

## *Neuroprotective Effects of Myricitrin on Cognitive Deficits in Hippocampal Demyelinated Rats*

Fatemeh Sargolzaee Javan<sup>1</sup>,  
Mohammad Ali Mirshekar<sup>2</sup>,  
Mohammadreza Shahraki<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Physiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

(Received July 13, 2019 ; Accepted October 1, 2019)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Multiple sclerosis (MS) as an autoimmune disease is the most common demyelinating inflammatory disease in young people that affects the central nervous system. Myricitrin (MYR) is known to have antioxidant and neuroprotection effects, so, the current study investigated its effect on cognitive defects in rat models of MS.

**Materials and methods:** In this experimental study, 40 Wistar rats were divided into five groups. Intra- hippocampus injection of Ethidium bromide (3  $\mu$ L 0.01%) was performed using Hamilton syringe to induce demyelination. MYR was injected intraperitoneally for seven days after induction of demyelination. Measurements of passive avoidance memory in shuttle box, spatial memory (using Morris water maze), balance (by rotarod task), and anxiety level (using elevated plus maze) were done. The levels of MDA, TNF- $\alpha$ , and total antioxidant capacity were also measured.

**Results:** Ethidium bromide significantly increased hippocampal MDA and TNF- $\alpha$  levels and decreased hippocampal total antioxidant capacity activity ( $P < 0.001$ ). MYR treatment significantly prevented the decrease of antioxidant capacity and the increase in hippocampal MDA and TNF- $\alpha$  levels induced by ethidium bromide ( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ , respectively). Behavioral evaluation also indicated that treatment with MYR significantly improved the ability to keep information and reminders, spatial memory, balance, and anxiety.

**Conclusion:** Injection of ethidium bromide into the CA1 region of the hippocampus led to the induction of MS, and administration of MYR may improve memory, motor function, and anxiety in MS models, possibly through antioxidant and anti-inflammatory pathways.

**Keywords:** Multiple sclerosis, Myricitrin, antioxidant, cognition, ethidium bromide

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29 (180): 8-23 (Persian).

\* Corresponding Author: Mohammad Ali Mirshekar- Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran (E-mail: ma\_mib78@yahoo.com)

## بررسی اثر میریسیتین بر نقایص شناختی در موش های صحرائی دمیلینه شده هیپوکمپی

فاطمه سرگلزایی جوان<sup>1</sup>محمدعلی میرشکار<sup>2</sup>محمد رضا شهرکی<sup>3</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** ام اس به عنوان یک بیماری خود ایمنی، شایع ترین بیماری التهابی دمیلینه در افراد جوان است که روی سیستم اعصاب مرکزی تأثیر می گذارد. در این مطالعه، با توجه به اثر آنتی اکسیدانی و حفاظت نوروئی میریسیتین، اثر تجویز این ماده بر نقایص شناختی در مدل موش صحرائی مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، چهل سر موش صحرائی نژاد ویستار به پنج گروه مختلف تقسیم شدند. از تزریق داخل هیپوکمپی 3 میکرو لیتر اتیدیوم بروماید 0/01 درصد، با استفاده از سرنگ همیلتون جهت القای دمیلیناسیون استفاده شد. داروی میریسیتین به میزان 5 میلی گرم/کیلوگرم به مدت 7 روز به صورت داخل صفاقی بعد از القای دمیلیناسیون تزریق گردید. اندازه گیری حافظه اجتنابی غیر فعال در دستگاه شاتل باکس، حافظه فضایی با دستگاه ماز آبی موریس و میزان تعادل با دستگاه روتارود انجام شد. همچنین سطح هیپوکمپی مالون دی آلدئید (MDA)، فاکتور نکوز دهنده توموری آلفا (TNF- $\alpha$ ) و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) اندازه گیری شد.

**یافته ها:** تزریق اتیدیوم بروماید موجب افزایش معنی دار سطح هیپوکمپی MDA و TNF- $\alpha$  و کاهش فعالیت ظرفیت تام آنتی اکسیدانی هیپوکمپی شد ( $P < 0/001$ ). تیمار میریسیتین از کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی و افزایش سطوح هیپوکمپی MDA و TNF- $\alpha$  ناشی از اتیدیوم بروماید به طور معنی داری ممانعت کرد ( $P < 0/05$ ,  $P < 0/001$ ). ارزیابی رفتاری نیز نشان داد که تیمار با میریسیتین به طور قابل توجهی باعث بهبود توانایی نگهداری اطلاعات و یادآوری، بهبود حافظه فضایی و تعادل شد.

**استنتاج:** تزریق اتیدیوم بروماید به ناحیه CA1 هیپوکمپی منجر به القا بیماری ام اس می گردد و تجویز میریسیتین احتمالاً از طریق مسیرهای آنتی اکسیدانی و ضد التهابی باعث بهبود حافظه و عملکرد حرکتی در مدل ام اس می شود.

**واژه های کلیدی:** مالتیپل اسکلروزیس، میریسیتین، آنتی اکسیدانت، شناخت، اتیدیوم بروماید

### مقدمه

جوان روی سیستم اعصاب مرکزی و اعصاب بینایی تأثیر می گذارد (1،2). سیستم ایمنی به میلین و سلول های الیگودندروسیت که میلین را می سازند، حمله کرده، آن ها

مالتیپل اسکلروزیس Multiple Sclerosis (ام اس) به عنوان یک بیماری التهابی خود ایمنی، یک بیماری مزمن و تحلیل برنده عصبی می باشد و بیش تر در افراد

E-mail: ma\_mib78@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** محمدعلی میرشکار - زاهدان: دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی

1. کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

2. استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

3. استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: 1398/4/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/4/24 تاریخ تصویب: 1398/7/9

را از بین می‌برد و به جای آن اسکار (زخم) به جای می‌ماند (3). شیوع ام‌اس در دو دهه گذشته افزایش یافته است و درصد بیماران مبتلا به ام‌اس در ایران نزدیک به 40 نفر در هر 100000 نفر می‌باشد. زنان دو برابر بیش از مردان و در سنین 20 تا 40 سال تحت تاثیر این بیماری قرار می‌گیرند. توزیع جغرافیایی بیماری ام‌اس در عرض‌های جغرافیایی شمال یا جنوب خط استوا افزایش یافته و جمعیت سفید پوست اروپایی بیش تر آسیب‌پذیر هستند (4). جدیدترین ویژگی همه‌گیر این بیماری می‌تواند به عوامل محیطی مانند کمبود ویتامین D، تابش اشعه ماوراء بنفش با طول موج کوتاه، عفونت‌های ویروسی، افزایش سن و مکان‌هایی با عرض جغرافیایی بالا باشد (5). علت ام‌اس ناشناخته است ولی مدارک نشان می‌دهند که این بیماری به‌طور ژنتیکی در افرادی که بیشتر با عامل‌های محیطی مواجه هستند، پیشرفت می‌کند. به‌طور محیطی سلول‌های TCD4+ باعث فعال شدن مولکول‌های پیچیده اصلی سازگاری بافتی (MHC) می‌شوند. این مولکول‌ها فنوتیپ‌هایی از انواع سلول‌های T را فعال می‌کنند که باعث تخریب غلاف میلین می‌شوند (6,5). سیتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترفرون  $\gamma$ ، فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا ( $TNF-\alpha$ ) و سیتوکین‌های سلول‌های التهابی B در ام‌اس افزایش می‌یابند (8,7). علائم بالینی در بیماران مبتلا به ام‌اس، اختلال در سیستم عصبی مرکزی شامل اختلالات حرکتی و نیز نقص شناختی می‌باشد (3). اختلالات شناختی عمدتاً یادگیری و حافظه، در 43 تا 70 درصد از بیماران ام‌اس در طول مراحل اولیه دیده شده است (9).

مطالعات جدید در زمینه عکس‌برداری مغناطیسی مغز در بیماران مبتلا به ام‌اس، اختلالات ساختاری هر دو قشر مغزی و هیپوکمپ را نشان داده‌اند (محل اصلی تثبیت حافظه). علاوه بر این، شواهد متقاعد کننده‌ای از اختلال حافظه در بیماران ام‌اس گزارش شده است (10). در مطالعه‌ای که Omotoso و همکاران بر روی موش‌های مبتلا به ام‌اس انجام دادند، دریافتند که دمی‌لیناسیون

هیپوکامپ به پیشرفت اختلالات شناختی و حافظه مرتبط است و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌تواند عملکرد شناختی را کاهش دهد (11). مهم‌ترین هدف از درمان ام‌اس، جلوگیری از کار افتادگی و ناتوانی همیشگی سیستم عصبی است. شرایط حاد ام‌اس با کورتیکواستروئیدها که عوارض و التهاب را کاهش می‌دهند و هدایت عصبی را بهبود بخشیده و سیستم ایمنی را اصلاح می‌کنند، درمان می‌گردد. داروهایی اعم از باکلوفن<sup>1</sup>، تیزانیدین<sup>2</sup>، آمانتادین<sup>3</sup>، کوپاکسون<sup>4</sup> تعدادی از تهاجمات ام‌اس را کاهش داده و در جلوگیری از پیشرفت این بیماری موثر هستند. اما عوارض جانبی بسیاری به دنبال دارند که از این میان می‌توان به آسیب کبدی، کاهش ضربان قلب و افزایش فشارخون، تضعیف سیستم ایمنی اشاره کرد (12,13). میریستین از خانواده میریستین و یسک آنتی‌اکسیدان طبیعی است که در مواد خوراکی مانند میوه‌ها، چای و تعدادی از گیاهان که خاصیت دارویی دارند یافت می‌شود. نام شیمیایی آن (myricetin-3-o-a- rhamnoside) است و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی می‌باشد (14). همچنین این ماده دارای اثرات ضد درد، ضد اضطراب و حفاظت نورونی می‌باشد (15-17). میریستین از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC)، گلوکاتیون احیا (GSH)، و کاهش مالون دی‌آلدئید (MDA) و رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) منجر به محافظت سلول‌های اندوتلیال عروقی در برابر آپوپتوز می‌شود. مصرف این فلاونوئید با کاهش اکسیداسیون لیپیدی و التهاب مزمن از ایجاد آترواسکلروز در عروق نیز جلوگیری نموده است (18). اثرات ضد التهابی میریستین از طریق کاهش فسفوریلاسیون P38<sup>5</sup>MAPK، اینترلوکین 1 بتا ( $IL-1\beta$ )<sup>6</sup> و فاکتور نکروز دهنده

1. Baclofen  
2. Tizanidine  
3. Amantadine  
4. Copaxone  
5. Mitogen activated protein kinase  
6. Interleukin 1 beta

توموری آلفا<sup>7</sup> (TNF- $\alpha$ ) در مطالعه Meotti و همکاران در سال 2007 به اثبات رسیده و از این ترکیب به عنوان یک عامل موثر در افزایش آستانه درد یاد شده است (19). استفاده از میریستیرین تا 2000 mg/kg هیچ گونه اثر سمیت ژنی را ایجاد ننموده و پیشنهاد شده است که استفاده از این ترکیب در غذاهای انسانی اثر منفی نخواهد داشت. با توجه به اثرات بسیار قوی آنتی اکسیدانی و ضد التهابی میریستیرین، و از آنجایی که تا به حال هیچ مطالعه‌ای در مورد اثر میریستیرین بر روی نقایص شناختی ناشی از ام اس انجام نشده است، این مطالعه با هدف بررسی اثر میریستیرین بر نقایص شناختی در مدل موش صحرایی مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس انجام پذیرفت.

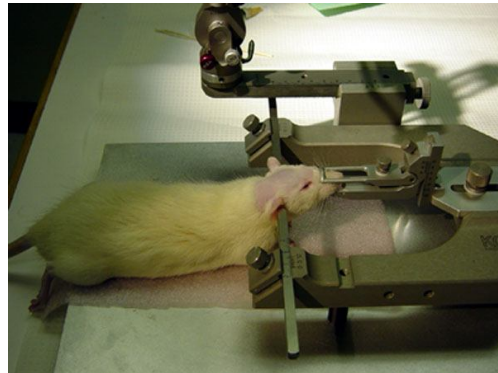
## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، پس از تصویب طرح و با کد اخلاق به شماره R. ZAUMS. REC.1395.184، تعداد 40 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی (200 تا 250 گرم) انتخاب و پس از یک هفته سازگاری، به صورت تصادفی در پنج گروه (هشت سر در هر گروه) قرار گرفتند. موش‌ها در شرایط کنترل شده، دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، سیکل نوری دوازده ساعت روشنایی و تاریکی، که به صورت مصنوعی تنظیم گردید، میزان رطوبت 20-15 درصد و دسترسی آزاد به آب و غذا، قرار گرفتند (20). هر دو حیوان در یک قفس قرار داده شدند. روش انجام کار به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زاهدان رسید. موش‌های صحرایی به طور تصادفی به 5 گروه شامل، گروه کنترل (دست نخورده و سالم (Control: Control))، گروه (جراحی و دریافت کننده نرمال سالین: Salin)، گروه مبتلا به ام اس: MS، گروه مبتلا به ام اس و دریافت کننده میریستیرین (MS+MYR) با دوز 5mg/kg و گروه کنترل مثبت (مبتلا به ام اس و دریافت کننده بتافرون MS+Beta) تقسیم شدند (21-23). برای جراحی استرئوتاکسی، ابتدا

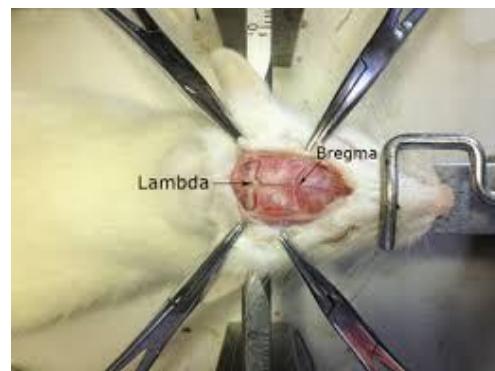
حیوانات با (300 mg/kg) کلرال هیدرات به صورت تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. پس از بیهوشی کامل حیوانات، سر حیوانات در دستگاه استرئوتاکس قرار داده شد به طوری که میله‌ی نگه دارنده‌ی دندان به ارتفاع 3/3 mm و میله نگه دارنده گوش به شکل متقارن قرار گرفت (تصویر شماره 1). محورهای دستگاه استرئوتاکس در سه جهت فضایی تنظیم شدند. مختصات استفاده شده بر طبق اطلس پاکسینوس عبارتند از  $ML = \pm 2/2$  و  $DV = - 3/2$ ،  $AP = - 3/8$  نقاط رفرانس برگما و لامبدا می‌باشد (تصویر شماره 2). موهای پشت سر حیوان شیو و پوست سر با الکل 70 درصد تمیز شد و یک برش با طول 1/5 سانتی‌متری در حد فاصل دو چشم تا برآمدگی استخوان پس سری با استفاده از تیغ بیستوری ایجاد گردید. بافت‌های رویی جمجمه کاملاً برداشته شدند و سطح بیرونی جمجمه کاملاً خشک شد تا محل دقیق برگما، لامبدا و ساجیتال مشخص شود. سپس سوراخی به قطر 1/5 میلی‌متر توسط مته دندان پزشکی در آن نقطه از جمجمه ایجاد گردید و پرده سخت شامه با نوک سوزن برداشته شد. سپس یک نوبت تزریق مستقیم 3 میکرولیتر اتیدایوم بروماید 0/01 درصد در سالیین 0/9 درصد با استفاده از سرنگ همیلتون در ناحیه CA1 هیپوکامپ به آرامی و در مدت زمان 4-3 دقیقه جهت القای دملیناسیون تزریق شد. برای اطمینان از انتشار اتیدایوم بروماید سوزن به مدت 4-5 دقیقه در محل تزریق بود. پس از اتمام تزریق پوست سر با بتادین شستشو داده و بخیه شد. موش‌ها در قفس‌های تمیز نگه داشته شده و دوران بهبودی را طی کردند (24). پس از تزریق اتیدایوم بروماید و بهبودی محل جراحی، داروی میریستیرین حل شده در 10 درصد توئین 80 به علاوه سالین به میزان 5 mg/kg به مدت 7 روز به صورت داخل صفاقی تزریق شد (25). اندازه‌گیری حافظه اجتنابی غیرفعال با کمک دستگاه شاتل باکس، حافظه فضایی با دستگاه ماز آبی موریس، میزان تعادل با

1. Tumor necrosis factor alpha

دستگاه روتارود و میزان اضطراب با دستگاه ماز بعلاوه مرتفع انجام شد (26-28).



تصویر شماره 1: نحوه قرارگیری حیوان در دستگاه استریوتکس



تصویر شماره 2: موقعیت نواحی بregma و لامبدا

می شود که یکی روشن و دیگری تاریک می باشد. حیوان مورد مطالعه قادر است تا از طریق دریچه 7 در 6 سانتی متری موجود در این دیواره بین دو طرف محفظه حرکت کند. میله های کف محفظه نیز از خارج به یکدیگر متصل شده اند و هنگام اتصال برق دو قطب مثبت و منفی را تشکیل می دهند. سقف محفظه نیز از درب کشویی ساخته شده است و جعبه کنترل نیز دارای کلیدهایی برای تنظیم مدت زمان، فرکانس و شوک الکتریکی می باشد که از طریق میله های کف شاتل به حیوان اعمال می شود.

#### آزمون ماز آبی موریس

با استفاده از این ماز، موش های صحرایی آموزش می بینند که محل خاصی در فضا را تنها به وسیله راهنماهای دیداری خارج از دستگاه، پیدا کنند. ماز آبی موریس با توجه به توانایی هایش برای تفکیک نقایص حافظه از نقص های حسی - حرکتی - هیجانی و مراحل به خاطر آوری امتیازات بیش تری نسبت به روش های دیگر مطالعه، اساس نور و شیمیایی یادگیری و حافظه دارد.

دستگاه مورد استفاده در این مطالعه از یک حوضچه استوانه ای شکل سیاه رنگ با قطر 136 سانتی متر و ارتفاع 60 سانتی متر تشکیل شده است که تا ارتفاع 25 سانتی متر از آب با دمای  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  پر می شود. حوضچه به طور فرضی به چهار ربع دایره با چهار نقطه به آب اندازی حیوان به نام های شمال (N)، شرق (E)، جنوب (S) و غرب (W) تقسیم می شود. سکویی از جنس پلکسی گلاس با قطر 10 سانتی متر در مرکز ربع دایره فرضی شمال غرب حوضچه قرار داده می شود به نحوی که سکو حدود 1 سانتی متر زیر سطح آب قرار گیرد. سکو پنهان از دید حیوانات قرار دارد و چون هدف از مطالعه، بررسی حافظه مرجع حیوانات است، موقعیت سکو در تمام روزهای آموزش و روز آزمون ثابت می ماند. به دیوارهای اتاق آزمایش سه راهنمای دیداری به اشکال دایره، مربع و مثلث چسبانده شد که حیوان می بایست با استفاده از این علائم موقعیت سکوی پنهان را پیدا کند.

#### آزمون احترازی غیر فعال

شاتل باکس وسیله ای جهت درک و بررسی حافظه و یادگیری برای حیواناتی نظیر موش سوری و یا موش صحرایی می باشد که در آن از نور به عنوان محرک شرطی استفاده می شود. همچنین تحریک الکتریکی نقش محرک غیر شرطی را در این وسیله ایفا می کند. این دستگاه از دو قسمت محفظه اصلی و جعبه کنترل تشکیل شده است. محفظه اصلی به ابعاد 20 در 40 در 20 سانتی متر می باشد که از جنس پلکسی گلاس ساخته شده است و کف آن توسط میله های فلزی به قطر 2 میلی متر و به فاصله  $7/5$  تا 10 سانتی متر پوشانده شده است. این محفظه توسط دیواره ای به دو محفظه مساوی تقسیم

هر موش به مدت 4 روز تحت آموزش قرار گرفت. هر روز شامل یک بلاک و هر بلاک شامل چهار تجربه می‌باشد. در هر تجربه حیوان به طوری که صورتش رو به دیوار حوضچه باشد، از یکی از چهار نقطه شروع در آب رها شد. هر یک از چهار نقطه شروع در هر بلاک یک بار استفاده شد و ترتیب آن به صورت تصادفی تعیین گردید. به هر یک از موش‌ها 90 ثانیه زمان داده شد که با شنا کردن محل سکوی پنهان زیر آب را پیدا کند. اگر موش در کم‌تر از این زمان موفق به یافتن سکو شود، اجازه یافت 30 ثانیه روی سکو بماند و بعد موش از حوضچه خارج گردید. موش‌هایی که در طی زمان 90 ثانیه محل سکو را پیدا نکرده، به آرامی به روی سکو منتقل و به آن‌ها نیز اجازه داده شد قبل از خروج از حوضچه، 30 ثانیه روی آن بمانند. به این ترتیب حیوانات یاد می‌گیرند تنها راه فرار از آب، پناه بردن به سکو است. فاصله زمانی بین هر تجربه در هر بلاک همواره 30 ثانیه است. بلاک آموزشی هر موش در هر یک از روزهای آموزش و روز آزمون در ساعتی مشابه انجام گرفت. حرکات حیوان در ماز توسط دوربینی که به رایانه متصل بود، ضبط شد و این تصاویر بعداً توسط نرم‌افزار Ethovision محصول شرکت Noldus هلند، مورد بررسی و پردازش قرار گرفت.

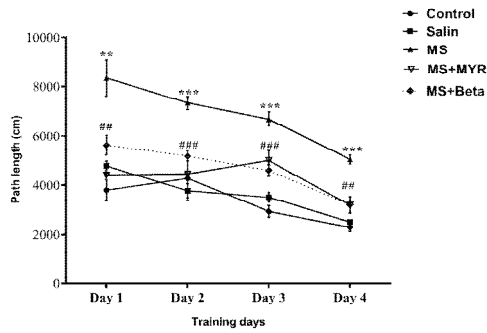
#### آزمون روتارود

دستگاه روتارود به منظور بررسی مقاومت در برابر خستگی در رت یا موش سوری و یا بررسی اثر داروها و مواد مختلف بر هماهنگی حرکتی و همچنین آزمون‌های غربالی برای انتخاب موش‌ها در یک رنج توام فیزیکی، برای به کارگیری در سایر آزمون‌ها، تحت پروتکل‌های مختلفی به کار می‌رود. این دستگاه قابلیت چرخش از سرعت صفر تا 45 دور در دقیقه را دارد. هر زمان که یکی از حیوانات نتوانست تعادل خود را حفظ کند و به پایین سقوط کرد دستگاه به‌طور اتوماتیک آن را تشخیص داده و اطلاعات آن موش را که شامل سرعتی که در آن

موش سقوط کرده است و زمان مقاومت موش و مسافتی را که پیموده در خود ذخیره می‌کند و در پایان آزمون این اطلاعات را در صفحه نمایش خود نشان می‌دهد. پس از پایان کار و کشتن حیوانات با رعایت اصول اخلاقی، بلوک هیپوکامپ جدا، و پس از شستشو با محلول سالین سرد و خشک کردن آن، به سرعت توزین شده و سپس بافت به همراه بافر تریس به مدت 2 دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور 5000 دور در دقیقه هموژنیزه شدند. سوسپانسیون هموژن حاصل از مرحله قبل جدا شد و برای اندازه‌گیری‌های بعدی به میکروتیوب‌ها منتقل، و در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. محلول هموژنیزه شده به مدت 15 دقیقه در سانتریفیوژ با دور 5000 rpm و دمای  $4^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. مقدار  $\text{TNF-}\alpha$  براساس کیت Zellbio آلمان، TAC و MDA هیپوکامپ براساس کیت‌های شرکت طب پژوهان رازی به روش الیزا اندازه‌گیری شدند (29). برای بررسی داده‌ها از نرم افزار پریم نسخه 7 استفاده شد. از آنالیز واریانس تکراری برای آنالیز داده‌های ماز آبی موریس استفاده گردید. داده‌های شاتل باکس، افسردگی و سیتوکین‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون توکی HSD مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (Mean $\pm$ SEM) نشان داده شد و اختلافات آماری با  $P < 0/05$  معنی‌دار تلقی گردید.

#### یافته‌ها

مقایسه میانگین مدت زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان در آزمون ماز آبی در گروه‌های مورد مطالعه میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌داری افزایش یافت (نمودار شماره 1) ( $P < 0/001$ ). این پارامتر در گروه MS+MYR در مقایسه با گروه MS به صورت معنی‌داری کاهش داشت ( $P < 0/01$ ). همچنین در گروه MS+Beta در مقایسه با گروه MS کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0/01$ ).



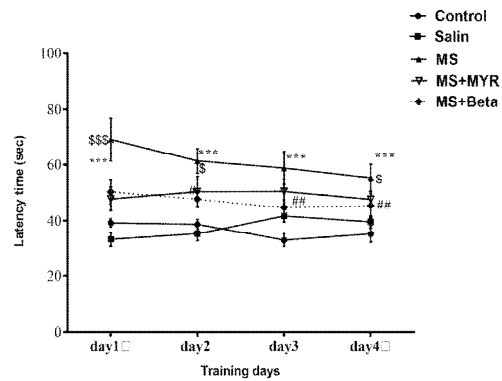
نمودار شماره 2: مقایسه میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در ماز آبی مورس در طی روزهای یادگیری در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس تکراری (گروه کنترل نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریسیتین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون (MS+Beta)، (Mean±SEM, n = 8).

Control در مقایسه با گروه MS:  $P < 0/01$  \*\*

Control در مقایسه با گروه MS+MYR:  $P < 0/001$  \*\*\*

MS+MYR در مقایسه با گروه Control:  $P < 0/01$  ##

MS در مقایسه با گروه MS+MYR:  $p < 0/001$  ###



نمودار شماره 1: مقایسه میانگین مدت زمان شنا کردن موش‌ها جهت یافتن سکوی پنهان در ماز آبی مورس در طی روزهای یادگیری با استفاده از تست آنالیز واریانس تکراری (گروه کنترل نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریسیتین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون (MS+Beta)، (Mean±SEM, n = 8).

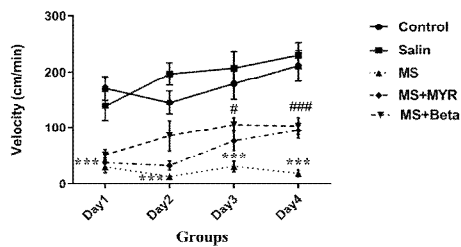
Control در مقایسه با گروه MS+MYR:  $P < 0/001$  \$\$\$

MS+MYR در مقایسه با گروه Control:  $P < 0/05$  \$

Control در مقایسه با گروه MS:  $P < 0/001$  \*\*\*

MS در مقایسه با گروه MS:  $P < 0/05$  #

MS در مقایسه با گروه MS:  $P < 0/01$  ##



نمودار شماره 3: مقایسه میانگین سرعت حرکت برای یافتن سکوی پنهان در ماز آبی مورس در طی روزهای یادگیری در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس تکراری، (گروه کنترل نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریسیتین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون (MS+Beta)، (Mean±SEM, n = 8).

Control در مقایسه با گروه MS:  $P < 0/001$  \*\*\*

MS در مقایسه با گروه Control:  $P < 0/05$  #

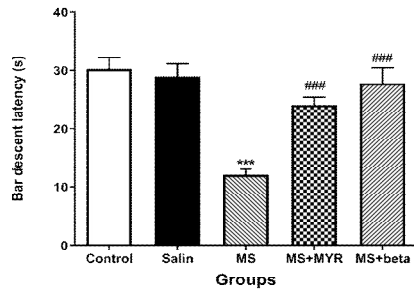
MS در مقایسه با گروه MS:  $P < 0/001$  ###

مقایسه میانگین زمان سپری شده در ربع هدف در روز تست در آزمون ماز آبی در گروه‌های مورد مطالعه

نمودار شماره 4 نشان می‌دهد که میانگین زمان سپری شده در ربع هدف در روز تست در گروه MS در مقایسه

مقایسه میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در آزمون ماز آبی در گروه‌های مورد مطالعه نمودار شماره 2 نشان می‌دهد که میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی داری افزایش داشته است ( $P < 0/001$ ).

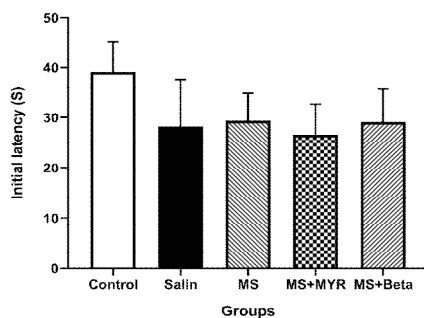
مقایسه میانگین سرعت حرکت برای یافتن سکوی پنهان در آزمون ماز آبی در گروه‌های مورد مطالعه براساس نمودار شماره 3، میانگین سرعت حرکت برای یافتن سکوی پنهان در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی داری کاهش نشان داد ( $P < 0/001$ ). همچنین این پارامتر در گروه MS+MYR در مقایسه با گروه MS به صورت معنی داری افزایش نشان داده است ( $P < 0/01$ ).



نمودار شماره 5: مقایسه مدت زمان ماندن روی میله روتارود در گروه های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس یک طرفه، (گروه کنترل دست نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریستین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون MS+Beta)، (Mean±SEM n = 8)

Control در مقایسه با گروه MS:\*\*\* P < 0/001

MS در مقایسه با گروه MS+MYR:### P < 0/001

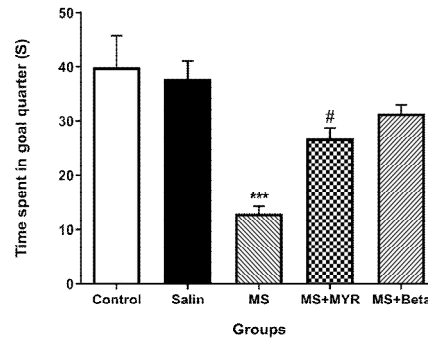


نمودار شماره 6: مقایسه میزان تاخیر اولیه در آزمون اجتنابی غیر فعال در گروه های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس یک طرفه، (گروه کنترل دست نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریستین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون MS+Beta)، (Mean±SEM n = 8)

مقایسه میزان تاخیر در حین عبور در آزمون اجتنابی غیر فعال در گروه های مورد مطالعه

نمودار شماره 7، نتایج مربوط به اندازه گیری تاخیر در حین عبور در آزمون رفتار اجتنابی غیرفعال را در موش های گروه های مختلف نشان می دهد. تاخیر در حین عبور در گروه MS به طور معنی دار و بارزی نسبت به گروه کنترل، کمتر بوده است (P < 0/001). به علاوه این پارامتر در گروه MS+MYR افزایش معنی داری در مقایسه با گروه MS نشان داد (P < 0/01).

با گروه کنترل به صورت معنی داری کاهش داشته است (P < 0/001). همچنین این پارامتر در گروه MS+MYR (P < 0/05) و گروه MS+Beta (P < 0/01) در مقایسه با گروه MS به صورت معنی داری افزایش نشان داد.



نمودار شماره 4: مقایسه میانگین زمان سپری شده در ربع هدف در روز تست در آزمون ماز آبی در گروه های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس یک طرفه، (گروه کنترل دست نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریستین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون MS+Beta)، (Mean±SEM n = 8)

Control در مقایسه با گروه MS:\*\*\* P < 0/001

MS در مقایسه با گروه MS+MYR:# P < 0/05

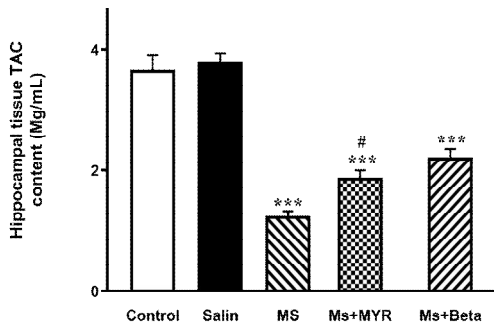
مقایسه مدت زمان ماندن حیوان بر روی روتارود در گروه های مورد مطالعه

نمودار شماره 5 نشان می دهد که مدت زمان ماندن روی میله روتارود در گروه MS در مقایسه با سایر گروه ها کاهش معنی داری دارد (P < 0/001). همچنین این پارامتر در گروه MS+MYR و MS+Beta نسبت به گروه MS افزایش معنی داری نشان داد (P < 0/001).

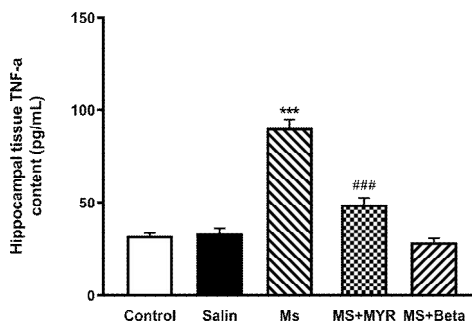
مقایسه میزان تاخیر اولیه در آزمون اجتنابی غیر فعال در گروه های مورد مطالعه

نمودار شماره 6، نتایج مربوط به اندازه گیری تاخیر اولیه در آزمون رفتار اجتنابی غیر فعال در موش های گروه های مورد مطالعه را نشان می دهد. تاخیر اولیه، در گروه های مختلف تفاوت معنی داری نداشت.

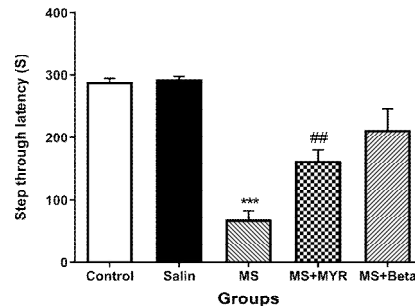
دی آلدئید در گروه ام اس در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی داری افزایش داشته است ( $P < 0/001$ ). همچنین این پارامتر در گروه MS+MYR در مقایسه با گروه ام اس کاهش معنی داری داشت ( $P < 0/001$ ).



نمودار شماره 8: مقایسه میانگین سطح هیپوکمپی TAC در مایع هموزینه هیپوکمپ در گروه های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس یک طرفه، (گروه کنترل دست نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریستین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون MS+Beta)، ( $n = 8$ ) (Mean±SEM) Control:\*\*\* $P < 0/001$  در مقایسه با گروه MS:## $P < 0/05$  در مقایسه با گروه MS



نمودار شماره 9: مقایسه میانگین تغییرات TNF-α در مایع هموزینه هیپوکمپ در گروه های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس یک طرفه، (گروه کنترل دست نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریستین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون MS+Beta)، ( $n = 8$ ) (Mean±SEM) Control:\*\*\* $P < 0/001$  در مقایسه با گروه MS:### $P < 0/001$  در مقایسه با گروه MS



نمودار شماره 7: مقایسه میزان تاخیر در حین عبور در آزمون اجتنابی غیر فعال در گروه های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس یک طرفه، (گروه کنترل دست نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریستین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون MS+Beta)، ( $n = 8$ ) (Mean±SEM) Control:\*\*\* $P < 0/001$  در مقایسه با گروه MS:## $P < 0/01$  در مقایسه با گروه MS

مقایسه میانگین سطح هیپوکمپی TAC در گروه های مورد مطالعه

نتایج حاصل از بررسی نشان می دهد که میانگین سطح هیپوکمپی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری داشته است ( $P < 0/01$ ). این پارامتر در گروه MS+MYR و MS+Beta در مقایسه با گروه MS به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ) (نمودار شماره 8).

مقایسه میانگین سطح هیپوکمپی TNF-α در گروه های مورد مطالعه

نمودار شماره 9 نشان می دهد که میانگین سطح هیپوکمپی فاکتور نکروز بافتی -آلفا در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری داشته است ( $P < 0/001$ ). این پارامتر در گروه MS+MYR در مقایسه با گروه MS به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0/001$ ).

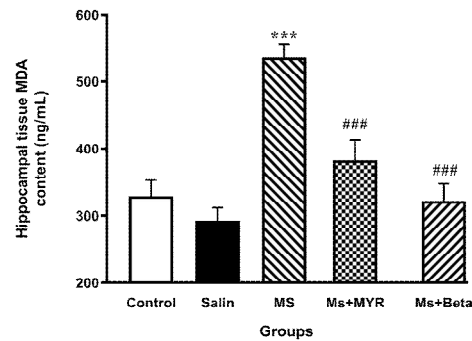
مقایسه میانگین سطح هیپوکمپی MDA در گروه های مورد مطالعه

نمودار شماره 10 نشان می دهد میانگین سطح هیپوکمپمالون

مدت زمان تاخیر رفتن حیوان به اتاق تاریک در آزمون حافظه احترازی غیر فعال در گروه MS+MYR در مقایسه با گروه ام اس به صورت معنی داری افزایش داشت. با توجه به این نکته که نقایص شناختی عمدتاً با نقص دفاع آنتی اکسیدانی همراه است و با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی میریستین، می توان بیان نمود که میریستین می تواند از طریق اثر حفاظتی خود در برابر آسیب اکسیداتیو در بهبود نقص حافظه و یادگیری ایجاد شده در مدل تجربی بیماری ام اس مؤثر واقع گردد. آزمون روتارود، یک ابزار مهم برای ارزیابی عملکرد حرکتی و اختلال عملکرد و همچنین تاثیر مداخلات دارویی در پیشرفت ناتوانی در موش است. مزیت واضح این آزمون بر سیستم های امتیاز دهی دیداری قدیمی این است که یک متغیر عینی ایجاد می کند که می تواند برای اهداف آماری برای اندازه گیری اثرات درمان ها و روش های تجربی در پیشرفت ناتوانی استفاده شود (30).

در مطالعه حاضر در آزمون روتارود، گروه MS+MYR و گروه MS+Beta در مقایسه با گروه ام اس از تعادل حرکتی بیش تری برخوردار بودند و توانستند زمان بیش تری را روی میله روتارود سپری کنند. همچنین در مطالعه حاضر سطح  $TNF-\alpha$  و MDA در هیپوکمپ حیوانات گروه ام اس افزایش یافت. اما میریستین، میانگین سطح هیپوکمپی  $TNF-\alpha$  و MDA را در مقایسه با گروه ام اس کاهش داد. در نتیجه، یافته های این مطالعه نشان می دهد که پراکسیداسیون لیپیدی در هیپوکمپ بیماران مبتلا به ام اس افزایش می یابد. در مطالعه حاضر، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسما در بیماران ام اس نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری نشان داد. میانگین سطح هیپوکمپی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در گروه ام اس و درمان با میریستین در مقایسه با گروه ام اس افزایش معنی داری نشان داد که با هدف مورد انتظار ما مطابقت داشته است.

هیپوکامپ مرکز یادگیری و حافظه در سیستم عصبی مرکزی است. این ناحیه بسیار حساس و آسیب پذیر است



نمودار شماره 10: مقایسه میانگین سطح هیپوکمپی مالون دی الدئید (MDA) در گروه های مورد مطالعه با استفاده از تست آنالیز واریانس یک طرفه، (گروه کنترل دست نخورده Control، گروه جراحی و دریافت کننده سالین Salin، گروه ام اس MS، گروه ام اس دریافت کننده میریستین MS+MYR، گروه ام اس دریافت کننده بتافرون MS+Beta)، (Mean±SEM, n = 8)

\*\*\*: P < 0/001 در مقایسه با گروه Control

###: P < 0/001 در مقایسه با گروه MS

## بحث

تزیق اتیدیوم پروماید به صورت مستقیم به تشکیلات هیپوکمپ (ناحیه CA1) عملکرد یادگیری و حافظه فضایی وابسته به هیپوکمپ را دچار اختلال می کند. در آزمون ماز آبی، میریستین مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان را نسبت به گروه ام اس کاهش داد. همچنین سرعت حرکت حیوان در گروه MS+MYR نسبت به گروه ام اس در طول روزهای آزمایش افزایش معنی داری نشان داده است. به همین ترتیب، در آزمون شاتل باکس که برای ارزیابی حافظه کوتاه مدت مورد استفاده قرار گرفت، از نظر تاخیر اولیه که نشان دهنده توانایی حیوان برای فراگیری رفتار مربوطه است، تفاوت معنی داری بین گروه ها مشاهده نشد. تاخیر در حین عبور که شاخصی از توانایی حیوان برای تثبیت اطلاعات در حافظه و به یادآوری آنها می باشد در گروه MS+MYR یک افزایش معنی دار نسبت به گروه ام اس نشان داد. این تغییرات مشاهده شده در حافظه حیوانات، نشان دهنده تاثیر منفی بیماری بر روی هیپوکامپ است که در تشکیل حافظه موثر است (11).

کبدی کاهش می‌دهد (35، 36). همچنین میریستین در غلظت‌های پایین ( $IC_{50} < 1.5 \mu M$ ) از پراکسیداسیون لیپیدها به دلیل وجود یون آهن در سلول‌های کبد موش جلوگیری می‌کند (37).

ایمونولوژیست‌ها، ام‌اس را به عنوان یک بیماری التهابی خود ایمنی در نظر می‌گیرند که در آن لنفوسیت‌های T اختصاصی برای آنتی‌ژن‌های میلیون یک واکنش التهابی به راه می‌اندازند که نهایتاً منجر به دمیلینه شدن و به دنبال آن آسیب آکسونی می‌شود که عمدتاً بر ماده سفید تأثیر می‌گذارد. با این حال، شواهد نشان می‌دهد که مناطق ماده خاکستری نیز به طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار می‌گیرند. به واسطه سلول‌های T است که این بیماری به عنوان یک بیماری خود ایمن شناخته شده و اولین بار این اطلاعات از مطالعات مدل‌های حیوانی به دست آمده است (11، 24). آسیب ROS به غشای سلولی، DNA، RNA، دستگاه متابولیک، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، و آنزیم‌های نگهداری DNA و پروتئین، منجر به جهش‌های ژنتیکی، اختلال عملکرد میتوکندری، نکرور و آپوپتوز می‌شود (38).

هیپوکسی و رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیش از حد ساختار میتوکندری را تغییر می‌دهند و باعث تضعیف دیپلاریزاسیون غشاء آن می‌شوند. نتایج مطالعه Wang و همکاران نشان داد که میریستین پتانسیل غشای میتوکندری را حفظ می‌کند، فعالیت کاسپاز 9، فعال شدن کاسپاز 3 و میزان آپوپتوز سلول‌ها را کاهش می‌دهد (33). کاسپازها گروهی از آنزیم‌ها هستند که نقش مهمی در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، آپوپتوز و التهاب دارند (39).

مطالعه Meotti و همکاران نشان داد که میریستین به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی قوی در غلظت‌های پایین، پراکسیداسیون لیپیدی را مهار می‌کند. این اقدامات آنتی‌اکسیدانی را می‌توان به‌طور عمده به توانایی تخریب فلاونوئیدها نسبت داد، به خصوص از آن‌جا که فلاونوئیدهای حاوی گروه کاتکول مشابه

و در بیماری‌های عصبی و ایسکمی به شدت تحت تأثیر آسیب اکسیداتیو قرار می‌گیرد. علائم بالینی در بیماران مبتلا به ام‌اس، اختلال در سیستم عصبی مرکزی، شامل نه تنها اختلالات حرکتی، بلکه نقص شناختی نیز می‌شود. اختلالات شناختی عمدتاً یادگیری و حافظه، در 43 تا 70 درصد از بیماران ام‌اس در طول مراحل اولیه دیده شده است (10، 31). یافته‌های مطالعه حاضر از آزمون عصبی رفتاری نشان داد که القای بیماری ام‌اس به طور معنی‌داری حافظه طولانی مدت و کوتاه مدت را کاهش می‌دهد. در مطالعه Omotoso و همکاران بر روی موش‌های مبتلا به ام‌اس، دریافتند که دمی‌لیناسیون هیپوکامپ به پیشرفت اختلالات شناختی و حافظه مرتبط است (11). افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌تواند عملکرد شناختی را کاهش دهد (32).

فلاونوئیدها، که حاوی یک گروه کاتکول هستند، نقش مهمی در استرس اکسیداتیو ایفا می‌کنند (33). میریستین متعلق به زیر گروه فلاونول‌هاست و به‌طور مشخص دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است که اثر قوی تری در مقابل رادیکال‌های آزاد نسبت به دیگر فلاونول‌ها مانند رامنوسید یا کوئرستین دارد (33). گزارش شده است که میریستین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی به عنوان کشف کننده رادیکال‌های آزاد و شلاتور یون‌های فلزی دارد (34). علاوه بر این گزارش شده است که میریستین باعث مهار فعالیت آلدوز ردوکتاز و اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی کم می‌شود و دارای اثر ضد مالاریایی است. دلیل این فعالیت‌ها این است که فلاونوئیدها دارای گروه‌های هیدروکسیل در حلقه B هستند که می‌توانند از طریق تشکیل پیوند هیدروژنی با رادیکال نیمه کینون حلقه B به عنوان کشنده‌های شدید رادیکال عمل کنند (34). همچنین مشاهده گردید که میریستین زیست‌پذیری سلول را بهبود بخشیده، مقدار گلوکاتیون در سلول را افزایش داده است. مقدار نشت لاکتات دی‌هیدروژناز را به محیط اطراف سلول کاهش داده و میزان تشکیل مالون دی‌الدهید را در سلول‌های

را در برابر استرس اکسیداتیو در بیماری‌های عصبی نشان داده است.

مطالعه Meyer و همکاران در سال 2017 نشان داد که میریستین دارای خواص ضد روان پریشی است و سنتز اکسید نیتریک را مهار می‌کند. مهارکننده‌های اکسید نیتروژن خواص ضد افسردگی دارند و ممکن است نوروژن را در جوندگان تحریک کنند. میریستین، علاوه بر اثرات دیگر (مانند مهار پروتئین کیناز C و NO)، باعث افزایش نوروژن هیپوکامپ، با اثرات متعدد و پیچیده در سیستم عصبی مرکزی می‌شود که نشان می‌دهد میریستین می‌تواند یک مولکول جالب برای توسعه داروهای پیشرفته باشد. میریستین با تحریک سلول‌های بنیادی تعداد نورون‌های تازه متولد شده را در منطقه غده گرانولی (subgranular zone) افزایش داد که نشان می‌دهد میریستین ممکن است باعث تمایز سلولی و بلوغ عصبی در ناحیه شکنج دندان‌های هیپوکامپ شود (42). در خصوص اثرات سودمند میریستین بر یادگیری و حافظه در آزمون اجتنابی غیر فعال و آزمون ماز آبی در این بررسی مشخص شد که آنتی‌اکسیدان‌ها به علت خاصیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن توانایی بهبود یادگیری و حافظه را دارند (45). احتمالاً میریستین بخشی از اثرات سودمند خود بر روند یادگیری و حافظه را از این طریق اعمال نموده است. در مطالعه حاضر تجویز میریستین اثرات بهبود دهنده خود بر یادگیری و حافظه را در دوز 5 میلی گرم بر کیلوگرم اعمال نمود. این نتایج نشان می‌دهد میریستین توانسته میزان حافظه اجتنابی غیر فعال و یادگیری فضایی را تا حدودی بهبود بخشد.

همچنین مطالعه حاضر نشان داد که میریستین با کاهش سطح هیپوکمپی  $TNF-\alpha$  و MDA و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما میزان التهاب و پراکسیداسیون لیپیدی را در هیپوکامپ کاهش می‌دهد. تزریق اتیدیوم بروماید به ناحیه CA1 هیپوکامپ منجر به القا بیماری ام اس گردید و تجویز میریستین

سوپراکسید دیسموتاز عمل می‌کنند که نقش مهمی در روند استرس اکسیداتیو دارد (40).

میریستین تولید  $TNF-\alpha$ ، IL-6 را در سلول‌های ماکروفاژ تحریک شده توسط اندوتوکسین که جزء دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی است مهار می‌کند. همچنین میریستین باعث کاهش آسیب حاد ریه در موش‌ها و مهار اندوتوکسین در ماکروفاژها می‌شود. علاوه بر این، این نتایج نشان می‌دهد که  $TNF-\alpha$  یک سیتوکین مهم در پاسخ التهابی است. نقش  $TNF-\alpha$  در کنترل عاطفی در انسان و جوندگان به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه Haji و همکاران، سرکوب  $TNF-\alpha$  در موش‌ها در آزمون ماز به علاوه موجب کاهش رفتار اضطراب و افسردگی شد و تزریق داخل صفاقی  $TNF-\alpha$  موجب رفتار بیماری و همچنین شامل اختلالات خلقی شد (41) به علت آن که اثرات ضد التهابی میریستین در ماکروفاژها مبتنی بر کاهش تولید فاکتور نکروز دهنده تومور ( $TNF-\alpha$ ) است، و همچنین از آن‌جا که  $TNF-\alpha$  موجب فعال شدن کلسیم در نورون‌های حسی می‌شود، بنابراین ممکن است اثر ضد حساسیتی میریستین در التهاب ناشی از  $TNF-\alpha$  به علت اثرات میریستین بر کانال‌های کلسیم باشد (43,42).

نتایج مطالعه حاضر با نتایج برخی مطالعات قبلی که نقش احتمالی رادیکال‌های آزاد در پاتوژنز ام اس را پیشنهاد می‌کند، مطابقت دارد. کاهش TAC در بیماران ام اس ممکن است از این نکته حمایت کند که در واقع، یک رابطه قوی بین اختلال در دفاع آنتی‌اکسیدانی و پاتوژنز ام اس وجود دارد (44).

این نتایج ممکن است به دلیل اثر حفاظتی و ضد التهابی میریستین در برابر آسیب عصبی باشد. این یافته با یافته‌های محققین دیگر که اثر ضد التهابی و حفاظت عصبی میریستین را در مدل‌های حیوانی سایر بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی نشان داده‌اند، مطابقت دارد. همچنین مطالعات متعددی نقش حفاظت عصبی میریستین

## سپاسگزاری

این مطالعه حاصل کار تحقیقاتی مستخرج از پایان‌نامه مصوب به شماره 8003 متعلق به دانشجوی کارشناسی ارشد خانم فاطمه سرگلزایی جوان می‌باشد که از محل معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان تامین اعتبار گردیده است و دارای کد مصوبه کد اخلاق به شماره IR. ZAUMS. REC.1395.184 می‌باشد.

باعث بهبود حافظه، عملکرد حرکتی و کاهش میزان التهاب و پراکسیداسیون لیپیدی در مدل ام اس می‌شود. با این حال، از آن‌جا که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد اثر میریستیرین روی بیماری ام اس انجام نشده است، امید است که با مطالعات بیشتر در این زمینه بتوان گفت که استفاده از میریستیرین برای بهبودی بیماری ام اس موثر است.

## References

1. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120(3): 393-399.
2. Pazokian M, Shaban M, Zakerimoghdam M, Mehran A, Sanglaj B. Effect of aerobic exercises on the level of fatigue in patients with Multiple Sclerosis 3 *JNE* 2013; 2(2): 64-73.
3. Wajda DA, Sosnoff JJ. Cognitive-motor interference in multiple sclerosis: a systematic review of evidence, correlates, and consequences. *BioMed Research International* 2015; 2015: 720856.
4. Magyari M, Sorensen PS. The changing course of multiple sclerosis: rising incidence, change in geographic distribution, disease course, and prognosis. *Curr Opin Neurol* 2019; 32(3): 320-326.
5. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annual Rev Immunol* 2005; 23(1): 683-747.
6. Pashenkov M, Teleshova N, Link H. Inflammation in the central nervous system: the role for dendritic cells. *Brain Pathol* 2003; 13(1): 23-33.
7. Link H. The cytokine storm in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998; 4(1): 12-15.
8. Li R, Rezk A, Ghadiri M, Luessi F, Zipp F, Li H, et al. Dimethyl fumarate treatment mediates an anti-inflammatory shift in B cell subsets of patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 2017; 198(2): 691-698.
9. Cattaneo D, Lamers I, Bertoni R, Feys P, Jonsdottir J. Participation restriction in people with multiple sclerosis: prevalence and correlations with cognitive, walking, balance, and upper limb impairments. *Arch Phys Med Rehabil* 2017; 98(7): 1308-1315.
10. Babri S, Mehrvash F, Mohaddes G, Hatami H, Mirzaie F. Effect of intrahippocampal administration of vitamin C and progesterone on learning in a model of multiple sclerosis in rats. *Adv Pharm Bull* 2015; 5(1): 83-87.
11. Omotoso GO, Gbadamosi IT, Afolabi TT, Abdulwahab AB, Akinlolu AA. Ameliorative effects of Moringa on cuprizone-induced memory decline in rat model of multiple sclerosis. *Anat Cell Biol* 2018; 51(2): 119-127.
12. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 1999.
13. Parsa NZ, Gaidano G, Mukherjee AB, Hauptschein RS, Lenoir G, Dalla-Favera R, et al. Cytogenetic and molecular analysis of

- 6q deletions in Burkitt's lymphoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 9(1): 13-18.
14. Domitrovic R, Rashed K, Cvijanovic O, Vladimir-Knezevic S, Skoda M, Visnic A. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Chem Biol Interact* 2015; 230: 21-29.
  15. Córdova MM, Werner MFdP, Silva MDd, Ruani AP, Pizzolatti MG, Santos ARS. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. *Neurosci Lett* 2011; 495(3): 173-177.
  16. Fernandez SP, Nguyen M, Yow TT, Chu C, Johnston GA, Hanrahan JR, et al. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and naringin exert anxiolytic action in mice. *Neurochem Res* 2009; 34(10): 1867-1875.
  17. Wang YH, Xuan ZH, Tian S, He GR, Du GH. Myricitrin attenuates 6-hydroxydopamine-induced mitochondrial damage and apoptosis in PC12 cells via inhibition of mitochondrial oxidation. *J Funct Foods* 2013; 5(1): 337-345.
  18. Domitrović R, Rashed K, Cvijanović O, Vladimir-Knežević S, Škoda M, Višnić A. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Chem Biol Interact* 2015; 230: 21-29.
  19. Meotti FC, Posser T, Missau FC, Pizzolatti MG, Leal RB, Santos AR. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. *Biochem Pharmacol* 2007 15; 74(6): 924-931.
  20. Feizollah S, Khezri S. Protective effect of testosterone on cognitive deficits induced by ethidium bromide in experimental model of multiple sclerosis. *Tehran Univ Med J* 2015; 73(8): 561-568 (Persian).
  21. Kiasalari Z, Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Hasas MJ. Dose-Dependent Effect of Curcumin on Learning and Memory Deficit in Kainate-Epileptic Rats. *J Ardabil Univ Med Sci* 2014; 14(3): 229-239 (Persian).
  22. Pereira M, Siba I, Chioca L, Correia D, Vital M, Pizzolatti M, et al. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35(7): 1636-1644.
  23. Sun J, Sun G, Cui X, Meng X, Qin M, Sun X. Myricitrin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by counteracting oxidative Stress and Inhibiting Mitochondrial Apoptosis via ERK/P53 Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016; 2016: 609378.
  24. Soleymanzadeh Moghadam S, Khodae Z, Sabokbar A, Goudarzvand M. Evaluating the effect of probiotics on serum Fe+2 and vitamin D3 following ethidium bromide-induced demyelination in hippocampus of rat. *RJMS* 2015; 22(131): 25-33 (Persian).
  25. Pereira M, Siba IP, Chioca LR, Correia D, Vital MABF, Pizzolatti MG, et al. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35(7): 1636-1644.
  26. Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian A. Effect of Royal Jelly on Improving Passive Avoidance Learning and Spatial Learning and Memory in Rats. *JSSU* 2012; 20(2): 211-219 (Persian).
  27. Maurice T. Protection by sigma-1 receptor agonists is synergic with donepezil, but not with memantine, in a mouse model of amyloid-induced memory impairments. *Behav Brain Res* 2016; 296: 270-278.

28. Mokhtari-Dehkordi S, Hojjati Mr, Rouhi L, Rabiei Z, Ali babaei Z. Effect of ethanolic extract of beet roots and leaves on motor coordination in male Wistar rats. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2014; 16(3): 108-115 (Persian).
29. Mirshekar MA, Fanaei H, Keikhaei F, Javan FS. Diosmin improved cognitive deficit and amplified brain electrical activity in the rat model of traumatic brain injury. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 1220-1229.
30. Gilli F, Royce DB, Pachner AR. Measuring Progressive Neurological Disability in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *J Vis Exp* 2016(117): 54616.
31. Kim DY, Hao J, Liu R, Turner G, Shi F-D, Rho JM. Inflammation-mediated memory dysfunction and effects of a ketogenic diet in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One* 2012; 7(5): e35476.
32. Kiasalari Z, Khalili M, Shafiee S, Roghani M. The effect of Vitamin E on learning and memory deficits in intrahippocampal kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. *Indian J Pharmacol* 2016; 48(1): 11.
33. Wang M, Sun GB, Du YY, Tian Y, Liao P, Liu XS, et al. Myricitrin Protects Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation Injury: Involvement of Heat Shock Protein 90. *Front Pharmacol* 2017; 8: 353.
34. Hwang IW, Chung SK. Isolation and Identification of Myricitrin, an Antioxidant Flavonoid, from Daebong Persimmon Peel. *Prev Nutr Food Sci* 2018; 23(4): 341-346.
35. Chobot V, Hadacek F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. *Redox Report* 2011; 16(6): 242-247.
36. Chang H, Mi MT, Gu YY, Yuan JL, Ling WH, Lin H. Effects of flavonoids with different structures on proliferation of leukemia cell line HL-60. *Ai zheng* 2007; 26(12): 1309-1314.
37. Oyama Y, Fuchs PA, Katayama N, Noda K. Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca<sup>2+</sup>-loaded brain neurons. *Brain Res* 1994; 635(1): 125-129.
38. Waslo C, Bourdette D, Gray N, Wright K, Spain R. Lipoic Acid and Other Antioxidants as Therapies for Multiple Sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 2019; 21(6): 26.
39. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 2013; 14(1): 32.
40. Meotti FC, Missau FC, Ferreira J, Pizzolatti MG, Mizuzaki C, Nogueira CW, et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(12): 1707-1713.
41. Haji N, Mandolesi G, Gentile A, Sacchetti L, Fresegna D, Rossi S, et al. TNF- $\alpha$ -mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2012; 237(2): 296-303.
42. Meyer E, Mori MA, Campos AC, Andreatini R, Guimaraes FS, Milani H, et al. Myricitrin induces antidepressant-like effects and facilitates adult neurogenesis in mice. *Behav Brain Res* 2017; 316: 59-65.
43. Meotti FC, Fachineto R, Maffi LC, Missau FC, Pizzolatti MG, Rocha JB, et al. Antinociceptive action of myricitrin: involvement of the K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur J Pharmacol* 2007; 567(3): 198-205.
44. Hadžović-Džuvo A, Lepara O, Valjevac A, Avdagić N, Hasić S, Kiseljaković E, et al.

- Serum total antioxidant capacity in patients with multiple sclerosis. *Bosn J Basic Med Sci* 2011; 11(1): 33-36.
45. Scaini G, Teodorak BP, Jeremias IC, Morais MO, Mina F, Dominguni D, et al. Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease. *Behav Brain Res* 2012; 231(1): 92-96.