

The effect of essential oil of *Salvia mirzayanii* on learning and memory in mice using the passive avoidance learning methods

Khoshnoud MJ^{1*}, Moein MR², Rafati A³, Memar-Kermani AH⁴

1- Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I. R. Iran.

2- Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I. R. Iran.

3- Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I. R. Iran.

4- Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, International Branch, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I. R. Iran.

Received January 29, 2014; Accepted May 4, 2014

Abstract:

Background: In traditional medicine, many herbal medicines like *lamiaceae* family are used as treatment for dementia. Lamiaceae family has many pharmacological effects including antioxidant, anti-cholinesterase, antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory and enhancing cognition and memory. *Salvia mirzayanii* is one of the species of this family and has been used as an herbal medicine for many years. The purpose of this study was to examine the effect of essential oil of *S. mirzayanii* on learning and memory in mice using the two passive avoidance methods.

Materials and Methods: The aerial parts of the plant were dried in shade and essential oils were obtained using clevenger apparatus. The active components in the essential oils of the plant were also identified using the gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). One-hundred and forty mice classified into different groups ($n=10$) were received certain doses of diazepam (0.5, 1 and 1.5 mg/kg) or the essential oil of *S. mirzayanii* (0.48, 0.96 and 1.92 mg/kg) by gavage tube. The step-down and step-through latencies were used to evaluate the learning and memory.

Results: *S. mirzayanii* essential oil significantly increased the step-down and step-through latency times in both methods ($P<0.01$).

Conclusion: Essential oil of *S. mirzayanii* can enhance learning and memory in mice and it has the potential of protection against Alzheimer and dementia.

Keywords: *Salvia mirzayanii*, Memory, Learning, Cholinesterase, Alzheimer

* Corresponding Author.

Email: khoshnoudm@sums.ac.ir

Tel: 098 917 318 0387

Fax: 098 711 242 4126

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences October, 2014; Vol. 18, No 4, Pages 317-324

بررسی اثرات اسانس گیاه مرو تلخ (*Salvia mirzayanii*) بر یادگیری و حافظه موش سوری در آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال

*^۱ محمد جواد خشنود ، محمود رضا معین ، علی رفعتی ، امیر حسام معمار کرمانی

خلاصه:

سابقه و هدف: در طب سنتی گیاهان مختلفی از جمله گیاهان خانواده مریم‌گلی برای درمان فراموشی استفاده می‌شوند. گیاهان این خانواده دارای اثرات گوناگون فارماکولوژیکی از جمله آنتی‌اسیدانی، آنتی‌کولین استرازی، ضد میکروبی، ضد التهابی بوده و دارای خاصیت بهبود شناخت و حافظه می‌باشند. گیاه مرو تلخ یکی از گونه‌های مریم‌گلی است که از گذشته کاربردهای دارویی داشته است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات غلظت‌های مختلف اسانس سرشاخه‌های گیاه مرو تلخ بر حافظه و یادگیری موش سوری در دو مدل فارماکولوژیکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از تایید گونه گیاه سرشاخه‌ها در سایه خشک شده و به کمک دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شدند. با استفاده از کروماتوگرافی کازی- طیف سنجی جرمی، ترکیبات اسانس شناسایی گردید. صد و چهل راس موش سوری به صورت اتفاقی در گروه‌های ۱۰ تایی و قفس‌های جدالگاهه قرار داده شدند و دیازیام (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا اسانس (۰/۴۸، ۰/۹۶ و ۰/۹۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت تک دوز به حیوان خورانده شد و آزمون یادگیری و حافظه توسط دو مدل Step-down latency و Shuttle box avoidance انجام شد.

نتایج: اسانس مرو تلخ به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) باعث افزایش تأخیر زمانی در هر دو آزمون یادگیری و حافظه گردید. نتیجه گیری: اسانس گیاه مرو تلخ توانست افزایش معنی‌داری در حافظه و یادگیری موش‌ها ایجاد کند و شاید بتواند در افزایش حافظه و جلوگیری از بروز آزاریم در انسان موثر باشد.

وازگان کلیدی: مرو تلخ، حافظه، یادگیری، کولین استراز، آزاریم

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۳، صفحات ۳۲۴-۳۱۷

و دیدگاه آخر، جلوگیری از تخریب هرچه بیشتر سلول‌های نورونی می‌باشد [۱]. آزاریم شایع‌ترین علت فراموشی محسوب می‌شود. فراموشی یک نشانگان بالینی است که با یک سلسله علایم و نشانه‌ها شامل اختلال حافظه، اختلال در تکلم، تغییرات روان شناختی و روان پزشکی و اختلال در فعالیت‌های روزمره زندگی تظاهر می‌کند. آنالیز محتوای نوروترانسمیترها در کورتکس مغز نشان می‌دهد که ۶۰-۹۰ درصد بیماران مبتلا به آزاریم دچار نقص در محتوای استیل کولین می‌باشند که در اثر آتروفی شدن نورون‌های کولینرژیک ایجاد می‌شود [۲]. انسان‌ها همواره به طبیعت به عنوان منبع نامتناهی از الهمات، جهت داشتن زندگی سالم‌تر توجه داشته‌اند. یکی از بخش‌های مهم موجود در طبیعت، گیاهان می‌باشند که به‌دلیل داشتن طیف وسیعی از خواص بیولوژیک همیشه به عنوان غذا و دارو مورد توجه بوده‌اند. در فرهنگ‌های گوناگون، طب جایگزین مانند استفاده از گیاهان دارویی برای درمان فراموشی دارای تنوع و گوناگونی زیادی است. سیستم طب سنتی در درمان فراموشی شامل مصرف گیاهان از خانواده‌های کاسنی و نعناعیان می‌باشد [۳]: گیاهان موجود در خانواده مریم‌گلی دارای اثرات گوناگون فارماکولوژیکی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به خاصیت آنتی‌اسیدانی، آنتی‌کولین استرازی، ضد

مقدمه

آلزالیم عبارت است از یک بیماری پیش‌رونده همراه با تخریب سلول‌های مغزی که با درجات مختلفی از فراموشی، تا فراموشی کامل خود شخص بیمار، همراه بوده و طبیعتاً با یک فراموشی ساده تفاوت دارد. مکانیسم ایجاد این بیماری دقیقاً مشخص نشده، اما می‌دانیم که در این بیماری آنزیم استیل کولین ترانسفراز و نیز شاخص‌های فعالیت عصبی کولینرژیک به طرز چشم‌گیری کاهش می‌یابد. به طور کلی ۳ دیدگاه برای بهبود و درمان بیماری آلزالیم وجود دارد. دیدگاه اول جلوگیری از تشکیل پلاک‌های بتا-آمیلوئید است. دیدگاه دوم استفاده از مهار کننده‌های استیل کولین استراز و بوتریل کولین استراز می‌باشد.

دانشیار، گروه فارماکولوژی- توکسیکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی

شیراز

۲ دانشیار، گروه فارماکوگنوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۳ دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۴ دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، واحد بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شیراز

*نشانی نمی‌سده مسئول:

شیراز، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی- توکسیکولوژی

تلفن: ۰۹۱۷ ۳۱۸۰۳۸۷ - ۰۷۱۱ ۲۴۴۳۱۲۶

پست الکترونیک: khoshnoudm@sums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۴ تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۹

بعد از خشک کردن گیاه، برگ‌های آن توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآورده شد تا سطح تماس آنها با حلال جهت استخراج هرچه بیشتر و سریع‌تر مواد موثره افزایش یابد. برای هریار اسانس‌گیری، بعد از آسیاب کردن گیاه، ۱۵۰ گرم از پودر آن را در بالن تقطیر ۲ لیتری وارد کرده و با اضافه نمودن یک لیتر آب مفطر، درون شوف بالن قرار داده و با دستگاه اسانس‌گیری کلونجر بهروش تقطیر با آب، اسانس گیاه تهیه شد.

کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC/ MS)

جهت جداسازی اسانس‌ها از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مجهز به ستون موئینه HP-5MS استفاده گردید. برنامه دمایی این دستگاه به این ترتیب بود که دمای آون ابتدا روی ۶۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد، سپس با سرعت ۵ درجه بر دقیقه تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد افزوده شد و ۱۰ دقیقه در این دما قرار گرفت. گاز حامل مورد استفاده هلیم با سرعت ۱mL/min بود. جهت شناسایی ترکیبات از طیف سنج جرمی با ولتاژ یونیزاسیون eV70 استفاده شد. محدوده وزنی m/z600-30 بود. تشخیص عمدۀ ترکیبات اسانس‌ها بر اساس مقایسه RT و KI و طیف Adams جرمی هر ترکیب با کتابخانه‌ی (n17) Willey و کتاب ۲۰۰۴ صورت گرفت. شناسایی کیفی اجزا با محاسبه شاخص‌های بازداری آنها با تزریق آلکان نرمال-n-نرمال (C10-C21) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس صورت گرفت.

حیوانات

هر بخش از آزمایش روی ۷۰ سر موش سوری (مجموعاً ۱۴۰ سر) با وزن ۳۰ - ۲۵ گرم انجام گرفت. موش‌ها به‌جز در طول آزمایش، به غذای استاندارد و آب دسترسی داشتند. به‌منظور انجام مطالعه موش‌ها به‌صورت اتفاقی در قفس‌های جداگانه قرار داده شده و به‌مدت نیم ساعت به حال خود رها شدند تا به شرایط محیط آزمایش عادت کنند. برای هر دوز دارو از ۱۰ سر موش استفاده شد و هر حیوان تنها یک بار به‌کار گرفته شد. کلیه آزمایش‌ها در دانشکده داروسازی واحد بین‌الملل شیراز انجام گرفت.

داروها

از روغن خوراکی بادام به‌عنوان حلال استفاده شد و محلول‌هایی از اسانس با غلظت‌های ۰/۹۶، ۰/۹۸ و ۱/۹۲ میلی گرم در ۱۰ میلی لیتر و دیازپام با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در ۱۰ میلی لیتر تهیه شد. حجم تجویز به هر حیوان ۱۰ میلی لیتر

میکروبی، ضد سرطان، ضد التهابی و بهبود قابلیت شناخت و حافظه اشاره کرد [۴]. گیاه مرو تلخ نیز یکی از گونه‌های مریم گلی است که از گذشته کاربردهای زیادی در تغذیه و درمان‌های دارویی داشته است. برای عصاره و اسانس تهیه شده از بخش‌های مختلف این جنس اثرات آنتی اکسیدانی [۵] و محافظت سیستم عصبی [۶] گزارش شده است. طی سال‌های اخیر مطالعات بسیاری جهت بررسی اثرات گیاهان مختلف بر حافظه و یادگیری صورت گرفته است. در یک مطالعه عصاره الکلی گیاه Salvia officinalis با دوز ۵۰ mg/kg به‌صورت درون صفاقی به موش تزریق شد و نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان‌دهنده خواص بالقوه این گیاه در تقویت حافظه بود [۳]. گونه‌های مختلفی از خانواده مریم گلی نیز دارای اثر مهاری بر آنزیم استیل کولین استراز هستند و می‌توانند سطح استیل کولین را افزایش دهند [۷]. هم‌چنین، در بررسی‌های انجام گرفته در مغز بیماران فوت شده به‌علت آزادیمر، افزایش شدید رادیکال‌های آزاد در بخش پیشانی و گیجگاهی ملاحظه شده و شواهد جدید نشان‌دهنده نقش رادیکال‌های آزاد در بروز بیماری آزادیمر است [۸]. بنابراین، با توجه به خواص آنتی اکسیدانی و محافظت سیستم اعصاب گیاه مرو تلخ، این گونه می‌تواند در درمان بیماری آزادیمر نقش داشته باشد [۵]. داروهای مهارکننده کولین استراز (تاکرین، دونیزیل، ریواستیگمین، و گالاتامین) می‌توانند موجب تداخلات دارویی با تظاهرات متفاوت شوند و دارای عوارض متعددی از جمله تهوع، استفراغ، اسهال، کاهش وزن و سمیت کبدی می‌باشند [۲]. با توجه به مشکلات حاصل از تداخلات دارویی و عوارض جانبی داروهای مورد استفاده در درمان این بیماری و عدم وجود درمان موثر و کم عارضه برای بیماری مذکور، روی آوردن به یافتن داروهای جدید و موثر و با عوارض کمتر ناگزیر می‌نماید. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر اسانس گیاه مرو تلخ بر یادگیری و حافظه موش سوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها جمع آوری گیاه

سرشاخه‌های گیاه مرو تلخ قبل از گل‌دهی طی ماه‌های بهمن و اسفند از حوالی شهرستان لامرد استان فارس (ارتفاع ۵۰۰ متری از سطح دریا) جمع آوری شده و پس از شناسایی گیاه، نمونه‌ای از آن با شماره هرباریوم PM-503 در دانشکده داروسازی شیراز نگهداری شد. گیاه جمع آوری شده در سایه و دمای مناسب برای خشک شدن قرار گرفت. گیاه به شکل گستره، در شرایط سایه و جریان هوا، بدون استفاده از حرارت خشک شد.

طراحی شده است. کل دستگاه در یک اتاق تاریک که قابلیت حذف صدای زمینه‌ای را دارد، قرار می‌گیرد. در ابتدا به حیوان اجازه داده می‌شود تا به مدت ۵ دقیقه درون دستگاه بگردد و جستجو کند، در حالی که در میانی باز است [۱۰]. جهت اجرای مرحله یادگیری، موش در حالی که پشتیش به سمت در گیوتینی بود در داخل اتاق تاریک قرار گرفت، ۱۰ ثانیه بعد درب گیوتینی بالا کشیده شد؛ بعد از ورود موش به ناحیه تاریک در بسته شد و شوک الکتریکی با شدت ۲/۰ میلی آمپر به مدت ۲ ثانیه به کف پای حیوان اعمال گردید. پس از آن حیوان از اتاق تاریک خارج شده و بر اساس این که در کدام گروه قرار داشت ترکیب مورد نظر (اسانس، دیازپام یا حامل) بر مبنای دوزهای بیان شده در بالا به صورت خوارکی به حیوان گواژ شد و حیوان به قفس برگردانده شد. به منظور ارزیابی حافظه، ۲۴ ساعت بعد از دریافت شوک الکتریکی حیوان دوباره در داخل اتاق روشن در حالی که دریچه بین دو اتاق باز است، قرار داده شد و تاخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک ثبت گردید. سقف زمانی در این مرحله ۳۰۰ ثانیه بود و طولانی‌تر بودن تاخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک نشانه یادگیری و حافظه بهتر می‌باشد [۱۰].

بررسی آماری داده‌ها

در هر آزمون رفتاری، پس از بدست آوردن درصد اختلاف در هر گروه (قبل از تزریق و بعد از تزریق)، یافته‌ها توسط نرم افزار (Version 20) SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و پس آزمون Dunnet مورد بررسی قرار گرفت و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در انسانس‌گیری از گیاه مرو تلخ از ۱۰۰ گرم پودر ابتدایی نهایتاً یک گرم انسانس بدست آمد. راندمان این مرحله ۱ درصد وزنی-وزنی بود. نوع و میزان ترکیبات شناسایی شده موجود در انسانس گیاه مرو تلخ تهیه شده به روش تقطیر با آب به ترتیب خروج از ستون GC در جدول شماره ۱ قید شده است. ترکیبات شناسایی شده انسانس مرو تلخ ۹۱/۵ درصد بوده است که از این میزان ۲۸/۵ درصد را مونوتربنپن‌ها و ۶۱/۲ درصد ترکیبات را سسکوئی‌ترپن‌ها تشکیل می‌دهند. ترکیبات اصلی گیاه شامل ۱/۸ Eudesm-7(11)-en-4-ol (درصد)، Cineolee (۱۵/۱ درصد)، Spathulenol (۹/۷ درصد) و (۹/۵ درصد)- α -Terpinenyl (درصد) بود (جدول شماره ۱).

از هر غلظت به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان در نظر گرفته شد. حیوانات به صورت اتفاقی در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. گروه‌ها به طور جداگانه و در قفس‌های مجزا نگهداری شدند.

آزمون‌های فارماکولوژی

آزمون Step-down

در ابتدا حیوانات درون جعبه آزمون قرار داده شدند تا ۵ دقیقه به صورت آزادانه فعالیت داشته باشند. یک ساعت پس از این آشنازی، هر موش به آرامی بر روی سکوی چوبی قرار داده شد. هنگامی که موش از سکو پایین آمده و آخرین دست یا پای خود را پایین گذاشته و تمام پنجه‌های حیوان بر روی شبکه سیمی قرار گرفت شوک الکتریکی به مدت ۱۶ ثانیه اعمال شد؛ جریان الکتریکی وارد شده به سیم‌ها از طرف استیمولاپور مشخصات زیر را داشت: مربعی شکل با فرکانس ۰/۵ هرتز و طول مدت هر پالس ۰/۵ ثانیه. سپس حیوان برداشته شده و بر اساس این که در کدام گروه قرار داشت ترکیب مورد نظر (اسانس، دیازپام به عنوان کنترل مثبت و حامل) بر مبنای دوزهای بیان شده در بالا به حیوان خورانده شد و حیوان به قفس برگردانده شد و ۲۴ ساعت بعد آزمون یادگیری انجام گرفت [۹]. ۲۴ ساعت پس از آموزش، هر موش مجدداً روی سکوی چوبی قرار گرفت. با کرونومتر دستی زمان ماندن حیوان بر سکوی چوبی اندازه‌گیری شد. به محض پایین آمدن حیوان از سکو به شکلی که چهار دست و پا روی سیم‌های کف دستگاه قرار گرفت، زمان سنج متوقف و زمان ثبت شد. این زمان (Step-down latency) به عنوان میزان یادگیری موش می‌باشد. هرچه مدت آن بیشتر باشد به عنوان یادگیری بیشتر تلقی می‌شود. آزمایش حداقل تا ۳۰۰ ثانیه ادامه داشت [۹].

آزمون رفتاری یادگیری اجتنابی غیر فعال (Passive Avoidance Learning Test)

ابزار مورد استفاده در این آزمون (دستگاه شاتل باکس) شامل یک جعبه مستطیلی شکل در ابعاد ۱۵ در ۵۰ سانتی‌متر مربع و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر با دیوارهایی از جنس پلکسی گلاس بود. این دستگاه هم‌چنین دارای یک پوشش فلزی الکتریکی در کف است. جعبه به وسیله یک دیوار به دو قسم تقسیم شده و دارای یک در گیوتینی متحرک در ابعاد ۱۰ در ۱۰ سانتی‌متر در میان جعبه است که به صورت دستی باز و بسته می‌شود. یک منع شوک مقاومتی ثابت به همراه یک کلید خودکار هم به دستگاه وصل است. در این دستگاه یک سیستم خودکار برنامه ریزی شده برای ایجاد شرایط تحریک و غیر تحریک (برای شرطی کردن موش)

بررسی اثرات اسانس گیاه مرو تلخ ... (*Salvia mirzayani*)

جدول شماره ۱ - ترکیبات شناسایی شده از اسانس گیاه مرو تلخ تهیه شده به روش تقطیر با آب به ترتیب خروج از ستون GC

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد ترکیب (وزنی-وزنی)	دسته پندی نوع ماده
۱	Thujene	۹۳۰	۰/۲۱	Monoterpene
۲	α -Pinene	۹۳۸	۰/۲۲	Monoterpene
۳	Sabinene	۹۷۶	۰/۲۶	Monoterpene
۴	β -Pinene	۹۸۰	۰/۲۰	Monoterpene
۵	β -Myrcene	۹۹۰	۰/۲۶	Monoterpene
۶	Dehydro-1,8-cineolee	۹۹۱	۰/۲۲	Monoterpene
۷	α -Terpinene	۱۰۱۸	۰/۱۰	Monoterpene
۸	p-Cymene	۱۰۲۷	۰/۷۰	Monoterpene
۹	Limonene	۱۰۳۱	۰/۳۱	Monoterpene
۱۰	1,8 Cineolee	۱۰۳۵	۱/۱۳	Monoterpene
۱۱	γ -Terpinene	۱۰۶۲	۰/۱۶	Monoterpene
۱۲	cis-Sabinene hydrate	۱۰۷۰	۰/۱۰	Monoterpene
۱۳	α -Terpiolene	۱۰۸۸	۰/۲۰	Monoterpene
۱۴	Linalool	۱۱۰۰	۱/۶۰	Monoterpene
۱۵	Trans-verbenol	۱۱۵۰	۰/۱۰	Monoterpene
۱۶	Nerol oxide	۱۱۵۸	۰/۱۰	Monoterpene
۱۷	Pinocarvone	۱۱۶۸	۰/۰۵	Monoterpene
۱۸	Terpin-4-ol	۱۱۸۱	۰/۰۱	Monoterpene
۱۹	α -Terpineol	۱۱۹۳	۰/۱۲	Monoterpene
۲۰	Trans-Carveol	۱۲۲۲	۰/۲۰	Monoterpene
۲۱	Linalyl acetate	۱۲۵۹	۲/۰۴	Monoterpene
۲۲	Decanol	۱۲۷۳	۰/۲۱	Monoterpene
۲۳	α -Terpinenyl acetate	۱۳۵۰	۰/۰۰	Monoterpene
۲۴	Neryl acetate	۱۳۶۷	۰/۲۳	Monoterpene
۲۵	α -Copaene	۱۳۸۱	۰/۱۵	Sesquiterpene
۲۶	β -Elemene	۱۳۹۶	۱/۱۱	Sesquiterpene
۲۷	α -Gurjuene	۱۴۰۶	۱/۲۴	Sesquiterpene
۲۸	δ -Selinene	۱۴۲۰	۱/۰۰	Sesquiterpene
۲۹	Calarene	۱۴۳۵	۰/۰۶	Sesquiterpene
۳۰	α -Guaiene	۱۴۴۸	۰/۰	Sesquiterpene
۳۱	α -neo-Clovene	۱۴۵۷	۰/۱۳	Sesquiterpene
۳۲	α -Humulene	۱۴۶۱	۰/۱۰	Sesquiterpene
۳۳	Seychellene	۱۴۶۴	۰/۶۱	Sesquiterpene
۳۴	allo-Aromadendrene	۱۴۶۸	۰/۱۰	Sesquiterpene
۳۵	Dodecanol	۱۴۷۰	۰/۱۷	Sesquiterpene
۳۶	γ -Muurolene	۱۴۸۰	۰/۸۰	Sesquiterpene
۳۷	β -Selinene	۱۴۹۷	۰/۹۰	Sesquiterpene
۳۸	Bicyclo-Germacrene	۱۵۰۳	۰/۲۵	Sesquiterpene
۳۹	α -Bulnesene	۱۵۱۲	۰/۳۰	Sesquiterpene
۴۰	γ -Cadinene	۱۵۲۰	۱/۰	Sesquiterpene
۴۱	δ -Cadinene	۱۵۳۰	۰/۷۲	Sesquiterpene
۴۲	Cadina-1,4-diene	۱۵۳۹	۰/۱۲	Sesquiterpene
۴۳	Spathulenol	۱۵۸۷	۰/۷۰	Sesquiterpene
۴۴	Caryophyllene oxide	۱۵۹۱	۰/۶۰	Sesquiterpene
۴۵	Veridiflorol	۱۵۹۸	۰/۰۲	Sesquiterpene
۴۶	1,10-di-epi -Cubenol	۱۶۲۲	۰/۱۲	Sesquiterpene
۴۷	10-epi- Eudesmol	۱۶۲۸	۰/۱۰	Sesquiterpene
۴۸	1-epi- Cubenol	۱۶۳۰	۰/۴۰	Sesquiterpene
۴۹	Muurolol	۱۶۵۰	۲/۰۰	Sesquiterpene
۵۰	β -Eudesmol	۱۶۵۷	۱/۸۳	Sesquiterpene
۵۱	α -Cadinol	۱۶۶۳	۰/۴۰	Sesquiterpene
۵۲	1-tetra Decanol	۱۶۷۹	۰/۲۴	Sesquiterpene
۵۳	Eudesm-7(11)-en-4-ol	۱۶۹۲	۱/۰/۱۱	Sesquiterpene
۵۴	1-hexa Decanol	۱۶۸۰	۰/۱۰	Sesquiterpene
۵۵	epi-13Monyl oxide	۲۰۱۰	۰/۰۳	Sesquiterpene

رفتاری یادگیری اجتنابی غیر فعال نیز (Avoidance learning test) در جدول شماره ۲ آمده است. همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، دیازپام در دوزهای ۱ (P<0.05) و ۱/۵ میلی گرم توانسته به طور معنی‌داری باعث کاهش زمان اقامت حیوان در منطقه روشن شده (P<0.01) و اسانس در دوز ۱/۹۲ میلی گرم توانسته به طور معنی‌داری باعث افزایش این زمان تاخیر شود (P<0.01).

مقایسه نتایج گروه‌های درمانی و کنترل در آزمون شاتل باکس در جدول شماره ۲ قید شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود دیازپام در دوزهای ۱ و ۱/۵ میلی گرم توانسته است به طور معنی‌داری باعث کاهش زمان اقامت حیوان در منطقه روشن شده (P<0.05) و اسانس در دوز ۱/۹۲ میلی گرم توانسته به طور معنی‌داری باعث افزایش این زمان تاخیر شود (P<0.01). نتایج بدست آمده در گروه‌های درمانی و کنترل در دستگاه Step down در آزمون

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج گروه‌های درمانی و کنترل در آزمون‌های رفتاری Shuttle box و Step down

گروه	Shuttle box	آزمون	Step down
کنترل	۱۵/۸۷±۲/۷۲	۴۶/۲۸±۸	
۰/۵mg/kg دیازپام	۱۲/۳۳±۱/۹۲	-۲/۴۵±۱۰/۱۰	
۱ mg/kg دیازپام	-۳/۶۶±۲/۷۸*	-۱۷±۱۲/۲۵*	
۱/۵mg/kg دیازپام	-۳/۶۶±۳/۴۷*	-۱/۰۸۲±۷/۶۶	
۰/۴۸mg/kg اسانس	۱۴/۶۶±۱/۷۶	۴۳/۶۴±۱۴	
۰/۹۶ mg/kg اسانس	۳۱±۶/۳۷	۹۲/۶۹±۱۲/۹۱	
۱/۹۲mg/kg اسانس	۴۰/۲۸±۸/۹۰**	۱۲۲/۶۶±۲۵/۴۲ **	

مقادیر نشان‌دهنده اختلاف زمان تاخیر قبل و بعد از تزریق در هر گروه می‌باشد. تمام گروه‌ها با گروه کنترل مقایسه شده‌اند.

*: اختلاف معنی‌دار (P<0.05). **: اختلاف معنی‌دار (P<0.01)

است و نشان داده شده که یک دوز ۴۰۰ میلی گرم از عصاره این گیاه سبب افزایش کیفیت حافظه می‌گردد. در همین مطالعه به نقش کلیدی ترپنوبیدها به عنوان ترکیباتی موثر در درمان بیماری آزاریmer Shuttle اشاره شده است [۱۶]. در مطالعه حاضر از دو دستگاه Step down box و Shuttle box برای بررسی حافظه و یادگیری موش‌ها استفاده شد. تفاوت بر جسته‌ای که در مطالعه حاضر با سایر مطالعات مربوط به بررسی حافظه وجود داشت، استفاده از دو مدل فارماکولوژیک است. این در حالی است که در بیشتر مطالعات از یک مدل استفاده شده است. هم‌چنین، استفاده از غلظت‌های مختلف اسانس و دیازپام برای هر مدل فارماکولوژیک امکان بررسی و مقایسه بیشتر را فراهم می‌سازد. سه مرحله یادگیری و حافظه عبارتند از: یادگیری (Acquisition)، ذخیره اطلاعات (Storage) و یادآوری (Retrieval). در ابتدا، اطلاعات باید یاد گرفته شود، سپس این اطلاعات باید برای استفاده بعدی ذخیره شود و در نهایت، فرد باید بتواند اطلاعات ذخیره شده را به یاد آورد. اگر ترکیبی باعث اختلال در هر کدام از مراحل فوق شود، باعث می‌شود که نتوان اطلاعات را به یاد آورد. هر چند در ابتدا تصور می‌شد که بنزودیازپین‌ها بر مرحله Acquisition اثر می‌گذارند، ولی تحقیقات نشان داده است که هر سه مرحله می‌توانند توسط بنزودیازپین‌ها آسیب بینند [۱۷]. مطالعات قبلی نشان داده

بحث

در این مطالعه اثرات اسانس گیاه مرو تlux با غلظت‌های مختلف، بر حافظه و یادگیری موش سوری در دو مدل فارماکولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که سایر گونه‌های مریم‌گلی همچون S. lavandulaefolia [۱۱]، S. leriiifolia [۱۲]، S. fruticosa [۱۳] و S. triloba [۱۴] اثرات تقویت کننده سیستم کولینرژیک و افزایش دهنده حافظه و یادگیری می‌باشند. در یک مطالعه اثر آنتی‌کولین استرازی و آنتی-اسیدانی عصاره Salvia tiliifolia با داروی گالانتامین مقایسه شد و نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که این گونه توانایی مهار کولین استراز را دارد و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای داروهای مهار کننده کولین استراز مورد استفاده قرار گیرد [۱۵]. هم‌چنین، در مطالعه‌ای که بر روی اسانس S. lavandulaefolia صورت گرفت، اثرات فارماکولوژیک درمان فراموشی مشاهده شد. در همین قابل توجهی در بیماران مبتلا به فراموشی مشاهده شد. در همین مطالعه عارضه جانبی خاصی گزارش نشده است، فقط افزایش ناچیز فشار خون پس از مصرف کپسول‌های حاوی اسانس گیاه Panax ginseng قابل توجه بود [۱۱]. مطالعه دیگری بر روی گیاه

در موثر بودن گیاه مرو تلخ در افزایش حافظه دخیل هستند. در انها پیشنهاد می شود که از دیگر مدل های مورد استفاده برای آزمون های یادگیری و حافظه، نظری ماز آبی موریس نیز استفاده شود. هم چنین، استفاده از دستگاه های box shuttle و Step down مجهز به دوربین و زمان سنج خودکار میزان خطا را تا حد زیادی کاهش می دهد. بعلاوه، پیشنهاد می شود در کنار اسانس از عصاره گیاه مرو تلخ نیز استفاده گردد. اسانس ها با روش های مختلف مانند کروماتوگرافی ستونی جهت شناسایی ترکیبات موثر، فراکسیونه، تفکیک و آنالیز شوند و هر فراکسیون جداگانه مورد بررسی قرار بگیرد. شناخت هر فراکسیون و جدا کردن ترکیبات آن به نوبه خود، اطلاعات جدیدی در مورد ترکیبات را به دست می دهد و دریچه ای تازه متهی به ترکیبات دارای اثر آنتی کولین استراز را می گشاید.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که اسانس مرو تلخ باعث افزایش حافظه و یادگیری در موش های سوری می شود و بررسی های بیشتر جهت درک مکانیسم این اثر ضروری است. هر چند این اثر را به راحتی نمی توان به انسان نیز تعیین داد، ولی شاید در آینده بتواند به عنوان یک درمان کمکی در افزایش حافظه و جلوگیری از آرزوایم در انسان مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکترای حرفه ای آقای امیر حسام معمار کرمانی با شماره ۱۵ در دانشکده داروسازی واحد بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شیراز می باشد که هزینه آن از طرف معاونت محترم پژوهشی واحد بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شیراز پرداخت شده است. بدین وسیله از آن معاونت تشکر می شود. هم چنین، از سرکار خانم مهندس کرمی به پاس همکاری در تعیین مقدار و شناسایی اجزاء اسانس به کمک دستگاه کرومato-توگرافی گازی قدردانی می شود.

References:

- [1] Wong KK, Ho MT, Lin HQ, Lau KF, Rudd JA, Chung RC, et al. Cryptotanshinone, an acetylcholinesterase inhibitor from *Salvia miltiorrhiza*, ameliorates scopolamine-induced amnesia in Morris water maze task. *Planta Med* 2010; 76(3): 228-34.
- [2] Alldredge BK, Koda-Kimble MA, Young LY, Kradjan WA, Guglielmo BJ. Applied therapeutics: the clinical use of drugs. Philadelphia: Wolters

است که دیازپام و لورازپام باعث اختلال در یادگیری می شوند و فلورازپام باعث اختلال در تثیت و ذخیره اطلاعات می شود [۱۸]. پدیده LTP در هیپوکامپ، پایه و اساس الکتروفیزیولوژیکی یادگیری و حافظه است و دیازپام می تواند باعث کاهش LTP در منطقه CA1 هیپوکامپ شود [۱۹]. اسانس گیاه مرو تلخ با دوز ۱/۹۲ میلی گرم بر کیلوگرم توانست به طور موثر زمان پایین آمدن موش از روی سکو را به تأخیر بیاندازد. به بیان دیگر میزان حافظه و یادگیری موش ها در این گروه حدود دو برابر افزایش داشت. هم چنین، دیازپام با دوز های ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش زمان پایین آمدن موش از روی سکو شد (کاهش یادگیری و حافظه). برای ترکیب Spathulenol که یک ترپنیک الکل است خاصیت آنتی کولین استراز گزارش شده است [۲۰]. مطالعه ای که توسط Kennedy و همکاران بر روی روی انجام گرفته است حاکی از افزایش قابل توجه کیفیت حافظه می باشد. در این تحقیق مصرف خوراکی اسانس این گیاه باعث بهبود کارایی حافظه به خصوص ۱ ساعت بعد از انجام تست شده است. نتیجه این مطالعه نشان می دهد مصرف این گیاه سبب افزایش هوشیاری و بیداری مغز می شود [۲۱]. هم چنین، در یک مطالعه دیگر که بر روی *S. lavandulaefolia* صورت گرفته است اثرات آنتی اکسیدانی ترکیباتی همچون linalool 1,8-cineole, α -pinene به اثبات رسیده است [۱۱]. با توجه به بررسی های قبلی [۲۱,۲۰,۱۲] و مسجل بودن اثرات آنتی کولین استراز، آنتی-اکسیدانی و افزایش دهنده حافظه ترکیباتی نظری Spathulenol و 1,8-cineole و از آن جا که اسانس گیاه مرو تلخ دارای ۱۵/۱۰ درصد ۱,8-Eudesm-7(11)-en-4-ol و ۱۱/۳۳ درصد Bicyclo-6/۲۵, cineole درصد ۹/۷۰ درصد α -terpinenyl germacrene می باشد، اگر چه اثرات درمانی این گیاهان قابل انتظار است، اما نمی توان به قطع یقین این اثرات درمانی را صرفا محدود و مربوط به ماده خاصی دانست. نکته دیگر اینکه وجود مواد مختلف در کنار هم و اثر هم افزایی آنها را نمی توان نادیده گرفت، بنابراین عوامل گوناگونی

Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

[3] 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(3): 321-6.

[4] Kamatou GP, Makunga NP, Ramogola WP, Vilgoen AM. South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *J Ethnopharmacol* 2008; 119(3): 664-72.

- [5] Moein MR, Moein S, Ahmadizadeh S. Radical scavenging and reducing power of *Salvia mirzayanii* subfractions. *Molecules* 2008; 13(11): 2804-13.
- [6] Asadi S, Khodagholi F, Esmaeili MA, Tusi SK, Ansari N, Shaerzadeh F, et al. Chemical composition analysis, antioxidant, antiglycating activities and neuroprotective effects of *S. choloroleuca*, *S. mirzayanii* and *S. santolinifolia* from Iran. *Am J Chinese Med* 2011; 39(3): 615-38.
- [7] 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. *Neuropsychopharmacol* 2005; 31(4): 845-52.
- [8] Sonnen JA, Larson EB, Gray SL, Wilson A, Kohama SG, Crane PK, et al. Free radical damage to cerebral cortex in Alzheimer's disease, microvascular brain injury, and smoking. *Ann Neurol* 2009; 65(2): 226-9.
- [9] Vogel HG. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. Berlin: Springer; 2002.
- [10] van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, De Filippis D, et al. Endocannabinoids and β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(12): 1410-24.
- [11] Perry NS, Bollen C, Perry EK, Ballard C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol Biochem Be* 2003; 75(3): 651-9.
- [12] Mahdy K, Shaker O, Wafay H, Nassar Y, Hassan H, Hussein A. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16(3 Suppl): 31-42.
- [13] Savelev SU, Okello EJ, Perry EK. Butyryl and acetyl cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytother Res* 2004; 18(4): 315-24.
- [14] Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Menichini F, Bonesi M, Nadjafi F, et al. *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates in vitro antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity. *Nutr Res* 2010; 30(12): 823-30.
- [15] Adewusi E, Moodley N, Steenkamp V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S Afr J Bot* 2011; 77(3): 638-44.
- [16] Yoo KY, Park SY. Terpenoids as potential anti-Alzheimer's disease therapeutics. *Molecules* 2012; 17(3): 3524-38.
- [17] Buffet J, Stewart SH. Cognitive and sedative effects of benzodiazepine Use. *Curr Pharm Design* 2002; 8(1): 45-58.
- [18] Jensen RA, Martinez JL, Vasquez BJ, McGaugh JL. Benzodiazepines alter acquisition and retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Psychopharmacol* 1979; 64(1): 125-6.
- [19] Mori K, Togashi H, Kojima T, Matsumoto M, Ohashi S, Ueno Ki, et al. Different Effects of Anxiolytic Agents, Diazepam and 5-HT1A Agonist tandospirone, on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 69(3-4): 367-72.
- [20] Zhengwen Yu, Bochu W, Fumei Y, Qianyun S, Zhannan Y, Liancai Z. Chemical Composition and Anti-acetylcholinesterase Activity of flower essential oils of *artemisia annua* at different flowering stage. *Iran J Pharm Res* 2011; 10(2): 265-71.
- [21] Kennedy DO, Dodd FL, Robertson BC, Okello EJ, Reay JL, Scholey AB, et al. Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults. *J Psychopharmacol* 2011; 25(8): 1088-100.