

مقاله پژوهشی

اثر آسکوربیک اسید بر حافظه کاری، رفتار شبه اضطرابی و سطح فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز در موش های سوری اوارکتومی شده

فاطمه دلربای^۱، علی شمسی زاده^۱، ایمان فاطمی^۱، الهام حکیمی زاده^۱، فاطمه ایوبی^۱، محبوبه بنزازده^۱، محمد الله توکلی^{۱،۲*}

۱. مرکز تحقیقات فیزیولوژی- فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان
۲. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان

پذیرش: ۲۹ خرداد ۹۶

دریافت: ۲۳ فروردین ۹۶

چکیده

زمینه و هدف: گزارش شده است که یائسگی با افزایش استرس اکسیداتیو و به دنبال آن اختلال حافظه و اضطراب همراه است. با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی آسکوربیک اسید، اثر این ماده بر استرس اکسیداتیو، اختلال حافظه کاری و رفتار شبه اضطرابی در موش سوری اوارکتومی شده را بررسی کردیم.
روش ها: ۴۸ سر موش سوری ماده در محدوده وزنی 20 ± 5 گرم بطور تصادفی به شش گروه ۸ تایی شامل گروه کنترل آسکوربیک اسید، شام، اوارکتومی تیمار نشده و اوارکتومی تیمار شده با دوزهای ۵۰۰، ۳۰۰، ۱۰۰ mg/kg آسکوربیک اسید تقسیم شدند. نخست حیوانات اوارکتومی شدند و پس از تایید صحت اوارکتومی شدن، به مدت یک ماه با آسکوربیک اسید یا آب گاواژ شدند. سپس حافظه کاری (با آزمون ماز تی شکل)، رفتار شبه اضطرابی (با آزمون ماز مرتفع صلیبی) و سطح فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز در بافت مغز موش ها تعیین گردید.

یافته ها: در موش های اوارکتومی تیمار شده، آسکوربیک اسید با دوز ۱۰۰ mg/kg ($p < 0.05$) و ۵۰۰ mg/kg ($p < 0.001$) حافظه کاری را نسبت به گروه اوارکتومی تیمار نشده بهبود بخشید. آسکوربیک اسید با دوزهای ۳۰۰ mg/kg و ۵۰۰ mg/kg در حیوانات اوارکتومی در مقایسه با گروه اوارکتومی تیمار نشده مدت زمان گذرانده شده در بازوی باز را افزایش داد ($p < 0.01$). همچنین در گروه اوارکتومی تیمار شده با دوزهای ۳۰۰ mg/kg ($p < 0.01$) و ۵۰۰ mg/kg ($p < 0.001$) آسکوربیک اسید، درصد دفعات ورود حیوان به بازوی باز افزایش یافت. سطح فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز در گروه اوارکتومی تیمار شده با آسکوربیک اسید با دوز ۵۰۰ mg/kg نسبت به گروه اوارکتومی تیمار نشده افزایش یافت ($p < 0.01$).

نتیجه گیری: آسکوربیک اسید به خصوص با دوز ۵۰۰ mg/kg، نقش موثری در بهبود اضطراب، اختلال حافظه کاری و همچنین افزایش سطح فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز در موش های سوری اوارکتومی ایفا کرد.

واژه های کلیدی: آسکوربیک اسید، اوارکتومی شده، حافظه کاری، رفتار شبه اضطرابی، گلوکوتایون پراکسیداز

مقدمه

جنسی و به دنبال آن بالا رفتن هورمون های FSH (Follicle-Stimulating Hormone) و LH (Luteinizing Hormone) می شود. یائسگی نشانی از پایان دوره تولید مثل زنان و توقف پایدار فعالیت تخمدان ها می باشد. شایعترین عوارض یائسگی شامل اختلال حافظه، خستگی، گرگرفتگی، سرگیجه، اضطراب و افسردگی می باشد [۱]. استروژن از طریق فعال سازی نورون های اعصاب مرکزی،

یائسگی طبیعی ناشی از عدم ۱۲ بار قاعدگی در سال بوده که موجب پایین آمدن هورمون های

* نویسنده مسئول مکاتبات: allahtavakoli@gmail.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی مجله: ijpp@phypha.ir

نقش کوفاکتوری و آنتی اکسیدانی، ویتامین C به عنوان یک تنظیم کننده عصبی در سیستم عصبی مرکزی نیز معرفی شده است که می تواند موجب کاهش علائم رفتاری ناشی از اضطراب گردد [۸]. همچنین نشان داده شده است که ویتامین C علاوه بر اثرات آنتی اکسیدانی مستقیم باعث افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی مانند SOD، CAT و GPx هم می شود [۱۰].

با توجه به اثرات مخرب یائسگی بر روی حافظه، اضطراب و سیستم آنتی اکسیدانی و همچنین افزایش احتمال خطر ابتلا به آلزایمر و در پی آن احتمال آسیب حافظه و از سوی دیگر خواص آنتی اکسیدانی قابل توجه آسکوربیک اسید و اثرات مفید آسکوربیک اسید بر روی حافظه و یادگیری؛ این مطالعه، به منظور بررسی اثرات متفاوت و جدیدی از آسکوربیک اسید بر حافظه کاری، رفتار شبه اضطرابی و سیستم آنتی اکسیدانی در موش سوری اوارکتومی شده انجام شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از ۴۸ سر موش سوری ماده در محدوده وزنی 20 ± 5 گرم استفاده شد. موش ها در گروه های ۸ تایی در قفس های جدا و در اتاقی تحت شرایطی آرام و با حداقل استرس و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی (۷ صبح تا ۷ شب روشنایی) و دمای 23 ± 2 درجه سانتیگراد و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام مطالعه مذکور را تأیید نمود.

حیوانات به طور تصادفی به شش گروه ۸ تایی تقسیم شدند که عبارت بودند از گروه کنترل آسکوربیک اسید: در این گروه موش های سالم (غیر اوارکتومی) به مدت یک ماه با آسکوربیک اسید (500 mg/kg) گاواژ شدند؛ گروه شم: در این گروه موش ها تحت استرس جراحی قرار گرفتند و تمام مراحل جراحی (به جز برداشتن تخمدان ها) بر روی آن ها انجام شده و سپس به مدت یک ماه با آب بعنوان حلال آسکوربیک اسید (حجم 0.25 میلی لیتر) گاواژ شدند؛ گروه کنترل اوارکتومی شده: در این گروه ابتدا تخمدان موش ها برداشته شده و سپس به مدت یک ماه با آب بعنوان حلال آسکوربیک اسید (حجم 0.25 میلی لیتر) گاواژ شدند؛ گروه اوارکتومی + (mg/kg) 500 و 1000 آسکوربیک اسید: ابتدا تخمدان موش ها برداشته

ایجاد اتصالات سیناپسی جدید در بین نورون ها و افزایش ایجاد سیناپس در هیپوکمپ [۲] و افزایش فعالیت سیستم کولینرژیک تأثیرات خود را اعمال می کند [۳]. همچنین گزارش شده که استروژن دارای دو خاصیت، حفاظت نورونی و نوروتروفیک است که به نگهداری حافظه و یادگیری کمک می کند و کاهش استروژن متعاقب یائسگی موجب کاهش حافظه و یادگیری می شود [۴]. در همین راستا و در مطالعات انجام شده، مشخص شده است که یائسگی و کاهش سطح استروژن، باعث افزایش بروز بیماری آلزایمر و متعاقب آن اختلال حافظه می شود [۳]. یکی دیگر از اختلالات رایج در دوران یائسگی اضطراب است و در یائسگی به دلیل توقف ترشح استروژن از تخمدان ها میزان اضطراب افزایش پیدا می کند. همچنین نشان داده شده است که سطوح بالای پلاسمایی هورمون استروژن میزان اضطراب را در زنان کاهش می دهد [۱].

دفاع آنتی اکسیدانی بدن با افزایش سن کاهش می یابد که ممکن است پس از یائسگی به خاطر فقدان استروژن شدت یابد؛ بنابراین زنان یائسه، در معرض خطر استرس اکسیداتیو قرار دارند. آنزیم های کلیدی سیستم آنتی اکسیدانی بدن شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) هستند. یکی از مکانیسم های مهم حفاظتی استرادیول از طریق عمل آنتی اکسیدانی آن انجام می پذیرد [۵]. استروژن از طریق مهار افزایش کلسیم آزاد داخل سلولی که یک عنصر اصلی در ایجاد آسیب های ایسکمی توسط گونه های بازفعال اکسیژن (ROS) است، مرگ سلولی در بافت سیستم عصبی را محدود می کند [۶]. استروژن از طریق مکانیسم های مختلفی از قبیل اثرات آنتی اکسیدانی [۶] و افزایش بیان ژن هایی که در تولید فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و فاکتور رشد عصبی (NGF) نقش دارند [۴]، تحلیل نورونی را به ویژه در هیپوکمپ مهار کرده و باعث بهبود حافظه و یادگیری می شود [۷].

آسکوربیک اسید (ویتامین C) یک ویتامین محلول در آب می باشد که قابلیت ورود به مغز را دارد. فقدان یا کمبود آسکوربیک اسید ممکن است موجب افسردگی، زودرنجی، اختلالات قلبی، اضطراب و خستگی شود [۸]. عمل این ویتامین در پیشگیری از اختلالات حافظه ای ناشی از پیری را احتمالاً به اثر آنتی اکسیدانی آن مربوط دانسته اند [۹]. علاوه بر

شده و سپس به مدت یک ماه در گروه‌های مجزا با دوزهای ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ mg/kg آسکوربیک اسید گاواژ شدند.

روش برداشتن تخمدانها (القاء یائسگی)

ابتدا موش را وزن کرده و ۹۰ mg/kg و ۹۰ mg/kg و ۴/۵ زیلازین بصورت داخل صفاقی تزریق شد و بعد از بیهوشی کامل، ناحیه شکمی حیوان را تراشیده و محل جراحی استریل شد. طرفین بخش شکمی و کنار عضله ران موش، بین دو پستان دو و سه را شکاف داده، تخمدان را پیدا کرده و با دستگاه کوتر لوله رحمی را سوزانده و سپس تخمدان (بافت فولیکولی و قرمز رنگ متصل به لوله اویداکت) به آهستگی جدا و خارج شد. بعد از آن لایه داخلی و خارجی را جداگانه بخیه کرده و در نهایت ۲۲۰۰۰ μ i/kg پنی سیلین به عضله ران موش تزریق کرده و حیوان به قفس برگردانده شد تا به هوش آید. برای ارزیابی صحت جراحی بعد از گذشت سه روز از جراحی، به مدت شش روز اسمیر واژن حیوان بررسی شد (بوسیله بالب چند قطره نرمال سالین به واژن موش اضافه و آن را خارج کرده و سپس روی لام قرار داده و به حالت اسمیر پخش نموده و بوسیله میکروسکوپ نوری مشاهده شد) و با عدم مشاهده طرح سرخی و سلول‌های شاخی، برداشته شدن تخمدان موش‌ها تأیید گردید [۱].

آزمون حافظه کاری

برای بررسی یادگیری و حافظه کاری موش‌ها از آزمون ماز تی شکل استفاده شد [۱۱]. دستگاه استفاده شده دارای طول بازوی شروع ۷۶ cm و بازوهای هدف ۳۲ cm و عرض ۱۲ cm و ارتفاع ۲۰ cm است. دیواره‌های ماز از پلکسی گلاس شفاف ساوارکتومی شده است. ماز به سه درب گیوتینی قابل برداشت مجهز شده است. اولین درب یک فضای ۲۴ cm را در ابتدای بازوی شروع را جدا می‌کند. دو درب دیگر در ابتدای هر بازوی هدف قرار می‌گیرند و با پائین آمدن، ورود به بازو را مسدود می‌کنند. این آزمایش بر خلاف سایر روش‌ها اجازه بیشتری برای بررسی رفتارهای جستجوگرانه به صورت بی-غرض

می‌دهد. در این پروسه محرک‌های مصنوعی از جمله غذا برای پاداش و یا پاف هوا برای تنبیه وجود ندارد و بر پایه تمایل حیوان برای جستجوی موارد جدید است. پروسه آزمایش شامل

یک دوره اجباری و ۱۴ دوره انتخابی است. به دوره اول Forced-choice می‌گویند که موش‌ها به صورت تکی در نیمه اول بازوی عمودی T-maze قرار می‌گیرند بعد از ۵ ثانیه درب گیوتینی بازوی شروع، بالا کشیده می‌شود و به موش اجازه داده می‌شود در بازوی شروع و یکی از بازوهای هدف جستجو کند. در این حالت بازوی هدف دیگر مسدود شده است. انتخاب بازوی هدف به صورت تصادفی صورت می‌گیرد. موش فضاهای در دسترس را جستجو می‌کند و در نهایت به بازوی شروع برمی‌گردد بعد از این درب گیوتینی پائین آورده می‌شود و حیوان به مدت ۵ ثانیه محبوس می‌شود. به ۱۴ دوره بعدی Free-choice می‌گویند که موش‌ها می‌توانند به طور آزادانه بازوی هدف راست و چپ را انتخاب کنند. بعد از وارد شدن موش به یکی از بازوهای هدف بازوی دیگری بسته می‌شود و موش در نهایت به قفس شروع برمی‌گردد و درب گیوتینی بسته می‌شود و بعد از ۵ ثانیه باز می‌شود و دوره بعدی شروع می‌شود. ۱۴ دوره آزاد در طی یک آزمایش انجام می‌شود. از آنجایی که یک محرک جدید در بازوی هدف وجود دارد (جستجوی بازوی هدف دیگر) انتظار می‌رود که موش بازوی مسدود شده در دوره قبلی را جستجو کند. موش‌های آزمایش شده در این پروسه باید فعال باشند و عدم حرکت و سایر علائم ترس در موش وجود نداشته باشد. انتخاب‌های پی در پی که به وسیله موش انجام می‌شود را اندازه‌گیری کرده و درصد تغییرات کلی در طی ۱۴ دوره آزاد محاسبه می‌شود که افزایش این درصد نشان دهنده افزایش حافظه کاری می‌باشد. دستگاه برای هر موش با الکل ۱۰٪ تمیز شد ولی بین دوره‌های یک آزمایش این عمل انجام نمی‌شود [۱۲].

آزمون رفتار شبه اضطرابی

در این مطالعه برای سنجش اضطراب مدل رفتاری ماز بعلاوه‌ای شکل (Elevated plus-maze) استفاده شد. این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت (+) است. ابعاد راهروی باز و بسته ۱۰ × ۵۰ cm بوده و دو طرف و انتهای راهرو بسته دیواره ای به بلندی ۴۰ cm دارد که برای جلوگیری از افتادن موش‌ها در دو طرف و انتهای راهروی باز لبه‌ای به ارتفاع ۱ cm از جنس شیشه نصب گردیده است. چهار راهرو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۱۰ × ۱۰ cm

نمونه‌ها، جهت تهیه هموژنیزاسیون بافتی، نمونه‌ها بر روی سطح یخی قرار گرفته و به همه آنها بر طبق پروتکل موجود در کیت مورد استفاده؛ بافر فسفات سالین (PBS, pH ۷/۴) اضافه شد. سوسپانسیون حاصل از هر نمونه با دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت محلول رویی جمع‌آوری گردید و به عنوان محلول هموژنیزه بافتی برای استفاده در مرحله بعد در فریز ۸۰- نگهداری شد.

در این مطالعه، میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو اندازه‌گیری شد. این کار به وسیله کیت مخصوص و بر اساس پروتکل های شرکت مربوطه (ZellBio GmbH Ulm, Germany) انجام شد. برای محاسبه میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز از روش تبدیل پراکسید هیدروژن به آب استفاده شد که بر اساس آن یک واحد از فعالیت این آنزیم برابر با میزانی از نمونه است که در واحد زمان ۱ میکرومول از گلوتاتیون را به فرم GSSG اکسید نماید. برای این منظور، بر اساس دستورالعمل‌های مربوطه در کیت (و بر اساس غلظت کل پروتئین محاسبه شده به روش برادفورد)، مقادیر مورد نیاز از محلول‌های هموژنیزه بافتی با معرف‌های موجود در کیت برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در داخل میکروپلیت انکوبه شدند. جذب نوری در طول موج ۴۱۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (DRG, USA) خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم به صورت واحد در میلی‌گرم از پروتئین بافتی (Unit/mg pro) نمایش داده شد.

آنالیز آماری

در مطالعه حاضر از نرم‌افزار SPSS 20 برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. تفاوت‌های سطح اضطراب، اختلال حافظه کاری و سطح فعالیت GPx با آزمون ANOVA و سپس با آزمون LSD مقایسه شدند و بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند و $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر آسکوربیک اسید بر حافظه کاری

میانگین درصد تناوب در اثر اوارکتومی شدن بطور معنی‌داری نسبت به گروه شم با $p < 0/05$ کاهش یافت.

منتهی می‌شوند. ماز توسط پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ cm از سطح زمین قرار گرفت. موش‌ها درون محدوده مرکزی ماز قرار داده شدند بطوریکه رو به یک راهروی باز قرار گیرند. در مدت ۵ دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف ماز حرکت می‌کرد، تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهرو باز می‌شد؛ تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهرو بسته می‌شد؛ مدت زمانی که حیوان در راهرو باز باقی می‌ماند؛ و نهایتاً مدت زمانی که حیوان در راهرو بسته ماز باقی می‌ماند به روش فیلمبرداری اندازه‌گیری شد. منظور از ورود به راهروی باز یا بسته هنگامی است که هر چهار پای حیوان در راهروی مورد نظر قرار می‌گرفت. زمان گذرانده شده در هر راهرو نیز بر همین اساس محاسبه شد. نور مناسب توسط یک لامپ ۱۰۰ واتی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی‌متری از مرکز ماز قرار داشت تأمین شد. برای هر حیوان درصد ورود به راهرو باز و درصد زمان گذرانده‌شده در راهرو باز به طریق زیر محاسبه شد:

درصد دفعات ورود به راهرو باز (% Open Arm Entries;
%OAE = تعداد ورود به راهرو باز / تعداد ورود به راهرو باز +
تعداد ورود به راهرو بسته $\times 100$)

درصد زمان گذرانده شده در راهرو باز (%Open Arm
Time; %OAT = مدت زمان گذرانده‌شده در راهرو باز /
مدت زمان گذرانده‌شده در راهرو باز + مدت زمان گذرانده‌شده
در راهرو بسته $\times 100$)

افزایش معنی‌دار هر کدام از دو پارامتر فوق نشان دهنده کاهش اضطراب است. اگرچه فاکتور %OAE نسبت به فاکتور %OAT دارای حساسیت کمتری در ثبت رفتار اضطرابی و یا ضد اضطرابی حیوان است. همچنین مجموع تعداد دفعات ورود به بازوها، بعنوان شاخصی برای فعالیت حرکتی حیوان در نظر گرفته شد [۱].

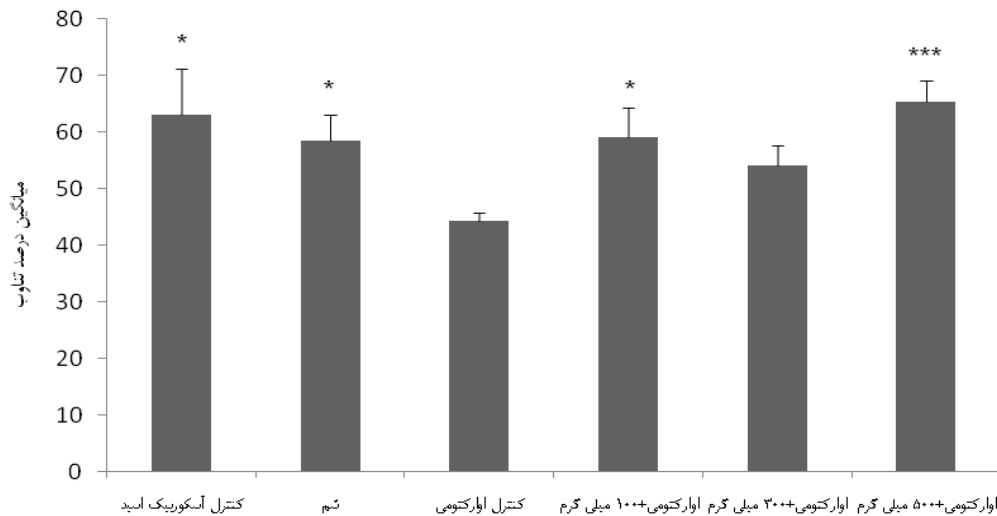
اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون

پراکسیداز

حیوانات ابتدا با اثر بیهوش شده و بعد از جدا کردن سر با گیوتین بلافاصله مغز از داخل جمجمه خارج، توزین و داخل میکروتیوب ۲ سی‌سی قرار گرفت و بعد از فریز شدن در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- منتقل شد. بعد از جمع‌آوری همه

تناوب را در مقایسه با گروه اوارکتومی افزایش داد (نمودار ۱).

آسکوربیک اسید با دوزهای ۱۰۰ mg/kg با $p < ۰/۰۵$ و با دوز ۵۰۰ mg/kg با $p < ۰/۰۰۱$ بطور معنی داری میانگین درصد



نمودار ۱- اثر آسکوربیک اسید بر حافظه کاری. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده است ($n = ۸$). $p < ۰/۰۵$ و $p < ۰/۰۰۱$: *** نسبت به گروه اوارکتومی شده.

در بررسی نتایج فعالیت حرکتی، در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد که نشان‌دهنده یکسان بودن توانایی فعالیت حرکتی حیوانات می‌باشد (نمودار ۴).

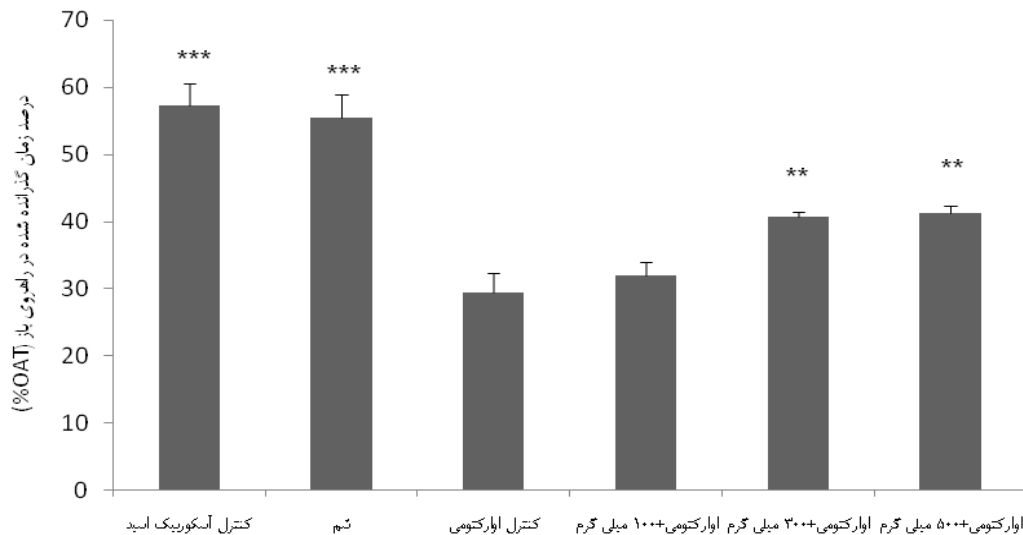
اثر آسکوربیک اسید بر سطح فعالیت GPx

میزان فعالیت GPx در گروه اوارکتومی شده بطور معنی داری نسبت به گروه شم ($p < ۰/۰۵$) کاهش یافت. این فاکتور در گروه دریافت‌کننده آسکوربیک اسید با دوز ۵۰۰ mg/kg نسبت به گروه اوارکتومی شده بطور معنی داری ($p < ۰/۰۰۱$) افزایش یافت (نمودار ۵).

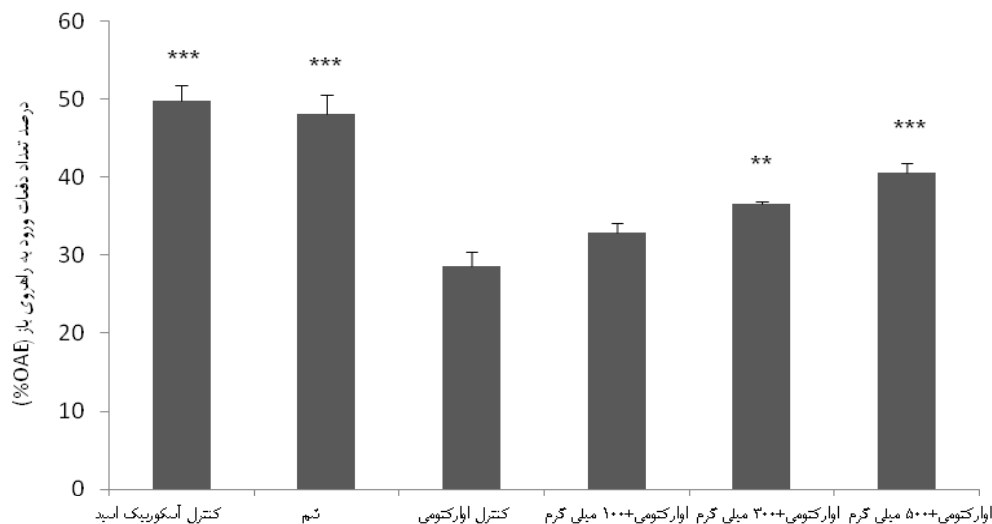
اثر آسکوربیک اسید بر رفتار شبه اضطرابی

جراحی اوارکتومی کردن به طور معنی داری باعث کاهش فاکتور %OAT نسبت به گروه شم شد ($p < ۰/۰۰۱$). آسکوربیک اسید با دوزهای ۳۰۰ mg/kg با $p < ۰/۰۱$ و ۵۰۰ mg/kg با $p < ۰/۰۱$ باعث افزایش معنی دار درصد زمان گذرانده شده در راهرو باز نسبت به گروه اوارکتومی شد (نمودار ۲).

همچنین اوارکتومی کردن بطور معنی داری فاکتور %OAE را نسبت به گروه شم با $p < ۰/۰۰۱$ کاهش داد. آسکوربیک اسید با دوزهای ۳۰۰ mg/kg با $p < ۰/۰۱$ و ۵۰۰ mg/kg با $p < ۰/۰۰۱$ این فاکتور را بطور معنی داری نسبت به گروه اوارکتومی افزایش داد (نمودار ۳).



نمودار ۲- اثر آسکوربیک اسید بر فاکتور %OAT. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده است ($n = 8$). $p < 0.001$ و $***$: نسبت به گروه اوارکتومی شده.



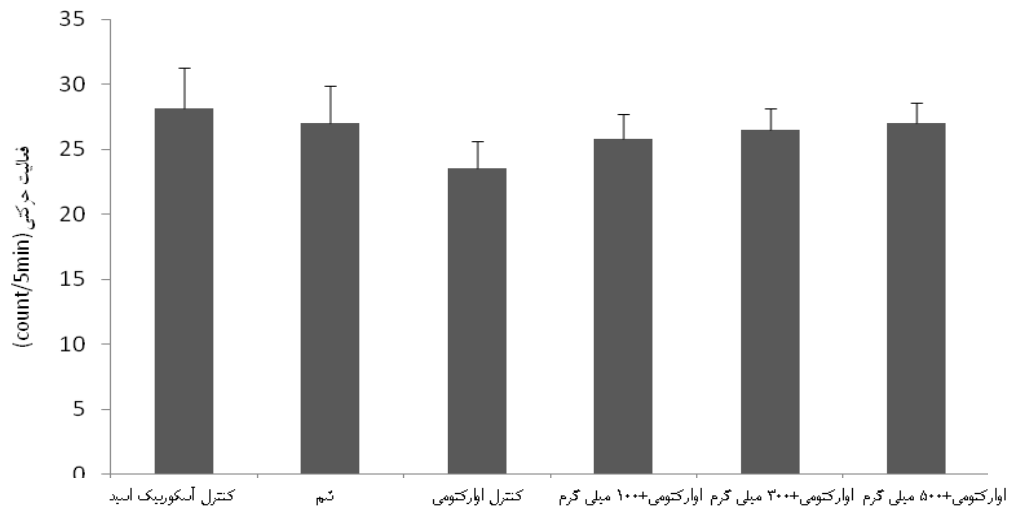
نمودار ۳- اثر آسکوربیک اسید بر فاکتور %OAE. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده است ($n = 8$). $p < 0.001$ و $***$: نسبت به گروه اوارکتومی شده.

بحث

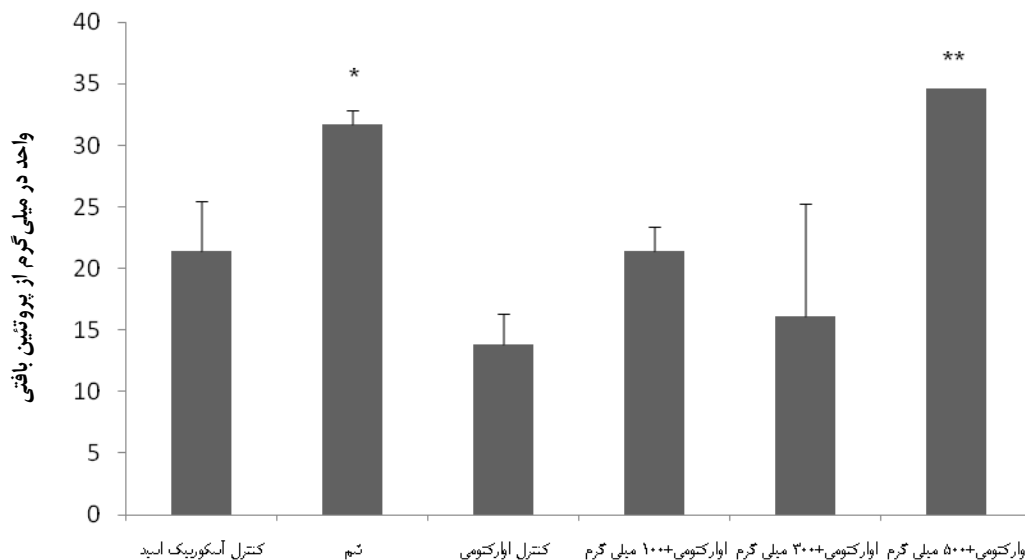
آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد [۵]. همچنین در مطالعات انجام شده، نقش رادیکالهای آزاد و استرس اکسیداتیو در آسیب‌های عصبی از جمله هیپوکمپ و اختلالات حافظه مشخص شده است [۱۳، ۱۴]. سیستم آنتی‌اکسیدانی از طریق آنزیم‌هایی نظیر SOD و GPx از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند. GPx یک سلنیوآنزیم (selenoenzyme) است که باعث تخریب H_2O_2 و هیدروپراکسیدها می‌شود؛ همچنین نشان داده شده که در خانم‌های یائسه میزان سطح ویتامین C بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد که این کاهش ممکن است

در این مطالعه به بررسی اثرات آسکوربیک اسید بر روی سطح فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلوکاتایون پراکسیداز و همچنین اختلالات حافظه و اضطراب در شرایط شبه‌یائسگی در موش سوری پرداختیم که نتیجه تاثیر مثبت درمان با ویتامین C در بهبود حافظه، کاهش سطح اضطراب و همچنین افزایش سطح فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز مشاهده شد. نشان داده شده است که در یائسگی با کمبود استروژن تولید رادیکالهای آزاد افزایش یافته و سیستم دفاع

بدلیل افزایش مصرف آن برای مقابله با استرس اکسیداتیو و مهار پراکسیداسیون لیپیدی غشاء باشد [۵]. مشخص شده است که برداشتن تخمدان موش‌ها با کاهش فعالیت آنزیم‌های کلیدی سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن از جمله SOD, CAT و GPx همراه



نمودار ۴- اثر اوارکتومی و آسکوربیک اسید بر فعالیت حرکتی. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده است ($n = 8$).



نمودار ۵- اثر آسکوربیک اسید بر سطح فعالیت GPx. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده است ($n = 8$). $p < 0.05$: * و $p < 0.01$: ** نسبت به گروه اوارکتومی شده.

افزایش قابل توجه در سطوح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD, CAT و GPx) در بافت کبد می‌شود [۱۶]. نتایج مطالعه ما هم نشان داد که تجویز آسکوربیک اسید (با دوز ۵۰۰ mg/kg) بمدت یک ماه باعث افزایش فعالیت GPx در مغز موش‌های اوارکتومی می‌شود. پس بنظر می‌رسد که ممکن است بخشی از اثرات دیده شده آسکوربیک اسید در این مطالعه به دلیل اثرات آسکوربیک اسید بر روی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد.

است [۱۵]. نتایج مطالعه ما هم نشان داد که فعالیت GPx در مغز موش‌های اوارکتومی شده کاهش می‌یابد. مطالعات زیادی اثرات ویتامین C را بر استرس اکسیداتیو بررسی کرده‌اند و نشان دادند که ویتامین C می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی مانند SOD، CAT و GPx افزایش دهد و از این طریق باعث محافظت بدن در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو شود [۱۰]. در مطالعه دیگری نشان داده شد که ویتامین C یک نقش پیشگیری‌کننده در برابر استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از دیابت القا شده با استرپتوزوسین در موش‌ها داشته و موجب

مبتلا به اختلال اضطراب دریافتند که سطوح ویتامین C در این بیماران بطور قابل توجهی نسبت به گروه سالم کمتر است که پس از درمان با مکمل این ویتامین میزان اضطراب کاهش یافت و سطوح خفونی آنتی اکسیدانها افزایش معنی داری را نشان داد [۲۰]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر که Mazloom و همکارانش بر روی اختلالات عصبی از جمله اضطراب بر روی بیماران مبتلا به دیابت انجام دادند نشان دادند که مصرف مکمل ویتامین C بطور قابل توجهی سطح اضطراب را کاهش می‌دهد که این کاهش از طریق کاهش آسیب اکسیداتیو است [۱۴]. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعات مشابه ارتباطی بین اضطراب و ایجاد آسیبهای اکسیداتیو وجود دارد که ویتامین C از طریق خاصیت آنتی اکسیدانی اش و افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی باعث بهبودی این اختلال می‌شود.

نتیجه‌گیری

درمان با آسکوربیک اسید (به خصوص دوز ۵۰۰ mg/kg) باعث بهبود حافظه کاری، اضطراب و همچنین سطح فعالیت گلوکوتائون پراکسیداز در موشهای اوارکتومی می‌شود. با توجه به اینکه در مقایسه با سایر داروهای حفاظت کننده نورونی، ویتامینها دارای عوارض جانبی بسیار کمتری می‌باشند، در صورت انجام کارآزمایی‌های بالینی جهت تایید این اثرات پیشنهاد می‌شود ویتامین C بعنوان مکمل برای کاهش علائم اضطراب و اختلال حافظه در زنان یائسه مصرف شود. البته مطالعات بیشتر باید بر روی دیگر ابعاد حافظه و عملکردهای شناختی انجام شود و همچنین بررسی دیگر آنزیمهای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و فاکتورهای نوروتروفیک در مغز جهت پی بردن به مکانیسم دقیق آسکوربیک اسید لازم است.

سپاسگزاری

از حمایت مالی معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان قدردانی می‌شود.

ملاحظات مالی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و با شماره طرح ۲۰/۶۰۵ انجام شده است.

نتایج مطالعه ما نشان داد که برداشتن تخمدانها باعث اختلال در حافظه کاری موشها می‌شود و تجویز آسکوربیک-اسید (با دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰ mg/kg) باعث بهبود این اختلالات می‌شود. یکی از شایعترین عوارض یائسگی اختلال حافظه و یادگیری می‌باشد که علت بروز این عارضه را اختلال در عملکرد هیپوکمپ و ازبین رفتن نورونهای این ناحیه می‌دانند. مطالعات زیادی اختلال در عملکرد هیپوکمپ و کاهش حافظه و یادگیری را در فقدان هورمونهای جنسی در شرایط اوارکتومی در موشها نشان داده‌اند [۱۷]. از طرف دیگر اثرات مفید درمان جایگزین استروژن در بهبود عملکرد شناختی در موشهای اوارکتومی شده به‌خوبی ثابت شده است [۱۸]. در مطالعه دیگری، Tomé و همکارانش نشان دادند که آسکوربیک اسید اثرات مفیدی در نقص حافظه و آسیب هیپوکمپ مشاهده شده در طول تشنج دارد. این محققین نشان دادند که آسکوربیک اسید اثرات خود را توسط مهار رادیکالهای آزاد اعمال می‌کند و از این طریق باعث ایجاد اثرات محافظت کننده نورونی و کاهش آسیب به هیپوکمپ می‌شود [۱۳]. Mhaidat و همکاران نشان دادند که آسکوربیک اسید اثرات مفیدی بر روی اختلال حافظه ناشی از بی‌خوابی دارد و این عمل را از طریق طبیعی کردن سطح و فعالیت آنزیمهای دفاع آنتی اکسیدانی از جمله گلوکوتائون پراکسیداز در هیپوکمپ انجام می‌دهد [۱۹]. به نظر می‌رسد که بخشی از مکانیسم آسکوربیک اسید در بهبود حافظه در موشهای اوارکتومی از طریق اثرات محافظت کننده نورونی (از طریق افزایش دفاع آنتی اکسیدانی) در مغز می‌باشد.

در راستای نتایج مطالعه حاضر، یائسگی و توقف تولید استروژن از تخمدانها موجب بروز رفتارهای اضطرابی می‌شود. در مطالعه‌ای علی محمدی و همکارانش به بررسی رابطه کاهش استروژن و بروز رفتار شبه اضطرابی در موشهای اوارکتومی شده پرداختند که نتایج این مطالعه افزایش معنی دار اضطراب در گروه اوارکتومی شده را نشان می‌دهد [۱]. نتایج ما در این مطالعه نشان داد که تجویز ویتامین C (با دوزهای ۵۰۰ و ۳۰۰ mg/kg) در موشهای اوارکتومی باعث بهبود اضطراب شد. همسو با نتایج مطالعه ما و مطالعات متعدد انجام شده که به بررسی رابطه استرس اکسیداتیو و سیستم آنتی اکسیدانی و بروز اختلالات اضطرابی پرادوارکتومی شده است، Gautam و همکارانش در مطالعه‌ای بر روی بیماران

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

ف.د: انجام مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله؛ ع.ش:

فهرست منابع

- [1] Alimohammadi R, Naderi S, Allahtavakoli M, Effects of exercise and estrogen on anxiety-like behaviors in ovariectomized mice. *J Babol Univ Med Sci* 12 (2015) 40-46.
- [2] Sárvari M, Kalló I, Hrabovszky E, Solymosi N, Rodolosse A, Liposits Z, Long-Term Estrogen Receptor Beta Agonist Treatment Modifies the Hippocampal Transcriptome in Middle-Aged Ovariectomized Rats. *Front Cell Neurosci* 10 (2016) 1-20.
- [3] Engler-Chiurazzi E, Singh M, Simpkins J, Reprint of: From the 90's to now: A brief historical perspective on more than two decades of estrogen neuroprotection. *Brain Res* 1645 (2016) 79-82.
- [4] Luine V, Frankfurt M, Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. *Neuroscience* 239 (2013) 34-45.
- [5] Ansar S, Tayef Alhefdhi, Aleem AM, Status of trace elements and antioxidants in premenopausal and postmenopausal phase of life: a comparative study. *Int J Clin Exp Med* 8 (2015) 19486.
- [6] Sribnick EA, Del Re AM, Ray SK, Woodward JJ, Banik NL, Estrogen attenuates glutamate-induced cell death by inhibiting Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated Ca²⁺ channels. *Brain Res* 1276 (2009) 159-170.
- [7] Wang F, Song Y-F, Yin J, Liu Z-H, Mo X-D, Wang D-G, Gao LP, Jing YH, Spatial memory impairment is associated with hippocampal insulin signals in ovariectomized rats. *PloS one* 9 (2014) e104450.
- [8] Umadevi P, Murugan S, Jennifer Suganthi S, Subakanmani S, Evaluation of antidepressant like activity of cucurbita pepo seed extracts in rats. *Int J Curr Pharm Res* 3 (2011) 108-113.
- [9] Dixit S, Bernardo A, Walker JM, Kennard JA, Kim GY, Kessler ES, Harrison FE, Vitamin C deficiency in the brain impairs cognition, increases amyloid accumulation and deposition, and oxidative stress in APP/PSEN1 and normally aging mice. *ACS Chem Neurosci* 6 (2015) 570-581.
- [10] Akinrinmade FJ, Akinrinde AS, Soyemi OO, Oyagbemi AA, Antioxidant potential of the methanol extract of Parquetina nigrescens mediates protection against intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Diet Suppl* 13 (2016) 420-432.
- [11] Spowart-Manning L, Van der Staay F, The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. *Behav Brain Res* 151 (2004) 37-46.
- [12] Fatemi I, Shamsizadeh A, Ayoobi F, Taghipour Z, Sanati MH, Roohbakhsh A, Motevalian M, Role of orexin-A in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 291 (2016) 101-109.
- [13] Tomé AdR, Feitosa CM, Freitas RMd, Neuronal damage and memory deficits after seizures are reversed by ascorbic acid? *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 68 (2010) 579-585.
- [14] Mazloom Z, Ekramzadeh M, Hejazi N, Efficacy of supplementary vitamins C and E on anxiety, depression and stress in type 2 diabetic patients: a randomized, single-blind, placebo-controlled trial. *Pakistan J Biol Sci* 16 (2013) 1597-1600.
- [15] Yazgan B, Yazgan Y, Övey İS, Naziroğlu M, Raloxifene and Tamoxifen Reduce PARP Activity, Cytokine and Oxidative Stress Levels in the Brain and Blood of Ovariectomized Rats. *J Mol Neurosci* 60 (2016) 214-222.
- [16] Gren A, Effects of vitamin E, C and D supplementation on inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. *Int J Vitam Nutr Res* 83 (2013) 168-175.
- [17] Kaidah S, Soejono S, Partadiredja G, Exercise improves hippocampal estrogen and spatial memory of ovariectomized rats. *Bratislavske Lekarske Listy* 117 (2015) 94-99.
- [18] Liu X, Wang L, Peng D, Wang Y, Ren M, Effects of estrogen replacement therapy on cognitive function of ovariectomized rats. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 49 (2014) 42-47 [in Chinese].
- [19] Mhaidat NM, Alzoubi KH, Khabour OF, Tashtoush NH, Banihani SA, Abdul-razzak KK, Exploring the effect of vitamin C on sleep deprivation induced memory impairment. *Brain Res Bull* 113 (2015) 41-47.
- [20] Gautam M, Agrawal M, Gautam M, Sharma P, Gautam AS, Gautam S, Role of antioxidants in generalised anxiety disorder and depression. *Indian J Psychiatry* 54 (2012) 244-247.

Research paper

The effect of Ascorbic Acid on working memory, anxiety like-behavior and the activity of Glutation Peroxidase (GPx) in ovariectomized mice

Fatemeh Delrobaei¹, Ali Shamsizadeh¹, Iman Fatemi¹, Elham Hakimizadeh¹, Fatemeh Ayoobi¹, Mahboobeh Bannazadeh¹, Mohammad Allahtavakoli^{1,2*}

1. Physiology-Pharmacology Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

2. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Received: 12 April 2017

Accepted: 19 June 2017

Abstract

Background and aim: It has been reported that menopause is associated with increased oxidative stress and subsequent memory deficits and anxiety. According to the antioxidant property of Ascorbic Acid (AA), we tested the effect of AA on oxidative stress, impairment of working memory and anxiety like-behavior in ovariectomized mice.

Methods: Forty-eight female mice weighting 20 ± 5 g were randomly divided into six groups of eight including AA control group, sham, untreated ovariectomized, and ovariectomized treated with the doses of (100, 300, 500 mg/kg, by oral gavage for 1 month) of AA. Then, working memory (by T-maze), anxiety like-behavior (by Elevated Plus-maze) and the activity of Glutation peroxidase (GPx) in mice brain tissues were determined.

Results: AA by the doses of 100 ($p < 0.05$) and 500 mg/kg ($p < 0.001$) improved working memory of ovariectomized mice compared to untreated ovariectomized group. AA by the doses of 300 and 500 mg/kg increased Open Arm Time (%OAT) of ovariectomized animals compared to untreated ovariectomized group ($p < 0.01$). Open Arm Entries (%OAE) were also increased in ovariectomized treated group by the dose of 300 ($p < 0.01$) and 500 mg/kg ($p < 0.001$) of AA. The activity level of GPx increased in ovariectomized mice treated by AA 500 mg/kg compared to untreated ovariectomized group ($p < 0.01$).

Conclusion: AA especially at the dose of 500 mg/kg showed a significant improvement in anxiety, working memory as well as the level of GPx activity in ovariectomized mice.

Keywords: Anxiety like-behavior, Ascorbic Acid, Glutation peroxidase, Ovariectomy, Working memory

Please cite this article as follows:

Fatemeh Delrobaei, Ali Shamsizadeh, Iman Fatemi, Elham Hakimizadeh, Fatemeh Ayoobi, Mahboobeh Bannazadeh, Mohammad Allahtavakoli, The effect of Ascorbic Acid on working memory, anxiety like-behavior and the activity of Glutation Peroxidase (GPx) in ovariectomized mice. *Iran J Physiol Pharmacol* 2 (2018) 108-117.

*Corresponding author e-mail: allahtavakoli@gmail.com
Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>
Journal E-mail: ijpp@phypha.ir