

فصلنامه علمی - پژوهشی طب مکمل، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲

بررسی اثر عصاره دانه عنب بر رفتار شبه اضطرابی در موش صحرایی نژاد ویستار

کامبیز روشنایی^۱، نسرین حیدریه^۲، آذین بستانی^{۳*}

۱. استادیار فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.

۲. استادیار فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۸

چکیده

مقدمه: اضطراب یک اختلال شایع است که اغلب با علائم فیزیولوژیک همراه است. با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی ضد اضطراب، در این پژوهش تأثیر عصاره دانه گیاه عنب بر رفتار شبه اضطرابی در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۴۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات به گروه‌های کنترل ۱ (دست نخورده) و کنترل ۲ (نرمال‌سالین) و گروه‌های تجربی (عصاره هیدروالکلی دانه عنب در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه مرجع دیازپام (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. حیوانات، تزریقات را به صورت حاد و داخل صفاقی و نیم ساعت قبل از آزمون دریافت کردند و سپس در ماز صلیبی شکل مرتفع قرار گرفتند. در مرحله بعد شاخص‌های استاندارد ارزیابی اضطراب در آن‌ها ثبت شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: گروه‌های کنترل ۱ و ۲ تفاوت معناداری در شاخص‌های اضطراب نشان ندادند. عصاره در دوز ۵۰ میلی‌گرم ($p < 0.05$) و در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم ($p < 0.001$) به صورت معناداری سبب افزایش مدت زمان حضور در بازوی باز و نیز در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم ($p < 0.001$) سبب افزایش تعداد ورود به بازوی باز در ماز صلیبی شکل مرتفع در مقایسه با گروه کنترل ۲ گردید. تزریق عصاره در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم اثرات مشابه با اثرات ضد اضطرابی دیازپام نشان داد و در مقادیر فوق تأثیری بر میزان فعالیت حرکتی رت نشان نداد.

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی دانه عنب در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم اثر کاهشی بر رفتار شبه اضطرابی در موش صحرایی نژاد ویستار نشان داد.

کلیدواژه‌ها: اضطراب، عصاره دانه عنب، رت نر، ماز صلیبی شکل مرتفع.

*نویسنده مسئول: E.mail: azin_bostani@yahoo.com

مقدمه:

اضطراب یک حالت خلقی آینده‌نگر برای آماده شدن در مقابله با حوادث منفی آینده است که با حالت دلهره، عدم قطعیت و ترس ناشی از پیش‌بینی یک رویداد واقعی یا وضعیت تهدیدکننده غیر واقعی همراه است و با علائم جسمی و نشانه‌های بالینی مثل: تاکی‌کاردی، سردرد، سرگیجه، تهوع یا استفراغ، رنگ‌پریدگی، اختلال در تنفس و... بروز می‌کند. این علائم به علت واکنش‌های هورمونی، عضلانی و سیستم قلبی - عروقی درگیر در واکنش جنگ و گریز (مرتبط با سیستم سمپاتیک و بخش مرکزی غده فوق کلیه) می‌باشد (۱). تصور می‌شود اضطراب یک واکنش طبیعی به استرس باشد و به فرد، توان مواجه شدن با شرایط دشوار را می‌دهد؛ اما زمانی که شدت و مدت علائم اضطرابی طولانی شود، ممکن است به یکی از انواع اضطراب پاتولوژیک تبدیل شده و نیاز به درمان داشته باشد. این شرایط معمولاً به تجربیات زندگی پراسترس مربوط است، به ویژه زمانی که استرس‌ها مزمن و آسیب‌زا باشند. ظاهراً استرس به عنوان یک عامل مستعدکننده و تسریع‌کننده در این شرایط روانی است (۲). مطالعات نشان می‌دهد به هم خوردن تعادل سیستم نوروترانس‌میترها، تغییر در مسیر انتقال سیگنال‌ها و تغییر شکل مدارات نورونی مغز در این پاتولوژی سهمیم هستند (۱). اختلالات اضطرابی با محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال^۱ مرتبط است (۳، ۴). سیستم‌های گاباژیک و سروتونرژیک به طور قابل توجهی در تنظیم سیستم اضطرابی نقش دارند (۱). همچنین فعال‌سازی رسپتور گابا سبب بهبود اختلالات اضطرابی می‌گردد (۲). بیشتر مطالعات انجام شده در مورد مکانیسم نوروترانس‌میترها، گابا، سروتونین^۲، نور آدرنرژیک و نوروپپتیدها بوده در حالی که مطالعات جدید نقش آدنوزین، کوله سیستم‌توکین و نورواستروئیدها را در پیشرفت اضطراب پیشنهاد می‌کنند (۵). داروهایی که با این نوروترانس‌میترها تعامل دارند

ممکن است اثرات ضد اضطرابی داشته باشند. در حال حاضر اغلب داروهایی که برای درمان اضطراب تجویز می‌شوند آرام‌بخش و خواب‌آور هستند. داروهای ضد اضطرابی معمول شامل داروهای بنزودیازپینی است که سبب تسهیل عمل مهارى گابا می‌شوند. همچنین داروهای مهارکننده انتخابی بازجذب سروتونین که در درمان اختلال ترس اجتماعی و اختلال اضطراب عمومی^۳ استفاده می‌شوند و دسته دیگر داروهای ضد اضطرابی، بلوکرهای بتاآدرنرژیک می‌باشند که اثرات آدرنالین و نورآدرنالین را در بدن کاهش می‌دهند (۲، ۶). استفاده از داروهای مذکور به علت اثرات جانبی آنها محدودیت دارد. این عوارض از قبیل ایجاد اختلالات روان‌پزشکی، واکنش‌های آلرژیک، خواب‌آلودگی، گیجی ذهنی، خستگی، حالت تهوع، مشکلات هماهنگی و اعتیاد آوری می‌باشد (۲). از طرفی استفاده از گیاهان دارویی در کاهش اضطراب و بهبود اختلالات خواب از قدیم مرسوم بوده است. طب گیاهی، قدیمی‌ترین روش درمان است که از سوی بشر شناخته شده است. در کشور کره و چین استفاده از عصاره میوه، دانه و برگ‌های گیاه عناب قدمت چند هزار ساله دارد (۲). در طب سنتی از عناب به عنوان داروی تصفیه‌کننده خون، آرام‌کننده اعصاب، مقوی عمومی، مقوی معده، ملین، ضد سرفه و مدر استفاده شده و از پوست، ریشه و برگ آن برای از بین بردن برخی انواع تب، افزایش رشد موی سر و شست و شوی چشم استفاده می‌شود (۷). در تحقیقات جدید، ترکیبات فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، گلیکوزیدی و استرولی در بخش‌های مختلف گیاه عناب شناسایی شده که دارای خواص دارویی هستند (۲). ساپونین^۴ و زیزیفن^۵ موجود در برگ عناب سبب سرکوب طعم شیرینی ناشی از گلوکز و فروکتوز می‌شود. مطالعات بر روی یک داروی سنتی چینی که حاوی عناب است نشان داد که این دارو عامل مهار جریان یون سدیم و کلسیم در نورون حلزون و بی‌حسی موضعی در عصب

³ Generalized anxiety disorder

⁴ saponin

⁵ ziziphin

¹ HPA

² SSRIs

تاریکی، دمای 26 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد و بدون آلودگی صوتی بود. پس از سپری شدن دوره سازش‌پذیری با محیط جدید، رت‌ها وزن شدند و به طور تصادفی در گروه‌های ۷ تایی قرار گرفتند. در این مدت هر روز نوازش شدند تا با آزمایشگر خو بگیرند و در روز آزمون استرس نداشته باشند. در این تحقیق موش‌ها در ۶ گروه ۷ تایی با سن تقریبی ۱۱ تا ۱۲ هفته به ترتیب زیر تقسیم شدند:

۱. گروه دست نخورده^۲: این گروه فقط آب و غذای کافی دریافت کردند و بدون هیچ تزریقی، از آن‌ها آزمون اضطراب گرفته شد.

۲. گروه کنترل نرمال‌سالین: این گروه محلول نرمال‌سالین را به عنوان حلال با دوز ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم رت دریافت کردند.

۳. گروه تجربی ۱: یک بار، با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی دانه عناب تیمار شدند.

۴. گروه تجربی ۲: یک بار، با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی دانه عناب تیمار شدند.

۵. گروه تجربی ۳: یک بار، با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی دانه عناب تیمار شدند.

۶. گروه کنترل مثبت (مرجع): این گروه دیاپام را با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند.

تهیه عصاره هیدروالکلی: پس از جمع‌آوری میوه عناب و تأیید آن توسط گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد قم، عصاره به روش زیر تهیه شد. میوه عناب پس از شسته شدن به مدت چند ساعت خیسانده شد. سپس فرابر میوه به طور کامل از دانه جدا شد و در مجاورت هوا قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. سپس دانه‌ها کوبیده شدند تا به صورت پودر نرمی درآمدند. پس از توزین، ۵۰۰ گرم از پودر حاصل، درون دستگاه سوکسله قرار گرفت. درون بالن سوکسله ۳۰۰ سی‌سی الکل ۷۰ درجه (حاوی ۲۱۰ سی‌سی الکل خالص و ۹۰ سی‌سی آب مقطر) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت درون دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد.

قورباغه است (۸). ماده بتونولیک اسید^۱ در برابر سلول‌های غیرطبیعی ریه، تخمدان، گردن رحم، سر و گردن مؤثر است (۹). دانه و برگ بسیاری از گونه‌های گیاه عناب اثرات ضد اضطراب، خواب‌آور و آرام‌بخش دارد و فعالیت سیستم اعصاب مرکزی را کاهش می‌دهد. مطالعات انجام شده بر روی ترکیبات دانه عناب اثر مهاري بر فعالیت هیپوکامپ موش صحرائی داشته است (۱۰). همچنین آلکالوئیدهای به دست آمده از میوه عناب، سبب افزایش زمان خواب در موش‌های آزمایشگاهی شده است. مطالعات مشابه نشان داده که با گرمادهی به این ترکیبات اثر آرام‌بخشی آن افزایش می‌یابد (۱۱). با توجه به خواص دارویی بخش‌های مختلف گیاه عناب و همچنین سازگاری این گیاه با شرایط مختلف آب و هوایی کشور ما مطالعه علمی و کاربردی این گیاه می‌تواند گامی در جهت خودکفایی کشور عزیزمان باشد (۷). لذا با توجه به خواص آرام‌بخشی ترکیبات این گیاه و اینکه تا کنون در کشور ما درباره اثرات آرام‌بخشی آن مطالعه‌ای انجام نشده است در این تحقیق اثر عصاره هیدروالکلی دانه عناب بر رفتار شبه اضطرابی در موش صحرائی بررسی شد تا در صورت اثربخشی در مطالعات بالینی بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها:

حیوانات مورد آزمایش: در این مطالعه مداخله‌ای از نوع تجربی، از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ویستار (رت) با میانگین وزنی 250 ± 20 گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور کرج خریداری و به حیوان‌خانه دانشگاه آزاد واحد قم منتقل شدند. پس از انتقال، در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند و آب و غذای مخصوص (پلت) به اندازه کافی - به جز هنگام آزمایش - در دسترس آن‌ها قرار گرفت. برای از بین رفتن استرس و ترس ناشی از جابه‌جایی و سازش با مکان جدید، یک هفته قبل از شروع آزمایش، موش‌ها به حیوان‌خانه محل آزمایش منتقل شدند. محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت

² Intact

¹ betulinic acid

بازوی باز و بسته و همچنین تعداد دفعات ورود به هر دو بازو به صورت جداگانه ثبت شد و درصد زمان سپری شده در بازوی باز^۲ درصد ورود به بازوی باز^۳ به عنوان عوامل استاندارد سنجش اضطراب محاسبه شد. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته هنگامی است که هر چهار پای حیوان در راهروی مورد نظر قرار می گرفت. زمان سپری شده در هر راهرو نیز بر همین اساس محاسبه شد. افزایش ورود به بازوهای باز و افزایش مدت سپری شده در بازوی باز، به عنوان شاخص کاهش اضطراب در موش تلقی شد. همچنین قضاوت در مورد اختلاف معنی دار سطح اضطراب بدین صورت بود که اگر هم زمان هر دو شاخص (تعداد ورود به بازوی باز و مدت زمان سپری شده در بازوی باز) در یک راستا کاهش و یا افزایش می یافت و یا حداقل یکی از آن ها تفاوت معنی داری با گروه کنترل داشت، به عنوان تغییر معنی دار در سطح اضطراب تلقی می شد. برای بررسی اثر عصاره بر میزان فعالیت حرکتی^۴ حیوان، میزان فعالیت حرکتی او نیز محاسبه شد. روش محاسبه این شاخص ها به ترتیب زیر بود (۱۲، ۱۳).

درصد زمان سپری شده در بازوی باز = مدت زمان سپری شده در بازوی باز $\times 100\%$
 درصد دفعات ورود به بازوی باز = تعداد دفعات ورود به بازوی باز تقسیم بر مجموع تعداد دفعات ورود به بازوی باز و بسته $\times 100\%$
 میزان فعالیت حرکتی = تعداد دفعات ورود به بازوی باز + تعداد دفعات ورود به بازوی بسته.

زمان گذرانده شده در بازوی بسته و تعداد ورود به بازوی بسته نیز بر همین اساس محاسبه شد. در روز آزمایش حیوانات به آزمایشگاه منتقل شدند و از هر حیوان جداگانه به ترتیب زیر آزمون گرفته شد. ۲۵ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی عصاره، هر حیوان به مدت ۵ دقیقه در جعبه ای با دیواره های سیاه با ابعاد $40 \times 40 \times 25$ سانتی متر قرار گرفت تا فعالیت جست و جوگرانه او افزایش

در مرحله بعد عصاره حاصل شده، صاف شد و سپس با کمک دستگاه حذف حلال در خلأ (روتاری) و دمای 40°C درجه سانتی گراد و فشار 175 میلی متر جیوه، عمل جداسازی عصاره از حلال تا به دست آمدن یک عصاره غلیظ ادامه یافت، آن گاه عصاره غلیظ به دست آمده از داخل بالن خارج گردید و در دسیکاتور قرار گرفت. برای محلول سازی ابتدا وزن عصاره مورد نیاز برای تهیه دوز مورد نظر به کمک درصد رطوبت محاسبه شد. سپس دوزهای لازم برای هر گروه با ترازویی با دقت 0.001 گرم توزین شد و هر دوز در 1 میلی لیتر محلول نرمال سالین به ازای هر کیلوگرم رت به حجم مناسب رسید و متناسب با وزن هر حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق شد. حجم مشابه نرمال سالین (1 میلی لیتر نرمال سالین به ازای هر کیلوگرم رت) نیز متناسب با وزن بدن حیوانات در گروه کنترل به طریق داخل صفاقی تزریق گردید.

برای آزمون اضطراب از دستگاه ماز مرتفع صلیبی شکل^۱ استفاده شد. این ابزار از جنس چوب، دارای دو بازوی باز و دو بازوی بسته به ابعاد 50×10 سانتی متر است که این چهار بازو به یک کفه مرکزی به ابعاد 10×10 سانتی متر منتهی می شود و ارتفاع آن از سطح زمین 50 سانتی متر است. در انتهای بازوهای باز، دیوار کوتاهی از جنس فایبر-گلاس شفاف با ارتفاع 2 سانتی متر قرار گرفت تا از افتادن حیوان جلوگیری شود. این مدل آزمون اضطراب با توجه به غیر شرطی بودن، نیاز به آموزش و یادگیری حیوان ندارد. اساس این آزمایش بر دو اصل حس غریزی جست و جوگرانه حیوان و غریزه احتراز از محیط های باز و روشن استوار است. به بیان دیگر از طرفی حیوان تمایل به حرکت و جست و جو در تمام بازوها را دارد و از طرف دیگر از ورود به بازوی باز می ترسد و همین امر سبب بروز تضاد و اضطراب در حیوان می گردد. به همین دلیل حیوان بیشتر وقت خود را در بازوی بسته سپری می کند. حیوان در آغاز آزمایش در محدوده مرکزی دستگاه رو به روی بازوی باز قرار گرفت و طی مدت 5 دقیقه، زمان سپری شده در

² Open Arm Time: OAT

³ Open Arm Entries: OAE

⁴ Locomotor Activity

¹ Elevated plus- maze

در بازوهای باز گردید که این مدت نسبت به دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کمتر بود. عصاره دانه عناب در دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم تفاوتی در مدت زمان سپری شده در بازوهای باز نسبت به گروه کنترل نشان نداد. بنابراین عصاره در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیشترین میزان معناداری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد که این امر در واقع بیانگر کاهش اضطراب حیوان به طور قابل توجهی نسبت به دیگر دوزهای مصرفی بود. فقط اثر دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره با اثر دیاپام بر درصد زمان سپری شده در بازوی باز مشابه است و نشان می دهد عصاره در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به اندازه دیاپام اضطراب را در رت‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش می دهد (نمودار ۱).

تزریق دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره دانه عناب سبب افزایش تعداد دفعات ورود به بازوهای باز نسبت به گروه کنترل گردید. تزریق عصاره دانه عناب در دوز ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم تفاوتی در مدت زمان سپری شده در بازوهای باز نسبت به گروه کنترل نشان نداد. بنابراین عصاره در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیشترین میزان معناداری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد که این امر در واقع بیانگر کاهش اضطراب حیوان به طور قابل توجهی نسبت به دیگر دوزهای مصرفی و گروه کنترل بود. همچنین اثر دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره با اثر دیاپام بر درصد زمان سپری شده در بازوی باز مشابه است و نشان می دهد تزریق عصاره در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به اندازه دیاپام اضطراب را در رت‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش می دهد (نمودار ۲).

میزان فعالیت حرکتی

دوزهای مصرفی ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره دانه عناب و همچنین دیاپام با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم اثر معنی داری بر میزان فعالیت حرکتی در ماز صلیبی شکل مرتفع نسبت به گروه کنترل نداشت. اما دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه دیاپام کاهش معنی داری بر میزان فعالیت حرکتی رت‌ها نشان داد

یابد. سپس به آرامی در مرکز دستگاه ورو به بازوی باز قرار گرفت و به مدت ۵ دقیقه شاخص‌های استاندارد ارزیابی اضطراب از طریق مشاهده (فیلم برداری) در او بررسی و ثبت شد. تمام اندازه گیری‌ها در محیطی بسیار آرام با نور ثابت (لامپ ۱۰۰ وات به ارتفاع ۱/۵ متر بالای ماز) و در ساعات ۲ تا ۶ بعد از ظهر انجام گرفت. از هر حیوان فقط یکبار آزمون گرفته شد. داده‌های جمع آوری شده در همه گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای مقایسه بین دو گروه از روش آماری تی تست استفاده شد. تفاوت با $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف استاندارد از میانگین ارائه شد.

یافته‌ها:

در همه آزمایش‌های انجام شده تفاوت معنی داری در نتایج گروه دست نخورده با نتایج گروه نرمال سالین مشاهده نشد. لذا نتایج حاصل با گروه نرمال سالین به عنوان گروه کنترل مقایسه شده است.

نتایج حاصل نشان داد، یکبار تزریق داخل صفاقی عصاره دانه عناب در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی داری (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.001$) سبب افزایش درصد مدت زمان حضور در بازوی باز شد و همچنین تزریق عصاره در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی داری ($p < 0.001$) تعداد دفعات ورود به بازوی باز را در رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد (جدول شماره ۱ و ۲).

تزریق عصاره در دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم تغییری در فعالیت حرکتی رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل نداشت.

بررسی معیارهای شاخص کاهش اضطراب: تزریق دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره دانه عناب سبب افزایش مدت زمان سپری شده در بازوهای باز نسبت به گروه کنترل گردید. همچنین عصاره دانه عناب در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب افزایش مدت زمان سپری شده

(نمودار ۳).

بحث:

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، یک بار تزریق داخل صفاقی عصاره دانه عنب در دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی دار سبب افزایش درصد مدّت زمان حضور در بازوی باز شد و همچنین عصاره در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی دار تعداد دفعات ورود به بازوی باز را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. بنابراین اثر کاهشی بر رفتار اضطرابی نشان داد. بیشترین تأثیر عصاره در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود.

تا کنون ساختار حدود ۵۰۰۰ نوع فلاونوئید گیاهی شرح داده شده و بسیاری از این فلاونوئیدها به عنوان لیگاند رسپتورهای گابا در سیستم عصبی مرکزی بوده اند و در نتیجه احتمالاً شبیه بنزودیازپین ها عمل می کنند (۱۴). این فرضیه با مطالعات رفتاری انجام شده بر روی رفتار اضطرابی، آرام بخشی و تشنج در مدل های جانوری تأیید می شود (۱۵). مطالعات نشان داده که تزریق داخل صفاقی فلاونوئید گلیکوزید موجود در گیاه سنبل الطیب از طریق اثر بر رسپتور گابا اثرات آرام بخشی دارد. همچنین اثرات ضد اضطرابی ماده اپیجینین^۱ جدا شده از عصاره متانولی برگ گیاه دمنانه بررسی شده است (۱۶). با این وجود بررسی های انجام شده در آزمایش های الکتروفیزیولوژیک نشان داد فلاونوئیدهایی از قبیل کوئرستین^۲ و اپیجینین با مکانیسمی متفاوت از بنزودیازپین ها اثرات ضد اضطرابی خود را بر روی رسپتورهای گابا اعمال می کنند (۱۷). اپیجینین قادر به عبور از سد خونی- مغزی بوده و به عنوان تنظیم کننده مثبت و آلوستریک، سبب تقویت اثرات گابا بر روی گیرنده گابا می شود و بر خلاف دیازپین و آلوپرگنانونولون به محل اتصال گابا متصل نمی شود. بنابراین بر خلاف دیازپین ها وابستگی ایجاد نمی کند. دانه گیاه عنب نیز به دلیل دارا بودن اپیجینین می تواند با کاهش دادن فعالیت نورونی اثر ضد اضطرابی داشته باشد (۹).

از طرفی مطالعات مختلفی بر روی اثرات آرام بخشی عصاره دانه عنب^۳ انجام شده است. بررسی ها نشان می دهد که یک بار تجویز خوراکی عصاره دانه عنب مدّت زمان خواب را در موش های سوری تیمار شده با هگزوباربیتال افزایش داده و در دوزهای پائین تر اثرات ضد اضطرابی و در دوزهای بالاتر اثرات خواب آوری دارد (۱۸). تحقیقات جدید به منظور شناسایی ترکیبات مؤثر و مکانیسم های عمل این ترکیبات در حال انجام است. از مهم ترین ترکیبات خواب آور شناسایی شده در عصاره دانه عنب ترکیبات گلیکوزیدی به نام های جوجوبوساید آ و ب^۴ و اسپینوزین^۵ می باشد (۲۰، ۱۹). همچنین ترکیبات آلکالوئیدی به نام سانجونین^۶ استخراج شده از عصاره عنب دارای خواص سدا تیو و هیپنوتیک (آرام بخش و خواب آور) می باشد (۱۱).

جوجوبوساید آ یکی از اصلی ترین گلیکوزیدهای استخراج شده از عصاره دانه عنب است و مطالعات بر روی مکانیسم اثر این ماده پیشنهاد می کند که این ماده یک مهار کننده غیر رقابتی کالمودولین می باشد (۲۱). جوجوبوساید آ اثرات مهاری بر شکل گیری هیپوکامپ از طریق اثر مهاری بر مسیرهای تحریکی با واسطه گیری گلو تامات در هیپوکامپ دارد و این اثر را احتمالاً از طریق عمل بازدارندگی کالمودولین اعمال می کند (۲۲). در نتیجه می تواند سبب کاهش اثرات تحریکی گلو تامات در مغز شود. و در درمان اختلالاتی از قبیل اضطراب، اسکیزوفرنی و ... استفاده شود (۲۳، ۲۲). همچنین بررسی امواج الکتروانسفالوگرام^۷ کورتکس در موش های هایپراکتیو تیمار شده با سدیم - پنی سیلین نشان می دهد که اثرات مهاری جوجوبوساید آ و دیازپام بیشتر از طریق مهار اثرات گلو تامات می باشد (۲۲). همچنین این ماده بیان ژن زیر واحد رسپتور گابا^۸ را در هیپوکامپ رت ها افزایش داده و

³ SZJE: Seed Ziziphus jujube extract⁴ jujubosideA -B⁵ spinosin⁶ sanjoinine⁷ EEG⁸ GABA A¹ apigenin² quercetine

اسلامی قم ثبت گردیده است. لذا از مسئولان دانشگاه و تمامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه با ما داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سبب کاهش فعالیت نورونی می‌گردد (۲۴). یکی دیگر از ترکیبات موجود در دانه عناب نوعی آکالوئید به نام سانجونین آ^۱ می‌باشد که دارای اثرات ضد تشنجی است و سبب کاهش جریان یون کلسیم و در نتیجه کاهش فعالیت نورونی می‌گردد. این اثر احتمالاً با واسطه‌گری رسپتوریونوتروپیک گلوتامات^۲ اعمال می‌شود (۲۵).

در پژوهش حاضر تزریق عصاره هیدروالکلی به صورت داخل صفاقی در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثرات ضد اضطرابی نشان داد که با یافته‌های پنگ و همکارانش (۱۸) مطابقت دارد. همچنین مقایسه اثرات ضد اضطرابی حاصل از تزریق داخل صفاقی عصاره دانه عناب در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با اثرات ضد اضطرابی دیازپام اختلاف معنی‌داری را نشان نداد که ممکن است به دلیل مکانیسم‌های مشابه اثرات عصاره و دیازپام از طریق افزایش فعالیت رسپتورهای گابا باشد (۶، ۲۴). با توجه به وجود ترکیبات گلیکوزیدی و آکالوئیدی در دانه عناب، این ترکیبات احتمالاً با افزایش فعالیت سیستم گابائرتژیک و کاهش فعالیت سیستم گلوتاماترتژیک و در نهایت کاهش فعالیت نورونی، از فعالیت بیش از حد آمیگدال و مراکز مرتبط با آن در شرایط اضطراب‌زا می‌کاهند.

نتیجه‌گیری:

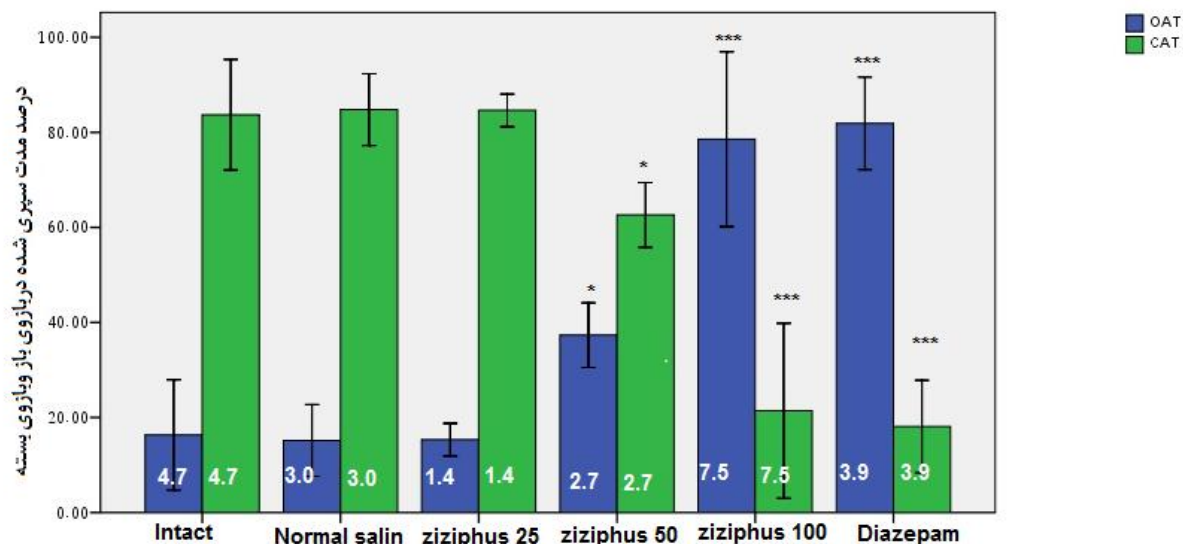
نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره دانه عناب در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم رفتار شبه اضطرابی را کاهش می‌دهد. برای کاربردی شدن این پژوهش جداسازی ترکیبات مؤثر عصاره و تأثیر این ترکیبات به طور اختصاصی در بررسی‌های بعدی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی:

پژوهش حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی پایان‌نامه بود که بانظارت گروه تخصصی استادان فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی قم و رعایت اصول اخلاق پژوهشی کار با حیوانات با مجوز شماره ۱۵۴۳-۵۱۹۹۰۰۲۰۰- در دانشگاه آزاد

^۱ Sanjoinine A

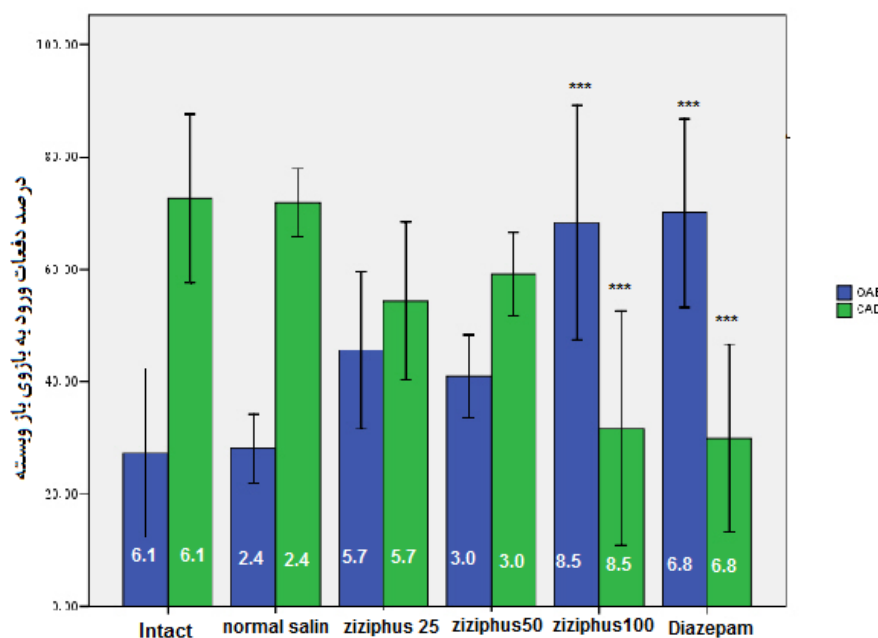
^۲ NMDA



نمودار ۱- مقایسه اثر دوزهای مختلف عصاره دانه عناب بر مدت زمان سپری شده در بازوی باز و بسته در تست ماز صلیبی شکل مرتفع، هر ستون نشان دهنده $Mean \pm S.E.M$ و $N=7$ است.

علامت * نشانه معنی دار بودن تفاوت بین گروه‌های مختلف با گروه کنترل نرمال سالین است ($P < 0.05$ * $P < 0.001$ ***).

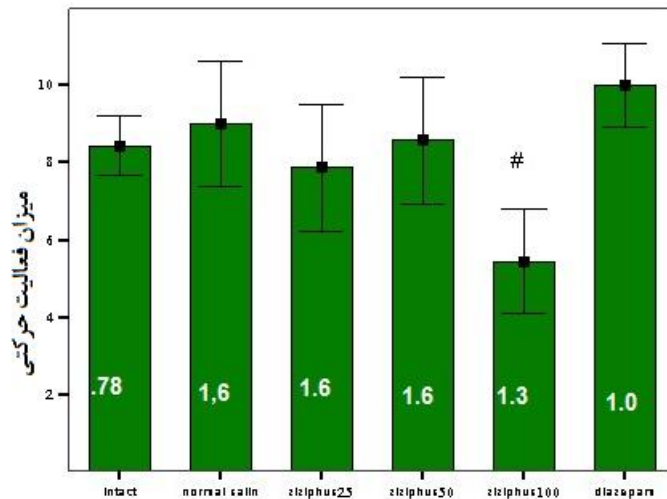
اعداد داخل هر ستون نشان دهنده S.E.M می‌باشد.



نمودار ۲- مقایسه اثر دوزهای مختلف عصاره دانه عناب بر درصد دفعات ورود به بازوی باز و بسته در تست ماز صلیبی شکل مرتفع، هر ستون نشان دهنده $Mean \pm S.E.M$ و $N=7$ است.

علامت * نشانه معنی دار بودن تفاوت بین گروه‌های مختلف با گروه کنترل نرمال سالین است ($P < 0.05$ * $P < 0.001$ ***).

اعداد داخل هر ستون نشان دهنده S.E.M می‌باشد.



نمودار ۳- مقایسه اثر دوزهای مختلف عصاره دانه عناب میزان فعالیت حرکتی در تست ماز صلیبی شکل مرتفع، هر ستون نشان-
 دهنده $N=7$ و $Mean \pm S.E.M$ است.

علامت # نشانه معنی دار بودن تفاوت بین گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ mg عصاره با گروه دیازپام می باشد ($p < 0.05$ #)، اعداد
 داخل هر ستون نشان دهنده $S.E.M$ می باشد.

جدول شماره ۱: مقایسه تفاوت اثر دوزهای مختلف عصاره دانه عنب بر گروه‌های مختلف مورد مطالعه

میزان فعالیت حرکتی (مجموع تعداد ورود به بازوی باز و بسته) میانگین \pm انحراف معیار	درصد ورود به بازوی بسته میانگین \pm انحراف معیار	درصد ورود به بازوی باز میانگین \pm انحراف معیار	درصد مدت سپری شده در بازوی بسته میانگین \pm انحراف معیار	درصد مدت سپری شده در بازوی باز میانگین \pm انحراف معیار	گروه‌ها
۸/۴۳ \pm ۰/۸۲	۷۲/۷۱ \pm ۶/۲	۲۷/۳۵ \pm ۶/۱۴	۸۳/۷۱ \pm ۴/۷۵	۱۶/۳۵ \pm ۴/۷۴	(Intact)
۹ \pm ۱/۶۱۸	۷۱/۸۵ \pm ۲/۴۸	۲۸/۱۴ \pm ۲/۴۸	۸۴/۸۱ \pm ۳/۰۸	۱۵/۱۸ \pm ۳/۰۸	(نرمال سالین)
۷/۸۶ \pm ۱/۶۵۴	۵۴/۴۲ \pm ۵/۷۶	۴۵/۶۴ \pm ۵/۷۲	۸۴/۶۴ \pm ۱/۴۰	۱۵/۳۵ \pm ۱/۴۰	(دوز ۲۵ mg/kg عصاره)
۸/۵۷ \pm ۱/۶۴۵	۵۹/۱۴ \pm ۳/۰۴	۴۲/۹۲ \pm ۳/۰۲	۶۲/۶۴ \pm ۲/۷۷	۳۷/۳۵ \pm ۲/۷۷	(دوز ۵۰ mg/kg عصاره)
۵/۴۳ \pm ۱/۳۴۳	۳۱/۷۱ \pm ۸/۵۳	۶۸/۲۸ \pm ۸/۵۳	۲۱/۴۲ \pm ۷/۵۲	۷۸/۵۷ \pm ۷/۵۲	(دوز ۱۰۰ mg/kg عصاره)
۱۰ \pm ۱/۰۹۱	۲۹/۹۲ \pm ۶/۸۴	۷۰/۰۷ \pm ۶/۸۴	۱۸/۱۰ \pm ۳/۹۷	۸۱/۹۰ \pm ۳/۹۷	(دiazepam ۱ mg/kg)

جدول شماره ۲: مقایسه سطح معنی‌داری شاخص‌های ارزیابی اضطراب و میزان فعالیت حرکتی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

میزان فعالیت حرکتی (مجموع تعداد ورود به بازوی باز و بسته)	درصد ورود به بازوی باز	درصد مدت سپری شده در بازوی باز	گروه‌ها
۰/۹۹۸	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	(intact)
۱/۰۰۰	۰/۵۶۴	۱/۰۰۰	(دوز ۲۵ mg/kg عصاره)
۱/۰۰۰	۰/۵۲۵	**۰/۰۰۸	(دوز ۵۰ mg/kg عصاره)
۰/۵۲۸	***۰/۰۰۰	***۰/۰۰۰	(دوز ۱۰۰ mg/kg عصاره)
۱/۰۰۰	***۰/۰۰۰	***۰/۰۰۰	(diazepam ۱ mg/kg)

علامت * نشانه اختلاف معنی‌دار بین گروه نرمال سالین با گروه مورد نظر است.

References:

1. Kalinin V. Comorbidity of Anxiety and Affective Disorders as Neuropsychiatric and Evolutionary Problem (A New Concept). First published ed. Croatia: intech publisher; 2011.
2. Khanum F. Anxiety-Herbal treatment: A review. *Research and Reviews in Biomedicine and Biotechnology*. 2010;1(2):83-9.
3. Mathew SJ, Price RB, Charney DS. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: Implications for novel therapeutics. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2008;148 (2):89-98.
4. Risbrough VB, Stein MB. Role of corticotropin releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective. *Hormones and behavior*. 2006;50(4):550-61.
5. Stein M, Steckler T. Behavioral neurobiology of anxiety and its treatment. University of California San Diego. 2010;2:3-28.
6. Katzung B, Trevor A, Masters S. *Basic & clinical pharmacology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2009.
7. Khakdaman H, Naeinii M, Pourmeidani A. Identify the Jujube (*Zyziphus jujuba* Mill.) varieties in Iran. *Qom Agricultural and Natural Resources Research Center* 2008;14(4):202-14. [persian]
8. Tsuda T, Kubota K, Yasuda K, Nishikawa S, Sugaya A, Sugaya E. Effects of Chinese herbal medicine "kanbaku – taiso - to" on transmembrane ionic currents and its local anesthetic action. *Journal of Ethnopharmacology*. 1986; 17(3): 257-61.
9. Mahajan R, Chopda M. Phyto-Pharmacology of *Zyziphus jujuba* Mill-A plant review. *Pharmacognosy Reviews*. 2009; 3(6):320.
10. Shou C, Feng Z, Wang J, Zheng X. The inhibitory effects of jujuboside A on rat hippocampus in vivo and in vitro. *Planta Medica*. 2002; 68(9):799-803.
11. Han H, Ma Y, Eun JS, Li R, Hong JT, Lee MK, et al. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zyzyphi Spinosi* Semen: possible involvement of GABAergic transmission. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2009;92(2):206-13.
12. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322-8.
13. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2011;23(3):255-64.
14. Fernandez SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GA, Paladini AC, et al. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*. 2006; 539(3): 168-76.
15. Fernandez SP, Nguyen M, Yow TT, Chu C, Johnston GA, Hanrahan JR, et al. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin

- and naringin exert anxiolytic action in mice. *Neurochemical Research*. 2009;34(10):1867-75.
16. Kumar S, Madaan R, Sharma A. Estimation of Apigenin, an Anxiolytic Constituent, in *Turnera aphrodisiaca*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 70(6): 847-51.
 17. Goutman JD, Waxemberg MD, Donate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. *European Journal of Pharmacology*. 2003; 461(2-3): 79-87.
 18. Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, Lin YC, Liao J. Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse models of anxiety. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 72(3): 435-41.
 19. Yuan CL, Wang ZB, Jiao Y, Cao AM, Huo YL, Cui CX. Sedative and hypnotic constituents of flavonoids in the seeds of *Ziziphus spinosae*. *Zhong yao tong bao* (Beijing, China : 1981). 1987; 12(9): 34-6, 62-3.
 20. Jiang JG, Huang XJ, Chen J, Lin QS. Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and polysaccharides extracted from *Semen Ziziphus jujube*. *Natural Product Research*. 2007; 21(4):310-20.
 21. Hwang K, Han Y, Han B. Inhibition of calmodulin-dependent Calcium-ATPase and phosphodiesterase by various cyclopeptides and peptide alkaloids from the *Ziziphus* species. *Archives of Pharmacal Research*. 2001; 24(3): 202-6.
 22. Lu YJ, Zhou J, Zhang SM, Zhang HY, Zheng XX. Inhibitory effects of jujuboside A on EEG and hippocampal glutamate in hyperactive rat. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2005; 6(4): 265-71.
 23. Zhang M, Ning G, Shou C, Lu Y, Hong D, Zheng X. Inhibitory effect of jujuboside A on glutamate-mediated excitatory signal pathway in hippocampus. *Planta Medica*. 2003;69(8):692-5.
 24. You ZL, Xia Q, Liang FR, Tang YJ, Xu CL, Huang J, et al. Effects on the expression of GABAA receptor subunits by jujuboside A treatment in rat hippocampal neurons. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 128(2): 419-23.
 25. Ma Y, Yun SR, Nam SY, Kim YB, Hong JT, Kim Y, et al. Protective effects of sanjoinine A against N-methyl-D-aspartate-induced seizure. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2008; 31(9):1749-54.

Effect Of Extract of Seed Ziziphus Jujuba on Anxiety in Male Rats

Roshanaei K¹, Heidarieh N², Bostani A^{*3}

1- Department of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

2- Department of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

3- Animal physiology graduate student, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Received: 20 October,2012; Accepted: 20 October, 2013

Abstract

Introduction: Anxiety disorder is a common, problem that often associated with physiological symptoms. Because of synthetic drugs and medications possess enormous side effects, hence the present study was to investigate anxiolytic effect of seed of Ziziphus jujuba extract (SZJE) in rat using in Elevated plus maze (EPM).

Methods: Anxiety was measured by the number of entries and duration spent in open and close arm of the EPM following administration of the extracts intraperitoneally (i.p). Total number of entries was measured as an index of locomotor activity. Diazepam (1.0 mg/kg, i.p.) was used as the positive control.

Results: The SZJE at the dosage 50-100mg/kg increased the percentage of time-spent ($p<0/05$, $p<0/001$) and at the dosage 100mg/kg increased the percentage of arm entries in the open arms of the EPM ($p<0/001$) and decreased the percentage of time-spent and the percentage of arm entries in the closed arms of the EPM. The effect of The SZJE at the dosage 100mg/kg did not differ significantly from diazepam.

Administration of the extracts in these doses had no effect on locomotor activity.

Conclusion: These results suggested that extract seed of Ziziphus jujuba possessed anxiolytic effect at 50-100 mg/kg doses.

Key words: Anxiety, Ziziphus jujuba seed extract, Male rat, Elevated plus maze.

*Corresponding author: E.mail: azin_bostani@yahoo.com