

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

دلارام اسلیمی اصفهانی، شهربانو عریان و میترا حاتمی

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

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

چکیده

بیماری آلزایمر در میان‌سالی شروع شده، به سرعت پیشرفت می‌کند و منجر به از دست دادن توان ذهنی فرد می‌شود. با توجه به اینکه اثر نوروپروتکتیو گیاه ختمی (*Althea officinalis*- Marshmallow) گزارش شده 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 موش‌های نر نژاد ویستار با وزن (۲۲۰-۱۸۰) گرم استفاده شد. گروه‌های کنترل (بدون تزریق)، شم (نرمال سالین)، تجربی (بتا آمیلوئید (۴۰-۱) و چهار گروهی که عصاره گیاه ختمی را با مقادیر ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، به صورت 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. داده‌ها نشان داد که تیمار گروه دریافت‌کننده آمیلوئید بتا با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم 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 مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استرازیتزکیبات این گیاه مانند کوئرستین، کامپفرول، تانن، لسیتین، پکتین، استرولوکومارین در ارتباط است.

واژه‌های 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 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، چندعاملی است (۸)، بنابراین شناسایی عوامل ایجادکننده بیماری می‌تواند نقش پیشگیرانه در بروز آن داشته باشد (۲۷). عوامل مختلفی در ایجاد بیماری آلزایمر دخیل است که می

بیماری آلزایمر (Alzheimer) که در میان‌سالی شروع شده، به سرعت پیشرفت می‌کند و منجر به از دست دادن توان ذهنی فرد می‌گردد، به عنوان پیری زودرس مغز تعریف می‌شود (۸۶). این بیماری در نتیجه از دست رفتن تدریجی و غیرقابل برگشت 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 (۱۵ و ۱۰). آلزایمر یک

برای افزایش مقدار استیل کولین پایانه‌های عصبی استفاده می‌شوند از جمله ریواستیگمین (Exelon)، دانپزیل (Aricept)، و گالاتامین (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 می‌باشد (۲۱).

امروزه گیاهان دارویی به دلیل عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷ و ۵). 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 (۲ و ۳). ختمی متعلق به خانواده *Malvaceae* می‌باشد (۱۸). یکی از ترکیبات ختمی موسیلاژ آن می‌باشد که در اثر هیدرولیز، قندهای رامنوز، گالاکتوز و اسید گالاکتورونیک ایجاد می‌شود (۴ و ۲۴). ترکیبات دیگر، شامل: فلاونوئید، پکتین، قندها، آسپاراژین و کمی استرول می‌باشند. فلاونوئیدها که آنتی‌اکسیدان‌های بر پایه گیاهی هستند به محافظت از سیستم عصبی مرکزی کمک می‌کنند. همچنین این گیاه دارای خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استرازاستکه باعث افزایش سطح استیل کولین در مغز می‌شود (۴ و ۲۴). بنابراین در این تحقیق به بررسی اثر عصاره گیاه ختمی بر بهبود اختلالات یادگیری اجنبی غیر فعال ایجاد شده توسط آمیلوئید بتا پرداخته شد.

مواد و روشها

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

توان به افزایش سن، زمینه ژنتیکی، مصرف دخانیات، چاقی و فشارخون، دیس لیپیدی، 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 کولینرژیک و استرس اکسیداتیو اشاره کرد (۱۲ و ۲۲).

بیماری آلزایمر دارای دو مشخصه نوروپاتولوژیکی است که عبارت‌اند از: تجمع خارج سلولی پلاک‌های آمیلوئید 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 پلاستیسیته سیناپسی، تغییرات سیناپسی مانند کاهش در چگالی انتهای پیش سیناپسی و از بین رفتن سیناپس‌ها و در نهایت مرگ سلولی منجر به پیشرفت بیماری می‌شوند (۱۳ و ۱۴ و ۲۰). 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 شکل‌گیری حافظه نقش مهمی بر عهده دارد. مشاهده شده که تزریق پروتئین آمیلوئید بتا به داخل هیپوکامپ باعث دژنراسیون نورون‌ها، کاهش انتقال و پلاستیسیته سیناپسی، نقصان یادگیری و کاهش میزان هماهنگی روانی- حرکتی می‌شود (۱۶ و ۱۹).

همان‌گونه که ذکر شد، در بیماری آلزایمر مقدار استیل کولین که یکی از میانجی‌های عصبی مؤثر در حافظه است کم می‌شود که دلیل آن آتروفی شدن و تحلیل نورونهای کولینرژیک می‌باشد. مشخص شده که مهارکننده‌های آنزیم استیل کولین استراز (تجزیه‌کننده استیل کولین) برای بهبود بیماری آلزایمر مفید هستند (۲۶ و ۳۱). داروهای مختلفی

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 دقیقه 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 یادداشت 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 یادداشت 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- اتوزین و نیسل مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعات بافتی پس از فیکس کردن نمونه با فرمالین ۱۰٪، مراحل آگیری و شفاف سازی، نمونه‌ها در داخل پارافین مذاب قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم (Cambridge Medical Instruments, United Kingdom) برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون انجام شد. نمونه‌ها روی لام قرار گرفتند و سپس با هماتوکسیلین- اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. همچنین در این مطالعه از رنگ

تاثیر عصاره، موش‌ها مقدار موش‌ها به صورت تصادفی به ۷ گروه (هر گروه ۸ عدد) شامل گروه کنترل، گروه شم (حلال)، گروه آمیلوئید (چهارمیکرولیتر حاوی دو میکروگرم)، گروه آزمون (دریافت عصاره در مقادیر ۱۰، 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 در میان 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 Watman صاف 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 در دو 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 و تاریک باز بود موش در اتاقک روشن قرار داده می‌شد و به مدت دو دقیقه به آن اجازه داده می‌شد که با دستگاه آشنا شود و از طریق دریچه ارتباط بین اتاقک تاریک و روشن رایباید، سپس موش از دستگاه خارج می‌شد 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

شد. به همین دلیل سه هفته پس از تزریق آمیلوئید بتا برای 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 معنی‌داری نداشت. 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 معنی‌دار نشان می‌دهند (نمودار ۲).

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 معنی‌داری نداشت. 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 معنی‌دار نشان می‌دهند (نمودار ۳).

بررسی‌های بافت‌شناسی: 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 CA₁ 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 CA₁ هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود که نشان دهنده کم‌اثر بودن این دوز از عصاره در بهبود آسیب بافتی ناشی از CA₁ (Aβ) است (شکل ۱- C). گروه تیمار شده با دوز (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل دارای انسجام بافتی بهتری در ناحیه‌ی CA₁ هیپوکامپ است که نشان از موثر بودن این دوز از عصاره در بهبود آسیب بافتی ناشی از پلاک‌های آمیلوئید بتا است (شکل ۱- D). گروه تیمار

آمیزیکریزل ویوله برای رنگ آمیزی اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورونها استفاده شد که در این روش اجسام نیسل به رنگ بنفش-آبی دیده می‌شوند. پس از فیکس کردن، غالب گیری و برش توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت ۷ میکرون، نمونه‌ها روی لام قرار داده شده و پس از شفاف سازی و آبدهی، نمونه‌ها با کریزل ویوله یک درصد رنگ آمیزی شدند. این رنگ آمیزی معمولاً برای شناسایی نکروز در بافت مغز و طناب 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 نرم‌افزار Olysia bioreport (GmbH version: 5.1.2600.2180) استفاده شد.

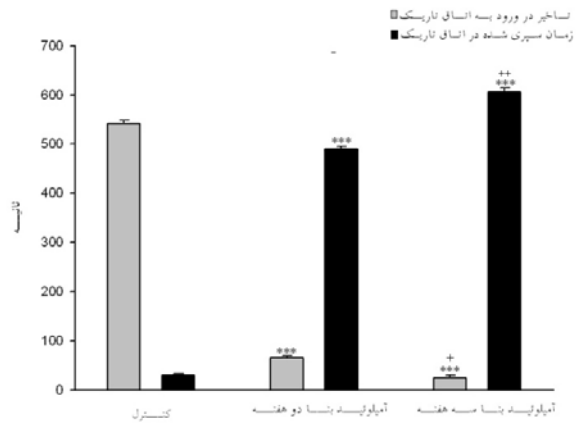
روش‌های آماری: داده‌های بدست آمده توسط نرم افزار SPSS ۱۹ و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس و توکی تجزیه تحلیل گردیدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Sigma plat رسم شدند.

نتایج

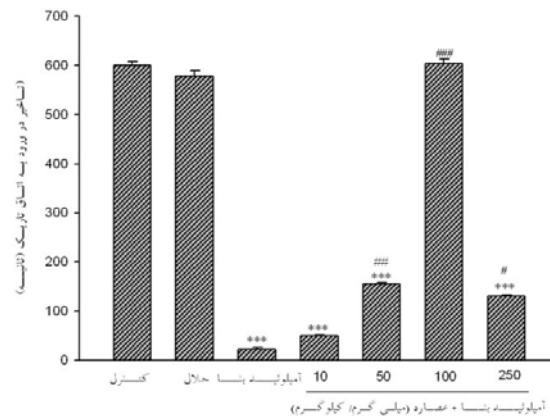
نتایج آزمون رفتاری یادگیری اجتنابی غیر فعال: داده‌ها نشان دهنده تاخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک در موش‌های دریافت‌کننده آمیلوئید بتا در مقایسه با گروه کنترل بودند و افزایش مدت زمان ماندن در خانه‌ی تاریک در موش‌های دریافت‌کننده آمیلوئید بتا در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. کاهش معنی‌داری در تاخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک در موش‌ها سه هفته پس از دریافت آمیلوئید بتا در مقایسه با موش‌ها دو هفته پس از دریافت آمیلوئید بتا مشاهده گردید و افزایش معنی‌داری نیز در مدت زمان ماندن در اتاق تاریک در موش‌ها سه هفته پس از دریافت آمیلوئید بتا در مقایسه با موش‌ها دو هفته پس از دریافت آمیلوئید بتا دیده

در رنگ آمیزی نیسل گروه کنترل در ناحیه CA₁ 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).

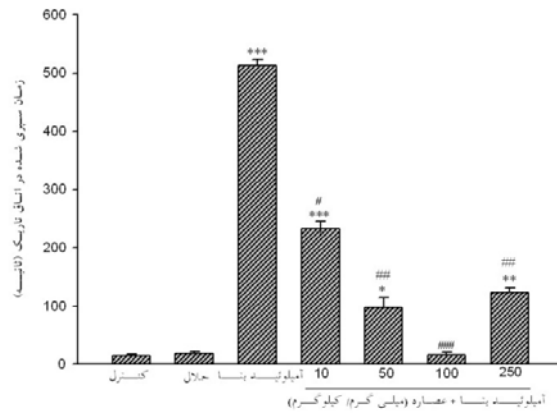
شده با دوز (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) مشابه با گروه کنترل دارای انسجام بافتی در ناحیه CA₁ هیپوکامپ است که نشان از موثر بودن این دوز از عصاره در بهبود آسیب بافتی ناشی از پلاک‌های آمیلوئید بتا است (شکل ۱- E). در گروه تیمار شده با دوز (۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) در مقایسه با گروه کنترل، تا حدودی کاهش انسجام بافتی در ناحیه CA₁ هیپوکامپ مشاهده شد که البته این کاهش نسبت به گروه تیمار شده با دوز (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) کمتر است و نشان دهنده تاثیر کمتر این دوز از عصاره در بهبود آسیب بافتی ناشی از A β (1-40) است (شکل ۱- F).



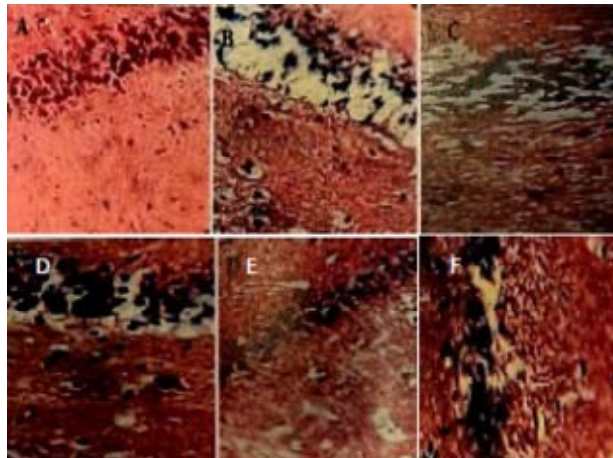
نمودار ۱- مقایسه تاخیر زمانی برای اولین ورود و مدت زمان ماندن در اتاق تاریک در گروه کنترل، دو هفته و سه هفته پس از دریافت پیپتید آمیلوئید بتا. $P < 0.001^{***}$ بین گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده آمیلوئید بتا، $P < 0.001^{++}$ ، $P < 0.05^{+}$ بین دو گروه دریافت کننده آمیلوئید بتا.



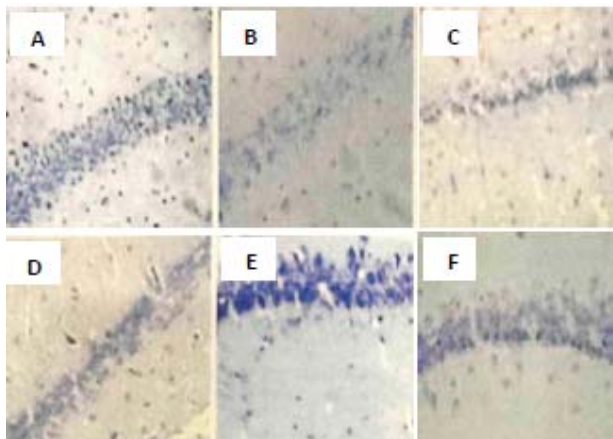
نمودار ۲- مقایسه تاخیر زمانی ورود به اتاق تاریک در گروه‌های مختلف. $P < 0.001^{***}$ تفاوت نسبت به گروه کنترل، $P < 0.001^{####}$ تفاوت نسبت به گروه القائی آلزایمر.



نمودار ۳- مقایسه مدت زمان ماندن در اتاق تاربیگ در گروه‌های مختلف، ($P < 0.001^{***}$) تفاوت نسبت به گروه کنترل، ($P < 0.001^{###}$) تفاوت نسبت به گروه القایی آزایمر.



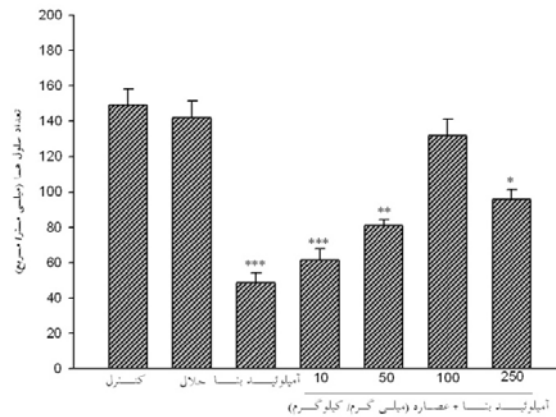
شکل ۱) مقایسه فتومیکروگراف‌های رنگامیزی H&E ناحیه CA₁ هیپوکامپ در گروه کنترل (A)، گروه دریافت‌کننده 1-40 μg/kg (B)، گروه تیمار شده با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (C)، گروه تیمار شده با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (D)، گروه تیمار شده با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (E)، گروه تیمار شده با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (F) (بزرگنمایی × ۴۰۰).



شکل ۲- مقایسه فتومیکروگراف‌های رنگامیزی نیسل ناحیه CA₁ هیپوکامپ در گروه‌های مختلف. گروه کنترل (A)، گروه دریافت‌کننده 1-40 μg/kg (B)، گروه تیمار شده با دوز ۱۰ (mg/kg) (C)، گروه تیمار شده با دوز ۵۰ (mg/kg) (D)، گروه تیمار شده با دوز ۱۰۰ (mg/kg) (E)، گروه تیمار شده با دوز ۲۵۰ (mg/kg) (F) (بزرگنمایی × ۴۰۰).

سلول هادر گروه تیمار شده با دوز (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد ولی نسبت به گروه القائی آلزایمر تعداد سلول هآآن به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. گروه تیمار شده با دوز (۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) تفاوت معنی‌داری در تعداد سلول‌ها نسبت به گروه آمیلوئید بتا دارد (نمودار ۴).

نتایج نشان داد که در گروه دریافت‌کننده پپتید آمیلوئید بتا، تعداد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. تعداد سلول هادر گروه تیمار شده با دوز (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) عصاره گیاه ختمی در مقایسه با گروه کنترل نیز تفاوت معنی‌داری دارد. تعداد سلول هادر گروه تیمار شده با دوز (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) نسبت به گروه القائی آلزایمر تعداد سلول هادر حال افزایش است. تعداد



نمودار ۴- تعداد سلول‌ها در ناحیه CA₁ هیپوکامپ در رنگامیزی نیسل در گروه‌های مختلف. ($P < 0.001$ ***, $P < 0.01$ **). تفاوت با گروه کنترل.

بتا آمیلوئید می‌باشد (۲۴ و ۴). مطالعات بیانگر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطح گلوکوتانین، افزایش استیل کولین استراز، کاهش فعالیت استیل کولین ترانسفراز و سطوح استیل کولین در موش‌های تیمار شده با $A\beta$ بود (۲۵). تزریق داخل مغزی پپتید $A\beta$ (1-40) باعث کاهش فعالیت کولین‌ترانسفراز در قشر مغز و هیپوکامپ می‌گردد (۲۶ و ۳۱). همچنین محققین کاهش قابل توجهی در میزان نیکوتین و KCL ناشی از کاهش آزادسازی استیل کولین را در هیپوکامپ و قشر مغز و همچنین کاهش ترشح دوپامین در اثر تزریق داخل مغزی پپتید $A\beta$ (1-40) را در زیر جسم مخطط مشاهده کردند. در این مطالعه گیاه ختمی نشان داد که با توجه به داشتن خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز، عوارض داروهای آنتی کولین استرازی را ندارد در این تحقیق عصاره هفت روز قبل و ۲۱ روز بعد از کاربرد آمیلوئید بتا به حیوانات داده شد. مطالعات نشان

بحث

در این مطالعه به بررسی اثرات گیاه ختمی بر بیماری آلزایمر القاء شده توسط پپتید $A\beta$ (1-40) پرداخته شد. نتایج نشان داد این گیاه با مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث کاهش عوارض ایجاد شده و بهبود حافظه اجتنابی غیر فعال گردید. دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تاثیر کمتری داشتند. اثر دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نیز از ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کمتر بود که شاید به این دلیل است که دوز بالاتر این گیاه با کاهش قند خون باعث ایجاد اختلال در حافظه تاثیر می‌شود (۳۲). گیاه ختمی یکی از گیاهان بسیار پر کاربرد و پر استفاده می‌باشد (۲۹). به دلیل داشتن ترکیبات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز، گزینه مناسبی برای بهبود عوارض ایجاد شده توسط

تخریب بافتی و فاصله گرفتن سلول‌ها به دلیل ایجاد نکروز دیده شد که نشان دهنده‌ی اثر تخریبی پپتید $A\beta(1-40)$ در ناحیه‌ی CA_1 هیپوکامپ است. محققان نشان دادند که تزریق $A\beta(1-40)$ منجر به 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 آمیزی نیسل به طور واضح مشاهده گردید (۹ و ۱۵). *Nobakht* و همکارانش در سال ۲۰۱۱ پس از تزریق پپتید $A\beta(1-40)$ از طریق رنگ آمیزی نیسل میزان تراکم نورونی را در ناحیه‌ی CA_1 هیپوکامپ و قشر نشان دادند که تراکم نورونی در موش‌های صحرائی آلزایمری به میزان زیادی کاهش یافته بود (۱۵) که با نتایج بدست آمده از این تحقیق هم خوانی دارد و می‌توان نتیجه گرفتگیاه ختمی باعث کاهش نکروز و فیبروز بافتی شده و شرایط زیست سلول‌ها را بهبود بخشیده است.

نتیجه‌گیری

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 می‌شود. از آنجا که گیاه ختمی دارای ترکیبات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد، 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.

می‌دهند کاربرد عصاره قبل از تزریق آمیلوئید بتا باعث بقای سلولی و همچنین بهبود عوارض ایجاد شده می‌گردد (۳۳).

مطالعات همچنین نشان می‌دهند که پپتید $A\beta$ 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 (۲۸ و ۳۰). بنا به این دلیل آنتی-اکسیدانت‌ها مانند یک α -توکوفرول اثر محافظتی در برابر کاهش یادگیری و حافظه القاء شده از طریق $A\beta$ را دارند (۱۹). از جمله ترکیبات موجود در گیاه ختمی میتوان به فلاونوئیدهای کوئرستین، کامپفرول، تانن، لسیتین، پکتین، استریول و کومارین 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 نورودژنراتیو پپتید $A\beta(1-40)$ ، برخی از محققان نشانه‌هایی از آسیب سلولی پس از تزریق پپتید $A\beta(1-40)$ 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 $A\beta(1-40)$ است (۱) که این نتایج همسو با مطالعات بافتی قبلی از طریق رنگ آمیزی نیسل است. در بررسی بافتی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اؤزین در موش صحرائی‌های آلزایمری

منابع

- 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
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD, (2002). *Herbal Medicines: A Guide for Health Care Professionals*. The Pharmaceutical Press. pp: 112 - 13.
- 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. Ekor M (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. *Health 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, Kovari 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 protein-induced 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 (beta₁₋₄₀:beta₁₋₄₂ = 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, Diaz 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). Transient disturbances in contextual fear memory induced by AB (25-35) in rats are accompanied by cholinergic 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 passive 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 increased 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