

## بررسی اثر عصاره چای سبز بر آسیب حافظه ناشی از تزریق داخل مغزی

### استرپتوزوتوسین در رت نر ویستار

مهدی نجفی کاکاوند<sup>۱</sup>، دکتر شهربانو عریان<sup>۲</sup>، دکتر محمد نبیونی<sup>۳\*</sup>، حبیبه غفوریان<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲. استاد فیزیولوژی حیوانی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۴. کارشناس ارشد، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری آلزایمر از بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی است که در اثر رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو بروز می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اثر فوق‌العاده‌ای در تقویت حافظه و کنترل بیماری آلزایمر دارند. در این مطالعه، تأثیر عصاره‌ی چای سبز که حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است، بر سرعت یادگیری و بهبود حافظه در رت‌های آلزایمری مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** با تزریق دو طرفه‌ی استرپتوزوتوسین درون بطن‌های جانبی رت‌های نر ویستار، مدل آلزایمر القا شد و رت‌های گروه تیمار به مدت ۲۱ روز ۱۰۰ mg/kg عصاره‌ی چای سبز دریافت کردند. برای بررسی حافظه‌ی رت‌ها، از تست یادگیری اجتنابی غیرفعال استفاده شد. زمان ورود به اتاق تاریک و مدت ماندن در اتاق تاریک، به عنوان پارامترهای اصلی برای ارزیابی حافظه‌ی اجتنابی و یادگیری، ارزیابی شد. همچنین، میزان تخریب بافتی و مرگ سلولی با مطالعات هیستوتیکنیک بررسی گردید. داده‌های به دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون ANOVA از نوع Tukey و LSD و در سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  بررسی شد.

**یافته‌ها:** شاخص حافظه در گروه دریافت‌کننده‌ی استرپتوزوتوسین در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم و شم، کاهش معنی‌داری را نشان داد، اما تیمار با عصاره‌ی چای سبز، سبب افزایش معنی‌داری در سرعت یادگیری و بهبودی حافظه در رت‌های آلزایمری شد. نتایج به دست آمده از برش‌های بافتی، کاهش میزان مرگ سلولی در گروه‌های تحت تیمار با چای سبز را نشان می‌دهد.

**نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها نشان می‌دهد که عصاره‌ی چای سبز می‌تواند در بهبود شرایط آلزایمر و آسیب‌های حافظه ناشی از آن مناسب باشد و تا حدودی سبب کاهش مرگ سلولی در سلول‌های ناحیه‌ی هیپوکامپ شود.

### واژگان کلیدی: آلزایمر، استرپتوزوتوسین، حافظه، عصاره چای سبز

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Najafi Kakavand M, Oryan S, Nabiuni M, Ghafournian H. The effect of green tea extract memory impairment induced by injection of streptozotocin-induced brain in male Wistar rat. *Pejouhandeh* 2015;20(4):198-205.

### مقدمه

دو جنس به یک نسبت دیده می‌شود. آلزایمر به دو شکل اتفاقی و وراثتی ظاهر می‌شود که نوع اتفاقی آن شایع‌تر (بیش از ۹۰٪) می‌باشد و بیشترین علل احتمال آن، تأثیر عوامل محیطی و متابولیکی ناشناخته است. در این بیماری که اغلب به صورت دیررس پس از ۶۵ سالگی بروز می‌نماید، حافظه‌ی وقایع گذشته‌ی دور، نسبتاً سالم مانده ولی حافظه‌ی وقایع جدید، شدیداً آسیب می‌بیند (۱). در طی این بیماری که می‌تواند در اثر استرس اکسیداتیو ایجاد شود، یک عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی‌اکسیدانی به وجود می‌آید. رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب غیراشباع سلول‌های بافت

بیماری آلزایمر، شایع‌ترین علت منحصر به فرد زوال عقل می‌باشد و میزان بروز آن در تمام جهان مشابه است. به طور متوسط سالیانه ۳ مورد جدید در هر صد هزار نفر زیر ۶۰ سال و ۱۲۵ مورد بالای ۶۰ سال از این بیماری گزارش می‌شود. این بیماری، مهم‌ترین بیماری تحلیل برنده‌ی مغز است که در هر

\* نویسنده مسؤوّل مکاتبات: دکتر محمد نبیونی؛ تهران، خیابان شهید مفتاح، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی؛ تلفن: ۰۹۱۲۶۶۰۹۳۳۷؛ پست الکترونیک: devbiokharazmi@gmail.com

کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی و بعضی سرطان‌ها، اثرات ضد فشار خون، کنترل وزن بدن (کاهش وزن بدن)، فعالیت ضد ویروسی و ضد باکتریایی، شرکت در فرآیندهای ضد دیابتی (از طریق مهار آمیلاز بزاق و روده که مانع از شکسته شدن نشاسته می‌شود) (۱۲) و همچنین خاصیت آنتی‌موتازنیک و ضد التهاب، حفاظت در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش، افزایش چگالی مواد معدنی استخوان و خواص آنتی‌فیبروتیک، کاهش کلسترول و تری‌گلیسریدها (۱۱) و کاهش مقاومت به انسولین (۱۳).

EGCG (Epigallocatechin gallat)، فراوان‌ترین ترکیب پلی‌فنول چای سبز بوده و به نظر می‌رسد که بخش عمده‌ی فعالیت‌های بیولوژیک چای سبز، مربوط به همین ترکیب باشد (۱۴). تحقیقات نشان داده است که EGCG دارای آثار حفاظتی در مقابل آسیب‌های حافظه و یادگیری و نیز بیماری‌های نورودژنراتیو می‌باشد (۱۵). آزمایشات انجام گرفته نشان داده است که کاتچین‌ها از جمله EGCG می‌توانند آثار نوروپروتکتیو خود را از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، کاهش پراکسیداسیون چربی، کاهش آپوپتوز و نیز آثار ضدالتهابی اعمال نمایند (۱۴).

همچنین، نشان داده شده است که ترکیب EGCG در چای سبز، قادر به توقف مسیر توده‌های مضر پروتئین‌های بتا آمیلوئید می‌باشد که در بیماری آلزایمر به طور محکم به سلول‌های مغز می‌چسبند و نیز می‌تواند باعث از بین رفتن آنها شود (۱۶).

با توجه به نتایج مطالعات آزمایشگاهی در خصوص آثار نوروپروتکتیو چای سبز در مدل‌های تجربی ایسکمی مغزی و نیز بیماری‌های نورودژنراتیو، در این مطالعه به بررسی تأثیر عصاره‌ی چای سبز بر یادگیری و حافظه‌ی اجتنابی غیرفعال در مدل رت ویستار، که از طریق تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین آلزایمری شده بودند، پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۳۶ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۲۰ تا ۱۸۰ گرم، از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی واحد کرج تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. محل نگهداری حیوانات، دارای دوره‌ی روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته و دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد بود و آب و غذا به مقدار کافی در اختیار حیوانات قرار داشت.

جهت القای آلزایمر، STZ با دوز ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و با حجم ۱/۵ میکرولیتر در هر بطن طرفی

مغز حمله کرده و باعث ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو می‌شوند (۲). در آلزایمر، ساختار سلولی نورون‌ها تخریب شده و بر حافظه و رفتار، تأثیر می‌گذارد (۳). تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی در اطراف سلول‌های عصبی و نیز فیلامنت‌های نوروفیبریلاری درون سلول‌های مغزی نیز از جمله علت‌های این بیماری به شمار می‌روند. از جمله صدمات وارد شده به مغز در اثر تشکیل پلاک‌ها، ایجاد التهاب در بافت مغز، آزاد شدن آنزیم استیل‌کولین‌استراز از پلاک‌ها و اثر سمی رسوب آمیلوئیدی بر سلول‌های مغزی می‌باشد (۴،۵).

نشان داده شده است که تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin, STZ) در رت‌ها می‌تواند علائمی مشابه با آنچه که در بیماری آلزایمر دیده می‌شود، ایجاد کند و بر همین اساس، به عنوان یک مدل حیوانی آلزایمر با ایجاد تغییرات پاتوفیزیولوژیکی اولیه‌ی آلزایمر، مورد استفاده قرار گیرد (۱). تزریق درون بطنی STZ موجب افزایش در پروتئین تاو و بتا-آمیلوئید در مغز می‌شود و افزایش بتا-آمیلوئید، موجب التهاب و شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۶). یافته‌های اخیر نشان داده است که مصرف موادی که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند، به‌واسطه‌ی کاهش متابولیسم اکسیداتیو و متعاقب آن، کاهش رادیکال‌های آزاد، خطر ابتلا به بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو همانند آلزایمر را کاهش داده و در درمان این بیماری مؤثر هستند (۷،۸). بر اساس مطالعاتی که روی برخی مواد خوراکی یا آشامیدنی انجام گرفته، مشاهده شده است که این مواد به دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، هم قبل از بیماری آلزایمر نقش پیشگیری دارند و هم می‌توانند پیشرفت این بیماری را به تعویق بیندازند که به عنوان نمونه می‌توان به عصاره‌ی سیر کهنه، سارکومین، ملاتونین، ژنگکو بیلوبا، چای سبز، میوه‌های حاوی رسوراترول، مواد غذایی حاوی ویتامین B و E و C، عصاره‌ی سالویا و زاتین از گیاه فیتوتوآبولوسا، اشاره کرد (۷،۹).

چای سبز، فرآورده‌ی ساخته شده از برگ و جوانه‌ی گیاه *Camellia sinensis* است که تقریباً بعد از آب، پرمصرف‌ترین نوشیدنی محسوب می‌شود. چای سبز، یک چای غیرتخمیری بوده (۱۰) و حاوی مقدار زیادی کاتچین‌ها می‌باشد. کاتچین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های قوی *in vitro* و *in vivo* هستند. به علاوه، حاوی مقداری مواد معدنی و ویتامین‌ها می‌باشد که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی این نمونه چای را افزایش می‌دهد (۱۱). مطالعات اخیر روی انسان نشان می‌دهد که چای سبز فواید درمانی زیادی دارد از جمله:

تیمار شده با عصاره چای سبز): اعضای این گروه STZ به آنها تزریق گردید و تیمار آنها با عصاره‌ی چای سبز با دوز ۱۰۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی و به مدت ۳ هفته انجام گرفت (۱۷).

چای سبز در شهر لاهیجان استان گیلان جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده، در سایه خشک گردید و برگ آنها از ساقه‌ی گیاه جدا و سپس به روش مکانیکی به پودر تبدیل گردید. به منظور تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی، ۲۰۰ گرم از پودر برگ خشک شده‌ی چای سبز با نسبت مساوی از الکل اتیلیک و آب (هر کدام ۱۵۰۰ میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت خیسانده شد. محلول حاصل پس از صاف شدن، در جریان ثابت هوا تبخیر و کاملاً خشک گردید. پس از آن، عصاره‌ی خشک شده جمع‌آوری و برای تهیه‌ی دوز مورد نظر عصاره‌ی هیدروالکلی چای سبز مورد استفاده قرار گرفت (۱۴).

برای ارزیابی حافظه و یادگیری اجتنابی غیرفعال، از دستگاه شاتل باکس استفاده شد. این دستگاه تست یادگیری شامل یک جعبه می‌باشد که توسط دیواره‌ی عرضی به ۲ محفظه تقسیم می‌شود (یک بخش روشن و یک بخش تاریک). در دیواره‌ی عرضی، یک درب گیوتینی متحرک تعبیه شده است. کف جعبه از میله‌های موازی با هم و عمود بر محور طولی جعبه تشکیل شده است که یک درمیان به قطب + و - متصل هستند. حیوان، تحریک الکتریکی را که توسط استیمولاتور به میله‌های فولادی کف بخش تاریک منتقل می‌شود، دریافت کرده و می‌آموزد که باید از رفتن به اتاق تاریک اجتناب کند. این آزمون در ۳ مرحله انجام گرفت:

الف) مرحله‌ی سازش: در این مرحله، ابتدا جانور را در اتاق روشن شاتل باکس قرار داده و پس از گذشت ۱۰ ثانیه درب گیوتینی را بالا کشیده و به محض ورود پاهای عقبی جانور به اتاق تاریک، درب را بسته و حیوان به مدت ۱۰ ثانیه در اتاق تاریک باقی می‌ماند. سپس، حیوان به آرامی از بخش تاریک دستگاه برداشته و به قفس برگردانده می‌شود. اگر زمان ورود به اتاق تاریک بیش از ۱۰۰ ثانیه طول بکشد، حیوان به علت عدم همکاری از آزمایش حذف می‌شود.

ب) مرحله‌ی اکتساب: نیم ساعت پس از سازش، حیوان در اتاق روشن قرار گرفته و پس از ۱۰ ثانیه، درب گیوتینی بالا کشیده شده تا حیوان به اتاق تاریک وارد شود. به محض ورود پاهای عقبی حیوان به اتاق تاریک، درب گیوتینی پایین آورده شده و شوک الکتریکی به میزان ۱/۵ mA، ۵۰ Hz، ۵ s به جانور اعمال گردید.

ج) مرحله‌ی به یادآوری: ۲۴ ساعت بعد از آموزش، حیوان

به داخل بطن‌های مغزی تزریق شد (۱). برای این منظور، موش‌های صحرایی بعد از توزین، با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۱۰۰ mg/kg و زایلازین ۲۵ mg/kg بیهوش و سپس توسط دستگاه استریوتاکس (Stoelting، آمریکا) ثابت شدند. در این از زمان از پماد چشمی جهت جلوگیری از خشک شدن چشم‌ها و چراغ مطالعه به منظور حفظ دمای بدن حیوان استفاده شد. بعد از ثابت کردن سر حیوان و کوتاه کردن موهای ناحیه سر، پوست سر را از ناحیه بین دو چشم تا انتهای استخوان پس‌سری با تیغ جراحی شکاف عمودی داده و بعد از برداشتن بافت‌های این ناحیه، استخوان را با پنبه کاملاً تمیز کرده تا محل برگما (Bregma) و نیز محل لامبدا (Lambda) مشخص شود. بعد از مشخص کردن مختصات استریوتاکس برای بطن‌های جانبی مغزی با استفاده از مختصات به دست آمده از مطالعه‌ی پایلوت (جلویی - عقبی ۰/۸ - میلی‌متر، جانبی ۱/۶ ± میلی‌متر، پشتی - شکمی ۴ - میلی‌متر)، محل تزریق توسط جوهر روی جمجمه علامت‌گذاری شد و به وسیله‌ی سر سرنگ ۱۰ سی‌سی، دو سوراخ در جمجمه ایجاد گردید. بعد از سوراخ کردن جمجمه، STZ را که در سالین (سرم فیزیولوژیک) به عنوان حلال حل شده بود با دوز ۳ mg/kg در حجم ۱/۵ میکرولیتر در هر بطن توسط سرنگ هامیلتون (Corporation Kyto، ژاپن) تزریق گردید. سرنگ هامیلتون، به مدت ۵ دقیقه پس از تزریق در محل باقی ماند تا ضمن پیشگیری از پس زدن محلول دارو و نیز دیفیوژن، تمامی محلول تزریقی جذب نورون‌های مغز شود. پس از اتمام تزریق، محل جراحی توسط مخلوط سیمان دندانپزشکی با منومر اکریل پوشانده شد. پس از خشک شدن سیمان، رت‌ها را از دستگاه استریوتاکس خارج و در قفس‌های جداگانه در محیطی گرم در اتاق حیوانات قرار دادند تا به هوش آیند.

حیوانات در این آزمایش به ۴ گروه ۹ تایی به شرح زیر تقسیم شدند: گروه اول (کنترل سالم): این گروه شامل موش‌های کاملاً سالمی بود که روی آنها هیچ گونه جراحی و تیماری انجام نگرفت. گروه دوم (شم): اعضای این گروه به جای STZ محلول سالین (سرم فیزیولوژیک)، که به عنوان حلال STZ استفاده شده بود، به درون بطن‌های مغزی آنها تزریق شد و تیمار آنها با سالین در طی ۳ هفته به صورت داخل صفاقی انجام گرفت. گروه سوم (آلزامر): اعضای این گروه STZ دریافت کرده ولی تیمار آنها در این مدت توسط تزریق داخل صفاقی سالین که حلال عصاره‌ی چای سبز است، به مدت ۳ هفته انجام گرفت. گروه چهارم (گروه

ANOVA از نوع Tukey و LSD جهت تعیین سطوح تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد و جهت مقایسه‌ی دو به دو بین گروه‌ها، از آزمون t مستقل استفاده گردید.  $P < 0/05$  به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. نمودارهای مربوطه با استفاده از برنامه‌ی Excel رسم شد.

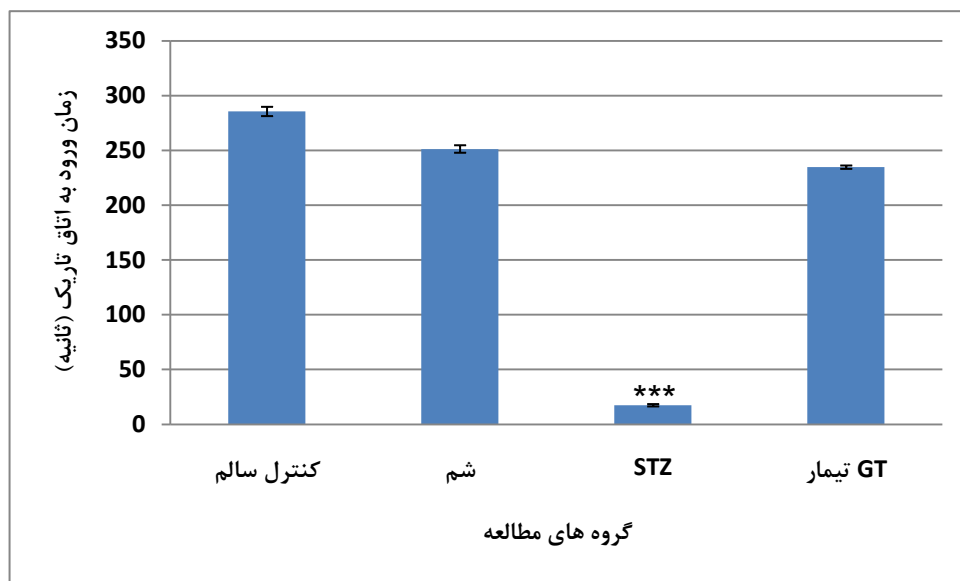
### یافته‌ها

در مطالعات مربوط به آلزایمر، ورود به اتاق تاریک در زمان کمتر، نشان‌دهنده‌ی حافظه و یادگیری کمتر می‌باشد. در این مطالعه، ۳ هفته پس از تزریق STZ و القای آلزایمر، مشاهده شد که گروه‌های STZ نسبت به سه گروه دیگر، در مدت زمان بسیار کمتری وارد اتاق تاریک می‌شوند که این زمان نسبت به سه گروه دیگر در سطح  $P < 0/001$  معنی‌دار بوده و نشان‌دهنده‌ی القای صحیح آلزایمر در مدل‌های مورد مطالعه می‌باشد (نمودار ۱).

مجدداً در اتاق روشن قرار داده شده و پس از گذشت ۱۰ ثانیه دریچه باز گردید و مدت زمانی که طول کشید تا پاهای عقبی حیوان به اتاق تاریک وارد شود، به عنوان زمان تأخیر به یادآوری، یادداشت گردید. مدت زمانی که به حیوان فرصت داده می‌شد تا به اتاق تاریک وارد شود، ۳۰۰ ثانیه بود. مدت زمان ماندن در اتاق تاریک نیز ثبت شد.

پس از اتمام تزریق عصاره، مغز رت‌ها جهت بررسی هیستولوژیکی برداشته شدند و بافت‌ها با روش هیستوتکنیک آماده‌سازی شده و به صورت سریالی و با ضخامت ۸ میکرومتر برش داده شدند. پس از رنگ‌آمیزی برش‌ها با همتوکسیلین-اتوزین، با استفاده از میکروسکوپ نوری میزان مرگ سلولی در برش‌های تهیه شده مشاهده گردید. این رنگ سبب رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم سلول‌های زنده شده و از این طریق می‌توان میزان مرگ یا بقای سلول‌ها را مشاهده کرد (۱۷).

برای آنالیز نتایج مربوطه، از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون



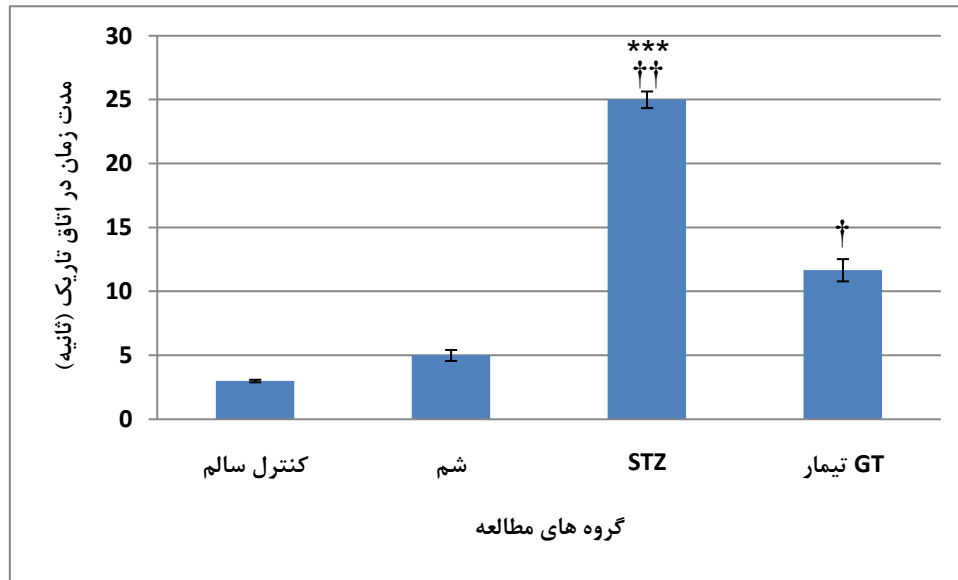
نمودار ۱. مقایسه زمان ورود به اتاق تاریک در دستگاه شاتل باکس، ۳ هفته پس از تیمار با چای سبز. در این نمودار، زمان بیشتر، نشان‌دهنده‌ی حافظه‌ی بهتر می‌باشد.  $P < 0/001$  در مقایسه‌ی گروه آلزایمر با گروه‌های کنترل و شم و چای سبز.

تزریق عصاره‌ی چای سبز، تأثیری بر مدت زمان ورود به اتاق تاریک نداشت و داده‌های مربوطه، اختلاف معنی‌داری را بین گروه تیمار و گروه‌های شم و کنترل نشان نداد (نمودار ۱). اما تیمار با چای سبز سبب شد که موش‌های STZ مدت زمان کمتری را در اتاق تاریک بمانند و این اختلاف زمان نسبت به گروه STZ در سطح  $P < 0/05$  معنی‌دار بود (نمودار ۲). داده‌های مربوط به گروه‌های شم در زمان ورود به اتاق تاریک و همچنین در مدت زمان ماندن در اتاق تاریک، نسبت به

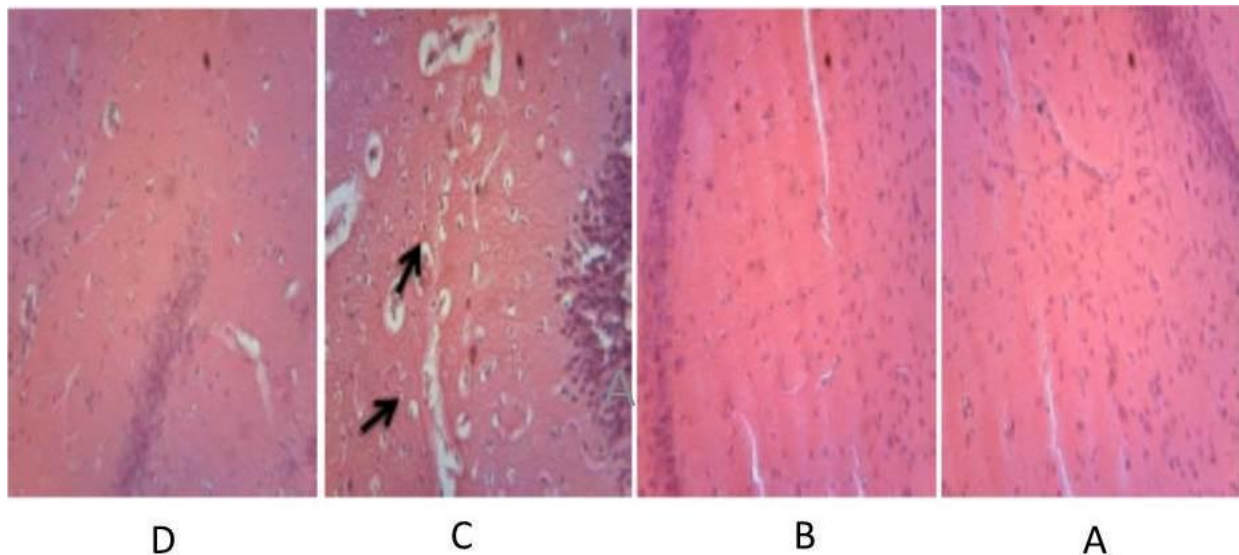
مدت زمان ماندن در اتاق تاریک نیز می‌تواند عامل دیگری برای سنجش یادگیری باشد، به گونه‌ای که ماندگاری بیشتر در اتاق تاریک، نشان‌دهنده‌ی یادگیری کمتر می‌باشد. در این مورد نیز گروه STZ نسبت به سه گروه دیگر مدت زمان بیشتری را در اتاق تاریک گذراند که این افزایش زمان نسبت به سه گروه دیگر، معنی‌دار بود. در مقایسه‌ی گروه STZ با گروه‌های کنترل و شم  $P < 0/001$  و در مقایسه با گروه تیمار شده با چای سبز،  $P < 0/01$  بود (نمودار ۲).

به صورت حباب‌های بی‌رنگ و سلول‌های زنده در زیر میکروسکوپ، رنگی دیده می‌شوند. در طی این مطالعه نشان داده شد که تزریق عصاره‌ی چای سبز، سبب کاهش میزان مرگ سلولی در گروه‌های تیمار می‌شود (شکل ۱).

گروه کنترل سالم و STZ، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد که این، حاکی از آن است که حلال STZ یا حلال چای سبز، تأثیری بر القای آلزایمر یا بهبود آن ندارند (نمودارهای ۱ و ۲). طی آلزایمر تحت STZ، سلول‌های ناحیه‌ی هیپوکامپ دچار مرگ سلولی می‌شوند که پس از رنگ‌آمیزی، سلول‌های مرده



نمودار ۲. مقایسه مدت زمان ماندن در اتاق تاریک در دستگاه شاتل باکس، ۳ هفته پس از تیمار با چای سبز. در این نمودار زمان کمتر، نشان‌دهنده‌ی حافظه‌ی بهتر است.  $P < 0.05$  † در مقایسه‌ی گروه تیمار چای سبز (GT) با گروه کنترل سالم؛  $P < 0.01$  †† در مقایسه‌ی گروه STZ با گروه تیمار چای سبز؛  $P < 0.001$  \*\*\* در مقایسه‌ی گروه STZ با گروه‌های کنترل سالم و شم.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری از برش ناحیه هیپوکامپ گروه‌های کنترل سالم (A)، شم (B)، STZ (C) و گروه تیمار شده با عصاره‌ی چای سبز (D). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بزرگنمایی میکروسکوپی  $\times 100$ . در تصاویر A و B که به ترتیب مربوط به گروه کنترل سالم و شم است، مرگ سلولی دیده نمی‌شود. تصویر C مربوط به گروه STZ می‌باشد و مرگ سلولی ناحیه هیپوکامپ که بر اثر تزریق استرپتوزتوسین ایجاد گردیده، توسط پیکان نشان داده شده است. مرگ سلولی در گروه تیمار شده با عصاره‌ی چای سبز نسبت به گروه آلزایمری تا حدودی کمتر به نظر می‌رسد.

## بحث

در این مطالعه، اثرات عصاره‌ی چای سبز بر بهبود تشکیل و تقویت حافظه در رت‌های مبتلا به اختلال حافظه ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تیمار با چای سبز توانسته است حافظه و یادگیری اجتنابی غیرفعال را در رت‌هایی که STZ دریافت کرده بودند، بهبود بخشد، به گونه‌ای که گروه چای سبز، هم در مدت زمان ورود به اتاق تاریک و هم در مدت ماندن در اتاق تاریک، نسبت به گروه آلزایمری تفاوت معناداری را نشان داد.

همان‌گونه که پیش از این ذکر شد، در این آزمون، به منظور آلزایمری کردن رت‌ها، از تزریق داخل بطن مغزی STZ استفاده شد. طبق مطالعاتی که انجام شده است تزریق STZ به داخل بطن‌های جانبی مغز رت، از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو، نقایص پیشرونده‌ی طولانی مدتی را در حافظه ایجاد می‌کند و حافظه‌ی مرجع و کاری را کاهش می‌دهد. این حیوانات که به این شکل دچار نقص حافظه شده‌اند به عنوان مدلی برای بیماری آلزایمر استفاده می‌شوند (۱۸).

در بیماری آلزایمر اسپورادیک که توسط STZ ایجاد می‌گردد، کاهش بارزی در استفاده از گلوکز مغزی همراه با کاهش مداوم در انرژی در دسترس مغزی مشاهده شده است (۱۹). فرض بر این است که این ناهنجاری‌ها توسط یک اختلال در عملکرد سیگنال‌های نورونی انسولین ایجاد می‌شود (۲۰). در واقع، کاهش غلظت انسولین و اختلال در عملکرد گیرنده‌های انسولین در مغز بیماران آلزایمری پس از مرگ و در مایع مغزی- نخاعی بیماران آلزایمری، مشاهده شده است (۲۱).

تحقیقات نشان داده‌اند که کمبود انرژی، زیربنای زوال رفتار می‌باشد و با توجه به اینکه گلوکز منبع اصلی برای تولید انرژی مغز بوده، متابولیسم صحیح آن برای عملکرد مغز و حفظ انرژی سلولی به شکل ATP مهم است، کاهش استفاده از آن با اختلالات عملکرد ادراکی، ارتباط دارد (۲۱). در این راستا، مشاهده شده است که عملکرد سلول‌های مغزی همچون یادگیری، حافظه و ادراک، دقیقاً وابسته به متابولیسم انرژی سلولی می‌باشد (۲۱). مطالعات نشان داده است که احتمال دارد کاهش انرژی در دسترس بتواند موجب اختلال در تولید پروتئین‌های پیش‌ساز آمیلوئید و در نتیجه، تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی شود (۲۱).

همچنین مشخص شده است که فعالیت آنزیم استیل کولین ترانسفراز در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری شده

با استرپتوزوتوسین، کاهش می‌یابد. این آنزیم، مسؤل سنتز استیل کولین، یکی از نوروترانسمیترهای مهم در حافظه و یادگیری می‌باشد (۲۲).

بررسی‌های انجام شده نشان داده است که EGCG موجود در چای سبز قادر به توقف مسیر توده‌های مضر پروتئین‌های بتا- آمیلوئیدی است که در بیماری آلزایمر به طور محکم به سلول‌های مغز می‌چسبند و نیز می‌تواند باعث از بین رفتن آنها شوند (۱۸). همچنین، مواد موجود در چای سبز، مانع از فعالیت آنزیم استیل کولین‌استراز می‌شود که این آنزیم استیل کولین را تجزیه می‌کند.

چای سبز به علت داشتن مواد آنتی‌اکسیدانی از جمله EGCG، به عنوان یک روش درمانی برای کاهش استرس اکسیداتیو در سیستم اعصاب مرکزی و در تقویت حافظه و کنترل بیماری، مؤثر است (۱۴). از آنجا که میزان مصرف اکسیژن در هیپوکامپ و استراتیوم مغز بیشتر است، تأثیر گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و رادیکال‌های آزاد نیز در این مناطق بیشتر است (۲۳) و این مناطق نسبت به مناطق دیگر حساس‌تر هستند. اثر حفاظتی پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز، وابسته به توانایی هیدروژن‌دهی آنها یا توانایی پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۲۳).

در تحقیقی که حافظه‌ی فضایی و اجتنابی رت‌های آلزایمری شده با STZ مورد بررسی قرار گرفته بود، مشاهده گردید که مصرف یک آنتی‌اکسیدان، با ممانعت از استرس اکسیداتیو حاصل از استرپتوزوتوسین، از نقایص حافظه و یادگیری جلوگیری می‌کند (۲). پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز به ویژه EGCG به واسطه‌ی گروه‌های هیدرکسیل موجود در ساختارشان، می‌توانند به رادیکال‌های آزاد متصل شده و آنها را خنثی نمایند (۱۴). همچنین، این ترکیبات می‌توانند به طور غیرمستقیم میزان آنتی‌اکسیدان‌های آندوژن بدن را افزایش دهند (۲۴). بررسی‌ها نشان داده‌اند که تزریق EGCG، موجب کاهش حجم منطقه‌ی آسیب‌دیده‌ی بافت عصبی در مدل حیوانی سکتی‌مغزی می‌شود (۱۱). همچنین، نشان داده شده است که تزریق EGCG، موجب کاهش آسیب وارده به ماده‌ی سفید اطراف بطن‌های مغزی در مدل حیوانی هیدروسفال می‌شود (۲۵).

## نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج حاصل از بررسی‌های هیستولوژی و

## تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی و مرکز تکثیر و پرورش دانشکده‌ی علوم زیستی دانشگاه خوارزمی انجام شده است. بدین وسیله از ریاست محترم دانشکده و مرکز تشکر می‌نماییم.

نیز حرکتی در تحقیق حاضر، بیانگر آثار نوروپروتکتیو و محافظتی عصاره‌ی هیدروالکلی چای سبز در برابر آسیب حافظه ناشی از تزریق داخل مغزی استرپتوزوتوسین است. جای امید است که بتوان از آن در درمان و پیشگیری از این بیماری استفاده کرد.

## REFERENCES

- Victor M, Ropper A. Adams and victors principles of neurology. 7<sup>th</sup> ed. London: McGraw-Hill; 2001. p. 158–65.
- Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res* 2006;171:9–16.
- Adersen A, Gauguin B, Gudiksen L, Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol* 2006;104:418–22.
- Resende R, Moreira PI, Proenca T. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's Disease. *Free Radical Bio Med* 2008;44:2051–7.
- Salkovic-Petrisic M. Amyloid cascade hypothesis: is it true for sporadic Alzheimer's disease. *Periodicum Biologorum* 2008;110:17–25.
- Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Effect of naringenin on intracerebroven-tricular streptozotocin-i-induced cognitive deficits in rat: A behavioural analysis. *Pharmacol* 2006;78:193–7.
- Shukitt-Hale B, Carey A, Simon L, Mark DA, Joseph JA. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition* 2006;22:295–302.
- Dani C, Pasquali MA, Oliveira MR, Umezu FM, Salvador M, Henriques JA. Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brains of adult Wistar rats. *J Med Food* 2008;11:55–61.
- Heo HJ, Hong SC, Cho HY, Hong B, Kim HK, Kim EK. Inhibitory effect of zeatin, isolated from *Fiatoua villosa*, on acetylcholinesterase activity from PC12 cells. *Mol Cells* 2002;13(1):113–7.
- Costa LM, Gouveia ST, Nobrega JA. Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg and Mn in tea samples. *Ann Sci* 2002;18:313–8.
- Wuc D, Wei GX. Tea as a functional food for oral health. *Nutrition* 2002;18:443–4.
- Mann J, Truswell AS. *Essentials of Human Nutrition*. New York: Oxford University Press; 1998.
- Sabu MC, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relation ship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol* 2002;81:155–60.
- Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem* 2006;17:291–306.
- Biasibetti R, Tramontina AC, Costa AP, Dutra MF, Quincozes-Santos A, Nardin P, *et al*. Green tea (-) epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behav Brain Res* 2013;236(1):186–93.
- Rezai-Zadeh K, Shytle D, Sun N, Mori T, Hou H, Jeanniton D, *et al*. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J Neurosci* 2005;25:8807–14.
- Ghafurniyani H, Nabiuni M, Karimzadeh L. The effect of green tea on IL-6 and CRP level in model of polycystic ovary syndrome as an inflammation state. *ISPACS* 2014;1–12.
- Kakuda T. Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1513–8.
- Wenk GL. An hypothesis on the role of glucose in the mechanism of action of cognitive enhancers. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;99:431–8.
- Hoyer S. The aging brain, changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini-review. *J Neural Transm* 2002;109:991–1002.
- Hoyer S, Lee SK, Loffler T, Schliebs R. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? *Ann N Y Acad Sci* 2000;920:256–8.
- Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:491–4.

23. Emami M, Hosseini A, Saeedi A, Golbidi D, Reisi P, Alaei H. Effect of red grape juice on learning and passive avoidance memory in rats. *J Isfahan Med School* 2010;28:1–8. (Full Text in Persian)
24. Skrzydlewska E, Ostrowska J, Farbiszewski R, Michaela K. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine* 2002;9:232–8.
25. Etus V, Altuq T, Belce A, Ceylan S. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate prevents oxidative damage on periventricular white matter of infantile rats with hydrocephalus. *Tohoku J Exp Med* 2003;200:203–9.