پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال هفدهم، شماره ۵، پی در پی ۸۹، صفحات ۲۱۹ تا ۲۲۷
آذر و دی ۱۳۹۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۳۰

اثر تیموکینون بر حافظه فضایی کوتاه‌مدت، یادگیری و حافظه آزمون اجتنابی غیر فعال در موشهای صحرایی دیابتی، و بررسی نقش استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ

پروین صالحی[۱]، دکتر سیما نصری[۲]، دکتر مهرداد روغنی*[۳]، اورانوس پوردهنده[۱]، دکتر توراندخت بلوچ نژاد مجرد[۴]

۱. کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تهران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تهران
۳. استاد، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی،دانشگاه شاهد
۴. استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: دیابت قندی در درازمدت با اختلالاتی در یادگیری، حافظه و شناخت همراه است. با توجه به اثر ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی تیموکینون، در این بررسی اثر تجویز درازمدت آن بر یادگیری و حافظه موشهای صحرایی دیابتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، موشهای صحرایی نر به پنج گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با تیموکینون (۵ mg/kg)، دیابتی، و دو گروه دیابتی تحت درمان با تیموکینون (۲/۵ و ۵ mg/kg) تقسیم شدند. تیموکینون از یک هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین به مدت ۵ هفته (داخل صفاقی) تجویز شد. در پایان، برای بررسی یادگیری و حافظه حیوانات، تأخیر اولیه و تأخیر در حین عبور در آزمون اجتنابی غیر فعال و درصد رفتار تناوب به عنوان شاخص حافظه فضایی با استفاده از ماز Y تعیین گردید. به علاوه، میزان مالون‌دی‌آلدهید هموژنه بافت هیپوکامپ تعیین گردید و با آزمونهای پارامتری و ناپارامتری مورد قضاوت آمار قرار گرفت.

یافته‌ها: کاهش معنی‌دار تأخیر در حین عبور در موشهای دیابتی ($p<۰/۰۱$) و دیابتی تحت تیمار با تیموکینون ($p<۰/۰۰۵$) در پایان کار مشاهده گردید و تیمار با تیموکینون در هیچ کدام از دوزها، این پارامتر را بهبود نبخشید. به علاوه، درصد تناوب در حیوانات دیابتی به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۰۵$) و این پارامتر در گروههای دیابتی تحت تیمار با دوز بالای تیموکینون به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دیابتی بود ($p<۰/۰۱$). همچنین، موشهای دیابتی یک افزایش معنی‌دار در سطح بافتی مالون‌دی‌آلدهید ($p<۰/۰۱$) نشان دادند و درمان با تیموکینون در دوز بالا میزان مالون‌دی‌آلدهید را به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش داد.

نتیجه‌گیری: تجویز دراز مدت تیموکینون در دوز بالا هر چند بر توانایی نگهداری اطلاعات در انبار حافظه و به یادآوری آنها در حیوانات دیابتی در آزمون اجتنابی غیر فعال تأثیر ندارد، ولی موجب بهبود حافظه فضایی کوتاه‌مدت در حیوانات دیابتی می‌گردد و بخشی از اثرات سودمند این ماده از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت هیپوکامپ اعمال می‌شود.

واژگان کلیدی: تیموکینون، دیابت قندی، استرپتوزوتوسین، یادگیری، حافظه، استرس اکسیداتیو

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Salehi P, Nasri S, Roghani M, Poordahandeh U, Baluchnejadmojarad T. The effect of thymoquinone on short-term spatial memory, passive avoidance learning and memory of diabetic rats and the involvement of hippocampal oxidative stress. Pejouhandeh 2012;17(5):219-27.

مقدمه

بیماری دیابت قندی یک بیماری درون‌ریز شایع است که شیوع آن در جامعه انسانی در آینده افزایش چشمگیر خواهد یافت (۱). دیابت قندی خود یکی از عوامل خطر مهم برای ایجاد زوال عقل و اختلال شناختی و حافظه در سنین بالا می‌باشد که مشابه علائم ظاهر شده در بیماری آلزایمر محسوب می‌شود (۲). هر چند تاکنون تحقیقات زیادی در خصوص ارتباط بین دیابت قندی و نوروپاتی محیطی به انجام

*نویسنده مسؤول مکاتبات: ، دکتر مهرداد روغنی؛ تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدالله زاده (دهکده)، پلاک ۳۱، دانشکده پزشکی شاهد، گروه فیزیولوژی، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۷۴۳۵، کد پستی: ۱۴۱۵-۷۴۳۵؛
پست الکترونیک: mehjour@yahoo.com

رسیده است، ولی در مورد اثرات دیابت بر سیستم اعصاب مرکزی بویژه مغز از نظر ساختمانی و عملکردی (تغییرات رفتاری شامل یادگیری و حافظه) اطلاعات کمتری یافت می‌شود (۳). در این رابطه، دیابت قندی بویژه نوع ۱ موجب بروز اختلال در روندهای مرتبط با یادگیری، حافظه و شناخت در حیوانات مبتلا می‌شود. به علاوه، یک ارتباط تنگاتنگ بین بروز دیابت قندی و ظهور نقایص در یادگیری و حافظه در موجودات آزمایشگاهی یافت می‌شود که البته مکانیسم‌های مسؤول بروز این اختلالات به خوبی مشخص نشده است؛ هرچند برای دو فرضیه میکرووواسکولار و استرس اکسیداتیو ناشی از تشدید تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن شواهد زیادی یافت می‌گردد (۴ و ۵). به علاوه، دیابت قندی از نظر ساختمانی موجب کاهش بارز تراکم نورونی در ناحیه شکنج دندانه‌دار که نقش مهمی در روندهای حافظه فضایی و یادگیری دارد می‌شود (۲). همچنین، این بیماری موجب کاهش بیان آنزیم نیتریک‌اکسید سنتاز در نورون‌های ناحیه هیپوکامپ می‌گردد. همین امر موجب اختلال در تسهیل سیناپسی و روندهای یادگیری و حافظه در حیوانات دیابتی می‌شود (۶ و ۷).

با توجه به افزایش دانش بشری در مورد هتروژنیته این بیماری، نیاز برای یافتن ترکیبات مؤثر با عوارض جانبی کمتر در جلوگیری یا درمان دیابت و مشکلات ناشی از آن شدیداً احساس می‌گردد. مواد طبیعی مشتق از گیاهان دارویی اگرچه در طی دو دهه اخیر در درمان دیابت قندی و عوارض ناشی از آن مطرح بوده‌اند، ولی در مورد اثربخشی قطعی بسیاری از آنها تاکنون شواهد تحقیقاتی معتبر یافت نمی‌شود (۸).

تیموکینون مهمترین ماده مؤثره سیاهدانه محسوب می‌شود (۹) و اثرات آنتی‌اکسیدانی آن باعث حفاظت بافتهای بدن در مقابل آسیبهای شیمیایی می‌شود (۱۰). این ماده دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی (۱۱)، ضد التهابی (۱۲) و ضد سرطان (۱۰) می‌باشد و اثر ضد دیابتی آن (کاهش گلوکز خون) قبلاً مورد تأیید قرار گرفته است (۱۳ و ۱۴). در این رابطه، تجویز تیموکینون حتی می‌تواند موجب بهبود عملکرد سلول‌های بتای مترشحه انسولین و بازسازی جزایر لانگرهانس شود (۱۳). نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تیموکینون، پراکسیداسیون لیپیدی غیر آنزیمی را مهار می‌کند و دارای خاصیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن است (۱۵). همچنین نشان داده شده که تیموکنیون موجب کاهش آسیب اکسیداتیو در هیپوکامپ موشهای صحرایی می‌شود (۱۶). به علاوه، این ماده سبب جلوگیری از بیان آنزیم‌های متابولیسم اسید آراشیدونیک در مسیر سنتز پروستاگلاندین‌ها می‌شود که از این طریق می‌تواند از تولید واسطه‌های التهابی جلوگیری نموده و بدین ترتیب اثر ضد التهابی خود را ایجاد نماید (۱۷). با توجه به اینکه تاکنون هیچگونه گزارشی در مورد اثر تیموکینون بر یادگیری و حافظه موشها در حالت دیابت قندی نشده است، لذا در این تحقیق برای اولین بار اثر تجویز درازمدت این ماده بر یادگیری و حافظه در مدل تجربی دیابت قندی القا شده توسط داروی استرپتوزوتوسین در موشهای صحرایی نر با استفاده از دو آزمون اجتنابی غیر فعال و ماز Y مورد بررسی قرار گرفت و نقش استرس اکسیداتیو با اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در بافت هیپوکامپ تعیین شد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار (انستیتو پاستور، تهران) در محدوده وزنی ۲۸۰-۲۱۰ گرم استفاده شد. حیوانها در دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد در گروههای ۳ تا ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوانها آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش دسترسی داشتند. در این بررسی از آن دسته موشهای صحرایی نر استفاده شد که میزان گلوکز سرم آنها کمتر از ۲۰۰ mg/dl بود. در این خصوص از شبکه رترواوربیتال و لوله مویینه برای خونگیری استفاده شد. موشها به طور تصادفی به ۵ گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با تیموکینون به میزان ۵ mg/kg، دیابتی، و دو گروه دیابتی تحت تیمار با تیموکینون در دوزهای ۲/۵ و ۵ mg/kg تقسیم شدند.

برای دیابتی نمودن موشها از داروی استرپتوزوتوسین (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) به صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ mg/kg حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده شد (۱۸). تیموکینون (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) نیز از یک هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین به مدت پنج هفته و به فرم داخل صفاقی تجویز شد. برای حل نمودن تیموکینون نیز از حلال پروپیلن گلیکول (مرک، آلمان) استفاده شد. یک هفته پس از تزریق، برای اطمینان از دیابتی بودن حیوانات، قند ادرار با نوار ادراری (شرکت گلوکو یاب، تهران) کنترل شد و فقط حیوانات دیابتی شده به مرحله بعدی برای شروع تیمار راه یافتند. میزان وزن حیوانات و گلوکز سرم (روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، تهران)) قبل از انجام کار و در طی هفته‌های ۳ و ۶ پس از آزمایش اندازه‌گیری گردید.

آزمون رفتار اجتنابی غیر فعال (Passive avoidance test)

برای بررسی رفتار احترازی غیر فعال از یک دستگاه به ابعاد ۲۰ ×۸۰ ×۲۰ سانتی‌متر (شاتل باکس) دارای یک محفظه روشن و یک محفظه تاریک استفاده شد. میله‌های فلزی موجود در کف محفظه تاریک برای شوک دادن به پای حیوان استفاده شد. برای اعمال تحریک به محفظه تاریک از دستگاه استیمولاتور خاص استفاده گردید؛ بدین منظور، تک تحریکی به شدت یک میلی‌آمپر و به مدت یک ثانیه اعمال گردید. در این تحقیق روش بررسی رفتار احترازی غیر فعال پس از بررسی به شرح زیر و بر اساس رفرانس قبلی بود (۱۸):

الف - سازش (Adaptation): در این مرحله هر حیوان برای دو روز متوالی قبل از شروع آزمایش حداقل به مدت ۵ دقیقه در داخل دستگاه قرار داده شد.

ب - اکتساب (Acquisition): در این مرحله (روز سوم) حیوان در محفظه روشن قرار داده و به مدت دو دقیقه این محفظه تاریک نگه داشته شد. در این مدت در گیوتینی ارتباط دهنده محفظه روشن و تاریک کاملاً بسته بود. در انتهای دوره، لامپ محفظه روشن شده و در گیوتینی باز می‌گردید. به محض باز کردن در، کورنومتر را به کار انداخته و مدت زمانی که طول می‌کشید تا حیوان از محفظه روشن به محفظه تاریک برود یادداشت می‌گردید که این مدت زمان تحت عنوان تأخیر اولیه یا IL (Initial latency) اطلاق گردید (ملاک برای ورود حیوان به محفظه تاریک عبور اندامهای حرکتی پشتی حیوان از در ارتباط دهنده دو محفظه بود). سپس در را پایین آورده و یک تک شوک (یک میلی‌آمپر، یک ثانیه) به حیوان وارد می‌آمد. در پایان کار پس از ۱ دقیقه حیوان به قفس منتقل می‌گردید. در ارتباط با این مرحله، موشهای با تأخیر اولیه بیشتر از ۶۰ ثانیه از آزمایشات حذف گردیدند.

ج - نگهداری و به یادآوری اطلاعات (Retention and Recall): این مرحله ۲۴ ساعت پس از مرحله دوم در روز چهارم انجام پذیرفت. این مرحله مشابه مرحله قبل بود با این تفاوت که زمانی که حیوان به محفظه تاریک وارد می‌شد هیچ گونه شوکی را دریافت نمی‌کرد. در این مرحله، تأخیر در حین عبور یا STL (Step-through latency) اندازه‌گیری گردید. منظور از STL مدت زمانی است که حیوان در محفظه روشن باقی می‌ماند قبل از آنکه وارد محفظه تاریک شود. زمان قطع آزمایش (Cut-off time) در صورتی که موش وارد محفظه تاریک نشود نیز ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد.

آزمون Y-maze و اندازه‌گیری رفتار تناوب (Alternation behavior)

این آزمون در پایان کار ۳-۲ روز قبل از تست رفتار اجتنابی و بر اساس رفرانس قبلی انجام پذیرفت (۱۸). در این ارتباط میزان عملکرد حیوانات از نظر حافظه کاری از طریق مشاهده و اندازه‌گیری رفتار تناوب خودبخودی حیوان در یک جلسه کاری مورد بررسی قرار گرفت. ماز مربوط به این آزمون از جنس پلکسی گلاس بود و هر بازو دارای ابعاد ۴۰×۳۰× ۱۵ بود و بازوها از طریق یک محوطه مرکزی به هم متصل می‌شدند. برای انجام آزمون، هر موش صحرایی در قسمت انتهایی یک بازو قرار داده می‌شد و امکان دسترسی آزاد آن به تمام نواحی ماز در یک پریود زمانی ۸ دقیقه فراهم می‌گردید. تعداد دفعات ورود حیوان به داخل هر بازو با مشاهده نمودن ثبت می‌شد. ورود حیوان به داخل یک بازو زمانی بود که پاهای عقبی حیوان به طور کامل در داخل بازو قرار می‌گرفت. رفتار تناوب به عنوان ورودهای موفق و پشت سر هم (سریال) به داخل تمام بازوها در مجموعه‌های سه‌تایی در نظر گرفته شد. بدین ترتیب درصد تناوب از نسبت تناوب مشاهده شده به حداکثر تناوب (۲ - تعداد کل بازوهای وارد شده) × ۱۰۰ محاسبه گردید.

سنجش مالون‌دی‌آلدهید بافتی (MDA)

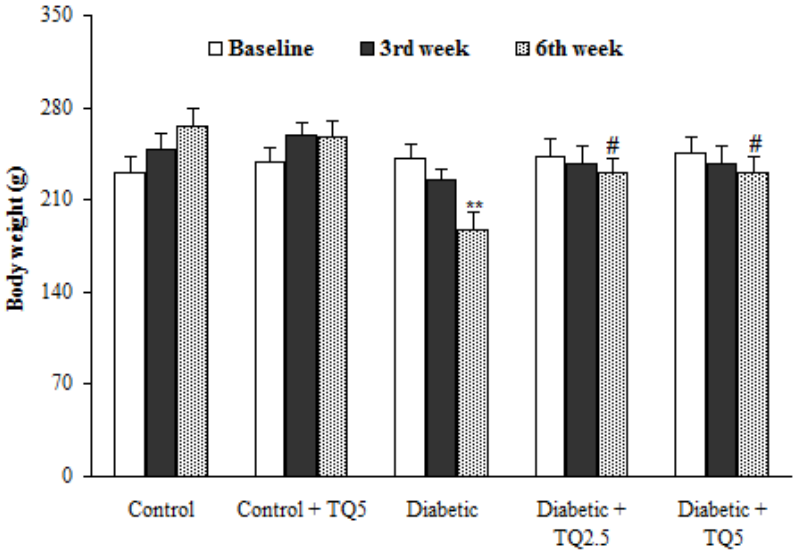
پس از پایان کار و کشتن حیوان به روش یوتنزی، بلوک هیپوکامپ مغز بر اساس رفرانس (۱۸) از بدن جدا شده و پس از شستشو با محلول سالین سرد و خشک نمودن سریعاً توزین شده و سپس بافت به همراه بافر تریس به مدت ۲ دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه (۱۰٪) گردید و محلول هموژنیزه شده، سانتریفوژ شد. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تمامی مراحل گفته شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد. پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محلول جدا شده، بخش زیرین رسوب کرده دور ریخته شد و از محلول شفاف رویی برای سنجش استفاده شد. اندازه‌گیری سطح MDA بر اساس روشی است که اساس آن واکنش تیوباربیتوریک اسید (TBA) است که در دمای جوش انجام می‌گیرد. در این آزمایش MDA یا مواد شبه MDA با TBA واکنش داده و رنگ صورتی ایجاد می‌کنند که ماکزیمم جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر است. این واکنش در محیط اسیدی و در دمای جوش به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. بعد از سرد کردن نمونه، جذب نوری خوانده شد. منحنی استاندارد نیز بر اساس رقتهای تترا اتوکسی پروپان تهیه شد و جذبهای نوری به دست آمده از نمونه‌ها بر روی منحنی استاندارد تطبیق داده شد.

آنالیز آماری

تمام نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. برای مقایسه بین گروهی در مورد نتایج وزن و گلوکز سرم و شاخص های استرس اکسیداتیو از آزمون آنووای یک طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین از آزمون آنووا با اندازه‌گیری مکرر برای مقایسه داده‌ها در هفته‌های مختلف استفاده شد. آزمون غیرپارامتریک کروسکال والیس نیز برای آنالیز نتایج آزمون ای رفتاری استفاده شد. در تمام بررسیها، $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از نظر وزن، هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین گروهها در هفته قبل از مطالعه مشاهده نشد. میزان و تغییرات وزن برحسب زمان و به تفکیک گروههای دارویی در نمودار ۱ ارائه شده و نشان می‌دهد که گروه کنترل تحت تیمار با دوز بالای تیموکینون به میزان ۵ mg/kg مشابه با گروه کنترل، یک افزایش طبیعی وزن را در پایان هفته ششم نشان داد، هر چند این افزایش کمتر بود. در گروه دیابتی نیز در هفته ششم یک کاهش معنی‌دار در مقایسه با هفته قبل از بررسی ($p<۰/۰۱$) مشاهده گردید، به طوری که وزن از ۲۴۱/۵ به ۱۸۷/۳ گرم رسید. از طرف دیگر، تفاوت موجود بین دو گروه دیابتی و دیابتی تحت درمان با دوز پایین (۲/۵ mg/kg) و دوز بالای تیموکینون (۵ mg/kg) در پایان هفته ششم نیز در حد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) و میزان وزن در گروه دیابتی تحت تیمار با تیموکینون کاهش کمتری نشان داد.



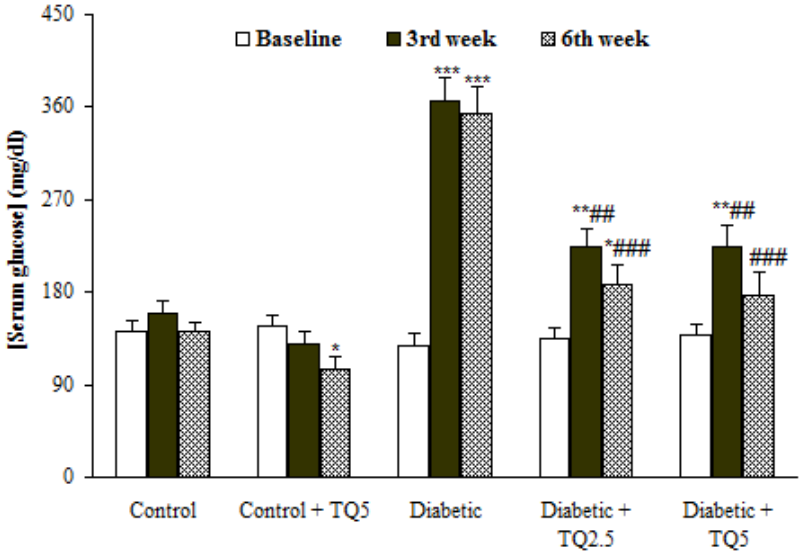
نمودار ۱- تغییرات وزن بدن در زمانهای مختلف در موشهای صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با تیموکینون در دو دوز ۲/۵ و ۵ mg/kg
**** $p<۰/۰۱$ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، # $p<۰/۰۵$ (در مقایسه با گروه دیابتی در همان هفته)**

میزان گلوکز سرم، در نمودار شماره ۲ ارائه شده و نشان می‌دهد در هفته قبل از بررسی تفاوت معنی‌داری بین گروهها یافت نشد. در هفته‌های ۳ و ۶ میزان گلوکز سرم در دو گروه دیابتی و دیابتی تحت تیمار با تیموکینون (در دو دوز ۲/۵ و ۵ mg/kg) در حد معنی‌دار ($p<۰/۰۰۰۵$ تا $p<۰/۰۵$) بیشتر از گروه کنترل بود (۳۵۳/۸ mg/dl در گروه دیابتی، ۱۸۸/۲ mg/dl در گروه دیابتی دریافت کننده تیموکینون به میزان ۲/۵ mg/kg و ۱۷۶/۳ mg/dl در گروه دیابتی دریافت کننده تیموکینون به میزان ۵ mg/kg در پایان هفته ششم)، هر چند در گروه دیابتی تحت درمان با دوز پایین (۲/۵ mg/kg) و بالای تیموکینون (۵ mg/kg) میزان گلوکز سرم به طور معنی‌داری در پایان هفته‌های ۳ و ۶ کمتر از گروه دیابتی درمان نشده بود ($p<۰/۰۱$ تا $p<۰/۰۰۵$). به علاوه، گروه کنترل تحت تیمار با دوز بالای تیموکینون کاهش معنی‌دار این پارامتر (۱۰۴/۵ mg/dl) را در مقایسه با گروه کنترل (۱۴۱/۴ mg/dl) نشان داد ($p<۰/۰۵$).

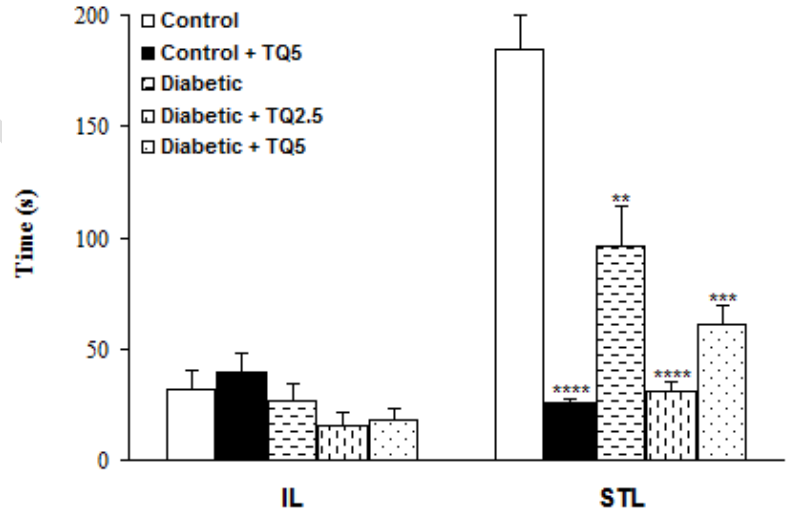
در موشهای دیابتی و دیابتی‌های تحت تیمار با دوز پایین و دوز بالای تیموکینون کاهش مختصر و غیر معنی‌داری در مورد تأخیر اولیه در مقایسه با گروه کنترل به دست آمد. به علاوه، از نظر تأخیر اولیه هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین گروههای دیابتی و دیابتی‌های تحت تیمار با تیموکینون در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نگردید. میزان تأخیر اولیه در حین عبور در نمودار شماره ۳ ارائه شده و نشان می‌دهد که تأخیر در حین عبور (که شاخصی از توانایی حیوان برای نگهداری اطلاعات در انبارهای حافظه و به یادآوری آنها می‌باشد) یک کاهش معنی‌دار

در موشهای دیابتی (۹۶/۱ ثانیه) (p<۰/۰۱) و دیابتی تحت تیمار با دوز پایین تیموکینون (۳۰/۸ ثانیه) (p<۰/۰۰۱) و دوز بالای تیموکینون (۶۱/۳ ثانیه) (p<۰/۰۰۵) داشت. همچنین میزان این پارامتر در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای تیموکینون از گروه دیابتی تیمار نشده کمتر بود. به علاوه، تیمار موشهای گروه کنترل با تیموکینون نیز یک کاهش بارز و معنی‌دار تأخیر در حین عبور را (۲۵/۸ ثانیه) در مقایسه با گروه کنترل (۱۸۴/۵ ثانیه) نشان دادند (p<۰/۰۰۱) ۳/۳۲=(۴،۳۱) F.

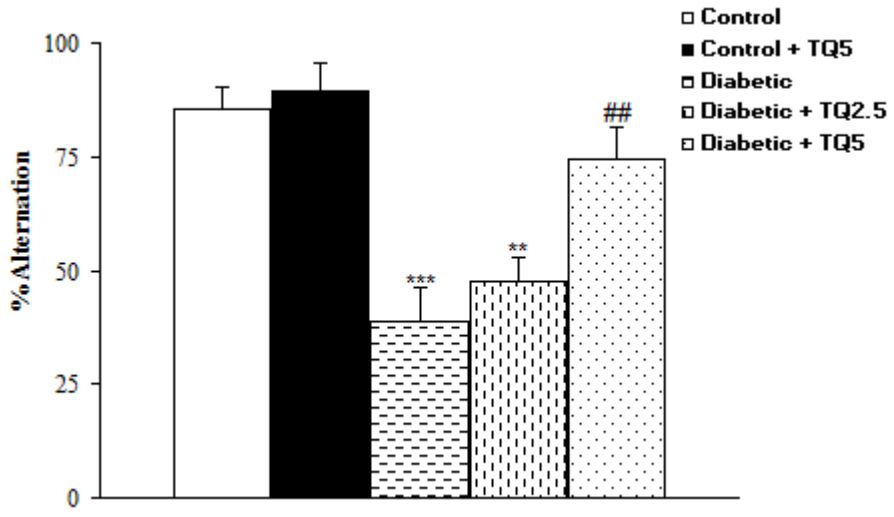
نتایج آزمون ماز Y که شاخصی از حافظه فضایی کوتاه‌مدت از نوع بازشناختی (Recognition) در جوندگانی نظیر موش صحرایی است در نمودار شماره ۴ ارائه شده و نشان می‌دهد که درصد تناوب در حیوانات گروه دیابتی (۳۸/۸٪) به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل (۸۵/۴٪) بود (p<۰/۰۰۵). همچنین درصد تناوب در گروههای دیابتی تحت تیمار با تیموکینون با دوز بالا (۷۴/۳٪) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دیابتی (۳۸/۸٪) بود (p<۰/۰۱). به علاوه، تجویز تیموکینون به گروه کنترل (۸۹/۳٪) تغییر معنی‌داری از این نظر در مقایسه با گروه کنترل (۸۶/۷٪) ایجاد ننمود ۴/۰۹=(۴،۳۱) F.



نمودار ۲- تغییرات گلوکز سرم در زمانهای مختلف در موشهای صحرایی کنترل و دیابتی تحت تیمار با تیموکینون در دو دوز ۲/۵ و ۵ mg/kg
*** p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۰۵ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، ## p<۰/۰۱، ### p<۰/۰۰۵ (در مقایسه با گروه دیابتی در همان هفته)**



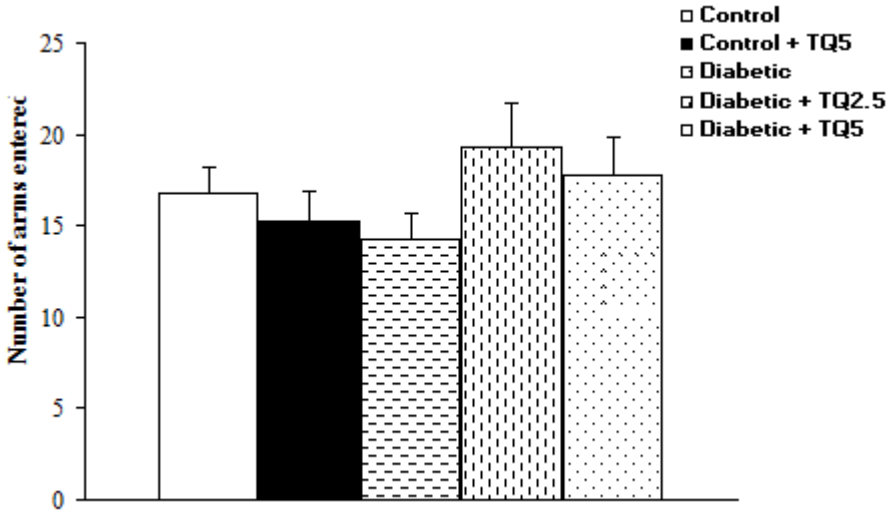
نمودار ۳- میزان تأخیر اولیه و تأخیر در حین عبور در آزمون اجتنابی غیر فعال در موشهای صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با تیموکینون در دو دوز ۲/۵ و ۵ mg/kg پس از گذشت ۶ هفته
**** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۵، **** p<۰/۰۰۱ (در مقایسه با کنترل)**



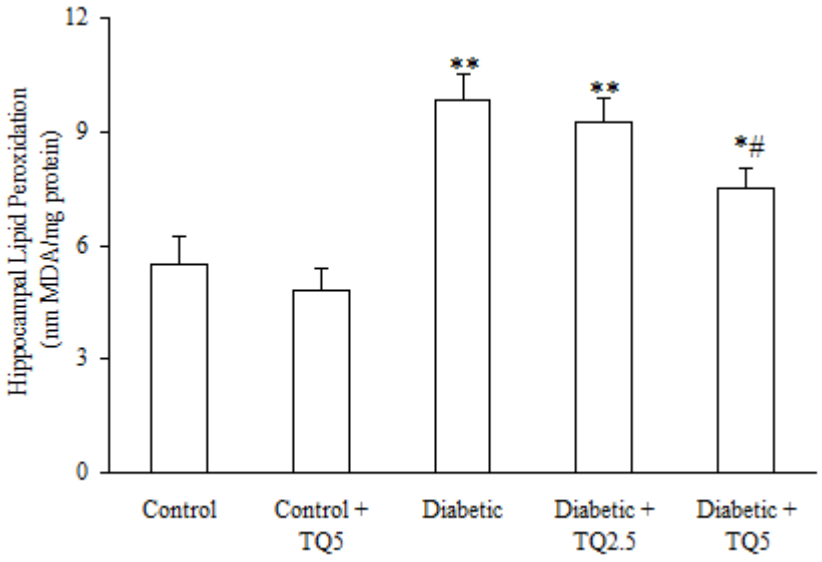
نمودار ۴- درصد تناوب در آزمون ماز Y در موشهای صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با تیموکینون در دو دوز ۲/۵ و ۵ mg/kg پس از گذشت ۶ هفته
**** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۵ (در مقایسه با کنترل)، ## p<۰/۰۱ (در مقایسه با دیابتی)**

تعداد کل بازوی وارد شده برای هر موش در آزمون Y که شاخصی از میزان توانایی حرکتی حیوان می‌باشد در نمودار ۵ ارائه شده و نشان می‌دهد که عملاً تفاوت معنی‌داری بین گروهها یافت نشد، هر چند در گروههای دیابتی تیمار نشده و دیابتی‌های تیمار شده با تیموکینون این پارامتر در حد مختصر و به طور غیر معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود.

با اندازه‌گیری سطح MDA در بافت هیپوکامپ که شاخصی از استرس اکسیداتیو است، در گروههای مختلف در پایان هفته ششم، مشخص شد که این پارامتر در گروه کنترل تحت تیمار با تیموکینون در دوز بالا یک کاهش مختصر و غیر معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. در گروه دیابتی در پایان هفته ششم سطح MDA افزایش قابل ملاحظه و معنی‌داری (۹/۸۴ نانومول بر میلی‌گرم) نسبت به گروه کنترل (۵/۵۳ نانومول بر میلی‌گرم) نشان داد (p<۰/۰۱)، و در گروه دیابتی تحت تیمار با تیموکینون در دوز بالا میزان افزایش MDA نسبت به گروه دیابتی به صورت وابسته به دوز کمتر بود، به طوری که در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای تیموکینون، سطح MDA در پایان هفته ششم به طور معنی‌داری (۷/۵۱ نانومول بر میلی‌گرم) کمتر از گروه دیابتی تیمار نشده (۹/۸۴ نانومول بر میلی‌گرم) بود (p<۰/۰۵).



نمودار ۵- تعداد کل بازوی وارد شده به عنوان شاخصی از فعالیت حرکتی حیوان در آزمون ماز Y در موشهای صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با تیموکینون در دو دوز ۲/۵ و ۵ mg/kg پس از گذشت ۶ هفته



نمودار ۶: میزان MDA بافت هیپوکامپ مغز به عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدی در موشهای صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با تیموکینون در دو دوز ۲/۵ و ۵ mg/kg

*** p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱ (در مقایسه با کنترل)، # p<۰/۰۵ (در مقایسه با گروه دیابتی)**

بحث

در این تحقیق کاهش معنی‌دار تأخیر در حین عبور در موشهای دیابتی و دیابتی تحت تیمار با تیموکینون در پایان کار مشاهده گردید و تیمار با تیموکینون در هیچ کدام از دوزها، این پارامتر را بهبود نبخشید. به علاوه، درصد تناوب در حیوانات دیابتی به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود و این پارامتر در گروههای دیابتی تحت تیمار با دوز بالای تیموکینون به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دیابتی بود. همچنین، موشهای دیابتی یک افزایش معنی‌دار در سطح بافتی MDA نشان دادند و درمان با تیموکینون در دوز بالا (۵ mg/kg) میزان MDA را به صورت معنی‌داری کاهش داد.

بروز دیابت قندی در موجودات آزمایشگاهی (نظیر موش صحرایی) و جامعه انسانی با اختلالاتی در روندهای شناختی و حافظه و یادگیری، آتروفی مغز، و افزایش احتمال ابتلا به دمانس همراه می‌باشد. هر چند که مکانیسم بروز این اختلالات در جامعه دیابتی به خوبی شناخته نشده است ولی مشخص شده است که دو ناحیه قشر مغز و هیپوکامپ که از نواحی اصلی مرتبط با این روندها محسوب می‌شوند به میزان زیاد به دنبال دیابتی شدن تحت تأثیر قرار می‌گیرند. در این ارتباط بروز دیابت قندی موجب تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در برخی نواحی مغزی شامل هیپوکامپ شده (۱۹ و ۲۰) و سطح فاکتورهای رشد شبه انسولین و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در برخی نواحی مغز کاهش می‌یابد (۲۰). به علاوه، محققان اخیراً کاهش توانایی حیوانات دیابتی را در ارتباط با تثبیت و به یادآوری اطلاعات انبار شده پس از یک ماه گزارش نموده‌اند که همین نتیجه در بررسی حاضر نیز در پایان هفته ششم به دست آمد. بر اساس شواهد موجود، تغییرات حاصله در این توانایی‌ها را می‌توان به تغییرات پلاستیسیته سیناپسی در ناحیه هیپوکامپ و در نتیجه ایجاد اختلال در روند تقویت درازمدت نسبت داد. البته شایان ذکر است که هر چند این تغییرات بیشتر در تثبیت اطلاعات دخالت دارند ولی بر اساس شواهد تحقیقاتی جدید به میزان کمتر در فراگیری مهارتهای جدید و پیچیده نیز می‌توانند دخالت داشته باشند (۲۳-۲۱). به علاوه، در بررسی حاضر تجویز درازمدت تیموکینون موجب بهبود حافظه فضایی در موشهای دیابتی گردید. در این خصوص قبلاً مشخص شده که بروز دیابت قندی در جوندگانی نظیر موش کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین موجب افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از تشدید تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در برخی نواحی مغز به خصوص در دو ناحیه هیپوکامپ و قشر مغز که خود از نواحی اصلی یادگیری و حافظه محسوب می‌گردند می‌شود (۲۱ و ۲۲) و از طرف دیگر تیموکینون موجب کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و حفاظت نورون‌ها در برابر عوامل آسیب‌رسان می‌گردد (۱۴ و ۱۵) و از این طریق می‌تواند موجب بهبودی در خصوص برخی روندها گردد.

در این بررسی با اندازه‌گیری سطح MDA در بافت هیپوکامپ مغز که خود یکی از شاخصهای بارز پراکسیداسیون لیپیدی در

نواحی بافتی می‌باشد مشخص شد که با تجویز تیموکینون سطح این پارامتر در مغز حیوانات دیابتی کاهش می‌یابد که این خود بخشی از بهبود را در ارتباط با حافظه فضایی در این تحقیق توجیه می‌نماید. در توجیه عدم اثر تجویز تیموکینون بر یادگیری و حافظه موشهای دیابتی در آزمون رفتار اجتنابی غیر فعال نیز می‌توان گفت که این ماده دارای خاصیت ضد اضطراب می‌باشد (۲۴) و موجب تغییراتی در سیستم‌های میانجی در مغز می‌گردد (۲۴) که شاید این تغییرات روند شرطی‌سازی و نگهداری و به یادآوری اطلاعات در رابطه با این آزمون را تحت تأثیر قرار داده باشد که خود این نیاز به مطالعات بیشتر دارد. همچنین بخش دیگری از اثر سودمند تیموکینون بر حافظه فضایی را می‌توان به تأثیر آن بر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نسبت داد. در این رابطه معلوم شده که کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نقش مهمی در یادگیری و حافظه فضایی ایفا می‌کنند و اختلال عملکردی آنها می‌تواند موجب بروز اختلال در حافظه فضایی گردد (۲۵)، هر چند تاکنون گزارشی در مورد اثر تیموکینون بر عملکرد این کانال‌ها یافت نمی‌شود که خود نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

بخشی از اثر سودمند تیموکینون در دوز ۲/۵ mg/kg بر حافظه فضایی در موشهای دیابتی شده در این تحقیق را می‌توان به اثر این ماده در کاهش استرس اکسیداتیو در ناحیه هیپوکامپ نسبت داد که با کاهش سطح MDA در بافت هیپوکامپ خود را نشان داد. این توانایی تیموکینون در مورد سایر آنتی‌اکسیدان‌ها نیز برقرار است، به عنوان نمونه تجویز آنتی‌اکسیدان طبیعی یعنی ویتامین E نیز می‌تواند موجب بهبود یادگیری و حافظه در تست اجتنابی غیر فعال در موشهای دیابتی گردد (۲۶). به عبارت دیگر توانایی تیموکینون در بهبود حافظه فضایی در این بررسی که از طریق کاهش استرس اکسیداتیو به انجام رسیده است نمی‌تواند یک اثر اختصاصی آن در نظر گرفته شود.

در مطالعه حاضر، تجویز درازمدت تیموکینون موجب بهبودی یادگیری و حافظه در آزمون اجتنابی غیر فعال نگردید. در این خصوص معلوم شده که برای تثبیت اطلاعات در انبارهای حافظه در تست اجتنابی غیر فعال بر خلاف آزمونهای حافظه فضایی کوتاه مدت نظیر آزمون ماز Y نیاز به سنتز پروتئین‌های جدید در مدارهای عصبی مربوطه در مغز می‌باشد و مکانیسم ملکولی آنها متفاوت از هم می‌باشد (۲۷ و ۲۸). نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که تیموکینون خود می‌تواند موجب کاهش سنتز پروتئین در برخی بافتهای بدن گردد (۲۹) که این می‌تواند عدم بهبود یادگیری و حافظه در آزمون اجتنابی غیرفعال در بررسی حاضر را در موشهای دیابتی و کنترل به دنبال تجویز تیموکیون تا حدی توجیه نماید، هر چند این موضوع خود نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

یکی از محدودیتهای بررسی حاضر عدم اندازه‌گیری دقیق فعالیت حرکتی حیوان با استفاده از ابزار سنجش تحرک بود، هرچند تعداد ورود به داخل بازوها در آزمون Y به عنوان شاخص میزان تحرک در نظر گرفته شد و از این نظر تفاوت معنی‌داری بین گروهها مشاهده نشد. به علاوه در این بررسی برای ارزیابی حافظه فضایی از آزمون ماز Y استفاده شد که عملکرد حیوان را در سطح پایینتر بررسی می‌نماید. توصیه می‌شود در مطالعات آتی از آزمونهای با سطح عملکرد بالاتر نظیر آزمون آبی موریس و ماز رادیال هشت پر استفاده گردد.

نتیجه‌گیری

تجویز درازمدت تیموکینون در دوز بالا هر چند بر توانایی نگهداری اطلاعات در انبار حافظه و به یادآوری آنها در حیوانات دیابتی در آزمون اجتنابی غیر فعال تأثیر ندارد ولی موجب بهبود حافظه فضایی کوتاه مدت در حیوانات دیابتی می‌گردد و بخشی از اثرات سودمند این ماده از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت هیپوکامپ اعمال می‌شود. نتایج این مطالعه می‌تواند در کاهش اختلالات شناختی در بیماران دیابتی تا حدی کاربرد داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور (تهران) مصوب سال ۱۳۸۹ به شماره ۱۲۳۱۹/د می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است. نویسندگان مقاله همچنین مراتب تشکر وافر خود را از سرکار خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد در کمک به انجام آزمایشات اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1. Ceylan-Isik AF, Fliethman RM, Wold LE, Ren J. Herbal and traditional Chinese medicine for the treatment of cardiovascular complications in diabetes mellitus. Curr Diabetes Rev 2008;4(4):320-8.

2. Szémán B, Nagy G, Varga T, Veres-Székely A, Sasvári M, Fitala D, et al. Changes in cognitive function in patients with diabetes mellitus. Orv Hetil 2012;153(9):323-9. (Full text in Hungarian)

3. Biessels GJ, Smale S, Duis SE, Kamal A, Gispen WH. The effect of gamma-linolenic acid-alpha-lipoic acid on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. J Neurol Sci 2001;182(2):99-106.

4. Parihar MS, Chaudhary M, Shetty R, Hemnani T. Susceptibility of hippocampus and cerebral cortex to oxidative damage in streptozotocin treated mice: prevention by extracts of Withania somnifera and Aloe vera. J Clin Neurosci 2004;11(4):397-402.

5. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res 2010;107(9):1058-70.

6. Reagan LP, McEwen BS. Diabetes, but not stress, reduces neuronal nitric oxide synthase expression in rat hippocampus: implications for hippocampal synaptic plasticity. Neuroreport 2002;13(14):1801-1804.

7. Baydas G, Nedzvetskii VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Yoldas T. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Life Sci 2003;73(15):1907-16.

8. D'Antuono LF, Moretti A, Lovato AFS. Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of Nigella sativa L. and Nigella damascene L. Ind Crops Prod 2002;15(1):59-69.

9. Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip PA, Kucuk O, et al. Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. Nutr Cancer 2010;62(7):938-46.

10. Randhawa MA, Alghamdi MS. Anticancer activity of Nigella sativa (black seed) - a review. Am J Chin Med 2011;39(6):1075-91.

11. Hosseinzadeh H, Taiari S, Nassiri-Asl M. Effect of thymoquinone, a constituent of Nigella sativa L., on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2012 385(5):503-8.

12. Ammar el-SM, Gameil NM, Shawky NM, Nader MA. Comparative evaluation of anti-inflammatory properties of thymoquinone and curcumin using an asthmatic murine model. Int Immunopharmacol 2011;11(12):2232-6.

13. Sankaranarayanan C, Pari L. Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and β-cell damage in experimental hyperglycemic rats. Chem Biol Interact 2011;190(2-3):148-54.

14. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life Sci 2009;85(23-26):830-4.

15. Fouda AM, Daba MH, Dahab GM, Sharaf El-Din OA. Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008;103(2):09-18.

16. Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Asl MN, Sadeghnia HR, Ziaee T. Effect of thymoquinone and Nigella sativa seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. Phytomedicine 2007;14(9):621-7.

17. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. Immunol Lett 2006;106(1):72-81.

18. Nasri S, Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Balvardi M, Rabani T. Chronic cyanidin-3-glucoside administration improves short-term spatial recognition memory but not passive avoidance learning and memory in streptozotocin-diabetic rats. Phytother Res 2012;26(8):1205-10.

19. Biessels GJ, ter Laak MP, Kamal A, Gispen WH. Effects of the Ca2+ antagonist nimodipine on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Brain Res 2005;1035(1):86-93.

20. Nitta A, Murai R, Suzuki N, Ito H, Nomoto H, Katoh G, Furukawa Y, et al. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. Neurotoxicol Teratol 2002;24(5):695-701.

21. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. Brain Res 1990;532(1-2):95-100.

22. Artola A, Kamal A, Ramakers GM, Biessels GJ, Gispen WH. Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long-term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus. Eur J Neurosci 2005;22(1):169-78.

23. Sima AA, Li ZG. The effect of C-peptide on cognitive dysfunction and hippocampal apoptosis in type 1 diabetic rats. Diabetes 2005;54(5):1497-505.

24. Gilhotra N, Dhingra D. Thymoquinone produced antianxiety-like effects in mice through modulation of GABA and NO levels. Pharmacol Rep 2011;63(3) 660-9.

25. Kim R, Moki R, Kida S. Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. Mol Brain 2011;4:9.

26. Hasanein P, Shahidi S. Effects of combined treatment with vitamins C and E on passive avoidance learning and memory in diabetic rats. Neurobiol Learn Mem 2010;93(4):472-8.

27. Barros DM, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I. Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. Behav Pharmacol 2002;13(2):163-7.

28. Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Mello e Souza T. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. Neurobiol Learn Mem 1998;69(3):219-24.

29. Badr G, Mohany M, Abu-Tarboush F. Thymoquinone decreases F-actin polymerization and the proliferation of human multiple myeloma cells by suppressing STAT3 phosphorylation and Bcl2/Bcl-XL expression. Lipids Health Dis 2011;10:236.