



## بررسی تأثیر داروی جینکو بی لوبا بر روی یادگیری احترازی غیر فعال در رت نر بالغ نژاد ویستار

حیدر آقابابا<sup>۱\*</sup> و راضیه متحدزاده<sup>۲</sup>

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، گروه زیست شناسی، ارسنجان، ایران

مسئول مکاتبات: aqababa@iaua.ac.ir

### چکیده

با توجه به اینکه جینکو بی لوبا یکی از داروهای گیاهی است که در درمان فراموشی استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر داروی گیاهی جینکو بر روی یادگیری احترازی غیرفعال با اندازه‌گیری میزان STL (گذاشتن پاهای حیوان از در گیوتینی) را به عنوان تأخیر در ورود به بخش تاریک در یادگیری احترازی غیرفعال می‌باشد. (Step Through Latency) پودر عصاره جینکو از شرکت اهورا دارو در ایران بدون هیچ گونه ماده افزودنی خریداری شد و بر روی موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار آزمایش صورت گرفت. دوزهای استفاده شده در این تحقیق ۴۰، ۶۵، ۹۰ mg/kg بود که دوز ۶۵mg/kg به عنوان دوز مؤثر انتخاب شد. دستگاه مورد استفاده در این تحقیق دستگاه شاتل باکس می‌باشد. یادگیری احترازی غیرفعال شامل سه مرحله عادت، آموزش و به یادآوری می‌باشد. اساس این نوع یادگیری، برقراری ارتباط بین دو محرک شرطی (تاریکی) و غیرشرطی (شوک الکتریکی) است. دوز مؤثر در این تحقیق دوز ۶۵mg/kg بود که هم سطح کورتیکوسترون و هم سطح STL را افزایش می‌داد.

کلمات کلیدی: حافظه و یادگیری، شاتل باکس، جینکو بی لوبا

### مقدمه

است که با افزایش جریان خون به سمت مغز و توسعه و بهبود ارسال پیام‌های عصبی موجب کاهش نارسایی مغز و علاوه بر این باعث بهبود کار مغز و تقویت حافظه می‌شود [۲]. اسید گاما آمینو بوتیریک (GABA) نوروترانسمیتر مهاری است که در تمام نواحی مغز انسان یافت می‌شود و مشخص شده است که GABA در تعدیل حافظه نقش دارد. جینکو به عنوان آنتاگونیست رقابتی گیرنده‌های GABA نقش مهمی را در تعدیل حافظه ایفا می‌کند [۷].

برگ جینکو دارای طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی گیاهی از قبیل آلکان‌ها، لیپیدها، استرول‌ها، بنزنوئیدها، کاروتنوئیدها، فینیل پروپانوئیدها، کربوهیدرات‌ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها می‌باشد [۵]. اجزاء اصلی عصاره گیاه جینکو، فلاونوئیدها هستند که مونو، دی و تری گلیسیریدها و استرهای کوماریک اسید فلاونول‌های کامپفرول و کوئرستین غالب هستند [۱۳]. مقادیر کمی گلیکوزیدهای ایزورامنتین، میریستین و ۳-متیل میریستین نیز وجود

محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال (HPA) بر حافظه و یادگیری تأثیر مستقیم دارد و با تغییر در میزان فعالیت این محور، میزان حافظه و یادگیری را دچار تغییر می‌کند. از جمله هورمونی که در حافظه و یادگیری دخالت بسزایی دارد هورمون محور HPA یعنی کورتیزول می‌باشد. استرس با فعال کردن کل محور HPA باعث ترشح کورتیزول می‌شود و کورتیزول هم با شروع مجموعه‌ای از اثرات متابولیکی، سعی در دفع آسیب ناشی از استرس می‌نماید. در موارد عدم وجود استرس کورتیزول از طریق فیدبک منفی مستقیماً بر هیپوتالاموس و هیپوفیز خلفی تأثیر گذاشته و ترشح کورتیزول را کاهش می‌دهد [۱].

یکی از این گیاهان که در تقویت حافظه استفاده می‌شود جینکو بی لوبا است. یکی از خواص این گیاه خاصیت آنتی اکسیدانی و پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد و همچنین تأثیر مثبت بر جریان خون خصوصاً در مویرگ‌ها می‌باشد. مکانیسم عمل آن به این صورت

یادگیری احترازی غیرفعال (Passive Avoidance Learning) و دستگاه مورد استفاده شاتل باکس بود که توسط شرکت نورتاب ساخته می‌شود. دستگاه از دو بخش جعبه آموزش (Training Box) و بخش کنترل تشکیل شده است. جعبه آموزش دارای ابعاد  $62 \text{ cm} \times 23 \times 23$  و از ورقه های پلکسی گلاس (Plexy glass) شفاف ساخته شده است. جعبه آموزش دارای دو محفظه کوچک مساوی که توسط دیواره عرضی از هم جدا شده اند. برای تاریک شدن تمام سطح خارجی آن را سیاه می کنند. دریچه مستطیل شکل به ابعاد  $9 \text{ cm} \times 7$  جهت عبور حیوان از دیواره عرضی است. دریچه توسط در گیوتینی باز و بسته می شود. کف محفظه دارای میله فلزی به قطر  $2/5 \text{ cm}$  و با فاصله  $1 \text{ cm}$  از هم می باشد. بخش کنترل کننده دارای پیچ های تنظیم کننده مدت زمان برقراری شوک و میزان شوک از نظر فرکانس، ولتاژ و آمپر است (تصویر ۱).

دارد. فرم های غیر گلیکوزیدی بی فلاونوئیدها، کاتشین ها و پروآنتوسیانیدین ها هم حضور دارند [۱۲]. ترکیبات شاخص این گیاه دی ترین لاکتون های منحصر به فرد شامل جینکولیدها A, B, C, J و M و سزکوئی ترین لاکتون بیلوبالید می باشد [۱۱].

#### مواد و روش کار

در این تحقیق از ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی معین (۱۸۰ تا ۲۳۰ گرم) استفاده شد، و به مدت یک هفته جهت سازش با شرایط محیط در حیوانخانه در شرایط حرارتی  $21 \pm 2$  درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در این زمان حیوانات از غذای موش صحرایی آماده (plat) و آب لوله کشی استفاده گردید. آزمایش در یک ساعت معین انجام می گرفت. مراحل سازش، آموزش و به یادآوری اجرا می شد و پاسخ شرطی احترازی غیرفعال در رت بررسی و ثبت می گردید. روش سنجش حافظه در این تحقیق



تصویر ۱: نمای کلی از دستگاه شاتل باکس

بباید، سپس آن را در قفس انداخته و پس از چند دقیقه حیوان در محفظه روشن گذاشته می شود و پس از ۳۰ ثانیه در گیوتینی باز می گردد. اگر در طول ۲ دقیقه حیوان وارد محفظه تاریک نگردد، جلسه آموزش را خاتمه می داده و در غیر این صورت، مرحله اعمال شوک تکرار می شد.

جلسه به یادآوری (Memory Retention):  
(Session) برای تعیین میزان به یاد آوری حافظه، ۲۴ ساعت بعد از جلسه آموزش، حیوان را در بخش روشن دستگاه قرار داده و پس از گذشت ۳۰ ثانیه در گیوتینی را به آرامی باز نموده و زمانی را که طول می کشد تا حیوان کاملاً وارد بخش تاریک دستگاه شود به عنوان تأخیر در ورود به بخش تاریک یا STL (Step-Through Latency) ثبت می گردد. حداکثر زمانی که برای ورود به محفظه تاریک در نظر گرفته می شود ۶۰۰ ثانیه است.

حیوانات به طور کلی به پنج گروه تقسیم شدند، که این گروه ها عبارتند از:

گروه اول، گروه Control، هیچ دارویی به آنها داده نشده بود، ولی تمام شرایط نگهداری و تغذیه آنها مشابه سایر گروه ها بوده و در دستگاه شاتل باکس قرار گرفتند.

گروه دوم، گروه Sham، به این گروه محلول الکل-سوربیتول که حلال دارو می باشد از طریق گاوآژ خورنده شد.

گروه سوم، رت هایی که دارو با دوز ۴۰ mg/Kg به مدت یک هفته از طریق گاوآژ خورنده شد.

گروه چهارم، رت هایی که دارو با دوز ۶۵ mg/Kg به مدت یک هفته از طریق گاوآژ خورنده شد.

گروه پنجم، رت هایی که دارو با دوز ۹۰ mg/Kg به مدت یک هفته از طریق گاوآژ خورنده شد.

قابل ذکر است که هر گروه شامل ۸ موش بود (N=8 بعد از ساخت محلول، به مدت یک هفته دارو

داروی مورد استفاده در این تحقیق پودر ناشی از عصاره برگ *Ginkgo biloba* - بدون هیچ گونه ماده افزودنی- بود که از شرکت اهورا دارو در ایران تهیه گردید. برای درست کردن دارو ابتدا ۶ گرم پودر جینکو را وزن کرده و در ظرفی می ریزیم و بعد ۱۵ سی سی الکل به آن اضافه کرده و با همزن به هم می زنیم و ۵ سی سی سوربیتول اضافه کرده، این مواد را به هم می زنیم و بعد ۸۰ میلی لیتر آب مقطر به این مواد اضافه می کنیم و به هم می زنیم تا پودر جینکو حل شود.

روش یادگیری احترازی غیر فعال: یادگیری احترازی غیر فعال شامل سه مرحله عادت، آموزش، بیادآوری می باشد.

جلسه عادت (Habituation Session): به منظور عادت دادن، حیوان را در بخش روشن دستگاه قرار داده و پس از ۵ ثانیه در گیوتینی را باز کرده و به محض ورود حیوان به بخش تاریک، در گیوتینی بسته می شود. پس از ۳۰ ثانیه در گیوتینی را باز کرده تا حیوان به محفظه روشن برود و در صورتی که حیوان به محفظه روشن نرفت با دست آن را هدایت می گردد و سپس حیوان را از دستگاه خارج می کنیم. این مرحله پس از ۳۰ دقیقه مجدداً تکرار می گردد. اگر حیوان پس از گذشت ۱۰۰ ثانیه در هر یک از جلسات وارد بخش تاریک نشد آن را حیوان ناآموز به حساب آورده و از ادامه آزمایشات حذف می شود.

جلسه آموزش (Training Session): ۳۰ دقیقه پس از جلسه عادت، برای هدایت آسان تر شوک الکتریکی، پای حیوان به سرم فیزیولوژیک آغشته می گردد. ۳۰ ثانیه بعد در گیوتینی را باز کرده و به محض ورود حیوان به بخش تاریک، در گیوتینی به آرامی بسته و شوک ملایمی به میزان ۱ mA و به مدت ۲۳ ثانیه و فرکانس ۱۰۰ هرتز به پای حیوان اعمال می گردد و صبر می کنیم تا حیوان از محفظه تاریک بیرون

به صورت هیستوگرام ارائه گردید. تفسیرهای آماری به کمک روش تفسیری Tukey, Scheffe صورت گرفت.

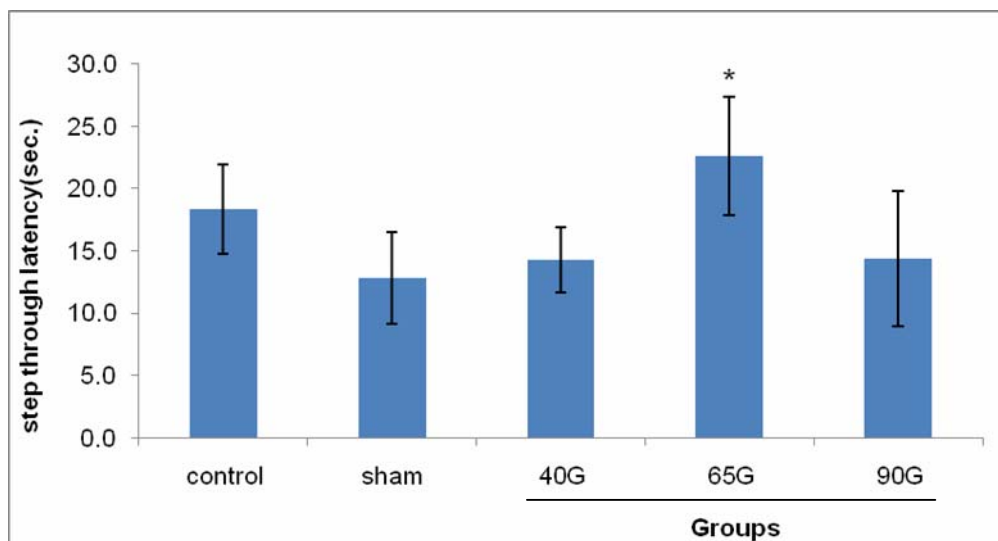
### نتایج

نتایج آنالیز واریانس داده های بدست آمده از مقایسه گروه کنترل و گروه Sham نشان داد که بین این دو گروه تفاوت معناداری وجود ندارد.

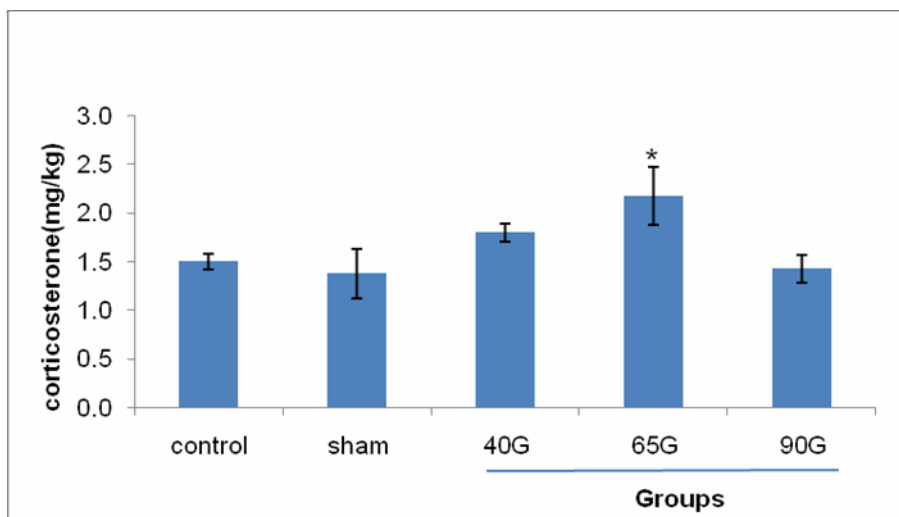
نتایج آنالیز واریانس داده های بدست آمده از مصرف جینکو با دوزهای مختلف ۴۰، ۶۵، ۹۰ mg/kg بر زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهد که مصرف ۴۰ mg/kg و ۹۰ mg/kg عصاره جینکو روزانه به مدت یک هفته قبل از آموزش در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نشان ندادند، ولی در دوز ۶۵ mg/kg تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده شده و این دوز به عنوان دوز مؤثر شناخته شده است.

به صورت گاوآژ به رت ها خورانده شد، بعد از یک هفته رت ها را در دستگاه شاتل باکس قرار داده و مرحله عادت، آموزش، بیادآوری انجام گرفت، در مرحله بیادآوری، مدت زمان ورود به محفظه تاریک یادداشت گردید و بعد از آن خون گیری از قلب انجام شد. سپس توسط کیت هورمونی که از شرکت پویش طب فارس خریداری شده بود سطح پلاسمائی هورمون کورتیکوسترون اندازه گیری گردید. هورمون کورتیکوسترون به وسیله دستگاه سانتیفریوژ اندازه گیری شد.

روش آماری: به منظور بررسی سطح حافظه و به یادآوری زمان ورود به اتاق تاریک STL، سطح پلاسمائی کورتیکوسترون (بر حسب mg/dl) اندازه گیری شد. با استفاده از آنالیزهای آماری به روش آنالیز واریانس یک عامله، میانگین و خطای استاندارد (mean ± SE) هر گروه تعیین گردید. مرز آماری مورد قبول برای بررسی اختلاف میانگین ها  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده از آزمایشات



نمودار ۱: مقایسه گروه های کنترل، sham و گروه های تجربی دریافت کننده دوزهای ۴۰، ۶۵، ۹۰ mg/kg داروی جینکو، بر روی زمان STL. هر ستون نمایان گر میانگین ± خطای معیار می باشد. اختلاف گروه دریافت کننده جینکو با دوز ۶۵ mg/kg نسبت به بقیه گروه ها و گروه کنترل در  $P < 0.05$  معنادار می باشد. (\*  $P < 0.05$ )



نمودار ۲: مقایسه گروه های کنترل، sham و گروه های تجربی دریافت کننده دوزهای ۹۰، ۶۵، ۴۰ mg/kg داروی جینکو، بر روی سطح پلاسمایی کورتیکوسترون. هر ستون نمایان گر میانگین  $\pm$  خطای معیار می باشد. اختلاف گروه دریافت کننده جینکو با دوز ۶۵mg/kg نسبت به گروه کنترل در  $P < 0.05$  معنی دار می باشد. (\*  $P < 0.05$ )

## بحث

ممانعت می کند و مدت زمان بیشتری طول می کشد که حیوان به بخش تاریک برود. علت اینکه دوز ۶۵mg/kg به عنوان دوز مؤثر در این تحقیق استفاده شد ممکن است این باشد که شاید جینکو تا یک مقدار معینی باعث گشادی رگ شود و در نتیجه خون بیشتری را به مغز برساند و این عمل باعث افزایش حافظه گردد. مطالعات Huang و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که جینکو به عنوان آنتاگونیست رقابتی گیرنده های  $GABA_A$  شناخته شده است [۶]. همچنین Amri و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که جینکو موجب مهار اتصال لیگاند با گیرنده های بنزودیازپینی محیطی شده و این موضوع نشانگر تأثیر جینکو بر کنترل استرس و تقویت حافظه می باشد [۳]. گزارشات Stackman و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان داد که در حیواناتی که دچار بیماری آلزایمر شدند و توسط جینکو معالجه گردیدند حافظه افزایش یافت [۱۰].

جینکو دارای خواص آنتی اکسیدانی است. زیرا باعث تقویت عملکرد پلاکت های خونی، سلول های عصبی و افزایش خون رسانی به سیستم عصبی و مغز می

موضوع یادگیری و حافظه و بهبود آن از مسائل مهم زندگی انسان ها است که به دلیل پیچیدگی و دخالت فاکتورهای متعدد، تحقیقات مربوط به آن همچنان ادامه دارد. از طرفی امروزه استفاده از داروهای گیاهی در معالجه بیماری ها مانند فراموشی و همچنین برای تقویت حافظه شایع می باشد که برای شناخت عوارض و چگونگی تأثیر آن، انجام تحقیقات بیشتر ضروری است. یکی از گیاهان مطرح برای تقویت حافظه و جلوگیری از فراموشی مربوط به سن و یا به دلیل بیماری آلزایمر، عصاره گیاه جینکو می باشد [۲]. از بین دوزهای استفاده شده در این تحقیق (۹۰ mg/Kg، ۶۵ mg/Kg، ۴۰ mg/Kg) دوزی که بیشترین تأثیر را داشته دوز ۶۵ mg/kg بوده که هم از نظر سطح کورتیزول بالاترین سطح را دارد و هم از نظر تأخیر در پا گذاشتن و ورود حیوان به بخش تاریک دستگاه شاتل باکس بیشترین تأثیر را داشته است. در واقع حیوان در جلسه عادت و آموزش یاد گرفته بود که وقتی از بخش روشن به بخش تاریک برود یک شوک به پای او وارد می شود در نتیجه در جلسه یادآوری از رفتن به بخش تاریک



5- Hasler, A et al. (1992), Complex flavonol glycosides from the leaves of *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry* 31:1391.

6- Huang, S. Duke, R. Chebib, M. Sasaki, K. Wada, k. Johnston, GA. (2003), sesquiter Trilacton from *Ginkgo biloba*, is an antagonist at recombinant alpha 1 beta 2 gamma. GABA<sub>A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol.* 46: 41-80.

7- Huang, CC. Hsu, Ks. (2004), Local protein synthesis and GABA receptors regulate the reversibility of long – term potentiation at murine hippocampal mossy fiber- CA3 synapses. *J physiol.* 91-108.

10- Stackman, R. Eckenstein, F. Frei, B. kulhanek, D. Nowlin, J. Quinn, J. (2003), Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic *Ginkgo biloba* treatment. *Exp. Neurol.* 184: 510-520.

11- Sticher, O. (1993), Quality of *Ginkgo* preparations. *Planta medica.* 59:2-11.

12- Sticher, O. (1994), Biochemical pharmaceutical and medical perspectives of *Ginkgo* preparations. In *New Drug Development from Herbal Medicines in Neuropsychopharmacology. Symposium of the 21th CIMP Congress Washington: DC. June 27-July 1*

13- Van Beek, T.A. et al. (1991), Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytochemicals. *Journal of Chromatography*, 543:375-387.

14- Wilmer, P. Stone, G. (2005), Johnstonl. *Environmental of Physiology Animals. Sec Ed. Black well Pub. Comp.* 381- 386.

شود. همچنین ویسکوزیته خون را کاهش می دهد و از طرف دیگر باعث گشاد شدن رگ های خونی می شود. در واقع عصاره جینکو بخش اعظم آسیب های ناشی از پیری به ویژه صدمات وارده بر سیستم های جریان خونی و عصبی را ترمیم می کند. عصاره مزبور همچنین سبب تقویت رگ های خونی می شود. در نتیجه غالباً برای افراد مسن که از علایم زوال عقل نظیر اختلال هوشیاری، از دست رفتن حافظه، انواع سردرد، افسردگی رنج می برند، توصیه می شود. جینکو بی لوبا یک گیاه مقوی حافظه به شمار می رود و قسمت مورد استفاده دارویی آن برگ های این گیاه می باشد که خاصیت آرام بخش دارد و موجب جریان خون بیشتر در سلول های مغزی شده و جهت مقابله با آلزایمر در پیری بکار می رود [۲].

#### منابع

۱- گایتون، آ.، هال، ج.، ترجمه: بیگدلی، م.، (۱۳۸۷)، فیزیولوژی پزشکی، جلد ۲، انتشارات تیمورزاده.

۲- نوشین فر، الف.، ۱۳۸۵، اثر پیش درمانی با عصاره جینکو بی لوبا بر فراموشی ناشی از MK801 در موش صحرائی، فیزیولوژی و فارماکولوژی، جلد ۱۰، شماره ۴، ص ۲۷۶-۲۷۵.

3- Amri, H. Drieu K. Papadopulos V. (2002), Use of Ginkgolide B and a Ginkgolide activated response element to control gene transcription. Example of the adrenocortical peripheral type benzodiazepine receptor. *Cell Mol. Biol.* 45: 633-639.

4- Dash, P.K. Mach, S.A. Blum, S. and A.N. Moore (2002), Intrahippocampal Wortmannin Infusion Enhances Long-Term Spatial and Contextual Memories. *Research Paper* 9, 4:167-177.