

## اثر عصاره اسفناج (*Spinacia oleracea L.*) بر اختلال حافظه و اضطراب القا شده توسط استرس مزمن بی حرکتی در رت‌های نر

معصومه تاراسی: کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه فیزیولوژی جانوری، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.  
\*معصومه اصل‌روستا: استادیار، گروه فیزیولوژی جانوری، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران. (\*نویسنده مسئول). mrousta@iauz.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۹

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** اسفناج (*Spinacia oleracea L.*) اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدآپوپتوتیک و محافظت‌کننده عصبی دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره هیدروالکلی اسفناج بر اختلال یادگیری و حافظه فضایی و اضطراب القا شده توسط استرس مزمن بی حرکتی در موش‌های صحرایی نر بالغ است.

**روش کار:** ۶۰ سر رت نر نژاد ویستار به ۶ گروه شامل کنترل، اسفناج ۲۰۰ و اسفناج ۴۰۰ (که روزانه با عصاره هیدروالکلی اسفناج در دوزهای ۴۰۰/۲۰۰ و ۴۰۰/۴۰۰ گاواژ شدند)، استرس (تحت ۶ ساعت استرس بی حرکتی در روز به مدت ۲۱ روز متوالی)، استرس-اسفناج ۲۰۰ و استرس-اسفناج ۴۰۰ (که علاوه بر استرس بی حرکتی، عصاره اسفناج دریافت نمودند) تقسیم شدند. یادگیری و حافظه فضایی و اضطراب حیوانات به ترتیب توسط ماز آبی موریس و ماز بعلاوه مرتفع مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** استرس مزمن بی حرکتی موجب اختلال در یادگیری و حافظه فضایی و بروز اضطراب شد. مدت زمان و مسافت سپری شده برای رسیدن به سکوی پنهان در گروه‌های استرس-اسفناج در مقایسه با گروه استرس کاهش معنی‌داری داشت (به ترتیب  $P < 0/01$  و  $P < 0/05$ ). همچنین مصرف عصاره اسفناج، موجب افزایش معنی‌دار مدت زمان و مسافت شناخته در ربع دایره هدف در مقایسه با گروه استرس شد (به ترتیب  $P < 0/01$  و  $P < 0/05$ ). مصرف هر دو دوز عصاره اسفناج به افزایش معنی‌دار درصد ورود به بازوی باز و درصد زمان ماندن در بازوی باز در حیوانات گروه‌های استرس-اسفناج در مقایسه با گروه استرس منجر گردید (به ترتیب  $P < 0/01$  و  $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** عصاره اسفناج احتمالاً به علت محتوای غنی آنتی‌اکسیدانی، موجب بهبود یادگیری و حافظه فضایی و کاهش اضطراب در موش‌های مواجهه شده با استرس بی حرکتی می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** اسفناج (*Spinacia oleracea L.*)، حافظه، اضطراب، استرس بی حرکتی، رت

### مقدمه

قرار دارند هزینه کم و دسترسی آسان باعث شده است که کاربرد درمانی آنها مورد مطالعه قرار بگیرد. اسفناج (*Spinacia oleracea L.*) از خانواده Chenopodiaceae یک گیاه یک ساله روزبلند و بومی آسیا می‌باشد. از ترکیبات شیمیایی موجود در اسفناج می‌توان فلاونوئیدهای مختلف، ترکیبات فنلی، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها (A، E، C، K و اسید فولیک) و مواد معدنی را نام برد (۷). بررسی‌ها نشان داده است که اسفناج دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، هیپولیپیدمی، ضدالتهابی، ضدآپوپتوز و محافظت‌کننده عصبی است. عصاره اسفناج می‌تواند التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو ناشی از لیپوپولی‌ساکارید را در مغز موش سوری کاهش دهد و تا حد زیادی از مرگ نورونی در مغز میانی جلوگیری نماید (۱۰-۸). با توجه به اثرات محافظتی که از اسفناج

استرس بی حرکتی یکی از قوی‌ترین انواع استرس‌ها است که در طولانی مدت به سیستم‌های مختلف بدن، بخصوص سیستم عصبی مرکزی آسیب وارد نموده و به پیدایش اختلالاتی نظیر نقص حافظه و رفتارهای اضطرابی منجر می‌شود (۱،۲). بررسی‌ها نشان داده است که استرس مزمن بی حرکتی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن را تضعیف می‌کند و موجب پیدایش استرس اکسیداتیو/نیتروزیو و التهاب عصبی در مغز بخصوص در هیپوکامپ می‌شود که با اختلال حافظه و پیدایش رفتارهای اضطرابی و بیماری‌های نورودژنراتیو در ارتباط است (۳-۶). بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری و درمان اضطراب و اختلال حافظه ناشی از استرس سودمند است. امروزه گیاهان به علت دارا بودن مقادیر فراوانی آنتی‌اکسیدان مورد توجه

یک دوربین نیز در بالای تانک تعبیه شده است. در روز ۱۶ هر حیوان به مدت ۱۲۰ ثانیه به جهت سازش با محیط آزمون در داخل تانک شنا کرد. سپس ۴ روز متوالی (روز ۱۷ تا ۲۰) به یادگیری اختصاص یافت و در هر روز، ۴ دوره متوالی برای آموزش در نظر گرفته شد. در هر دوره، موش از یکی از ۴ ربع دایره در داخل آب قرار می‌گرفت و ۹۰ ثانیه فرصت داشت تا سکوی پنهان را بیابد و پس از یافتن سکو و یا در پایان ۹۰ ثانیه به حیوان اجازه داده می‌شد تا به مدت ۲۰ ثانیه (S) بر روی سکو بنشیند. مسافت طی شده (cm) و زمان سپری شده (S) تا رسیدن به سکوی پنهان، توسط کامپیوتری که به دوربین متصل بود ثبت شد (برای بررسی میزان یادگیری حیوانات). کاهش این دو فاکتور به معنی افزایش سطح یادگیری است. در روز ۲۱، آزمون پروب جهت بررسی حافظه فضایی حیوانات انجام گرفت. در این آزمون، سکوی پنهان برداشته و به حیوان اجازه داده می‌شد تا ۶۰ ثانیه در داخل تانک شنا کند. مسافت طی شده (cm) و زمان سپری شده (S) در ربع دایره هدف (ربع دایره‌ای که در روزهای آموزش، سکوی پنهان را در خود جای داده بود) ثبت می‌شد. افزایش این دو فاکتور به معنی افزایش سطح حافظه است (۱۳).

پس از پایان دوره ۲۱ روزه، آزمون ماز بعلاوه مرتفع برای بررسی سطح اضطراب حیوانات مورد استفاده قرار گرفت. ماز بعلاوه از دو بازوی باز و دو بازوی بسته (هر یک به طول ۵۰ و عرض ۱۰ سانتی متر) تشکیل شده است. بازوهای بسته توسط دیواره‌هایی به ارتفاع ۴۰ سانتی متر احاطه شده اند و در محل اتصال ۴ بازو، مربعی به مساحت ۱۰×۱۰ قرار دارد. ماز در ارتفاع ۵۰ سانتی متری از سطح زمین قرار دارد و یک لامپ ۱۰۰ واتی در ارتفاع ۱۲۰ سانتی متری از ماز تعبیه شده است. رفتار هر حیوان فقط یک بار در ماز بعلاوه مرتفع مورد بررسی قرار گرفت. حیوان در مربع وسط قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه اجازه حرکت در بازوها را داشت. تعداد ورود به هر بازو و زمان ماندن در هر بازو ثبت گردید و درصد ورود به بازوی باز (OAE) و درصد زمان ماندن در بازوی باز (OAT) محاسبه شد. افزایش این دو فاکتور به معنی کاهش سطح اضطراب حیوان است (۲).

مطالعات آماری با استفاده از SPSS v.18 انجام و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شد. جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات از One-way ANOVA و Tukey و HSD post hoc استفاده شد و برای بررسی یادگیری

گزارش شده است فرض می‌شود که بتواند آسیب‌های عصبی ناشی از استرس را نیز کاهش دهد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره هیدروالکلی برگ اسفناج بر یادگیری و حافظه فضایی و اضطراب در رت‌های نر بالغ مواجه شده با استرس مزمن بی‌حرکتی می‌باشد.

## روش کار

این تحقیق از نوع بنیادی است. ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم در شرایط استاندارد حیوان‌خانه (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی گراد و دسترسی به آب و غذای کافی) نگهداری شدند. آزمایش‌ها با توجه به قوانین مربوط به نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت. حیوانات به ۶ گروه برابر تقسیم شدند:

(۱) گروه کنترل: حیواناتی که تحت هیچ گونه تیماری قرار نگرفتند.

(۳و۲) گروه اسفناج ۲۰۰ و ۴۰۰: عصاره هیدروالکلی اسفناج را با دوزهای ۲۰۰mg/kg یا ۴۰۰ به مدت ۲۱ روز متوالی به صورت گاواژ دریافت نمودند (۱۱).

(۴) استرس: به مدت ۲۱ روز متوالی هر روز ۶ ساعت در مقیدکننده قرار گرفتند (۱۲).

(۶و۵) استرس-اسفناج ۲۰۰: علاوه بر قرارگرفتن در مقیدکننده، عصاره را با دوزهای ۲۰۰mg/kg یا ۴۰۰ دریافت نمودند.

برای تهیه عصاره از برگ خشک شده اسفناج که در مزارع شهرستان خدابنده کشت و توسط گروه گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان تأیید شد استفاده گردید. ۱۰۰ گرم از پودر برگ خشک شده و ۳۰۰ میلی لیتر الکل ۷۰ درصد در داخل یک بشر به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت و محلول مورد نظر، پس از گذراندن از کاغذ صافی، جهت حذف حلال در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در روتاری قرار گرفت. سپس با افزودن آب مقطر، دوزهای ذکر شده از عصاره تهیه شد و با حجم ۰/۴ میلی لیتر برای هر گاواژ به حیوان خوراندند.

آزمون ماز آبی موریس در روزهای ۱۶ تا ۲۱ انجام گرفت. ماز آبی موریس از یک تانک مدور (به ارتفاع ۶۰ cm و قطر ۱۳۰ cm) محتوی آب تشکیل شده که به طور فرضی به ۴ ربع دایره تقسیم می‌شود و یک سکوی پنهان را در شمال شرقی تانک، ۱ cm زیر سطح آب قرار دارد. علامت‌هایی نظیر چند عکس در اطراف تانک قرار دارد و

کمتر بود (به ترتیب  $p < 0/01$  و  $p < 0/001$ ) (نمودار ۲). مسافت سپری شده توسط حیوانات هر دو گروه استرس-اسفناج ۲۰۰ و ۴۰۰ در ربع دایره هدف در مقایسه با گروه استرس افزایش معنی داری داشت ( $p < 0/05$ ) و زمان سپری شده در ربع دایره هدف در این گروه ها نیز به طور معنی داری بیشتر از گروه استرس بود ( $p < 0/01$ ) (نمودار ۲). یادگیری و حافظه فضایی در گروه‌های اسفناج ۲۰۰ و ۴۰۰ تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت.

نتایج حاصل از آزمون ماز بعلاوه مرتفع نیز بیان‌گر بروز اضطراب در گروه استرس بود به طوری که درصد OAE و OAT در این گروه در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی داری داشت (به ترتیب  $p < 0/001$  و  $p < 0/05$ ) (نمودار-۳). درصد OAE و OAT در هر دو گروه استرس-اسفناج در مقایسه با گروه استرس افزایش چشمگیری یافت (به ترتیب  $p < 0/01$  و  $p < 0/05$ ) (نمودار ۳). درصد OAE و OAT در گروه‌های اسفناج ۲۰۰ و ۴۰۰ تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. رفتار حرکتی حیوانات (مجموع ورود به بازوهای باز و بسته) در گروه‌های مختلف اختلاف معنی داری نداشت (نتایج نشان داده نشده است).

### بحث و نتیجه‌گیری

فضایی بین روزهای اول و چهارم، t-Test به کار گرفته شد.  $p < 0/05$  به عنوان سطح معنی داری نتایج در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

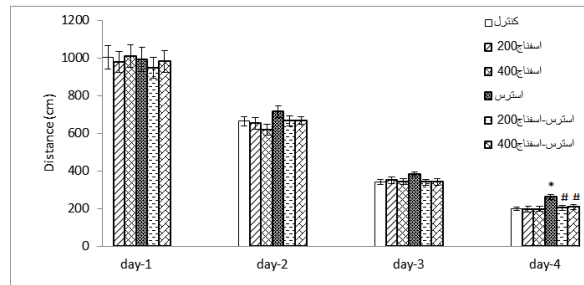
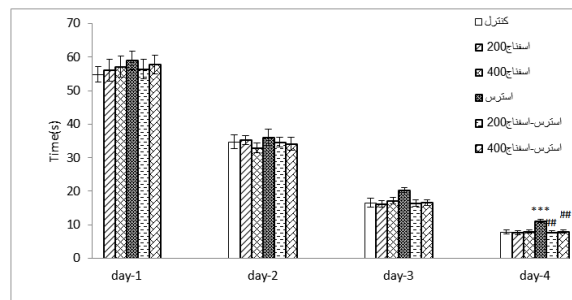
نتایج حاصل از آزمون ماز آبی موریس نشان داد که یادگیری در همه گروه‌ها انجام گرفته است. میانگین مدت زمان و مسافت سپری شده برای رسیدن به سکوی پنهان در روز چهارم در مقایسه با روز اول در همه گروه‌ها کاهش چشمگیری نشان داد ( $p < 0/001$ ) (جدول ۱).

در روز چهارم آموزش، میانگین مسافت و زمان طی شده در گروه استرس در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی داری داشت (به ترتیب  $p < 0/05$  و  $p < 0/001$ ) و میانگین مسافت و زمان سپری شده برای رسیدن به سکو توسط هر دو گروه استرس-اسفناج در مقایسه با گروه استرس به طور چشمگیری کاهش یافت (به ترتیب  $p < 0/05$  و  $p < 0/01$ ) (نمودار ۱).

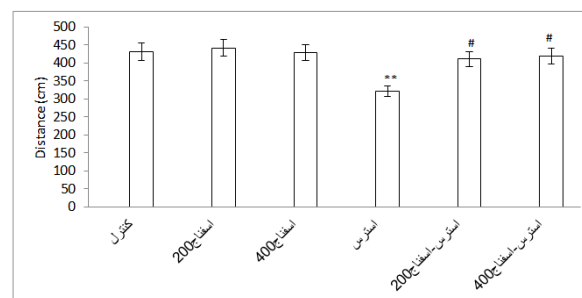
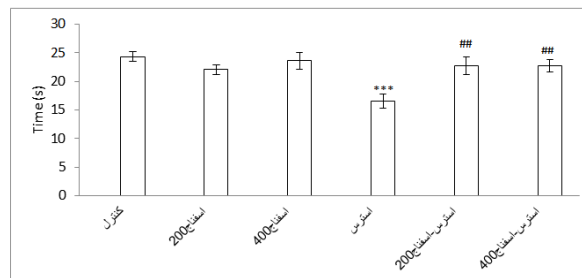
نتایج حاصل از آزمون پروب نیز نشان‌دهنده کاهش سطح حافظه فضایی در حیوانات گروه استرس در مقایسه با کنترل بود به طوری که مسافت و زمان سپری شده در ربع دایره هدف در گروه استرس، در مقایسه با گروه کنترل

جدول ۱- بررسی روند یادگیری حیوانات، بر اساس میانگین زمان و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در روز اول و چهارم آزمون ماز آبی موریس که با استفاده از t-Test مقایسه شده است. در هر گروه ۱۰ حیوان قرار دارد.

گروه	مسافت شنا شده برای رسیدن به سکو			زمان سپری شده برای رسیدن به سکو		
	انحراف معیار $\pm$ میانگین	روز ۴	P<	انحراف معیار $\pm$ میانگین	روز ۴	P<
کنترل	روز ۱	۱۹۸/۹	۰/۰۰۱	روز ۱	۷/۸۳	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
اسفناج ۲۰۰	روز ۱	۸/۴۴	۰/۰۰۱	روز ۱	۲/۲۳	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
اسفناج ۴۰۰	روز ۱	۱۹۶/۳	۰/۰۰۱	روز ۱	۵۶/۱۱	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
استرس	روز ۱	۱۵/۴۱	۰/۰۰۱	روز ۱	۳/۳۱	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
استرس-اسفناج ۲۰۰	روز ۱	۱۲/۸۷	۰/۰۰۱	روز ۱	۵۷/۱۷	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
استرس-اسفناج ۴۰۰	روز ۱	۲۶۰/۱	۰/۰۰۱	روز ۱	۳/۲۲	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
کنترل	روز ۱	۹۹۳	۰/۰۰۱	روز ۱	۵۹/۰۲	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
استرس-اسفناج ۲۰۰	روز ۱	۱۲/۵۰	۰/۰۰۱	روز ۱	۲/۷۵	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
استرس-اسفناج ۴۰۰	روز ۱	۲۰۲/۷	۰/۰۰۱	روز ۱	۵۶/۵۱	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
کنترل	روز ۱	۱۳/۶۶	۰/۰۰۱	روز ۱	۲/۹۲	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
استرس-اسفناج ۲۰۰	روز ۱	۲۰۶/۱	۰/۰۰۱	روز ۱	۵۷/۸۲	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	
استرس-اسفناج ۴۰۰	روز ۱	۱۲/۴۵	۰/۰۰۱	روز ۱	۲/۸۲	۰/۰۰۱
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	



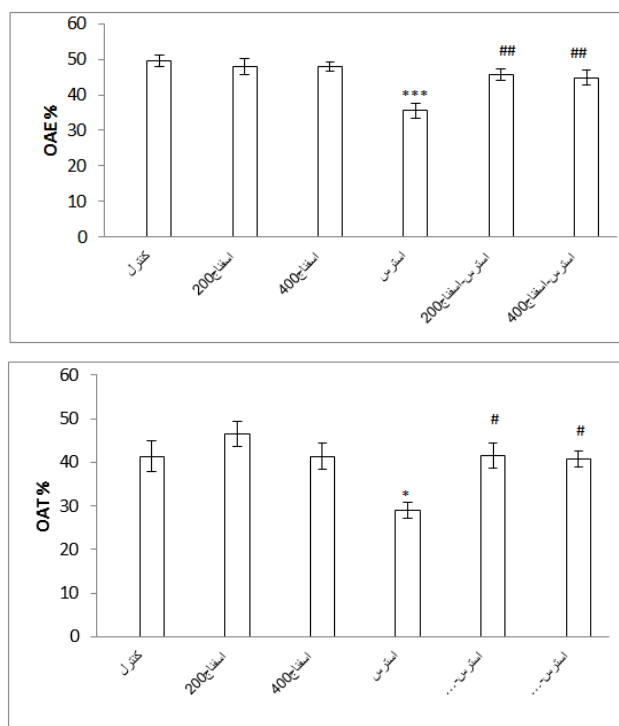
نمودار ۱- بررسی تأثیر عصاره اسفناج بر یادگیری فضایی حیوانات مواجه شده با استرس مزمن بی حرکتی با استفاده از آزمون ماز آبی موریس. حیوانات به مدت ۲۱ روز متوالی با استرس بی حرکتی مواجه شدند و عصاره را به صورت گاوژ دریافت نمودند. در روز ۲۰-۱۷ آزمایش، آموزش انجام گرفت. الف) زمان سپری شده و ب) مسافت شنا شده برای دستیابی به سکوی پنهان، در چهار روز آموزش ثبت شد و در گروه‌های مختلف، مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است. ۱۰ سر حیوان در هر گروه قرار دارد.  $p < 0.05$  \* و  $p < 0.001$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل،  $p < 0.05$  # و  $p < 0.01$  ## در مقایسه با گروه استرس.



نمودار ۲- بررسی تأثیر عصاره اسفناج بر حافظه فضایی حیوانات مواجه شده با استرس مزمن بی حرکتی با استفاده از آزمون ماز آبی موریس. در روز ۲۱ دوره آزمایش، آزمون پروب با برداشتن سکوی پنهان انجام گرفت. الف) زمان سپری شده و ب) مسافت شنا شده در ربع دایره هدف در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است. ۱۰ سر حیوان در هر گروه قرار دارد.  $p < 0.05$  \* و  $p < 0.001$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل و  $p < 0.05$  # و  $p < 0.01$  ## در مقایسه با گروه استرس.

هدف در آزمون پروب، حافظه این حیوانات را نیز مختل نماید که طبق مطالعات پیشین، احتمالاً با نقص در Long term potentiation (LTP) (۱۴)، التهاب عصبی (۱۵)، کاهش سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) در هیپوکامپ، آتروفی نورونی بخصوص در نورون‌های پیرامیدال CA3، آپوپتوز نورون‌های هیپوکامپ و کاهش

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استرس مزمن بی حرکتی به مدت ۲۱ روز متوالی توانسته است با افزایش میانگین مدت زمان و مسافت سپری شده برای رسیدن به سکوی پنهان در ماز آبی موریس در روزهای آموزش موجب کاهش یادگیری فضایی این حیوانات شود و با کاهش مدت زمان و مسافت سپری شده در ربع دایره



نمودار ۳- بررسی تأثیر عصاره اسفنجان بر رفتار اضطرابی موش‌های تحت استرس مزمن بی حرکتی با استفاده از آزمون ماز بعلاوه مرتفع. آزمون پس از پایان دوره ۲۱ روزه آزمایش انجام گرفت. الف) درصد ورود به بازوی باز (OAE%)، ب) درصد زمان گذارنده شده در بازوی باز (OAT%) را نشان می‌دهد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است و در هر گروه، ۱۰ سر موش قرار دارد.  $p < 0.001$  و  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل،  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه استرس.

ترکیبات به واسطه فعال شدن مسیره‌های سیگنالینگ در سلول نظیر مسیر MAPK (پروتئین‌کیناز فعال شده با میتوزن) از فعال‌سازی میکروگلیا و رهاسازی سایتوکاین‌ها و در نتیجه از التهاب عصبی جلوگیری می‌کنند (۱۹) به علاوه فلاونوئیدها با افزایش بیان BDNF در هیپوکامپ، موجب تقویت حافظه فضایی در جوندگان می‌شوند (۲۰). همچنین ترکیبات کاروتنوئیدی مانند لوتئین و بتاکاروتن و ویتامین‌ها (که قبلاً به حضور آنها در اسفنجان اشاره شد) خاصیت انتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوتیک در نورون‌ها دارند (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴) و با افزایش سطح گلوتاتیون و تحریک فعالیت سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون S- ترانسفراز و کاتالاز و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، از استرس اکسیداتیو القا شده توسط استرس بی حرکتی در مغز رت جلوگیری می‌کنند (۲۳) امروزه کاروتنوئیدها به علت ممانعت از تولید و تجمع بتامیلوئید و جلوگیری از استرس اکسیداتیو، مهار آزادسازی عوامل التهابی و تقویت نمودن حافظه، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل پیشگیری و درمان‌کننده الزایمر پیشنهاد شده‌اند (۲۲) از سوی دیگر اسفنجان یکی از گیاهانی است که خاصیت انتی‌کولین استرازی دارد (۲۴) و با توجه به آن که سطح کولین استراز

حجم آن (۱۷، ۱۶) بر اثر استرس مزمن بی حرکتی در ارتباط است.

همچنین نتایج نشان داد که یادگیری و حافظه فضایی در هر دو گروه استرس-اسفنجان ۲۰۰ و ۴۰۰ در مقایسه با گروه استرس به طرز چشمگیری بهبود یافت. نتایج حاصل از یک تحقیق نشان داد که تزریق درون صفاقی عصاره اسفنجان (دوز ۵۰ mg/kg) آسیب‌های ناشی از لیپوپلی‌ساکارید را در مغز موش سوری کاهش می‌دهد. عصاره اسفنجان توانست فعالیت کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز را در مغز موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید کاهش داده و از کاهش گلوتاتیون پراکسیداز ممانعت نموده، از کاهش وزن مغز جلوگیری نماید، بیان  $IL-1\beta$ ،  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  را در مغز کاهش دهد و همچنین از مرگ نورونی در ناحیه مغز میانی این حیوانات جلوگیری کند (۱۰) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر در یک راستا می‌باشد. اسفنجان سرشار از فلاونوئیدهایی چون کوئرستین، میریستین، کامفرول، آپیژنین و لوتئولین است (۷) فلاونوئیدهای مختلف، نورون‌ها را از استرس اکسیداتیو و مرگ نورونی ناشی از سمیت تحریکی گلوتامات نجات می‌دهند (۱۸). این

اکسیدانی در مغز موش‌های تحت استرس و اثر عصاره اسفناج بر آن، از کاستی‌های مطالعه حاضر محسوب می‌شود.

در مجموع نتیجه گیری می‌شود که عصاره هیدروالکلی اسفناج به دلیل دارا بودن محتوای غنی آنتی اکسیدانی خود احتمالاً با مهار استرس اکسیداتیو و تعدیل سیستم نوروترنس میتری در مغز توانسته است از بروز اختلال یادگیری و حافظه فضایی و اضطراب در موش‌های صحرایی مواجه شده با استرس مزمن بی‌حرکتی ممانعت نماید.

### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از استادان و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان که در مراحل عملی این تحقیق ما را یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌شود.

### منابع

1. Raju T. Chronic restraint stress impairs acquisition and retention of spatial memory task in rats. *Current Sci*; 2000. 79(11): 1581-1584.
2. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety-and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*; 2012.39(1): 112-119.
3. Liu J, Wang X, Shigenaga M, Yeo H, Mori A, Ames B. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J*; 1996. 10(13): 1532-1538.
4. Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev*; 2009. 2(2): 63-67.
5. Rivat C, Becker C, Blugeot A, Zeau B, Mauborgne A, Pohl M, et al. Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. *Pain*; 2010. 150(2): 358-368.
6. Jangra A, Sriram CS, Dwivedi S, Gurjar SS, Hussain MI, Borah P, et al. Sodium phenylbutyrate and edaravone abrogate chronic restraint stress-induced behavioral deficits: implication of oxidonitrosative, endoplasmic reticulum stress cascade, and neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol*; 2017. 37(1): 65-81.
7. Metha D, Belemkar S. Pharmacological activity of *Spinacia eleracea* linn. A complete overview.

در مغز بر اثر استرس بی‌حرکتی افزایش می‌یابد (۲۵). ویژگی آنتی کولین استرازی همراه با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی اسفناج (۷) را می‌توان به عنوان برخی از دلایل احتمالی بهبود حافظه در حیوانات گروه‌های استرس-اسفناج در تحقیق حاضر در نظر گرفت.

نتایج حاصل از آزمون ماز بعلاوه مرتفع نشان داد که استرس مزمن بی‌حرکتی با کاهش معنی دار درصد OAE و OAT، موجب بروز اضطراب در رت‌ها شد و تیمار ۲۱ روزه عصاره هیدروالکلی اسفناج در موش‌های تحت استرس، تا حد زیادی توانست از کاهش درصد OAE و OAT ممانعت نموده و سطح اضطراب این حیوانات را کاهش دهد.

استرس مزمن بی‌حرکتی موجب افزایش زواید دندریتی در هسته بازولترال آمیگدال می‌شود و با تقویت پلاستی سیتی ساختاری در نورون‌های آمیگدال در نهایت به بروز اضطراب منجر می‌گردد (۱۷). البته استرس اکسیداتیو ناشی از بی‌حرکتی هم نقش عمده‌ای در پیدایش اضطراب در این حیوانات دارد (۴). بنابراین به نظر می‌رسد که ترکیبات آنتی اکسیدانی اسفناج با جلوگیری از استرس اکسیداتیو و تقویت سیستم آنتی اکسیدانی بدن (علاوه بر بهبود حافظه فضایی) در مهار اضطراب نیز ایفای نقش می‌کنند. از طرفی اثرات ضداضطرابی بسیاری از ترکیبات موجود در اسفناج نظیر کوئرستین (۲۶) آپیژنین (۲۷)، کامفرول (۲۸)، ویتامین E (۲۹) و لوتئولین (۳۰) نیز گزارش شده است. اثر ضداضطرابی کوئرستین و کامفرول از طریق تقویت سیستم GABA<sub>A</sub> و گیرنده سروتونینی 1-A انجام می‌گیرد (۳۱). ضمناً GABA از جمله ترکیبات امینواسیدی است که در اسفناج وجود دارد (۳۲) و این موضوع، فرضیه ضداضطراب بودن اسفناج را تقویت می‌کند. عملکرد حیوانات در تست آموزش و پروب در ماز آبی موریس و آزمون ماز بعلاوه مرتفع در گروه‌های اسفناج، تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. به نظر می‌رسد که اثر محافظت‌کنندگی حافظه و اثر ضداضطرابی که در این تحقیق از اسفناج مشاهده شده است در شرایط استرس ظاهر می‌شود. با توجه به آن که استرس اکسیداتیو موجب اختلالات رفتاری ناشی از استرس (نظیر اختلال حافظه و اضطراب) می‌شود (۵۶) بنابراین عصاره اسفناج احتمالاً با استرس اکسیداتیو مقابله نموده و عملکرد حیوانات تحت استرس را در آزمون‌های آبی موریس و ماز بعلاوه مرتفع بهبود می‌بخشد. بنابراین بررسی فعالیت سیستم آنتی

derived neurotrophic factor. *PLoS one*; 2013. 8(5): e63535.

21. Nataraj J, Manivasagam T, Thenmozhi AJ, Essa MM. Lutein protects dopaminergic neurons against MPTP-induced apoptotic death and motor dysfunction by ameliorating mitochondrial disruption and oxidative stress. *Nutr Neurosci*; 2016. 19(6): 237-246.

22. Honarvar NM, Saedisomeolia A, Abdolahi M, Shayeganrad A, Sangsari GT, Rad BH, et al. Molecular Anti-inflammatory Mechanisms of Retinoids and Carotenoids in Alzheimer's Disease: a Review of Current Evidence. *J Mol Neurosci*; 2017. 61(3): 289-304.

23. Zaidi SKR, Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta*; 2004. 340(1): 229-233.

24. Boğa M, Hacibekiroğlu I, Kolak U. Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. *Pharm Biol*; 2011. 49(3): 290-295.

25. Valuskova P, Farar V, Janisova K, Ondicova K, Mravec B, Kvetnansky R, et al. Brain region-specific effects of immobilization stress on cholinesterases in mice. *Stress*; 2017. 20(1): 53-60.

26. Bouhali IE, Tayaa H, Ouakid ML, Tahraoui A. Quercetin, a Natural Flavonoid, alleviates Fenthion induced Anxiety-like behavior and Depression signs in Male wistar rat. *Adv Biores*; 2014. 5(4): 110-115.

27. Kumar D, Bhat ZA. Apigenin 7-glucoside from *Stachys tibetica* Vatke and its anxiolytic effect in rats. *Phytomedicine*; 2014. 21(7): 1010-1014.

28. Grundmann O, Nakajima JI, Kamata K, Seo S, Butterweck V. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. *Phytomedicine*; 2009. 16(4): 295-302.

29. Desrumaux C, Risold PY, Schroeder H, Deckert V, Masson D, Athias A, et al. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB J*; 2005. 19(2): 296-297.

30. McCall S. Investigation of the anxiolytic effects of luteolin, a lemon balm flavonoid in the male Sprague-Dawley rat. *AANA J*; 2009. 77(1): 33-36.

31. Jung JW, Lee S. Anxiolytic Effects of Quercetin: Involvement of GABAergic System. *J Life Sci*; 2014. 24(3): 290-296.

32. Yoon YE, Kuppusamy S, Kim SY, Kim JH, Lee YB. Free Amino Acid Composition of Korean Spinach (*Spinacia oleracea*) Cultivars as Influenced by Different Harvesting Time. *Korean J Environ Agric*; 2016. 35(2): 104-110.

*AJPRD*; 2014. 2(1): 83-93.

8. Nagar A, Shukla AK, Bigoniya P. Anti-inflammatory potential of *Spinacia oleracea* leaf extract. *J Nat Pharm*; 2011. 2(2): 80-87.

9. Ko S-H, Park J-H, Kim S-Y, Lee SW, Chun S-S, Park E. Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Prev Nutr Food Sci*; 2014. 19(1): 19-26.

10. Sharma N, Kapoor M, Nehru B. *Spinacia oleracea* L. extract protects against LPS induced oxidative stress, inflammatory response and ensuing biochemical, neurochemical and neurobehavioral impairment in mice. *Int J Pharm Pharm Sci*; 2014. 6: 203-210.

11. Kumar Giri R. Hypolipidemic Activity of *Spinacia Oleracea* L. in Atherogenic Diet Induced Hyperlipidemic Rats. *J Biomed Pharm Res*; 2012. 1(1): 39-43.

12. MacDowell K, Caso J, Martín-Hernández D, Madrigal J, Leza J, García-Bueno B. Paliperidone prevents brain Toll-like receptor 4 pathway activation and neuroinflammation in rat models of acute and chronic restraint stress. *Int J Neuropsychopharmacol*; 2015. 18(3): pyu070.

13. Asle-Rousta M, Oryan S, Ahmadiani A, Rahnema M. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by SEW2871 improves cognitive function in Alzheimer's disease model rats. *EXCLI J*; 2013. 12: 449-461.

14. Pavlides C, Nivón LG, McEwen BS. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus*; 2002. 12(2): 245-257.

15. Munhoz C, Garcia-Bueno B, Madrigal J, Lepsch L, Scavone C, Leza J. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Braz J Med Biol Res*; 2008. 41(12): 1037-1046.

16. Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res* 2005; 53(2): 129-139.

17. Vyas A, Mitra R, Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*; 2002. 22(15): 6810-6818.

18. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. *Free Radic Biol Med*; 2001. 30(4): 433-446.

19. Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med*; 2012. 33(1): 83-97.

20. Rendeiro C, Vauzour D, Rattray M, Waffo-Tégou P, Mérillon JM, Butler LT, et al. Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-

## Effect of spinach (*Spinacia oleracea L.*) extract on chronic restraint stress-induced memory deficit and anxiety in male rats

**Masoumeh Tarasi**, MSc, Department of Animal Physiology, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran.

\***Masoumeh Asle-Rousta**, Assistant professor, Department of Animal Physiology, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran (\*Corresponding author). [mrousta@iauz.ac.ir](mailto:mrousta@iauz.ac.ir)

### Abstract

**Background:** Spinach (*Spinacia oleracea L.*) has antioxidant, antiinflammatory, antiapoptotic and neuroprotective properties. The aim of this study was to investigate the effect of spinach hydroalcoholic extract on chronic restraint stress-induced spatial learning and memory deficit and anxiety in adult male rats.

**Methods:** 60 adult male Wistar rats were allocated to six groups: Control group, Spinach200 and Spinach400 groups (were gavaged with hydroalcoholic extract of spinach at 200, 400 mg/ kg/bw doses), Stress group (restrained in restrainers for 6hours per day for 21 consecutive days), Stress-Spinach200 and Stress-Spinach400 groups (received spinach extract in addition to chronic immobility stress). Spatial learning and memory and anxiety were examined through the Morris water maze (MWM) test and elevated plus maze (EPM) respectively.

**Results:** Chronic immobilization stress caused spatial learning and memory impairment and anxiety-like behavior. Escape latency and distance moved to reach the hidden platform had dramatic decrease in Stress-Spinach groups compare with Stress group ( $p<0.01$  and  $p<0.05$  respectively). Consuming both doses of spinach extract caused significant increase in spent time and swam distance in target quadrant by Stress-Spinach groups comparing with stress group ( $p<0.01$  and  $p<0.05$ ). Taking both doses of the extract led to significant increase in percentages of open arm entry and time spent in open arm in EPM test compared with Stress Group ( $p<0.01$  and  $p<0.05$  respectively).

**Conclusion:** It has been concluded that due to rich antioxidant amount in spinach ethanol extract, it can improve spatial learning and memory and reduce anxiety in restraint stress exposed rats.

**Keywords:** Spinach (*Spinacia oleracea L.*), Spatial memory, Anxiety, Restraint stress, Rat