

## Research Paper

# Effect of Donepezil and Hyoscyamoside on Improving Spatial Memory in Rats With Alzheimer's Disease



Fatemeh Heidari Soureshjani<sup>1</sup>, \*Majid Kheirollahi<sup>2,3</sup>, Parichehreh Yaghmaei<sup>1</sup>, Fattah Sotoodehnejadnematalahi<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.



**Citation:** Heidari Soureshjani F, Kheirollahi M, Yaghmaei P, Sotoodehnejadnematalahi F. [Effect of donepezil and hyoscyamoside on improving spatial memory in rats With Alzheimer's Disease (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences(JAMS). 2020; 23(4):524-539. <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.4.6135.1>

<https://doi.org/10.32598/JAMS.23.4.6135.1>



### Article Info:

Received: 16 Mar 2020

Accepted: 05 Jul 2020

Available Online: 01 Oct 2020

### Keywords:

Alzheimer's disease, Hyoscyamoside, Donepezil, Morris water maze, Spatial memory

## ABSTRACT

**Background and Aim** Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative brain disease that gradually destroys memory and cognitive skills. The disease is caused by the formation of beta-amyloid plaques, oxidative stress, dysfunctions in the cholinergic system, neuronal killing inflammation, and ultimately brain atrophy. Donepezil and hyoscyamoside have inhibitory effects on these pathogens; therefore, their impact on the learning process of Alzheimer's rats in the Morris Water Maze was investigated.

**Methods & Materials** In the present experimental study, 60 male rats of Wistar breed with approximately 7 weeks age within the control group (rats that received normal water and food), the PBS group (underwent surgery), PBS group (received solvent A $\beta$ ), the first Alzheimer's group (animals that received beta-amyloid by Alzheimer's surgery, second Alzheimer's group (after Alzheimer's surgery, they received 1 cc of normal saline daily, and treatment groups that treated the rats with beta-amyloid after Alzheimer. In the hyoscyamoside group, they received 10 mg/kg daily of hyoscyamoside for 28 days. The donepezil group received it 4 mg/kg daily for 28 days by gavage. The Morris Water Maze test was used to evaluate learning and memory. Data were analyzed by ANOVA statistical analysis and Post Hoc test.

**Ethical Considerations** The Ethics Committee in Biomedical Research, Islamic Azad University, Science and Research Branch approved the research (Code: IR.IAU.SRB.REC 1397.057)

**Results** Beta-amyloid injection caused extensive damage to memory. The treatment groups with hyoscyamoside and donepezil spent less time and distance with a significant level ( $P < 0.001$ ) than the group of Alzheimer's patients to find the hidden platform. In the reminder phase, where the previously hidden platform was located, they spent more time, with a significant level ( $P < 0.001$ ) in the local quarter.

**Conclusion** Treatment of rats with hyoscyamoside and donepezil improved spatial memory in Alzheimer's rats. They appear to play a significant role in the prevention and treatment of Alzheimer's disease

## Extended Abstract

### 1. Introduction

# A

lzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease that is associated with pro-

found impairments of memory and cognitive functions. In this disease, amyloid accumulation with hyperphosphorylation of tau protein, creating oxidative stress, inflammation, altered secretion of mediators, inhibition of synaptic plasticity, decreased number and function of cholinergic neurons, and eventually cell death. Research has shown that the use

### \*Corresponding Author:

Majid Kheirollahi, PhD.

Address: Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Tel: +98 (31) 37929086

E-mail: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

of steroid saponins reduces pro-inflammatory factors in the brain. Other benefits include their antioxidant and anti-acetylcholinesterase properties [5].

The use of medicinal plants with low side effects and antioxidant properties has received much attention. Therefore, we investigated the effect of sapogenin (hyoscyamoside) on spatial memory, and perhaps it can be used as a dietary supplement for families with hereditary Alzheimer's disease in the prevention, delay of pathology, and treatment of this disease.

## 2. Materials and Methods

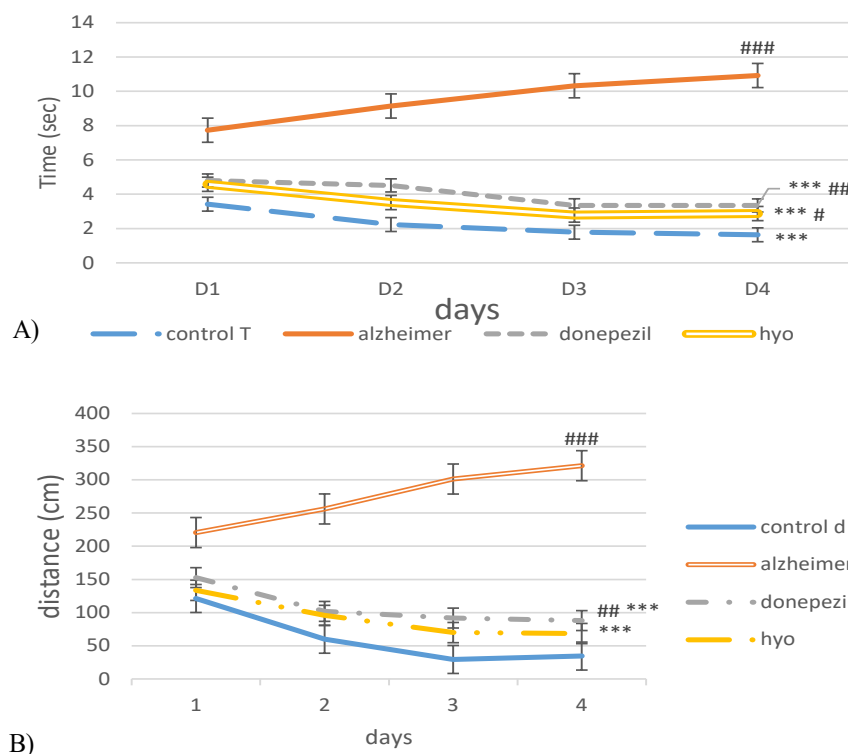
In the present experimental study, 60 male Wistar rats, approximately 7 weeks old, were divided into the following groups: control group, consisted of rats that received normal water and food; PBS group underwent surgery and received PBS (Aβ solvent); the first Alzheimer's group consisted of rats that received beta amyloid during Alzheimer's surgery; the second Alzheimer's group received 1 cc of normal saline

daily after Alzheimer's surgery; the treatment groups, after beta-amyloid induction of Alzheimer's disease in the rats, received 10 mg/kg of hyoscyamoside for 28 days in the hyoscyamoside group; the donepezil group received 4 mg/kg of this substance by gavage for 28 days.

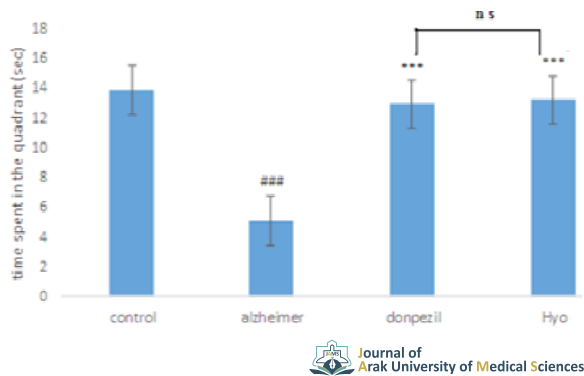
Morris Water Maze (MWM) test was used to assess learning and memory. Due to the lack of differences in the initial results of the MWM test in the control group and PBS group, the control group was considered as the control group and therefore the second Alzheimer's group was considered as the Alzheimer's group. In this study, SPSS software V. 22 was used. To investigate the existence of significant differences between the groups, Analysis of Variance (ANOVA) and post hoc tests were used according to the data.

## 3. Results

MWM test was used to evaluate spatial learning and memory. The results showed that the learning and spatial memory of the rats that received Aβ as an intra-hippocampal injection



**Figure 1.** Effect of treatment with donepezil and Hyoscyamoside (Hyo) on Alzheimer's animals using the Morris Water navigation task  
 A: Elapsed time; B: The distance swam in the Morris water navigation task to find the hidden platform on different days of the experiment;  
 \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001, Significant difference compared to Alzheimer's group;  
 ##P<0.01; ###P<0.001, Significant difference compared to the control group.



**Figure 2.** The effect of treatments on Alzheimer's rats in the dot-probe test in the Morris water navigation task

\*\*\* $P < 0.001$ , Significant difference compared to Alzheimer's group;

### $P < 0.001$ , Significant difference compared to the control group;

NS: Nonsignificant.

were impaired ( $P < 0.001$ ). The time elapsed and the distance traveled to reach the hidden platform, in the first to third days of training were considered as the criteria for learning, and on the fourth day after learning, they were considered as the criteria for verification. Alzheimer's rats spent significantly more time and distance to find the hidden platform than the control group ( $P < 0.001$ ).

The treatment groups showed a significant decrease ( $P < 0.001$ ) compared to the Alzheimer's group. On the fourth day, the hyoscyamoside group showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) in the elapsed time compared to the control group. The donepezil treatment group showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) compared to the hyoscyamoside group. Regarding the distance traveled, the donepezil group showed a significant difference ( $P < 0.01$ ) compared to the control group, while the hyoscyamoside group had a significant difference ( $P < 0.01$ ) compared to the control group. In the treatment groups, significant improvement in learning disability and spatial memory of A $\beta$ -receiving rats were observed ( $P < 0.001$ ). The elapsed time and distance traveled to reach the hidden platform in the rats in the treatment groups decreased compared to the Alzheimer's group (Figure 1).

In the dot-probe test, Figure 2 showed a significant increase in the time spent in the target quadrant by the treatment groups compared to the Alzheimer's group ( $P < 0.001$ ), and this showed the positive effect of treatments on learning and spatial memory of Alzheimer's rats. The treatment groups were not significantly different from each other and the control group ( $P < 0.05$ ).

## 4. Discussion and Conclusion

In this study, Alzheimer's disease in rats reduced their spatial memory, and their spatial memory improved after treatments. The time and the distance to reach the podium in the rats' treatment groups were significantly reduced compared to the Alzheimer's group (Figure 1). Studies showed that induction of Alzheimer's disease in rats by A $\beta$ 1-42, reduced their memory, and triggered an inflammatory response. Treatment with donepezil improved Alzheimer's rats' performance on the Morris water navigation task and reduced their inflammatory cytokines [16].

The use of the steroidal saponin diosgenin in mutant rats improved their memory and showed that the diosgenin treatment group removed A $\beta$  plaque, reduced neuronal death and neurofibrillary tangles in the cerebral cortex and hippocampus, and inhibited acetylcholinesterase [15]. Sapogenins with antioxidant properties inhibit IL-6 and TNF $\alpha$  and inhibit their production of free radicals [27].

Researchers are trying to develop drugs that, in addition to having better effects, also have fewer side effects. Plants are one of the sources that have always been used for the production of new medicines [17]. The present results showed that the use of donepezil and hyoscyamoside improved memory. The treatments may have improved the condition of plaque formation and memory loss (due to plaque) and cholinergic system defects, which may be due to the inhibitory activity of acetylcholinesterase and antioxidants.

## 5. Conclusion

According to the results of studies in people at high risk of Alzheimer's disease, it is suggested that the use of hyoscyamoside and donepezil be included in their daily diet for prevention. In people with Alzheimer's, taking hyoscyamoside may improve the disease, possibly by influencing the causes of Alzheimer's (such as accumulated beta-amyloid plaque, cholinergic system disorders, oxidative stress, and inflammation), and prevention of neuronal apoptosis improves the disease and prevents familial cases of Alzheimer's.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This research was ethically approved by the Islamic Azad University, Science and Research Branch (Code: REC.1397.057. IR.IAU.SRB).

### **Funding**

The paper was extracted from the PhD. dissertation of the first author, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran.

### **Authors' contributions**

All authors met the standard writing criteria based on the recommendations of the [International Committee of Medical Journal Publishers \(ICMJE\)](#) and all contributed equally to the writing of the work.

### **Conflicts of interest**

The authors declared no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

This article was taken from a doctoral dissertation and has no sponsorship. We are grateful to all those who cooperated with us in conducting this research.

---

This Page Intentionally Left Blank

---

## اثر دونپزیل و هیوسیاموزید بر بهبود حافظه فضایی در رت‌های مبتلا به آلزایمر

فاطمه حیدری سورشجانی<sup>۱</sup>، \*مجید خیراللهی<sup>۲،۳</sup>، پریچهره یغمایی<sup>۱</sup>، فتاح ستوده‌نژاد نعمت‌اللهی<sup>۱</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده پیشگیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری آلزایمر یک بیماری مغزی از بین‌برنده اعصاب است که به مرور حافظه و مهارت‌های شناختی را تخریب می‌کند. در این بیماری تجمع بتا آمیلوئید، استرس اکسیداتیو، نقص در سیستم کولینرژیک و التهاب منجر به مرگ نورون‌ها و نهایتاً انحطاط مغزی می‌شود. دونپزیل و هیوسیاموزید دارای تأثیرات مهمی بر این عوامل بیماری‌زا هستند. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر این دو ترکیب بر حافظه و یادگیری موش‌های صحرایی آلزایمری بود.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه تجربی حاضر، شصت رت نر نژاد ویستار با سن تقریبی هفت هفته در گروه‌های کنترل (آب و غذای معمولی دریافت کردند)؛ PBS (تحت عمل جراحی قرار گرفته و PBS دریافت کردند)؛ آلزایمر اول (تحت عمل جراحی آلزایمری، بتا آمیلوئید دریافت کردند)؛ آلزایمر دوم (پس از جراحی آلزایمری روزانه یک سی‌سی نرمال سالین دریافت می‌کردند) و گروه‌های تیمار که پس از آلزایمری شدن به مدت ۲۸ روز، روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هیوسیاموزید (گروه هیوسیاموزید) و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم دونپزیل (گروه دونپزیل) به صورت گاوآژ دریافت کردند، تقسیم شدند. برای ارزیابی یادگیری و حافظه از آزمون ماز آبی موریس استفاده شد. داده‌ها توسط آزمون آنالیز آماری وان وی آنووا (One Way) و آزمون Post Hoc (پست‌هاک) بررسی شدند.

**ملاحظات اخلاقی:** مجوز تحقیق توسط کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات با کد IR.IAU.SRB.REC 1397.057 صادر شد.

**یافته‌ها:** تزریق بتا آمیلوئید موجب آسیب بسیار به حافظه شد. گروه‌های تیمار با هیوسیاموزید و دونپزیل نسبت به گروه آلزایمری، زمان و مسافت کمتری را برای یافتن سکوی پنهان سپری کردند ( $P < 0.001$ ) و در مرحله یادآوری که قبلاً سکوی پنهان قرار داشت نیز زمان بیشتری را در ربع محلی گذراندند ( $P < 0.001$ ).

**نتیجه‌گیری:** تیمار با هیوسیاموزید و دونپزیل موجب بهبود حافظه فضایی در موش‌های آلزایمری می‌شود. به نظر می‌رسد این ترکیبات در پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر نقش بارزی داشته باشند.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۶ اسفند ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۰۵ شهریور ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۳۹۹

### کلیدواژه‌ها:

بیماری آلزایمر، هیوسیاموزید، دونپزیل، آزمون ماز آبی موریس، حافظه فضایی

### مقدمه

می‌گردد. از جمله عوامل افزایش آن، بیماری‌های مزمن التهابی، رژیم غذایی فاقد آنتی‌اکسیدان و کاهش فعالیت‌های ذهنی و بدنی معرفی شده است [۲]. در سال ۲۰۰۶ بیش از ۲۶ میلیون نفر از این بیماری آسیب دیده بودند. پیش‌بینی‌ها نشانگر ابتلای یک نفر از هر ۸۵ نفر در جهان تا سال ۲۰۵۰ است [۳]. این بیماری در زنان مسن شایع‌تر از مردان است. ترکیبات استروئیدی پیش‌ساز استروژن، پروژسترون و خود آن‌ها در درمان هورمونی زنان در یائسگی، بر حافظه اثر مثبت داشته‌اند. هورمون‌های استروئیدی زنان موجب بهبود تعداد سیناپس‌های عصبی، افزایش حلالیت بتا آمیلوئیدها و انجام نقش آنتی‌اکسیدانی توسط آن‌ها می‌شوند و بر حافظه اثر مثبتی دارند [۲]. رادیکال‌های آزاد با تخریب بافت مغز باعث ایجاد گونه‌های فعال

بیماری آلزایمر<sup>۱</sup> یک بیماری نورودژنراتیو است که با اختلالات عمیق عملکردهای حافظه و شناختی همراه است. در این بیماری، تجمع آمیلوئید با هایپرفسفریلاسیون پروتئین تائو، ایجاد استرس اکسیداتیو، التهاب، تغییر ترشح مواد میانجی، مهار پلاستیسیته سیناپسی، کاهش تعداد و عملکرد نورون‌های کولینرژیک و در نهایت مرگ سلولی موجب پیشرفت بیماری می‌شود [۱]. این اختلال بر گفتار، حافظه و تفکر اثر می‌گذارد. شروع بیماری سال‌ها قبل از تخریب حافظه آغاز و باعث ناتوانی فرد در مراقبت از خویش

1. Alzheimer's Disease (AD)

\*نویسنده مسئول:

دکتر مجید خیراللهی

نشانی: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی.

تلفن: +۹۸ (۳۱) ۳۷۹۲۹۰۸۶

پست الکترونیکی: mkheirollahi@med.mui.ac.ir





ساپونین‌ها حمایت می‌کنند. استفاده از ساپونین استروئیدی باعث بهبود حافظه در مدل موش 5XFAD شد و موجب کاهش بتا آمیلوئید شد [۹].

دونپزیل یک مهارکننده غیررقابتی و بازگشت‌پذیر استیل کولین استراز است که باعث افزایش استیل کولین خارج سلولی می‌شود و در کبد متابولیزه می‌شود. مهارکننده آنزیم کلیدی تشکیل آمیلوئید، بتا-سکرتاز است و مهار این آنزیم به عنوان یکی از اهداف درمانی بیماری آلزایمر مطرح است. تهوع، استفراغ، اسهال، خستگی، بی‌خوابی، گیجی، بی‌اشتهایی، کاهش وزن، اختلال کبدی و تعریق از جمله عوارض جانبی دارو هستند که استفاده از آن را برای برخی افراد محدود می‌کند [۱۰]. این دارو علائم نشانه‌های را بهبود می‌بخشد. بنابراین راهبردهای درمانی جدیدی برای درمان آلزایمر نیاز است و در این میان، استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کم و خواص آنتی‌اکسیدانی، بسیار مورد توجه است. از این رو اثر ساپونین (هیوسیاموزید) بر حافظه فضایی مورد بررسی قرار گرفت تا شاید با توجه به عوارض کم داروی هیوسیاموزید، از این ترکیب بتوان به عنوان مکمل غذایی برای خانواده‌هایی با بیماری آلزایمر موروثی به منظور پیشگیری، تأخیر پاتولوژی و درمان بیماری استفاده کرد.

مهارکننده‌های استیل کولین استراز از سلول‌ها در برابر آسیب بتا آمیلوئید و رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند و مانع ترشح سیتوکین‌ها به واسطه میکروگلیاها می‌شوند یافته‌ها بر افزایش جریان خون عروق مغزی در درمان با مهارکننده‌های استیل کولین استراز دلالت دارند [۷]. خواص آنتی‌اکسیدانی دونپزیل بر علیه رادیکال‌های آزاد به اثبات رسیده است. دونپزیل نه تنها میکروگلیا را در مغز سرکوب می‌کند، بلکه در موش PS19 تحریک شده با لیپوپولی ساکارید (LPS)، بیان اینترلوکین-1 $\beta$  و سیکلوآکسیژناز ۲ را در مغز و طحال مهار کرده و مانع از التهاب سیستمیک می‌شود. شواهد در حال حاضر نشان می‌دهند مهارکنندگان استیل کولین استرازها دارای نقش ضدالتهابی، اقدام علیه رادیکال‌های آزاد و سمیت آمیلوئید از طریق کاهش انتشار سیتوکین‌ها از میکروگلیا هستند [۱۱].

التهاب ناشی از پلاک‌های آمیلوئیدی در بیماران آلزایمری از جمله دلایل بروز این بیماری است. تجمع بتا آمیلوئید ( $A\beta$ ) در آلزایمر با یک پاسخ التهابی ناشی از فعال شدن میکروگلیا و گرد آمدن آستروسیت‌ها همراه بوده و موجب القاء بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی و افزایش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود. به دلیل نیاز مغز به مقدار قابل توجه انرژی و اکسیژن، این بافت مستعد آسیب‌های اکسیداتیو بوده و افزایش استرس اکسیداتیو مغز در سنین بالا زمینه‌ساز ابتلا به بیماری آلزایمر است [۱۲]. درمان با ساپونین‌های گیاه پلاتیکدن گرانیدیفلوروس (گل زنگوله‌ای

اکسیژن<sup>۲</sup> می‌شوند و عمل میانجی‌های نورونی را مختل می‌کنند، در نتیجه از عوامل اصلی در آلزایمر و تخریب نورونی هستند. تجمع ROS منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود که عامل اصلی بیماری آلزایمر گزارش شده است و به همه مولکول‌های زیستی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک حمله می‌کند. مغز برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد به آنتی‌اکسیدان نیازمند است و همچنین آمیلوئید بتا به واسطه ایجاد استرس اکسیداتیو باعث افزایش آپوپتوز نورون‌ها می‌شود [۳]. شواهد نشان داده است که رژیم حاوی مواد غذایی مدیترانه‌ای (سرشار از آنتی‌اکسیدان) احتمال ابتلا به آلزایمر را تا ۴۰ درصد کاهش می‌دهد [۴].

گیاهان دارویی در سال‌های اخیر به دلیل داشتن اثرات متنوع، برای درمان بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله اثرات درمانی گیاهان خاصیت ضدالتهابی آن‌هاست. رژیم غذایی مناسب برای جلوگیری از التهاب عروق مغزی، افزایش کلسترول و افزودن ریسک آلزایمر لازم است. تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از ساپونین‌های استروئیدی سبب کاهش عوامل پیش‌التهابی در مغز می‌شود. از دیگر فواید آن می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌استیل کولین استرازی آن‌ها اشاره کرد [۵]. گیاه بذالبنج<sup>۲</sup> از تیره سیب‌زمینی<sup>۴</sup> است. این گیاه دارای خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است [۶]. هیوسیاموزید یک ساپونین (گلیکوزید) استروئیدی در بذالبنج است که ۱۷ نوع گلیکوزید از جمله تیگوژنین، فورستان و دیوسژنین دارد. مواد غذایی با خواص آنتی‌اکسیدانی یا ضدالتهابی خود نقش مهمی در کاهش ابتلا و مهار زوال عقل دارند. از این رو اثر هیوسیاموزید بر حافظه فضایی برای نخستین بار مورد بررسی قرار گرفت [۶].

علاوه بر عوامل نوروپاتولوژی، فرضیات استرس اکسیداتیو، التهاب و کولینرژیک از فرضیات ابتلا به بیماری آلزایمر هستند [۷]. مغز بیماران آلزایمری دچار کمبود استیل کولین استیل کولین یک ناقل عصبی مهم در فرایند حافظه و یادگیری است و عقیده بر این است که نقص رفتاری و عملکردی در بیماری آلزایمر به دلیل عدم توانایی در انتقال پیام عصبی در سیناپس‌های کولینرژیک است. بر اساس نظریه کولینرژیک، کاهش میزان استیل کولین در نتیجه آزاد شدن بیش از اندازه استیل کولین استراز بر حافظه افراد مبتلا به آلزایمر تأثیر دارد [۷]. فلاونوئیدها و ساپونین‌های استروئیدی با دارا بودن خاصیت مهارکنندگی استیل کولین استرازی و نیز خواص آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند و در درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارند. کاهش میزان استیل کولین به علت ترشح بیش از اندازه استیل کولین استراز بر حافظه فضایی افراد آلزایمری مؤثر است [۸]. مطالعات *In vivo* و *In vitro* از اثر نوروپروتکتیو

2. Reactive Oxygen Species (ROS)
3. Hyoscyamus niger
4. Solanaceae

سپوزنین بر کاهش آپوپتوز را به نقش آن بر تقویت مسیر AKT/PI3K (فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز) و خانواده BCL-2 نسبت می‌دهند. Akt-PI3K یک مسیر سیگنالینگ داخل سلولی است که بقای سلول را تنظیم می‌کند [۸]. بررسی‌ها نشان داده‌اند فورستان و تیگوژنین دارای خاصیت ضدالتهابی و کاهش اثرات التهابی هستند و ساپونین‌های استروئیدی مسیرهای التهابی JNK/AP-1 و NFkB/IKB (فاکتور هسته‌ای کاپا / زنجیره سبک بهبوددهنده سلول‌های B فعال) را مهار می‌کنند و مشخصاً التهاب از عوامل ایجاد و تشدید پاتولوژی آلزایمر و افزایش دهنده آمیلوئید بتا و سیتوکین‌های التهابی است [۱۶]. مشخص شده است سپوزنین‌های موجود در عصاره فنوگریک<sup>۶</sup> با افزایش مهار استیل کولین استراز باعث بهبود آلزایمر در رت شده و این مهار با حضور این آنتی‌اکسیدان‌ها بیشتر می‌شود و ROS درون سلولی را کاهش می‌دهد. همچنین فلاونوئیدها دارای خاصیت مهارکننده استیل کولین استراز هستند [۱۷]. مطالعات نشان داده‌اند دونپزیل باعث کاهش پلاک در هیپوکامپ و بهبود حافظه از طریق مسیر BDNF/TrkB می‌شود [۱۸].

اخیراً استفاده از گیاهان دارویی با وجود داشتن تأثیرات متعدد و عوارض جانبی کم، توجه محققان را برای درمان بیماری‌ها به خود جلب کرده است. همچنین آنتی‌اکسیدان‌ها و ضدالتهاب‌های طبیعی در دسترس و ارزان قیمت می‌توانند به عنوان رژیم غذایی برای افراد با خطر بالای ابتلا به بیماری‌های زمینه‌ای التهابی یا آلزایمر ارثی مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین در این تحقیق سعی شد اثر یک ترکیب گیاهی در دسترس بر حافظه فضایی موش مورد بررسی قرار گیرد. رژیم غذایی مناسب ممکن است نه فقط بر ریسک بروز AD، بلکه همچنین بر سندرم‌های پیش از زوال مغزی و پیشرفت زوال مغزی اثرگذار باشد. رژیم غذایی مناسب برای جلوگیری از التهاب عروق مغزی، افزایش کلسترول و افزودن ریسک آلزایمر، لازم است. بنابراین استفاده از رژیم حاوی آنتی‌اکسیدان و ترکیبات گیاهی موجب جلوگیری و بهبود عوامل ابتلا می‌گردد [۱۹]. از این رو هیوسیاموزید که ساپونین استروئیدی گیاه بذرا بنج است احتمالاً با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب، مهارکننده استیل کولین استراز و ممانعت از تجمع آمیلوئید ممکن است بر بهبود حافظه در موش‌های مبتلا به آلزایمر مؤثر باشد. از آنجا که تا به حال اثر این ترکیب گیاهی بر حافظه فضایی بررسی نگردیده است، لذا در این تحقیق پژوهشی سعی شد تا ترکیبات گیاهی درمانی مؤثرتر بر بهبود اختلالات یادگیری و حافظه فضایی مورد بررسی قرار گیرد تا افراد با ریسک خطر بالای ابتلا به بیماری‌های التهابی و آلزایمر بتوانند در رژیم غذایی خود از آن مصرف کنند. بنابراین هدف این تحقیق، بررسی اثر دونپزیل و هیوسیاموزید در مقابله با اختلال به‌وجودآمده در حافظه فضایی ناشی از تزریق بتا آمیلوئید در رت‌های نر و بررسی میزان تأثیر آن‌ها بر بهبود حافظه فضایی بود.

چینی<sup>۵</sup> پس از قرار گرفتن در معرض LPS به طور قابل توجهی بیان اینترلوکین- $\beta 1$  و NF- $\kappa B$  (فاکتور هسته‌ای کاپا بی)، ERK (کیناز تنظیم‌شده سیگنال خارج سلولی)، JNK (کیناز N-ترمینال Jun)، همچون MAPK (پروتئین کیناز فعال شده با میتوز) و TNF- $\alpha$  (فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا) در سلول‌های میکروگلیایی را کاهش می‌دهد. این ساپونین‌ها ممکن است با مهار پاسخ التهابی در سلول‌های میکروگلیایی فعال در درمان بیماری‌های عصبی مؤثر باشند [۱۳]. مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده است درمان طولانی‌مدت با داروهای ضدالتهابی، خطر بروز بیماری آلزایمر را بیش از ۸۰ درصد کاهش داده و رخداد این بیماری را به تأخیر می‌اندازد که خود تأییدی بر نقش التهاب در رخداد و پیشرفت بیماری آلزایمر است [۱۴].

سپوزنین‌ها خاصیت ضدالتهابی قوی دارند و به طور خاص سیگنالینگ NF- $\kappa B$  را هدف قرار می‌دهند. این ترکیب سیگنالینگ MAPK، ERK را تعدیل می‌کند. کاهش آنزیم‌های گزانتین اکسیداز، سیکلواکسیژناز، ماتریکس متالوپروتئیناز و نیتریک اکسید سنتاز، از سازوکارهای ضدالتهابی آن‌هاست، اما مصرف در دزهای بسیار بالا ممکن است با عوارض کبدی همراه باشد [۸]. در بررسی ساپونین‌های استروئیدی جینسینگ نشان داده شده است این ترکیبات سمیت  $A\beta 42$  را در سلول‌های BV-2 با مهار iNOS،  $\beta 1$ -IL، NF- $\kappa B$  و TNF- $\alpha$  کاهش می‌دهند [۹]. فلاونوئیدها و ساپونین‌های استروئیدی (کاردیوگلیکوزیدها) دارای خواص ضدانعقادی، ضدالتهابی، ضدعفونی، حفاظت نورونی، مهارکننده استیل کولین استراز، کاهش دهنده گلوکز خروجی از کبد، کلسترول، مقاومت به انسولین، بهبوددهنده جریان خون مغز و فعالیت‌های ضدسرطانی هستند، اگرچه برخی از فلاونوئیدها با غلظت بالا در متاستاز موجب القای آپوپتوز می‌شوند [۵].

آمیلوئید بتا باعث از دست رفتن فعالیت کولینرژیک از طریق مهار مراحل ساخت و ترشح استیل کولین می‌شود. تزریق مستقیم  $A\beta$  به مغز موش نشان داد که  $A\beta$  باعث کاهش تولید استیل کولین شده و دارای فعالیت ضدکولینرژیک است و باعث افزایش پاتولوژی آلزایمر از جمله مسیر تائو و التهاب نورونی می‌شود [۳].

مصرف دیوسژنین در موش‌های جهش‌یافته با بیان مضاعف پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید باعث بهبودی حافظه آنان می‌شود و قادر است استرس اکسیداتیو و مارکرهای پروآپوپتوتیک التهابی را مهار کند [۱۵]. برخی محققان معتقدند اثر سپوزنین‌ها بر کاهش آپوپتوز از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی‌شان مانع از فعال شدن مسیر JNK و آزاد شدن سیتوکرم C می‌شود. JNK در فعال کردن آپوپتوز نقش دارد و اثر آنتی‌اکسیدانی خود را با افزایش میزان سوپراکسید دیسموتاز، کاهش BAX، کاهش کاسپاز ۳، مهار ROS و تنظیم خانواده BCL-۲ بروز می‌دهد. اثر مصرف

6. Fenugreek

5. Platycodon grandiflorus



## مواد و روش‌ها

استخراج از گیاه، توسط شیکر در یک سی‌سی نرمال‌سالین کاملاً محلول شده و به صورت گاوژا به موش‌های گروه‌های درمانی خوراند می‌شد.

## جداسازی هیوسیاموزید

۴۰ گرم پودر بذربنچ با ۳۰۰ سی‌سی محلول شامل ۲۵۰ سی‌سی متانول و ۵۰ سی‌سی آب مقطر درون دستگاه سوکسیله قرار داده شده، سپس محلول زرد - سبز حاصل شد و بعد از سرد شدن، با کاغذ صافی صاف گردید و با استات سرب ۱/۵ درصد برای جداسازی تانن، ترپن و سایر ناخالصی‌ها مخلوط شد. محلول حاصله در دمای آزمایشگاه به مدت ۵ دقیقه نگهداری شده و سپس صاف شد و حاصل صافی به دستگاه دکانتور منتقل شد و با ۱۵۰ سی‌سی محلول که شامل ۶۰ سی‌سی ایزوپروپانول و ۹۰ سی‌سی کلروفرم بود، دکانته شد. محلول کلروفرمی حاوی هیوسیاموزید کف‌کننده بود و برای خشک کردن به دستگاه روتاری منتقل شد [۲۱].

## مطالعه رفتاری (آزمون یادگیری و حافظه فضایی)

در این بررسی، سنجش یادگیری و حافظه فضایی توسط ماز آبی انجام شد و اختلال حافظه که ناشی از آلزایمر است در گروه بیمار مشاهده گردید. ماز یک تانک آبی با قطر ۱۸۰ و عمق ۶۰ سانتی‌متر بود که نیم آن از آب پر می‌شد. این تانک به چهار ربع تقسیم شده و سکوی نجاتی با ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر در یکی از چهار قسمت، ۱ تا ۲ سانتی‌متر زیر آب قرار داشت. ماز در یک اتاق که علائم فضایی متفاوت آن در طول آزمایش‌ها ثابت بود و نیز برای حیوان درون ماز قابل دید بود، قرار می‌گرفت و از طریق دوربین ردیاب که در ارتفاع ۱۸۰ سانتی‌متری بالاتر از وسط ماز آبی بود، بررسی و اطلاعات مربوط به آزمایش ذخیره می‌شد.

## مرحله یادگیری یا آموزش

حیوان در طی آزمایش از یکی از ربع‌های ماز به طوری که صورت آن به طرف دیواره ماز بود رها می‌گردید. انتخاب محل شروع توسط نرم‌افزار تصادفی پیشنهاد می‌شد. حداکثر زمان آزمایشی که حیوان جهت پیدا کردن سکو در اختیار داشت ۹۰ ثانیه بود. در هنگام عدم موفقیت، حیوان به سمت سکو، راهنمایی و ۳۰ ثانیه روی آن قرار می‌گرفت. حیوان با توجه به علائم، موقعیت خود را به خاطر می‌سپرد. اگر حیوان سکو را می‌یافت با قرارگیری روی سکو عمل ضبط متوقف می‌شد و باز هم ۳۰ ثانیه به حیوان برای به خاطر سپردن علامت‌ها وقت داده می‌شد. سپس حیوان به درون ظرف اختصاصی منتقل، خشک و به قفس انتقال داده می‌شد. پس از ۱۰ دقیقه دوباره در ربع دیگری آزمایش تکرار می‌شود. این آزمایش به مدت چهار روز و هر روز چهار بار تکرار می‌شد.

در این تحقیق تجربی، شصت سر رت نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۱۸۰ گرم با سن تقریبی هفت هفته به صورت تصادفی در شش گروه ده‌تایی تقسیم‌بندی شدند. موش‌ها در شرایط استاندارد نور، دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰ درصد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. حیوانات در گروه‌های زیر مورد مطالعه قرار گرفتند: گروه کنترل که آب و غذای معمولی دریافت کردند و جراحی نشدند؛ گروه PBS<sup>۲</sup> که تحت عمل جراحی قرار گرفتند و PBS (حلال AB) به جای AB تزریق شد؛ گروه آلزایمری اول شامل حیواناتی که تحت عمل جراحی آلزایمری، بتا آمیلوئید دریافت کردند؛ گروه آلزایمری دوم شامل حیواناتی که تحت عمل جراحی آلزایمری قرار گرفتند (بتا آمیلوئید دریافت کرده و پس از ۲۰ روز مبتلا به آلزایمر شدند) و روزانه یک سی‌سی نرمال‌سالین دریافت کردند؛ گروه آلزایمر تیمار شده با دونپزیل که ۲۸ روز، روزانه ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی دونپزیل به صورت گاوژا دریافت می‌کردند؛ گروه آلزایمر تیمار شده با هیوسیاموزید که ۲۸ روز، هیوسیاموزید را به میزان روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت گاوژا دریافت کردند. با توجه به عدم معنی‌دار بودن نتایج موريس و اثر ميز گروه کنترل و گروه PBS، گروه کنترل به عنوان کنترل و به علت یکسان بودن نتایج این آزمون در گروه اول و دوم آلزایمری گروه دوم به عنوان گروه آلزایمری در نظر گرفته شد.

داروی بتا آمیلوئید از شرکت Sigma Aldrich به میزان ۱۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر PBS حل شد. سپس به مدت یک هفته در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

حیوانات با تزریق کتامین (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش می‌شدند. با تراشیدن موهای روی سر از فاصله بین دو چشم تا دو گوش، سپس سوراخ کردن جمجمه در دستگاه استریوتاگس، مقدار ۲ میکرولیتر از بتا آمیلوئید ۱-۴۲ به وسیله سرنگ همپلتون درون مغز حیوانات با مختصات قدامی - خلفی ۰/۵، عمق ۴ و میانی طرفی  $1/6 \pm$  میلی‌متر از نقطه برگما با اطلس (AP=۰/۵) از برگما،  $ML=1/6 \pm$  و  $D=4$  میلی‌متر) تزریق شد. برای جلوگیری از آسیب مغزی تزریق به‌آهستگی و در مدت ۲۰ دقیقه انجام می‌شد [۲۰]. به منظور رسوب بهتر بتا آمیلوئید ۵ دقیقه سرنگ در محل تزریق می‌ماند، ۲ دقیقه استراحت و سپس تزریق ادامه می‌یافت. موش‌ها جهت آلزایمری شدن، بتا آمیلوئید را به میزان ۲ میکرولیتر به صورت دوطرفه در هیپوکامپ دریافت کردند. کاهش حافظه فضایی در گروه آلزایمر با آزمون موريس و اثر ميز مشاهده گردید. دونپزیل شرکت داروسازی لقمان به میزان ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز و هیوسیاموزید به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز پس از

7. Phosphate buffered saline

### مرحله بازخوانی یا پروب

بعد از مرحله اول، یک مرحله آزمون پروب انجام شد که با برداشتن سکو (پروب) حیوان به صورت تصادفی از یکی از جهات ماز رها می‌شد، با این فرض که حیوان محل سکو را به خاطر دارد و باید حداکثر زمان و مسافت را در ربع محل قرارگیری سکو بماند. این مرحله برای هر حیوان یک‌بار در مدت ۹۰ ثانیه تکرار شد.

در این تحقیق از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. به منظور بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون آنالیز آماری وان‌وای آنووا و آزمون پست‌هاک متناسب با داده‌ها استفاده شد. ضمناً داده‌ها به صورت میانگین و خطای استاندارد گزارش شدند و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

بر اساس نتایج آزمون ماز آبی موریس، یادگیری و حافظه فضایی موش‌هایی که AB را به صورت درون‌هیپوکامپی دریافت کردند، دچار اختلال شد ( $P < 0/001$ ). زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده تا رسیدن به سکو پنهان در روزهای اول تا سوم آموزش، ملاک یادگیری حیوان و روز چهارم پس از یادگیری ملاک بررسی قرار گرفت. در روز چهارم، موش‌های گروه دوم آلزایمری در مقایسه با گروه اول (کنترل)، به طور معنی‌داری زمان و مسافت بیشتری را صرف یافتن سکو پنهان کردند ( $P < 0/001$ ). اثر تیمار با دونپزیل و تیمار با هیوسیاموزید بر نقص حافظه القاء‌شده توسط AB در موش‌های آلزایمری بررسی شد که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ( $P > 0/05$ ). مصرف هیوسیاموزید و دونپزیل توانست تا حد زیادی موجب بهبود نقص یادگیری و حافظه فضایی موش‌های دریافت‌کننده AB شود ( $P < 0/001$ ). زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده تا رسیدن به سکو در حیوانات در روز چهارم پس از آموزش از لحاظ معنی‌داری مورد بررسی قرار گرفت که گروه‌های تیمار با دونپزیل و هیوسیاموزید کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه آلزایمر نشان دادند ( $P < 0/001$ ). گروه هیوسیاموزید در روز چهارم تفاوت معنی‌داری را در زمان سپری‌شده در مقایسه با کنترل نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین بین گروه دونپزیل و گروه کنترل از نظر مدت‌زمان سپری‌شده تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/01$ ). گروه درمان با دونپزیل با گروه هیوسیاموزید تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P > 0/05$ ). در مورد مسافت پیموده‌شده گروه دونپزیل با کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/01$ ), در حالی که هیوسیاموزید نسبت به کنترل تفاوت معنی‌دار نداشت ( $P < 0/05$ ). تفاوت‌های معنی‌دار در گروه‌ها نسبت به گروه کنترل بیانگر وجود اختلاف گروه‌های بیمار و درمان‌شده پس از بیماری با حیوانات سالم بود. در گروه‌های درمانی تا حد زیادی بهبود نقص یادگیری و حافظه

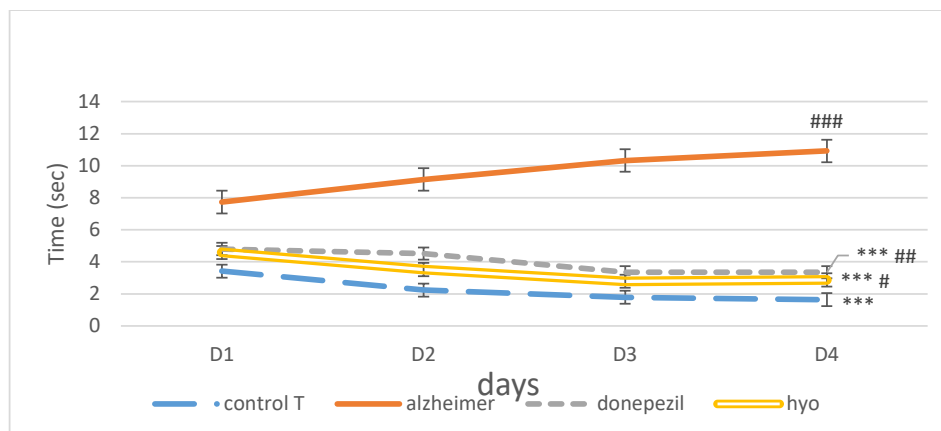
فضایی موش‌های دریافت‌کننده AB مشاهده شد ( $P < 0/001$ ). در روزهای آزمون، زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده تا رسیدن به سکو پنهان در حیوانات گروه‌های درمان نسبت به گروه آلزایمر کاهش یافت (تصویر شماره ۱).

در آزمون پروب (که بدون سکو پنهان اجرا شد)، زمان سپری‌شده در ربع دایره هدف، اساس حافظه فضایی محسوب گردید. کاهش معنی‌داری در زمان سپری‌شده توسط حیوانات گروه آلزایمری در ربع دایره هدف در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0/001$ ). همچنین مدت‌زمان سپری‌شده در ربع دایره هدف توسط گروه‌های درمان در مقایسه با گروه آلزایمر افزایش معنی‌داری داشت ( $P < 0/001$ ) که بیانگر اثر مثبت تیمارها بر یادگیری و حافظه فضایی موش‌های دریافت‌کننده بتا آمیلوئید بود. گروه‌های تیمار با یکدیگر و نیز با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نداشتند ( $P > 0/05$ ) (تصویر شماره ۲).

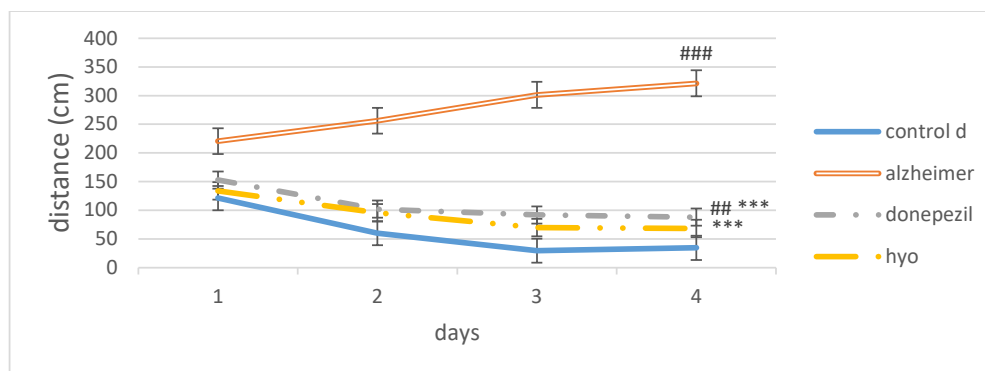
### بحث

در این مطالعه تجربی، اثر دونپزیل و هیوسیاموزید بر بهبود یادگیری فضایی رت‌های مبتلا به آلزایمر مورد بررسی قرار گرفت. آلزایمری شدن موش‌ها باعث کاهش حافظه فضایی موش‌های نر بالغ نسبت به گروه کنترل گردید و بهبود حافظه فضایی پس از تیمار با دونپزیل و هیوسیاموزید مشاهده شد. در روزهای آزمون، زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده تا رسیدن به سکو در حیوانات گروه‌های درمان نسبت به گروه آلزایمر کاهش معنی‌دار داشت (تصویر شماره ۱). بنابراین تیمارها منجر به بهبود حافظه فضایی شدند؛ البته همچنان تا رسیدن به حد موش سالم اختلاف دارند که ناشی از عوارض شدید بیماری آلزایمر و از دست رفتن حافظه است، اما در مقایسه با گروه آلزایمر موجب بهبود عوارض بیماری شدند. عواملی از قبیل تأثیر رسوب بتا آمیلوئید در مغز، اختلال در مسیرهای انتقال پیام، هایپرفسفریلاسیون تائو، التهاب و استرس اکسیداتیو در ایجاد این بیماری دخیل هستند. با پیشرفت آلزایمر و با از دست رفتن حافظه به‌ویژه حافظه فضایی و عدم توانایی در یافتن جهات، اختلالات رفتاری و شناختی ایجاد می‌شود [۲۲].

تزریق بتا آمیلوئید در هیپوکامپ موش باعث ایجاد آلزایمر، اختلال در حافظه و یادگیری آزمایش‌شده در آزمون ماز آبی موریس می‌شود که می‌تواند از طریق افزایش استرس اکسیداتیو موجب اختلال شناختی و ایجاد پلاک شود و این حیوانات در مقایسه با گروه کنترل مدت‌زمان بیشتری برای پیدا کردن سکو پنهان داخل ماز آبی سپری می‌کنند [۲۳]. نتایج مطالعه حاضر با مطالعات مذکور همسو است، به طوری که در پژوهش حاضر تزریق داخل هیپوکامپی بتا آمیلوئید در حیوانات باعث کاهش حافظه فضایی در مقایسه با گروه‌های کنترل شد؛ چون تفاوت مسافت طی‌شده و زمان سپری‌شده جهت یافتن سکو در گروه کنترل و گروه بیمار معنی‌دار بود (تصویرهای شماره ۱ و شماره ۲).



(الف)



(ب)



تصویر ۱. بررسی تأثیر تیمار با دونپزیل و هیوسیاموزید بر حیوانات آلزایمری با استفاده از آزمون ماز آبی موریس

الف: مدت زمان سپری شده؛ ب: مسافت شناخته شده در ماز آبی موریس جهت یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات گروه‌های مختلف در روزهای مختلف آزمایش؛

$P < 0.001$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه آزمایش؛

$P < 0.001$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل؛

Hyo: هیوسیاموزید.

مطابق با یافته‌های این تحقیق، استفاده از ساپونین استروئیدی منجر به بهبود حافظه در آزمون رفتاری ماز آبی موریس در موش 5XFAD شد و بررسی‌های بافتی، از بین رفتن پلاک‌های بتا آمیلوئید را نشان داد [۲۵].

در موش با تجمع بتا آمیلوئید، فعالیت AChE (استیل کولین استراز) افزایش می‌یابد، اما با مصرف ساپونین‌ها کاهش AChE و افزایش بیان BCL-2 مشاهده شد که تحریک‌کننده NGF (فاکتور رشد نورونی) نیز هستند. محققین در تلاش‌اند تا با دستیابی به داروهای جدید که علاوه بر اثرات بیشتر، حداقل عوارض جانبی را نیز داشته باشند از منابع گیاهی جهت یافتن داروهای جدید استفاده کنند [۱۷]. نتایج حاصل از این مطالعه نیز بیان می‌کنند که مصرف دونپزیل و هیوسیاموزید باعث افزایش معنی‌دار حافظه فضایی موش‌ها شده که همسو با مطالعات گذشته است.

موافق با مطالعه حاضر، رسولی جازی و همکاران گزارش دادند تزریق بتا آمیلوئید ۴۱-۱ در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرائی نر باعث تخریب نورونی و کاهش حافظه می‌شود [۲۴]. مطالعات نشان داده‌اند دونپزیل باعث کاهش پلاک بتا آمیلوئید در هیپوکامپ و بهبود حافظه در مدل tree shrew می‌شود [۱۸]. مواد گیاهی از جمله فلاونوئیدها و ساپونین‌ها دارای اثر مثبت بر یادگیری و حافظه و پلاستیسیته سیناپسی هستند [۱۵]. مصرف ساپونین استروئیدی دیوسژنین (دارای خاصیت استیل کولین استرازی) در موش‌های جهش‌یافته با بیان مضاعف APP و PS1 باعث بهبودی حافظه آنان شد و نتیجه ایمونوهیستوشیمی نشان داد درمان با دیوسژنین باعث حذف پلاک  $A\beta$ ، کاهش مرگ نورون‌ها و انسدادهای نوروفیبریلیال در قشر مغزی و هیپوکامپ و مهار استیل کولین استراز شد [۱۵] که این بهبود حافظه در پژوهش حاضر نیز مشهود بود.

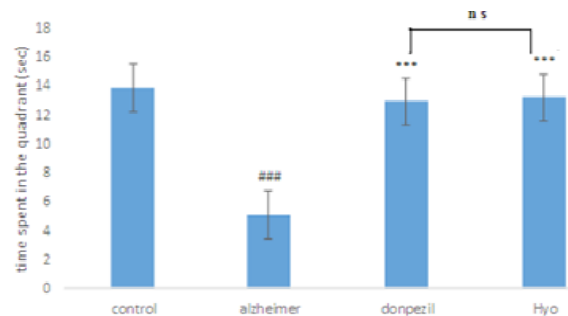
می‌دهد [۲۸] که می‌تواند از جمله مسیرهای بهبود التهاب مغزی و در نتیجه حافظه نیز باشد. ساپونین‌های استروئیدی خارخاسک باعث بهبود فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداسیون چربی‌ها شده و بین کلسترول خوب و بد تعادل برقرار می‌کنند و نقش محافظتی در دیابت القاء‌شده با استرپتوزوسین در رت نشان می‌دهند. دیابت با ایجاد اختلال در یادگیری، حافظه، شناخت، آتروفی مغز و بالا رفتن احتمال ابتلا به دمانس همراه است. ساپونین‌های استروئیدی از جمله دیپوسونین و تیگوژنین دارای خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان، ضددیابت و مهارکنندگی استیل کولین استراز هستند [۲۹]. نتایج مطالعه حاضر با مطالعات مذکور همسو است، به طوری که در پژوهش حاضر تزریق داخل هیپوکامپی بتا آمیلوئید ۱-۴۲ در موش‌ها باعث کاهش حافظه فضایی در مقایسه با گروه‌های کنترل شد و تیمارها با دونپزیل و هیوسیاموزید باعث افزایش معنی‌دار حافظه به‌ویژه در بهبود زمان و مسافت طی‌شده برای یافتن سکو شد که همسو با مطالعات گذشته است.

یکی از عوامل مؤثر در پیری، تجمع  $A\beta$ ، کاهش توان بدن برای محافظت از خود در برابر التهابات و آسیب‌های اکسیداتیو است. رادیکال‌های آزاد که در اثر مصرف مقادیر بالای اکسیژن توسط مغز ایجاد شده‌اند باعث آسیب‌های جبران‌ناپذیر به نورون‌ها می‌شوند. از جمله راهکارهای مهم در حفظ سلامت سیستم مغز، شناسایی مواد غذایی با خاصیت محافظ نوروئی است. مواد موجود در میوه و سبزیجات اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی دارند که با مقابله با استرس اکسیداتیو، باعث حفظ سلامت و بهبود عملکرد نورون‌های مغزی می‌شوند. ساپونین‌ها با خواص آنتی‌اکسیدانی از طریق مسیر NF-KB باعث مهار  $TNF-\alpha$ ، IL-6 و التهاب می‌شوند و نیز تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از آن‌ها را مهار می‌کنند و افزایش‌دهنده کاتالاز هستند [۲۷]. هیپوکامپ و ساختارهای اطرافش و نورون‌های کولینرژیک آن از ابتدایی‌ترین ساختارهایی هستند که تحت تأثیر تغییرات پاتولوژی AD قرار می‌گیرند. اختلالات کولینرژیک در بیماری آلزایمر بسیار برجسته‌اند. درمان با دونپزیل منجر به بهبود التهاب عصبی، آسیب تائو، از دست دادن سیناپسی و نوروئی و همچنین کاهش ماندگاری تائو و فسفوریلاسیون از مسیر JNK در مغز موش PS19 می‌شود و نشان داده شده است استیل کولین برای سرکوب التهاب نقش مهمی در نورون‌ها ایفا می‌کند [۳۰].

برخلاف نتایج مطالعه حاضر با ایجاد تخریب در حافظه با تزریق اسکوپولامین به موش صحرایی و تیمار با دوز پایین دونپزیل، اثر اسکوپولامین آنتاگونیست نشد [۳۱]. فلاونوئیدها و ترکیبات گیاهی سبب بهبود خون‌رسانی به مغز شده و در افزایش حافظه و توانایی یادگیری نقش دارند. از مکانیسم‌های احتمالی اثرات فلاونوئیدها در عملکرد مغزی، ارتباط آن‌ها با فرایندهای مؤثر در بقای سلول، تمایز، بهبود فعالیت کولینرژیک، مهار استیل کولین استراز و شکل‌گیری حافظه است. در موش‌های صحرایی نشان داده شده

علائم اولیه بیماری آلزایمر، مختل شدن تدریجی حافظه به‌خصوص حافظه فضایی است و با بررسی اثر تزریق بتا آمیلوئید در مغز موش‌های صحرایی و اثر آن بر یادگیری دریافتند که این حیوانات در مقایسه با حیوانات کنترل در مدت‌زمان بیشتر سکوی مخفی درون ماز آبی را پیدا می‌کنند [۲۶]. تأثیر مهارکننده‌های استیل کولین استراز بر بهبود بیماری آلزایمر از طریق افزایش انتقال سیناپس‌های کولینرژیک و کاهش رادیکال‌های آزاد است. رسوب بتا آمیلوئید در دیواره عروق مغزی موجب کاهش اتساع عروق می‌شود و از دلایل دیگر آن می‌توان به آتروفی مغز اشاره کرد که در پی تحریک مغز باعث کاهش نیاز به جریان خون شده، در نتیجه منجر به کاهش جریان خون عروق مغز می‌شود. استفاده از فلاونوئیدها بهبوددهنده این جریان مغزی است [۱۶].

چوئی و همکاران در سال ۲۰۰۱ در بررسی اثر تزریق بتا آمیلوئید در مغز موش‌های صحرایی و اثر آن بر یادگیری و سیستم کولینرژیک دریافتند که این حیوانات در مقایسه با حیوانات کنترل در مدت‌زمان بیشتری سکوی مخفی درون ماز آبی را پیدا می‌کنند. نتایج این مطالعه نشان داد تزریق بتا آمیلوئید در مغز سبب آسیب رساندن به حافظه می‌شود و درمان با بهبوددهندگان میزان استیل کولین باعث بهبود حافظه می‌شود [۲۲]. مطالعات نشان داده‌اند ساپونین‌ها بهبوددهنده حافظه در موش‌های آلزایمری هستند و در درمان بیماری‌های عصبی با جلوگیری از تشکیل پلاک و مرگ نوروئی تأثیر دارند [۲۷]. نتایج ذکر شده و مباحث مذکور، صحت یافته‌های این پژوهش را تأیید می‌کنند. ساپونین شیرین بیان از طریق فعال کردن مسیر  $Nrf2$  که تنظیم‌کننده‌ای در برابر مواد اکسیداتیو است موجب کاهش سیتوکین‌های التهابی IL-1، IL-6 و  $TNF-\alpha$  و افزایش سیتوکین‌های ضدالتهابی IL-4 و IL-10 می‌شود و در نهایت التهاب در سیروز کبدی و سطح سرمی آنزیم‌های کبدی را کاهش



تصویر ۲. بررسی تأثیر تیمارها بر حیوانات آلزایمری از نظر مدت‌زمان سپری‌شده در ماز آبی موریس در ربع محل قرارگیری سکو در آزمایش پروب

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  در مقایسه با گروه آلزایمر؛

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل؛

Hyo: هیوسیاموزید؛ NS: غیرمعنی‌دار.





می‌دهند AChE، سلول را به طور مستقیم در برابر آسیب ناشی از بتا آمیلوئید محافظت می‌کند و اخیراً نشان داده شده است دونه‌پزیل از سلول‌های عصبی مصنوعی موش در مقابل سمیت بتا آمیلوئید محافظت می‌کند [۱۱]. در حال حاضر شواهد به نقش ضدالتهابی AChE از طریق اقدام علیه رادیکال‌های آزاد و سمیت آمیلوئید و نیز از طریق کاهش انتشار سیترات‌ها از میکروگلیای فعال در مغز و خون اشاره می‌کنند. این بدون شک امید بیشتری را در درمان پاتوژنز AD و تعامل بین عوامل مختلف پاتولوژیک درگیر در علل بیماری نشان می‌دهد [۹]. نتایج مطالعات اخیر نشان داده‌اند دونه‌پزیل و هیوسیاموزید به طور اثربخشی سبب کاهش آسیب‌های شناختی ناشی از افزایش سطوح  $\beta$  یا کاهش فعالیت کولینرژیک می‌شوند. همچنین دونه‌پزیل و هیوسیاموزید فعالیت‌های آنتی‌کولین استراز، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای را طبق مطالعات انجام‌شده در سالیان گذشته اعمال می‌کنند.

اثر دونه‌پزیل از طریق چندین مکانیسم شامل فعالیت‌های آنتی‌کولین استراز و اثرات ضدالتهابی به اثبات رسیده است. دونه‌پزیل دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و از تخریب نورونی و اختلال حافظه فضایی ممانعت به عمل می‌آورد و سبب بهبود اختلال حافظه فضایی می‌شود [۳۳]. نتایج حاصل از مطالعه ما نیز از نظر تأثیر دونه‌پزیل بر بهبود یادگیری و حافظه با موارد گفته‌شده همخوانی دارد. کوئرتستین و ساپونین‌ها نیز به عنوان آنتی‌اکسیدان بسیار قوی رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید تولیدشده در بافت را خنثی می‌کنند و در مهار کردن استرس اکسیداتیو و التهاب فعالیت دارند [۳۴]. بر اساس مطالعات مشابه، تیمارها با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی مانع تشکیل پلاک و مرگ نورونی و پیشرفت آلزایمر می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که در درمان با هیوسیاموزید، با کاهش استرس اکسیداتیو و نیز بهبود اعمال شناختی، افزایش محافظت عصبی، کاهش التهاب و تنظیم اعمال کولینرژیک موجب بهبود حافظه و یادگیری در موش‌های صحرایی مدل آلزایمر و تحت تیمار با هیوسیاموزید می‌شوند.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعات گذشته و مطالعه اخیر پیشنهاد می‌شود مصرف هیوسیاموزید و دونه‌پزیل در رژیم غذایی روزانه افراد با خطر ابتلای بالا به آلزایمر به منظور پیشگیری از این بیماری وارد شود. همچنین مصرف هیوسیاموزید در افراد مبتلا باعث بهبود بیماری می‌شود که احتمالاً این بهبود با تأثیر بر عوامل ایجاد آلزایمر از قبیل تجمع پلاک بتا آمیلوئید، اختلالات سیستم کولینرژیک، استرس اکسیداتیو، التهاب و جلوگیری از آپوپتوز نورونی صورت می‌گیرد.

است ترکیب‌های فلاونوئیدی قادر به اثرگذاری مثبت بر حافظه کوتاه‌مدت هستند [۲۵].

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، کاهش زمان سپری‌شده و مسافت طی‌شده در گروه‌های تحت تیمار با هیوسیاموزید و دونه‌پزیل در مقایسه با گروه آلزایمری مشاهده شد. با توجه به کاهش معنی‌دار زمان و مسافت سپری‌شده جهت یافتن سکوی مخفی می‌توان نتیجه گرفت که دونه‌پزیل و هیوسیاموزید می‌توانند در بهبود بیماری آلزایمر مؤثر باشند. شواهد روزافزون نشان می‌دهند آنتی‌کولین استرازها دارای اثرات حفاظت‌کننده نورونی و عملکرد کولینرژیک هستند [۲۷]. درمان با دونه‌پزیل به طور قابل توجهی باعث کاهش سطح بیان در mRNA استیل‌کولین استراز، BACE1 (آنزیم برش‌دهنده جایگاه بتا در پروتئین پیش‌ساز آمیلوئیدی) و افزایش میزان بیان استیل‌ترانسفراز می‌شود که کاهش میزان استیل‌کولین در نتیجه آزاد شدن زیاد آنزیم استیل‌کولین استراز نیز از دیگر دلایل بروز آلزایمر است و حافظه فضایی را مختل می‌کند [۳۲]. نتایج حاصل از این مطالعه نیز بیان می‌کند که مصرف دونه‌پزیل و هیوسیاموزید به مدت ۲۸ روز، باعث افزایش معنی‌دار حافظه فضایی موش‌ها شده که همسو با مطالعات گذشته است.

یکی از راهبردهای درمانی انتخابی، افزایش سطح استیل‌کولین در مغز افراد مبتلا به این بیماری با استفاده از مهارکننده‌های کولین استراز مانند داروی دونه‌پزیل است که این داروها تجزیه استیل‌کولین سیناپسی را کاهش داده، توانایی آن را برای تحریک گیرنده‌های پس‌سیناپسی طولانی‌تر می‌کنند. این دارو در تثبیت حافظه و قدرت تفکر اهمیت زیادی داشته و الگوی طبیعی آزاد شدن استیل‌کولین در مغز را تقویت می‌نماید. همچنین بر ساب‌یونیت‌های NMDA رسپتور، NOS1 و گلیکوژن سنتتاز (برای فسفریلاسیون تائو مهم است)، مهار آنزیم کلیدی تشکیل آمیلوئید و بتا-سکرتاز (BACE-1) نیز مؤثر است [۱۰]. در مطالعات مشخص شد آلزایمری کردن موش‌ها با  $\beta$ 1-42 منجر به ایجاد پاسخ التهابی شده و مداوا با مصرف دونه‌پزیل باعث بهبود آزمون موریس واتر میز و کاهش سیتوکین‌های التهابی در موش‌های آلزایمری می‌شود [۱۶]. ساپونین‌های استروئیدی فنوگریک (*fenugreek*) با افزایش مهار AChE، آلزایمر را بهبود می‌بخشند و پیشنهاد شده است که این ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش ROS درون سلولی می‌شوند. همچنین ترکیبات گیاهی به علت خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند سمیت  $\beta$  و استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از آن را کاهش دهند و مانع مرگ سلولی شوند [۱۷]. نتایج بررسی حاضر نشان داد استفاده از دونه‌پزیل و هیوسیاموزید باعث بهبود حافظه می‌شود. بنابراین احتمالاً تیمار با دونه‌پزیل و هیوسیاموزید باعث بهبود وضعیت ایجاد پلاک و از دست دادن حافظه به واسطه پلاک و نقص سیستم کولینرژیک می‌شود که می‌تواند ناشی از فعالیت مهارکنندگی استیل‌کولین استرازی و آنتی‌اکسیدانی باشد. تحقیقات نشان

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این تحقیق در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات با شناسه اخلاق REC.1397.057. IR. IAU.SRB تأیید شده است.

### حامی مالی

این مقاله منتج از پایان نامه دانشجویی مقطع دکتری نویسنده اول در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران است.

### مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی - [International Committee of Medical Journal Editors](#) را دارا بودند و همگی به یک اندازه در نگارش اثر مشارکت داشتند.

### تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.



## References

- [1] Liu C-C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013 ; 9(2):106-18. [DOI:10.1038/nrneurol.2012.263] [PMID] [PMCID]
- [2] Hebert LE, Beckett LA, Scherr PA, Evans DA. Annual incidence of Alzheimer disease in the United States projected to the years 2000 through 2050. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2001; 15(4):169-73. [DOI:10.1097/00002093-200110000-00002] [PMID]
- [3] Behl C. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Implications for prevention and therapy. *Subcell Biochem*. 2005; 38:65-78. [DOI:10.1007/0-387-23226-5\_3] [PMID]
- [4] Profenno LA, Porsteinsson AP, Faraone SV. Metaanalysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry*. 2010; 67(6):505-12 [DOI:10.1016/j.biopsych.2009.02.013] [PMID]
- [5] Chiu F-L, Lin J-K. Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF- $\kappa$ B and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages. *FEBS Lett*. 2008; 582(16):2407-12. [DOI:10.1016/j.febslet.2008.05.049] [PMID]
- [6] Lunga I, Chintea P, Piacente S, Şveţ S, Bassarello C, Pizzi C. Steroidal saponins from the seeds of *Hyoscyamus niger* L. *Chem J Moldova*. 2008; 3(1):89-93. [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/6834](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/6834)
- [7] Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2003; 348(14):1333-4. [DOI:10.1056/NEJMoa013128] [PMID]
- [8] Hur J, Lee P, Moon E, Kang I, Kim S-H, Oh MS, et al. Neurite outgrowth induced by spicatoside A, a steroidal saponin, via the tyrosine kinase A receptor pathway. *Eur J Pharmacol*. 2009; 620(1-3):9-15. [DOI:10.1016/j.ejphar.2009.08.016] [PMID]
- [9] Koh E-K, Yun W-B, Kim J-E, Song S-H, Sung J-E, Lee H-A, et al. Beneficial effect of diosgenin as a stimulator of NGF on the brain with neuronal damage induced by A $\beta$ -42 accumulation and neurotoxicant injection. *Lab Anim Res*. 2016; 32(2):105-15. [DOI:10.5625/lar.2016.32.2.105] [PMID] [PMCID]
- [10] Black SE, Doody R, Li H, McRae T, Jambor KM, Xu Y, et al. Donepezil preserves cognition and global function in patients with severe Alzheimer disease. *Neurology*. 2007; 69(5):459-69. [DOI:10.1212/01.wnl.0000266627.96040.5a] [PMID]
- [11] Yoshiyama Y, Kojima A, Ishikawa C, Arai K. Anti-inflammatory action of donepezil ameliorates tau pathology, synaptic loss, and neurodegeneration in a tauopathy mouse model. *J Alzheimers Dis*. 2010; 22(1):295-306. [DOI:10.3233/JAD-2010-100681] [PMID]
- [12] Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016; 8(6):595-608. [DOI:10.15252/emmm.201606210] [PMID] [PMCID]
- [13] Jang K-J, Kim HK, Han MH, Oh YN, Yoon H-M, Chung YH, et al. Anti-inflammatory effects of saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorus* in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Int J Mol Med*. 2013; 31(6):1357-66. [DOI:10.3892/ijmm.2013.1330] [PMID]
- [14] Fischer CW, Elfving B, Lund S, Wegener G. Behavioral and systemic consequences of long-term inflammatory challenge. *J Neuroimmunol*. 2015; 288:40-6. [DOI:10.1016/j.jneuroim.2015.08.011] [PMID]
- [15] Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T. Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D3-MARRS/Pdia3/ ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep*. 2012; 2:535. [DOI:10.1038/srep00535] [PMID] [PMCID]
- [16] Ji KY, Kim KM, Kim YH, Im A-R, Lee JY, Park B, et al. The enhancing immune response and anti-inflammatory effects of *Anemarrhena asphodeloides* extract in RAW 264.7 cells. *Phytomedicine*. 2019; 59:152789. [DOI:10.1016/j.phymed.2018.12.012] [PMID]
- [17] Khalil WKB, Roshdy HM, Kassem SM. The potential therapeutic role of Fenugreek saponin against Alzheimer's disease: Evaluation of apoptotic and acetylcholinesterase inhibitory activities. *J Appl Pharm Sci*. 2016; 6(9):166-73. [DOI:10.7324/JAPS.2016.60925]
- [18] Huang S-H, Wang J, Sui W-H, Chen B, Zhang X-Y, Yan J, et al. BDNF-dependent recycling facilitates TrkB translocation to postsynaptic density during LTP via a Rab11-dependent pathway. *J Neurosci*. 2013; 33(21):9214-30 [DOI:10.1523/JNEUROSCI.3256-12.2013] [PMID] [PMCID]
- [19] Solfrizzi V, Panza F, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, Imbimbo BP, et al. Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: The current evidence. *Expert Rev Neurother*. 2011; 11(5):677-708. [DOI:10.1586/ern.11.56] [PMID]
- [20] Ghahremanitamadon F, Shahidi S, Zargooshnia S, Nikkha A, Ranjbar A, Soleimani Asl S. Protective effects of borago officinalis extract on amyloid. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:798535. [DOI:10.1155/2014/798535] [PMID] [PMCID]
- [21] Dhawan D, Gupta J. Comparison of different solvents for phytochemical extraction potential from *Datura metel* plant leaves. *Int J Biol Chem*. 2017; 11(1):17-22. [DOI:10.3923/ijbc.2017.17.22]
- [22] Choi SH, Park CH, Koo JW, Seo JH, Kim HS, Jeong SJ, et al. Memory impairment and cholinergic dysfunction by centrally administered A $\beta$  and carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP in mice. *FASEB J*. 2001; 15(10):1816-8. [DOI:10.1096/fj.00-0859fje] [PMID]
- [23] Guariglia CC. Spatial working memory in Alzheimer's disease. *Dement Neuropsychol*. 2007; 1(4):392-5. [DOI:10.1590/S1980-57642008DN10400011] [PMID] [PMCID]
- [24] Rasoolijazi H, Azad N, Joghataei MT, Kerdari M, Nikbakht F, Soleimani M. The protective role of carnosic acid against beta-amyloid toxicity in rats. *Scient World J*. 2013; 2013:917082. [DOI:10.1155/2013/917082] [PMID] [PMCID]
- [25] Tabet N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: Anti-inflammatories in acetylcholine clothing. *Age Age*. 2006; 35(4):336-8. <https://doi.org/10.1093/ageing/af1027>
- [26] Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000; 33(1):95-130. [DOI:10.1016/S0165-0173(00)00019-9]
- [27] Shal B, Ding W, Ali H, Kim YS, Khan S. Anti-neuroinflammatory potential of natural products in attenuation of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 2018; 9:548-64. [DOI.org/10.3389/fphar.2018.00548]
- [28] Roghani M, Baluchnejad Mojarrad T, Andalibi N, Ansari F, Sharayeli M. [Effect of consumption of *T. terrestris* on serum glucose and lipid levels in diabetic rats (Persian)]. *JSSU*. 2010; 18(1):17-23. <http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-1005-en.html>
- [29] Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Wu X, Yang X, et al. Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2010; 184(3):366-75. [DOI:10.1016/j.cbi.2010.02.005] [PMID]

- [30] Ramos-Rodriguez JJ, Pacheco-Herrero M, Thyssen D, Murillo-Carretero MI, Berrocoso E, et al. Rapid beta-amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013; 72(4):272-85 [DOI:10.1097/NEN.0b013e318288a8dd] [PMID] [PMCID]
- [31] Eskandary A, Moazedi AA. [Effect of co-administration of donepezil and folic acid on spatial memory impairment in adult male rat model of Alzheimer's disease (Persian)]. *JQUMS*.2018; 22(5):14-25. [DOI:10.29252/qums.22.5.14]
- [32] Birch AM, Katsouri L, Sastre M. Modulation of inflammation in transgenic models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2014; 11:25. [DOI:10.1186/1742-2094-11-25] [PMID] [PMCID]
- [33] Umukoro S, Adewole FA, Eduviere AT, Aderibigbe AO, Onwuchekwa C. Free radical scavenging effect of donepezil as the possible contribution to its memory enhancing activity in mice. *Drug Res (Stuttg)*. 2014; 64(5):236-9. [DOI:10.1055/s-0033-1357126] [PMID]
- [34] Chen Y, Miao Y, Huang L, Li J, Sun H, Zhao Y, et al. Antioxidant activities of saponins extracted from *Radix Trichosanthis*: An in vivo and in vitro evaluation. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14:86. [DOI:10.1186/1472-6882-14-86] [PMID] [PMCID]