

بررسی اثر گنادکتومی و اختلافات وابسته به جنس در پاسخ به عصاره گل بابونه (*Matricaria chamomilla*) بر رفتار فعالیت حرکتی در موش سوری

حسن راعی (M.Sc.)⁺ مهناز کسمتی (Ph.D.)^{**} محمدرضا زادکرمی (Ph.D.)^{***}

چکیده

سابقه و هدف: در تحقیق قبل نشان داده شد که عصاره گل بابونه (*Matricaria Chamomilla*) در پدیده درد و اضطراب در موش نر و ماده به طور وابسته به جنس عمل می کند. در این تحقیق اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر رفتار فعالیت حرکتی در حضور و غیاب غدد جنسی در موش سوری نر و ماده بالغ از نژاد *NMRI* در آزمون میدان باز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: حیوانات در گروه های ۷ تایی سالم، شم، فاقد غدد جنسی و دریافت کننده عصاره هیدروالکلی بابونه (۳۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg) تقسیم شدند. دستگاه پایش فعالیت حرکتی (Motor Activity Monitor) جهت ارزیابی شاخص های فعالیت حرکتی (تعداد حرکت خطی، تعداد حرکات کلیشه ای و تعداد حرکات بلند شدن بر روی پاها (Rearing) در آزمون میدان باز برای کلیه گروه ها مورد استفاده قرار گرفت. جهت ارزیابی آماری داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون t و متعاقباً از آزمون توکی استفاده شد.

یافته ها: ۱) عصاره هیدروالکلی بابونه به میزان ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، شاخص های فعالیت حرکتی را در موش های نر، هم در حضور و هم در غیاب غدد جنسی کاهش داد. ۲) عصاره هیدروالکلی بابونه به میزان ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم شاخص های فعالیت حرکتی را در موش های ماده، هم در حضور و هم غیاب غدد جنسی افزایش داد. ۳) حذف غدد جنسی در موش های نر اثری بر میزان شاخص های فعالیت حرکتی نداشت. ۴) حذف غدد جنسی در موش های ماده شاخص های فعالیت حرکتی را کاهش داد.

استنتاج: با توجه به شواهد موجود به نظر می رسد عصاره هیدروالکلی گل بابونه با تحت تاثیر قرار دادن برخی عوامل وابسته به جنس مانند سیستم های نوروشیمیایی فعالیت حرکتی را در موش سوری نر و ماده تحت تاثیر قرار می دهد و احتمالاً بخشی از این اثر در موش های ماده، وابسته به گیرنده های هورمون های جنسی است.

واژه های کلیدی: گل بابونه، میدان باز، فعالیت حرکتی

⁺ ✉ مولف مسئول: آذربایجان شرقی - تسوج، اداره آموزش و پرورش انزلی
E_mail: Raeishabtab@yahoo.com

* کارشناس ارشد فیزیولوژی، عضو هیأت علمی (مربی) دانشگاه شهید چمران اهواز

** متخصص نوروفیزیولوژی، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه شهید چمران اهواز

*** متخصص آمار کاربردی، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه شهید چمران اهواز

☞ تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۵/۲/۹ تاریخ تصویب: ۸۵/۶/۱۵

مقدمه

حرکت بخش جدا ناپذیر ساختار کلی بشر و موجودات زنده است و فعالیت‌های حرکتی به عنوان مهم‌ترین مشخصه زندگی و وسیله‌ای برای ادامه حیات محسوب می‌شود. رفتار حرکتی یکی از پیچیده‌ترین پدیده‌های فیزیولوژیکی است که می‌تواند تحت تأثیر عوامل زیستی، مکانیکی، فیزیولوژیکی، اجتماعی و روانی قرار گیرد (۱).

چنانچه از مطالعات بر می‌آید پارامترهای زیست‌شناختی متعدد همچون تغذیه و نوع رژیم غذایی، سن، عوامل ژنتیکی و نژادی و تفاوت‌های جنسی نیز بر پیچیدگی موضوع می‌افزایند (۲). نتایج برخی مطالعات نشان داده‌اند که میانجی‌های شیمیایی عصبی متعدد، مانند دوپامین، گلوتامات، استیل کولین، سروتونین، گابا، هیستامین، ماده P و انکفالین‌ها و همچنین مراکز مختلف مغزی فعالیت‌های حرکتی را میانجی‌گری می‌کنند (۳،۴).

بدیهی است که بیش‌تر رفتارهای ادراکی (حافظه، یادگیری، اکتشاف) و اعمال هیجانی (ترس، اضطراب، پرخاشگری) با درگیری پاسخ‌های حرکتی همراه است (۵).

از سوی دیگر برخی مطالعات حاکی از دخالت عوامل جنسی بر پدیده‌های مختلف فیزیولوژیک از جمله رفتارهای حرکتی و اختلالات مربوطه می‌باشد؛ به طوری که شیوع بعضی از بیماری‌ها، نواقص و اختلالات حرکتی مانند پارکینسون و ... در جنس نر و ماده متفاوت می‌باشد (۶،۷،۸). این امر نشان دهنده تعامل بین هورمون‌ها و عوامل جنسی با میانجی‌های عصبی است که بعضاً در پدیده رفتارهای حرکتی دخیل هستند. از سوی دیگر نشان داده شده که عوامل دارویی چه از نوع صنعتی و یا گیاهی در برخی موارد به طور وابسته به جنس عمل می‌کنند (۹). عقیده بر این است که اغلب

ترکیبات طبیعی، به خصوص گیاهان طبی می‌توانند منبع یافتن ترکیبات جدید باشند. در این میان گل بابونه (*Matricaria chamomilla*) به عنوان یک گیاه دارویی مهم در فارماکوپه‌های معتبر، دارای اعتبار جهانی است (۱۰). آنالیزهای آزمایشگاهی و سنجش‌های داروشناسی نشان داده که گل‌های بابونه محتوی اسانس‌های روغنی ترپنوئیدی (آزلن، کامازولن، اکسید بیسابولول، سزکوئی ترپن‌های A, B)، فلاونوئیدها (آپی‌ژنین، کریزین، لوتولین، کورستین)، کومارین‌ها (امبلی فرون)، اسپیرواترها (ان ین سیکلوتر) و مواد موسیلاژی، املاح، پلی ساکاریدها، تانن‌ها و اسیدهای چرب است (۱۱). در طب سنتی از این گیاه به عنوان آرامبخش، اشتها آور، ضد اسپاسم، تنظیم کننده عادت ماهیانه و درمان عفونت‌های لثه، دهان و پوست استفاده می‌شود. نتایج حاصل از مطالعات نشان می‌دهد که این گیاه دارای اثرات ضد اضطرابی، ضد دردی، مهار کننده تشنج، تقویت کننده سیستم ایمنی بدن، ضد حساسیت و ضدباکتری، کاهنده علائم گرگرفتگی ناشی از یائسگی، محافظ بدن در مقابل بیماری‌های قلبی-عروقی و پوکی استخوان است. اثرات ضد اسپاسمی قوی بابونه را به اسپیرواترها، خاصیت ضد حساسیت آن را به کامازولن و خواص ضدالتهابی آنرا به آلفا بیسابولول و آزلن و اثرات ضد اضطرابی، ضد اکسیدانتهی و شبه هورمونی آن‌ها را با اثرگذاری بر سیستم عصبی مرکزی، بر فلاونوئیدها نسبت می‌دهند. در حال حاضر اسانس این گیاه در صنایع داروسازی، آرایشی، بهداشتی و غذایی کاربرد وسیعی را پیدا کرده است (۱۲،۱۳).

مطالعات آولون و زانولی (Zanoli و Avallon) در موش‌های نر نشان داد که ترکیبات موجود در عصاره بابونه اثرات ضد اضطرابی و تسکینی دارند، ضمن این که در مدل سنجش اضطراب، کاهش فعالیت حرکتی را

و از غذای فشرده ساخت شرکت دام و طیور پارس و آب معمولی شهر تغذیه شدند.

گروه بندی حیوانات

برای هر گروه آزمایش تعداد ۷ سر موش استفاده گردید که در مجموع بصورت تصادفی در ۱۴ گروه به شرح زیر مورد ارزیابی حرکتی قرار گرفتند.

گروه های آزمایشی نر:

گروه ۱: نرهای سالم دریافت کننده سالیین
گروه ۲: نرهای سالم دریافت کننده عصاره بابونه
دوز ۳۰ mg/kg

گروه ۳: نرهای سالم دریافت کننده عصاره بابونه
دوز ۵۰ mg/kg

گروه ۴: نرهای شم (موش هایی که بی هوش و جراحی شدند ولی غدد جنسی شان برداشته نشد)
گروه ۵: نرهای فاقد غدد جنسی (Testectomy)
(در حالت بی هوشی به کمک جراحی، غدد جنسی آنها برداشته شد)

گروه ۶: نرهای فاقد غدد جنسی دریافت کننده سالیین

گروه ۷: نرهای فاقد غدد جنسی دریافت کننده عصاره بابونه دوز ۵۰ mg/kg

گروه های آزمایشی ماده:

گروه ۱: ماده های سالم دریافت کننده سالیین
گروه ۲: ماده های سالم دریافت کننده عصاره بابونه دوز ۳۰ mg/kg

گروه ۳: ماده های سالم دریافت کننده عصاره بابونه دوز ۵۰ mg/kg

گروه ۴: ماده های شم (موش هایی که بی هوش و جراحی شدند ولی غدد جنسی شان برداشته نشد)
گروه ۵: ماده های فاقد غدد جنسی (Overectomy)

نشان می دهند. آزمایش های بعدی نشان داد که تزریق آنتاگونیست گیرنده های بنزودیازپینی اثرات ضد اضطرابی حاصل را بدون این که تاثیری در فعالیت حرکتی حیوان داشته باشد، مهار می کند (۱۴، ۱۵). بنابراین، به نظر می رسد که مکانیسم عمل عصاره بابونه بر روی دو رفتار فوق متفاوت باشد. همچنین در تحقیق اخیر که در این آزمایشگاه انجام شد، نشان داده شد که عصاره گل بابونه به عنوان یک گیاه دارویی با ارزش با مصارف گوناگون در جنس نر اثر تسکینی بیش تری را در رابطه با درد و اضطراب نسبت به جنس ماده نشان می دهد با توجه به محدود بودن اطلاعات در خصوص عصاره تام این داروی گیاهی بر فعالیت حرکتی، خصوصا در جنس ماده و همچنین در ادامه مطالعات قبلی مبنی بر این که آیا اثرات تسکینی حاصله از این گیاه، مربوط به کاهش فعالیت حرکتی است یا خیر و آیا اثر آن بر فعالیت حرکتی نیز به صورت وابسته به جنس است یا نه، و نیز جهت روشن شدن نقش هورمون ها و تداخل (تقویت یا تضعیف) عملکرد آن با عصاره بابونه، مطالعه حاضر طراحی شد. جهت بررسی موضوع و برای درک بیش تر از تداخل عمل هورمون ها و روشن شدن مکانیسم رفتارها در سطح مغز، اثر عصاره گل بابونه بر شاخص های فعالیت حرکتی در موش های نر و ماده بالغ هم در حضور غدد جنسی و هم در فقدان آنها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

حیوانات مورد آزمایش

در آزمایش های انجام شده از موش های کوچک آزمایشگاهی نر، نژاد NMRI (35 ± 4 گرم) و ماده (30 ± 4 گرم) (۴-۶ ماهه) از نژاد NMRI که از انستیتو رازی کرج خریداری شده بود، استفاده گردید. حیوانات تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت نگهداری

گیاه بابونه با نام علمی (*Matricaria Chamomilla*) که از شرکت گل داروی اصفهان تهیه شده بود، استفاده گردید ضمن این که قبل از استفاده در هرباریوم گروه زیست شناسی توسط اساتید فن در رشته گیاه شناسی و سیستماتیک تائید شد. برای تهیه عصاره گل بابونه از روش خیساندن استفاده شد. برای این کار سر شاخه‌های گلدار خشک شده گیاه بابونه به وسیله آسیاب برقی در حد ملایم پودر شد. ۲۰ گرم از پودر حاصل با ۲۰۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درجه مخلوط و پس از گذشت ۴۸ ساعت محتویات داخل ظرف به وسیله کاغذ صافی و قیف شیشه‌ای داخل بشری صاف گردید. محلول صاف شده بدرون بالنی منتقل و حلال آن در دستگاه روتاری (تنظیم شده در دمای ۷۰ درجه با دور متوسط) خارج گردید. مایع غلیظ حاصل روی شیشه‌ای پهن و در آن ۵۰ درجه خشک شد. پس از آن عصاره خشک شده به نرمی از روی شیشه جمع‌آوری و پودر حاصل برای تهیه مقادیر مورد نظر عصاره هیدروالکلی بابونه در پژوهش حاضر مورد استفاده قرار گرفت (۱۰،۱۱،۱۸).

دستگاه ثبت کننده فعالیت حرکتی: جهت ارزیابی فعالیت و رفتارهای حرکتی در آزمون میدان باز از دستگاه پایش فعالیت حرکتی (Motor Activity Monitor) (مدل LE8811 ساخت کشور اسپانیا) استفاده گردید. این دستگاه شامل یک واحد ارزیاب (detection unit) (متشکل از کف و دو قاب (Frame) چهارگوش رویهم، هر کدام مجهز به ۱۶×۱۶ سلول تشعشع کننده امواج مادون قرمز (Infrared beams) (فرستنده) و ۱۶×۱۶ سلول گیرنده و یک واحد کنترل متصل به کامپیوتر و مرتبط با نرم افزار ویژه (جهت پیکربندی پارامترها و تنظیمات لازم) و نیز قابلیت اتصال به دوربین‌های فیلم برداری و تجزیه و تحلیل حرکات جانور می‌باشد (تصویر A) که به صورت خودکار و ارقامی، پارامترهای حرکتی را تحلیل و آنها را ثبت و ذخیره می‌کند. تعیین فعالیت حرکتی و تحلیل پارامترهای آن بر اساس فراوانی و

(در حالت بی‌هوشی به کمک جراحی غدد جنسی آنها برداشته شد).

گروه ۶: ماده‌های فاقد غدد جنسی دریافت کننده سالیین گروه ۷: ماده‌های فاقد غدد جنسی دریافت کننده عصاره بابونه دوز ۵۰ mg/kg

روش جراحی و تزریقات: در گروه‌های جراحی اعم از نر و ماده جهت بی‌هوشی از ترکیب داروهای کتامین (۱۰۰ mg/kg) و گریلازین (۱۰ mg/kg) ساخت شرکت آلفاسان هلند که به صورت داخل صفاقی (i.p.) تزریق شد، استفاده گردید. جهت برداشتن بیضه‌ها ابتدا پوست کیسه بیضه را شکافته و بعد از بستن رگ‌های خونی، بیضه‌ها به صورت دو طرفه جدا گردیدند. بعد از شکافت پوست و عضلات شکم لوله‌های اویداکت به همراه رگ‌های خونی بسته شده و تخمدان‌ها به صورت دو طرفه برداشته شدند. برای ضد عفونی محل جراحی از محلول بتادین و پودر پنی سیلین استفاده گردید. موش‌های جراحی شده پس از گذشت ۱۵ روز دوره بهبودی امتحان شدند (۱۶،۱۷). گروه‌های آزمایشی دریافت کننده عصاره بابونه (۳۰ mg/kg، ۵۰ mg/kg) و سالیین (شاهد) ۳۰ دقیقه بعد از تزریق (داخل صفاقی i.p.) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۰،۱۴،۱۵).

در این مطالعه رفتاری، اثرات حذف غدد جنسی و عصاره هیدروالکلی بابونه بر شاخص‌های حرکتی موش‌های سالم و فاقد غدد جنسی، در آزمون رفتاری میدان باز (Open field behavior test) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. باتوجه به اثرات کوتاه و دراز مدت انواع ترکیبات روی رفتارها، در پژوهش حاضر، اثرات سریع و کوتاه مدت ترکیبات فوق بر رفتار فعالیت حرکتی در تمامی گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

گیاه بابونه و روش عصاره گیری در این پژوهش از سر گل‌های تازه و خشک شده

تمیز و خشک می‌گردید و همچنین در ابتدای هر آزمایش کف و دیواره قاب‌های دستگاه با یک محلول بدبو یا زننده (به منظور دوری از اثر تحریکی بالقوه باقیمانده بوی ادرار و مدفوع حیوان قبلی بر روی فعالیت حرکتی) به‌طور ملایم آغشته می‌شد. در این کار از روغن بادام تلخ استفاده گردید (۱۴،۱۵).

آنالیز آماری: برای ارزیابی آماری داده‌های آزمایش از نرم‌افزار SPSS و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون t استفاده گردید. آزمون توکی برای بررسی اختلاف بین گروه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در تمامی آزمایش‌های انجام شده سطح معنی‌داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار EXCEL و میانگین‌ها به صورت $(Mean \pm S.E.M)$ نمایش داده شد.

یافته‌ها

۱- بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بابونه بر میزان شاخص‌های فعالیت حرکتی موش‌های نر و ماده سالم در آزمون میدان باز

مقایسه شاخص‌های فعالیت حرکتی بین گروه‌های نر دریافت‌کننده سالین و عصاره بابونه دوزهای ۳۰ و ۵۰ mg/kg در آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و توکی نشان داد که در شاخص حرکتی تعداد حرکات خطی بین گروه دریافت‌کننده سالین و عصاره ۵۰ mg/kg و نیز بین گروه دریافت‌کننده عصاره ۳۰ mg/kg و عصاره ۵۰ mg/kg بابونه اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($F(1, 18, 2) = 20/75 (P < 0/05)$) (نمودار A- سری ۱) و در شاخص حرکتی تعداد حرکات کلیشه‌ای بین گروه دریافت‌کننده سالین و عصاره ۵۰ mg/kg بابونه و بین گروه دریافت‌کننده عصاره ۳۰ و ۵۰ mg/kg تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($F(1, 18, 2) = 17/7 (P < 0/05)$) (نمودار B- سری ۱) ضمن این که در شاخص حرکتی تعداد حرکات

سرعت شکستن امواجی است که در زمان حرکت حیوان، قطع می‌شود.

پارامترهای قابل سنجش توسط این دستگاه شامل تعداد حرکات خطی (اعم از حرکات سریع و آرام بر روی چهار پا در کف دستگاه) (Number of line crossing movments)، تعداد حرکات کلیشه‌ای (اعم از سریع و آرام) (Number of stereotyped movments) و تعداد حرکات بلند شدن بر روی پاها (اعم از کوتاه و بلند، که در این حرکت حیوان بر روی دو پای عقبی بلند می‌شود) (Number of rearing movments). از این شاخص‌ها، شاخص تعداد حرکات خطی و تعداد حرکات کلیشه‌ای را قاب پائینی و شاخص تعداد حرکات بلند شدن بر روی پاها را قاب بالایی آنالیز و شمارش می‌کند.

ثبات فعالیت حرکتی:

الف. سازگاری: در این مرحله هر یک از موش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در داخل دستگاه رها شده تا با دستگاه آشنا و به آن خو بگیرند. این عمل به منظور کاهش اضطراب حیوان صورت گرفته و ۲۴ ساعت قبل از ارزیابی حرکتی انجام می‌شود.

ب. آزمایش: در مرحله آزمایش حیوان را در وسط یا در یکی از گوشه‌های واحد ارزیاب، به طوری که سر حیوان به طرف یکی از گوشه‌ها باشد، قرار داده و متعاقباً دکمه شروع را فشار می‌دهیم. دستگاه در مدت تنظیم شده (۱۰ دقیقه) به‌طور خودکار حرکات حیوان را تحلیل و شاخص‌های حرکتی را ثبت و با ارقام (Digital) آن‌ها را ذخیره می‌کند.

تمامی آزمایش‌ها در فاز روشنایی بین ساعت ۸ صبح تا ۲ بعد از ظهر و در زیر نور فلورسانت معمولی آزمایشگاه صورت می‌گرفت و بعد از پایان هر آزمایش کف و دیواره‌های واحد ارزیاب با پنبه آغشته به الکل

معنی دار وجود دارد و مقدار P در شاخص تعداد حرکات بلندشدن بر روی پاها نزدیک به سطح معنی داری است. نتیجه این که حذف غدد جنسی (اوارکتومی) و هورمون‌ها شاخص‌های حرکتی را در موش‌های ماده کاهش می‌دهد (نمودارهای A, B, C - سری ۲).

۳- بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بابونه (دوز ۵۰ mg/kg) بر میزان شاخص‌های فعالیت حرکتی موش‌های نر فاقد غدد جنسی در تست میدان باز

مقایسه شاخص‌های فعالیت حرکتی موش‌های نر فاقد غدد جنسی دریافت‌کننده عصاره بابونه با گروه شاهد در آزمون t نشان داد که بین دو گروه در شاخص‌های حرکتی تعداد حرکات خطی ($P < 0.01$) و تعداد حرکات بلندشدن بر روی پاها ($P < 0.01$) تفاوت معنی دار وجود دارد. نتیجه این که عصاره هیدروالکلی بابونه در موش‌های نر فاقد غدد جنسی نیز همانند موش‌های سالم، فعالیت حرکتی را کاهش می‌دهد (نمودارهای A, B, C - سری ۲).

۴- بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بابونه (به میزان ۵۰ mg/kg) بر میزان شاخص‌های فعالیت حرکتی موش‌های ماده فاقد غدد جنسی در آزمون میدان باز

مقایسه شاخص‌های حرکتی موش‌های ماده فاقد غدد جنسی دریافت‌کننده عصاره بابونه با گروه دریافت‌کننده سالیسین در آزمون t نشان داد که بین این دو گروه در شاخص‌های حرکتی تعداد حرکات کلیشه‌ای ($P < 0.05$) و تعداد حرکات بلندشدن بر روی پاها ($P < 0.05$) تفاوت معنی دار وجود دارد که این معنی داری در جهت افزایش فعالیت حرکتی توسط عصاره بابونه در موش‌های ماده فاقد غدد جنسی می‌باشد (نمودارهای A, B, C - سری ۲).

بلندشدن بر روی پاها نیز در مابین سه گروه اختلاف معنی دار دیده می‌شود ($F(18,2) = 22/40 (P < 0.05)$) (نمودار C - سری ۱) و (تصویر شماره ۱).

مقایسه شاخص‌های فعالیت حرکتی بین گروه‌های ماده دریافت‌کننده سالیسین و عصاره بابونه دوزهای ۳۰ و ۵۰ mg/kg با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و توکی نشان داد که در شاخص حرکتی تعداد حرکات خطی بین گروه دریافت‌کننده سالیسین و عصاره ۵۰ mg/kg ($F(18,2) = 4/90 (P < 0.05)$) (نمودار A - سری ۱) و در شاخص حرکتی تعداد حرکات بلند شدن بر روی پاها بین گروه دریافت‌کننده سالیسین و عصاره ۵۰ mg/kg با بونیه اختلاف معنی دار وجود دارد ($F(18,2) = 3/59 (P < 0.05)$) (نمودار C - سری ۱).

نتیجه این که، عصاره هیدروالکلی بابونه در مقادیر بالا (۵۰ mg/kg) باعث کاهش معنی دار شاخص‌های فعالیت حرکتی در موش‌های نر شده، در صورتی که در همین مقدار باعث افزایش شاخص‌های فعالیت حرکتی در موش‌های ماده می‌شود.

۲- بررسی اثر حذف غدد جنسی بر میزان شاخص‌های فعالیت حرکتی موش‌های نر و موش‌های ماده در آزمون میدان باز.

مقایسه شاخص‌های فعالیت حرکتی بین گروه‌های نر شم و فاقد غدد جنسی در آزمون t نشان داد که بین دو گروه در شاخص‌های فعالیت حرکتی اختلاف معنی دار وجود ندارد. می‌توان نتیجه گرفت که حذف غدد جنسی تاثیری در فعالیت حرکتی موش‌های نر ندارد (نمودارهای A, B, C - سری ۲).

مقایسه شاخص‌های فعالیت حرکتی بین گروه‌های ماده شم و فاقد غدد جنسی در آزمون t نشان داد که بین دو گروه در شاخص‌های حرکتی تعداد حرکات خطی ($P < 0.05$) و تعداد حرکات کلیشه‌ای ($P < 0.05$) تفاوت

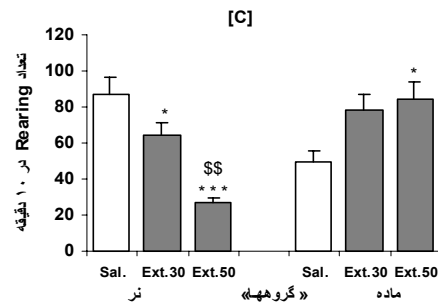
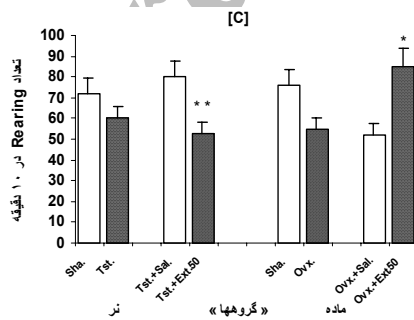
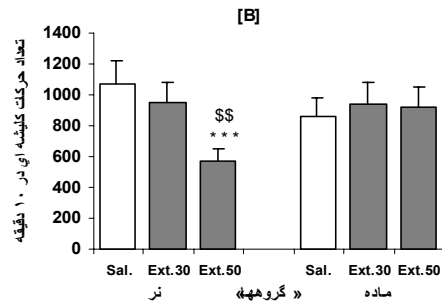
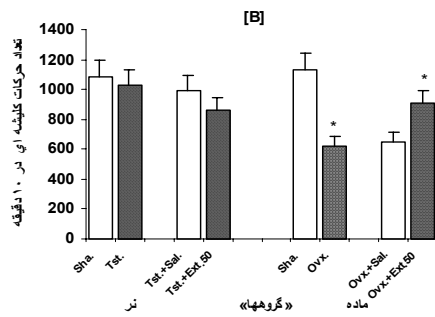
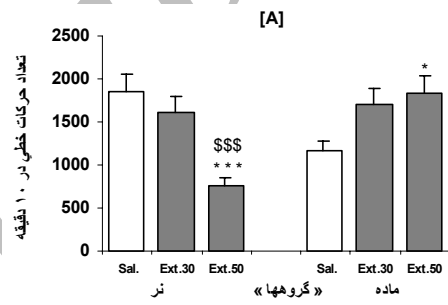
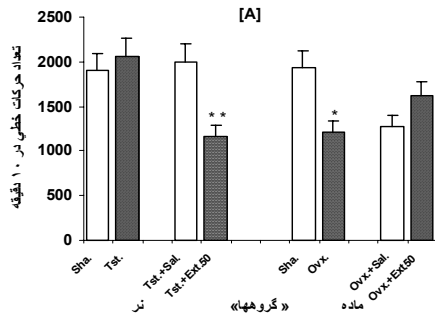


(الف)

(ب)

(ج)

تصویر شماره ۱: نمونه ای از الگوهای حرکتی ثبت شده در دستگاه پایش فعالیت حرکتی (MAM)، ویژه موش های نر سالم دریافت کننده سالیین (الف)، دریافت کننده مقدار ۳۰ mg/kg بابونه (ب) و دریافت کننده مقدار ۵۰ mg/kg عصاره بابونه (ج).



نمودارهای سری ۲: مقایسه شاخص های فعالیت حرکتی تعداد حرکات خطی [A]، تعداد حرکات کلیشه ای [B]، و تعداد Rearing [C]، بین گروه های شاهد و آزمایش، شامل نرهای شم (Sha.) و فاقد غدد جنسی (Tes.)، فاقد غدد جنسی دریافت کننده سالیین (Tes.+Sal.) و مقدار ۵۰ mg/kg عصاره بابونه (Tes.+Ext.50)، و ماده های شم (Sha.) و فاقد غدد جنسی (OvX.)، فاقد غدد جنسی دریافت کننده سالیین (OvX.+Sal.) و مقدار ۵۰ mg/kg عصاره بابونه (OvX.+Ext.50) در آزمون میدان باز. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ ، معنی داری گروه های آزمایش با گروه شاهد را نشان می دهد. (N=V, Mean±SEM)

نمودارهای سری ۱: مقایسه شاخص های فعالیت حرکتی تعداد حرکات خطی [A]، تعداد حرکات کلیشه ای [B]، تعداد Rearing [C]، بین گروه های نر و ماده سالم، دریافت کننده سالیین (Sal.) و مقادیر ۳۰ mg/kg (Ext.30) و ۵۰ mg/kg (Ext.50) عصاره هیدروالکلی بابونه در تست میدان باز. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ ، معنی داری گروه های آزمایش با گروه شاهد و $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ ، معنی داری گروه دریافت کننده عصاره، دوز ۵۰ با دوز ۳۰ را نشان می دهد. (N=V, Mean±SEM)

بحث

موش‌های جوان و مسن با فلاونوئیدهای آپی ژنین و کورستین فعالیت حرکتی را تغییر نمی‌دهد ولی تعادل موش‌های مسن را در آزمون روتارود بهبود می‌بخشد (۷) به نظر می‌رسد اثرات حرکتی این ترکیبات وابسته به مدت استفاده بوده و با افزایش مدت استفاده اثر آن کاهش می‌یابد.

همچنین در مطالعه حاضر نشان داده شد که عصاره گل بابونه به میزان ۵۰ mg/kg شاخص‌های فعالیت حرکتی را در موش‌های ماده بر خلاف موش‌های نر افزایش می‌دهد. تصویری شود این اثر دوگانه و تفاوت حساسیت به عصاره بابونه در موش‌های نر و ماده ناشی از تفاوت‌های جنسی، هورمون‌های استروئیدی گنادی و عملکرد متفاوت سیستم عصبی باشد. در مطالعه حاضر و همچنین در بررسی‌های متعدد بر روی جوندگان نشان داده شده که ماده‌ها در مقایسه با نرها فعال‌ترند (۲۱،۲۲) و نیز گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد موش‌های صحرایی ماده در جاهای پرپیچ و خم (Maze) با میدان باز، اکتشاف بیشتر و در با جعبه میدان باز، فعالیت زیادتر و در ماز به علاوه مرتفع، تعداد ورودی‌های بیشتر را نسبت به نرها انجام می‌دهند (۲). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که دو شکل جنسی در سیستم‌های ناقلین شیمیایی وجود دارد و این سیستم‌ها تحت تاثیر هورمون‌های جنسی قرار می‌گیرند (۳). همچنین تفاوت‌های جنسی در پاسخ به محرک‌های روانی همچون آمفتامین و کوکائین و نیز شیوع بالای بیماری پارکینسون در مردان دیده می‌شود که این تفاوت‌ها را به نقش هورمون‌های تخمدانی و تفاوت‌های ذاتی در سازماندهی مدارات عصبی و سیستم‌های ناقل عصبی خصوصاً سیستم دوپامینی نسبت می‌دهند (۲۶-۲۳). شواهد محکمی وجود دارد که استروژن اثرات عمیقی بر عملکرد نورون‌های سیستم دوپامینرژیک در استریاتوم،

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی گل بابونه به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، شاخص‌های فعالیت حرکتی را در موش‌های نر سالم کاهش می‌دهد و این یافته با مطالعات قبلی در این مورد همخوانی دارد. به طور مثال آلون (Avallon) و همکارانش (۲۰۰۰) نشان دادند که درمان موش‌های نر با عصاره گل بابونه باعث کاهش شاخص‌های بلندشدن بر روی پاها (Rearing) و کل مسافت پیموده شده می‌شود ولی زمان سپری شده در بی‌حرکتی را چندان تغییر نمی‌دهد (۱۴). سازگار با این نتیجه زانولی (Zanolli) و همکارانش (۲۰۰۰) گزارش دادند که تزریق داخل صفاقی آپی ژنین و کرایزین دو فلاونوئید جدا شده از عصاره گل بابونه شاخص‌های فعالیت حرکتی را در آزمون میدان باز در مقایسه با گروه مورد و شاهد به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (۱۵). مطالعات و سنجش‌های داروشناسی متعدد نشان داده که فلاونوئیدهای موجود در عصاره بابونه (آپی ژنین، کرایزین) با اثر گذاری روی سیستم عصبی مرکزی و واکنش با گیرنده‌های گابا، اثرات ضد اضطرابی و تسکینی اعمال می‌کنند (۱۴،۱۵،۲۰). به منظور روشن شدن مکانیسم کاهش حرکت در موش‌های نری که با فلاونوئیدهای آپی ژنین و کرایزین درمان شدند زانولی و همکارانش (۲۰۰۰) نشان دادند که تزریق فلومازنیل و پیکروتوکسین (آنتاگونیست گیرنده‌های گابا) پیش از درمان با فلاونوئیدها قادر به اصلاح کاهش فعالیت حرکتی در جانوران نیست و اثر آپی ژنین و کرایزین روی فعالیت حرکتی به وسیله یک آنتاگونیست گیرنده بنزودیازپینی مهار نمی‌شود (۱۴،۱۵). بنابراین تصور می‌شود که اثرات حرکتی این ترکیبات به اثر مستقیم آنها روی گیرنده‌های بنزودیازپینی بستگی ندارد و از طریق سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری میانجی‌گری می‌شود. در مطالعه دیگر نشان داده شده که درمان مزمن

جسم سیاه و هسته آکومبنس، که در رفتار حرکتی نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند، دارد (۲۲). مطالعات حیوانی نشان می‌دهد که استروژن در ساخت، ترشح و متابولیسم دوپامین نقش دارد (۲۷) این در حالی است که این سیستم تحت تاثیر آندروژن‌ها قرار نمی‌گیرد و این اثرات تحت تاثیر استرادیول در نرها دیده نمی‌شود (۳،۲۸).

مطالعات سلولی در انشعابات دوپامینرژیک مغز میانی در توده استریاتوم، جسم سیاه و هسته آکومبنس نشان داده که بر اساس نوع جنس، عملکرد استروژن و پروژسترون بر این نواحی متفاوت است که ممکن است اثرات به صورت دوپامینرژیک یا آنتی دوپامینرژیک فعالیت و رفتارهای وابسته به دوپامین را تحت تاثیر قرار دهد (۳). سانکو (Sanco) و همکارانش (۱۹۹۷ و ۱۹۹۸) در جهت تعیین نقش استروژن و گیرنده‌های استروژنی در یک چهارچوب وابسته به جنس، بر روی فعالیت حرکتی در آزمون میدان باز نشان دادند که حذف گیرنده‌های استروژنی در نرها و ماده‌ها اثرات متفاوتی را در رفتارهای حرکتی جانور ایجاد می‌کند؛ به طوری که فعالیت حرکتی در نرها افزایش و در ماده‌ها کاهش می‌یابد (۲۷،۲۹). با توجه به مطالعات انجام شده و نتایج تحقیق حاضر، عصاره گیاه بابونه احتمالاً مشابه آن‌دسته از داروهایی که در دو جنس اثر متفاوتی را نشان می‌دهند، عمل می‌کند. مشخص شده که فلاونوئیدهای موجود در عصاره بابونه به عنوان ترکیبات دارویی فعال و اثرگذار در سیستم عصبی مرکزی فعالیت استروژنیک دارند و در بافت‌های هدف ویژه همانند مقلدهای استروژن عمل می‌کنند و تمایل اتصال به گیرنده‌های استروژنی α و β را دارند. در جای دیگر خصوصیات آنتاگونیستی آن‌ها با تاموکسی فن، خصوصاً راگوکسی فن مقایسه شده است. عنوان شده که این اثرات ممکن است وابسته به جنس و در ارتباط با حالات غدد جنسی جانور باشد (۳۳-۳۰).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر همچنین نشان داد که حذف غدد جنسی تاثیری بر فعالیت حرکتی موش‌های نر ندارد در صورتی که فقدان غدد جنسی در موش‌های ماده شاخص‌های فعالیت حرکتی را به شدت کاهش می‌دهد. در تائید این نتایج میشل (Mishel) و همکارانش (۱۹۸۱) نشان دادند که اخته کردن موش‌های نر تاثیری در فعالیت حرکتی آن‌ها ندارد ولی در آوردن تخمدان‌ها باعث کاهش معنی‌دار فعالیت حرکتی، ترشح دوپامین و مهار شدن تحریک آمفتامین و آپومورفین در الفاء رفتارهای حرکتی می‌شود (۲۴،۲۵). جرمی و مارتینز (Jeremy و Martineze) (۲۰۰۲) در دو تحقیق جداگانه با تزریق تستوسترون در یک محدوده وسیع به موش‌های نر فاقد غدد جنسی دریافتند که تستوسترون اثر مستقیمی روی فعالیت حرکتی در آزمون میدان باز ندارد (۳۴،۳۵). مطالعات دیگر نشان می‌دهد که آندروژن‌ها متابولیسم سروتونین و دوپامین را خصوصاً در استریاتوم، هسته آکومبنس و هیپوکامپ افزایش می‌دهند و همچنین مصرف مزمن استروئیدهای آندروژنیک باعث کاهش تراکم گیرنده‌های D1، D2 در هسته دمدار و پوتامن و هسته آکومبنس و تغییر حساسیت آن‌ها می‌شود (۳۵). ضمن این که برخی محققین همچنین نشان دادند که در موش‌های صحرایی نر وحشی بین تستوسترون پلازما و میزان فعالیت حرکتی ارتباط مستقیم و معنی‌داری وجود دارد (۳۶). به نظر می‌رسد این اختلاف از شرایط محیطی، جایگاه زندگی و ویژگی موش‌ها ناشی شود. گرچه گزارش‌های ضدونقیض بسیاری درباره اثرات آندروژن‌ها بر فعالیت حرکتی وجود دارد، اثرات استرادیول در میانجی‌گری رفتارهای حرکتی به اثبات رسیده است. استیسی (Stacy) و همکارانش (۲۰۰۰) گزارش داده‌اند که درمان موش‌های صحرایی که تخمدان‌شان در آورده شده با استرادیول بنزوات سطوح فعالیت حرکتی را به

نظر می‌رسد که این دو از طریق سیستم مشابه فعالیت حرکتی را در موش‌های ماده افزایش می‌دهند. گزارش‌هایی وجود دارد که فلاونوئیدهای آپی ژنین و کریزین موجود در عصاره بابونه دارای اثرات فیتواستروژنیک هستند (۴۱). بررسی‌ها نشان داده که عصاره بابونه در مقادیر بالا به عنوان مقلد ضعیف استروژن و پروژسترون عمل می‌کند و گزارش‌های دیگر حاکی از اتصال فلاونوئیدهای آپی ژنین و کریزین موجود در عصاره بابونه با گیرنده‌های کلاسیک و غیر کلاسیک استروژن است (۱۵،۳۰،۴۲). نشان داده شده که آپی ژنین فلاونوئید مطرح در عصاره بابونه در باز چرخش دوپامین در مراکز متعدد از مغز همچون استریاتوم، آمیگدال و هیپوتالاموس موثر است. ضمن این که لورنزو (Lorenzo) و همکارانش (۱۹۹۷) نشان داده‌اند که آپی ژنین فعالیت منوآمین اکسیداز، آنزیم عمده در کاتابولیک منوآمین‌ها، را مهار می‌کند (۴۳).

همچنین مطرح شده که مولکول‌های شبه استروژن همچون فیتواستروژن‌ها اثرات پیچیده بر رفتارهای غیر تولید مثلی همچون اضطراب و حرکت دارند، بنابراین ممکن است اثرات ضد اضطرابی ایجاد کنند ولی ممکن است اثرات تسکینی اعمال نکنند که این به نوبه خود فعالیت حرکتی و رفتارهای کاوشی را افزایش می‌دهد و این اثرات بیشتر در ارتباط با عمل هورمونی و استروئیدهای جنسی است (۴۴).

شواهد موجود همچنین نشان می‌دهد که عصاره گل بابونه فعالیت حرکتی موش‌های فاقد غدد جنسی را نسبت به موش‌های سالم بیشتر افزایش می‌دهد، از آن جایی که فیتواستروژن‌ها آگونیست‌های ضعیف‌تری نسبت به استروژن‌ها محسوب می‌شوند (۴۳،۴۴). تصور می‌شود در فقدان رقابت با استروژن ترکیبات فیتواستروژنی بهتر عمل می‌کنند. بنابراین به نظر می‌رسد که ترکیبات فلاونوئیدی بابونه از طریق اثرات

طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (۳۷). بررسی‌های انجام شده بر روی موش‌هایی که تخمدانشان در آورده شده در اکثر مطالعات نشان داده که در آوردن تخمدان فعالیت‌های حرکتی و رفتارهای وابسته به آن را کاهش می‌دهد (۳۷،۳۸،۳۹). در مطالعه دیگر اگوا (Ogwa) و همکارانش (۱۹۹۷ و ۱۹۹۸) ثابت کردند که استروژن فعالیت حرکتی را در موش‌های ماده از طریق گیرنده استروژنی α افزایش می‌دهد و در ادامه ثابت کردند که درمان موش‌هایی که تخمدانشان در آورده شده با استرادیول هم فعالیت حرکتی در مدل چرخ گردان و هم میدان باز را افزایش می‌دهد در حالی که پروژسترون در این ارتباط فاقد اثر است (۲۸،۲۹). ونیز مشاهده شده است که سطح فعالیت درموش‌های ماده در روز استروس که میزان استرادیول پلازما بالاست، در مقایسه با سایر روزها بیش‌تر است (۴۰). این یافته‌ها علاوه بر درگیری هورمون‌های جنسی در فعالیت حرکتی تفاوت‌های جنسی بین دو جنس را نیز به نوعی توجیه می‌کند.

نتایج بعدی نشان داد که عصاره بابونه در فقدان غدد جنسی نیز شاخص‌های فعالیت حرکتی را کاهش می‌دهد و این امر می‌تواند نشانگر عدم تداخل بین هورمون تستوسترون و عصاره گل بابونه در میانجی‌گری رفتارهای حرکتی باشد و این برخلاف اثرات تقویت‌کننده تستوسترون و عصاره گل بابونه در اعمال اثرات ضد اضطرابی و ضد دردی است (۱۸،۱۹،۳۴). در هر حال با توجه به شواهد موجود تصور بر این است که دو سیستم ناقل عصبی گابا آرژیک و دوپامینرژیک بیش‌تر از همه در این ارتباط دخیل باشند.

نتایج به دست آمده از اثرات عصاره گل بابونه در موش‌هایی که تخمدانشان در آورده شده در مطالعه حاضر نشان داد که شاخص‌های فعالیت حرکتی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. با توجه به اثرات مشابه استرادیول و عصاره بابونه در افزایش فعالیت حرکتی به

دوپامینرژیک و گاباارژیک پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مدیر محترم گروه زیست‌شناسی جناب آقای دکتر فروغمند و همچنین مدیر محترم گروه شیمی سرکار خانم دکتر پور رضا که در طول اجرای این تحقیق در نهایت صمیمیت همکاری نمودند، کمال تشکر را دارم.

استروژنیک با تحت تاثیر قرار دادن سیستم دوپامینرژیک فعالیت حرکتی را در موش‌های ماده افزایش می‌دهند. ضمن این‌که با اثرات آنتی استروژنیک و یا شاید آنتی‌دوپامینرژیک فعالیت حرکتی را در جنس نر در یک محدوده وابسته به جنس کاهش می‌دهند. بنابراین جهت روشن شدن بیش‌تر موضوع تجویز عصاره گل بابونه به صورت توام با هورمون‌های جنسی و همچنین به همراه آنتاگونیست‌های گیرنده‌های استروژنی و سیستم

فهرست منابع

1. خالدان، اصغر، حرکت زیربنای تربیت بدنی و ورزش، نشریه حرکت، تابستان ۱۳۷۸، سال اول، شماره ۱، ص ۲۰-۵.
2. Jenet C.L, Tou and Charles E, Wade. Determinations affecting physical activity levels in animal models; *Exp. Biol. Med.* 2002; 227: 587-600.
3. Bruce S, McEwen and Stephen E. Esterogen actions in the central nervous system; *Endocr. Rev.* 1999; 20(3): 279-307.
4. Jones D.L, Mogenson G.J, Wu M. Injections of dopaminergic, cholinergic, serotonergic and gabaergic drugs into the nucleus accumbens: effects on locomotor activity in rat; *Neuropharmacology.* 1981; 20(1): 29-37.
5. Bardgett M.E, Henry J.D. Locomotor activity and accumbens expression driven by ventral hippocampal stimulation require D1 and D2 receptors. *Neuroscience.* 1999; 94(10): 59-70.
6. Pattie S, Green, James W, Simpkins. Neuroprotective effect of estrogen: potential mechanisms of action; *Int. J. Dev. Neurosci.* 2000; 18: 347-358.
7. Sawada H, Shimohama S. Estrogens and parkinson disease: novel approach for neuroprotection; *Endocrine*, 2003; 21(1): 77-80.
8. Sawada H, Shimohama S. Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons; *Neurosc. Biobehav. Rev.* 2000; 24: 143-147.
9. Wim E, Crusio. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour; *Behav. Brain. Res.* 2001; 125(1-2): 127-132.
۱۰. فریدونی، مسعود، اعتمادی، لیلا، بروک، اعظم، بررسی اثرات ضد دردی بابونه به وسیله تست فرمالین روی موش‌های سوری، *مجله فیزیولوژی فارماکولوژی*، ۱۳۸۰، جلد پنجم، شماره دوم، ص ۱۹۷-۱۸۹.
۱۱. صمصام شریعت - سیدهادی: *عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آنها*، جلد اول، انتشارات مانی، ص ۱۹-۱۳، (۱۳۷۱).

12. Nemezc George. Herbal Pharmacy: Chamomile, This widely available herb has diverse therapeutic uses, including antiphlogistic, sedative and antimicrobial effects; *Pharmacist*, 2000; 23: 115-123.
۱۳. درزی- محمد تقی، حاج سید هادی- سید محمد رضا: آشنایی با گیاه دارویی بابونه، *نشریه زیتون*، ۱۳۸۰، شماره ۱۴۹، ص ۶۲-۶۰.
14. Avallon R, Zanolì P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria Chamomilla*; *Biochem. Pharmacol.* 2000; 55: 1387-1394.
15. Zanolì P, Avallone R, Baraldi M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin; *Fitoterapia*, 2000; 71: 117-123.
16. Morgan M.A, Pfaff D.W. Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice; *Horm. Behav.* 2001; 40: 472-482.
17. Morgan M.A, Pfaff D.W. Estrogens effects on activity, and fear in two mouse strains; *Behavi. Brain. Res.* 2002; 132: 85-93.
۱۸. راعی، حسن، کسمتی، مهناز، زاد کرمی. محمد رضا. تداخل اثر هورمون‌های جنسی و عصاره هیدروالکلی بابونه بر رفتار فعالیت حرکتی در موش سوری نر و ماده فاقد غدد جنسی. *مجله علوم پزشکی همدان*، بهار ۱۳۸۵، دوره سیزدهم، شماره اول، ص ۴۸-۵۷.
19. Avallone R, Zanolì P. Benzodiazepin-like compounds and GABA in flower heads of *matricaria chamomilla*; *Phytother. Res.* 1996; 10: 177-179.
20. Viola H, Wasowski C, Levi de Stein M, Wolfman C, Silveria R, Dajas F, Medina J.H, Paladini A.C. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazpine receptors-ligand with anxiolytic effects; *Planta. Med.* 1995; 61(3): 213-216.
21. Fitch RH, Denenberg VH. A role for ovarian hormones in sexual differentiation of the brain; *Behavi. Brain. Sci.* 1999; 11: 933-942.
22. Sandra J. Kelly, Nancy L. Ostrowski, Mariene A. Wilson. Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases; *Pharmacol. Biochem. Be.* 1999; 64(4): 655-664.
23. Margaret L, Forgie and Jane Stewart. Sex differences in amphetamin-induced locomotor activity in adult rays: Role of testosterone exposure in the neonatal period; *Pharmacol. Biochem. Be.* 1993; 46(3): 637-645.
24. Marriot L.K, Korol D.L. Short term estrogen treatment in ovariectomized rats augments hippocampal actylcholin release during place learning; *Neurobiol. Learn. Mem.* 2003; 80: 315-322.
25. Michelle M, Savageau and William W, Beatty. Gonadectomy and sex differences in the behavioral responses to amphetamine and apomorphoin of rats; *Pharmacol. Biochem. Be.* 1981; 14(1): 17-21.

26. Sandra J. Kelly, Nancy L. Ostrowski, Mariene A. Wilson. Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases; *Pharmacol. Biochem. Be.* 1999; 64(4): 655-664.
27. Lisa M, Shulman. Is there a connection between estrogen and Parkinsons disease; *Parkinsonism. Relat. D.* 2002; 8: 289-295.
28. Ogawa Sanoko, Dennis B, Lubahn, Kenneth S, Korach, Donald W, Pfaff. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice; *Neurobiology.* 1997; 94(4): 1476-1781.
29. Ogawa Sanoko, Vincent Eng, Julia Taylor, Dennis B, Lubahn, Kenneth S, Korach, and Donald W, Pfaff. Roles of estrogen receptor α gene expression in reproduction-related behaviors in female mice; *Endocrinology.* 1998; 139(12): 5070-5081.
30. Brrinhot V, Hossaini A, Svendsen GW, Brouwer C, and Nielsen E. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of receptor distribution, metabolism and bioavailability; *Food. Chem. Toxicol.* 2000; 38: 555-564.
31. Edwin D, Lephart A, Timoty W, West K, Scott Weber, and et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens; *Neurotoxicol. Teratol.* 2002; 24: 5-16.
32. Daniel E, Frigo, Bich N, Duong, Lilia I, Melink, Lavanda S, et al. Flavonoid phytochemical regulate activator protein -1 signal transduction pathways in endometrical and kidney stable cell lines -1; *J. Nutr.* 2002; 132: 1848-1853.
33. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B. Interaction of estrogen chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta; *Endocrinology.* 1998; 139: 4256-4263.
34. Jeremy L, Aikey, John G, Nyby, David M, Anmuth, Peter J, Jammes. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*); *Hor. Behav.* 2002; 42(4): 448-460.
35. Martinez- Sanchis S, Aragon C.M.G, Salvador A. Cocaine-induced locomotor activity is enhanced by exogenous testosterone; *Physiol. Behav.* 2002; 76 (4-5): 605-609.
36. Perrot-Sinal T, Klaus-Peter O, Martin Kavaliers. Influence of a natural stressor (predator odor) on locomotor activity in the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*): modulation by sex, reproductive condition and gonadal hormones; *Psychoneuroendocrinol.* 2000; 25: 259-276.
37. Stacy L. Sell, Joanne M. Scalzitti, Mary L. Thomas Kathryn A. Cunningham. Influence of ovarian hormones and estrous cycle on the behavioral response to cocaine in female rats; *Pharmacology,* 2000; 293(3): 879-886.
38. Ohtani H, Nomoto M, Douchi T. Chronic estrogen treatment replaces striatal dopaminergic function in ovariectomized rats; *Brain. Res.* 2001; 900: 163-168.

39. Ming Hu, Jill B, Becker. Effects of sex and estrogen on behavior sensitization to cocaine in rats; *J. Neurosci.* 2003; 23(2): 693-699.
40. Marczinski C, Pirot-sinal TS, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Sex differences in spontaneous locomotor activity and rotational behavior in Meadow Voles; *Physiol. Behav.* 1998; 65(2): 387-391.
41. Daniel E, Frigo, Bich N, Duong, Lilia I, Melink, Lavanda S, et al. Flavonoid phytochemical regulate activator protein-1 signal transduction phatways in endometrical and kidney stable cell lines -1; *J. Nutr.* 2002; 132: 1848-1853.
42. Nakazawa T, Yasuda T, Ueda J, Ohsawa K. Antidepressant-like effects of apigenin and 2,4,5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla Frutescens* in the forced swimming test; *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26(4): 474-480.
43. Salgueiro JB, Ardenghi P, Dias M, Ferreira MB C, Izquierdo I, Medina J H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats; *Pharmacol. Biochem. Be.* 1997; 58(4): 887-891.
44. Edwin D, Lephart A, Timoty W, West K, Scott Weber, et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens; *Neurotoxicol. Teratol.* 2002; 24: 5-16.