

اثر اولتروپپتین بر میزان مالون دی‌آلدهید، بیان ژن GluN2B و اختلالات حافظه احترازی غیرفعال ناشی از اسکوپولامین در موش سوری

گلاویز محمودی^۱، اعظم مشفق^{۲*}

(۱) گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

(۲) گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۵

چکیده

مقدمه: اولتروپپتین مهم‌ترین ترکیب فنلی برگ زیتون است که خواص فارماکولوژیک متعددی دارد. تاکنون دیده شده است که این ترکیب خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، آنتی‌آتروژنیک، ضد میکروبی و ضد ویروسی دارد. اسکوپولامین یک آنتاگونیست موسکارینی است که به‌عنوان داروی استاندارد برای ایجاد نقایص شناختی در انسان و حیوان استفاده می‌شود. این مطالعه، به‌منظور بررسی اثر اولتروپپتین بر عملکرد حافظه احترازی غیرفعال، میزان مالون دی‌آلدهید و بیان ژن GluN2B در الگوی اختلال حافظه ناشی از اسکوپولامین انجام شد.

مواد و روش‌ها: سی‌وپنج موش سوری نر به‌طور تصادفی به پنج گروه ۷ تایی تقسیم گردیدند. گروه کنترل نرمال سالیین دریافت کرد. گروه Sco (scopolamine) به مدت سه هفته، اسکوپولامین با دوز ۱ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی دریافت کرد. گروه‌های درمانی اولتروپپتین را با سه دوز ۵، ۱۰ و ۲۰ mg/kg دریافت کردند. در پایان تست شاتل باکس، مغز حیوانات برای تعیین معیارهای استرس اکسیداتیو و تست‌های مولکولی برداشته شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج مطالعه نشان داد، اسکوپولامین به‌طور معناداری باعث کاهش حافظه و القای استرس اکسیداتیو می‌شود ($P < 0.05$) و در مقابل، اولتروپپتین سبب بهبود حافظه و یادگیری و کاهش آسیب اکسیداتیو می‌گردد ($P < 0.05$). تیمار توسط اولتروپپتین، مقادیر افزایش‌یافته مالون دی‌آلدهید (MDA) مغز را در موش‌های دریافت‌کننده اسکوپولامین کاهش داد ($P < 0.05$). اولتروپپتین با سه دوز به‌کاررفته در این مطالعه، تغییر فراوانی در بیان ژن GluN2B در هیپوکامپ ایجاد نکرده است ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: روی هم‌رفته، تیمار موش‌های سوری با اولتروپپتین، نقص حافظه ناشی از اختلال عملکرد سیستم کولینرژیک در مغز را بهبود بخشید که ممکن است به علت کاهش استرس اکسیداتیو باشد و شاید روشی برای مدیریت ناهنجاری‌های عصبی در شرایط زوال عقل را فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: اولتروپپتین، مالون دی‌آلدهید، ژن GluN2B، نقص حافظه، موش سوری

*نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

Email: moshfeghazam@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

آنالیزهای نوروشیمیایی مغز بیماران مبتلا به آلزایمر (AD) نشان داد، تعداد فراوانی از نورون‌های کولینرژیک در قشر مغز و هیپوکامپ از بین رفته است (۱، ۲). استیل کولین استراز (AChE) یک هدف برای درمان آلزایمر است و مهار فعالیت آن، به حفظ سطح استیل کولین (ACh) در سیناپس‌های عصبی کمک می‌کند و باعث ایجاد آثار مثبت درمانی در بیماران مبتلا به آلزایمر می‌شود (۳). اخیراً پیشنهاد شده که اختلال حافظه ناشی از اختلال عملکرد کولینرژیک، با افزایش استرس اکسیداتیو به دنبال مصرف اسکوپولامین ارتباط دارد. علاوه بر این، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) در مراحل اولیه آلزایمر گزارش شده است (۱).

شواهد اخیر نشان می‌دهد که فعالیت گیرنده ان‌متیل دی‌آسپاراتات رسپتور (NMDA: N-methyl-D-aspartate receptor) با یادگیری، حافظه و شناخت از طریق تعدیل تراکم ستون دندریتی، پلاستیسیته سیناپسی و قدرت سیناپسی ارتباط دارد. رسپتورهای NMDA یک ساختار heterotetrameric دارد که متشکل از دو زیرواحد GluN1 و دو زیرواحد GluN2 یا GluN3 اضافی است که باهم به عملکرد گیرنده کمک می‌کنند. زیرمجموعه‌های GluN2A و GluN2B رسپتور NMDA در توسعه تقویت طولانی‌مدت (LTP: long term potentiation) در حافظه فضایی وابسته به هیپوکامپ دخیل هستند و با افزایش بیان نوع GluN2B، سبب افزایش حافظه در موش‌های بالغ می‌شود (۲). بررسی تغییرات در بیان GluN2B در موش‌های دارای نقص حافظه ممکن است نقش NMDAR را در یادگیری و حافظه نشان دهد و همچنین ممکن است به‌عنوان یک ارزیابی برای سازوکار مولکولی آثار داروهای تنظیم‌کننده عصبی گیاهی عمل کند. به‌طور کلی، ترکیبات فنلی به‌صورت اسیدهای فنولی یا الکل، مشتقات اولئوروپئین، لیگنان‌ها و فلاونوئیدها وجود دارند. در روغن زیتون، محتوای پلی‌فنل‌ها از ۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است که مقدار آن به عواملی مانند شرایط جغرافیایی، میزان رسیدگی میوه زیتون، فناوری استخراج روغن، شرایط نگهداری و نحوه بسته‌بندی بستگی دارد (۴). اولئوروپئین پلی‌فنول اصلی در روغن زیتون است

که به همین شکل و به‌صورت آگلیکون وجود دارد و مقدار آن در میوه درخت زیتون، طی مرحله رشد تا ۱۴ درصد وزن خالص میوه افزایش می‌یابد (۵). پس از آن، به موازاتی که زیتون سبزتر می‌شود، اولئوروپئین کاهش می‌یابد و در نهایت، با افزایش آنتوسیانین‌ها (ایجاد رنگ قهوه‌ای تیره در زیتون)، کاهش بیشتر در مقدار اولئوروپئین قابل مشاهده است. پژوهشگران نشان داده‌اند که اولئوروپئین در روغن زیتون بکر و فرابکر، قابلیت زیست دسترسی بالایی دارد. این ترکیب خواص متعددی دارد که از آن جمله می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب، آنتی‌آتروژنیک، ضدسرطان، ضد میکروبی و ضد ویروسی اشاره کرد (۶)؛ همچنین این ترکیب‌های پلی‌فنولی طبیعی، سبب فعال‌سازی آبشار سیگنالینگ پروتئین کیناز و لیپید کیناز می‌شوند و احتمالاً می‌توانند تأثیر چشمگیری روی شکل‌پذیری سیناپسی و جریان خون عروق مغزی داشته باشند. توانایی ترکیب‌های فنولی با فعال‌سازی کیناز تنظیم‌کننده سیگنالینگ سلولی که عامل افزایش بیان نوروتروفین هستند، در تثبیت حافظه مؤثرند و از این طریق، سبب بهبود حافظه می‌شوند (۷).

اسکوپولامین یک آنتاگونیست موسکارینی است و در حافظه حیوانات و انسان، به‌ویژه در فرایندهای مربوط به یادگیری و حافظه کوتاه‌مدت تداخل ایجاد می‌کند. از اسکوپولامین برای القای الگوهای آزمایشی بیماری آلزایمر استفاده می‌شود (۸).

در مطالعه دیگر که به بررسی اثر اولئوروپئین بر نوروتوکسیسیته القا شده توسط مورفین در هیپوکامپ و اختلالات حافظه در موش‌های صحرایی پرداخته، نشان داده شد که اولئوروپئین با دوز ۱۵ و ۳۰ mg/kg به‌طور معناداری اختلالات حافظه و یادگیری فضایی را در موش‌های دریافت‌کننده مورفین بهبود بخشیده است (۹). در یک مطالعه دیگر، آثار محافظتی عصبی اولئوروپئین در برابر اختلال عملکرد شناختی ناشی از کلشی‌سین در منطقه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی بررسی شد و نتایج نشان داد پیش‌درمان با اولئوروپئین سبب بهبود حافظه فضایی و کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۰). با توجه به مطالعات پیشین بر الگوهای مختلف تخریب حافظه و یادگیری و نتایج اثربخش اولئوروپئین، پژوهش حاضر طراحی گردید و در این مطالعه، ما به بررسی آثار

گیوتینی به هم مرتبط هستند. در این آزمون، تأخیر ابتدایی ورود به اتاق تاریک ثبت گردید. پس از ورود حیوان به بخش تاریک، بلافاصله شوکی (۱ میلی آمپر، ۱ ثانیه، ۱ بار) از ناحیه پا به حیوان وارد و از بخش تاریک خارج و به قفس مربوطه برگردانده می شد. ۲۴ ساعت بعد، هر موش برای ادامه آزمون در اتاق روشن قرار داده شد، فاصله زمانی میان قرار گرفتن در اتاق روشن و ورود به اتاق تاریک اندازه گیری گردید و به عنوان زمان تأخیر ثانویه (حداکثر ۶۰ ثانیه) بیان شد (۱۱).

اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید سرم و بافت مغز: ۲۰۰ میکرولیتر از سرم/ هموژنه بافت مغز با ۱/۵ میلی لیتر اسید استیک ۲۰ درصد، ۱/۵ میلی لیتر تیوباریتوریک اسید (TBA) ۰/۸ و ۲۰۰ میکرولیتر محلول SDS ۸/۱ درصد مخلوط گردید؛ سپس نمونه ها به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری آب جوش قرار گرفتند. پس از آن، نمونه ها خنک شده و ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۵ میلی لیتر مخلوط ان-بوتانول-پیریدین به آن ها اضافه گردید و شیک شد؛ سپس مخلوط حاضر در دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۲۳ نانومتر ثبت شد (۱۲).

اندازه گیری بیان ژن GluN2B: استخراج RNA با کیت تهیه شده از شرکت آناسل ایرانی صورت گرفت. با اندازه گیری غلظت RNA های استخراج شده، در هر نمونه، حجمی از آن که معادل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA است، برای سنتز cDNA برداشته شد؛ سپس سنتز cDNA با کیت شرکت SCIENTIFIC Thermo انجام گردید. واکنش RT PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در دستگاه کوربت ۳۰۰ صورت گرفت. ژن رفرنس بتا اکتین انتخاب شد. توالی پرایمرهای به کاررفته در آزمایش و برنامه داده شده به دستگاه در جدول شماره ۱ آمده است. پس از انجام RT PCR، CT مخصوص هر ژن از دستگاه استخراج و آنالیزهای بیان ژن ها به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد.

بهبوددهندگی اولئوروپئین در شکل گیری حافظه و وضعیت اکسیداتیو هیپوکامپ در الگوی ناشی از اسکوپولامین پرداخته ایم. علاوه بر این، ما mRNA ژن GluN2B هیپوکامپ در موش های سوری دریافت کننده اسکوپولامین را بررسی کردیم.

مواد و روش ها

حیوانات آزمایشگاهی: در این مطالعه تجربی، ۳۵ سر موش سوری با محدوده وزنی ۲۰-۳۰ گرم، از موسسه انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. حیوانات در قفس های ویژه با شرایط دوره روشنایی-تاریکی ۱۲/۱۲ ساعته و دمای 23 ± 2 درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. هیچ گونه محدودیتی برای دسترسی به غذا و آب برای حیوانات وجود نداشت.

گروه های **آزمایش:** حیوانات در این آزمایش، برای بررسی اثر غلظت های مختلف اولئوروپئین بر موش های تیمار شده با اسکوپولامین، به طور تصادفی به ۵ گروه ۷ سری تقسیم شدند:

- گروه شاهد که سالین ۲ ml/kg دریافت کرد؛
- گروه درمانی با سه زیرگروه، که به ترتیب دریافت کننده غلظت های ۵، ۱۰ و ۲۰ mg/kg اولئوروپئین همراه با اسکوپولامین با دوز ۱ mg/kg بودند؛
- گروهی که اسکوپولامین با میزان ۱ mg/kg دریافت کردند.

اولئوروپئین و اسکوپولامین پس از حل شدن در سالین ۰/۹، به روش درون صفاقی به مدت ۲۱ روز به حیوانات داده شد. پس از طی دوره تیمار، آزمون های رفتاری صورت گرفت؛ سپس موش ها تحت بی هوشی عمیق قرار گرفته و نمونه خون و همچنین بافت مغز تهیه شد.

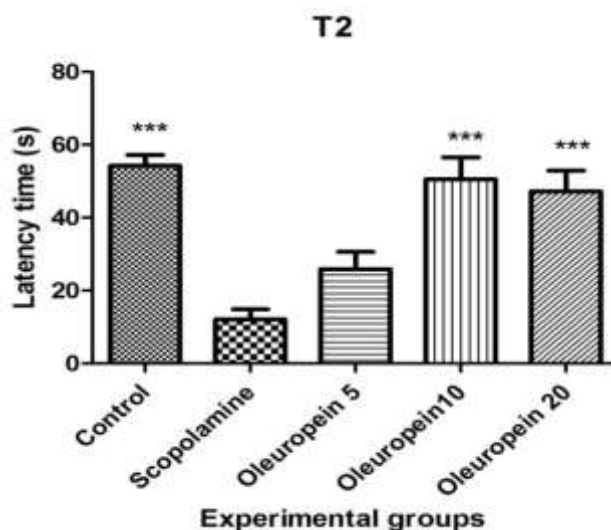
آزمون های رفتاری؛ آزمون حافظه احترازی غیرفعال: برای انجام این آزمون، از جعبه شاتل باکس استفاده گردید. دستگاه یک جعبه پلکسی شامل دو بخش روشن و تاریک است. این دو بخش توسط یک دریچه

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای به کاررفته در آزمایش و برنامه داده شده به دستگاه

gens	forward	Reverse
GluN2B	CTACTGCTGGCTGCTGGTGA	GACTGGAGAATGGAGACGGCTA
B-actin	CACCATTGGCAATGAGCGGTTT	AGGTCCTTTGCGGATGTCCACGT

با توجه به نتایج تست شاتل باکس در شکل شماره ۱، مدت زمان تأخیر ثانویه (t2) در ورود به اتاق تاریک در گروه اسکوپولامین، در مقایسه با گروه کنترل، به طور معناداری کمتر بود ($P < 0.001$). اولئوروپئین با دوزهای ۱۰ و ۲۰ mg/kg توانسته است به طور معناداری، مدت زمان تأخیر ثانویه در ورود به اتاق تاریک را در مقایسه با گروه اسکوپولامین افزایش دهد ($P < 0.001$).

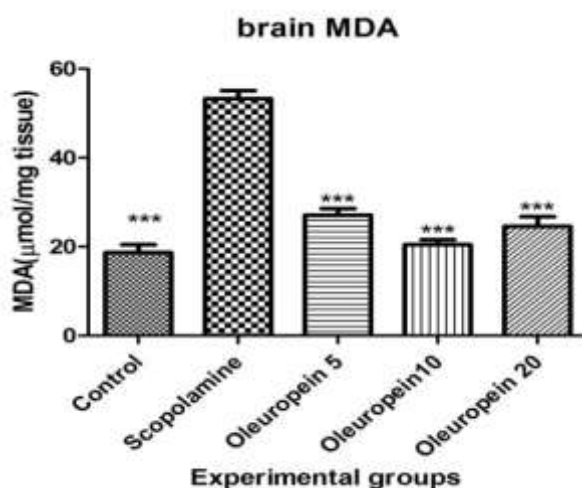
تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های مطالعه از طریق نرم افزار SPSS vol.16 تجزیه و تحلیل گردید. آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن، آزمون تعقیبی توکی برای آنالیز داده‌ها به کار رفت. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان و مقادیر $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.
یافته‌های پژوهش



شکل شماره ۱: اثر اسکوپولامین و دوزهای مختلف اولئوروپئین بر مؤلفه مدت زمان تأخیر ثانویه (t2) در تست شاتل باکس. *** نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح $P < 0.001$ است.

دریافت کننده اولئوروپئین با سه دوز ۵، ۱۰ و ۲۰ mg/kg سطح MDA بافت مغز در مقایسه با گروه اسکوپولامین، به طور معناداری کاهش نشان داد ($P < 0.001$) (شکل شماره ۲).

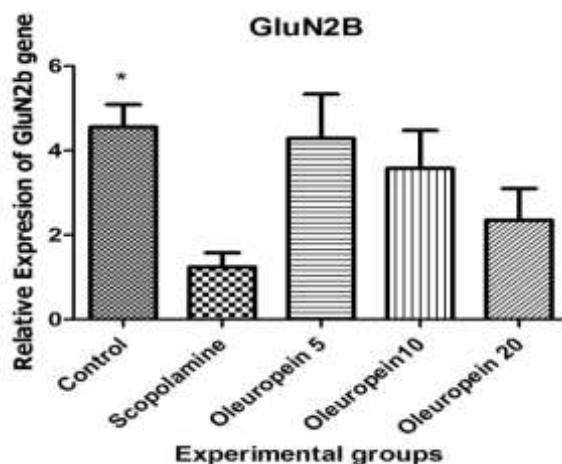
نتایج نشان می‌دهد در گروه دریافت کننده اسکوپولامین، سطح MDA بافت مغز در مقایسه با گروه کنترل، به طور معناداری بالاتر است ($P < 0.001$). در گروه‌های



شکل شماره ۲. شماره سطح MDA مغز میان گروه دریافت کننده اسکوپولامین و اولئوروپئین. *** نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح $P < 0.001$ است.

فراوانی در بیان ژن GluN2B در هیپوکامپ ایجاد نکرده است (شکل شماره ۳).

در گروه دریافت کننده اسکوپولامین، به طور معناداری بیان ژن GluN2B در هیپوکامپ کاهش یافته است ($P < 0.05$).
اولئوروپتین با سه دوز به کاررفته در این مطالعه، تغییر



شکل شماره ۳. اثر دوزهای مختلف اولئوروپتین و اسکوپولامین بر میزان بیان ژن GluN2B در گروه‌های آزمایشی. * نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح ($P < 0.05$) است.

بحث و نتیجه گیری

است که تزریقات اسکوپولامین سبب تسریع پراکسیداسیون لیپیدهای مغز و تضعیف فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آن می‌شود (۹).

آثار محافظت نوروئی اولئوروپتین در برابر استرس اکسیداتیو نیز، با اندازه‌گیری غلظت MDA بافت مغز بررسی گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق داخل صفاقی اولئوروپتین باعث مهار پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش سطح MDA در موش‌های سوری دریافت کننده اسکوپولامین می‌شود و این نشانگر اثر استرس ضد نیتروساتیو اولئوروپتین است که مطابق با نتایج مطالعه سربیشگی و همکاران است. در مطالعه سربیشگی و همکاران، اولئوروپتین با دوز ۵۰ mg/kg به مدت ۶ ماه به حیوانات داده شد و در نهایت، آنالیزهای بیوشیمیایی بافت مغز آن‌ها نشان داد فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز به طور چشمگیری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است (۱۵). مطالعات پیشین بیانگر آن است که اولئوروپتین آثار محافظت کننده عصبی دارد که می‌تواند با آثار آنتی‌اکسیدانی نیرومند آن مرتبط باشد (۱۱). نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان داد که اولئوروپتین به عنوان سرکوب کننده استرس اکسیداتیو عمل می‌کند که مطابق با مطالعات پیشین است (۱۳، ۱۲). در مطالعه علیرضایی و همکاران که به بررسی آثار آنتی‌اکسیدانی اولئوروپتین در برابر استرس اکسیداتیو ناشی

اسکوپولامین باعث کاهش تأخیر ثانویه در آزمون حافظه احترازی غیرفعال شد. اولئوروپتین سبب افزایش حافظه احترازی از طریق افزایش مدت زمان تأخیر ثانویه در تست شاتل باکس گردید. در مطالعه لی و همکاران، هم‌راستا با مطالعه حاضر که به بررسی اثر اولئوروپتین بر اختلال استرس پس از تروما پرداخته شده، نتایج نشان داد که اولئوروپتین با مهار بیان واسطه‌های پیش‌التهاب در مغز موش، به طور چشمگیری اختلال شناختی ناشی از تروما را کاهش می‌دهد (۱۳)؛ همچنین در یک مطالعه دیگر، اولئوروپتین با دوز ۱۰ و ۲۰ mg/kg سبب بهبود حافظه احترازی در الگوی تشنج ناشی از پنتیلن تترازول در موش‌های صحرایی شد (۱۴). با توجه به اینکه آثار اولئوروپتین در اختلالات حافظه ناشی از اسکوپولامین بررسی نگردیده بود، این مطالعه طراحی شد و نتایج نشان داد که اولئوروپتین آثار فراوانی در بهبود حافظه احترازی در موش‌های سوری دارد.

بافت مغز به علت مصرف بالای اکسیژن، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نسبتاً ضعیف، حضور مقادیر بالای یون‌های فلزی تولید کننده رادیکال‌های آزاد و همچنین سوبستراهایی همانند گلوتامات، آسکوربات و اسیدهای چرب آزاد که به سرعت وارد واکنش‌های ردوکس می‌شوند، به آسیب اکسیداتیو بسیار حساس است (۸). در مطالعات گزارش شده

در تجمع آمیلوئید سمی $A\beta$ در مدل *C. elegans* ناشی از AD است (۱۸، ۱۹).

در مطالعه شیبانی و همکاران که به بررسی تأثیرات اولئوروپئین بر نوروتوکسیسیته هیپوکامپ و اختلالات حافظه ناشی از مورفین در موش‌های صحرایی پرداختند، نتایج نشان می‌دهد درمان اولئوروپئین (۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سبب بهبود اختلالات یادگیری و حافظه در حیوانات دریافت‌کننده مورفین می‌شود؛ همچنین درمان با باعث کاهش آپتوز و استرس اکسیداتیو در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های دریافت‌کننده مورفین گردید (۹). اولئوروپئین به علت خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی‌اش، سبب کاهش اختلالات حافظه در موش‌های کیندل شده توسط PTZ شد (۲۰).

با توجه به مطالعات پیشین بر الگوهای گوناگون تخریب حافظه و یادگیری و نتایج اثربخش اولئوروپئین، مطالعه حاضر طراحی گردید و این مطالعه تأکید می‌کند که اولئوروپئین کاهش حافظه ناشی از اسکوپولامین را در موش سوری بهبود می‌بخشد؛ بنابراین، اولئوروپئین ممکن است یک داروی درمانی امیدوارکننده برای جلوگیری از فراموشی و نقص شناختی مرتبط با پیری یا بیماری‌های عصبی مانند آلزایمر باشد.

کد اخلاق:

از اتانول در روده موش‌های صحرایی پرداخته، نشان داده شد که فعالیت آنزیم‌های گلوکوتیون پراکسیداز و کاتالاز در گروه دریافت‌کننده اولئوروپئین به همراه اتانول، نسبت به موش‌های دریافت‌کننده اتانول، به‌طور چشمگیری بالاتر بود (۱۶).

اولئوروپئین با سه دوز، تغییر معناداری در بیان ژن GluN2B ایجاد نکرده است که نشان می‌دهد ممکن است اولئوروپئین تغییری در فعالیت گیرنده NMDA نداشته باشد که مرتبط با یادگیری، حافظه و شناخت است.

در مطالعه پورخداداد در سال ۲۰۱۶ که نتایج آن هم‌راستا با مطالعه ما بود، اختلال حافظه از طریق تزریق کلشی‌سین در موش‌های صحرایی ایجاد شد و همچنین کلشی‌سین سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت مغز گردید که پیش‌درمانی با اولئوروپئین باعث بهبود فراوان حافظه و یادگیری و کاهش استرس اکسیداتیو شد (۱۰).

داک‌کچه و همکاران پیشنهاد داده‌اند که پلی‌فنول اولئوروپئین به‌عنوان یک مهارکننده تجمع تاو (Tau Protein) عمل می‌کند و همچنین مطالعات دیگر آثار ضد‌آمیلوئیدوزنیک و ضدالتهابی اولئوروپئین را نشان می‌دهند که خواص مفید آن را در برابر نورودژنراسیون تأیید می‌کند (۱۷)؛ همچنین نشان داده‌شده است که عصاره برگ زیتون استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش سن را در اندام‌های اصلی موش‌های سالخورده کاهش می‌دهد. یک مطالعه دیگر نشان داده است که اولئوروپئین قادر به تداخل

References

1. Mehta M, Adem A, Sabbagh M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012. doi: 10.1155/2012/728983.
2. Jo YS, Choi J-S. Memory retrieval in response to partial cues requires NMDA receptor-dependent neurotransmission in the medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem*. 2014;109:20-6. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.11.004>
3. Galimberti D, Scarpini E. Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016;25(10):1181-7. doi: 10.1080/13543784.2016.1216972.
4. Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, et al. Potential health

benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):686. doi: 10.3390/ijms19030686.

5. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, et al. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):18508-24. doi: 10.3390/ijms151018508.

6. Kovacsova M, Barta A, Parohova J, Vrankova S, Pechanova O. Neuroprotective mechanisms of natural polyphenolic compounds. *Act Nerv Super Rediviva*. 2010;52(3):181-6.

7. Zhao T, Ding K-m, Zhang L, Cheng X-m, Wang C-h, Wang Z-t. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of β -carboline and quinoline alkaloids derivatives from the plants of genus

- Peganum. *J Chem.* 2013;2013(1-6). <https://doi.org/10.1155/2013/717232>.
8. Kwon S-H, Lee H-K, Kim J-A, Hong S-I, Kim H-C, Jo T-H, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur J Pharmacol.* 2010;649(1-3):210-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.001.
9. Shibani F, Sahamsizadeh A, Fatemi I, Allahtavakoli M, Hasanshahi J, Rahmani M, et al. Effect of oleuropein on morphine-induced hippocampus neurotoxicity and memory impairments in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2019;392(11):1383-91. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01678-3>.
10. Pourkhodad S, Alirezai M, Moghaddasi M, Ahmadvand H, Karami M, Delfan B, et al. Neuroprotective effects of oleuropein against cognitive dysfunction induced by colchicine in hippocampal CA1 area in rats. *J Physiol Sci.* 2016;66(5):397-405. doi: 10.1007/s12576-016-0437-4.
11. Rabiei Z, Rafieian-Kopaei M, Heidarian E, Saghaei E, Mokhtari S. Effects of Zizyphus jujube extract on memory and learning impairment induced by bilateral electric lesions of the nucleus Basalis of Meynert in rat. *Neurochem Res.* 2014;39(2):353-60. doi: 10.1007/s11064-013-1232-8.
12. Mahmoudi T, Lorigooini Z, Rafieian-Kopaei M, Arabi M, Rabiei Z, Bijad E, et al. Effect of Curcuma zedoaria hydro-alcoholic extract on learning, memory deficits and oxidative damage of brain tissue following seizures induced by pentylentetrazole in rat. *Behav Brain Funct.* 2020;16(1):1-12. <https://doi.org/10.1186/s12993-020-00169-3>.
13. Lee B, Shim I, Lee H, Hahm D-H. Effect of oleuropein on cognitive deficits and changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and cytokine expression in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Nat Med.* 2018;72(1):44-56. . doi: 10.1007/s11418-017-1103-8.
14. Hosseini PS, Rafieirad M, Esmaeili S. The effect of oleuropein on working and passive avoidance memory in the pentylentetrazole-induced seizure animal model. *J Res Med Sci.* 2019;6(1):41-8.
15. Sarbishegi M, Mehraein F, Soleimani M. Antioxidant role of oleuropein on midbrain and dopaminergic neurons of substantia nigra in aged rats. *Iran Biomed J.* 2014;18(1):16. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.001
16. Alirezai M, Dezfoulia O, Sookhtehzari A, Asadian P, Khoshdel Z. Antioxidant effects of oleuropein versus oxidative stress induced by ethanol in the rat intestine. *Comp Clin Path.* 2014;23(5):1359-65. doi: 10.1007/s00580-013-1791-8
17. Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, et al. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem Int.* 2011;58(6):700-7. . doi: 10.1016/j.neuint.2011.02.010.
18. Çoban J, Öztezcan S, Doğru-Abbasoğlu S, Bingül I, Yeşil-Mizrak K, Uysal M. Olive leaf extract decreases age-induced oxidative stress in major organs of aged rats. *Geriatr Gerontol Int.* 2014;14(4):996-1002. <https://doi.org/10.1111/ggi.12192>.
19. Diomede L, Rigacci S, Romeo M, Stefani M, Salmona M. Oleuropein aglycone protects transgenic *C. elegans* strains expressing A β 42 by reducing plaque load and motor deficit. *PLoS one.* 2013;8(3):e58893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058893>.
20. Asgharzade S, Rabiei Z, Rabiei S, Bijad E, Rafieian-Kopaei M. Therapeutic effects of oleuropein in improving seizure, oxidative stress and cognitive disorder in pentylentetrazole kindling model of epilepsy in mice. *Iran J Pharm Sci.* 2020;19(1):98. (Persian). doi: 10.1007/s00210-019-01678-3

Effects of oleuropein on malondialdehyde level and expression of GluN2B gene following passive avoidance memory impairment in mice

Mahmoodi G¹, Moshfegh A^{2*}

(Received: December 05, 2020 Accepted: April 05, 2021)

Abstract

Introduction: Oleuropein is the most important phenolic compound in olive leaves which has several pharmacological properties. So far, this compound has been shown to have antioxidant, anti-inflammatory, anti-atrogenic, antimicrobial, and antiviral properties. Scopolamine is a muscarinic antagonist used as standard medication for inducing cognitive deficits in humans and animals. This study was performed to investigate the effect of oleuropein on the function of passive avoidance memory, malondialdehyde level, and expression of GluN2B gene in the model of memory impairment caused by scopolamine.

Materials & Methods: In total, 35 male mice were randomly divided into five groups (n=7). The control group received normal saline, and the Sco (scopolamine) group received intraperitoneal scopolamine at a dose of 1 mg/kg for three weeks. The treatment groups received oleuropein in three doses of 5, 10, and 20 mg/kg. At the end of the shuttle box test, the brain tissues of the animals were removed

for the determination of oxidative stress and molecular tests.

Findings: The results of our study showed that scopolamine significantly decreased memory and induced oxidative stress (P<0.05). On the other hand, oleuropein improved memory and learning and reduced oxidative damage (P<0.05). Oleuropein treatment reduced the elevated brain MDA levels in mice receiving scopolamine (P<0.05). Oleuropein at three doses used in this study did not significantly alter the expression of the GluN2B gene in the hippocampus (P>0.05).

Discussions & Conclusions: In general, the treatment of mice with oleuropein improved memory impairment due to dysfunction of the cholinergic system in the brain that may be due to the reduction in oxidative stress; moreover, it may be regarded as a method to manage neurological disorders in conditions of dementia.

Keywords: Oleuropein, Malondialdehyde, GluN2B gene, Memory deficit, Mouse

1. Dept of Biology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

2. Dept of Biology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

*Corresponding author Email: moshfeghazam@gmail.com