

بررسی اثر عصاره گیاه *Salvia hydrangea* (گل ارونه) بر روند بهبود حافظه، کاهش آپوپتوز و فسفریلاسیون پروتئین CREB در مدل آلزایمر القا شده با آمیلوئید بتا در موش‌های صحرایی نر

سولماز خلیفه^۱، قربانگل اصحابی^۲، احمد امیدپناه^۳، دکتر فریبا خداقلی^۴، دکتر محمدعلی اسماعیلی^{۵*}

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)، تهران

۲. دانشجوی دکتری فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز

۳. کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۴. دانشیار مرکز تحقیقات نوروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۵. دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۶. استادیار مرکز تحقیقات گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری آلزایمر یکی از مهمترین بیماری‌های سیستم عصبی است که منجر به زوال عقل می‌گردد. مطالعات بسیاری در زمینه پیشگیری، درمان و تولید دارو در این بیماری انجام شده است. گیاهان دارویی مختلفی در برابر بیماری آلزایمر، اثرات محافظتی از خود نشان داده‌اند. اثر محافظتی گونه‌های مختلف گیاه سالویا (تیره نعناع، جنس مریم گلی) در زمینه بیماری‌های نورودژنراتیو نیز به اثبات رسیده است. در این بررسی، اثر پیشگیرانه‌ی عصاره گیاه سالویا هیدرانژا (*Salvia hydrangea*)، نام محلی گل ارونه) در مدل آلزایمر القا شده توسط آمیلوئید بتا در موش‌های صحرایی، مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: موش‌ها با روش گاوژ به مدت ده روز، عصاره‌ی الکلی گیاه را دریافت کردند. سپس با تزریق آمیلوئید بتا، آلزایمری شده و حافظه‌ی موش‌ها به وسیله‌ی دستگاه شاتل باکس، ارزیابی شد. سطح مولکولی $Ca^{2+}/cAMP$ response element binding protein (CREB) و فعالیت آن‌تی‌اکسیدانتی و استیل‌کولین استرازی، بررسی شد.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه سالویا هیدرانژا، سبب افزایش حافظه در موش‌های آلزایمری می‌شود. سالویا هیدرانژا، موجب افزایش فعالیت آن‌تی‌اکسیدانتی و افزایش فسفریلاسیون CREB در موش‌های پیش‌درمان شده گردید. درمان با عصاره سالویا هیدرانژا سبب کاهش آپوپتوز در نواحی هیپوکمپ و کورتکس پیشانی شد. مطالعات کروماتوگرافی نشان داد که فنول‌هایی همچون جنتیتیک اسید، کلوروژنیک اسید، وانیلیک، کافئیک و سیرینژیک اسید در عصاره گیاه سالویا هیدرانژا وجود دارند. **نتیجه‌گیری:** عصاره گیاه سالویا هیدرانژا با اثرات محافظتی خود نشان داد که دارای پتانسیلی قوی در پیشگیری از بیماری آلزایمر می‌باشد.

واژگان کلیدی: فعالیت استیل‌کولین استرازی، آن‌تی‌اکسیدانت‌ها، آلزایمر، حافظه، آپوپتوز، سالویا هیدرانژا، موش صحرایی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Khalifeh S, Ashabi G, Omidpanah A, Khodagholi F, Esmaeili MA. Evaluating the effect of *Salvia hydrangea* extract on memory improvement, apoptosis reduction and CREB phosphorylation in animal model of Alzheimer's disease in male rats. *Pejouhandeh* 2014;19(2):78-85.

مقدمه

حافظه و کارکردهای شناختی اشاره کرد (۱). تجمع آمیلوئید

بتا در نواحی هیپوکمپ و کورتکس پیشانی، یکی از مهمترین مشخصه‌های پاتوژنیک این بیماری به شمار می‌رود. پپتید آمیلوئید بتا در مغز ساختارهای پلاک مانند ایجاد کرده و این پلاک‌ها سبب شروع استرس اکسیداتیو و در نتیجه، کاهش نورون‌های کولینرژیک می‌شوند (۲). مطالعات نشان داده‌اند که

بیماری آلزایمر، یکی از مهمترین بیماری‌های زوال عقل در جهان می‌باشد. از علایم این بیماری می‌توان به از دست دادن

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر محمدعلی اسماعیلی؛ مرکز تحقیقات گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران؛ تلفن: (۰۲۱) ۲۹۹۰۴۰۵۴؛ پست الکترونیک: m_esmaeili@sbu.ac.ir

خلأ، خشک و پودر شد. برای گاوژ کردن، عصاره در آب حل شد.

در این مطالعه، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی ۲۶۰-۲۳۰ گرم استفاده شد (انستیتو پاستور، تهران، ایران). موش‌ها در قفس‌های سه‌تایی در ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا، نگهداری شدند. تمام آزمایشات بر اساس قوانین نگهداری و استفاده از حیوانات دانشگاه شهید بهشتی صورت گرفته است. در هر گروه، ۶ حیوان مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی، حیوانات به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل و گروه آمیلوئید بتا. این دو گروه برای ۱۰ روز، یک میلی‌لیتر آب را به صورت خوراکی به روش گاوژ دریافت کرده و سپس ۳ میکرولیتر PBS (Phosphate Buffer Saline) و یا آمیلوئید بتا (۱۰ ng/μl) به درون هیپوکمپ آنها تزریق شد. دو گروه دیگر، یک میلی‌لیتر از عصاره‌ی گیاه را با غلظت ۵۰ mg/kg (دوز مناسب طبق پژوهش‌های اولیه انجام شده انتخاب شده است) (۱۲) دریافت کرده و پس از ۱۰ روز، آمیلوئید بتا و یا PBS به ناحیه‌ی هیپوکمپ پشتی، تزریق گردید.

گروه‌ها به مدت ۹ ساعت از دسترسی به آب و غذا منع بوده و پس از ۹ ساعت، یک میلی‌لیتر محلول عصاره‌ی گیاهی به مدت ۱۰ روز به آنها خورانده شد. پس از اتمام ۱۰ روز، موش‌ها به وسیله‌ی تزریق درون صفاقی کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلین (۴ mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استروکتس قرار گرفتند. تزریق درون هیپوکمپی (PBS و یا آمیلوئید بتا)، طبق مختصات هیپوکمپ در اطلس پاکسینوس و واتسون (۳/۸ mm از برگما به عقب، ۳/۲ mm به طرفین و ۲/۸ mm به عمق) صورت گرفت (۱۲). هفت روز پس از تزریق آمیلوئید بتا، موش‌ها کشته شده و مغز آنها برای آزمایشات بعدی، جدا گردید.

ترتیب گروه‌بندی‌ها عبارت بود از: گروه کنترل که آب خوراکی را به صورت گاوژ و PBS (حلال آمیلوئید بتا) را در هیپوکمپ دریافت کردند، گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا، گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی سالویا هیدرانژا و گروه درمان که هم سالویا هیدرانژا را به صورت گاوژ و هم آمیلوئید بتا را دریافت کردند.

دستگاه کروماتوگرافی (Agilent LC, G1311A, USA) شامل یک پمپ و تشخیص دهنده‌ی دیود نوری می‌باشد. این دستگاه، یک تزریق‌کننده‌ی اتوماتیک دارد که به برنامه‌ی کروماتوگرافی کامپیوتر وصل می‌باشد. جداسازی در ستون reverse-phase-۴×۳۰۰ میلی‌متر و اندازه‌ی ۵ میلی‌لیتر

پپتید آمیلوئید بتا به تنهایی در مغز، می‌تواند سبب استرس اکسیداتیو شود. استرس اکسیداتیو به حالت پاتولوژیکی اطلاق می‌گردد که سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS (Reactive oxygen species) می‌شود (۳).

از میان مواد بسیاری که در زمینه‌ی درمان بیماری آلزایمر پیشنهاد شده است، داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. گیاه سالویا در طب چینی در درمان بیماری‌های مختلفی از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی و ایسکمی مغزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). همچنین، گونه‌های مختلف گیاه سالویا، به عنوان داروهای ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی در بسترهای عصبی (همچون سلول‌های شبه عصبی PC12) و مطالعات تغذیه‌ای، معرفی شده‌اند (۵-۷).

گونه‌های مختلف گیاه سالویا از جمله *S. officinalis* و *S. miltiorrhiza*، سبب بهبود حافظه می‌شوند (۸ و ۹). از سوی دیگر، فعالیت ضد کولین‌استرازی برخی گونه‌های سالویا، به اثبات رسیده است (۱۰). یک بررسی نشان داده است که گیاه سالویا، هیدرانژا پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی بیشتری در مقایسه با گونه‌های دیگر دارد (۱۱). با این وجود، هنوز مطالعات *in vivo* به صورت گسترده در زمینه‌ی بیماری آلزایمر با استفاده از این گیاه انجام نگرفته است. این مطالعه با هدف تعیین اثر آنتی‌اکسیدانی، ضد آپوپتوزی و ضد کولین‌استرازی عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانژا و نیز تعیین رفتار موش‌های پیش درمان شده با این عصاره انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

آنتی‌بادی‌های ضد caspase-3، CREB، pCREB و β-actin از شرکت سل سیگنالینگ (آمریکا) تهیه شد. کیت Electrochemiluminescence (ECL) از شرکت آمرشام (آمریکا) تهیه گردید. کاغذ polyvinylidene difluoride (PVDF) از شرکت میلی‌پور (آمریکا) خریداری شد. آمیلوئید بتا و سایر موادی که ذکر نشده است، از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه گردید. گیاه سالویا هیدرانژا از کرج در ایران توسط دکتر سنبلی جمع‌آوری و پس از شناسایی، یک نمونه از گیاه به شماره‌ی هرباریومی ۱۰۴۲ در هرباریوم پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه‌ی دارویی دانشگاه شهید بهشتی، نگهداری شد. گیاه در هوا، خشک و سپس پودر گردید. پودر گیاه برای ۴ بار در متانول عصاره‌گیری شد. عصاره‌ی متانولی گیاه در شرایط فشار شدید، تغلیظ و سپس با دستگاه خشک کن در

المن انجام شد (۱۴). Acetylthiocholine (ACThCh)، به عنوان سوسترا در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت استیل‌کولین‌استرازی به صورت نانو مول ACThCh hydrolyzed/min/mg در طول موج ۴۱۲ نانومتر، اندازه‌گیری شد.

برای انجام روش وسترن بلات، مقادیر مساوی از پروتئین توسط ژل پلی‌آکریل‌آمید SDS-PAGE ۱۲٪ جداسازی شد. بعد از مرحله‌ی الکتروفورز، پروتئین‌های ژل به کاغذ PVDF منتقل و کاغذ به مدت یک ساعت، در محلول بلاکینگ قرار گرفت. پس از آن، کاغذ به مدت یک شب، در آنتی‌بادی اولیه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و در روز دوم، ۳ بار با محلول TBST شستشو داده شد و سپس کاغذ با آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از این مرحله، کاغذها با کیت ECL پوشانده و با استفاده از فیلم رادیولوژی، ظاهر گردیدند. سپس، بلات‌ها در بافر استریپینگ شستشو داده و پس از قرار دادن آنتی‌بادی بتا اکتین روی کاغذ، مجدداً با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شدند. همچنین، بتا اکتین کنترل نیز در فیلم رادیولوژی ظاهر شده و توسط برنامه‌ی Image J، باندهای به دست آمده، دانسیومتری شدند. فعالیت کاتالازی به وسیله‌ی اسپکتوفتومتر سنجیده شد (۱۵). سرعت تجزیه‌ی H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر، مورد بررسی قرار گرفت. غلظت گلوکاتایون با استفاده از 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) در هیپوکمپ و کورتکس پیشانی مورد بررسی قرار گرفت (۱۶). به طور خلاصه، DTNB و نمونه‌ی مغزی، در طول موج ۴۱۲ نانومتر به وسیله‌ی دستگاه الیزا ریدر، خوانده شد. هر آزمایش، حداقل ۳ بار تکرار شد. یافته‌ها به صورت میانگین به همراه انحراف معیار، نشان داده شدند. برای مقایسه‌ی گروه‌ها، از آزمون ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی (post hoc) Tukey استفاده شد. همچنین، سطح معنی‌داری اختلاف بین گروه‌ها، با $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جدول ۱، آنالیز اجزای تشکیل‌دهنده‌ی عصاره‌ی گیاه سالوبا هیدرانژا را نشان می‌دهد. این فنول‌ها شامل جنتیتیک اسید، کلوروژنیک اسید، وانیلیک، کافئیک و اسید سیرینژیک می‌باشد.

در این مطالعه، از تست شاتل باکس برای یادگیری و حافظه استفاده شد. این تست رفتاری برای تشخیص بهبود حافظه بسیار مفید می‌باشد. برای تشخیص حافظه‌ی کوتاه مدت، ۲۴

C18، در دمای اتاق و جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه انجام گرفت و پیک مربوطه، در محدوده‌ی ۲۰۰-۶۰۰ نانومتر، شناسایی شد. ستون، به وسیله‌ی سه محلول $CH_3OH/H_2O/CH_3COOH$ (10:88:2, v/v/v) (محلول A)، $CH_3OH/H_2O/CH_3COOH$ (90:8:2, v/v/v)، (محلول B) و CH_3OH (محلول C)، سه بار شستشو داده شد. مواد در محلول B برای مدت ۱۵ دقیقه به غلظت ۱۵ تا ۳۰ درصد و در ۳ دقیقه بعدی به غلظت ۴۰ درصد رسیده و برای ۱۲ دقیقه نگهداری شدند تا به غلظت ۱۰۰ درصد برسد. سپس محلول C، اضافه شد تا در ۲ دقیقه به ۱۲ درصد و در ۱۱ دقیقه به ۳۰ درصد برسد و ظرف مدت ۲ دقیقه به حالت نرمال بازگردد. اجزای گیاه، با استفاده از مقایسه‌ی زمان بازگشت آنها بر اساس حالت استاندارد و با استفاده از کتابخانه‌ی PDA، شناسایی شدند. ده دقیقه زمان تعادل برای هر تزریق در نظر گرفته شد. محلول نمونه و تمامی استانداردها، سه بار تکرار شدند.

شاتل باکس شامل دو محفظه (یک بخش روشن و یک بخش تاریک)، با اندازه‌ی یکسان (۲۵×۲۵×۲۸ سانتی‌متر) می‌باشد. این دو بخش، توسط دریچه‌ای به هم مرتبط می‌باشند. سیم‌های الکتریکی جهت القای شوک الکتریکی، در زیر این دو بخش واقع شده‌اند. اتفاقی که در آن آزمایش صورت می‌گیرد، تاریک می‌باشد. شش روز پس از تزریق درون هیپوکمپی، آزمون شاتل باکس به منظور بررسی عملکرد حافظه در حیوانات، انجام شد. سی دقیقه قبل از انجام آزمون، موش‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در شاتل باکس قرار داده شدند تا به محیط عادت کنند. سپس طی ۵ دقیقه، موش‌ها در شاتل باکس، تحت نظر گرفته شدند. در صورت ورود موش به داخل محفظه‌ی تاریک، شوک الکتریکی با شدت ۲ میلی‌آمپر، فرکانس ۵۰ هرتز و مدت ۱/۵ ثانیه، به حیوان داده می‌شد. در روز دوم، آزمون اصلی روی حیوان انجام گرفت. به این ترتیب که موش‌ها به مدت ۵ دقیقه در شاتل باکس قرار گرفته و زمان ورود به قسمت تاریک (Latency) و دفعات عبور (Error number) از دریچه، ثبت می‌گردید.

هفت روز پس از جراحی، موش‌ها به وسیله‌ی دی‌اکسیدکربن بیهوش شده و سر آنها جدا گردید. هیپوکمپ و کورتکس پیشانی، از مغز موش‌ها جدا شد و در نیتروژن مایع قرار گرفت. جداسازی پروتئین‌ها بر اساس پروتکل نیمورا و همکارانش انجام شد (۱۳). سپس هیپوکمپ و کورتکس پیشانی برای انجام آزمایش وسترن بلات آنزیمی، مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت استیل‌کولین‌استرازی، بر اساس روش

را در مقایسه با گروه کنترل کاهش و تعداد دفعات خطا را افزایش دهد ($P < 0.001$). پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، زمان ورود به قسمت تاریک را افزایش و تعداد دفعات خطا را نسبت به گروه آمیلوئید بتا، کاهش داد ($P < 0.001$).

ساعت پس از یادگیری، از رت‌ها تست گرفته شد. میانگین و انحراف معیار زمان ورود به قسمت تاریک و تعداد دفعات خطا، بر اساس گروه‌های بررسی شده، در جدول ۲ آمده است. تزریق آمیلوئید بتا در هیپوکمپ، توانست زمان ورود به قسمت تاریک

جدول ۱. مقادیر واجزای فنولی تشکیل دهنده‌ی گیاه سالویا هیدرانزا.

پیک	نام ماده	mg/۴۰mg عصاره متانولی	درصد
۱	Gentisic acid	۳۴/۰	۸۵/۰
۲	Chlorogenic acid	۱۳/۰	۳۲/۰
۳	Vanillic acid	۱۳/۰	۳۲/۰
۴	Caffeic acid	۳/۱	۲/۳
۵	Syringic acid	۴/۱	۵/۳

جدول ۲. اثر درمان با سالویا هیدرانزا در بهبود حافظه در آزمون شاتل باکس.

گروه‌ها	زمان ورود به قسمت تاریک (ثانیه)	تعداد دفعات خطا
کنترل	۲۹۹/۲±۰/۸	۰/۵±۰/۲
آمیلوئید بتا	۳۴/۳±۸/۱	۳/۳±۰/۲
سالویا هیدرانزا	۲۹۷/۵±۲/۵	۰/۷±۰/۲
سالویا هیدرانزا + آمیلوئید بتا	۲۹۱/۰±۶/۶	۰/۷±۰/۳

تعداد موش‌ها در هر گروه، ۶ رأس می‌باشد. موش‌ها به مدت ۱۰ روز به وسیله‌ی سالویا هیدرانزا پیش‌درمان شده و دوز ۳۰ نانوگرم/موش از آمیلوئید بتا را دریافت کرده و پس از ۶ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. زمان تأخیر در ورود به قسمت تاریک و تعداد دفعات خطا، در جدول نشان داده شده است. سطح معنی‌داری با $P < 0.05$ در متن مورد آنالیز قرار گرفته است. $Mean \pm S.E.M$ در جدول بیان شده است. تزریق آمیلوئید بتا در هیپوکمپ توانست زمان ورود به قسمت تاریک را در مقایسه با گروه کنترل کاهش و تعداد دفعات خطا را افزایش دهد ($P < 0.001$). پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، زمان ورود به قسمت تاریک را افزایش و تعداد دفعات خطا را نسبت به گروه کنترل، کاهش داد ($P < 0.001$).

اختلاف گروه‌ها از نظر نسبت p-CREB/CREB در هیپوکمپ معنی‌دار بود ($P < 0.001$). آزمون Tukey نشان داد که نسبت p-CREB/CREB در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته در حالی که این نسبت در موش‌های پیش‌درمانی شده با عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا، نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا، افزایش یافته است ($P < 0.001$). سطح caspase-3 هیپوکمپ نیز در گروه‌های مورد بررسی، دارای اختلاف معنی‌داری بود. در موش‌های مدل آلزایمری، سطح caspase-3 نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.001$). این در حالی است که پیش‌درمانی با عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا، موجب کاهش سطح caspase-3 در مقایسه با گروه آلزایمری شد ($P < 0.001$ ، جدول ۳).

میانگین و انحراف معیار متغیرهای اندازه‌گیری شده در قشر پیشانی، در جدول ۴ نشان داده شده است. اختلاف گروه‌ها از لحاظ فعالیت آنزیم کاتالاز قشر پیشانی، معنی‌دار بود ($P < 0.001$). آزمون Tukey نشان داد که فعالیت

میانگین و انحراف معیار متغیرهای اندازه‌گیری شده در هیپوکمپ در جدول ۳ نشان داده شده است. فعالیت کاتالاز هیپوکمپ، در موش‌های آلزایمری شده با آمیلوئید بتا در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.001$) ولی پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا شد ($P < 0.001$). بررسی‌ها نشان داد که سطح گلووتاتیون در هیپوکمپ، در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل، کاهش یافته ($P < 0.001$) ولی پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، موجب افزایش سطح گلووتاتیون نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا شده است ($P < 0.001$). فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز در گروه آلزایمر (حیوانات دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا)، در مقایسه با گروه کنترل (حیوانات سالم)، افزایش چشمگیری یافت ($P < 0.001$). این در حالی است که تجویز عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا در حیوانات آلزایمری شده، فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز را در مقایسه با گروه آلزایمری، کاهش داد ($P < 0.001$).

جدول ۳. اثر درمان با سالویا هیدرانزا بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و استیل کولین استراز و همچنین سطح پروتئین p-CREB، caspase-3 و مقدار گلوکاتینون در هیپوکمپ موش‌ها.

گروه‌ها	فعالیت کاتالاز (nmol/m)	سطح گلوکاتینون (U/mg)	فعالیت استیل کولین استراز (بر حسب درصد)	سطح پروتئین p-CREB (واحد‌ها نسبی هستند)	سطح پروتئین Caspase-3 (واحد‌ها نسبی هستند)
کنترل	۰/۰۷±۰/۰۵	۰/۵±۱۱/۸	۱۰۰±۳	۰/۶±۰/۰۴	۰/۳±۰/۰۷
آمیلوئید بتا	۲±۰/۰۸	۰/۴±۱۰/۵	۱۴۰±۹	۰/۴±۰/۰۱	۲/۱±۰/۰۶
سالویا هیدرانزا	۲/۵±۰/۰۹	۰/۶±۱۱/۹	۷۲±۳	۰/۶±۰/۰۲	۰/۳±۰/۰۵
سالویا هیدرانزا + آمیلوئید بتا	۳/۸±۰/۰۷	۰/۷±۱۰/۸	۸۱±۵	۰/۵±۰/۰۲	۱/۲±۰/۰۳

تعداد موش‌ها در هر گروه، ۶ رأس می‌باشد. موش‌ها به مدت ۱۰ روز به وسیله‌ی سالویا هیدرانزا پیش‌درمان شده و دوز ۳۰ نانوگرم/موش از آمیلوئید بتا را دریافت کردند. موش‌ها پس از ۶ روز، کشته شده و فاکتورهای فوق، ارزیابی گردید. سطح معنی‌داری با $P < ۰/۰۵$ در متن مورد آنالیز قرار گرفته است. $Mean \pm S.E.M$ در جدول بیان شده است. فعالیت کاتالاز در موش‌های مدل آلزایمری شده با آمیلوئید بتا در مقایسه با گروه کنترل، کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۱$) و پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا گردید ($P < ۰/۰۰۱$). سطح گلوکاتینون در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل، کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۱$) ولی پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، موجب افزایش سطح گلوکاتینون نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا گردید ($P < ۰/۰۰۱$). فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در گروه آلزایمر (حیوانات دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا)، در مقایسه با گروه کنترل (حیوانات سالم)، افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). این در حالی است که تجویز عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا در حیوانات آلزایمری شده، توانست فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را نسبت به گروه آلزایمری، کاهش دهد ($P < ۰/۰۰۱$). نسبت p-CREB/CREB در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل، کاهش یافت؛ در حالی که این نسبت در موش‌های پیش‌درمانی شده با عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا، افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). سطح caspase-3 در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$)؛ در حالی که پیش‌درمانی با عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا، موجب کاهش caspase-3 در مقایسه با گروه آلزایمری شد ($P < ۰/۰۰۱$).

جدول ۴. اثر درمان با سالویا هیدرانزا بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و استیل کولین استراز و همچنین سطح پروتئین p-CREB، caspase-3 و مقدار گلوکاتینون در ناحیه‌ی کورتکس پیشانی موش‌ها.

گروه‌ها	فعالیت کاتالاز (nmol/m)	سطح گلوکاتینون (U/mg)	فعالیت استیل کولین استراز (بر حسب درصد)	سطح پروتئین p-CREB (واحد‌ها نسبی هستند)	سطح پروتئین Caspase-3 (واحد‌ها نسبی هستند)
کنترل	۱۱/۲±۰/۰۳	۲/۱۴±۱۷/۸۸	۱۰۰±۸/۷	۰/۸±۰/۰۴	۰/۳±۰/۰۳
آمیلوئید بتا	۲۴/۶±۰/۰۴	۱/۹۳±۱۳/۵۵	۱۵۰±۹	۰/۷±۰/۰۴	۲/۱±۰/۰۴
سالویا هیدرانزا	۷/۴±۰/۰۴	۲/۲۷±۱۷/۵۳	۶۷±۷/۴	۰/۸±۰/۰۲	۰/۳±۰/۰۵
سالویا هیدرانزا + آمیلوئید بتا	۲۰/۷±۰/۰۵	۲/۱۲±۱۸/۷۵	۷۵±۶/۳	۱±۰/۰۳	۱/۲±۰/۰۳

تعداد موش‌ها در هر گروه، ۶ رأس می‌باشد. موش‌ها به مدت ۱۰ روز به وسیله‌ی سالویا هیدرانزا، پیش‌درمان شده و دوز ۳۰ نانوگرم/موش از آمیلوئید بتا را دریافت کردند. موش‌ها پس از ۶ روز، کشته شده و فاکتورهای فوق، ارزیابی گردید. سطح معنی‌داری با $P < ۰/۰۵$ در متن مورد آنالیز قرار گرفته است. $Mean \pm S.E.M$ در جدول بیان شده است. فعالیت کاتالاز، در موش‌های مدل آلزایمری شده با آمیلوئید بتا در مقایسه با گروه کنترل، افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). این در حالی است که پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا گردید ($P < ۰/۰۰۱$). سطح گلوکاتینون در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل، کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۵$)، در حالی که پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، موجب افزایش سطح گلوکاتینون نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا شد ($P < ۰/۰۰۱$). فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در گروه آلزایمر (حیوانات دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا)، در مقایسه با گروه کنترل (حیوانات سالم)، افزایش چشمگیری یافت ($P < ۰/۰۰۱$). این در حالی است که تجویز عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا در حیوانات آلزایمری شده، توانست فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را نسبت به گروه آلزایمری مجدداً کاهش دهد ($P < ۰/۰۰۱$). نسبت p-CREB/CREB در موش‌های آلزایمری شده، نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ولی این نسبت در موش‌های پیش‌درمان شده با عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا، افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). سطح caspase-3 در موش‌های آلزایمری شده نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$)، در حالی که پیش‌درمانی با عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا، موجب کاهش caspase-3 در مقایسه با گروه آلزایمری شد ($P < ۰/۰۰۱$).

گلوکاتینون نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا شد ($P < ۰/۰۰۱$). اختلاف گروه‌ها از نظر فعالیت استیل کولین استراز در قشر پیشانی به صورت زیر بود: در گروه آلزایمر (حیوانات دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا)، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مقایسه با گروه کنترل (حیوانات سالم)، افزایش چشمگیری یافت ($P < ۰/۰۰۱$). این در حالی است که تجویز عصاره‌ی سالویا هیدرانزا در حیوانات آلزایمری شده، موجب کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نسبت به

کاتالاز قشر، در موش‌های مدل آلزایمری شده با آمیلوئید بتا در مقایسه با گروه کنترل، افزایش یافته ($P < ۰/۰۰۱$) ولی پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا، شده است ($P < ۰/۰۰۱$).

سطح گلوکاتینون قشر در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۵$) در حالی که پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا موجب افزایش سطح

رفتار موش‌های آلزایمری شده، از آزمون احترازی غیر فعال (Passive avoidance) استفاده گردید. نتایج این آزمون که نشان‌دهنده تغییرات حافظه‌ی کوتاه مدت در طی ۲۴ ساعت می‌باشد، نشان داد که درمان با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، سبب بهبودی حافظه در موش‌های آلزایمری شده با آمیلوئید بتا شده است. همچنین، یافته‌ها نشان داد که تجویز خوراکی عصاره‌ی سالویا هیدرانزا به روش گاواژ در موش‌ها، به تنهایی سبب تغییرات در موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل نمی‌گردد. گونه‌های دیگری از گیاه سالویا هم اثرات محافظتی در برابر بیماری آلزایمر از خود نشان داده‌اند (۱۲).

به علاوه، بررسی‌های مولکولی نشان داد که عصاره‌ی سالویا هیدرانزا علاوه بر بهبود حافظه در آزمایشات رفتاری، سبب افزایش فسفوریلاسیون CREB در هیپوکمپ و کورتکس موش‌های آلزایمری شده با آمیلوئید بتا شده است. همچنین، فعال شدن CREB سبب تنظیم فعالیت استیل کولین‌استراز در بیماران آلزایمری می‌گردد (۲۴). یافته‌ها نشان می‌دهند که کلوروژنیک اسید و فلوریک اسید، به عنوان دو ماده‌ی مهم در سالویا هیدرانزا، سبب کاهش فعالیت استیل کولین‌استراز می‌شوند (۲۵ و ۲۶). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که عصاره‌ی سالویا هیدرانزا سبب کاهش فعالیت استیل کولین‌استراز شده و فسفوریلاسیون CREB را در سلول‌های هیپوکمپ، افزایش داده و از این طریق سبب بهبود حافظه می‌گردد. گروه دریافت‌کننده‌ی سالویا هیدرانزا به تنهایی در مطالعات مولکولی، تغییر خاصی نسبت به گروه کنترل نداشته است. این مسأله نشان می‌دهد که عصاره‌ی سالویا هیدرانزا به تنهایی نمی‌تواند اثرات تخریبی داشته باشد. همچنین مطالعه‌ی اولیه که به منظور انتخاب دوز صورت گرفته بود، هیچگونه سمیتی در دوزهای بالاتر از خود نشان نداد.

علاوه بر این، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی کاتالاز و گلوتاتیون در هیپوکمپ و کورتکس پیشانی نشان داد که درمان با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، سبب افزایش فعالیت کاتالازی می‌گردد، به نحوی که این افزایش فعالیت هیپوکمپ نسبت به کورتکس، بیشتر به چشم می‌خورد. با این وجود، هر دو ناحیه‌ی کورتکس و هیپوکمپ، دارای فعالیت گلوتاتیون زیادی بوده و در نتیجه، اختلاف‌های مشاهده شده در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، می‌تواند به علت خصوصیات مربوط به سلول‌های هر ناحیه از مغز باشد. خواص آنتی‌اکسیدانتی این گیاه، توسط اسدی و همکارانش مورد بررسی قرار گرفته و مشخص گردید که این گیاه به تنهایی،

گروه آلزایمری گردید ($P < 0.001$). نسبت p-CREB/CREB در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته و این نسبت در موش‌های پیش‌درمانی شده با عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی آمیلوئید بتا، افزایش یافت ($P < 0.001$). سطح caspase-3 قشر در موش‌های مدل آلزایمری نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.001$) و پیش‌درمانی با عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا، موجب کاهش caspase-3 در مقایسه با گروه آلزایمری شد ($P < 0.001$).

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، با تزریق آمیلوئید بتا در ناحیه‌ی هیپوکمپ موش به عنوان مدل ایجاد آلزایمر، اثرات محافظت نورونی عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که نتایج نشان داد، پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا در موش‌های آلزایمری شده، موجب افزایش زمان ورود به قسمت تاریک دستگاه شاتل باکس و کاهش تعداد دفعات خطا گردید. همچنین، از دیگر اثرات مطلوب این عصاره، باید به افزایش سطح گلوتاتیون در موش‌های پیش‌درمان شده‌ای که آمیلوئید بتا دریافت کرده بودند، اشاره کرد. علاوه بر این، سطح فسفوریلاسیون CREB در موش‌های پیش‌درمان شده با عصاره، افزایش چشمگیری پیدا کرد. یکی دیگر از نشانه‌های اثربخشی این عصاره در پیشگیری از بیماری آلزایمر، توانایی آن در کاهش سطح caspase-3 در موش‌های پیش‌درمان شده نسبت به گروه آلزایمری که عصاره دریافت نکردند، می‌باشد.

استخراج به وسیله‌ی متانول، بهترین روش برای به دست آوردن ترکیبات فنولی می‌باشد. به همین دلیل، عصاره‌ی متانولی گیاه مورد استفاده قرار گرفت. عناصر فنولی موجود در سالویا هیدرانزا، سبب از بین رفتن گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند (۱۷). این عناصر فنولی، دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی قوی می‌باشند. مطالعات نشان داده‌اند که این فنول‌ها سبب افزایش گسترش نورونی و حفاظت نورونی می‌گردند (۱۸ و ۱۹). وانلیک اسید نیز دارای خواص ضد التهابی در برابر استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲۳-۲۰). با توجه به این شواهد، می‌توان انتظار داشت که به دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی در عصاره‌ی گیاه سالویا هیدرانزا، عصاره‌ی این گیاه بتواند سبب پیشگیری از اختلال حافظه گردد.

به همین منظور و برای نشان دادن اثر عصاره‌ی گیاه بر

هیچ‌گونه اثر سمی روی سلول‌های عصبی ندارد (۲۷).

در آخر، میزان آپوپتوز به وسیله‌ی اندازه‌گیری سطح caspase-3 در هر دو ناحیه، انجام شد. این بررسی نشان داد که پیش‌درمانی با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا، سبب کاهش سطح caspase-3 در نواحی هیپوکمپ و کورتکس پیشانی در موش‌های آلزایمری، می‌شود. درمان با عصاره‌ی سالویا هیدرانزا نمی‌تواند میزان caspase-3 را به اندازه‌ی گروه کنترل و یا گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی سالویا هیدرانزا به تنهایی، افزایش دهد. با این وجود، سطح caspase-3 در گروه درمان، کمتر از گروه آلزایمری می‌باشد. این امر، در رابطه با فاکتورهای اندازه‌گیری شده‌ی کاتالاز و گلوکاتایون هم صادق می‌باشد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که عصاره‌ی سالویا هیدرانزا می‌تواند خواص سمی ناشی از تزریق آمیلوئید بتا را در موش‌ها کاهش داده و از طریق مکانیسم‌های مولکولی نظیر افزایش فسفوریلاسیون CREB و مهار استیل‌کولین‌استراز، سبب بهبود حافظه شود. این روند بهبود حافظه را می‌توان به اجزای فنولی مهم موجود در این گیاه مربوط دانست. همچنین، خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه، موجب مهار

آپوپتوز در سلول‌های هیپوکمپ و کورتکس می‌شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این بررسی، می‌توان سالویا هیدرانزا را به دلیل داشتن پتانسیل قوی در مهار تخریب نورونی ناشی از آمیلوئید بتا، به عنوان یک ترکیب پیشنهادی، در پیشگیری و درمان بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله آلزایمر، در نظر گرفت. مطالعه‌ی حاضر، خواص پیشگیرانه‌ی گیاه را نشان می‌دهد و خواص این گیاه را می‌توان پس از تزریق آمیلوئید بتا نیز بررسی کرد. بررسی‌های دقیق‌تر بر گیاه سالویا هیدرانزا و اجزای تشکیل‌دهنده‌ی آن، می‌تواند گزینه‌ی مناسبی در مطالعات بالینی و ساخت دارو به منظور درمان بیماری آلزایمر باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه شهید بهشتی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

REFERENCES

1. Lindeboom J, Weinstein H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. *Eur J Pharmacol* 2004;490:83–6.
2. Yatin SM, Varadarajan S, Link CD, Butterfield DA. In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1–42). *Neurobiol Aging* 1999;20:325–30.
3. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81:741–66.
4. Bi HC, Zuo Z, Chen X, Xu CS, Wen YY, Sun HY, *et al.* Preclinical factors affecting the pharmacokinetic behaviour of tanshinone IIA, an investigational new drug isolated from *Salvia miltiorrhiza* for the treatment of ischaemic heart diseases. *Xenobiotica* 2008;38:185–222.
5. Hu S, Chen SM, Li XK, Qin R, Mei ZN. Antitumor effects of chi-shen extract from *Salvia miltiorrhiza* and *Paeoniae radix* on human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:1215–23.
6. Wu BW, Pan TL, Leu YL, Chang YK, Tai PJ, Lin KH, *et al.* Antiviral effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against enterovirus 71. *Am J Chin Med* 2007;35:153–68.
7. Esmaeili MA, Sonboli A. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food Chem Toxicol* 2010;48:846–53.
8. Eidi M, Eidi A, Bahar M. Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition* 2006;22:321–6.
9. Mei Z, Zhang F, Tao L, Zheng W, Cao Y, Wang Z, *et al.* Cryptotanshinone, a compound from *Salvia miltiorrhiza* modulates amyloid precursor protein metabolism and attenuates beta-amyloid deposition through upregulating alpha-secretase in vivo and in vitro. *Neurosci Lett* 2009;452:90–5.
10. Kennedy DO, Pace S, Haskell C, Okello EJ, Milne A, Scholey AB. Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:845–52.
11. Firuzi O, Javidnia K, Gholami M, Soltani M, Miri R. Antioxidant activity and total phenolic content of 24 Lamiaceae species growing in Iran. *Nat Prod Commun* 2010;5:261–4.

12. Foolad F, Khodagholi F. Dietary supplementation with *Salvia sahendica* attenuates acetylcholinesterase activity and increases mitochondrial transcription factor A and antioxidant proteins in the hippocampus of amyloid beta-injected rats. *J Pharm Pharmacol* 2013;65:1555–62.
13. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. New York: Academic Press; 2007.
14. Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Ishihara N, Matsumoto K, *et al*. Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:1354–65.
15. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88–95.
16. Abei H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
17. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
18. Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 1996;24:790–5.
19. Sul D, Kim HS, Lee D, Joo SS, Hwang KW, Park SY. Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sci* 2009;84:257–62.
20. Ito H, Sun XL, Watanabe M, Okamoto M, Hatano T. Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:885–8.
21. Huang SM, Chuang HC, Wu CH, Yen GC. Cytoprotective effects of phenolic acids on methylglyoxal-induced apoptosis in Neuro-2A cells. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:940–9.
22. Huang SM, Hsu CL, Chuang HC, Shih PH, Wu CH, Yen GC. Inhibitory effect of vanillic acid on methylglyoxal-mediated glycation in apoptotic Neuro-2A cells. *Neurotoxicology* 2008;29:1016–22.
23. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Kobayashi M, Tamesada M, *et al*. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2009;32:1215–9.
24. Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993;41:31–91.
25. Clifford MN, Wu W, Kirkpatrick J, Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MSn. *J Agric Food Chem* 2007;55:929–36.
26. Clifford MN, Zheng W, Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC-MS(n). *Phytochem Anal* 2006;17:384–93.
27. Asadi S, Ahmadiani A, Esmaeili MA, Sonboli A, Ansari N, Khodagholi F. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1341–9.