

The effect of hydroalcoholic extract of *Pimpinella anisum* on hippocampal oxidative stress and activity of butyrylcholinesterase in rats under high-cholesterol diet

Amir Mahmoudi¹, Gholamali Naderi^{2*}, Narges Haddadzadeh-Niri³, Mehrdad Roghani⁴

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

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

Abstract

Background and Objective: High-cholesterol diet and ensuing oxidative stress causes development of various neurologic disorders. Considering anti-inflammatory and antioxidant properties of the anise (*Pimpinella anisum*) plant, the effect of its hydroalcoholic extract on hippocampal oxidative stress and cholinesterase activity was assessed in rats under high-cholesterol diet.

Materials and Methods: In this experimental study, rats were divided into control, extract-treated control, high cholesterol diet, and extract-treated high cholesterol diet. After 8 weeks, treated groups also received extract at a dose of 250 mg/kg (i.p.) for 3 weeks and high-cholesterol diet was given till the end of the study. Then, after preparing hippocampal homogenate, butyrylcholinesterase (BChE) activity and oxidative stress factors including reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), and catalase activity were determined. One-way ANOVA and Tukey's post-hoc tests were used for statistical analysis of data.

Results: High cholesterol diet significantly increased hippocampal BChE activity and ROS level and significantly decreased GSH and catalase activity. Conversely, extract treatment of group under high-cholesterol diet caused significant decrease of ROS and BChE activity and significant increase of GSH and with no significant effect on catalase activity.

Conclusion: Consumption of anise hydroalcoholic extract under high-cholesterol diet reduces hippocampal oxidative stress and cholinesterase activity and this may lower associated neurological complications.

Keywords: Anise, Oxidative stress, Butyrylcholinesterase, High-cholesterol diet

Received: Feb 03, 2023

Revised: May 31, 2023

Accepted: Jul 23, 2023

How to cite this article: Mahmoudi A, Naderi GH, Haddadzadeh-Niri N, Roghani M. The effect of hydroalcoholic extract of *Pimpinella anisum* on hippocampal oxidative stress and activity of butyrylcholinesterase in rats under high-cholesterol diet. *Daneshvar Medicine* 2023; 31(3):34-44. doi: 10.22070/DANESHMED.2023.17321.1320

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

اثر عصاره آبی الکی انیسون بر استرس اکسیداتیو و فعالیت بوتیریل کولین استراز هیپوکمپ در موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دریافت‌کننده رژیم پرکلسترول

امیر محمودی^۱، غلامعلی نادری^{۲*}، نرگس حدادزاده نیری^۳، مهرداد روغنی^۴

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

Email: naderi@shahed.ac.ir

*نویسنده مسئول: غلامعلی نادری

چکیده

مقدمه و هدف: مصرف رژیم غذایی پرکلسترول و استرس اکسیداتیو ناشی از آن موجب بروز انواع بیماری‌های عصبی می‌شود. با توجه به خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی گیاه انیسون، در این مطالعه اثر عصاره آبی-الکی این گیاه بر استرس اکسیداتیو و فعالیت کولین استراز هیپوکمپ موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دریافت‌کننده رژیم پرکلسترول بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، موش‌ها به چهار گروه کنترل، کنترل دریافت‌کننده عصاره، پرکلسترول، و پرکلسترول و دریافت‌کننده عصاره تقسیم شدند. پس از ۸ هفته، گروه‌های تحت درمان، با عصاره انیسون به میزان ۲۵۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی به مدت ۳ هفته درمان شدند و هم‌زمان تجویز غذای پرکلسترول تا پایان مطالعه ادامه داشت. در پایان کار، پس از تهیه هموژنه هیپوکمپ، سنجش فعالیت بوتیریل کولین استراز (BChE) و شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، گلوتاتیون (GSH) و کاتالاز انجام شد. داده‌ها از نظر آماری با آزمون آنوای یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شدند.

نتایج: رژیم غذایی پرکلسترول باعث افزایش معنادار فعالیت BChE و ROS و همچنین کاهش معنادار GSH و کاتالاز هیپوکمپ شد. از طرف دیگر، تیمار گروه پرچرب با عصاره انیسون موجب کاهش معنادار ROS و BChE و افزایش معنادار GSH شد و بر فعالیت کاتالاز تأثیر معنادار نداشت.

نتیجه‌گیری: مصرف عصاره آبی-الکی انیسون موجب کاهش فعالیت کولین استراز و استرس اکسیداتیو هیپوکمپ به دنبال دریافت رژیم پرکلسترول می‌شود که این احتمالاً در کاهش عوارض عصبی مرتبط می‌تواند سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: انیسون، استرس اکسیداتیو، بوتیریل کولین استراز، رژیم پرکلسترول

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۱۴

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱

مقدمه

رژیم غذایی پرچرب به‌ویژه با محتوای بالا از کلسترول باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در سیستم عصبی مرکزی به‌ویژه مغز می‌شود (۱، ۲). به‌هم‌خوردن تعادل ذخایر و وزن بدن به‌عنوان یک وضعیت افزایش التهاب و استرس اکسیداتیو تشخیص داده شده است (۳). استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی نقش مهمی در روند پیری، اختلالات شناختی خفیف و سایر اختلالات مغزی دارند. به‌طور مثال در بیماری آلزایمر، آمیلوئید بتا با تولید رادیکال‌های آزاد در مغز باعث آسیب اکسیداتیو و مرگ سلولی می‌شود. به‌علاوه با افزایش تولید سایتوکاین‌ها و آنزیم‌های پیش‌التهابی باعث التهاب عصبی شده، نهایتاً به تخریب حافظه، اختلال عملکرد شناختی و زوال عقل می‌انجامد (۴). از آنجاکه نشانه‌های اکسیداتیو اغلب در گردش خون سیستمی وجود دارد، سد خونی-مغزی نقش کلیدی در میانجی‌گری اثر این نشانه‌ها بر اختلال عملکرد مغز ایفا می‌کند؛ بنابراین آسیب اکسیداتیو و اختلال در سد خونی-مغزی یک کانون اضطرابی علت و پیشرفت بیماری عصبی است. اثر آسیب اکسیداتیو بر سد خونی-مغزی می‌تواند به‌صورت گردش سلولی ناکارآمد و چسبندگی سلول‌های ایمنی باشد (۵).

سطوح بالای کلسترول در میان‌سالی با افزایش خطر ابتلا به اختلالات حافظه‌ای در مراحل بعدی زندگی مرتبط است که نشان می‌دهد مسیرهای منتهی به آسیب‌شناسی این بیماری‌ها ممکن است چندین دهه قبل از شناسایی علائم بیماری فعال شوند. تصور می‌شود که کلسترول غذایی که نمی‌تواند از سد خونی-مغزی عبور کند، با افزایش انتقال محصول تجزیه‌شده‌اش در گردش خون، یعنی ۲۷- هیدروکسی کلسترول، به مغز، بر هموستاز سیستم عصبی تأثیر بگذارد. افزایش کلسترول ناشی از رژیم پرکلسترول با افزایش سطوح تخریب عصبی در هیپوکمپ مرتبط است (۶). میتوکندری به‌عنوان منبع عمده‌ی استرس اکسیداتیو مطرح می‌شود.

افزایش مزمن تولید *ROS (Reactive Oxygen Species)* با میزان آسیب در *DNA*، پروتئین‌ها و لیپیدها همراه است (۳). خانواده آنزیم کولین استراز فقط دو عضو دارد: استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز. هدف اولیه بیولوژیکی اولی تنظیم استیل کولین، یک انتقال‌دهنده

عصبی، از طریق هیدرولیز در اتصالات عصبی عضلانی است، بنابراین ثابت می‌کند که یک جزء ضروری در نگهداری و عملکرد سیستم‌های عصبی است. آنالوگ پلاسمایی *AChE* یعنی بوتیریل کولین استراز که قبلاً به‌عنوان شبه کولین استراز نامیده می‌شد، در کبد تولید می‌شود و برخلاف *AChE* هدف بیولوژیکی بسیار مهم‌تری دارد. غلظت *BChE* در پلازما بیشتر از *AChE* است (۷). *BChE* تا ۹۰ درصد کل *ChE* سرم را تشکیل می‌دهد درحالی‌که فعالیت آن ۲۰ برابر کمتر از *AChE* در هیدرولیز *ACh* است. فعالیت سرمی *BChE* به‌طور گسترده به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای بیماری‌های مختلف استفاده شده است. اگرچه عملکرد آن به‌طور قطعی روشن نشده است. در کلینیک، بیشتر برای ارزیابی مسمومیت با ارگانوفسفره استفاده می‌شود. برخی از مطالعات همچنین نشان داده‌اند که فعالیت *BChE* شدت پاسخ‌های ضدالتهابی کولینرژیک را منعکس می‌کند یا به‌عنوان نشانگر تغییرات در تعادل سمپاتیک/پاراسمپاتیک عمل می‌کند (۸). آنزیم کولین استراز، استیل کولین را تجزیه می‌کند و با جلوگیری از تجمع استیل کولین و تحریک بیش‌ازحد عضلات و اعصاب، کارکرد مناسب سیستم عصبی را فراهم می‌کند. این عمل بسیار لازم است تا نورون‌های کولینرژیک به حالت استراحت خود برگردند. کمبود یا جهش در این آنزیم شرایط کلینیکی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد می‌کند (۳). امروزه تلاش‌های زیادی برای یافتن گیاهان دارویی با حداقل عوارض جانبی و دارای خواص دارویی مفید در جریان است که در این راستا نتایج مطلوبی نیز حاصل شده و گیاه انیسون با خواص سودمند متعدد از آن جمله است (۹). انیسون یا گیاه بادیان رومی با نام علمی *Pimpinella anisum* گیاهی با دانه‌های بسیار معطر و شبیه به رازیانه بوده که اثرات حفاظتی، آنتی‌باکتریایی، ضداضطراب، ضدافسردگی و ضدسرطانی آن به اثبات رسیده است (۹-۱۲). این گیاه همچنین دارای خواص طعم‌دهنده، نگهدارنده و آرام‌بخش است (۱۳). مطالعه حاضر برای بررسی اثر عصاره آبی الکلی گیاه انیسون بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز

هیپوکمپ در موش‌های دریافت‌کننده رژیم پرکلسترویل انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۲۸ سر موش آزمایشگاهی بزرگ نر سفید نژاد ویستار در محدوده وزن ۱۹۰-۲۲۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. موش‌ها در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات دانشگاه شاهد در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد با شرایط روشنایی و تاریکی طبیعی در گروه‌های ۳ تا ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوانات به‌طور آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش تهیه‌شده از شرکت خوراک دام پارس دسترسی داشتند. روش نمونه‌گیری تصادفی و ابزار گردآوری داده‌ها شامل آزمایشات تجربی بود.

موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۴ گروه مساوی شامل کنترل با رژیم غذایی عادی، کنترل با رژیم غذایی عادی و تیمار با عصاره انیسون، پرچرب دریافت‌کننده رژیم غذایی پرکلسترویل و پرچرب تحت تیمار با عصاره انیسون تقسیم شدند. به گروه‌های کنترل غذای معمولی به مدت ۸ هفته داده شد (۱۴). گروه‌های پرچرب به مدت ۱۱ هفته غذای پرکلسترویل (کلسترویل ۱ درصد و اسیدکولیک ۰/۲۵ درصد) دریافت کردند (۳). پس از ۸ هفته به گروه‌های تیمار شده، عصاره انیسون با دوز ۲۵۰ mg/kg به مدت ۳ هفته و روزانه به‌طور داخل صفاقی تزریق شد (۱۵) و هم‌زمان تجویز غذای پرکلسترویل تا پایان مطالعه ادامه داشت. بعد از اتمام کار، موش‌ها در محفظه دی‌اکسید کربن بی‌هوش شدند و سر حیوانات توسط گیوتین جدا و مغز به‌طور کامل از جمجمه خارج شد. هموژنه بافت هیپوکمپ با استفاده از دستگاه هموژنایزر تهیه شد.

بررسی‌های بیوشیمیایی

روش کار به این صورت بود که ابتدا بافت مغز توزین شد و سپس محلول تریس هیدروکلراید ۱۵۰ میلی مولار متناسب با وزن هر نمونه به آن اضافه شد و به مدت دو دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور ۵۰۰۰ در دقیقه هموژنیزه شد و مجدداً محلول هموژنیزه‌شده، توسط سانتریفوژ یخچال‌دار با دور ۳۰۰۰ در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه

سانتریفوژ شد. به‌منظور جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل بالا در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. 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 گلوکاتیون استفاده شد (۱۶).

روش تهیه عصاره گیاه

گیاه انیسون از مرکز فروش گیاهان دارویی در تهران تهیه و کد هرباریوم گیاه (SUMS=8062) نیز از دانشگاه شهید بهشتی اخذ شد. عصاره‌گیری از بخش هوایی شامل میوه و برگ و دانه گیاه انیسون انجام شد. استخراج عصاره آبی الکلی انیسون به روش ماسراسیون انجام شد. در این روش ۱۰۰ گرم پودر دانه خشک گیاه انیسون در ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول خیسانده شد و بعد از ۷۲ ساعت توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شده و با استفاده از دستگاه بن ماری در دمای ۷۰ درجه آب آن جدا شد. سپس عصاره لیوفیلیزه تهیه شد و پودر خشک عصاره تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۴ درجه در یخچال نگهداری شد (۱۷).

سنجش فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز (BChE)

اختلال در فعالیت آنزیم کولین استراز می‌تواند نشانه نقصان وسیع سیستم کولینرژیک مغز باشد. در مطالعه حاضر فعالیت بوتیریل کولین استراز بر اساس دستورالعمل کیت (پارس آزمون، تهران، ایران) سنجش شد. در این آزمایش آنزیم کولین استراز، بوتیریل تیوکولین را هیدرولیز کرده و تیوکولین و اسید بوتیریک آزاد می‌شود. تیوکولین آزادشده پتاسیم هگزاسیانوفرات سه‌ظرفیتی زردرنگ را به پتاسیم هگزاسیانوفرات دوظرفیتی که بی‌رنگ است، کاهش می‌دهد. سرعت کاهش رنگ زرد محلول معرف در طول موج ۴۰۵ نانومتر قابل‌اندازه‌گیری است و رابطه مستقیم با میزان فعالیت آنزیم کولین استراز دارد.

سنجش گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر (ROS)

سطوح ROS با رنگ لیئوفیلک غیرفلورسانس و دی‌کلروفلورسین دی‌استات (که به صورت غیرفعال از غشای سلولی عبور می‌کنند در حضور ROS های درون سلولی توسط آنزیم‌های استراز درون سلولی به ۷،۲- دی کلروفلورسین شکافته و ایجاد فلورسانس می‌کند) اندازه‌گیری شد. روش کار به این صورت بود که ۱۰ میکرولیتر از دی‌کلروفلورسین دی‌استات با غلظت ۱۰ میکرومولار به ۱۵۰ میکرولیتر از هموزنه بافتی اضافه شد و محلول مخلوط به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شد و میزان فلورسانس در ۴۸۸ نانومتر تحریک (جذب) و ۵۲۵ نانومتر نشر اندازه‌گیری شد (۱۸).

سنجش گلووتاتیون احیا (GSH)

برای سنجش گلووتاتیون احیا شده ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی بافت با ۰/۳ میلی‌لیتر از ۰/۲ M تریس بافر (pH=۸/۲) و ۰/۰۲ میلی‌لیتر از DTNB (۰/۰۱ مولار) در لوله آزمایش مخلوط شد 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 شد و سپس لوله‌ها در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه در RT به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. جذب نوری در طول موج ۴۱۲ نانومتر سنجیده شد (۲۰).

آنالیز آماری

تمامی داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ بیان شدند. برای بررسی توزیع داده‌ها و تأیید نرمال بودن آنها از آزمون آماری شاپیرو استفاده شد. نتایج از آزمون آماری پارامتریک آنوای یک‌طرفه و در صورت اختلاف معنادار از آزمون توکی استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها در برنامه سیگما استات انجام شد. برای رسم نمودارها از برنامه اکسل استفاده شد. در مورد تمامی یافته‌ها اختلاف در سطح $(p < 0/05)$ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

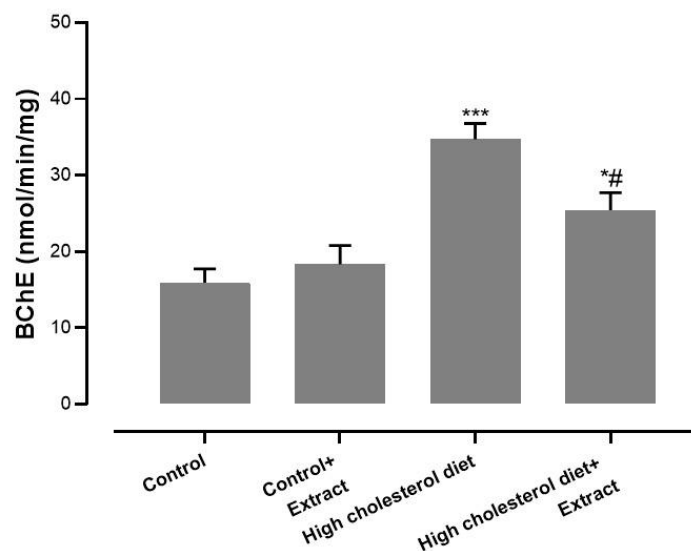
نتایج

نتایج سنجش آنزیم بوتیریل کولین استراز (BChE) با سنجش میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز بافت هیپوکمپ به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های مختلف مشخص شد که در گروه کنترل تیمار شده با عصاره انیسون یک افزایش مختصر و غیرمعنادار نسبت به گروه کنترل وجود دارد. در گروه دریافت‌کننده رژیم پرکلسترو، افزایش معنادار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز نسبت به گروه کنترل به دست آمد $(p < 0/01)$. افزایش معنادار فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز در گروه دریافت‌کننده غذای پرکلسترو و تیمار شده با عصاره انیسون نسبت به گروه کنترل مشاهده شد $(p < 0/05)$. از طرف دیگر میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز در گروه دریافت‌کننده رژیم پرکلسترو و

سنجش فعالیت کاتالاز

این آنزیم یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌های خنثی‌کننده هیدروژن پراکسید است و از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان محسوب می‌شود. در این پژوهش برای سنجش کاتالاز از کیت سنجش اختصاصی فعالیت کاتالاز شرکت کیا زیست ساخت ایران استفاده شد. در این آزمایش، کاتالاز در حضور متانول فعالیت پراکسیدازی دارد و در حضور مهارکننده خود متوقف می‌شود و فرم آلدئید تولیدی از آن با Purpald واکنش می‌دهد و رنگ بنفش تولید می‌کند که در نهایت این رنگ در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب نوری دارد. روش انجام طبق کیت پیش برده شد، به این صورت که ۲۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد بلانک (بافر لیزکننده) به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر اندازه‌گیری کاتالاز موجود در کیت به آن اضافه شد، سپس ۳۰ میکرولیتر متانول کاتالاز به نمونه‌ها افزوده و مخلوط شد. سپس ۲۰ میکرولیتر سوبسترای موجود در کیت به آن افزوده و در نهایت پلیت در ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در ادامه ۳۰ میکرولیتر از محلول STOP موجود در کیت به آنها اضافه شده و در دمای اتاق خوانده شد و در نهایت جذب‌ها با فرمولی که در کیت وجود داشت مورد مطالعه قرار گرفت (۱۹).

تیمار شده با عصاره انیسون نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول کاهش مطلوب و معناداری داشت ($p < 0.05$) (نمودار ۱ و جدول ۱).



نمودار ۱. نتایج مربوط به سنجش میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز بر حسب واحد nmol/min/mg در گروه‌های تحت بررسی بر اساس آزمون تعقیبی توکی (post hoc)

***: نسبت به گروه کنترل ($p < 0.001$)

#: نسبت به گروه کنترل ($p < 0.05$)

#: نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول ($p < 0.05$)

گروه کنترل تیمار شده با عصاره انیسون یک کاهش مختصر و غیرمعنادار نسبت به گروه کنترل وجود دارد. در گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول، کاهش معنادار کاتالاز نسبت به گروه کنترل به دست آمد ($P < 0.05$) در حالی که کاهش معنادار کاتالاز در گروه دریافت کننده غذای پرکلسترول و تیمار شده با عصاره انیسون نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. از طرف دیگر میزان کاتالاز در گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول و تیمار شده با عصاره انیسون نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پر کلسترول نیز افزایش مطلوب و معناداری نداشت (نمودار B-۲ و جدول ۱).

نتایج سنجش ROS

با سنجش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های مختلف مشخص شد که در گروه کنترل تیمار شده با عصاره انیسون یک افزایش مختصر و غیر معنادار نسبت به گروه کنترل وجود دارد. در گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول، افزایش

نتایج سنجش گلوتاتیون احیا (GSH)

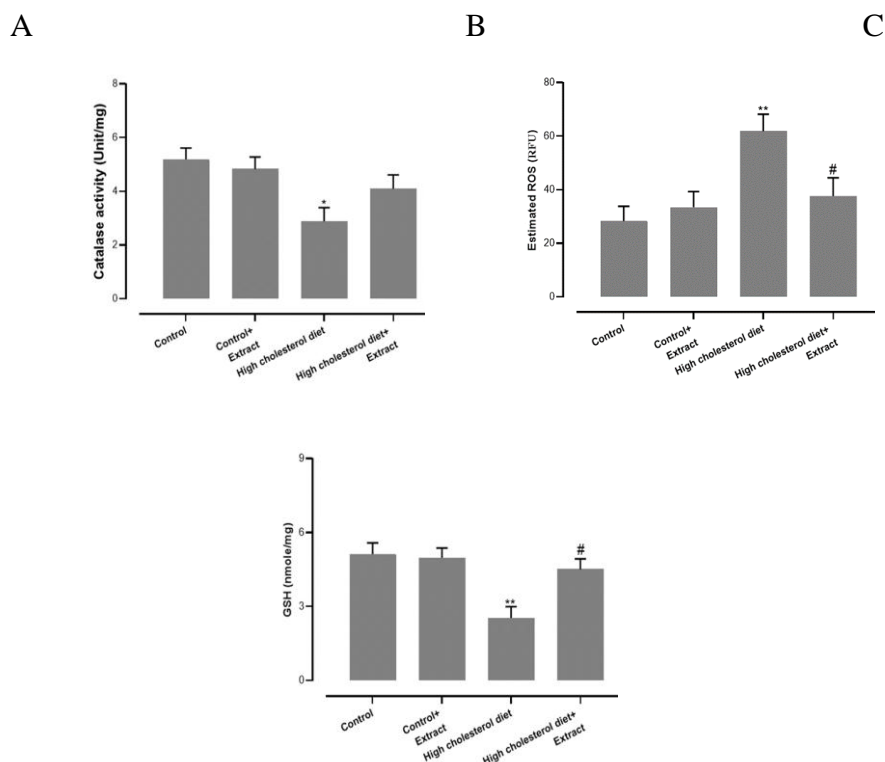
با سنجش میزان گلوتاتیون هیپوکمپ به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های مختلف مشخص شد که در گروه کنترل تیمار شده با عصاره انیسون یک کاهش مختصر و غیرمعنادار نسبت به گروه کنترل وجود دارد. در گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول، کاهش معنادار گلوتاتیون نسبت به گروه کنترل به دست آمد ($P < 0.01$)، در حالی که کاهش معنادار میزان گلوتاتیون در گروه دریافت کننده غذای پرکلسترول و تیمار شده با عصاره انیسون نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. میزان گلوتاتیون در گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول و دریافت کننده عصاره انیسون افزایش مطلوب و معناداری نسبت به گروه دریافت کننده رژیم پرکلسترول داشت ($P < 0.05$) (نمودار A-۲ و جدول ۱).

نتایج سنجش فعالیت کاتالاز

با سنجش میزان فعالیت کاتالاز به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های مختلف مشخص شد که در

طرف دیگر میزان ROS در گروه دریافت‌کننده رژیم پرکلسترول و تیمارشده با عصاره انیسون نسبت به گروه دریافت‌کننده غذای پرکلسترول کاهش مطلوب و معناداری داشت ($P < 0.05$) (نمودار ۲-C و جدول ۱).

معنادار رادیکال آزاد اکسیژن (ROS) نسبت به گروه کنترل به دست آمد ($P < 0.01$)، درحالی‌که افزایش معنادار میزان ROS در گروه دریافت‌کننده غذای پرکلسترول و تیمارشده با عصاره انیسون نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. از



نمودار ۲. نتایج مربوط به سنجش میزان گلوکوتاتیون برحسب واحد (۲-A) nmole/mg ، فعالیت کاتالاز برحسب واحد (۲-B) unit/mg ، میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن (۲-C) در گروه‌های تحت بررسی بر اساس آزمون تعقیبی توکی (*post hoc*)

#: $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل

##: $P < 0.01$ نسبت به گروه کنترل

#: $P < 0.05$ نسبت به گروه دریافت‌کننده رژیم پرکلسترول

جدول ۱: نتایج مربوط به فاکتورهای سنجش شده در تحقیق

	Control	Control+Extract	High cholesterol diet	High cholesterol diet+Extract
BChE (nmol/min/mg)	15.9±1.8 Min:11.5 Max:20.3	18.3±2.5 Min:12.1 Max:24.5	34.7±2.1 Min:29.4 Max: 39.8	25.4±2.3 Min:19.6 Max:31.2
GSH (nmol/mg)	5.1±0.4 Min:4.2 Max:6.1	4.9±0.3 Min:4.1 Max:5.7	2.5±0.4 Min:1.3 Max:3.7	4.5±0.4 Min:3.4 Max:5.5
Catalase activity (Unit/mg)	5.2±0.4 Min:4.1 Max:6.2	4.8±0.4 Min:3.7 Max:5.9	2.9±0.5 Min:1.6 Max:4.2	4.1±0.5 Min:2.8 Max:5.3
ROS (RFU)	28.3±5.5 Min:14.5 Max:42.1	33.4±5.9 Min:18.6 Max:48.1	61.8±6.4 Min:45.8 Max:77.9	37.6±6.8 Min:20.5 Max:54.7

بحث

نتایج نشان می‌دهد که نواقص شناختی می‌تواند از نتایج مهم التهاب نورونی و استرس اکسیداتیو باشد. در مقابل آنتی‌اکسیدان‌ها مکانیسم‌های دفاعی بد در برابر اکسیدان‌ها هستند که در حفظ وضعیت کاهش و حذف گونه‌های فعال و برقراری تعادل بین واکنش‌های افزایش-کاهش در بدن نقش مهمی را ایفا می‌کنند. برقراری تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی در برابر عوامل اکسیدان از طریق سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بدن مانند کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز یا تعیین مقدار محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها قابل بررسی است (۲۱-۲۳). با توجه به نتایج پژوهش حاضر رژیم پرکلسترول در طولانی‌مدت باعث افزایش آنزیم کولین استراز و رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیز کاهش نشانگرهای آنتی‌اکسیدانی در بافت مغز در گروه تیمار شده با این رژیم شد. استرس اکسیداتیو در بافت مغز باعث تخریب سیستم عصبی شده و اختلالات شناختی و نقص در حافظه را به دنبال دارد. در مطالعه‌ای که **Rajib Paul** و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام دادند، اثر رژیم پرکلسترول بر فعالیت استیل کولین استراز مغز را بررسی کردند. آنها دریافتند که رژیم غذایی پرکلسترول با کاهش فعالیت کولین استراز همراه با مهار کمپلکس میتوکندری و التهاب باعث افزایش رادیکال‌های آزاد مانند یون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های شبه هیدروکسیل در مغز و آسیب به آن شد (۲۴) که در زمینه فعالیت کولین استراز با نتیجه مطالعه حاضر مغایرت دارد ولی بقیه یافته‌ها از مطالعه ما پشتیبانی می‌کند. در مطالعه‌ای که **Yoon Sun** و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام دادند، اثر رژیم غذایی پرکلسترول بر سطح **PIP2** را بررسی کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که کلسترول بالا با افزایش بیان فسفولیپاز **(C(PLC β 1** در مغز موش، سطح **PIP2** را کاهش داد. با علم به اینکه کاهش سطح **PIP2** ارتباط نزدیکی با تولید آمیلوئید بتا دارد، می‌توان نتیجه گرفت که رژیم پرکلسترول می‌تواند در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله آلزایمر نقش داشته باشد (۲۵). در

مطالعه‌ای که **Chen** و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند، اثرات پیش و ضدالتهابی رژیم غذایی پرکلسترول بر مغز موش‌های سالخورده را بررسی کردند. برخلاف انتظار رژیم پرکلسترول زوال شناختی وابسته به سن و مرگ عصبی هیپوکمپ را تشدید نکرد. حتی بیان سیناپتوفیزین و پروتئین مربوط به رشد ۴۳ در هیپوکمپ موش‌های مسن را کاهش داد. جالب‌تر اینکه رژیم پرکلسترول نه تنها فعال‌سازی اینفلامازوم **NLRP3** و بیان **IL-1β** را بهبود بخشید، بلکه سایتوکاین‌های ضدالتهابی **IL-4** و **IL-6** و **TNF-α** در هیپوکمپ را افزایش داد (اثر پیش‌التهابی و ضدالتهابی). این تغییرات مضر و محافظتی رژیم پرکلسترول بر مغز افراد سالخورده نشان می‌دهد که کلسترول خون در افراد سالمند با زوال عقل و اختلالات شناختی مرتبط نیست (۲۶). در مطالعه‌ای که **Sigurd Hartnett** و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند کاهش کنترل عصب واگ بر قلب در موش تحت تیمار رژیم پرچرب را بررسی کردند. آنها دریافتند که رژیم غذایی پرچرب باعث افزایش آنزیم بوتیریل کولین استراز در سرم شد و مهار آن باعث بهبود پاسخ ضعیف قلب شد (۲۷). نتایج این مطالعه از یافته‌های ما پشتیبانی می‌کند.

گیاهان دارویی از منابع غنی آنتی‌اکسیدان به شمار می‌روند. گیاه انیسون از کهن‌ترین گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی ایران و ملل مختلف با دارابودن خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، آرام‌بخشی، ضدآریتمی و فشارخون و اثراتی بر سیستم عصبی مرکزی با توجه به اهمیت عصبی و تولیدمثلی است (۹).

برگر مرغ را بهبود بخشید. نتایج نشان داد که استفاده از این ماده غنی شده با انیسون، با توجه به اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن، به عنوان یک نگهدارنده طبیعی ماندگاری فرآورده های گوشتی را افزایش داده و از نظر اقتصادی به صرفه است (۲۹). نتایج این تحقیق از یافته های ما پشتیبانی می کند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف عصاره آبی-الکلی انیسون موجب کاهش فعالیت کولین استراز و استرس اکسیداتیو هیپوکمپ به دنبال دریافت رژیم پرکلسترول می شود که این احتمالاً در کاهش عوارض عصبی مرتبط می تواند سودمند باشد.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش یک مطالعه تجربی و آزمایشگاهی از نوع مداخله ای همراه با گروه شاهد روی مدل های حیوانی است که در آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشگاه شاهد با کد مصوبه کمیته اخلاق در پژوهش های پزشکی به شماره IR.SHAHED.REC.1400.114 انجام شد.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

نتایج تحقیق ما نشان داد که عصاره گیاه انیسون اثر آنتی اکسیدانی دارد. این نتایج با یافته های قبلی که از عصاره گیاهی یکسان استفاده می کردند مطابقت دارد (۲۸). در مطالعه ای که اکرم جمشیدزاده و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، اثر حفاظت کبدی عصاره انیسون در برابر سمیت ناشی از CCl₄ بررسی شد. انیسون توانست با خاصیت آنتی اکسیدانی و بهبود نشانگرهای استرس اکسیداتیو از کبد در برابر سمیت ناشی از CCl₄ محافظت کند (۱۲). نتایج این مطالعه هم راستا با یافته های تحقیق حاضر است. در مطالعه ای که علی اسدالله پور و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام دادند، تأثیر انیسون بر بیماری کبد چرب غیرالکلی در موش صحرائی را بررسی کردند. آنها دریافتند عصاره انیسون با کاهش LDL و کلسترول و افزایش HDL اثرات مفیدی در درمان کبد چرب غیرالکلی دارد. نتایج این بررسی از یافته های مطالعه حاضر پشتیبانی می کند (۱۷). در مطالعه ای که Ahmed S و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام دادند با بررسی یک سری از فعل و انفعالات پیچیده بین مواد سمی به عنوان لیگاند و آنزیم های حشرات به عنوان هدف، به خاصیت حشره کشی انیسون به عنوان یک محصول طبیعی و غیرمضر برای محیط زیست پی بردند (۲۸). در مطالعه ای که وحید مهدوی و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند تأثیر فیلم کیتوزان خوراکی غنی شده با اسانس انیسون بر ماندگاری و کیفیت همبرگر مرغ را بررسی کردند. استفاده از این ماده، اکسیداسیون لیپید را در برگر مرغ به تأخیر انداخت و خواص شیمیایی

منابع

1. Paul R, Borah A. Global loss of acetylcholinesterase activity with mitochondrial complexes inhibition and inflammation in brain of hypercholesterolemic mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-13.
2. Mokhtarzadeh Bazargani M, Naderi G, Roghani M, Esmail Jamaat E, Hasheminejad SA. Evaluating the effect of trachyspermum ammi (ajwain) hydro-alcoholic extract on oxidative stress markers and cholinesterase activity n brain of male rats fed by a high cholesterol diet. *Daneshvar Medicine*. 2021;29(1):59-69.
3. Bolouki E, Naderi G, Roghani M, Zahedi E. The effect of hydroalcoholic extract of *Ruta graveolens* on oxidative stress markers and cholinesterase in brain rats receiving high-cholesterol diet. *Daneshvar Medicine*. 2020;26(6):41-50.
4. Chauhan A, Chauhan V. Beneficial effects of walnuts on cognition and brain health. *Nutrients*. 2020;12(2):550.
5. Merelli A, Repetto M, Lazarowski A, Auzmendi J. Hypoxia, oxidative stress, and inflammation: three faces of neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2021;82(s1):S109-S26.
6. Brooks SW, Dykes AC, Schreurs BG. A high-

- cholesterol diet increases 27-hydroxycholesterol and modifies estrogen receptor expression and neurodegeneration in rabbit hippocampus. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;56(1):185-96.
7. De Boer D, Nguyen N, Mao J, Moore J, Sorin EJ. A comprehensive review of cholinesterase modeling and simulation. *Biomolecules*. 2021;11(4):580.
 8. Dong M-X, Xu X-M, Hu L, Liu Y, Huang Y-J, Wei Y-D. Serum butyrylcholinesterase activity: a biomarker for Parkinson's disease and related dementia. *BioMed research international*. 2017;2017.
 9. Lavaee F, Moghaddas A, Modarresi F, Nowrouzi M. The Effect of Pimpinella Anisum and Origanum Vulgare Extracts Against Streptococcus Sanguinis, Streptococcus Mutans, and Streptococcus Salivarius. *Journal of Dentistry*. 2022;23(2):113-20.
 10. Es-Safi I, Mechchate H, Amaghnouje A, Elbouzidi A, Bouhrim M, Bencheikh N, et al. Assessment of antidepressant-like, anxiolytic effects and impact on memory of pimpinella anisum l. Total extract on swiss albino mice. *Plants*. 2021;10(8):1573.
 11. Fitsiou E, Mitropoulou G, Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Vamvakias M, Bardouki H, et al. Phytochemical profile and evaluation of the biological activities of essential oils derived from the Greek aromatic plant species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. *Molecules*. 2016;21(8):1069.
 12. Jamshidzadeh A, Heidari R, Razmjou M, Karimi F, Moein MR, Farshad O, et al. An in vivo and in vitro investigation on hepatoprotective effects of Pimpinella anisum seed essential oil and extracts against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2015;18(2):205.
 13. Ghosh A, Saleh- e- In MM, Abukawsar MM, Ahsan MA, Rahim MM, Bhuiyan MNH, et al. Characterization of quality and pharmacological assessment of Pimpinella anisum L.(Anise) seeds cultivars. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2019;13:2672-85.
 14. Ghlissi Z, Kallel R, Krichen F, Hakim A, Zeghal K, Boudawara T, et al. Polysaccharide from Pimpinella anisum seeds: Structural characterization, anti-inflammatory and laser burn wound healing in mice. *International journal of biological macromolecules*. 2020;156:1530-8.
 15. Al Mofleh IA, Alhaider AA, Mossa JS, Al-Soohaibani MO, Rafatullah S. Aqueous suspension of anise "Pimpinella anisum" protects rats against chemically induced gastric ulcers. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2007;13(7):1112.
 16. Haddadzadeh Niri N, Khalili M, Taleahmad F, Joneidi E, Roghani M. The effect of diosgenin on mitochondrial health and neutrophil infiltration indices in methotrexate-induced liver damage in the rat. *Daneshvar Medicine*. 2022;30(3):62-71.
 17. Asadollahpoor A, Abdollahi M, Rahimi R. Pimpinella anisum L. fruit: Chemical composition and effect on rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2017;22.
 18. Jin C, Miao X, Zhong Y, Han J, Liu Q, Zhu J, et al. The renoprotective effect of diosgenin on aristolochic acid I-induced renal injury in rats: impact on apoptosis, mitochondrial dynamics and autophagy. *Food & function*. 2020;11(9):7456-67.
 19. Binesh A, Devaraj SN, Halagowder D. Atherogenic diet induced lipid accumulation induced NF κ B level in heart, liver and brain of Wistar rat and diosgenin as an anti-inflammatory agent. *Life Sci*. 2018;196:28-37.
 20. Dawson NJ, Storey KB. Passive regeneration of glutathione: glutathione reductase regulation in the freeze-tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica*. *The Journal of experimental biology*. 2017;220(Pt 17):3162-71.
 21. Fidèle N, Joseph B, Emmanuel T, Théophile D. Hypolipidemic, antioxidant and anti-atherosclerogenic effect of aqueous extract leaves of *Cassia. occidentalis* Linn (Caesalpinaceae) in diet-induced hypercholesterolemic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017;17(1):1-11.
 22. Kim M-H, Lee E-J, Cheon J-M, Nam K-J, Oh T-H, Kim K-S. Antioxidant and hepatoprotective effects of fermented red ginseng against high fat diet-induced hyperlipidemia in rats. *Laboratory animal research*. 2016;32:217-23.
 23. Sofic E, Salkovic-Petrisic M, Tahirovic I, Sapcanin A, Mandel S, Youdim M, et al. Brain catalase in the streptozotocin-rat model of sporadic Alzheimer's disease treated with the iron chelator-monoamine oxidase inhibitor, M30. *Journal of Neural Transmission*. 2015;122:559-64.
 24. Paul R, Borah A. Global loss of acetylcholinesterase activity with mitochondrial complexes inhibition and inflammation in brain of hypercholesterolemic mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):17922.
 25. Chun YS, Chung S. High-Cholesterol Diet Decreases the Level of Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate by Enhancing the Expression of Phospholipase C (PLC β 1) in Rat Brain. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1161.
 26. Chen Y, Yin M, Cao X, Hu G, Xiao M. Pro- and anti-inflammatory effects of high cholesterol diet on aged brain. *Aging and disease*. 2018;9(3):374.
 27. Hartnett S, Gao H, Schnack S, Li Y. Reduced vagal control of the heart in high-fat diet

- mice: a potential role of increased butyrylcholinesterase. *Physiological Reports*. 2015;3(11):e12609.
28. Ahmed IAM, Matthäus B, Özcan MM, Al Juhaimi F, Ghafoor K, Babiker EE, et al. Determination of Bioactive Lipid and Antioxidant Activity of *Onobrychis*, *Pimpinella*, *Trifolium*, and *Phleum* spp. Seed and Oils. *Journal of Oleo Science*. 2020;69(11):1367-71.
29. Mahdavi V, Hosseini SE, Sharifan A. Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. *Food science & nutrition*. 2018;6(2):269-79.