

## The effect of alcoholic extract of *Panicum miliaceum* L. seed on hippocampus neuronal density in male mouse

Bornarodi A, Tehranipour M\*, Mahdavi-Shahri N

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

Received May 1, 2017; Accepted August 15, 2017

### Abstract:

**Background:** Hippocampus organization is a part of temporal lobe, which consists of several sections including hippocampal body, dentate gyrus and subiculum. *Panicum miliaceum* L. contains proteins, vitamins and antioxidants for human health. This study was conducted to examine the effect of the alcoholic extract of the seed of *Panicum miliaceum* L. plant on hippocampus neuronal density.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 24 male mice were divided into 4 groups (n=6, each group). The alcoholic extract of the seed of the *Panicum miliaceum* L. plant was prepared by soxhlet extraction. Three doses of the extract 25, 50, 75 mg/kg were intraperitoneally injected to 3 treatment groups for 21 days and the control group received normal saline injection. At the end of the experiment, the animals were anesthetized and after perfusion, their brains were removed from the skull. After tissue processing, slices of the brain were prepared and stained. Then, different regions of the hippocampus were photographed and neuronal densities were evaluated.

**Results:** Results showed that the neuronal density in the CA1, CA3 regions of the group treated with 50 mg/kg of the alcoholic extract and in all regions of hippocampus (CA1,CA2,CA3) in groups treated with dose of 75 mg/kg of the alcoholic extract had a significant increase compared to the control group ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** The present study shows that the alcoholic extract of the seed of *Panicum miliaceum* L. plant increases neuronal density and induces neurogenesis in the mouse hippocampus.

**Keywords:** Panicum miliaceum, Alcoholic extract, Neuronal density, Hippocampus

\* Corresponding Author.

Email: maryam\_tehranipour@mshdiau.ac.ir

Tel: 0098 915 511 0370

Fax: 0098 51 384 35050

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2017; Vol. 21, No 4, Pages 335-344

Please cite this article as: Bornarodi A, Tehranipour M, Mahdavi-Shahri N. The effect of alcoholic extract of *Panicum miliaceum* L. seed on hippocampus neuronal density in male mouse. *Feyz* 2017; 21(4): 335-44.

# بررسی اثر عصاره الکلی دانه ارزن پروسو (*Panicum miliaceum* L.) بر تراکم نوروئی ناحیه هیپوکامپ موش سوری

آرزو برنای رودی<sup>۱</sup>، مریم طهرانی پور<sup>۲\*</sup>، ناصر مهدوی شهری<sup>۳</sup>

خلاصه:

**سابقه و هدف:** تشکیلات هیپوکامپ بخشی از لوب گیجگاهی را به خود اختصاص می‌دهد و خود از این بخش‌ها تشکیل شده است: جسم هیپوکامپ، شکنج دندانه‌ای و سوییکولوم. گیاه ارزن حاوی پروتئین‌ها، مواد معدنی، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز برای حفظ حیات و سلامت سلول‌های بدن پستانداران است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره الکلی دانه گیاه ارزن پروسو (*Panicum miliaceum* L.) بر تراکم نوروئی ناحیه هیپوکامپ انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش سوری به ۴ گروه تقسیم شدند. عصاره الکلی دانه گیاه ارزن پروسو به روش سوکسله تهیه شده و به سه گروه تیمار به ترتیب با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به روش داخل صفاقی و به مدت ۲۱ روز تزریق شد. گروه کنترل نرمال سالیین دریافت نمود. در پایان مطالعه حیوانات بیهوش شده و پس از پرفیوژن، مغز از جمجمه خارج گردید. بعد از انجام مراحل پاساژ بافتی از مغز برش تهیه شده و رنگ‌آمیزی شد. سپس، تراکم نوروئی نواحی مختلف هیپوکامپ بررسی شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد که تراکم نوروئی در نواحی CA1 و CA3 گروه تیمار شده با دوز ۵۰ mg/Kg و در تمام نواحی هیپوکامپ (CA1, CA2, CA3) گروه تیمار شده با دوز ۷۵ mg/Kg عصاره الکلی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی دانه گیاه ارزن پروسو باعث افزایش تراکم نوروئی و القای نورون‌زایی در هیپوکامپ موش سوری می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** ارزن پروسو، عصاره الکلی، تراکم نوروئی، هیپوکامپ

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۳۴۴-۳۳۵

## مقدمه

جسم هیپوکامپ و شکنج دندانه‌ای بخشی از آرکتوکورتکس است و سوییکولوم بخش انتقالی کورتکس را در بر می‌گیرد، یعنی حد وسط بین آرکتوکورتکس و نئوکورتکس است. هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک است که در مکانیسم تثبیت حافظه شرکت می‌کند. هیپوکامپ از قاعده مغز جلویی و سپتوم، آوران‌های کولینرژیک دریافت می‌کند که در روند حافظه و یادگیری نقش مهمی دارند [۳]. مغز قادر به تولید سلول‌های جدید از طریق نورون‌زایی در دوران پس از بلوغ است [۴]. تا حدود ۲۰ سال پیش اعتقاد بر این بود که مغز انسان قادر به تولید سلول‌های جدید مغزی پس از بلوغ نیست، اما دانشمندان در حال حاضر به این واقعیت رسیده‌اند که مغز انسان می‌تواند نورون‌زایی داشته باشد [۴]. نورون‌زایی به این معنی است که سلول‌های عصبی جدید حتی در بزرگسالی متولد می‌شوند و این فرآیند را می‌توان همراه با برخی تغییرات در رژیم غذایی و شیوه زندگی بهبود بخشید. دو منطقه خاص در مغز، ساب‌نتریکولار و هیپوکامپ، شواهد نورون‌زایی پس از بلوغ را نشان می‌دهند [۵]. جنس ارزن (*Panicum* L.) جزء غلات دانه‌ریز محسوب می‌شود و به خانواده گندمیان (Poaceae) تعلق دارد. ارزن معمولی یا ارزن پروسو با نام علمی (*Panicum miliaceum* L.) برای تولید علوفه و دانه کشت می‌شود و

هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک بوده که به علت ساختار نعل اسبی شکل آن بدین نام نامیده شده و دارای بخش‌های CA1، CA2، CA3، سوییکولوم و شکنج دندانه‌ای است که ارتباطات متعدد اما به‌طور عمده غیرمستقیم با بیشتر بخش‌های قشر مغز و نیز با عقده‌های قاعده‌ای سیستم لیمبیک یعنی آمیگدال، هیپوتالاموس، سپتوم و اجسام پستانی دارد. هرگونه تجربه حسی باعث فعال شدن قسمت‌های مختلف هیپوکامپ می‌گردد [۲، ۱]. این تشکیلات بخشی از لوب گیجگاهی را به خود اختصاص می‌دهد.

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد زیست‌شناسی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

<sup>۳</sup> استاد، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

\* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۱۵۵۱۱۰۳۷۰ دونه‌پس: ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰

پست الکترونیک: maryam\_tehrani@msdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۱ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۶/۵/۲۴

مطالعه با این هدف انجام شد تا در صورت مؤثر بودن این عصاره بر تراکم نورونی بتواند زمینه تحقیقات بیشتر را روی نمونه‌های انسانی فراهم سازد و این عصاره به‌عنوان یک عامل تقویت‌کننده حافظه و یادگیری در افراد سالم و جوان مورد استفاده قرار گیرد.

#### مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی روی ۲۴ سر موش سوری نر بالغ با وزن ۴۰-۳۰ گرم در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد. موش‌های سوری نر بالغ از موسسه سرم‌سازی رازی خریداری گردید و در شرایط نوری ۱۲ ساعت نور- ۱۲ ساعت تاریکی در درجه حرارت ۲۱ درجه سانتی-گراد و رطوبت مناسب، درحالی‌که امکان دسترسی به آب و غذا برای‌شان فراهم بود، در اتاق حیوانات دانشگاه آزاد واحد مشهد شهرستان خواف جمع‌آوری گردید و در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی تأیید شد. دانه گیاه ارزن پروسو برای عصاره‌گیری کاملاً آسیاب گردیده و عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام شد. پنجاه گرم پودر دانه گیاه ارزن پروسو با حدود ۴۵۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق به‌عنوان حلال در حرارت ۶۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت در دستگاه سوکسله به‌منظور عصاره‌گیری قرار داده شد. سپس، عصاره‌های به‌دست آمده به‌منظور حذف حلال در انکوباتور با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و بدین وسیله عصاره الکلی گیاه کاملاً تغلیظ و خشک گردید [۲۱]. عصاره الکلی کرم رنگ با بازده ۱۲/۸ درصد بود. در تمام طول آزمایش پروتکل اخلاقی کار با حیوانات رعایت شد تا کمترین درد یا زجری متحمل نشوند. در زمان آزمایش حیوانات به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی کنترل، تیمار با عصاره دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تیمار با عصاره دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، و تیمار با عصاره دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. انتخاب دوزها بر اساس تجربیات گذشته بود [۲۱]. در گروه‌های تیمار عصاره به روش داخل صفاقی (IP) به مدت ۲۱ روز [۲۲] به‌طور پیوسته با فاصله زمانی ۲۴ ساعت تزریق شد و به گروه شاهد نیز نرمال سالیین تزریق شد. دوزها و مدت تزریق دارو انتخابی بود و به‌صورت تجربی و با مطالعات پایلوت به‌دست آورده شده‌اند، زیرا کار مشابهی در این زمینه انجام نشده بود. بعد از گذشت یک ماه از اولین تزریق حیوانات با رامپون و کتامین (۶ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش گردیدند [۲۲]. برای نفوذ بهتر فیکساتور به مغز قبل از تشریح به کمک متود پرفیوژن تا حدی

هنگامی‌که هدف از کشت، تولید دانه باشد جزو غلات به‌شمار می‌آید [۶]. ارزن‌های پروسو نسبتاً پاکوتاه و کم شاخ و برگ هستند و خوشه باز دارند، به خشکی نسبتاً مقاوم‌اند، ضمن آنکه نمی‌توانند خشکی شدید را تحمل کنند نسبت به دمای زیر صفر درجه سانتی-گراد نیز حساس هستند. بنابراین در بهار و زمانی‌که خطر سرما رفع شده باشد، کشت می‌شوند [۷]. کرمان، اصفهان، خراسان و مازندران از استان‌ها و مناطق مهم تولیدکننده ارزن در ایران به‌شمار می‌روند [۷]. مواد مغذی موجود در ۱۰۰ گرم ارزن پروسو با رطوبت ۱۲ درصد به شرح ذیل می‌باشد: پروتئین ۱۲/۵ گرم، چربی ۳/۵ گرم، خاکستر ۳/۱ گرم، فیبر خام ۵/۲ گرم، کربوهیدرات ۶۳/۸ گرم، انرژی ۳۶۴ کیلوکالری، کلسیم ۸ میلی‌گرم، آهن ۲/۹ میلی-گرم، تیامین ۰/۴۱ میلی‌گرم، ریبوفلاوین ۰/۲۸ میلی‌گرم، و نیاسین ۴/۵ میلی‌گرم [۸]. پروتئین ارزن منبع خوبی از اسید آمینه‌های ضروری لوسین، ایزولوسین و متیونین است [۹]. در حال حاضر بیش از ۵۰ ترکیب فلاونوئید در گیاه ارزن کشف شده است [۱۰]. همچنین، رژیم‌های غذایی غنی از فلاونوئیدها می‌تواند تاثیر مثبتی بر مغز و اختلالات تخریب نورونی نظیر آلزایمر و پارکینسون داشته باشد [۱۱، ۱۲]. نشان داده شده است که تیمار موش‌های سوری ماده بالغ با بلوبری [۱۳]، عصاره انگور قرمز [۱۴] و چای سبز منجر به نورون‌زایی و بهبود حافظه می‌شود [۱۵]. فنول‌ها و دیگر اجزای فعال استخراج شده از گیاه ارزن دارای فعالیت آنتی-اکسیدانی هستند. هر ۱۰۰ گرم ارزن معمولی شامل ۲۹ میلی‌گرم پلی‌فنول و ۲/۲۲ میلی‌گرم توکوفرول است. به‌علاوه، رابطه مثبت و معنی‌داری بین پلی‌فنول‌ها و مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد مشاهده شده است [۱۶]. همچنین، ارزن دارای فلاونوئیدی به‌نام کوئرستین است [۱۷] که با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود باعث بهبود یادگیری و حافظه می‌شود [۱۸]. فعالیت رادیکال‌های آزاد در بدن می‌تواند باعث انواع دژنراسیون، سرطان، دیابت، نارسایی‌های قلبی، آسیب‌های مغزی (از جمله سکتة مغزی، پارکینسون و آلزایمر)، مشکلات عضلانی، پیری زودرس، آسیب‌های چشمی و در کل ضعف سیستم ایمنی بدن شود. در این میان آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های آزاد را از بین برده و موجب بازسازی سلول‌های تخریب شده می‌شوند و کارایی سیستم ایمنی بدن را در مقابل انواع بیماری‌ها افزایش می‌دهند [۱۹]. از آثار مفید ارزن می‌توان جلوگیری از سرطان و بیماری‌های قلبی-عروقی، کاهش بروز تومور، کاهش فشار خون، کاهش کلسترول و میزان جذب چربی و به‌تاخیرانداختن تخلیه معده را نام برد [۲۰، ۲۱]. اثر دانه گیاه ارزن پروسو بر تغییر تراکم نورونی هیپوکامپ به‌صورت تجربی روی حیوانات آزمایشگاهی مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا این

فرمول زیر محاسبه گردید [۶]:

$$NV = \frac{\sum Q}{\sum frame \times Vdisector}$$

در این تحقیق چهارچوب نمونه برداری روی صفحه مانیتور  $1/5 \times 1/5$  بود که برای به دست آوردن اندازه واقعی این مساحت به میکرون ( $\mu$ ) روی نمونه از لام میکرومتری استفاده شد. داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری Minitab و آزمون‌های t و Anova آنالیز شدند و برای مقایسه دوتایی گروه‌ها از آزمون Tukey استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نمایش داده شدند و سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد. منحنی‌ها به کمک نرم‌افزار Excel رسم شدند [۲۱].

### نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر دانه گیاه ارزن پروسو بر تراکم نورونی مناطق مختلف هیپوکامپ در گروه‌های تیمار شده با عصاره و گروه کنترل به صورت شمارش نوروها در جدول شماره ۱ آمده است.

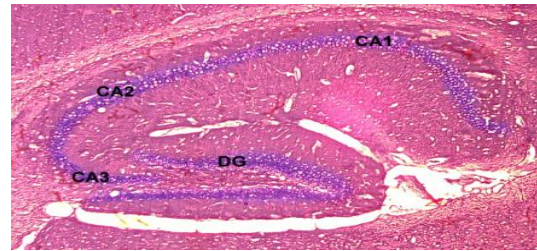
جدول شماره ۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار تراکم نورونی

(میلی‌متر مکعب) در مناطق مختلف هیپوکامپ گروه‌های مطالعه

گروه ناحیه	کنترل	تیمار با عصاره $20\text{mg/Kg}$	تیمار با عصاره $75\text{mg/Kg}$	تیمار با عصاره $50\text{mg/Kg}$
CA1	$57 \pm 2/4$	$57 \pm 3/06$	$79 \pm 3/04$	$73 \pm 2/67$
CA2	$69 \pm 3/06$	$77 \pm 3/06$	$87 \pm 3/82$	$81 \pm 1/98$
CA3	$77 \pm 2/4$	$87 \pm 2/25$	$109 \pm 3/06$	$101 \pm 2/67$

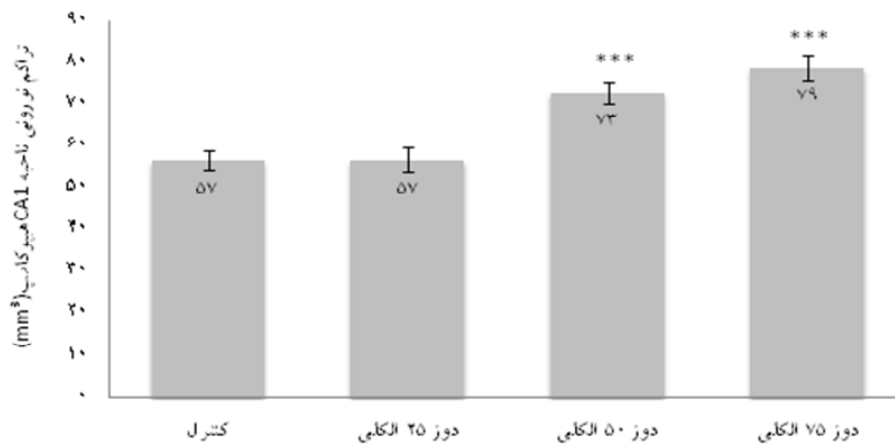
آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف بین میانگین تراکم نورونی ناحیه CA1 در گروه‌های کنترل ( $57 \pm 2/4$  میلی‌متر مکعب) و تیمار با دوز  $25$  میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره ( $57 \pm 3/06$  میلی‌متر مکعب) تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ( $P > 0/05$ )، اما بین تراکم نورونی در گروه‌های کنترل ( $57 \pm 2/4$  میلی‌متر مکعب) و تیمار با دوز  $50$  میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره ( $73 \pm 2/67$  میلی‌متر مکعب) و نیز تیمار با دوز  $75$  میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره ( $79 \pm 3/04$  میلی‌متر مکعب) تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود ( $P < 0/05$ ) (نمودار شماره ۱ و شکل شماره ۲).

بافت‌های مغز فیکس شدند. پس از اتمام پرفیوژن مغز به آرامی از حجمه خارج شده و در فرمالین نمکی  $10$  درصد قرار داده شد و پس از طی مراحل پاساژ بافتی از مغز برش‌های ساژیتال سریال  $7$  میکرونی تهیه شده و با آبی تولوئیدین و اریتروزین رنگ‌آمیزی شد [۲۲]. سپس، ناحیه هیپوکامپ و مناطق مختلف آن شناسایی شد (شکل شماره ۱).

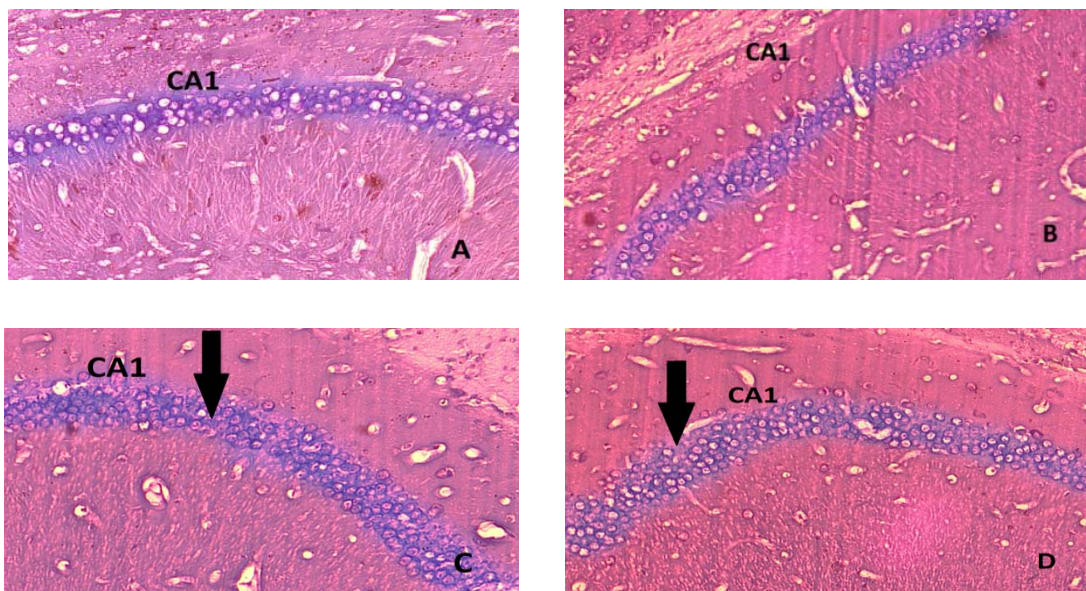


شکل شماره ۱- تصویر بافت شناسی مناطق مختلف هیپوکامپ موش سوری نر

از مناطق CA1, CA2, CA3 هیپوکامپ عکسبرداری به عمل آمد. در حدود  $100$  برش شمارش انجام شد. از دو برش متوالی عکس‌های جداگانه تهیه شد و با حفظ شماره و ترتیب برای مطالعات بعدی قرار داده شدند. بزرگنمایی میکروسکوپی  $100$  بود. برای شمارش نورونی از روش نمونه‌برداری تصادفی استفاده گردید و برای شمارش ذرات یعنی نوروها از روش دایسکتور و متود استریولوژی استفاده شد. متغیرهای لازم برای آنالیز داده‌های خام این چنین تعریف می‌شدند:  $\sum Q$ : مجموع نوروهای شمارش شده در یک نمونه؛  $\sum frame$ : مجموع دفعات نمونه برداری شده؛  $Vdisector$ : حجم چهارچوب نمونه برداری که برابر است با  $A$ ؛  $A \text{ frame} \times H = Vdisector$ : مساحت چهارچوب نمونه برداری؛  $H$ : فاصله بین دو برش یا ضخامت هر برش و  $\frac{Vd}{\sum frame} = NV$ : حاصل تقسیم مجموع نوروهای شمارش شده در یک نمونه بر مجموع دفعات نمونه برداری شده. برای بررسی داده‌ها با استفاده از برنامه‌های آماری مانند t نیاز به پارامتر دیگری به نام NV (Numerical density) یا تراکم تعداد است. این پارامتر از



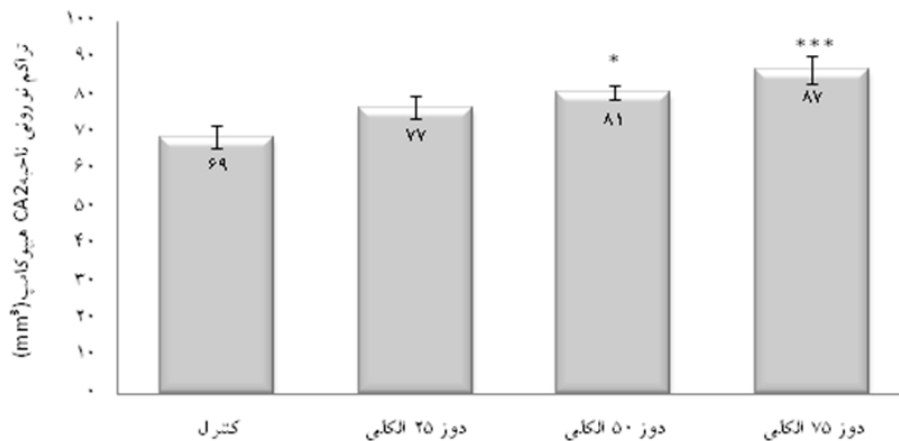
نمودار شماره ۱- مقایسه تراکم نورونی ناحیه CA1 در گروه‌های تیمار شده با عصاره الکلی دانه گیاه ارزن پروسو با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ mg/Kg با گروه کنترل (n=۶) ( $P < 0.05$ \*) و  $P < 0.001$ \*\*\* تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار با گروه کنترل را نشان می‌دهد.



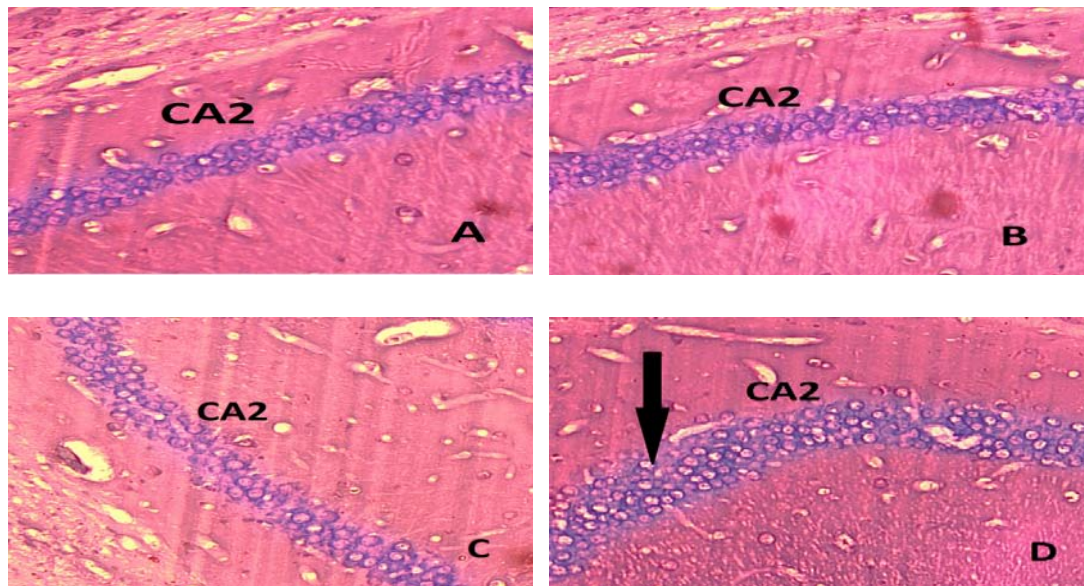
شکل شماره ۲- تصاویر ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی تیمار شده با دوزهای تزریقی (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عصاره الکلی دانه گیاه ارزن و گروه کنترل با رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین و اریتروزین (×۱۰۰) (فلش نشان دهنده افزایش تراکم نورونی هیپوکامپ می‌باشد).  
A: گروه کنترل؛ B: عصاره با دوز ۲۵ mg/Kg؛ C: عصاره با دوز ۵۰ mg/Kg و D: عصاره با دوز ۷۵mg/Kg

آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف بین میانگین تراکم نورونی ناحیه CA2 در گروه‌های کنترل (۶۹±۳/۰۶ میلی‌متر مکعب) و تیمار با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره (۸۷±۳/۸۲ میلی‌متر مکعب) تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۲ و شکل شماره ۳).

اما بین تراکم نورونی در گروه‌های کنترل (۶۹±۳/۰۶ میلی‌متر مکعب) و تیمار با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره (۷۷±۳/۰۶ میلی‌متر مکعب) و نیز تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره (۸۱±۱/۹۸ میلی‌متر مکعب) تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.



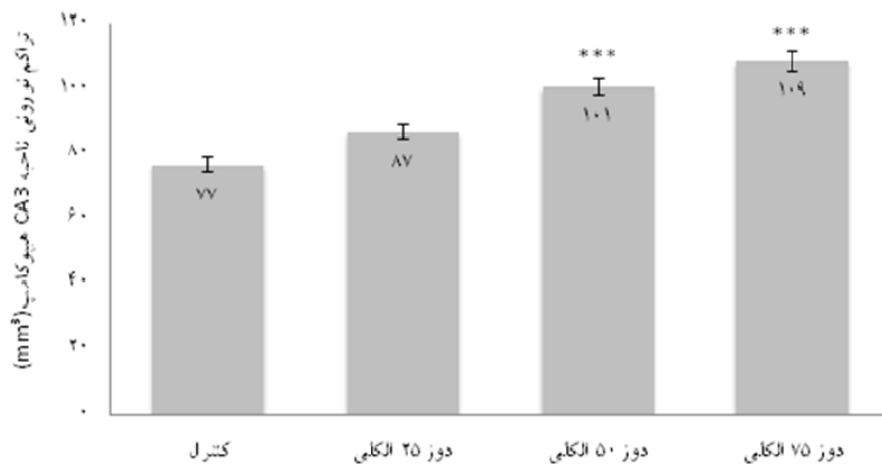
نمودار شماره ۲- مقایسه تراکم نورونی ناحیه CA2 در گروه‌های تیمار شده با عصاره الکلی دانه گیاه ارزن پروسو با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ mg/Kg با گروه کنترل (n=۶) ( $P < 0.05^*$  و  $P < 0.001^{***}$  تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار با گروه کنترل را نشان می‌دهد).



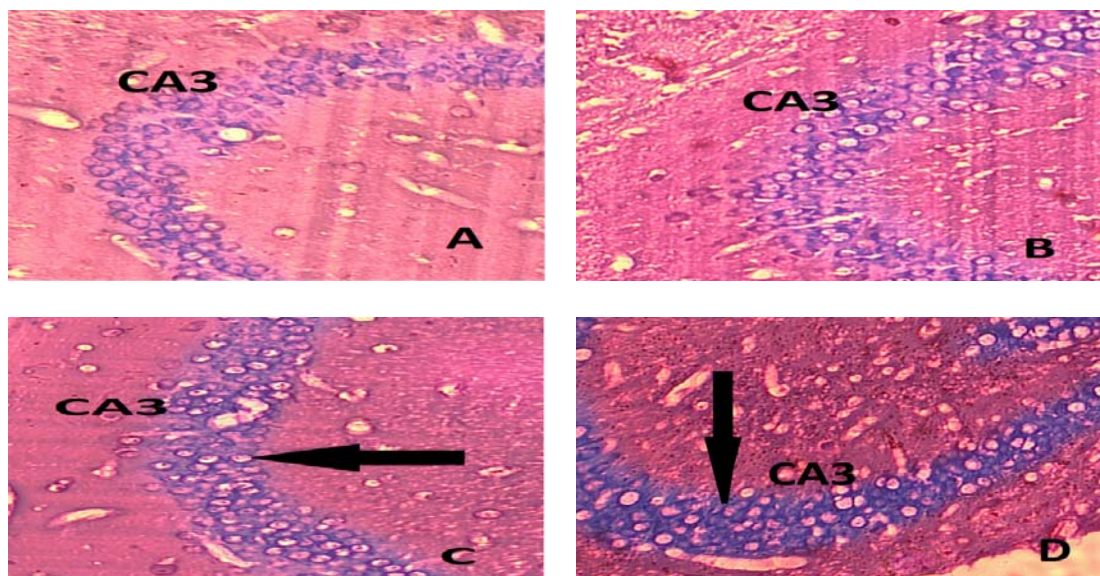
شکل شماره ۳- تصاویر ناحیه CA2 هیپوکامپ موش‌های صحرایی تیمار شده با دوزهای تزریقی (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عصاره الکلی دانه گیاه ارزن و گروه کنترل با رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین و اریتروزین (×۱۰۰) (فلش نشان دهنده افزایش تراکم نورونی هیپوکامپ می‌باشد).  
A: گروه کنترل؛ B: عصاره با دوز ۲۵ mg/Kg؛ C: عصاره با دوز ۵۰ mg/Kg و D: عصاره با دوز ۷۵mg/Kg

همچنین، آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف بین میانگین تراکم نورونی ناحیه CA3 در گروه‌های کنترل ( $77 \pm 2/4$  میلی‌متر مکعب) و تیمار با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره ( $87 \pm 2/25$  میلی‌متر مکعب) تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ( $P > 0.05$ ). اما بین تراکم نورونی در گروه‌های کنترل ( $77 \pm 2/4$  میلی‌متر مکعب) و تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره

همچنین، آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف بین میانگین تراکم نورونی ناحیه CA2 در گروه‌های تیمار شده با دوزهای تزریقی (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عصاره الکلی دانه گیاه ارزن و گروه کنترل (n=۶) ( $P < 0.05^*$  و  $P < 0.001^{***}$  تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار با گروه کنترل را نشان می‌دهد).



نمودار شماره ۳- مقایسه تراکم نورونی ناحیه CA3 در گروه‌های تیمار شده با عصاره الکلی دانه گیاه ارزن پروسو با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ mg/Kg با گروه کنترل (n=۶) ( $P < 0.05^*$ ) و ( $P < 0.001^{***}$ ) تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار با گروه کنترل را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۴ - تصاویر ناحیه CA3 هیپوکامپ موش‌های صحرایی تیمار شده با دوزهای تزریقی (۲۵، ۵۰، ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عصاره الکلی دانه گیاه ارزن و گروه کنترل با رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین و اریتروزین (x100) (فلش نشان دهنده افزایش تراکم نورونی هیپوکامپ می‌باشد). A: گروه کنترل؛ B: عصاره با دوز ۲۵ mg/Kg؛ C: عصاره با دوز ۵۰ mg/Kg و D: عصاره با دوز ۷۵mg/Kg

#### بحث

وسیله جایگزینی سلول‌ها ترمیم خودبه‌خودی را انجام می‌دهند. تعدادی از مطالعات در این زمینه نشان داده‌اند که آکسون‌های مغز توانایی رشد مجدد را بعد از مواجه شدن با درجاتی از صدمات دارند [۲۳]. برای اینکه سلول‌های جدید مغزی توسعه پیدا کنند سلول‌های بنیادی عصبی چندظرفیتی در مغز تقسیم شده و به نورون‌ها یا سلول‌های گلایای جدید تبدیل می‌شوند. برای بالغ شدن این سلول‌ها از سلول‌های چندظرفیتی جدا می‌شوند و این نورون‌ها با نورون‌های فعال ارتباط برقرار می‌کنند و بیش از یک‌ماه طول

نتایج این مطالعه نشان داد که تراکم نورونی در نواحی CA3 و CA1 گروه تیمار شده با دوز ۵۰ mg/Kg عصاره و در تمام نواحی هیپوکامپ گروه تیمار شده با دوز ۷۵ mg/Kg عصاره الکلی دانه گیاه ارزن افزایش معنی‌داری داشته است ( $P < 0.05$ ). نورون‌زایی امیدی برای افراد مبتلا به اختلالات مغزی از جمله پارکینسون، هانتینگتون و آلزایمر می‌باشد. یکی از اهداف اصلی محققان کشف داروهایی برای تحریک مناطقی از مغز است که به-

می‌کشد تا نورون‌های جدید قادر به ارسال و دریافت پیام‌های جدید شوند، که این نشان می‌دهد نورون‌زایی یک فرآیند کاملا کنترل شده است [۲۴]. با توجه به نتایج این پژوهش، به نظر می‌رسد که عصاره الکلی دانه گیاه ارزن موجب تحریک نورون‌زایی می‌شود. اخیرا شواهد زیادی تاثیرات مثبت فلاونوئیدها را بر مغز نشان می‌دهد [۲۶، ۲۵]. فلاونوئیدها شبکه‌های عصبی را با تحریک نورون‌زایی افزایش می‌دهند [۲۷]. هم‌چنین، گزارش شده است که فلاونوئیدها برای بهبود عملکردهای شناختی نیز مفید می‌باشند [۲۸]. فلاونوئیدها در بسیاری از سبزیجات و میوه‌ها و دانه‌ها وجود دارند و تا حد زیادی بر عملکردهای مختلف مغزی نظیر جریان خون مغزی و شکل‌پذیری سیناپسی، یا همان مکانیسم احتمالی یادگیری و حافظه، تاثیر می‌گذارند [۲۵]. اولین و مهم‌ترین ویژگی فلاونوئیدها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها و توانایی آنها برای مهار تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال است [۱۷]. بسیاری از شواهد نشان داده است که فلاونوئیدها به دلیل بالا بودن نسبت آنتی‌اکسیدانی آنها، نقش مهمی در بهبود تراکم نورونی دارند [۲۶]. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که فلاونوئیدها از آسیب‌های عصبی در لایه‌های هرمی هیپوکامپ جلوگیری می‌کند [۲۹]. اثرات مفید فلاونوئیدها روی سلول‌های اندوتلیال و جریان خون محیطی می‌تواند باعث افزایش عملکرد مغزی و تسهیل نورون‌زایی در هیپوکامپ بزرگسالان شود [۳۰]. فلاونوئیدها هم‌چنین با اثر بر پروتئین کینازها، لپید کینازها (P13/Akt) و مسیر MAP کینازها موجب بهبود ارتباطات نورونی در مناطق شکنج دندانه‌ای و CA3 هیپوکامپ و به دنبال آن منجر به بهبود شکل‌پذیری سیناپسی می‌شوند. این ترکیبات روی مسیر ERK/CREB اثر کرده و آن را فعال می‌کنند [۱۱]. در حال حاضر بیش از ۵۰ ترکیب فنولیک متعلق به چندین گروه به نام فنولیک اسیدها و مشتقات آنها از قبیل توکوفرول، فلاونول، فلاون، فلاوانول و فلاوانون در گیاه ارزن کشف شده است [۱۰]. لذا به نظر می‌رسد که اثرات عصاره دانه گیاه ارزن بر نورون‌زایی ناشی از ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدهای موجود در این عصاره باشد. یکی از فلاونوئیدهای مهم موجود در ارزن کوئرستین است [۱۸]. نشان داده شده است که پلی‌فنول‌های مختلف شامل کوئرستین باعث محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از آمیلوئید- $\beta$  در مدل‌های حیوانی بیماری آلزایمر می‌شوند [۳۱]. علاوه بر این، گزارش شده است که کوئرستین اثرات محافظتی در برابر آسیب‌های ایسکمیک مغزی را نشان می‌دهد [۳۲]. کوئرستین مانع از آسیب اکسیداتیو و مرگ سلول‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله مهار رادیکال‌های اکسیژن، مهار زاتین اکسیداز و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود.

مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان برای حفاظت از سلول‌ها و بافت‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو مهم هستند. بنابراین، کوئرستین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند باعث بهبود حافظه و یادگیری شود [۳۳]. هم‌چنین، کوئرستین اثر قابل ملاحظه محافظتی روی سلول‌های عصبی در حال دژنره شدن در بیماری آلزایمر دارد [۳۴]. در مطالعه‌ای تاثیر کوئرستین روی عملکرد شناختی موش‌های مدل پارکینسون بررسی شده و مشخص گردید کوئرستین باعث افزایش حافظه فضایی می‌شوند [۳۵]. تاکنون تحقیقی درخصوص تاثیر عصاره ارزن بر تراکم نورونی هیپوکامپ انجام نشده است؛ با این وجود احتمال می‌رود اثر عصاره الکلی ارزن بر نورون‌زایی به دلیل کوئرستین موجود در آن باشد. هم‌چنین، نورون‌زایی توسط فاکتورهای رشد کنترل می‌شود که این فاکتورها می‌توانند تکامل سلول‌های جدید را رهبری کنند. فاکتورهای رشد دیگری از جمله فاکتورهای نروتروفیک نیز سلول را زنده نگه می‌دارند [۲۴]. بعضی از عصاره‌های طبیعی گیاهان دارای ترکیباتی هستند که مشابه با فاکتورهای نروتروفیک در بدن می‌باشند؛ این ترکیبات باعث بقای سلول‌های عصبی و احتمالا تحریک نورون‌زایی و فرآیندهای وابسته به آن می‌شود [۲۴]. در سیستم اعصاب مرکزی، فاکتور رشد عصبی (NGF) ارتباط نزدیکی با سیستم کولینرژیک ژیک دارد. NGF بقای نورون‌های کولینرژیک آسیب دیده در شرایط آزمایشگاهی را افزایش می‌دهد. هم‌چنین باعث حفظ و تنظیم فنوتیپ نورون‌های کولینرژیک می‌شود. NGF یک عمل شبه‌ناقل عصبی در جهت تنظیم انتقال عصبی کولینرژیک و تحریک‌پذیری نورونی دارد. داروها و ترکیباتی که تولید NGF را در سیستم اعصاب مرکزی تشدید می‌کنند، می‌توانند در درمان بیماری آلزایمر مفید باشند؛ چراکه نورون‌های کولینرژیک به‌ویژه در بیماری آلزایمر آسیب می‌بینند [۳۶]. Kasaka و Yokoi عصاره برگ رزماری را به محیط کشت سلول‌های گلیوبلاستوما انسانی اضافه کرده و مشاهده نمودند که سنتز NGF در این سلول‌ها افزایش می‌یابد. به علاوه، ایشان از این عصاره برای درمان کاهش حافظه در بیماری آلزایمر استفاده نمودند [۳۷]. بدین ترتیب شاید اثر مفید عصاره دانه گیاه ارزن روی تراکم نورونی هیپوکامپ به این دلیل باشد؛ زیرا نقش ارزن در تولید عامل رشد عصب ثابت شده است [۳۸].

#### نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که تراکم نورونی در نواحی CA1 و CA3 گروه تیمار شده با دوز ۵۰ mg/Kg عصاره و در تمام



### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد است. بدین‌وسیله از همه همکاران گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مدیریت گروه سرکار خانم دکتر مریم طهرانی‌پور و ریاست محترم دانشکده علوم آقای دکتر فرشید سعیدی به‌خاطر همکاری‌های بی‌دریغ‌شان تشکر و قدردانی می‌شود.

نواحی هیپوکامپ حیوانات تیمار شده با دوز ۷۵ mg/Kg عصاره الکلی دانه گیاه ارزن افزایش می‌یابد. لذا عصاره الکلی دانه گیاه ارزن می‌تواند اثرات نورون‌زایی در هیپوکامپ القا کرده و تراکم نورونی را در این مناطق افزایش دهد. همچنین، با در نظر گرفتن ارتباط مستقیم تعداد نورون‌ها در هیپوکامپ و میزان حافظه، می‌توان از این عصاره برای بهبودی اختلال حافظه در بیماری‌هایی مثل پارکینسون استفاده کرد و با وارد کردن این غلات به رژیم غذایی احتمالا می‌توان از ابتلا به بیماری‌هایی مثل آلزایمر جلوگیری کرد.

### References:

- [1] Gorden M.s. Neurobiology. 3<sup>rd</sup> ed. **Oxford university press**; 2000. p. 618-34.
- [2] Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical physiology. 3<sup>rd</sup>. Philadelphia: Saunders; 2008. p. 645-643.
- [3] Jahanshahi M, Sadeghi Y, Hosseini A, Naghdi N, Piriaie A. Working memory learning method and astrocytes number in different subfields of rat's hippocampus. **J Animal Veterinary** 2008; 3(1): 31-28.
- [4] Achille G, Synthia H. Ganadotropins and Progestogens: Obligatory developmental function during early embryogenesis and their role in adult neurogenesis, neuroregeneration and neurodegeneration. **Academic Press** 2011; 1: 375-305.
- [5] Taupin P. The hippocampus: neurotransmission and plasticity in the nervous system. 1<sup>st</sup>. New York: Nova Biomedical Books; 2008. P. 25-20.
- [6] Baker RD. Millet production. Cooperative Extension Service, **New Mexico State** 1996; 1: 41-1.
- [7] Kazemi Arbat H. private farming. **Jahad University Press** 2003; p. 228-17. [in Persian]
- [8] Hulse JH, Laing EM, Pearson OE. Sorghum and the millets: their composition and nutritive value. New York: **Academic Press**; 1980. P. 997-1.
- [9] Kalinova J, Moudry J. Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum L.*) varieties. **Plant Foods Hum Nutr** 2006; 9: 61-45.
- [10] Chandrasekara A, Shahidi F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. **J Agric Food Chem** 2010; 58: 6706-14.
- [11] Mehla J, Pahuja M, Gupta YK. Streptozotocin-Induced Sporadic Alzheimer's Disease: Selection of Appropriate Dose. **J Alzheimers Dis** 2013; 33(1): 21-17.
- [12] Williams R, Spencer J. Flavonoids. Cognition and dementia: actions, mechanisms and potential therapeutic utility for Alzheimer's disease. **Free Radical Bio Med** 2011; 127(3): 213-210.
- [13] Andres-Lacueva CB, Shukitt-Hale RL, Galli O, Jauregui RM, et al. Anthocyanins in Aged Blueberry-Fed Rats Are Found Centrally and May Enhance Memory. **Nutr Neurosci** 2005; 8(2): 111-20.
- [14] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease. **N Engl J Med** 2010; 362(4): 329-44.
- [15] Tahmasebi S, Heidari N, Mohagerani HR. Effects of Crataegus Aronia on Passive Avoidance Learning in Wistar Male Rats. **J Cellular Molecular Biotechnol News** 2013: 86-79.
- [16] Choi Y, Jeong H-S, Lee J. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. **Food Chem** 2007; 103(1): 130-8.
- [17] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **Scientific World J** 2013; 20:750-162.
- [18] Pradeep P.M, Yadahally N, Sreerama N. Soluble and bound phenolics of two different millet genera and their milled fractions: Comparative evaluation of antioxidant properties and inhibitory effects on starch hydrolysing enzyme activities. **J Functional Foods** 2017; 35:693-685.
- [19] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biol Int** 2006; 160: 40-1.
- [20] Truswell AS. Cereal grain and coronary heart disease. **Eur J Clin Nutr** 2002; 56(1): 4-1.
- [21] Tehranipour M, Sabzalizade M. Effect of *Cannabis sativa* alcoholic extract on hippocampus neuronal density in Rats. **J Gorgan Univ Med Sci** 2011; 13(2): 15-9. [in Persian]
- [22] Behnam-rasouli M, Nikravesh M, Mahdavi N, Tehranipour M. Post-Operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alpha motoneurons, using a stereological counting method (disector). **Iran Biomedical J** 2000; 4(1): 45-9.
- [23] Kempermann G, Kuhn H.G, Gage F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature** 1997; 386: 495-493.
- [24] Gage F. Brain repair yourself. **Scientific American** 2003; 289(3): 95-87.
- [25] Rendeiro C, Rhodes JS, Spencer JP. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. **Neurochem Int** 2015; 89: 139-126.

- [26] Wang H, Wang H, Cheng H, Che Z. Ameliorating effect of luteolin on memory impairment in an Alzheimer's disease model. *Mol Med Rep* 2016; 13: 4220-15.
- [27] Oberbauer E, Urmann C, Steffenhagen C, Bieler L, Brunner D, Furtner T, et al. Chroman-like cyclic prenylflavonoids promote neuronal differentiation and neurite outgrowth and are neuroprotective. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 1962-53.
- [28] Macready AL, Kennedy OB, Ellis JA, Williams CM, Spencer JP, Butler LT. Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes Nutr* 2009; 4: 227-42.
- [29] Ashrafpour M, Parsaei S, Sepehri H. Quercetin improved spatial memory dysfunctions in rat model of intracerebroventricular streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease. *Natl J Physiol* 2015; 5: 411-5.
- [30] Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer PE. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr* 2008; 3(3-4): 115-26.
- [31] Pocernich CB, Lange ML, Sultana R, Butterfield DA. Nutritional approaches to modulate oxidative stress in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8: 469-52.
- [32] Lei X, Chao H, Zhang Z, Lv J, Li S, Wei H, et al. Neuroprotective effects of quercetin in a mouse model of brain ischemic/reperfusion injury via anti-apoptotic mechanisms based on the Akt pathway. *Mol Med Rep* 2015; 12: 3696-88.
- [33] Abd El, Baky AE. Quercetin protective action on oxidative stress, sorbitol, insulin resistance and  $\beta$ -cells function in experimental diabetic rats. *IJPSR* 2011; 2(2): 7-1.
- [34] Heo HJ, Lee CY. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem* 2004; 52(25): 7514-7.
- [35] Sriraksa N, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tiamkao S, Brown K, Chaisiwamongkol K. Cognitive-Enhancing Effect of Quercetin in a Rat Model of Parkinson's Disease Induced by 6-Hydroxydopamine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM). 2012; 2012.
- [36] Rattray M. Is there nicotinic modulation of nerve growth factor? Implications for cholinergic therapies in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2001; 49(3): 185-93.
- [37] Kosaka K, Yokoi T. Carnosic Acid, a component of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1620-2.
- [38] Rajasekaran NS, Nithya M, Rose C, Chandra TS. The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1689(3-4): 190-201.