Research Paper

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

Motahareh Mokhtarzadeh Bazargani[1], Gholamali Naderi[2]*, Mehrdad Roghani[3], Elham Esmaeil_Jamaat [4], Seyed Abbas Hasheminejad[5]

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. School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
5. Department of Persian Medicine, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

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

Citation: Bazargan M, Naderi Gh, Roghani M, Esmaeil Jamaat E, Hasheminejad A. 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.
doi: 10.22070/DANESHMED.2021.12757.0

Abstract

Background and Objective: The brain is exceptionally susceptible to oxidative stress that may be caused by a high cholesterol diet. Hypercholesterolemia and oxidative stress are the major risk factors for many diseases such as cognitive abnormalities and various central nervous system disorders. This study aimed to evaluate the antioxidant and enzyme modulation activities of hydro-alcoholic extract of Trachyspermum ammi in the brain homogenates of adult Wistar rats.

Materials and methods: In this experimental study, 28 male rats in the weight range of 190-220 g were divided into four different groups including control, Control plus Ajwain extract, HF, and Ajwain extract-treated high cholesterol-fed groups. Rats were fed a high-cholesterol diet (high-fat group) or a normal diet (control group) for eight weeks. The extract was injected intraperitoneally into rats at a dose of 250 mg/kg weight for three weeks once a day. The activity of butyrylcholinesterase (BChE), catalase (CAT), reduced glutathione (GSH), and reactive oxygen species (ROS) activities were measured by relevant kits in homogenous tissue of the rat brain. Finally, the results were analyzed by one-way ANOVA statistical test.

Results: Our study showed that the levels of BChE, Catalase, GSH significantly reduced in the high-fat group compared to the control group after eight weeks and the ROS levels significantly increased in the high-fat group compared to the control ($p<0.01$). Levels of BChE, catalase and reduced glutathione were significantly increased compared to the high-fat group after treatment with Ajwain extract ($p <0.01$).

Conclusion: Antioxidants and anticholinesterase inhibitors may provide appropriate therapies that improve oxidative stress and reduced cognitive function associated with neurodegenerative diseases.

Keywords: *Trachyspermum ammi* (Ajwain), Oxidative stress, Cholinesterase, Hypercholesterolemia

Received: 23 Dec 2020
Last revised: 01 Mar 2021
Accepted: 06 Feb 2021

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر عصاره آبی الکلی زنیان بر روی شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آنزیم کولین استراز در بافت مغز موش‌های صحرایی نر دریافت کننده رژیم پر کلسترول

نویسندگان: مطهره مختارزاده بازرگانی[۱]، غلامعلی نادری[۲*]، مهرداد روغنی[۳]، الهام اسماعیل جماعت[۴]، سید عباس هاشمی نژاد[۵]

۱. دانش آموخته پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. استاد گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
٤. دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۵. گروه طب سنتی ایرانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

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

دریافت: ۹۹/۱۰/۰۳
آخرین اصلاح‌ها: ۹۹/۱۲/۱۱
پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۶

چکیده

مقدمه و هدف: رژیم پرکلسترول مغز را به طور فزاینده‌ای در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌دهد. افزایش کلسترول و استرس اکسیداتیو از فاکتورهای خطر اصلی برای بسیاری از بیماریها از قبیل ناهنجاریهای شناختی و انواع مختلف اختلالات سیستم عصبی مرکزی است. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیتهای آنتی‌اکسیدانتی و تنظیم آنزیمی عصاره آبی الکلی زنیان دربافت هموژنه مغز موشهای نر ویستار بالغ می‌باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ۲۸ موش آزمایشگاهی بزرگ نر در محدوده وزنی ۲۲۰-۱۹۰ گرم به چهار گروه مختلف شامل کنترل، کنترل + عصاره زنیان، پرچرب و پرچرب + عصاره زنیان تقسیم شدند. موش‌ها با رژیم پرکلسترول (گروه پرچرب) یا غذای نرمال (گروه کنترل) به مدت هشت هفته تغذیه شدند. عصاره با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت سه هفته و روزی یک بار از طریق داخل صفاقی به موشها تزریق شد. فعالیت آنزیم‌های بوتیریل کولین استراز (BChE)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون احیا (GSH) و گونه‌های اکسیژن غیرفعال (ROS) توسط کیت‌های مربوطه در بافت هموژنه مغز موش‌ها اندازه‌گیری شد. در انتها، نتایج توسط تست آماری آنوای یک طرفه آنالیز شد.

نتایج: مطالعه ما نشان داد که سطوح بوتیریل کولین استراز، کاتالاز و گلوتاتیون احیا بعد از هشت هفته به طور معناداری در گروه پرچرب نسبت به گروه کنترل کاهش و سطوح ROS به طور معناداری در گروه پرچرب نسبت به کنترل افزایش یافته است ($p<0/01$). سطوح بوتیریل کولین استراز، کاتالاز و گلوتاتیون احیا به دنبال تیمار با عصاره زنیان به طور معناداری نسبت به گروه پرچرب افزایش یافته است ($p<0/01$).

نتیجه گیری: ویژگیهای آنتی اکسیدانتی و آنتی کولین استرازی زنیان ممکن است روش درمانی مطلوبی ایجاد کند که از این طریق، استرس اکسیداتیو و کاهش عملکرد شناختی مرتبط با بیماریهای تحلیل برنده‌ی عصبی بهبود یابند.

کلید واژه‌ها: زنیان، استرس اکسیداتیو، کولین استراز، رژیم پرکلسترول

مقدمه

در طول سالهای گذشته مصرف رژیم غذایی پرچرب در بین مردم به طور معناداری افزایش پیدا کرده است که این فرآیند منجر به مشکلات مختلفی ازجمله سندروم متابولیک و چاقی شده است. چاقی به نوبه‌ی خود موجب افزایش فشار خون، افزایش سطح کلسترول و دیابت نوع ۲ می‌شود (۱،۲). همچنین مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مصرف رژیم غذایی پرکلسترول فاکتور خطر مهمی برای ابتلا به انواع دمانس از جمله دمانس عروقی و بیماری آلزایمر می‌باشد (۳). همچنین اثرات مرکزی روی فرآیندهای شناختی دارد و موجب نقص در حافظه و یادگیری می‌شود (۵،٤). یادگیری فرآیند کسب اطلاعات جدید از محیط اطراف است و نگهداری و بازیابی این اطلاعات حافظه نامیده می‌شود. کاهش عملکرد سیستم کولینرژیک در مغز، افزایش استرس اکسیداتیو، واکنش‌های التهاب نورونی و افزایش کلسترول نقش عمده‌ای در اختلال حافظه ایفا می‌کند (٦). کاهش ناقل عصبی استیل کولین در شکاف سیناپسی با کاهش کولینرژیک در مغز و به دنبال آن با کاهش شناختی همراه می باشد. شواهدی وجود دارند دال بر اینکه مهارکننده‌های کولین استراز ارتباط مستقیمی با بهبود توانایی‌های شناختی دارند؛ بنابراین بازیابی سطح استیل کولین از طریق مهار استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز، راه درمانی مؤثری می‌باشد (۷). بوتیریل کولین استراز یک سرین هیدرولاز است که قادر به هیدرولیز کردن استرهای کولین می‌باشد. بوتیریل کولین استراز، آنزیمی با ویژگیهای منحصر به فرد است که به طور گسترده در سیستم عصبی توزیع شده است و در عملکرد نورونی بسیار مؤثر می‌باشد (۱). از سوی دیگر مغز، به علت مصرف زیاد اکسیژن، مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع و رژیم غذایی پرچرب، وجود فلزهای اکسایش-کاهش فعال مثل آهن و مس و در مقابل، ذخایر ناچیز آنتی‌اکسیدانتی در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر می‌باشد. استرس اکسیداتیو در نتیجه‌ی افزایش سطوح اکسیدان‌ها و کاهش سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها رخ می‌دهد. گونه‌های اکسیژن غیرفعال Reactive oxygen species (ROS)، ترکیبات اکسیژن‌داری هستند که توسط مسیرهای متابولیک تولید می‌شوند و آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA القا می‌کنند. تولید خارج از حد و نامتعادل گونه‌های اکسیژن غیرفعال ممکن است موجب افزایش استرس اکسیداتیو شود که می‌تواند منجر به مرگ نورونی از طریق القای آپوپتوز یا نکروزیس شود. مقالات بسیاری حاکی از ارتباط بین تولید گونه‌های اکسیژن غیرفعال و اختلالات تحلیل برنده‌ی عصبی دارند (۹،۸،۲،۱). عوامل حذف کننده اثرات مضر محصولات اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان نامیده می‌شوند. اجزای آنزیمی سیستم آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز می‌باشند و از اجزای غیر آنزیمی نیز می‌توان آلبومین، یوریک اسید، بیلی‌روبین، ویتامین E، ویتامین C و بتاکاروتن را نام برد (۱۱-۹). از این رو محققان علاقه‌مند به کشف عوامل درمانی جدیدی در گیاهان دارویی هستند. تولیدات گیاهی به طور معمول کمتر سمی هستند و عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند. توانایی بالقوه‌ی درمان و پیشگیری داروهای گیاهی موضوع مطالعات بسیار گسترده می‌باشد. در واقع بسیاری از مواد مؤثره‌ی طبیعی کشف شده‌اند که دارای ویژگیهای مختلف درمانی می‌باشند (۱۲،۹،۲). گیاه زنیان (*Trachyspermum* Ammi) یا (*Ajwain*) به عنوان طعم دهنده و چاشنی در غذاهای مردم کشورهای مختلف از جمله ایران، هند و پاکستان استفاده می‌شود. این گیاه به لحاظ پزشکی بسیار با ارزش است و در درمان انواع بیماریها در انسان و حیوان کاربرد دارد. گزارش شده است که گیاه دارای فعالیتهای آنتی‌اکسیدانتی، ضدمیکروبی، ضد درد، ضد سموم، کاهنده‌ی چربی و تنظیم فعالیت آنزیمی می‌باشد (۱٦-۱۲). تیمول (*Thymol*) و کارواکارول (*Carvacarol*) ترپنوئیدهای اصلی گیاه زنیان می‌باشند که فعالیت آنزیم کولین استراز را تنظیم می‌کند. به علاوه دانه‌های گیاه دارای ویژگیهای ضد افزایش چربی خون و آنتی اکسیدانتی است (٦). طبق اطلاعات ذکر شده، مطالعه‌ی حاضر برای بررسی اثر عصاره‌ی آبی الکلی گیاه زنیان بر روی آنزیم‌های استرس اکسیداتیو (کاتالاز،

گلوتاتیون احیا)، ROS و آنزیم بوتیریل کولین استراز در بافت هموژنه‌ی مغز موش آزمایشگاهی بزرگ طراحی شده است.

مواد و روش ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی و آزمایشگاهی از نوع مداخله ای همراه با گروه شاهد بر روی مدل‌های حیوانی می‌باشد که در آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشگاه شاهد با کد مصوبه کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی به شماره ۱۳۹۵,۲۲۳ انجام شد. در این مطالعه از ۲۸ سر موش آزمایشگاهی بزرگ نر سفید، نژاد ویستار خریداری شده از انستیتو پاستور در محدوده وزن ۲۲۰-۱۹۰ گرم استفاده شد. موش‌ها در مرکز پرورش و نگهداری دانشکده، در دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد با شرایط روشنایی و تاریکی طبیعی در گروه‌های ۵ تا ۷ تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوانات به طور آزادانه به آب لوله کشی و غذای مخصوص موش، تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس دسترسی داشتند. روش نمونه گیری تصادفی و ابزار گردآوری داده‌ها شامل آزمایش‌ها تجربی بود. متغیرهای مورد مطالعه در جدول ۳-۱ آورده شده است.

در این مطالعه ۲۸ سر موش آزمایشگاهی بزرگ نر به صورت تصادفی به ٤ گروه مساوی به ترتیب گروه‌های کنترل، شم کنترل (تحت رژیم غذایی پرچرب)، زنیان و گروه تحت تیمار با رژیم غذایی پرچرب و نیز عصاره زنیان تقسیم شدند. به گروههای کنترل و زنیان غذای معمولی به مدت ۸ هفته داده شد و به دو گروه دیگر به مدت ۸ هفته غذای پر کلسترول (High Fat) کلسترول ۱٪ و اسیدکولیک ۰/۲۵٪ داده شد (۱۷). پس از ۸ هفته به گروه های غیر از کنترل و شم کنترل عصاره زنیان با غلظت ۲۵۰ mg/kg به مدت ۳ هفته به طور داخل صفاقی تزریق شد و برای گروه شم کنترل فقط غذای پرکلسترول تا انتهای سه هفته ادامه داده شد.

در انتهای زمان تغذیه با رژیم پرچرب و انتهای زمان تزریق عصاره‌ها خون‌گیری از چشم کلیه موش‌ها انجام گرفت و پس از سانتریفوژ، نمونه‌های سرم‌ها جهت انجام آزمایشات چربی، در فریزر نگهداری شدند.

استخراج عصاره آبی الکلی زنیان به روش ماسراسیون انجام شد (۱۸). در این روش ۱۰۰ گرم پودر دانه خشک گیاه زنیان در ۵۰۰ میلی لیتر حلال متانول خیسانده شده و بعد از ۷۲ ساعت توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ با قطر ۱۵۰ میکرومتر فیلتر شده و با استفاده از دستگاه بن ماری در دمای ۷۰ درجه آب آن جدا گردید. سپس عصاره لیوفیلیزه تهیه شده و پودر خشک عصاره تا زمان انجام آزمایشات در دمای ٤ درجه در یخچال نگهداری شد (۱۹، ۲۰).

بعد از اتمام کار، موش‌ها با دی اتیل اتر بیهوش شدند و سر حیوانات توسط گیوتین جدا و مغز به طور کامل از جمجمه خارج گردید. هموژنه بافت مغز با استفاده از دستگاه هموژنایزر تهیه شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا بافت مغز توزین شد و سپس نرمال سالین ۰/۹ درصد متناسب با وزن هر بافت مغزی به آن اضافه شد و به مدت دو دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور ۵۰۰۰ در دقیقه هموژنیزه گردید و مجدداً محلول هموژنیزه شده، توسط سانتریفوژ یخچال دار با دور ۳۰۰۰ در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به منظور جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل بالا در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد صورت گرفته شد. پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محتویات جدا و درون میکروتیوب دو سی سی جمع آوری شد و از این محلول برای سنجش فعالیت آنزیم کولین استراز، ROS و کاتالاز و گلوتاتیون استفاده گردید (۲۱).

اختلال در فعالیت آنزیم کولین استراز می‌تواند نشانه نقصان وسیع سیستم کولینرژیک مغز باشد. برای اندازه‌گیری فعالیت بوتیریل کولین استراز، از روش المان Ellman استفاده می‌شود، به طور خلاصه ۰/٤ میلی لیتر از محلول هموژن بافتی رقیق شده به کووت حاوی ۲/٦ میلی لیتر 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 در طول موج ٤۱۲ نانومتر قرائت شده و پس از گذشت ۲ دقیقه، جذب را صفر و ۲۰

میکرو لیتر سوبسترا به آن اضافه گردید. تغییرات جذب در هر دو دقیقه تا ۱۰ دقیقه ثبت شده و بر اساس روش المن میزان فعالیت کولین استراز محاسبه گردید (۲۱).

سطوح ROS با رنگ لیپوفیلیک غیرفلورسانس، دی کلروفلورسین دی استات، (که به صورت غیر فعال از غشای سلولی عبور می‌کند در حضور ROS های درون سلولی توسط آنزیم‌های استراز درون سلولی به ۲،۷-دی کلروفلورسین شکافته و ایجاد فلورسانس می‌کند)، اندازه‌گیری شد. روش کار به این صورت بود که ۱۰ میکرو لیتر از دی کلروفلورسین دی استات با غلظت ۱۰ میکرومولار به ۱۵۰ میکرولیتر از هموژنه بافتی اضافه شد و محلول مخلوط به مدت ٤۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه گردید و میزان فلورسانس در ٤۸۸ نانومتر تحریک (جذب) و ۵۲۵ نانومتر نشر اندازه گیری شد (۲۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با روش اسپکتروفوتومتری درطول 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.

معرف‌ها شامل ۰/۰۵ مول بافر فسفات با pH=۷ که خود نیز شامل ۱۵/٤ میلی لیتر از K_2HPO_4 با غلظت ۰/۱ مولار و ۹/٦ میلی لیتر از KH_2PO_4 با غلظت ۰/۱ مولار بود که حجم آن با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر می‌رسد. همچنین پراکسید هیدروژن ۰/۰۵۹ مولار (۳۰٪) در بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH مساوی ۷ تهیه گردید. طبق روش کار ابتدا در داخل کووت، ۱/۹ میلی لیتر معرف و ۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۰۵۹ مولار اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه آن انکوبه، سپس ۰/۱ میلی لیتر از هموژنه بافتی اضافه شد و تغییرات جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر برای ۲ دقیقه ثبت گردید (۲۳).

جهت سنجش گلوتاتیون احیا شده ۰/۱ میلی لیتر از مایع رویی بافت با ۰/۳ میلی لیتر از M ۰/۲ تریس بافر (۸/۲ =pH) و ۰/۰۲ میلی لیتر از DTNB ۰/۰۱M در لوله آزمایش مخلوط گردید و به این مخلوط ۱/۵۸ میلی لیتر متانول مطلق تا حجم ۲ میلی لیتر 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 و سپس لوله‌ها در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه در RT به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. جذب نوری در طول موج ٤۱۲ نانومتر سنجیده شد. رنگ به دست آمده به مدت یک ساعت پایدار است (۲٤).

تمامی‌داده‌ها 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 انجام شد. جهت رسم نمودارها از برنامه اکسل استفاده گردید. در مورد کلیه یافته‌ها اختلاف در سطح $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

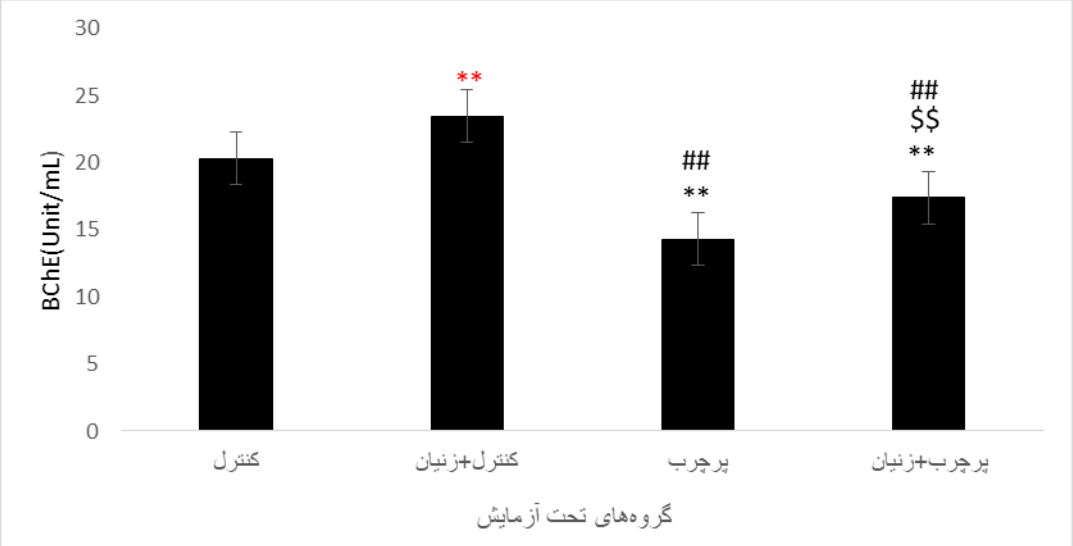
جدول ۱ سطوح پروفایل چربی را بعد از هشت هفته تغذیه با رژیم پرکلسترول نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود تغذیه با رژیم پرکلسترول به مدت هشت هفته سطوح تری گلیسیرید، کلسترول تام و کلسترول LDL را در گروه پرچرب نسبت به گروه کنترل افزایش و سطح کلسترول HDL را در گروه پرچرب نسبت به گروه کنترل کاهش داده است. تیمار گروه پرچرب با عصاره زنیان سطح HDL را در گروه D در مقایسه با گروه C به طور معناداری افزایش داده است. از سوی دیگر سطوح تری گلیسرید، کلسترول تام و کلسترول LDL در گروه D در مقایسه با گروه C کاهش معنادار داشته است.

جدول ۱- سطوح پروفایل چربی در گروه‌های مختلف

گروه حیوانی / نوع چربی	کنترل A	کنترل+زنیان B	رژیم پرچرب C	رژیم پرچرب+زنیان D
تری گلیسیرید (mg/dl)	۶۰/۲۰۲±۸/۱۲	۱۸۳/۳±۸/۱۶	۲۳۳/۵±۳/۱۶*	۲۰۵/۶±۸/۵۷**
کلسترول تام (mg/dl)	۷۳/۸±۱/۹	۷۲/۴۴±۱/۴	۹۶/۲۴±۲/۸۷*	۸۳/۰۳±۲/۱۱**
کلسترول HDL(mg/dl)	۶۲/۸±۲/۱۳	۷۴/۲۸±۲/۳۶	۲۱/۰۵±۱/۰۴*	۴۱/۸±۱/۳۰**
کلسترول LDL(mg/dl)	۴۰/۷±۲/۵۵	۳۷/۴±۱/۶۱	۵۶/۹±۲/۵۱*	۴۷/۳±۱/۸۲**

داده‌ها به صورت Mean ± SEM ارائه شده است.(n=۷ در هر گروه) *p<۰/۰۵ در مقایسه با کنترل، **p<۰/۰۱ در مقایسه با گروه پرچرب

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 زنیان افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل دارد (p<۰/۰۱) و در گروه پرچرب کاهشی بارز و معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود (p<۰/۰۱). گروه پرچرب تیمار شده با زنیان افزایش معنادار فعالیت این آنزیم را در مقایسه با گروه پرچرب نشان می‌دهد (p<۰/۰۱) و این مؤلفه در گروه پرچرب کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل تحت تیمار با زنیان دارد (p<۰/۰۱).



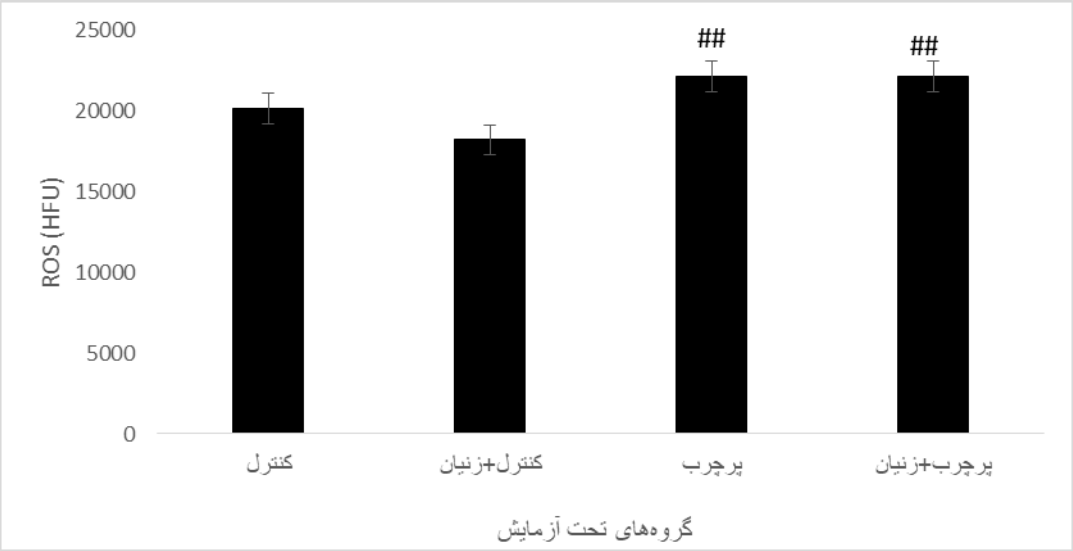
نمودار ۱. نتایج به دست آمده از میزان فعالیت بوتیریل کولین استراز در گروه‌های مختلف

**: p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل

$$: p<۰/۰۱ نسبت به گروه پرچرب

##: p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل + زنیان

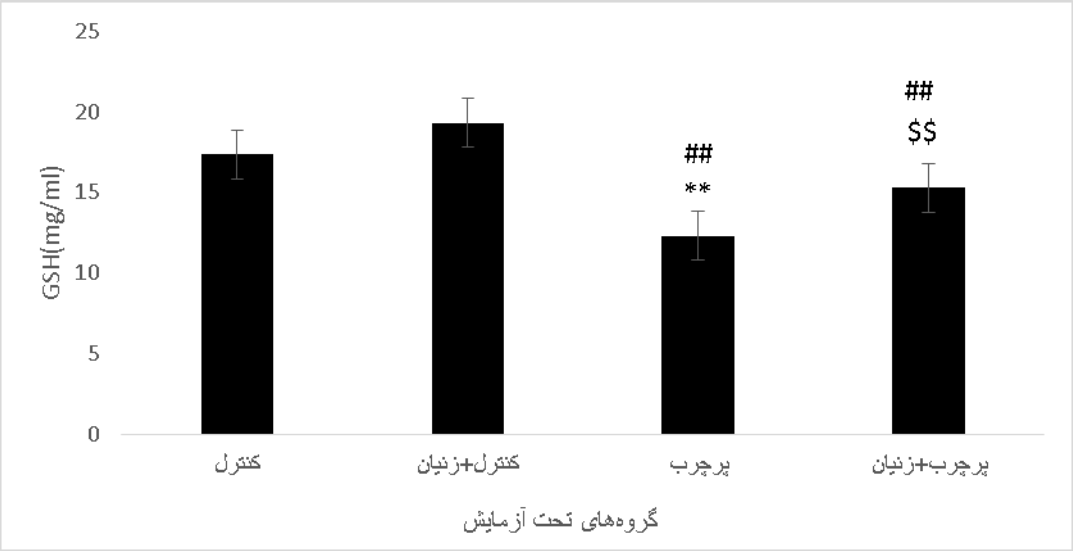
نمودار ۲ نتایج مربوط به شدت فلورسانس (AFU) مربوط به میزان ROS به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در بافت هموژنیزه هیپوکمپ موش‌های گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. این پارامتر در گروه پرچرب و پرچرب تیمار شده با زنیان افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل تحت تیمار با زنیان نشان می‌دهد (p<۰/۰۱).



نمودار ۲. شدت فلورسانس (AFU) مربوط به میزان ROS به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در بافت هموژنیزه هیپوکمپ در گروه‌های مختلف

##: p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل + زنیان

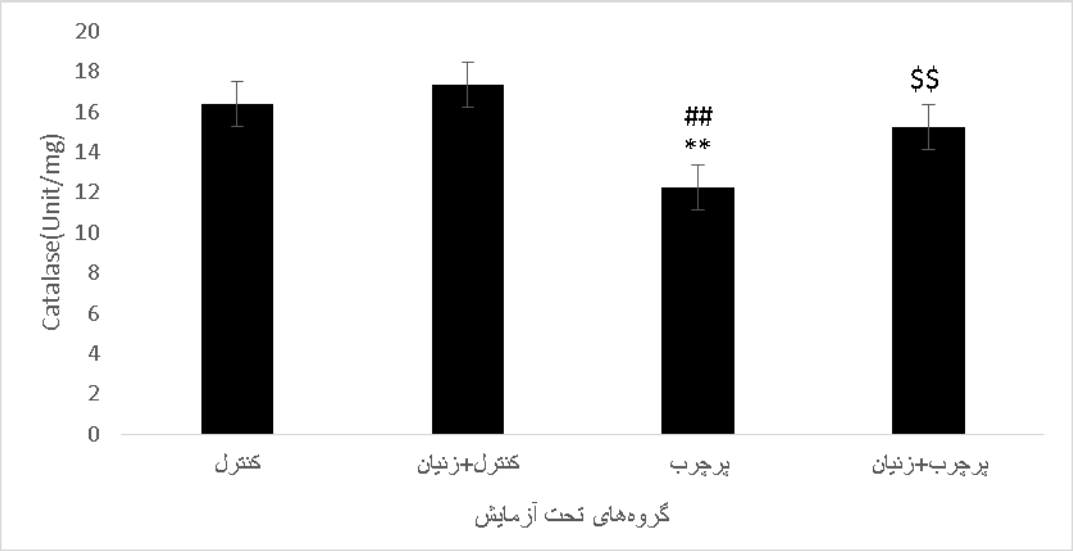
نمودار ۳ نتایج مربوط به میزان گلوتاتیون احیا در بافت هموژنیزه هیپوکمپ موش‌های گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. در گروه پرچرب کاهش معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (p<۰/۰۱) و در گروه پرچرب تیمار شده با زنیان نیز یک افزایش معنا دار در مقایسه با گروه پرچرب وجود داشت (p<۰/۰۱). به علاوه در گروه‌های پرچرب و پرچرب تحت تیمار با زنیان کاهش معنا دار نسبت به گروه کنترل تحت تیمار با زنیان مشاهده می‌شود (p<۰/۰۱).



نمودار ۳: میزان گلوتاتیون احیا (GSH) در بافت هموژنیزه هیپوکمپ در گروه‌های مختلف

**: p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل $$: p<۰/۰۱ نسبت به گروه پرچرب ##: p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل + زنیان

نمودار ٤ نتایج مربوط به فعالیت آنزیم کاتالاز که شاخصی از سیستم دفاع آنتی اکسیدان از نوع آنزیمی می‌باشد در بافت هموژنیزه هیپوکمپ موش‌های گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در گروه پرچرب این پارامتر کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد (p<۰/۰۱). به علاوه فعالیت این آنزیم در گروه پرچرب تحت تیمار با زنیان در مقایسه با گروه پرچرب افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد می‌دهد (p<۰/۰۱) و در گروه پرچرب نسبت به گروه کنترل تحت تیمار با زنیان کاهش معنا دار دیده می‌شود می‌دهد (p<۰/۰۱).



نمودار ٤: میزان فعالیت کاتالاز در بافت هموژنیزه هیپوکمپ در گروه‌های مختلف

**: p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل $$: p<۰/۰۱ نسبت به گروه پرچرب ##: p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل + زنیان

بحث

افزایش کلسترول خون از ریسک فاکتورهای عمده سه اختلال آترواسکلروز و بیماریهای قلبی و عروقی، افزایش فشارخون و انواع دیابت می‌باشد که می‌تواند این اثر را از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو ناشی از آن اعمال نماید (۳). نتایج نشان می‌دهد که التهاب نورونی و استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ موش‌ها به نواقص شناختی منجر می‌شود (۳, ٦, ۷). در مقابل آنتی اکسیدان‌ها 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. میزان تعادل سیستم آنتی اکسیدانی در برابر عوامل اکسیدان از طریق سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در بدن مانند کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز یا تعیین مقدار محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها قابل بررسی است (۲, ۹, ۱۱). از منابع غنی آنتی اکسیدان برون زاد می‌توان به گیاهان دارویی اشاره نمود. گیاه زنیان از کهن ترین 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 می‌باشد (۱۲-۱۵). با توجه به اهمیت دیس لیپیدمی و استرس اکسیداتیو ناشی از آن و البته محدودیت مطالعات انجام شده، هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره آبی الکلی گیاه زنیان بر روی شاخص‌های استرس اکسیداتیو و کولین استراز در بافت مغز موش‌های دریافت کننده رژیم پرکلسترول می‌باشد.

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 که با مطالعات Van Lith و همکاران هم‌راستا می‌باشد. آنها در مطالعه‌ی خود نشان دادند که رژیم غذایی پرکلسترول فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز را در سرم خون موش آزمایشگاهی بزرگ کاهش می‌دهد؛ بنابراین یافته آنها به این نتیجه رسیدند که بوتیریل کولین استراز در متابولیسم لیپید درگیر است (۲۵). درمان موش‌های رژیم پرچرب با عصاره زنیان توانست موجب افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه پرچرب گردد. نتایجی که با مطالعات Asif, Hafiz و همکاران مطابقت دارد. آنها در بخشی از این مطالعه فعالیت تنظیم آنزیمی گیاه زنیان را نشان دادند (۱۲). میزان ROS به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های پرچرب افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که با مطالعات Amin, K. A و همکاران مطابقت دارد. آنها اختلال اکسیداتیو در مغز موش‌های تغذیه شده با رژیم پرچرب را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که تغذیه‌ی حیوان با رژیم پرچرب به علت فعالیت مسیر بیوشیمیایی و تسریع لیپید پراکسیداسیون به طور معناداری باعث افزایش سطوح ROS می‌شود (۱). میزان گلوتاتیون احیا در گروه پرچرب کاهشی معنادار در مقایسه با گروه کنترل داشت و درمان موش‌های پرچرب با زنیان باعث افزایش معنادار این پارامتر در مقایسه با گروه پرچرب گردید. فعالیت کاتالاز نیز که شاخصی از سیستم دفاع آنتی اکسیدان از نوع آنزیمی می‌باشد در گروه پرچرب کاهش معنادار در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. به علاوه فعالیت این آنزیم پس از درمان موش‌ها در گروه پرچرب تحت تیمار با زنیان در مقایسه با گروه پرچرب یک افزایش معنادار نشان داد. Kim و همکارانش طی مطالعه‌ای نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانتی کاتالاز و گلوتاتیون احیا در گروههای دریافت کننده رژیم پرچرب کاهش معنادار یافته است که هم راستا با مطالعه‌ی حاضر است. (۹). مطالعات مختلفی در رابطه با اثرات آنتی اکسیدانتی گیاه زنیان انجام شده است. در این رابطه Goswami, N و همکاران پتانسیل جاروبگری رادیکال‌های آزاد گیاه زنیان و رازیانه را بررسی کردند. آنها نشان دادند که این گیاه دارای خواص آنتی اکسیدانتی قوی می‌باشد که ناشی از پلی فنول‌های موجود در گیاه است و سلولها را از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۲۶). در مطالعه‌ی دیگر Singh, A و همکاران اثر گیاه زنیان را روی تومور اپیتلیال پوست و معده‌ی موش مورین بررسی کردند و نشان دادند که میزان گلوتاتیون ردوکتاز و کاتالاز در گروههایی که عصاره دانه گیاه زنیان دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. افزایش فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون احیا در این ازمایش پس از تزریق عصاره، انتظار می‌رود به علت قابلیت سمیت زدایی عصاره گیاه زنیان در حذف و سمیت زدایی گونه‌های غیرفعال اکسیزن و سایر متابولیت‌های غیرفعال باشد که منجر به حفاظت بر علیه استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۷).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که سطوح بوتیریل کولین استراز، کاتالاز و گلوتاتیون احیا بعد از هشت هفته به طور معناداری در گروه پرچرب نسبت به گروه کنترل کاهش و سطوح ROS به طور معناداری در گروه پرچرب نسبت به کنترل افزایش یافته است. سطوح بوتیریل کولین استراز، کاتالاز و گلوتاتیون احیا به دنبال تیمار با عصاره زنیان به طور معناداری نسبت به گروه پرچرب افزایش یافته است.
بنابراین می‌توان اعلام کرد که عصاره آبی–الکلی دانه‌ی گیاه زنیان می‌تواند اثرات آنتی اکسیدانتی و حفاظت عصبی داشته باشد و پیشنهاد کننده پتانسیل درمانی مناسب این گیاه به دنبال اختلالات ناشی از افزایش کلسترول خون می‌باشد.

منابع

1. Amin KA, Kamel HH, Abd Eltawab MA. The relation of high fat diet, metabolic disturbances and brain oxidative dysfunction: modulation by hydroxy citric acid. Lipids in Health and Disease 2011;10:74.

2. Fidele N, Joseph B, Emmanuel T, Theophile D. Hypolipidemic, antioxidant and anti-atherosclerogenic effect of aqueous extract leaves of Cassia. occidentalis Linn (Caesalpiniaceae) in diet-induced hypercholesterolemic rats. BMC Complementary and Alternative Medicine 2017;17(1):76.

3. Neha, Kumar A, Jaggi AS, Sodhi RK, Singh N. Silymarin ameliorates memory deficits and neuropathological changes in mouse model of high-fat-diet-induced experimental dementia. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2014;387(8):777-87.

4. Kosari S, Badoer E, Nguyen JC ,Killcross AS, Jenkins TA. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. Behavioural brain research. 2012;235(1):98-103.

5. Morganstern I, Ye Z, Liang S, Fagan S, Leibowitz SF. Involvement of cholinergic mechanisms in the behavioral effects of dietary fat consumption. Brain Research 2012;1470:24-34.

6. Soni K, Parle M. Trachyspermum ammi seeds supplementation helps reverse scopolamine, alprazolam and electroshock induced amnesia. Neurochemical Research 2017;42(5):1333-1344.

7. Ogunruku OO, Oboh G, Ademosun AO. Water extractable phytochemicals from peppers (Capsicum spp.) Inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities and prooxidants induced lipid peroxidation in rat brain In vitro. International Journal of Food Science 2014:605618.

8. Salvati S, Attorri L, Di Benedetto R, Fortuna S, Di Biase A. Micronutrient-enriched rapeseed oils improve the brain oxidant/antioxidant system in rats fed a high-fat diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011;59(9):4483-8.

9. Kim MH, Lee EJ, Cheon JM, Nam KJ, Oh TH, Kim KS. Antioxidant and hepatoprotective effects of fermented red ginseng against high fat diet-induced hyperlipidemia in rats. Laboratory Animal Research 2016;32(4):217-23.

10. Pocernich CB, Butterfield DA. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 2012;1822(5):625-30.

11. 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(4):559-64.

12. Asif HM, Sultana S, Akhtar N. A panoramic view on phytochemical, nutritional, ethanobotanical uses and pharmacological values of Trachyspermum ammi Linn. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2014;4:S545-S53.

13. Bairwa R, Sodha RS, Rajawat BS. Trachyspermum ammi. Pharmacognosy Reviews 2012;6(11):56-60.

14. Jeet K, Devi N, Narender T ,Sunil T, Lalit S, Thakur R. Trachyspermum Ammi: A Comprehensive Review 2012:6.

15. Zarshenas MM, Moein M, Samani SM, Petramfar P. An overview on ajwain (Trachyspermum ammi) pharmacological effects; modern and traditional. Journal of Natural Remedies 2013;14(1):98-105.

16. Chahal K, Dhaiwal K, Kumar A, Kataria D, Singla N. Chemical

composition of Trachyspermum ammi L. and its biological properties: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2017;6(3):131-40.

17. 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 Uuniversity of Medical Sciences 2010;11(4):15-25.

18. Siddiqui MJ, Aslam A, Khan T. Comparison and evaluation of different seed extracts of Trachyspermum ammi for immunomodulatory effect on cell-mediated immunity through delayed-type hypersensitivity assay skin thickness method. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences 2019;11(1):43.

19. Kooti W, Mansouri E, Ghasemiboroon M, Harizi M, Ashtary-Larky D ,Afrisham R. The effects of hydroalcoholic extract of Apium graveolens leaf on the number of sexual cells and testicular structure in rat. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 2014;9(4):e17532.

20. Mansouri E, Kooti W, Bazvand M, Ghasemi Boroon M, Amirzargar A, Afrisham R, et al. The effect of hydro-alcoholic extract of Foeniculum vulgare Mill on leukocytes and hematological tests in male rats. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 2015;10(1):e18396.

21. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 1961;7:88-95.

22. Mudo G, Frinchi M, Nuzzo D, Scaduto P, Plescia F, Massenti MF, et al. Anti-inflammatory and cognitive effects of interferon-beta1a (IFNbeta1a) in a rat model of Alzheimer's disease. Journal of Neuroinflammation 2019;16(1):44.

23. Beers RF, Jr., Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. The Journal of Biological Chemistry 1952;195(1):133-40.

24. Razygraev AV, Yushina AD, Titovich IA. A method of measuring glutathione peroxidase activity in murine brain in pharmacological experiments. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2018;165(2):292-5.

25. Van Lith HA ,Beynen AC. Dietary cholesterol lowers the activity of butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8), but elevates that of esterase-1 (EC 3.1.1.1) in plasma of rats. The British Journal of Nutrition 1993;70(3):721-6.

26. Goswami N, Chatterjee S. Assessment of free radical scavenging potential and oxidative DNA damage preventive activity of Trachyspermum ammi L. (carom) and Foeniculum vulgare Mill. Seed Extracts 2014;2014:582767.

27. Singh B, Kale RK. Chemomodulatory effect of Trachyspermum ammi on murine skin and forestomach papillomagenesis. Nutrition and Cancer 2010;62(1):74-84.