

## **The influence of Hesperidin on memory, learning and oxidative stress parameters in rat model of uteroplacental insufficiency**

Abdollahi H<sup>1</sup>, Edalatmanesh MA<sup>1\*</sup>, Hosseini SE<sup>1</sup>, Forouzanfar M<sup>2</sup>

1- Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, I.R. Iran.

2- Department of Biology, College of Sciences, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, I.R. Iran.

Received: 2020/09/18 | Accepted: 2021/01/24

### **Abstract:**

**Background:** Uteroplacental Insufficiency (UPI) causes impaired fetal brain development and induces oxidative stress, which ultimately leads to intrauterine growth restriction. Due to the antioxidant properties of Hesperidin (HES), the study aimed to outcome this compound on cognitive impairment and serum level of catalase, antioxidant capacity of total and malondialdehyde following uterine-placental insufficiency in rats.

**Materials and Methods:** Thirty pregnant Wistar rats were randomly divided into 5 groups: control group, UPI+NS (Uteroplacental insufficiency+normal saline), UPI+HES25 (Uteroplacental insufficiency+Hesperidin 25 mg/kg), and UPI+HES50 (Uteroplacental insufficiency+Hesperidin 50mg/kg), UPI+HES100 (Uteroplacental insufficiency+ Hesperidin 100mg/kg). UPI was induced by obstruction of the anterior uterine arteries on day 18 of gestation. Hesperidin or normal saline gavage was performed from day 12 to 18 of gestation. Evaluation of working memory, avoidant learning and anxiety-like behaviors and then evaluation of serum levels of catalase, total antioxidant capacity and malondialdehyde content were performed in one-month-old pups.

**Results:** There was a significant decrease in working and avoidance memory, catalase levels, total antioxidants capacity with increased levels of anxiety and malondialdehyde in the UPI+NS group compared to the control group ( $P<0.05$ ). While in the HES-treated groups, there was a significant increase in working and avoidance memory, catalase level and total antioxidant capacity with a decrease in anxiety and malondialdehyde levels compared to the UPI+NS group ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** Hesperidin can improve memory and cognitive impairments in the model of uterine-placental insufficiency of rats by reducing oxidative stress damage.

**Keywords:** Intrauterine growth retardation, Hesperidin, Oxidative stress, Anxiety, Memory-short term, Rat

### **\*Corresponding Author**

**Email:** amin.edalatmanesh@gmail.com

**Tel:** 0098 939 633 5040

**Fax:** 0098 713 641 0059

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2021; Vol. 25, No 1, Pages 704-713*

*Please cite this article as:* Abdollahi H, Edalatmanesh MA, Hosseini SE, Forouzanfar M. The effect of Hesperidin on memory, learning and oxidative stress parameters in rat model of uteroplacental insufficiency. *Feyz* 2021; 25(1): 704-13.

# اثر هسپریدین بر حافظه، یادگیری و پارامترهای استرس اکسیداتیو در مدل موش صحرایی دارای نارسایی رحمی - جفتی

حامد عبدالمهی<sup>۱</sup>، محمدامین عدالت‌منش<sup>۱\*</sup>، سید ابراهیم حسینی<sup>۱</sup>، محسن فروزان‌فر<sup>۲</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** نارسایی رحمی - جفتی (UPI)، سبب اختلال در تکامل مغز جنین و القای استرس اکسیداتیو می‌شود که در نهایت منجر به بروز محدودیت رشد درون‌رحمی می‌گردد. با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی هسپریدین، مطالعه حاضر به ارزیابی تأثیر این ترکیب بر اختلالات شناختی و سطح سرمی آنزیم کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و میزان مالون‌دی‌آلدید متعاقب نارسایی رحمی - جفتی در موش صحرایی پرداخته است.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۳۰ سر موش صحرایی بارداری نژاد ویستار به صورت تصادفی در ۵ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، UPI+NS (نارسایی رحمی - جفتی + نرمال‌سالین)، UPI+HES25 (نارسایی رحمی - جفتی + هسپریدین ۲۵ mg/kg)، UPI+HES50 (نارسایی رحمی - جفتی + هسپریدین ۵۰ mg/kg)، UPI+HES100 (نارسایی رحمی - جفتی + هسپریدین ۱۰۰ mg/kg). با انسداد شریان‌های قدامی رحمی در روز ۱۸ بارداری UPI القا شد. گاوآژ هسپریدین یا نرمال‌سالین از روز ۱۲ تا ۱۸ بارداری انجام شد. ارزیابی حافظه کاری، یادگیری اجتنابی و رفتارهای شبه‌اضطرابی و سپس بررسی سطح سرمی کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مالون‌دی‌آلدید در نوزادان یک‌ماهه انجام شد.

**نتایج:** کاهش معنی‌دار در حافظه کاری و اجتنابی، سطح کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام به همراه افزایش سطح اضطراب و مالون‌دی‌آلدید در گروه UPI+NS نسبت به گروه کنترل دیده شد ( $P < 0/05$ ). در حالی که در گروه‌های تیمار شده با هسپریدین، افزایش معنی‌دار حافظه کاری و اجتنابی، سطح کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و کاهش سطوح اضطراب و مالون‌دی‌آلدید نسبت به گروه UPI+NS مشاهده شد ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** هسپریدین می‌تواند با کاهش آسیب استرس اکسیداتیو، سبب بهبود حافظه و اختلالات شناختی در مدل نارسایی رحمی - جفتی موش‌های صحرایی شود.

**واژگان کلیدی:** محدودیت رشد درون‌رحمی، هسپریدین، استرس اکسیداتیو، اضطراب، حافظه کوتاه‌مدت، موش صحرایی

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۱، فرودین - اردیبهشت ۱۴۰۰، صفحات ۷۱۳-۷۰۴

## مقدمه

در واقع UPI مدلی از محدودیت رشد داخل‌رحمی است که عوامل گوناگونی، از قبیل: اختلال جریان‌های خونی - رحمی، استفاده از الکل و دخانیات در دوران بارداری و همچنین برخی بیماری‌ها مانند فشارخون مزمن و پره‌اکلامپسی در ایجاد آن نقش دارند [۳]. کاهش جریان خون جفت و متعاقب آن کاهش میزان دریافت مواد مغذی و اکسیژن، بر روی مغز در حال تکوین جنین اثرات مخربی دارد. نوزادان تحت‌تأثیر IUGR عموماً دارای عقب‌ماندگی رشد و اختلالات عصبی هستند [۴]. از جمله عوارض شایع IUGR می‌توان به اختلال در حافظه کاری، حافظه شناختی، عملکردهای فضایی - دیداری و اختلالات رفتاری اشاره کرد [۵]. کاهش مقدار اکسیژن دریافتی و بروز هایپوکسی می‌تواند سبب ایجاد استرس اکسیداتیو، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و بروز اختلالات جدی در جنین شود [۶]. در شرایط طبیعی فیزیولوژیک، بین تولید رادیکال‌های آزاد و مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان سلولی، تعادل برقرار است. زمانی که این تعادل از بین برود، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود [۷]. رادیکال‌های آزاد، مولکول‌هایی با نیمه‌عمر کوتاه هستند و

محدودیت رشد داخل‌رحمی (IUGR)، عارضه‌ای چندعاملی است و سبب می‌شود تا جنین در رسیدن به پتانسیل رشد کامل خود ناکام بماند. محدودیت رشد داخل‌رحمی در ۵ تا ۱۰ درصد از بارداری‌ها رخ می‌دهد و عمدتاً ناشی از اختلال در خون‌رسانی به جنین است [۱]. این عارضه تحت‌تأثیر عوامل مختلفی از جمله تغییر جریان خون مادری یا جنینی و یا اختلالات جفتی همچون افزایش ضخامت جفت پدید می‌آید [۲].

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

## \* نشانی نویسنده مسئول:

شیراز، صدرا، پردیس دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۳۹۶۳۳۵۰۴۰ | دورنویس: ۰۷۱۳۶۴۱۰۰۵۹

پست الکترونیک: amin.edalatmanesh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۲۸ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۱/۵

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، رعایت اصول اخلاقی طبق قوانین بین‌المللی و ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز (کد اخلاق: IR.IAUSHIRAZ.1397.17.25) صورت گرفت و از نوزادان حاصل از جفت‌گیری ۳۰ سر موش صحرایی ماده دست‌نخورده نژاد ویستار با میانگین وزنی  $190 \pm 10$  گرم و سن تقریبی یک‌ماهه و ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ استفاده شد. حیوانات از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردیدند و پس از انتقال به آزمایشگاه تخصصی علوم جانوری دانشگاه آزاد اسلامی شیراز به منظور سازگاری با شرایط جدید، به مدت یک‌هفته در محیط استاندارد نگهداری شدند. تمامی مراحل کار با حیوانات، در شرایط استاندارد دما ( $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی ۵۵-۶۵ درصد و چرخه روشنایی / تاریکی ۱۲ ساعته انجام شد. پس از هم‌قفس شدن موش‌های صحرایی نر و ماده، به‌منظور اطمینان از وقوع بارداری، صبح روز بعد مقداری از اسمیر واژنی بر روی یک لام منتقل و با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و بزرگنمایی  $40 \times$  بررسی شد. در صورت مشاهده اسپرما توزوآ در اسمیر واژنی، آن روز به‌عنوان روز صفر بارداری تعیین گردید. سپس موش‌های صحرایی باردار به‌صورت تصادفی در ۵ گروه ۶تایی تقسیم شدند: گروه کنترل سالم (بر روی این گروه هیچ‌گونه جراحی و تیماری انجام نشد)، گروه UPI+NS (القای UPI به‌وسیله انسداد کامل شریان‌های فوقانی رحم در روز ۱۸ بارداری و گاوآژ نرمال‌سالین از روز ۱۲ تا ۱۸ بارداری) و گروه‌های UPI+HES25، UPI+HES50 و UPI+HES100 (القای UPI به‌وسیله انسداد کامل شریان‌های رحمی در روز ۱۸ بارداری، تیمار با هسپریدین به روش گاوآژ به‌ترتیب با دوزهای ۲۵ mg/kg، ۵۰ و ۱۰۰ وزن بدن حیوان از روز ۱۲ تا ۱۸ بارداری). شرایط گاوآژ هسپریدین (Sigma, USA) و نرمال‌سالین برای تمام گروه‌های تیماری یکسان بود و بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح انجام شد. با تولد نوزادان و با توجه به مرده‌زایی در برخی از مادرانی که تحت جراحی UPI قرار داشتند، از مجموع تقریباً ۳۰-۲۵ سر نوزاد نر، ۱۵ نوزاد (دو تا سه نوزاد نر از هر مادر) به‌طور تصادفی انتخاب شدند. در گروه کنترل سالم نیز همین تعداد نوزاد نر مورد استفاده قرار گرفت. نوزادان در ۲۴ روزگی از شیر گرفته شدند و در ۳۰ روزگی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

القای نارسایی رحمی - جفتی (UPI)

در روز ۱۸ بارداری به‌منظور القای UPI، موش‌های صحرایی ماده باردار با مخلوطی از دو ماده کتامین ( $50 \text{ mg/kg}$ ) و

واکنش‌پذیری بالایی دارند؛ بنابراین، فاقد رفتار اختصاصی هستند و تعیین مستقیم تولید آن‌ها دشوار است. از این‌رو برای تشخیص آسیب اکسیداتیو از اندازه‌گیری محصولات ثانویه‌ای همچون مالون‌دی‌آلدهید (MDA) استفاده می‌شود. همچنین می‌توان با اندازه‌گیری سطح شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در سرم، میزان بروز استرس اکسیداتیو را مورد ارزیابی قرار داد [۸]. از شاخص‌ترین سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌توان به کاتالاز (CAT)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اشاره کرد [۹]. آنتی‌اکسیدان‌ها، می‌توانند رادیکال‌های آزاد را غیرفعال و از فرآیند اکسیداسیون جلوگیری کنند و در نهایت اثرات مخرب آن را کاهش دهند [۱۰]. هسپریدین با فرمول مولکولی  $C_{28}H_{34}O_{15}$  یکی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است. هسپریدین یکی از ترکیباتی است که به وفور در مرکباتی نظیر گریپ‌فروت، لیمو و پرتقال یافت می‌شود [۱۱]. طی سال‌های اخیر، اثرات بیولوژیک و فارماکولوژیک هسپریدین مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. ویژگی مهم هسپریدین خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن است که سبب کاهش استرس اکسیداتیو و ربایش رادیکال‌های آزاد می‌شود که در نهایت موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ذکرشده، می‌گردد [۱۲]. هسپریدین با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی، سبب حفاظت نورونی می‌گردد و در نتیجه در پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مؤثر است [۱۳]. از شاخص‌ترین مکانیسم‌های متعدد محافظت نورونی هسپریدین می‌توان به ممانعت از تشکیل گونه‌های واکنشی اکسیژن، کاهش آسیب غشا و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد [۱۴]. از طرفی نتایج مطالعات اخیر نشان داده است که ترکیباتی همچون هسپریدین در جلوگیری از بروز بیماری‌های مزمن و تحلیل‌برنده عصبی، مانند آلزایمر و MS مؤثر است و یا دست‌کم می‌تواند شروع آن‌ها را به تأخیر بیندازد [۱۵]. با توجه به این‌که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با منشأ گیاهی همچون هسپریدین، غیرسمی، غیرآلرژیک و فاقد عوارض جانبی هستند [۱۶]، این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای برای استفاده هرچه بیشتر از آن‌ها برای مقابله با اثرات مخرب استرس اکسیداتیو به‌ویژه در دوره بارداری و بر روی جنین باشد. به همین‌منظور در مطالعه حاضر به بررسی اثر هسپریدین بر سطح سرمی شاخص‌های کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مالون‌دی‌آلدهید و همچنین به بررسی اختلالات شناختی - رفتاری ناشی از نارسایی رحمی - جفتی در موش‌های صحرایی پرداخته شده است.

اثر هسپریدین بر حافظه، یادگیری و پارامترهای استرس، ...

گرفتن در بازوی بسته دارند و افزایش ورود به بازوهای باز و مدت زمان سپری شده در آن، به عنوان شاخص کاهش اضطراب در موش تلقی می‌شود [۱۹].

روش ارزیابی حافظه کاری

برای سنجش حافظه کاری از آزمون ماز Y در ۳۰ روزگی استفاده شد. این ماز از سه بازو با شرایط یکسان شبیه به حرف Y تشکیل شده است. ابتدا حیوان به آرامی و بدون استرس در یکی از سه بازو قرار داده شد و حرکات آن به مدت پنج دقیقه مشاهده و تعداد دفعاتی که حیوان وارد هر کدام از بازوها شد، ثبت گردید. ورود هر حیوان به داخل یک بازو زمانی است که پاهای عقبی حیوان به طور کامل در داخل بازو قرار گیرد. برای تعیین میزان حافظه کاری، درصد رفتارهای تناوبی از حاصل جمع ورودهای موفق تقسیم بر ورودی‌های کل بازو منهای ۲ ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید. منظور از ورودهای موفق، ورودهای متناوب و سریالی در هر سه بازو می‌باشد [۲۰].

روش ارزیابی سطوح سرمی کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مالون‌دی‌آلدهید

به منظور بررسی شاخص‌های سرمی استرس اکسیداتیو از قلب موش‌های یک‌ماهه خونگیری صورت گرفت و پس از لخته شدن خون در دمای محیط، با استفاده از سانتریفیوژ (Hettich, Germany) با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه نسبت به جداسازی سرم اقدام شد. جهت اندازه‌گیری سطوح سرمی کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام از کیت ۹۶ تایی (ZellBio, Germany) استفاده شد و طبق دستورالعمل‌های هر کیت، مراحل آزمایش گام به گام صورت گرفت. همچنین سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید بر پایه واکنش با تیوباربیتریک اسید (Merck, Germany)، اندازه‌گیری جذب با روش طیف‌سنجی و مقایسه جذب با منحنی استاندارد انجام شد. اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید با حل کردن ۵۰۰ میکرولیتر سرم در ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۱٪ آغاز شد. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتریک اسید ۰/۶۷ درصد به لوله آزمایش اضافه و پس از آن مقدار ۲ میلی‌لیتر بوتانل نرمال افزوده و به مدت ۱ الی ۲ دقیقه مخلوط گردید. با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۵۳۵ نانومتر، غلظت مالون‌دی‌آلدهید سرمی تعیین شد [۲۱].

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های موردنظر، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA و تست تعقیبی توکی استفاده گردید. از نظر آماری مقادیر  $P < 0/05$ ، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

زایلازین (۵mg/kg) بیهوش شدند. پس از جراحی لاپراتومی و نمایان شدن شاخ‌های رحمی، شریان‌های راست و چپ فوقانی رحم به طور کامل به کمک الکتروکوتر سوزانده شدند؛ به گونه‌ای که هیچ جریان خونی پس از انسداد شریان برقرار نشود. سپس، ناحیه جراحی به کمک نخ ابریشم ۳-۰ بخیه شد [۱۷]. برای جلوگیری از عفونت احتمالی، میزان ۵۰۰۰ واحد بر کیلوگرم وزن بدن حیوان، پنی‌سیلین به صورت تزریق عمیق عضلانی به عضله گاستروکنمیوس تزریق گردید. پس از بیهوش آمدن، حیوانات به مدت ۲۴ ساعت تحت نظارت و مراقبت بودند. به حیوانات تمام گروه‌ها اجازه داده شد تا دوره بارداری خود را بطور کامل، سپری و نوزادان خود را به صورت طبیعی زایمان کنند. نوزادان تا یک‌ماهگی در شرایط طبیعی و استاندارد نزد مادر خود قرار داشتند.

ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال در نوزادان

پس از رسیدن نوزادان به سن سی‌روزگی به منظور بررسی حافظه اجتنابی غیرفعال در آن‌ها از دستگاه شاتل‌باکس، شامل دو محفظه روشن و تاریک که میان آن یک در گیوتینی قرار دارد، استفاده شد. این آزمون شامل سه مرحله اصلی است: الف) مرحله سازش: به منظور سازگاری حیوانات با محیط انجام شد. به این صورت که ابتدا حیوان در محیط روشن قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه در گیوتینی باز گردید و به مدت پنج دقیقه به حیوان اجازه داده شد که آزادانه در هر دو قسمت تاریک و روشن رفت‌وآمد کند. پس از سپری شدن این زمان مجدداً حیوان به قفس خود برگردانده شد. ب) مرحله اکتساب (آموزش): ۲۴ ساعت پس از مرحله سازش، حیوان در محیط روشن قرار گرفت. پس از ۳۰ ثانیه در گیوتینی باز شد و با ورود حیوان به محیط تاریک، در بسته شد و جریان الکتریکی به میزان ۲ میلی‌آمپر، به مدت ۲ ثانیه و فرکانس ۵۰ هرتز به حیوان وارد گردید. ۲۰ ثانیه پس از شوک الکتریکی، حیوان از دستگاه برداشته و به قفس منتقل شد. ج) مرحله به خاطرآوری (آزمون): ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مرحله اکتساب، حیوان در محیط روشن قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه در گیوتینی باز شد و مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک و کل زمان سپری شده در آن در بازه زمانی پنج دقیقه ثبت گردید [۱۸]. طولانی‌تر بودن تأخیر اولیه ورود به محفظه تاریک (Latency) در مرحله آزمون نشانه یادگیری بهتر است.

روش ارزیابی رفتارهای شبه‌اضطرابی

برای سنجش رفتار شبه‌اضطرابی از ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع استفاده شد. این دستگاه شامل دو بازوی باز و دو بازوی بسته است. در این آزمون، به مدت پنج دقیقه زمان حضور حیوان در بازوی باز ارزیابی و ثبت شد. چونندگان به طور معمول تمایل به قرار

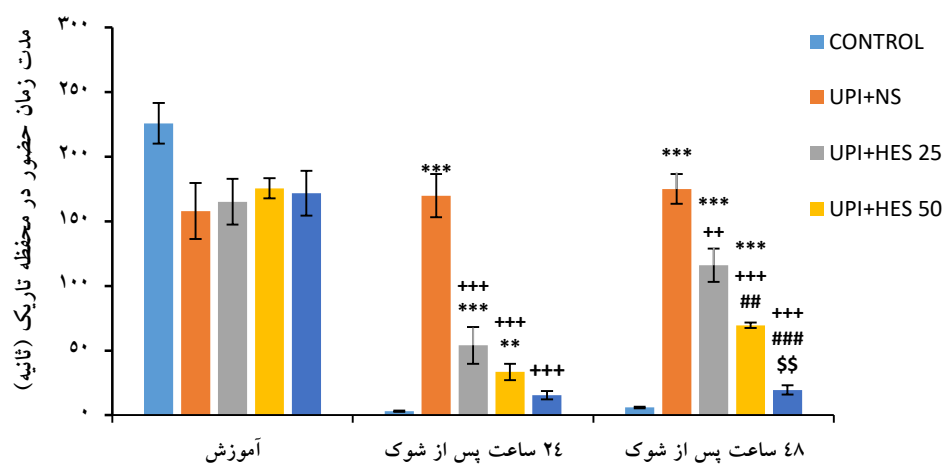
## نتایج

ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال

مدت زمان حضور در محفظه تاریک

نتایج به دست آمده نشان داد که مدت زمان حضور در محفظه تاریک آزمون شاتل در روز آموزش در بین گروه‌های حاضر در این مطالعه با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارد. در حالی که ۲۴ ساعت پس از شوک، مدت زمان حضور در محفظه تاریک در گروه کنترل کاهش معنی داری نسبت به گروه‌های UPI+NS، UPI+HES25 و UPI+HES50 از خود نشان داد ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ). همچنین، در گروه UPI+NS افزایش معنی داری در مقایسه با هر

سه گروه تیمار شده با هسپریدین دیده شد ( $P < 0.001$ ). ۴۸ ساعت پس از شوک، گروه‌های UPI+NS، UPI+HES25 و UPS+HES50 نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان دادند ( $P < 0.001$ ). همچنین، کاهش معنی داری در گروه‌های تیمار شده با هسپریدین نسبت به گروه UPI+NS دیده شد ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ) (نمودار شماره ۱). گروه UPI+HES25 در مقایسه با گروه‌های UPI+HES50 ( $P < 0.01$ ) و UPI+HES100 ( $P < 0.001$ ) افزایش معنی داری داشت و نیز در گروه UPI+HES100 نسبت به گروه UPI+HES50 کاهش معنی داری دیده شد ( $P < 0.01$ ).

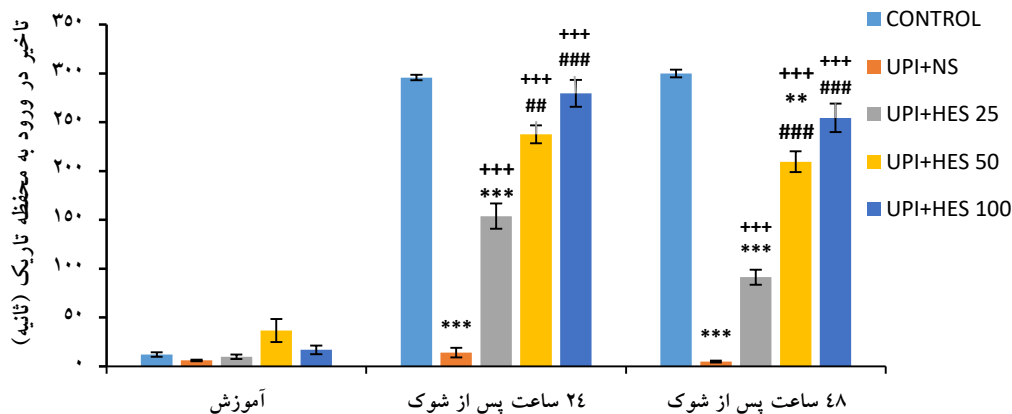


نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد مدت زمان حضور در محفظه تاریک در گروه‌های مورد مطالعه. ( $P < 0.001$  و  $P < 0.05$ ): اختلاف با گروه کنترل، ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ): اختلاف با گروه UPI+NS، ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ): اختلاف با گروه UPI+HES25، ( $P < 0.01$ ): اختلاف با گروه UPI+HES50.

تأخیر در ورود به محفظه تاریک

بررسی نتایج تأخیر در ورود به محفظه تاریک در روز آموزش، تفاوت معنی داری را بین گروه‌های مورد مطالعه نشان نداد. در حالی که ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شوک، گروه‌های UPI+NS و UPI+HES25 نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان دادند ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ). علاوه بر این، در هر دو بازه

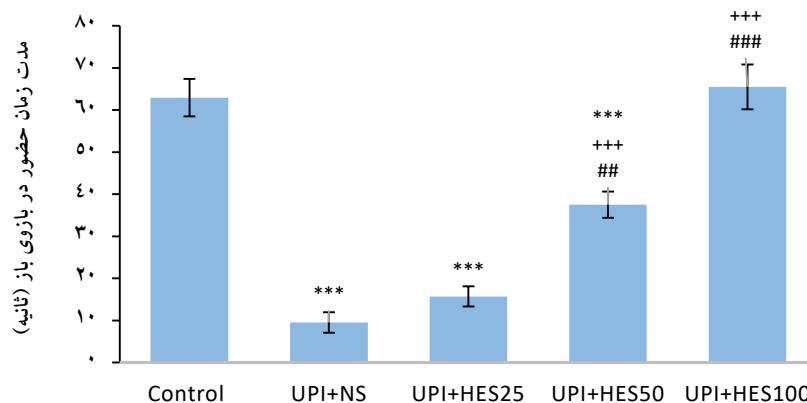
زمانی پس از شوک و در مقایسه با گروه UPI+NS، تمامی گروه‌های تیمار شده با هسپریدین افزایش معنی داری را در مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک از خود نشان دادند ( $P < 0.001$ ). افزایش معنی داری بین گروه‌های UPI+HES50 و UPI+HES100 در مقایسه با گروه UPI+HES25 دیده شد ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد تأخیر در ورود به محفظه تاریک. ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ): اختلاف با گروه کنترل، ( $P < 0.001$ ): اختلاف با گروه UPI+NS، ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ): اختلاف با گروه UPI+HES25

رفتار شبه اضطرابی  
ارزیابی زمان سپری شده در بازوی باز  
نتایج این مطالعه نشان داد که مدت زمان حضور در بازوی باز مرتفع صلیبی در گروه‌های UPI+NS، UPI+HES25 و UPI+HES50 نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کمتر بود ( $P < 0.001$ ). علاوه بر این، در مقایسه با گروه UPI+NS، گروه‌های UPI+HES50 و UPI+HES100 اختلاف معنی دار دیده شد ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ) (نمودار شماره ۳).

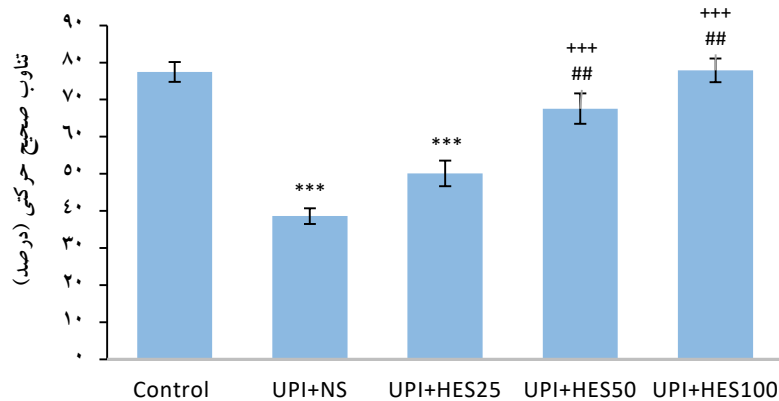
گروه‌های UPI+HES50 و UPI+HES100 افزایش معنی داری را در مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک از خود نشان دادند ( $P < 0.001$ ). همچنین، بین گروه UPI+HES25 با گروه‌های UPI+HES50 و UPI+HES100 اختلاف معنی دار دیده شد ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد مدت زمان باقی ماندن در بازوی باز با علاوه مرتفع در گروه‌های مختلف. ( $P < 0.001$ ): اختلاف با گروه کنترل. ( $P < 0.001$ ): اختلاف با گروه UPI+NS، ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ): اختلاف با گروه UPI+HES25

ارزیابی حافظه کاری  
نتایج حاصل از درصد تناوب صحیح حرکتی در ماز Y در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که در گروه‌های UPI+NS و UPI+HES25 کاهش معنی دار است ( $P < 0.001$ ). همچنین، درصد تناوب حرکتی در گروه‌های UPI+HES50 و UPI+HES100 در مقایسه با گروه UPI+NS افزایش معنی دار نشان دادند ( $P < 0.01$ ) (نمودار شماره ۴).

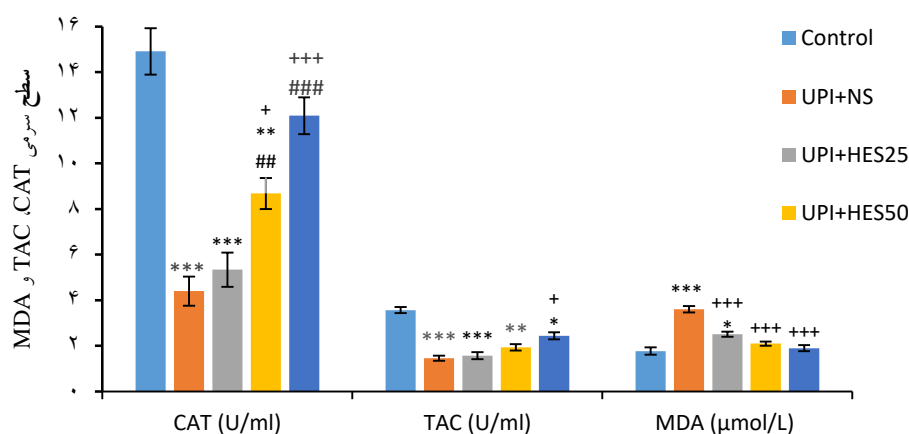
گروه UPI+HES100 در مقایسه با گروه UPI+NS افزایش معنی داری داشت ( $P < 0.001$ ). همچنین، گروه‌های UPI+HES50 و UPI+HES100 در مقایسه با گروه UPI+HES25 افزایش معنی دار نشان دادند ( $P < 0.01$ ) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴- مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد درصد تناوب صحیح حرکتی در ماز Y در گروه‌های مختلف. ( $P < 0.001$ ): اختلاف با گروه کنترل، ( $P < 0.001$ ): اختلاف با گروه UPI+NS، ( $P < 0.001$ ): اختلاف با گروه UPI+HES25

( $P < 0.001$  و  $P < 0.001$ ) همچنین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ( $P < 0.001$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$ ). با این حال، تنها بین گروه‌های UPI+NS و UPI+HES100 تفاوت معنی‌داری دیده شد ( $P < 0.05$ ). در ارزیابی نتایج سطح مالون‌دی‌آلدهید سرمی، گروه‌های UPI+NS و UPI+HES25 نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0.001$  و  $P < 0.05$ ). همچنین، در تمامی گروه‌های تیمار شده با هسپریدین در مقایسه با گروه UPI+NS، افزایش معنی‌داری دیده شد ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۵).

ارزیابی سطوح سرمی کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مالون‌دی‌آلدهید  
ارزیابی نتایج این مطالعه نشان داد که سطح سرمی آنزیم کاتالاز (CAT) در گروه‌های UPI+NS، UPI+HES25 و UPI+HES50 نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشت ( $P < 0.001$  و  $P < 0.01$ ). در حالی‌که در مقایسه با گروه UPI+NS، گروه‌های UPI+HES50 و UPI+HES100 افزایش معنی‌داری در سطح سرمی آنزیم کاتالاز از خود نشان دادند ( $P < 0.001$  و  $P < 0.05$ ). در بین گروه‌های تیمار با هسپریدین، گروه‌های UPI+HES50 و UPI+HES100 در مقایسه با گروه UPI+HES25 سطح سرمی بالاتری از آنزیم کاتالاز داشتند



نمودار شماره ۵- مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد سطوح سرمی MDA، TAC، CAT در گروه‌های مختلف. ( $P < 0.001$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$ ): اختلاف با گروه کنترل، ( $P < 0.001$  و  $P < 0.05$ ): اختلاف با گروه UPI+NS، ( $P < 0.001$  و  $P < 0.05$ ): اختلاف با گروه UPI+HES25

## بحث

مکانیسم این عمل به‌خوبی برای ما روشن نیست، اما احتمالاً هسپریدین با بالا بردن بیان فاکتور-2 Nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf<sub>2</sub>) منجر به افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد [۲۹]. استرس اکسیداتیو مزمن، قسمت‌هایی از مغز مانند هیپوکامپ، آمیگدال و کورتکس پره‌فرونتال را تحت تأثیر قرار می‌دهد که این نواحی در اضطراب و اختلالات ناشی از آن نقش دارند [۳۰]. کاهش انتقال عوامل سروتونرژیک در کورتکس پره‌فرونتال باعث اختلالات شناختی، افسردگی و اضطراب می‌شود. افزایش رفتارهای شبه‌اضطرابی و شبه‌افسردگی می‌تواند در ارتباط با عدم کارکرد صحیح انتقال عصبی سروتونرژیک در کورتکس پره‌فرونتال و سیستم لیمبیک باشد، اگرچه درگیری سیستم گلوتاماترژیک نیز گزارش شده است [۳۱]. آزمون‌ها علاوه بر ارتفاع به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی مکانیسم‌های اساسی رفتار مرتبط با اضطراب در جوندگان استفاده می‌شود [۳۲]. حضور در بازوی باز، بیانگر کاهش اضطراب موش‌ها می‌باشد. هرچه میزان حضور در بازوی باز بیشتر باشد، نشان‌دهنده‌ی کاهش اضطراب و استرس در موش مورد آزمایش است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با هسپریدین به‌ویژه در دوز ۱۰۰ mg/kg سبب کاهش اضطراب در موش‌های تحت تأثیر UPI و استرس اکسیداتیو می‌شود. مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ نشان داد که القای استرس اکسیداتیو در موش سبب افزایش رفتارهای شبه‌اضطرابی در تست ماز علاوه بر ارتفاع می‌شود و زمان ماندن در بازوی باز و تعداد دفعات ورود به بازوی باز کاهش می‌یابد [۳۳]. همچنین بررسی نتایج این پژوهش در مورد حافظه اجتنابی غیرفعال نشان داد که UPI و دریافت هسپریدین بر تأخیر در اوّلین ورود و مدت‌زمان حضور در تاریکی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شوک مؤثر است. در این آزمون، کاهش تأخیری زمانی برای ورود به اتاق تاریک و افزایش ماندن در آن بیانگر نقص در حافظه و یادگیری حیوان بود [۳۴]. در مطالعه حاضر بیشترین زمان حضور در تاریکی و کمترین تأخیر ورود به محفظه تاریک در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شوک متعلق به گروه UPI+NS بود؛ در حالی که هرچه مقدار دوز دریافتی هسپریدین در گروه‌های تیماری بیشتر بود، این نتایج به نتایج گروه کنترل سالم نزدیک‌تر شد. از طرف دیگر، پژوهش صورت‌گرفته بر روی حافظه کاری و بررسی تناوب‌های غیرتکراری ماز Y نشان داد که UPI و القای استرس اکسیداتیو در این مورد نیز اثرگذار است و مصرف هسپریدین در گروه‌های تیماری در بهبود درصدهای تناوب‌های غیرتکراری مؤثر است. مطالعه‌ای که توسط Witte و همکاران انجام شد، نشان داد که تجویز هسپریدین با دوز ۵۰ mg/kg به مدت ۲۸ روز در جلوگیری از اختلال حافظه و کاهش افسردگی در مدل حیوانی پارکینسون القا شده با تزریق درون‌بطنی

در این مطالعه، اثر UPI به‌عنوان مدلی از القای IUGR و همچنین سه دوز هسپریدین بر سطوح سرمی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان یک شاخص پراکسیدانی مقایسه و بررسی شد. علاوه بر این بررسی اختلالات شناختی، حافظه کاری و حافظه اجتنابی غیرفعال در گروه‌های مورد مطالعه انجام شد. نارسایی‌های مزمن جفتی و متعاقب آن کاهش دریافت اکسیژن و مواد مغذی در جنین عوارض گوناگونی را به دنبال دارند [۲۲]. هرچند دلایل متعددی برای نواقص رشد و تکوین ناشی از IUGR بر روی جنین وجود دارد؛ اما به‌نظر می‌رسد در این میان نقش استرس اکسیداتیو پررنگ‌تر است [۲۳]. در تمام گروه‌های UPI که شریان‌های فوقانی هر دو شاخ رحمی مسدود شده بود، عوارض شدیدی از IUGR نسبت به گروه کنترل سالم مشاهده شد. از طرفی در گروه‌های تیمار شده با هسپریدین به‌خصوص در دوزهای بالا (۵۰ mg/kg و ۱۰۰) این عوارض به‌طور چشمگیری کاهش یافت، در حالی که در گروه UPI+NS چنین نتیجه‌ای دیده نشد. استرس اکسیداتیو از عدم تعادل بین سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد در بدن ایجاد می‌شود و به تمام اجزای سلول از جمله پروتئین، چربی و اسیدهای نوکلئیک آسیب می‌رساند [۲۴]. پراکسیداسیون لیپیدی، فرآیند تخریب سلولی اولیه ناشی از استرس اکسیداتیو است و به عنوان مشخصه‌ای از آن در نظر گرفته می‌شود که رادیکال‌های آزاد با اسیدهای چرب غیراشباع واکنش داده، منجر به تشکیل پراکسیدان لیپیدی مانند مالون‌دی‌آلدئید و در نهایت موجب آسیب‌رسیدن به اجزای غشای سلول و نکروز می‌گردد [۲۵]. مطالعه‌ای در مورد بیماران دچار آلزایمر نشان داد که نشانگرهای استرس اکسیداتیو از جمله مالون‌دی‌آلدئید در سرم این بیماران نسبت به افراد سالم به‌طور معنی‌داری بیشتر است [۲۶]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استرس اکسیداتیو سبب افزایش سطوح مالون‌دی‌آلدئید و از طرفی موجب کاهش سطوح شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، نظیر کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در سرم خون موش‌های مبتلا به IUGR می‌شود که این عوامل، اثرات مخربی بر روی مغز در حال تکوین نوزاد ایجاد می‌کند. استفاده از هسپریدین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قدرتمند می‌تواند سبب بهبود سطوح سرمی کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام شود و در مقابل مالون‌دی‌آلدئید را کاهش دهد [۲۷]. مطالعه‌ای پیرامون استرس اکسیداتیو القا شده با سرب نشان داد که هسپریدین، موجب افزایش سطح گلوکاتایون و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید، در کبد و کلیه موش می‌شود و فعالیت کاهش یافته‌ی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بهبود می‌بخشد [۲۸]. هرچند هنوز



(ERK1/2) Extracellular Signal-Regulated Kinases می‌توانند بقای سلول‌ها و تمایز آن‌ها را افزایش دهند [۳۸].

#### نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که هسپریدین با خواص آنتی‌اکسیدانی خود سبب تقویت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در موش‌های دچار UPI می‌گردد و در نتیجه اثرات مخرب IUGR را کاهش می‌دهد. علاوه بر این هسپریدین می‌تواند در بهبود حافظه، کاهش اضطراب و درمان اختلالات شناختی ناشی از UPI نیز اثرگذار باشد.

#### تشکر و قدردانی

از حمایت‌های معنوی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز در اجرای این تحقیق قدردانی به عمل می‌آید.

#### References:

- [1] Sabbaghchi M, Jalali R, Mohammadi M. A Systematic Review and Meta-analysis on the Prevalence of Low Birth Weight Infants in Iran. *J Pregnancy* 2020; 2020: 3686471.
- [2] Gaccioli F, Lager S. Placental nutrient transport and intrauterine growth restriction. *Front Physiol* 2016; 7: 40.
- [3] Suhag A, Berghella V. Intrauterine growth restriction (IUGR): etiology and diagnosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2013; 2(2): 102-11.
- [4] Brown LD, Hay Jr WW. Impact of placental insufficiency on fetal skeletal muscle growth. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 435: 69-77.
- [5] Fung C, Ke X, Brown AS, Yu X, McKnight RA, Lane RH. Uteroplacental insufficiency alters rat hippocampal cellular phenotype in conjunction with ErbB receptor expression. *J Paediatr Child Health* 2012; 72(1): 2-9.
- [6] Silvestro S, Calcaterra V, Pelizzo G, Bramanti P, Mazzon E. Prenatal Hypoxia and Placental Oxidative Stress: Insights from Animal Models to Clinical Evidences. *Antioxidants (Basel)* 2020; 9(5): 414.
- [7] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4(8): 118.
- [8] Wang XL, Xing GH, Hong B, Li XM, Zou Y, Zhang XJ, et al. Gastrodin prevents motor deficits and oxidative stress in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway. *Int J Life Sci Biotechnol Pharma Res* 2014; 114(2): 77-85.
- [9] Simioni C, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonelli A, et al. Oxidative stress: role

مغزی ۶-هیدروکسی دوپامین مؤثر است [۳۵]. پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۵ نشان داد که دریافت ۱۰۰ mg/kg هسپریدین به مدت ۱۰ روز سبب بهبود اختلالات رفتاری و التهاب عصبی در موش ترانسژنیک آلزایمری می‌شود [۳۶]. اثرات هسپریدین با تأثیر بر نورونز و تقویت ارتباطات سیناپسی، سبب بهبود عملکرد شناختی می‌شود که نتیجه این امر بهبود ارتباطات نورونی در مناطقی از کورتکس، شکنج دندانهای و ناحیه CA3 هیپوکامپ است [۳۷]. به نظر می‌رسد که این ترکیب از طریق افزایش فعالیت پروتئین کیناز C، سبب افزایش میزان پروتئین-cAMP Response Element (CREB) Binding Protein و در نتیجه تولید بیشتر فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) می‌گردد. بنابراین، از یک طرف امکان بقا و تمایز سلول‌های عصبی افزایش می‌یابد و از طرف دیگر با تغییر در ساختار دندریت‌ها در محل تماس دو عصب، سطح ارتباط دو نورون بالا می‌رود. همچنین از طریق ممانعت در ایجاد فرآیندهای التهابی و فعال کردن مسیرهای مربوط به Akt و نیز

of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget* 2018; 9(24): 17181.

[10] Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J* 2015; 15(1): 1-22.

[11] Londoño-Londoño J, De Lima VR, Jaramillo C, Creczynski-pasa T. Hesperidin and hesperetin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. *Arch Biochem Biophys* 2010; 499(1): 6-16.

[12] Shagirtha K, Bashir N, MiltonPrabu S. Neuroprotective efficacy of hesperetin against cadmium induced oxidative stress in the brain of rats. *Toxicol Ind Health* 2017; 33(5): 454-68.

[13] Shimouchi A, Yokota H, Ono S, Matsumoto C, Tamai T, Takumi H, et al. Neuroprotective effect of water-dispersible hesperetin in retinal ischemia reperfusion injury. *Jpn J Ophthalmol* 2016; 60(1): 51-61.

[14] Shukitt-Hale B, Lau FC, Carey AN, Galli RL, Spangler EL, Ingram DK, et al. Blueberry polyphenols attenuate kainic acid-induced decrements in cognition and alter inflammatory gene expression in rat hippocampus. *Nutr Neurosci* 2008; 11(4): 172-82.

[15] Thilakarathna SH, Rupasinghe H. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients* 2013; 5(9): 3367-87.

[16] Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for

pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines (Basel)* 2018; 5(3): 93.

[17] Briffa JF, O'Dowd R, Moritz KM, Romano T, Jedwab LR, McAinch AJ, et al. Uteroplacental insufficiency reduces rat plasma leptin concentrations and alters placental leptin transporters: ameliorated with enhanced milk intake and nutrition. *Am J Physiol Cell Physiol* 2017; 595(11): 3389-407.

[18] Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Moghadas M, Haddad-Mashadrizeh A, Robati R, Hashemzadeh MR. Histopathological and behavioral assessment of toxin-produced cerebellar lesion: a potent model for cell transplantation studies in the cerebellum. *Cell J* 2014; 16(3): 325.

[19] Carlezon Jr WA, Chartoff EH. Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nat Protoc* 2007; 2(11): 2987.

[20] Bagha N, Edalatmanesh MA. Effectiveness of erythropoietin on working memory, passive avoidance learning and anxiety-like behaviors in prenatal food restriction model. *J Health Care* 2018; 4(1): 36-43.

[21] Lovrić J, Mesić M, Macan M, Koprivanac M, Kelava M, Bradamante V. Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Period Biol* 2008; 110(1): 63-8.

[22] Wixey JA, Chand KK, Colditz PB, Bjorkman ST. Neuroinflammation in intrauterine growth restriction. *Placenta* 2017; 54: 117-24.

[23] Rashid CS, Bansal A, Simmons RA. Oxidative Stress, intrauterine growth restriction, and developmental programming of type 2 diabetes. *Physiology* 2018; 33(5): 348-59.

[24] Fock EM, Parnova RG. Protective Effect of Mitochondria-Targeted Antioxidants against Inflammatory Response to Lipopolysaccharide Challenge: A Review. *Pharmaceutics* 2021; 13(2): 144.

[25] Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 2019; 24(8): 1583

[26] Hritcu L, Stefan M, Brandsch R, Mihasan M. Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-l-nicotine in Alzheimer's disease rat model. *Neurosci Lett* 2015; 591: 41-7.

[27] Miler M, Živanović J, Ajdžanović V, Oreščanin-Dušić Z, Milenković D, Konić-Ristić A, et al. Citrus flavanones naringenin and hesperetin improve antioxidant status and membrane lipid compositions in the liver of old-aged Wistar rats. *Exp Gerontol* 2016; 84: 49-60.

[28] Wang J, Zhu H, Yang Z, Liu Z. Antioxidative effects of hesperetin against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Indian J Pharmacol* 2013; 45(4): 395.

[29] Bodduluru LN, Kasala ER, Barua CC, Karnam KC, Dahiya V, Ellutla M. Antiproliferative and antioxidant potential of hesperetin against benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Chem Biol Interact* 2015; 242: 345-52.

[30] Schiavone S, Jaquet V, Trabace L, Krause KH. Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(12): 1475-90.

[31] Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre-and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 199.

[32] Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2(2): 322-8.

[33] Pinton S, da Rocha JT, Gai BM, Nogueira CW. Sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin promotes anxiogenic behavior in mice. *Behav Brain Res* 2011; 223(1): 1-6.

[34] 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 Res Med Sci* 2010; 28(104): 1-7.

[35] Witte AV, Kerti L, Margulies DS, Flöel A. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci* 2014; 34(23): 7862-70.

[36] Li C, Zug C, Qu H, Schluesener H, Zhang Z. Hesperidin ameliorates behavioral impairments and neuropathology of transgenic APP/PS1 mice. *Behav Brain Res* 2015; 281: 32-42.

[37] Drapeau E, Mayo W, Arousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(24): 14385-90.

[38] Spencer JP. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr* 2009; 4(4): 243.