. In addition, chamomile extract delayed the emergence of painful reflex in tail flick test. It showed better antinociceptive effect at 50 mg/kg.

Conclusion: Results of this study showed that chamomile extract possesses protective effects against ischemia induced pain and memory deficits that may be due to its anti-inflammatory and antioxidant effects.

Keywords: Memory, Learning, Ischemia, Pain.

Cite this article as: Setorki M, Moshfegh A, Raoufi N. Effect of hydroalcoholic extract of *Matricaria chamomilla* on passive avoidance memory and pain induced by global cerebral ischemia in Wistar rat. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 17(Suppl): 76-86.

***Corresponding author:**

Biology Dept., Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R. Iran. Tel: 00989133121589,
E-mail: moshfeghazam@gmail.com