بررسی اثر عصاره آبی-الکلی گیاه ختمی بر بهبود اختلالات یادگیری اجتنابی غیر فعال ناشی از تزریق دوطرفه پپتید آمیلوئید بتا در هیپوکامپموش صحرایی نر نژاد ویستار

دلارام اسلیمی اصفهانی، شهربانو عریان و میترا حاتمی

تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکدهٔ علوم زیستی، گروه علوم جانوری

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

بیماری آلزایمر در میان‌سالی شروع‌شده، به‌سرعت پیشرفت می‌کند و منجر به از دست دادن توان ذهنی فرد می‌شود. با توجه به اینکه اثر نوروپروتکتیو گیاه ختمی(*Althea officinalis- Marshmallow*) گزارش‌شده است، در این مطالعه به بررسی اثر عصاره این گیاه در مدل تجربی بیماری آلزایمر در موش صحرایی و تأثیر آن بر بهبود حافظه اجتنابی غیر فعال پرداخته شد. در ابتدا از طریق تزریق دوطرفه داخل بطنی پپتید آمیلوئید بتا(۴۰-۱)، مدل آلزایمری ایجاد شد. در این آزمایش از موش های نر نژاد ویستار با وزن (۲۲۰-۱۸۰)گرم استفاده شد. گروه های کنترل(بدون تزریق)، شم(نرمال سالین)، تجربی (بتاآمیلوئید (۴۰-۱) و چهار گروهی که عصاره گیاه ختمی را با مقادیر ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، به‌صورت داخل صفاقی به مدت ۷ روز قبل و سه هفته بعد از تزریق آمیلوئید بتا دریافت کردند. برای مطالعه رفتاری از دستگاه شاتل باکس استفاده شد و برای مطالعات بافت‌شناسی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و نیسل انجام شد. داده‌ها توسط آنالیز واریانس و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. داده ها نشان داد که تیمار گروه دریافت کننده آمیلوئید بتا با دوز ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم با عصاره گیاه ختمی می‌تواند شاخص‌های رفتاری را در تست حافظه اجتنابی غیر فعال نسبت به گروه شم افزایش دهد ($P<0.001$) و باعث کاهش شدید میزان آسیب بافتی و افزایش تعداد نیسل بادی‌های رنگ‌آمیزی شده ناحیه CA1 هیپوکامپ شود. در این تحقیق احتمالاً کاهش عوارض ایجاد شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت مهار کنندگی آنزیم استیل کولین استرازیترکیبات این گیاه مانندکوئرستین،کامپفرول،تانن،لسیتین،پکتین، استرولوکومارین در ارتباط است.

واژه های کلیدی: بتا آمیلوئید، حافظه اجتنابی غیر فعال، شاتل باکس، مطالعات بافتی، اجسام نیسل

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۸۸۴۸۹۴۰ ، پست الکترونیکی: d.eslimi.i@gmail.com

مقدمه

بیماری آلزایمر (Alzheimer) که در میان سالی شروع‌شده، به‌سرعت پیشرفت می‌کند و منجر به از دست دادن توان ذهنی فرد می‌گردد، به‌عنوان پیری زودرس مغز تعریف می‌شود (۶و۸). این بیماری در نتیجه از دست رفتن تدریجی و غیرقابل‌برگشت نورون‌های قشری خصوصاً در نواحی نئوکورتکس و هیپوکامپ (مرکز اصلی حافظه و یادگیری) ایجاد می‌شود، به همین دلیل اولین و مهم‌ترین نشانه این بیماری فراموشی است (۱۰و۱۵). آلزایمر یک بیماری پیچیده یا چندعاملی نیز محسوب می‌شود، چون هم عوامل ژنتیکی و هم فاکتورهای محیطی در ایجاد آن نقش دارند (۱۲). بیماری آلزایمر شایع‌ترین نوع دمانس است. اتیولوژی و ساز و کار زیستی دقیق آلزایمر ناشناخته است و احتمالاً مانند سایر بیماری‌های مزمن،چند عاملی است (۸)،بنابراین شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری می‌تواند نقش پیشگیرانه در بروز آن داشته باشد(۲۷). عوامل مختلفی در ایجاد بیماری آلزایمر دخیل است که می

توان به افزایش سن، زمینه ژنتیکی، مصرف دخانیات، چاقی و فشارخون، دیس لیپیدمی،دیابت و مقاومت به انسولین، بیماری‌های مانند افسردگی و ترومای سر،رسوب فلزاتی مانند آلومینیوم و آهن، تغییر در ریتم ترشحی مواد میانجی، ترشح بیش‌ازحد آمینواسیدهای تحریکی، فعال شدن فرایندهای التهابی و بالاخره کاهش تعداد و عملکرد نورون‌های کولینرژیکی و استرس اکسیداتیو اشاره کرد (۱۲و۲۲).

بیماری آلزایمر دارای دو مشخصه نوروپاتولوژیکی است که عبارت‌اند از: تجمع خارج سلولی پلاک‌هایآمیلوئید بتا و کلاف‌های رشته‌ای داخل نورونی (۲۳). الیگومرهای آمیلوئید بتا با هایپرفسفریلاسیون پروتئین Tau، ایجاد التهاب و استرس اکسیداتیو، تعامل با رسپتورهای نیکوتینی استیل کولین،مهار پلاستیسیتی سیناپسی، تغییرات سیناپسی مانند کاهش در چگالی انتهای پیش سیناپسی و از بین رفتن سیناپس‌ها و درنهایت مرگ سلولی منجر به پیشرفت بیماری می‌شوند (۱۳و۱۴و۲۰). .به مرور در بیماران آلزایمری مغز دچار آتروفی می‌شود که همراه با بزرگ شدن بطن‌ها است(۸).در این خصوص،هیپوکامپ یکی از اولین نواحی است که در بیماری آلزایمر کاهش نورون در آن رخ می‌دهد و یکی از نواحی مغز می‌باشد که در شکل گیری حافظه نقش مهمی بر عهده دارد. مشاهده شده که تزریق پروتئین آمیلوئید بتا به داخل هیپوکامپ باعث دژنراسیون نورون‌ها،کاهش انتقال و پلاستیسیتی سیناپسی،نقصان یادگیری و کاهش میزان هماهنگی روانی-حرکتی می‌شود(۱۶و۱۹).

همان گونه که ذکر شد، در بیماری آلزایمر مقدار استیل کولین که یکی از میانجی های عصبی مؤثردر حافظه‌است کم می‌شود که دلیل آن آتروفی شدن وتحلیل نورونهای کولینرژیک می‌باشد. مشخص شده که مهار کننده‌هایآنزیم استیل کولین استراز (تجزیه کننده استیل کولین) برای بهبود بیماری آلزایمر مفید هستند (۲۶و۳۱). داروهای مختلفی برای افزایش مقدار استیل کولین پایانه‌های عصبی استفاده می‌شوند از جمله ریواستیگمین(Exelon) ، دانپزیل (Aricept)، و گالانتامین (Razadyne) این داروها سبب بهبود حافظه، عملکرد شناختی و عملکرد اجتماعی بیمار می‌شوند. این داروها تا حدودی رفتارهای غیرطبیعی بیمار را نیز اصلاح می‌کنند. اما مشکل عمده این داروها عوارض گوارشی، تهوع، استفراغ، دل پیچه و اسهال می باشد (۲۱).

امروزه گیاهان داروئی به دلیل عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی موردتوجه قرار گرفته‌اند (۵و۷). گیاه ختمی با نام محلی گل هیرو، نام عربی خطمی، نام انگلیسی *Marshmallow*، نام علمی (*Althea officinalis*) خود را از لغت یونانی آلتو به معنای ترمیم گرفته است (۲و۳). ختمی متعلق به خانوادهMalvaceae می‌باشد (۱۸). یکی از ترکیبات ختمی موسیلاژ آن می‌باشد که در اثر هیدرولیز، قندهای رامنوز، گالاکتوز و اسید گالاکتورونیک ایجاد می شود (۴و۲۴). ترکیبات دیگر، شامل: فلاونوئید، پکتین، قندها، آسپاراژین و کمی استرول می باشند.فلاونوئیدها که آنتی اکسیدان های بر پایه گیاهی هستند به محافظت از سیستم عصبی مرکزی کمک می کنند.همچنین این گیاه دارای خاصیت مهار کنندگی آنزیم استیل کولین استرازاستکه باعث افزایش سطح استیل کولین در مغز می شود(۴و۲۴). بنابراین در این تحقیق به بررسی اثرعصاره گیاه ختمی بر بهبود اختلالات یادگیریاجتنابی غیر فعال ایجاد شده توسط آمیلوئید بتا پرداخته شد.

مواد و روشها

گروه های مورد آزمایش: در این مطالعه موش های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۲۰-۱۸۰ گرم در دمای ۲۲-۲۴درجه سانتی گراد، رطوبت ۴۵-۵۰ درصد و چرخه ی ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی، با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند.برای بررسی مدت زمان تاثیر بتا آمیلوئید (چهارمیکرولیترحاویدومیکروگرم)دو گروه به مدت دو و سه هفته مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی

تاثر عصاره، موش ها مقدار موش‌ها به صورت تصادفی به ۷ گروه (هر گروه ۸ عدد) شامل گروه کنترل، گروه شم (حلال)، گروه آمیلوئید بتا(چهارمیکرولیترحاویدومیکروگرم)، گروه آزمون(دریافت عصاره در مقادیر۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم/کیلوگرم)تقسیم شدند (۱۱).گروه آزمون عصاره را به صورت داخل صفاقی هفت روز قبل از دریافت آمیلوئید بتا و ۲۱ روز بعد از دریافت آمیلوئید بتا،یک روز درمیان دریافت کردند.

تهیه عصاره هیدروالکلی: دانه‌های گیاه ختمیکه از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شده بود با استفاده از آسیاب برقی آسیاب و پودر شد. سپس پودر در اتانول ۷۰٪ به روش ماسراسیون به مدت ۴۸ ساعت خیسانده شد که در طی این مدت توسط دستگاه شیکر به طور مداوم در حال هم زدن و تکان دادن بود. در مرحله بعد توسط کاغذ صافی Watmanصاف شد و با استفاده از دستگاه روتاری (تقطیر در خلاء) حلال عصاره خارج گردید.

آزمون رفتاری یادگیری اجتنابی: ارزیابی حافظه احترازی غیر فعال توسط دستگاه شاتل باکس صورت گرفت.این آزمایش دردو روز پشت سرهم انجام شد (۱۷).

مرحله سازگاری (Adaptaion session): در روز ۲۱ بعد از تزریق دارو پپتید آمیلوئید بتا(۴۰-۱) در حالی که بین اتاقک روشن وتاریک باز بود موش در اتاقک روشن قرار داده می‌شد وبه مدت دو دقیقه به آن اجازه داده می‌شد که با دستگاه آشنا شود واز طریق دریچه ارتباط بین اتاقک تاریک و روشن رابیابد، سپس موش از دستگاه خارج می-شد و به قفس انفرادی منتقل گردید.

مرحله آموزش (Training session) : نیم ساعت بعد از مرحله سازگاری هر موش در اتاقک روشن (در حالیکه در گیوتینی بسته بود) قرار داده شد، ۱۰ ثانیه بعد درب گیوتینی باز می‌شد پس از رفتن موش به اتاقک تاریک بلافاصله درب بسته می‌شد و یک شوک الکتریکی به مدت ۲ ثانیه با شدت جریان ۱ میلی آمپر وبا فرکانس ۵۰ هرتز از میله‌های فلزی به کف پای حیوان اعمال می‌شد و ۲۰ ثانیه بعد حیوان از اتاقک تاریک خارج می‌شد. برای اطمینان از اینکه حیوان یادگرفته که نباید به اتاقک تاریک وارد شود دو دقیه بعد از خارج کردن حیوان از اتاقک تاریک دوباره حیوان را در اتاقک روشن قرار میدادیم و ۲ دقیقه فرصت میدادیم تا ببینیم که آیا حیوان وارد خانه تاریک می‌شود و یا اینکه در اثر شوک اولیه یادگرفته است که نباید وارد اتاقک تاریک شود. اگر حیوان در بار دوم بعد از شوک وارد اتاقک می‌شد دوباره درب گیوتینی را می‌بستیم و دوباره به آن شوک میدادیم این عمل را تا زمانی که حیوان دیگر وارد اتاقک تاریک نشود انجام میدادیم.

مرحله به یاد آوری (Memory retention session): ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش هر موش در اتاقک روشن (درحالی که درب گیوتینی بسته بود) قرار داده شد و ۱۰ ثانیه بعد درب گیوتینی باز می‌شود و زمان تاخیر در ورود به اتاقک تاریک به عنوان Step- through latency time یاداشت گردید. حداکثر زمان برای تاخیر در ورود به جعبه تاریک تا ۶۰۰ ثانیه ثبت گردید، بعد از آنکه موش به قسمت تاریک رفت مدت زمان سپری شده در جعبه تاریک یاداشت می‌گردد که به عنوان زمان سپری شده در اتاق تاریک Total time in dark chamber در ۲۴ ساعت بعد از آموزش و اعمال شوک در نظر گرفته می‌شد.

مطالعات بافت شناسی: بافت هیپوکامپ توسط دو روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین– ائوزین و نیسل مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعات بافتی پس از فیکس کردن نمونه با فرمالین ۱۰٪، مراحل آبگیری و شفاف سازی، نمونه‌ها در داخل پارافین مذاب قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم (Cambrige Medical Instruments, United Kingdom) برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون انجام شد. نمونه‌ها روی لام قرار گرفتند و سپس با هماتوکسیلین– ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. همچنین دراین مطالعه از رنگ

آمیزیکریزل ویوله برای رنگ آمیزی اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورونها استفاده شد که در این روش اجسام نیسل به رنگ بنفش- آبی دیده می شوند. پس از فیکس کردن، غالب گیری و برش توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت ۷ میکرون، نمونه ها روی لام قرار داده شده وپس از شفاف سازی و آبدهی، نمونه ها با کریزل ویوله یک درصد رنگ آمیزی شدند. این رنگ آمیزی معمولابرای شناسایی نکروز در بافت مغز وطناب نخاعی استفاده می‌شود. سپس با استفاده از فتومیکروسکوپ نوری (Zeiss, Germany)و بزرگنمایی 40X بافت هیپوکامپ مورد بررسی قرار گرفت .به منظور شمارش سلولی در یک میلیمتر مربع هیپوکامپ،از نرم‌افزارOlysia bioreport (GmbH version: 5.1.2600.2180) استفاده شد.

روش های آماری: داده‌های بدست آمده توسط نرم افزارSPSS۱۹ و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس و توکی تجزیه تحلیل گردیدند. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Sigma plat رسم شدند.

نتایج

نتایج آزمون رفتاری یادگیری اجتنابی غیر فعال: داده‌ها نشان دهنده تاخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک در موش های دریافت کننده آمیلوئید بتادر مقایسه باگروه کنترل بودند و افزایش مدت زمان ماندن در خانه‌ی تاریک در موش های دریافت کننده آمیلوئید بتادر مقایسه با گروه کنترلنیز مشاهده شد. کاهش معنی داری درتاخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک در موش‌هاسه هفته پس ازدریافت *آمیلوئید بتا*در مقایسه با موش‌هادو هفته پس ازدریافت آمیلوئید بتامشاهده گردید و افزایش معنی داری نیز در مدت زمان ماندن در اتاق تاریک در موش‌هاسه هفته پس ازدریافت آمیلوئید بتادر مقایسه با موش‌هادو هفته پس ازدریافت آمیلوئیدبتادیده شد. به همین دلیل سه هفته پس از تزریق آمیلوئید بتابرای انجام تحقیقات انتخاب شدند.

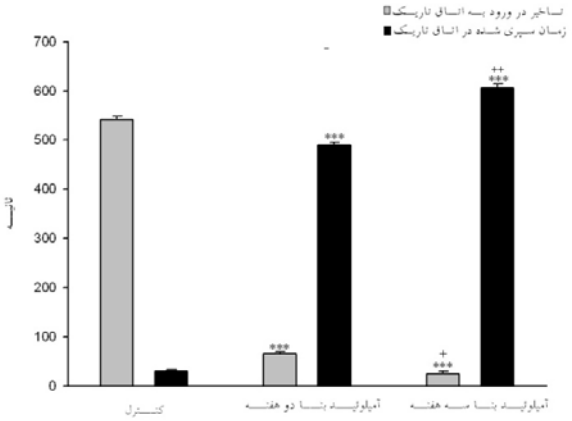
مقایسه تاخیر زمانی ورود به اتاق تاریک نشان داد که گروه تیمار شده با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی- الکلی گیاه ختمی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری تداشت. همچنین گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه ختمی با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، در مقایسه با گروه آمیلوئید بتا تفاوت معنی دار نشان می‌دهند (نمودار۲).

مقایسه مدت زمان ماندن در اتاق تاریک نشان داد که گروه تیمار شده با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی- الکلی گیاه ختمی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری تداشت. همچنین گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه ختمی با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، در مقایسه با گروه آمیلوئید بتا تفاوت معنی دار نشان می‌دهند (نمودار ۳).

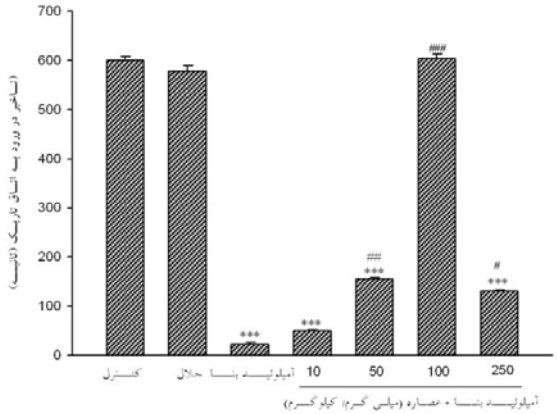
بررسی‌های بافت شناسی: مشاهدات میکروسکوپی در رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین نشان داد که در گروه آمیلوئید بتا، انسجام بافتی که در گروه کنترل وجود دارد، دیده نمی‌شود. همچنین آمورف شدن هسته سلول‌ها و فاصله گرفتن سلول‌ها به دلیل نکروز در ناحیه CA_1 هیپوکامپ قابل رویت است (شکل ۱- B). گروه تیمار شده با دوز (۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه ختمی، نکروز بافتی و تخریب نورونی و در نتیجه کاهش انسجام بافتی در ناحیه‌ی CA_1 هیپوکامپن سبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود که نشان دهنده‌کم اثر بودن این دوز از عصاره در بهبود آسیب بافتی ناشی از Aβ (1-40 است(شکل ۱- C).گروه تیمار شده با دوز (۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل دارای انسجام بافتی بهتری در ناحیه‌ی CA_1 هیپوکامپ است که نشان ازموثر بودن این دوز از عصاره در بهبود آسیب بافتی ناشی از پلاک های آمیلوئید بتا است(شکل ۱- D).گروه تیمار

شده با دوز (۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) مشابه با گروه کنترل دارای انسجام بافتی در ناحیه CA_1 هیپوکامپ است که نشان ازموثر بودن این دوز از عصاره در بهبود آسیب بافتی ناشی از پلاک های آمیلوئیدبتااست(شکل ۱- E). درگروه تیمار شده با دوز (۲۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) در مقایسه با گروه کنترل، تا حدودی کاهش انسجام بافتی در ناحیه CA_1 هیپوکامپ مشاهده شد که البته این کاهش نسبت به گروه تیمار شده با دوز (۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) کمتر است ونشان دهنده تاثیر کمتر این دوز از عصاره در بهبود آسیب بافتی ناشی از Aβ (1-40) است (شکل ۱- F).

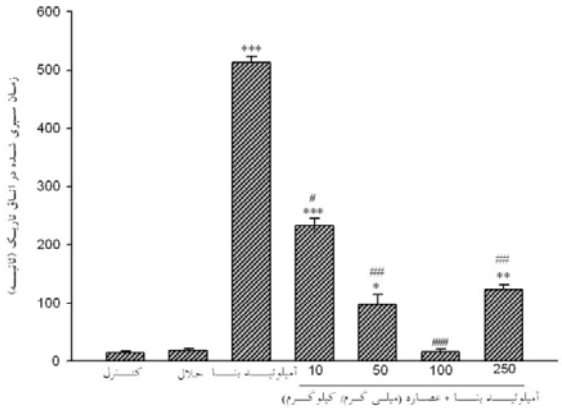
در رنگ آمیزی نیسل گروه کنترل در ناحیه CA_1 هیپوکامپ نورون‌های هرمی با هسته‌های گرد، هستک‌های برجسته و سیتوپلاسم واضح قابل مشاهده‌اند. در گروه آمیلوئید بتا اندازه‌ی نورون‌ها کوچکتر، هسته‌ها چروکیده، هستک‌ها غیر واضح و محدوده‌ی سیتوپلاسمی سلول نیز در بیشتر موارد خوب مشخص نبود و در مجموع تراکم سلولی از گروه کنترل به طور معنی داری بسیار کمتر بود ولی در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم عصاره، آسیب سلول‌ها کمتر شده بود (شکل ۲).



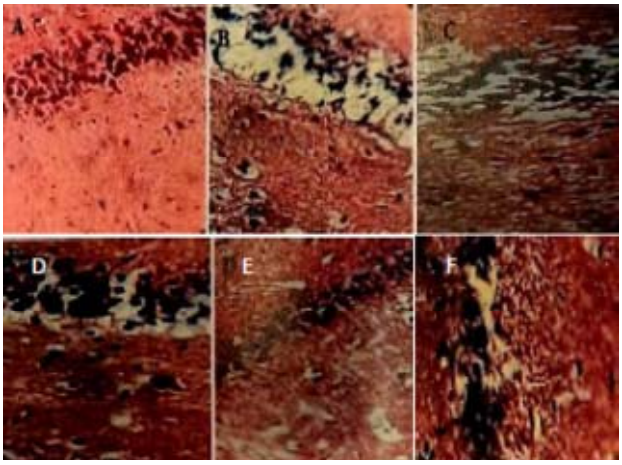
نمودار ۱- مقایسه تاخیر زمانی برای اولین ورود و مدت زمان ماندن در اتاق تاریکدر گروه کنترل ، دو هفته و سه هفته پس از دریافت پپتیدآمیلوئید بتا. $P<0.001^{***}$بین گروه کنترل و گروه های دریافت کننده آمیلوئید بتا، $P<0.001^{++}$, $P<0.05^{+}$ بین دو گروه دریافت کننده آمیلوئید بتا)



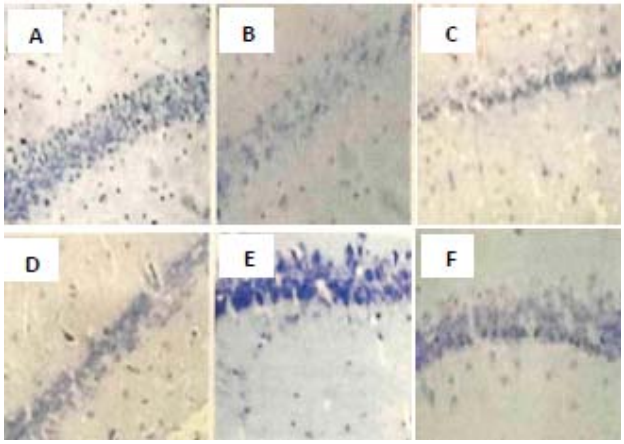
نمودار ۲- مقایسه تاخیر زمانی ورود به اتاق تاریک در گروه‌های مختلف. ($P<0.001^{***}$)تفاوت نسبت به گروه کنترل، ($P<0.001^{###}$) تفاوت نسبت به گروه القائی آلزایمر.



نمودار۳- مقایسه مدت زمان ماندن در اتاق تاریک در گروه‌های مختلف، ($P<0.001^{***}$) تفاوت نسبت به گروه کنترل، ($P<0.001^{###}$) تفاوت نسبت به گروه القائی آلزایمر.

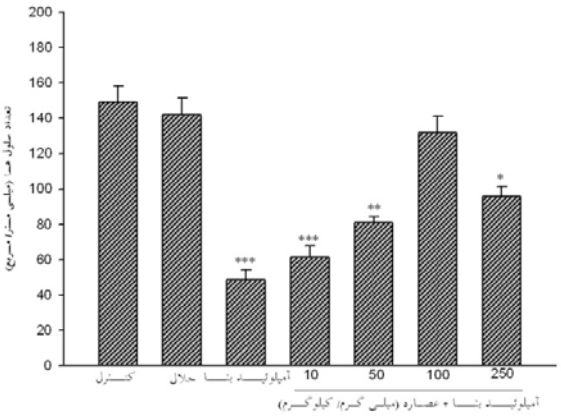


شکل۱)مقایسه فتومیکروگراف‌های رنگامیزی H&Eناحیه‌ی CA_1 هیپوکامپ در گروه کنترل (A)، گروه دریافت کننده‌ی (B)Aβ (1-40)، گروه تیمار شده با دوز(۱۰ میلی‌گرم/کیبوگرم) عصاره (C)، گروه تیمار شده با دوز (۵۰ میلی‌گرم/کیبوگرم) عصاره (D)، گروه تیمار شده با دوز (۱۰۰ میلی‌گرم/کیبوگرم) عصاره (E)، .گروه تیمار شده با دوز (۲۵۰ میلی‌گرم/کیبوگرم) عصاره (F) (بزرگنمایی × ۴۰۰).



شکل۲- مقایسه فتومیکروگراف‌های رنگامیزی نیسل ناحیه CA_1 هیپوکامپ در گروهه‌های مختلف. گروه کنترل(A)، گروه دریافت کننده‌ی (B) Aβ (1-40)، گروه تیمار شده با دوز(mg/kg10) عصاره (C)، گروه تیمار شده با دوز (mg/kg50) عصاره (D)، گروه تیمار شده با دوز (mg/kg 100) عصاره (E)، .گروه تیمار شده با دوز (mg/kg 250) عصاره (F) (بزرگنمایی × ۴۰۰).

نتایج نشان داد که در گروه دریافت کننده پپتید آمیلوئید بتا، تعداد سلول ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داشت. تعداد سلول هادر گروه تیمار شده با دوز (۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) عصاره گیاه ختمی در مقایسه با گروه کنترل نیز تفاوت معنی داری دارد .تعداد سلول هادر گروه تیمار شده با دوز (۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) نسبت به گروه القائی آلزایمر تعداد سلول هادر حال افزایش است.تعداد سلول هادر گروه تیمار شده با دوز (۱۰۰میلی‌گرم/ کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری ندارد ولی نسبت به گروه القائی آلزایمر تعداد سلول هاآن به صورت معنی داری افزایش یافته است.گروه تیمار شده با دوز (۲۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) تفاوت معنی داری در تعداد سلول ها نسبت به گروه آمیلوئید بتا دارد (نمودار ۴).



نمودار۴- تعداد سلولها در ناحیه CA_1 هیپوکامپ در رنگامیزی نیسل در گروه‌های مختلف. ($P<0.001^{***}$، $P<0.01^{**}$) تفاوت با گروه کنترل.

بحث

در این مطالعه به بررسی اثرات گیاه ختمی بر بیماری آلزایمر القاء شده توسط پپتید(1-40) Aβ پرداخته شد. نتایج نشان داد این گیاه با مقدار۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرمباعث کاهش عوارض ایجاد شده و بهبود حافظه اجتنابی غیر فعال گردید.دوز های ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم تاثیر کمتری داشتند. اثر دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم نیز از ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم کمتر یود که شاید به این دلیل است که دوز بالاتر این گیاه با کاهش قتد خون باعث ایجاد اختلال در حافظه تاثیر می‌شود (۳۲). گیاه ختمی یکی از گیاهان بسیار پر کاربرد و پر استفاده می باشد (۲۹). به دلیل داشتن ترکیبات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی وخاصیت مهار کنندگی آنزیم استیل کولین استراز، گزینه مناسبی برای بهبود عوارض ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید می باشد (۴و۲۴). مطالعات بیانگر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطح گلوتاتیون، افزایش استیل کولین استراز، کاهش فعالیت استیل کولین ترانسفراز و سطوح استیل کولین در موش‌های تیمار شده باAβ بود (۲۵). تزریق داخل مغزی پپتید (1-40) Aβباعث کاهش فعالیت کولین‌استیل‌ترانسفراز در قشر مغز و هیپوکامپ می-گردد (۲۶و۳۱). همچنینمحققین کاهش قابل توجهی در میزان نیکوتین و KCLناشی ازکاهش آزادسازی استیل کولین را در هیپوکامپ و قشر مغز و همچنین کاهش ترشح دوپامین در اثر تزریق داخل‌مغزی پپتید (1-40) Aβرا در زیر جسم مخطط مشاهده کردند. در این مطالعه گیاه ختمی نشان داد که با توجه به داشتم خاصیت مهار کنندگی آنزیم استیل کولین استراز، عوارض داروهای آنتی کولین استرازی را نداردر این تحقیق عصاره هفت روز قبل و ۲۱ روز بعد از کاربرد امیلوئید بتا به حیوانات داده شد. مطالعات نشان

می دهند کاریرد عصاره قبل از تزریق امیلوئید بتا یاعث بقای سلولی و همچنین بهبود عوارض ایجاد شده می گردد (۳۳).

مطالعات همچنین نشان می‌دهندکه پپتیدAβ باعث القاء استرس اکسیداتیو شامل پراکسیداسیون لیپیدها و پراکسیداسیون هیدروژن در نورون‌ها می‌شود استرس اکسیداتیو نقش مهمی را در توسعه و پیشرفت بیماری آلزایمر بازی می‌کند (۲۸و۳۰). بنا به این دلیل آنتی-اکسیدانت‌ها مانند یک α-توکوفرول اثر محافظتی در برابر کاهش یادگیری و حافظه القاء شده از طریقAβ را دارند (۱۹). از جمله ترکیبات موجود در گیاه ختمی میتوان به فلاونوئیدهای کوئرستین، کامپفرول، تانن، لسیتین، پکتین، استریول وکومارین اشاره نمود (۴). همانطور که در این تحقیق گفته شد، ختمی حافظه موش‌های آلزایمری شده (AD) را در مطالعه حاضر در دوز(۱۰۰ میلیگرم/ کیلوگرم) بهبود بخشیده است. با توجه به اثر نورودژنریتیو پپتید Aβ(1-40)، برخی از محققان نشانه‌هایی از آسیب سلولی پس از تزریق پپتیدAβ (1-40) در مغز را پیدا کرده‌اند (۱۵). در مطالعه‌ی حاضر در نمونه‌های بافتی تهیه شده با رنگ آمیزی نیسل در گروه مدل به دلیل متلاشی شدن اجسام نیسل یا به عبارتی متلاشی شدن RNA های ریبوزومی و شبکه‌ی آندوپلاسمی زبر،کاهش تراکم نورونی و همچنین کروماتولیز مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی تخریب ناحیه CA_1 هیپوکامپ در گروه دریافت کننده پپتید-1) Aβ (40است (۱) که این نتایج همسو با مطالعات بافتی قبلی از طریق رنگ آمیزی نیسل است. در بررسی بافتی رنگامیزی هماتوکسیلین- ائوزین در موش صحرایی‌های آلزایمری تخریب بافتی و فاصله گرفتن سلول‌ها به دلیل ایجاد نکروز دیده شد که نشان دهنده‌ی اثر تخریبی پپتید Aβ (1-40)در ناحیه‌ی CA_1هیپوکامپ است. محققان نشان دادند که تزریق Aβ (1-40) منجربه از بین رفتن سلول‌های عصبی و آسیب نواحی CA_1 ، CA_3 و DG می‌شود، همچنین گسستگی سلول‌های گرانولی و لایه‌ی سلول‌های هرمی-شکل از طریق رنگ امیزی نیسل به طور واضح مشاهده گردید (۹و۱۵). *Nobakht* و همکارانش در سال ۲۰۱۱ پس از تزریق پپتید Aβ (1-40) از طریق رنگ آمیزی نیسل میزان تراکم نورونی را در ناحیه‌ی CA_1هیپوکامپ و قشر نشان دادند که تراکم نورونی در موش‌های صحرایی آلزایمری به میزان زیادی کاهش یافته بود (۱۵)که با نتایج بدست آمده از این تحقیق هم خوانی دارد و می توان نتیجه گرفتگیاه ختمیباعث کاهش نکروز و فیبروز بافتی شده و شرایط زیست سلول ها را بهبود بخشیده است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان دهنده بهبود اختلالات حافظه فضایی ایجاد شده توسط آمیلوئید بتا توسط عصاره گیاه ختمی است. همچنین بهبود عوارض ایجاد شده بافتی نیز مشاهده می شود. از آنجا که گیاه ختمی دارای ترکیبات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی وخاصیت مهار کنندگی آنزیم استیل کولین استراز می باشد، نیاز به بررسی و مطالعات بیشتر در خصوص تمامی این موارد دارد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی و دانشکده علوم زیستی که امکان انجام این تحقیق را فراهم نموده‌اند، قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Babri S, Amani M, Mohaddes G, Alihemmati A, Ebrahimi H, (2012).Effect of Aggregated β-Amyloid (1-42) on Synaptic Plasticity of Hippocampal Dentate Gyrus Granule Cells in Vivo.`Bioimpacts.2(4):189-94
2. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD, (2002). Herbal Medicines: A Guide for Health Care Professionals. The Pharmaceutical Press. pp: 112 - 13.
3. Bradley P, (2006). British herbal compendium: a handbook of scientific information on widely used plant drugs. British Herbal Medicine Association, pp: 239.

4. Curnow A, Owen SJ,(2016).An Evaluation of Root Phytochemicals Derived from Althea officinalis (Marshmallow) and Astragalus membranaceus as Potential Natural Components of UV Protecting Dermatological Formulations.Oxid Med Cell Longev.2016:7053897
5. EkorM (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. Front Pharmacol. 4: 177.
6. Finch CE, Cohen DM (1997). Aging metabolism and Alzheimer disease: review and hypotheses. Experimental neurology; 143 (1): 82-102.
7. Golshani G, Zarei M, Mohammadi S, (2015). Acute/Chronic Pain Relief: Is Althaea officinalis Essential Oil Effective? Avicenna J Neuro Psych Physio. 2(4): e36586.
8. Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, Luchsinger JA, Ogunniyi A, (2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. Lancet Neurol. 7(10):867.
9. Miguel-Hidalgo J.J, Cacabelos R, (1998). Beta-amyloid (1-40) induced neurodegeneration in the rat hippocampal neurons of the CA1 subfield. Acta Neuropathologica; 95(5): 455–465.
10. Mooney P, Nicell PL, (1992). The importance of exterior environment for Alzheimer residents: effective care and risk management. Healthc Manage Forum. 5(2):23-9.
11. Nabeshima T, Nitta A, (1994).Memory impairment and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid protein in rats.Tohoku J Exp Med. 174(3):241-9.
12. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG, (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. J Neuropathol Exp Neurol. 71(5):362-81.
13. Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T, (1994). Beta-amyloid proteininduced Alzheimer's disease animal model. Neuroscience Letters; 170(1): 63–66.
14. Nitta A, Fukuta T, Hasegawa T, Nabeshima T, (1997). Continuous infusion of beta-amyloid protein into the rat cerebral ventricle induces learning impairment and neuronal and morphological degeneration. Japanese Journal of Pharmacology. 73(1): 51–57.
15. Nobakht M, Hoseini S. M, Mortazavi P, Sohrabi I, (2011). Neuropathological Changes in Brain Cortex and Hippocampus in a Rat Model of Alzheimer's Disease. Iranian Biomedical Journal; 15 (2): 51-85.
16. Ozdemir MB, Erdogan C, Iwasaki K, Watanabe T, Ishikane S, Fujiwara M, (2013).Injection of specific amyloid-beta oligomers ($beta_{1-40}$:$beta_{1-42}$ = 10:1) into rat medial septum impairs memory retention without inducing hippocampal apoptosis.Neurol Res. 35(8):798-803
17. Quillfeldt J A (2006). Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. CNS Drugs 24(2):163-76.
18. Razavi M, (2003). Medicinal plant. Talash Pub. pp: 104 - 5 (Persian).
19. Reddy P. H, (2006). Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: Implications for the development and progression of Alzheimer's disease. Journal of Neurochemistry. 96(1): 1–13.
20. Rojas-Gutierrez E, Muñoz-Arenas G, Treviño S, Espinosa B, Chavez R, Rojas K, Flores G, Díaz A, Guevara J, (2017). Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration.Synapse. 15:359-365.
21. Santoro A, Siviero P, Minicuci N, Bellavista E, Mishto M, Olivieri F, Marchegiani F, Chiamenti AM, Benussi L, Ghidoni R, Nacmias B, Bagnoli S, Ginestroni A, Scarpino O, Feraco E, Gianni W, Cruciani G, Paganelli R, Di Iorio A, Scognamiglio M, Grimaldi LM, Gabelli C, Sorbi S, Binetti G, Crepaldi G, Franceschi C (2010).Effects of donepezil, galantamine and rivastigmine in 938 Italian patients with Alzheimer's disease: a prospective, observational study.CNS Drugs. 24(2):163-76.
22. Salawu FK, Umar JT, Olokoba AB, (2011). Alzheimer's disease: a review of recent developments. Ann Afr Med. 10(2):73-9.
23. Selkoe DJ, (2001). Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein.J Alzheimers Dis. 3(1):75-80
24. Sendker J, Böker I, Lengers I, Brandt S, Jose J, Stark T, Hofmann T, Fink C, Abdel-Aziz H, Hensel A, (2017). Phytochemical Characterization of Low Molecular Weight

Constituents from Marshmallow Roots (Althaea officinalis) and Inhibiting Effects of the Aqueous Extract on Human Hyaluronidase-J Nat Prod.24;80(2):290-297.

25. Shanker G. M, Bloodgood B. L, Townsend M, Walsh D. M, Selkoe D. J, Sabatini B. L, (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA type glutamate receptor dependent signaling pathway. The Journal of Neuroscience; 27 (11): 2866-2875.
26. Stepanichev M, Lazareva N, Tukhbatova G, Salozhin S, Gulyaeva N, (1996). Trensient disturbances in cortextual fear memory induced by AB (25-35) in rats are accompanied by cholinergice dysfunction. Behavioural brain research; 259: 152-157.
27. Thies W, (2011). Stopping a thief and killer: Alzheimer's disease crisis demands greater commitment to research. Alzheimers Dement. 7(2):175-6.
28. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield D. A, (2000).Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. Journal of Structural Biology; 130(2–3): 184–20.
29. Wichtl M, Bisset NG, (2004). Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. CRC Press. pp: 234.
30. Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T, Nabeshima T, (1999). Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: Implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. European Journal of Neuroscience; 11 (1): 83-90.
31. Yamaguchi Y, Kawashima S, (2001). Effects of amyloid beta (25-35) on possive avoidance radial arm maze and choline acetyl transferase activity in the rat. European Journal of pharmacology; 412 (3): 265-272.
32. Yarmohammady P, Hosseini N, Salehi I, Ramazani M, (2015). The Effect of Althaea officinalis.L Root Alcoholic Extract on Blood Sugar Level and Lipid Profiles of Streptozotocin Induced-Diabetic Rats. IJEM, 17(3): 238-250.
33. Yazdian MR, Irani Z, (2015). Evaluation of the Effects of Hydro alcoholic Extract of Althea Root on Experimental Inflammation and Pain Due to Injection of Formalin in Male Rrats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 23(6): 528-38.

Effect of Marshmallow Hydro alcoholic extract on improving passive avoidance memory disorders in male Wistar rats

Eslimi Esfahani D., Oryan Sh. and Hatami M.

Animal Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Background and aim: Alzheimer's disease begins in the Middle Ages, it progresses rapidly and leads to loss of individual mental health. Considering that the neuroprotective effect of Marshmallow (*Althea officinalis*)has been reported, in this study, the effect of the plant on Alzheimer's rat model and its effect on the improvement of passive avoidance memory was investigated. Methods: Alzheimer's was initially induced by intra-ventricular injection of beta- amyloid peptide. In this experiment, male wistar rats (220-180 g) were used. The control group (no injection), sham group (saline injection), experimental group (injection of beta-amyloid (40-1)) and the groups which received marshmallow extract in 10, 50, 100 and 250 milligrams per kilogram of body weight by intraperitoneal injection for 7 days before and three weeks after beta-amyloid injection. Shuttle box was used to study the learning and memory behavior and H & E and Nissl staining were conducted for histological studies. The obtained data were analyzed by SPSS software (ANOVA and Tukey tests).Results: Data showed that treatment with beta-amyloid group at a dose of 100 mg/kg marshmallow extract increased behavioral indices in passive avoidance memory test, compared to sham group($P<0.001$) and reduced the amount of tissue damage and increasesd the number of Nissl bodies in the CA1 hippocampus area. Discussion: In this study, likely reducing the complications, caused by the antioxidant properties and the effect of the inhibitory acetylcholinesterase enzyme of the compounds of this plant, such as quercetin, camphorol, tannin, lecithin, pectin, sterol and coumarin, are related.

Key words: Beta-amyloid, the passive avoidance memory, shuttle box, histological studies, Nissl bodies