دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وششم– شماره ۱۳۹
اسفند ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۴
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۷

اثر عصاره آبی الکلی سداب بر روی شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آنزیم کولین استراز در بافت مغز موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم پر کلسترول

نویسندگان: الهام بلوکی[۱]، غلامعلی نادری[۲*]، مهرداد روغنی[۳]، الهام زاهدی[٤]

۱. دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران ، ایران
۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران ، ایران
۳. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
٤. دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران ، ایران

*نویسنده مسئول: غلامعلی نادری E-mail: naderi@shahed.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: بروز بیماریهای قلبی و عروقی و استرس اکسیداتیو با رژیم پر کلسترول ارتباط مستقیم دارند.گیاه سداب از گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی ایران و ملل مختلف بوده و با اثرات آنتی اکسیدانی خود در درمان بسیاری از بیماریها کاربرد داشته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه سداب بر روی آنزیم کولین استراز و شاخص های استرس اکسیداتیو در بافت مغز موش های دریافت کننده رژیم پرکلسترول می باشد.

مواد و روش‌ها : در این مطالعه تجربی، ۲۸ موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه کنترل ،کنترل ودریافت کننده سداب ، رژیم غذایی پر کلسترول و رژیم غذایی پر کلسترول و دریافت‌کننده سداب تقسیم شدند. برای مدت ۸ هفته، گروه های کنترل و کنترل و سداب، غذای معمولی و دو گروه دیگر غذای پر کلسترول (کلسترول ۱٪ و اسیدکولیک ۰/۲۵ ٪) را دریافت کردند. پس از ۸ هفته گروه‌های تحت درمان، با ۱۰۰mg/kg عصاره سداب به صورت داخل صفاقی به مدت ۳ هفته درمان شدند. در پایان کار، موش ها با اتر بیهوش شده و مغز آنها خارج و پس از تهیه هموژنه بافتی، فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز و سنجش استرس اکسیداتیو (مقادیر گونه های فعال اکسیژن (ROS)، گلوتاتیون و فعالیت کاتالاز) با استفاده از کیت های اختصاصی انجام شد.

نتایج: هشت هفته رژیم پرکلسترول موجب کاهش میزان گلوتاتیون و کاهش فعالیت آنزیم های بوتیریل کولین استراز و کاتالاز و افزایش ROS در بافت هیپوکمپ موش های صحرایی گردید. درمان سه هفته‌ای با عصاره هیدروالکلی سداب موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز هیپوکمپ موشهای تحت درمان در مقایسه با گروه پرچرب شد. به علاوه فعالیت کاتالاز و میزان گلوتاتیون احیا در گروه پرچرب تحت درمان در مقایسه با گروه پرچرب افزایش پیدا نمود که معنی دار نبود.همچنین تغییرات میزان ROS در گروههای مختلف معنی دار نبود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد عصاره هیدروالکلی سداب موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز هیپوکمپ موش های تحت درمان در مقایسه با گروه پرچرب شده است. ضمنا عصاره سداب سطوح آنتی اکسیدانی و دفاع در برابر استرس اکسیداتیو در موش‌های دریافت کننده رژیم پرکلسترول ر اتغییر داده است اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود.

واژگان کلیدی: رژیم پر کلسترول ، سداب، استرس اکسیداتیو، هیپوکمپ، بوتیریل کولین استراز

مقدمه

بالا بودن سطح کلسترول سرم و غیر نرمال بودن سطح سرمی سایر لیپیدها از ریسک فاکتورهای عمده آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشند و هایپرکلسترولمی نیز باعث استرس اکسیداتیو می‌شود (۱). به هم خوردن تعادل ذخایر و وزن بدن به عنوان یک وضعیت افزایش التهاب و استرس اکسیداتیو تشخیص داده شده است (۲). افزایش استرس اکسیداتیو در بدن تبعاتی دارد از جمله سبب افزایش فرسایش تلومر می‌شود و تلومر کوتاه با افزایش شاخص حجم بدن و افزایش سلول چربی ارتباط دارد (۳). تجمع بیش از حد چربی و استرس اکسیداتیو به بیماری‌زایی کبد چرب کمک می‌کند (٤). تولیدات لیپولیز تری‌گلیسریدها باعث آسیب لیپوتوکسیک در اندوتلیال مویرگ‌های مغزی به‌وسیله افزایش تولید رادیکال‌های سوپراکسید و فعالیت استرس اکسیداتیو و مسیرهای آپوپتوز می‌شود (۵). میزان تولید استرس اکسیداتیو در عروق در موش‌های تحت رژیم غذایی پرچرب افزایش یافته که این افزایش در انسان و در افراد سالخورده بیشتر به چشم می‌خورد (٦). چاقی اثرات وخیمی بر روی مغز و عملکرد شناختی در جمعیت سالخورده دارد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که التهاب نورونی و استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ موش‌ها به نواقص شناختی منجر می‌شود (۷).

میتوکندری به عنوان منبع عمده‌ی استرس اکسیداتیو مطرح می‌شود، افزایش مزمن میزان تولید (Reactive Oxygen Species (ROS با میزان آسیب در DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها همراه است (۸). هایپر لیپیدمی با تحریک سیتوکروم C450 باعث تحریک بیشتر تولید ROS، التهاب و آپوپتوز نورونی می‌شود (۹). برای پی بردن به عملکرد طبیعی مغز شاخص‌های مختلفی قابل‌اندازه‌گیری می‌باشند. افزایش ROS ممکن است به طور چشمگیری به ساختار سلولی آسیب وارد کند (۱۰). آنزیم کولین استراز، استیل کولین را تجزیه می‌کند و با جلوگیری از تجمع استیل کولین و تحریک بیش از حد عضلات و اعصاب کارکرد مناسب سیستم عصبی را فراهم می‌کند. این عمل بسیار لازم است تا نورون‌های کولینرژیک به حالت استراحت خود باز گردند. کمبود یا جهش در آنزیم کولین استراز شرایط کلینیکی قابل‌ملاحظه‌ای را ایجاد می‌کند (۱۱). گلوتاتیون فراوان‌ترین ترکیب تیول‌دار غیرپروتئینی با جرم مولکولی پایین است که نقش مهمی را در دفاع سلولی علیه استرس اکسیداتیو به عهده دارد (۱۲).

سداب‌ها گونه‌ای از تیره سدابیان هستند (۱۳). منشأ اصلی سداب نواحی جنوبی اروپا تشخیص داده شده است ولی امروزه با پراکندگی وسیعی که پیدا نموده در غالب مناطق مدیترانه و نواحی دیگر اروپا و آسیا نیز یافت می‌شود. این گیاه در ایران در نواحی شمالی کشور به طور خودرو می‌روید و در بعضی نواحی مانند رشت پرورش می‌یابد (١٤). مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی آن: انواع گلیکوزید، آلکالوئیدهای کینولینی، کومارین‌ها، لیگنین‌ها و فلاونوئیدها است (۱۵). از میان این دسته مواد فلاونوئید و به خصوص روتین مورد توجه محققین قرار گرفته است (١٦). بیوفلاونوئیدها از این نظر که توانایی حذف رادیکال‌های آزاد را دارند اهمیت زیادی دارند (١٦). گیاه سداب از کهن‌ترین گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی ایران و ملل مختلف بوده و برای درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد داشته است که از جمله کارایی‌های این گیاه خاصیت ضدالتهاب (۱۹-۱۷) ضدمیکروب (۲۱،۲۰) ضدآریتمی و فشارخون (۲٤-۲۲) و اثراتی بر سیستم عصبی (۲٦،۲۵) و تولیدمثلی (۲۷) است. طبق مطالعات انجام شده رژیم پرکلسترول باعث افزایش احتمال دمانس می‌شود (۲۸) و از طرفی طی مطالعات دیگر دمانس استیل کولین را افزایش می‌دهد (۲۹) لذا می‌توان نتیجه گرفت که کلسترول بالامی تواند باعث افزایش استیل کولین شود.

با توجه به این که مطالعات انجام شده تاکنون به بر روی مقادیر سرم خونی اسنرس اکسیداتیو بوده است، هدف از این بررسی اثر گیاه سداب بر روی شاخص‌های

استرس اکسیداتیو و کولین استراز در بافت مغز موش‌های دریافتی رژیم پرکلسترول است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی و آزمایشگاهی از نوع مداخله‌ای همراه با گروه شاهد بر روی مدل‌های حیوانی است. این مطالعه در آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشگاه شاهد انجام شد. در این مطالعه از ۲۸ سر موش صحرایی نر سفید، نژاد ویستار (انستیتو پاستور، کرج) در محدوده وزنی ۱۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. تمام موش‌ها در حیوانخانه دانشکده با شرایط روشنایی و تاریکی طبیعی، در دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های ۵ تا ۷ تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوانات آزادانه به آب‌لوله‌کشی و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) دسترسی داشتند.

روش نمونه‌گیری تصادفی و ابزار گردآوری داده‌ها شامل آزمایش‌ها تجربی بود.

متغیرهای موردمطالعه در جدول ۳-۱ آورده شده است. روش کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس دستورالعمل‌های توصیه شده انستیتو ملی بهداشت آمریکا (NIH) انجام شد.

ابتدا برای استخراج عصاره آبی الکلی گیاه به روش خیساندن اندام هوایی گیاه سداب شامل شاخه و برگ و گل جداگانه وزن شده و هرکدام پس از توزین به ارلن جداگانه‌ای انتقال داده شد. سپس چهار برابر وزن گیاه محلول اتانول ۸۰٪ برای نگهداری سه تا چهار روز در تکان دهنده (روتاری) در دمای آزمایشگاه به محتویات ارلن اضافه گردید. پس از این زمان، مخلوط از طریق کاغذ صافی فیلتر گردید و عصاره حاصل شده در کریستالیزور بر روی بن‌ماری ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا پودر خشک عصاره به دست آید. پودر عصاره حاصل شده در درجه حرارت ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده و تزریق به موش‌ها نگهداری شد (۳۰).

برای انجام آزمایش ابتدا ۲۸ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی به ٤ گروه مساوی کنترل، کنترل و سداب، شم کنترل (تحت رژیم غذایی پرچرب) و گروه تحت رژیم غذایی پرچرب و نیز عصاره سداب تقسیم شدند.

به گروه‌های کنترل و سداب، غذای معمولی به مدت ۸ هفته داده شد. همچنین به دو گروه دیگر به مدت ۸ هفته غذای پر کلسترول (High Fat) (کلسترول ۱٪ و اسیدکولیک ۰/۲۵٪ خورانده شد (۳۱). پس از ۸ هفته به گروه‌های غیر از کنترل و شم کنترل به صورت تزریق داخل صفاقی از عصاره سداب با غلظت mg/kg ۱۰۰ به مدت ۳ هفته تزریق شد و برای گروه شم کنترل فقط غذای پرکلسترول تا انتهای سه هفته ادامه داده شد. (۳۲).

خون‌گیری از چشم کلیه موش‌ها در انتهای زمان H.F و انتهای زمان تزریق عصاره‌ها انجام گرفت و پس از سانتریفوژ، نمونه‌ها سرم‌ها جهت انجام آزمایش‌ها چربی، در فریزر نگهداری شدند.

بعد از اتمام کار، موش‌ها با دی اتیل اتر بی‌هوش شده و بدون انجام پرفیوژن، سر حیوانات توسط گیوتین جدا و مغز به طور کامل از جمجمه خارج گردید. سپس هموژنه بافتی با استفاده از دستگاه هموژنایزر تهیه شد. برای تهیه هموژنه بافتی، ابتدا بافت توزین شده و سپس متناسب با وزن آن به صورت جداگانه، نرمال سالین ۰/۹ درصد اضافه و به مدت دو دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور ۵۰۰۰ در دقیقه هموژنیزه گردید آنگاه محلول هموژنیزه توسط سانتریفوژ یخچال دار با دور ۳۰۰۰ در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل بالا در دمای ٤ درجه سانتی گراد صورت گرفته شد. پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محتویات جدا و درون میکروتیوب دو سی‌سی جمع‌آوری شد و از این محلول برای سنجش فعالیت آنزیم کولین استراز، ROS و کاتالاز و گلوتاتیون استفاده گردید.

فعالیت آنزیم کولین استراز می‌تواند نشانه نقصان وسیع سیستم کولینرژیک مغز باشد برای اندازه‌گیری فعالیت بوتیریل کولین استراز، از با استفاده از روش المان Ellman، ۰/٤ میلی‌لیتر از محلول هموژن بافتی رقیق‌شده به کووت حاوی ۲/٦ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۸، 1/0 **مولار**) اضافه شد، سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از واکنشگر المن DTNB به فوتوسل اضافه گردید و سپس جذب نوری محلول نهایی در طول موج ٤۱۲ نانومتر خوانده و پس از گذشت ۲ دقیقه، جذب را صفر ه و ۲۰ میکرولیتر سوبسترا به آن اضافه شد. تغییرات جذب در هر دو دقیقه تا ۱۰ دقیقه را ثبت شده و بر اساس معادله المن میزان فعالیت کولین استراز محاسبه گردید (۳۳).

سطوح ROS با رنگ لیپوفیلیک غیرفلورسانس، دی کلروفلورسین دی استات، (که به صورت غیرفعال از غشای سلولی عبور می‌کند در حضور ROSهای درون‌سلولی توسط آنزیم‌های استراز درون‌سلولی به ۲،۷-دی‌کلروفلورسین شکافته شده و ایجاد فلورسانس می‌کند)، اندازه‌گیری شد. روش کار به این صورت بود که ۱۰ میکرو لیتر از دی کلروفلورسین دی‌استات با غلظت ۱۰ میکرومولار به ۱۵۰ میکرو لیتر از هموژنه بافتی اضافه شد و محلول مخلوط به مدت ٤۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه گردید و میزان فلورسانس در ۵۲۵ نانومتر نشر و جذب ٤۸۸ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳٤).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲٤۰ نانومتر انجام شد. در این روش، آنزیم کاتالاز نمونه با تجزیه پراکسید هیدروژن سبب کاهش جذب این ماده در طول موج ۲٤۰ نانومتر می‌شود و از تفاوت جذب در واحد زمان، فعالیت آنزیم اندازه‌گیری می‌گردد. بر طبق تعریف، یک واحد کاتالاز مقدار آنزیمی است که موجب تجزیه یک میکرومول H_2O_2 در مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌گردد.

ابتدا دو معرف شامل ۰/۰۵ مول بافر فسفات با pH=۷ (که خود نیز شامل ۱۵/٤ میلی‌لیتر از K_2HPO_4 با غلظت ۰/۱ مولار و ۹/٦ میلی‌لیتر از KH_2PO_4 با غلظت ۰/۱ مولار بود که با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر می‌رسد) و پراکسید هیدروژن ۰/۰۵۹ مولار (۰/۳٪) در بافرفسفات ۰/۰۵ مولار با pH مساوی ۷ تهیه گردید. آنگاه در داخل کووت، ۱/۹ میلی‌لیتر معرف و ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۰۵۹ مولار اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه محتویات انکوبه، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هموژنه بافتی اضافه شده و تغییرات جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر برای ۲ دقیقه ثبت شد (۳۲).

جهت سنجش گلوتاتیون احیا شده ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی بافت با ۰/۳ میلی‌لیتر از M ۰/۲ تریس بافر (pH=۸/۲) و ۰/۰۲ میلی‌لیتر از DTNB با غلظت M ۰/۰۱ در لوله آزمایش مخلوط گردید و به این مخلوط ۱/۵۸ میلی‌لیتر متانول مطلق تا حجم ۲ میلی‌لیتر اضافه شد. یک واکنشگر خالی (بدون نمونه) و یک نمونه خالی (بدون DTNB) نیز به شیوه‌ای مشابه آماده شد. لوله‌های آزمایش هر ۵ دقیقه تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه ساکن شدند، سپس لوله‌ها در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. جذب نوری در طول موج ٤۱۲ نانومتر سنجیده شدند ضمناً رنگ به دست آمده به مدت یک ساعت پایدار است (۳۲).

تمامی داده‌ها به صورت Mean ± SEM بیان شدند. در مورد نتایج از آزمون آماری پارامتریک آنووای یک‌طرفه و در صورت اختلاف معنی‌دار از آزمون توکی استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها در برنامه سیگما استات نسخه ۳/۵ (۲۰۰٦) انجام شد. جهت رسم نمودارها از برنامه اکسل ۲۰۱۳ استفاده گردید. در مورد کلیه یافته‌ها اختلاف در سطح $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

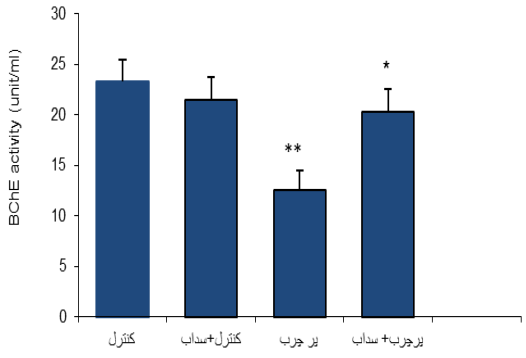
نتایج

جدول شماره ۱ سطوح پروفایل لیپیدی پس از هشت هفته رژیم غذایی پرچرب را نشان می‌دهد. در این راستا مقادیر کلسترول تام، کلسترول LDL و تری گلیسرید در گروه رژیم پرچرب نسبت به گروه کنترل در انتهای هفته هشتم افزایش و کلسترول HDL کاهش داشته است. همچنین درمان با سداب در گروه رژیم پرچرب موجب کاهش مقادیر کلسترول تام، کلسترول LDL و تری گلیسرید و افزایش کلسترول HDL شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود پروفایل لیپیدی (شامل تری‌گلیسیرید، کلسترول تام، کلسترول HDL و کلسترول LDL) تمامی موش‌های گروه پرچرب در محدوده دیس لیپیدمی قرار دارد در حالی که پروفایل لیپیدی موش‌های گروه کنترل در محدوده طبیعی است (P<۰/۰۱)؛ که نشان می‌دهد القای دیس لیپیدمی در موش‌های گروه پرچرب پس از هشت هفته با موفقیت همراه بوده است.

جدول ۱. سطوح پروفایل لیپیدی پس از هشت هفته رژیم غذایی پرچرب در موش‌های مورد مطالعه در گروه‌های مختلف. نتایج به صورت Mean±SEM گزارش شده است.

گروه حیوانی / نوع چربی	کنترل	کنترل+سداب	رژیم پرچرب	رژیم پرچرب + سداب
تری گلیسیرید (mg/dl)	۲۵۰.۲۴±۵.۲	۲۳۳.۱۷±۵.۳	۲۹۹.۹۲±۶.۴	۲۸۵.۷±۸.۳
کلسترول تام (mg/dl)	۷۱.۵۱±۴.۷	۶۸.۵۱±۵.۰۳	۹۱.۳۲±۴.۹	۷۷.۳۲±۴.۸
کلسترول HDL(mg/dl)	۲۰.۴۰±۳.۸	۲۴.۴۱±۲.۶	۱۵.۶±۲.۳	۲۸.۴±۲.۴
کلسترول LDL (mg/dl)	۶۰.۴±۴.۸	۵۶.۳۲±۵.۲	۸۹.۴۰±۴.۴	۷۵.۴±۴.۳

در نمودار ۱ نتایج مربوط به فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز (BChE) در بافت هموژنیزه هیپوکمپ موش‌های گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. این پارامتر در گروه کنترل تحت تیمار با سداب یک کاهش مختصر و غیر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. به علاوه این پارامتر در گروه پرچرب کاهش بارز و معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت (p<۰/۰۱). در گروه پرچرب تیمار شده با سداب در مقایسه با گروه پرچرب موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز هیپوکمپ موش‌های تحت درمان در مقایسه با گروه پرچرب شد.

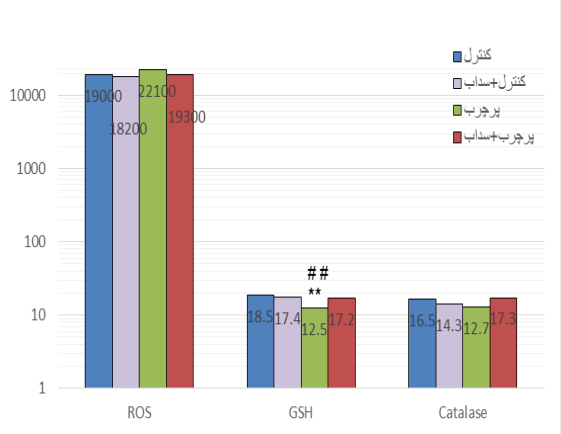


نمودار ۱. میزان فعالیت بوتیریل کولین استراز در گروه‌های مختلف

**: p<۰/۰۱ (در مقایسه با گروه کنترل)،

*: p<۰/۰۱ (در مقایسه با گروه پرچرب)

در نمودار ۲ شدت فلورسانس (AFU) مربوط به میزان ROS به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو، گلوتاتیون احیا به عنوان شاخصی از دفاع آنتی‌اکسیدان از نوع غیرآنزیمی و فعالیت کاتالاز به عنوان شاخصی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان از نوع آنزیمی در بافت هموژنیزه هیپوکمپ در گروه‌های کنترل، کنترل تحت درمان، پرچرب و پرچرب تحت درمان با عصاره آبی الکلی سداب در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده می‌شود. همانطور که مشاهده می‌شود در میان پارامترهای مد نظر تنها در سطح گلوتاتیون گروه پرچرب تحت درمان با سداب نسبت به گروه کنترل و گروه پرچرب اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.



نمودار ۲- نتایج مربوط به شدت فلورسانس مربوط به میزان ROS، میزان گلوتاتیون احیا (GSH)، میزان فعالیت کاتالاز در بافت هموژنیزه هیپوکمپ موش‌های گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

**: $p<۰/۰۱$ (در مقایسه با گروه کنترل)

##: $p<۰/۰۱$ (در مقایسه با گروه پرچرب)

بحث

دیس لیپیدمی از ریسک فاکتورهای عمده آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی و عروقی است که می‌تواند این اثر را از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو ناشی از آن اعمال نماید (۳۵). نتایج نشان می‌دهد که التهاب نورونی و استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ موش‌ها به نواقص شناختی منجر می‌شود. در مقابل آنتی‌اکسیدان‌ها مکانیسم‌های دفاعی بدن در برابر اکسیدان‌ها هستند که در حفظ وضعیت کاهش و حذف گونه‌های فعال و برقراری تعادل بین واکنش‌های اکسایش- کاهش در بدن نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۱). میزان تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی در برابر عوامل اکسیدان از طریق سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بدن مانند کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز یا تعیین مقدار محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها قابل بررسی است (۵-۲). از منابع غنی آنتی‌اکسیدان برون زاد می‌توان به گیاهان دارویی اشاره نمود. گیاه سداب از کهن‌ترین گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی ایران و ملل مختلف با دارا بودن خواص ضدالتهابی، ضدمیکروبی، ضدآریتمی و فشارخون و اثراتی بر سیستم عصبی و تولیدمثلی یکی از این گیاهان دارویی است (۳۶). با توجه به اهمیت دیس لیپیدمی و استرس اکسیداتیو ناشی از آن و البته محدودیت مطالعات انجام شده، هدف از این مطالعه بررسی اثر گیاه سداب بر روی فعالیت آنزیم کولین استراز و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت مغز موش‌های دریافتی رژیم پرکلسترول بود.

نتایج این مطالعه نشان داد فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز (BChE) در بافت هموژنیزه هیپوکمپ موش‌های صحرایی در گروه پرچرب کاهشی بارز و معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل داشت و درمان موش‌های رژیم پرچرب با سداب توانست موجب افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه پرچرب گردد. میزان ROS به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های کنترل تیمار شده با سداب، پرچرب و پرچرب تیمار شده با سداب دارای تغییر ولی غیر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد. میزان گلوتاتیون احیا در گروه پرچرب کاهشی در مقایسه با گروه کنترل داشت و درمان موش‌های پرچرب با سداب باعث افزایش این پارامتر در مقایسه با گروه پرچرب گردید. فعالیت کاتالاز نیز که شاخصی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان از نوع آنزیمی است در گروه پرچرب

کاهش ولی غیر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد به علاوه فعالیت این آنزیم پس از درمان موش‌ها در گروه پرچرب تحت تیمار با سداب در مقایسه با گروه پرچرب یک افزایش مطلوب نشان داد.

مطالعات مختلفی در رابطه با اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاه سداب انجام شده است. در این رابطه Hamdiken و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثر عصاره هیدروالکلی سداب بر سطوح آنتی‌اکسیدانی در موش‌های صحرایی دیابتی و با رژیم غذایی کمبود روی پرداختند آن‌ها نشان دادند که دریافت ناکافی روی باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش غلظت گلوتاتیون و فعالیت‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون S–ترانسفراز در بافت کبد و کلیه می‌شود. با این حال، درمان با عصاره سداب تمام اختلالات مشاهده شده را به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های کمبود روی بهبود بخشید و آن‌ها را تقریباً به سطوح نرمال رساند و در نهایت نتیجه‌گیری کردند که عصاره گیاه سداب با اثرات سودمند آنتی‌اکسیدانی، یک عامل قوی در کاهش شدت استرس اکسیداتیو ناشی از کمبود روی و دیابت تجربی است (۳۷). در مقایسه با نتایج مطالعه ما نیز کاهشی کم در میزان ROS و افزایشی در میزان گلوتاتیون احیا و فعالیت کاتالاز مشاهده شد اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. این اختلاف ممکن است به علت تفاوت در مدل تجربی مطالعه باشد که در مطالعه آن‌ها مدل تجربی دیابت و کمبود روی مورد بررسی قرار گرفت درحالی‌که مدل تجربی مطالعه ما رژیم غذایی پرچرب بود. به علاوه نتایج مطالعه Ratheesh و همکاران در سال ۲۰۱۳ که به بررسی اثر آلکالوئید جدا شده از گیاه سداب در کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو خرگوش‌های هیپرکلسترولمی پرداخته بودند حاکی از آن بود که فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و سطح گلوتاتیون احیا در خرگوش‌های رژیم پر کلسترول کاهش یافته و مکمل آلکالوئید جدا شده از گیاه سداب باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح گلوتاتیون احیا شد. در نهایت آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که آلکالوئید جدا شده از گیاه سداب باعث کاهش معنی‌دار استرس اکسیداتیو و التهاب در خرگوش‌های رژیم پر کلسترول می‌شود (۳۸). در مقایسه با نتایج این مطالعه با مطالعه ما نیز اگرچه تغییرات سودمندی در شاخص‌های استرس اکسیداتیو و عوامل آنتی‌اکسیدان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد اما این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود. علت این تفاوت نیز ممکن است به دلیل طولانی‌تر بودن مدت زمان تغذیه با رژیم پرچرب در این دو مطالعه باشد. به طوری که مدت زمان تغذیه رژیم پرچرب در مطالعه آن‌ها ۹۰ روز و در مطالعه ما ۸ هفته (۵۶ روز) بود. در جای دیگر Ratheesh و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی سداب با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز در مدل تجربی آرتریت موش صحرایی گزارش نمودند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ویتامین‌های C و E و سطح گلوتاتیون احیا در موش‌های تحت درمان با عصاره متانولی گیاه سداب افزایش معنی‌داری نسبت به دو گروه دیگر پیدا کرده است و در نهایت نتیجه‌گیری کردند که گیاه سداب با خواص قدرتمند آنتی‌اکسیدانی خود موجب بهبود التهاب و وضعیت استرس اکسیداتیو ناشی از آرتریت در موش صحرایی شده است (۳۹). همچنین آن‌ها نیز در سال ۲۰۱۰ که به بررسی اثرات ضدالتهابی آلکالوئید مشتق از گیاه سداب بر التهاب القا شده با Carrageenan در موش صحرایی پرداختند که نشان دادند که آلکالوئید مشتق از گیاه سداب با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر ضدالتهابی بیشتری نسبت به گروه تحت درمان با دیکلوفناک دارد و به علاوه سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سطح گلوتاتیون احیا در درمان با آلکالوئید مشتق از گیاه سداب افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل پیدا کرد (۴۰). مجدداً آن‌ها در سال ۲۰۱۳ با بررسی اثر ضدالتهابی کینولون آلکالوئید Skimmianine (SKM)، مشتق از گیاه سداب در التهاب حاد ناشی از Carrageenan گزارش کردند که التهاب،

پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو بافتی پس از درمان با SKM به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد (٤١). نتایج این سه مطالعه توسط Ratheesh و همکاران مؤید این است که گیاه سداب در شرایط التهاب اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی و محافظت در برابر استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی دارد. به علاوه یکی دیگر از تغییراتی که خصوصاً در بافت هیپوکمپ مغز پس از ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو پدید می‌آید کاهش فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد سداب با اثرات محافظت عصبی خود موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز هیپوکمپ مغز موش‌های تحت درمان در مقایسه با گروه پرچرب می‌گردد. به علاوه این گیاه با دارا بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی خود، میزان گلوتاتیون احیا و فعالیت کاتالاز در بافت هموژنه بافت مغزی گروه پرچرب تحت درمان را در مقایسه با گروه پرچرب را افزایش و میزان ROS در گروه‌های مختلف را کاهش غیر معنی‌داری داده است.

منابع

1. Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International Journal of Food Microbiology 2003; 80(3): 223 - 30
2. Olia P, Saderi H, Tabatabai nejad S, Naseri M, Rezaie M. Comparison of antimicrobial effect of Ruta graveolens extract and Gentamycin on Psudomonas aeroginosa. Iranian journal of Medicinal. and Aromatic Plants Research 2004; 2: 171 – 80
3. Ahmadi A, Nasirinejad F, Parivar K. Effects of areial parts of rue on spermatogenesis in male Balb/C premature rats. Iran Medical University Journal 2007; 14: 13 - 20.
4. Neha, Kumar A, Jaggi RK,Singh N. Silymarin ameliorates memory deficits and neuropathologicalchanges in mouse model af high-fat-diet-induced experimental dementia.Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology 2014;387(8):777-87.
5. Verma A, Sharma S. Beneficial effect of protein tyrosine phosphatase inhibitor and phytoestrogen in dyslipidemia-induced vascular dementia in ovariectomized rats. Journal of Stroke Cerebrovascular Disease 2015;24(11):2434-46.
6. Valizadeh E, fazli D, Ostadrahimi A. The Effect of herbal supplement « Mohazzel' in traditional medicine and weight loss diet on some biochemical parameters & Anthropometric indices in obese subjects. Commonwealth Magistrates' and Judges' Association 2018; 7 (4):2115-2127.
7. Karavi A, Shahanipour K, Monajemi R. Compare Antioxidant and cytotoxic effects of aqueous and hidroalcoholic extracts of Ruta graveolens on DU145 cell line. Journal of Animal Research 2017; 30(3): 335-345.
8. Hoshiari A, Najafi G, Zareai L. Evaluation of oxidant effect of aqueous extract of Ruta graveolens on mice ovary. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 2017, 22(3): 40-48
9. Keihanian, F, Rostampour VajariA M, Saeidynia, A, Elmieh A. Effect of Ruta Graveolens Hydro-Alcoholic Extract on Pentylenetetrazole-Induced Seizure in Male Mice. Journal of Babol University of Medical Sciences 2012; 14 (4):30-36
10. Mirrezaee N, Dakhili M, Mehrpour S. Effects of antifungal Rue on the candida albicans isolated from patients with vaginitis on in vitro during spring and winter seasons and comparison with two antibiotics. Yafte 2017; 19 (2):50-59
11. Javadi B, Sahebkar A, Emami SA. Medicinal Plants for the Treatment of Asthma: A Traditional Persian Medicine Perspective. Current Pharmaceutical Design 2017;23(11):1623-1632.
12. Mirghazanfari SM, Abbassian A, Kamalinejad M, Karimian SM, Massoud A. The Effect of Methanolic and Ethanolic Extracts of Ruta graveolens L. Leaves on Formalin-Induced Inflammation in Rats. Traditional and Integrative Medicine 2016. 1(4):136-141.
13. Mirheydar H. Plant science. Tehran. Islamic Cultuer Publishing office. 1992, pp: 203 – 7.
14. Zargari A. Medicinal plants. 6 ed. Tehran. Tehran University 1996; 464 – 7.
15. Stashenko EE, Acosta R, Martinez JR: Highresolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (Ruta graveolens L). Journal of Biochemistry 2000; 43: 379-90.

16. Weiss RF, Fintelman V: Herbal medicine. Germany: Thieme 2000; 181, 330.
17. Shen SC, Lee WR, Lin HY, Huang HC, Ko CH, Yang LL, Chen YC: In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E (2) production. The European Journal of Pharmacology 2002; 446: 187 - 94.
18. Raghav SK, Gupta B, Agrawal C, Goswami K, Das HR. Anti-inflammatory effect of Ruta graveolens L. in murine macrophage cells. The Journal of Ethnopharmacology 2006; 104: 234 - 9.
19. Raghav SK, Gupta B, Shrivastava A, Das HR.Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase and IL-1beta through suppression of NF-kappaB activation by 3-(1'-1'-dimethylallyl-(6-hydroxy-7-methoxy-coumarin isolated from Ruta graveolens L. European Journal of Pharmacology 2007;56:69-80.
20. Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International Journal of Food Microbiology 2003; 80(3): 223 - 30.
21. Olia P, Saderi H, Tabatabai nejad S, Naseri M, Rezaie M. Comparison of antimicrobial effect of Ruta graveolens extract and Gentamycin on Psudomonas aeroginosa. Iranian journal of Medicinal. and Aromatic Plants Research 2004; 2: 171 – 80.
22. Chiu KW, Fung AY. The cardiovascular effects of green beans Phaseolus aureus common rue (Ruta graveolens), and kelp Laminaria japonica in rats. General Pharmacology 1997;29:859-62.
23. Chiu KW, Fung AYL: The hypotensive effects of green bean (Phaseolus aureus), common rue (Ruta graveolens) and kelp (Laminaria japonica) in rats. Phytotherapy Research 1997; 11: 203 - 6.
24. Bidgoli M. Effect of rue, burdock and lonicera on electerophysiologic behavior of AV node in isolatet heart of male rats. Tehran Medical University, Pharmacy School 1997, Thesis no. 3892.
25. Adsersen A, Gauguin B, Gudiksen L, Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. Journal of Ethnopharmacology 2006; 104: 418 - 22.
26. Bethge EW, Bohuslavizki KH, Hansel W, Kneip A, Koppenhofer E. Effects of some potassium channel blockers on the ionic currents in myelinated nerve. General Physiology and Biophysics 1991; 10: 225 - 44.
27. Ahmadi A, Nasirinejad F, Parivar K. Effects of areial parts of rue on spermatogenesis in male Balb/C premature rats. Iran Medical University Journal 2007; 14: 13 - 20.
28. Neha, Kumar A, Jaggi RK,Singh N. Silymarin ameliorates memory deficits and neuropathologicalchanges in mouse model af high-fat-diet-induced experimental dementia. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology 2014;387(8):777-87.
29. Verma A, Sharma S. Beneficial effect of protein tyrosine phosphatase inhibitor and phytoestrogen in dyslipidemia-induced vascular dementia in ovariectomized rats. Journal of Stroke Cerebrovascular Disease 2015;24(11):2434-46.
30. Conni R.Mahoon. textbook of diagnostic microbiology antimicrobial sucsebtibility testing sanders 2015; (13):274-288
31. Piri M, Shahin M, Oryan S. The effects of Anethum on plasma lipid and lipoprotein in normal and diabetic rats fed high fat diets. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences 2010; 11 (4):15-25
32. Loonat F, Amabeoku GJ. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities of the leaf methanol extract of Ruta graveolens L. (Rutaceae) in mice and rats. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 2014;11(3):173-81.
33. Ellman G L, Courthey K D, Andres V, Featherstone A M. A new and rapid determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology Colorimic 1961; (7):88-95
34. Piri M, Shahin M, Oryan S. The effects of Anethum on plasma lipid and lipoprotein in normal and diabetic rats fed high fat diets. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences 2010; 11 (4):15-25
35. Ghosian Moghadam MH, Ansari I, Roghani M, Ghanem A, Mehdizadeh N. The Effect of Oral Administration of Hypericum Perforatum on Serum Glucose and Lipids, Hepatic Enzymes and Lipid Peroxidation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Galen Medical Journal 2017;6(4):319-29.
36. Naghibi Harat Z, Kamalinejad M, Sadeghi M, Sadeghipour H, Eshraghian M. A Review on Ruta graveolens L. Its Usage in Traditional Medicine and Modern Research

Data. Journal of Modern Physics 2009; 2 (30):1-19

37. Hamdiken M, Bouhalit S, Kechrid Z. Effect of Ruta chalepensis on Zinc, Lipid Profile and Antioxidant Levels in the Blood and Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats Fed Zinc-Deficient Diets. Canadian Journal of Diabetes 2018;42(4):356-364.
38. Ratheesh M, Shyni GL, Sindhu G, Helen A. Inhibitory effect of Ruta graveolens L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats. Exp Toxicologic Pathology 2011;63(3):285-90.
39. Ratheesh M, Shyni GL, Helen A. Methanolic extract of Ruta graveolens L. inhibits inflammation and oxidative stress in adjuvant induced model of arthritis in rats. Inflammopharmacology 2009; 17(2): 100-5.
40. Ratheesh M, Shyni GL, Sindhu G, Helen A. Protective effects of isolated polyphenolic and alkaloid fractions of Ruta graveolens L. on acute and chronic models of inflammation. Inflammation 2010;33(1):18-24.
41. Ratheesh M, Sindhu G, Helen A. Anti-inflammatory effect of quinoline alkaloid skimmianine isolated from Ruta graveolens L. Inflammation Research 2013;62(4):367-76.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
26th Year, No.139
February-March 2019

The effect of hydroalcoholic extract of *Ruta graveolens* on oxidative stress markers and cholinesterase in brain rats receiving high-cholesterol diet

Elham Bolouki[1], Gholamali Naderi[2]*, Mehrdad Roghani[3], Elham Zahedi[4]

1. School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Department of Biochemistry, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
4. Department of Physiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

*** Corresponding author e-mail: naderi@shahed.ac.ir**

Abstract

Background and Objective: High cholesterol is associated with higher incidence of cardiovascular diseases and oxidative stress. *Ruta graveolens* (RG) is one of the medicinal plants used in Iranian traditional medicine and different nations in the treatment of many diseases with antioxidant effects. The aim of this study was to investigate the effect of hydroalcoholic extract of RG on oxidative stress markers and cholinesterase enzyme in brain tissue of rats receiving high-cholesterol (HC) diet.

Materials and Methods: In this experimental study, 28 male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: Control, RG and HC diet and HC diet+RG. For 8 weeks, Control and RG group received normal diet and the other 2 groups received HC diet (1% cholesterol and colic acid 0.25%). After 8 weeks, treatment groups were treated with 100 mg/kg of RG intraperitoneally for 3 weeks. At the end of the experiment, the rats were anesthetized with diethyl ether and their brain were excised. After tissue homogenate was prepared, oxidative stress markers (level of reactive oxygen species (ROS), glutathione and catalase activity) and butyrylcholinesterase activity were measured using specific kits.

Results: Eight-week diet with HC decreased glutathione level and the activity of butyrylcholinesterase and catalase enzymes and increased ROS in the hippocampal tissue of rats. Three-week treatment with hydroalcoholic extract of RG significantly increased the activity of the butyrylcholinesterase enzyme in the treated rats compared with the HC diet group. In addition, the activity of catalase and level of glutathione increased in HC diet+RG group compared to the HC diet group. However, this increase was not significant. Also, the difference between level of ROS in different groups was not statistically significant.

Conclusion: Results of this study demonstrated that hydroalcoholic extract of RG significantly increases the activity of the butyrylcholinesterase enzyme in the hippocampal tissue of treated rats compared to the HC group and also had a partial effect on the antioxidant levels and defense against oxidative stress in the rats receiving HC diet but this difference was not statistically significant.

Received: 05/12/2018
Last revised: 19/02/2019
Accepted: 26/02/2019

Keywords: High-cholesterol diet, *Ruta graveolens*, Oxidative stress, Hippocampus, Butyrylcholinesteras