

بررسی هیستوپاتولوژیکی اثر عصاره برگ ریحان در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش مدل آلزایمر

درنا رفیقی^۱، وحید بهرام نیا^۲، سعید بهرام نیا^۳

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی- میکروب های بیماری زای دانشگاه آزاد واحد تبریز
- ۲- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران
- ۳- دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل

Bahramnia93@gmail.com

Dornarafighi2222@gmail.com

Saeidjj007@gmail.com

چکیده:

آلزایمر یکی از شایعترین نوع زوال عقل^۱ است که بیشتر در سنین بالا رخ می دهد. مطالعه حال حاضر با هدف بررسی هیستوپاتولوژیکی عصاره برگ ریحان بر روی بافت هیپوکامپ ناحیه CA1 مغز موش مدل آلزایمر انجام گرفته است. در این آزمایش ۱۵ سر رت خریداری و القای بیماری آلزایمر با تزریق نانو پودر اکسید منگنز می باشد. اعمال تیمار با عصاره استاندارد شده برگ ریحان صورت گرفته. سپس رت ها از نظر رفتاری و هیستوپاتولوژیکی مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از تاثیر مثبت و معنی دار عصاره برگ ریحان در رت مدل آلزایمر است.

کلمات کلیدی: آلزایمر، عصاره برگ ریحان، CA1، هیپوکامپ

مقدمه:

بیماری آلزایمر (AD^۲) یک بیماری پیشرونده عصبی^۳ همراه با تخریب سلول های مغزی که با درجات مختلفی از فراموشی، تا فراموشی کامل در بیماران را همراه است (۱). تعداد ابتلا به این بیماری به دلیل نبود روش های موثر برای درمان یا پیشگیری از بیماری، همچنان رو به افزایش است (۲). بیماری آلزایمر با منشأ خانوادگی و ژنتیکی با جهش در ژن هایی که پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP)، پرسینیلین ۱ (PS-1)، یا پرسینیلین ۲ (PS-2) را رمزگذاری می کنند، همراه است، که در نتیجه منجر به تولید بیش از حد پروتئین بتا آمیلوئید و ایجاد کلاف های نوروفیبریلاری

¹ Dementia

² Alzheimer Disease

³ Neurodegenerative Disease

می‌شود (۳). از سوی دیگر، عوامل غیر ژنتیکی و وراثتی مانند سن، جنسیت، مصرف الکل و دخانیات، افسردگی، جراحات و آسیب به سر، تغذیه، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین نیز در ابتلا به این بیماری می‌تواند تأثیر گذار باشد (۴).

در ایجاد بیماری آلزایمر عوامل مختلفی از جمله استرس اکسیداتیو، سمیت وابسته به افزایش میزان گلوتامات، کاهش میزان استیل کولین و التهاب بافت مغز در نتیجه حضور عوامل التهابی از جمله عوامل در ایجاد، افزایش بیش از حد فلزات سنگین دخیل هستند که بسیار حائز اهمیت می‌باشند و بخش بسیار بزرگی از این بیماری را بر عهده دارند (۵).

تا سال ۲۰۲۰ فقط پنج دارو توسط اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) برای استفاده در بیماری آلزایمر تایید شده بود که به عنوان درمان کامل این بیماری شناخته نشده بودند و تنها بیشتر به عنوان یک عامل پیشگیری مورد بحث بودند (۶). چهار مورد از این داروها عبارتند از: تاکرین، ریواستیگمین، دونپزیل و گالانتامین، که بیشترین مصرف را دارا بودند که بسیاری از این داروها دارای اثرات جانبی و محدودیت در مصرف می‌باشند. اما از آنجایی که ترکیبات گیاهان دارویی دارای اثرات چندجانبه و سوء اثر کمتری هستند، معرفی داروی گیاهی مناسب جهت بهبود بیماران آلزایمری می‌تواند مفید باشد (۷).

گیاه ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* گیاهی یکساله از تیره نعناعیان است (۸). ترکیبات شیمیایی حاصل از آن از جمله آپیزین، اوژنول، میرتنال، بتا-سیتوسترول، لوتئولین، رزمارینیک اسید، اسید کارنوزیک، ترکیبات فنلی غنی از اسانس و سایر موارد مانند آنتوسیانین‌ها و فلاون‌ها و نیز ماده ای تحت عنوان فنکول^۴ می‌تواند دارای ارزش درمانی در بیماری‌های نورودجنریتیو^۵ باشند (۹). تفاوت واریانس بین ترکیبات فنلی را پیدا کرد و پیشنهاد کرد که این تفاوت ممکن است برای دوره‌های مختلف گیاهی نسبت داده شود. اما وجود اجزای اصلی مانند کافئیک اسید و رزمارینیک اسید در تمام مراحل رشد گیاه مشاهده می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که وجود رزمارینیک اسید به عنوان شایع‌ترین ترکیب فنلی در گیاه ریحان است. رزمارینیک اسید از جمله ترکیبات فنلی مهم این گیاه است که خواص ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد التهابی و همچنین آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد (۱۰ و ۱۱).

هدف:

⁴ Fenchol

⁵ Neurodegenerative diseases

هدف از این پژوهش بررسی تاثیر عصاره برگ ریحان در هیستوپاتولوژی مغز رت های آلزایمری می باشد.

مواد و روش کار:

مطالعه حاضر با هدف بررسی عصاره برگ ریحان در ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز در موش مدل آلزایمر انجام گرفته است. در این آزمایش ۱۵ سر رت به سه گروه؛ شاهد سالم، شاهد آلزایمری و گروه آلزایمری + دریافت کنند تیمار دارویی تقسیم شدند. القای بیماری آلزایمر با تزریق محلول نانو پودر منگنز بشکل داخل صفاقی به مقدار ۶۰mg به مدت ۲۱ روز انجام شد. در این مدت رت های شاهد سالم نیز سرم فیزیولوژیک بدون منگنز دریافت کردند. رت ها پس از ۷ روز استراحت، با دستگاه تست رفتاری به شماره پتنت ۱۳۹۷۵۰۱۴۰۰۰۳۰۰۹۱۶۵ مورد بررسی قرار گرفتند. تیمار با عصاره استاندارد شده برگ ریحان در دوزهای ۲سی سی، ۱ سی سی و ۰/۵ سی سی (۳ میلی گرم در هر سی سی) به صورت داخل صفاقی به مدت یک هفته انجام شد.

برای تهیه عصار برگ ریحان، ابتدا برگ ریحان بخوبی شسته شده سپس به کمک هاون چینی در آب الککل ۷۰٪ کوبیده شد تا محلول یکنواختی بدست آید. در مرحله بعدی با استفاده از دستگاه سونیکاتور به محلول یکنواخت و همگنی تبدیل شد و پس از سانتریفیوژ شدن این محلول، قسمت رویی آن برداشته شد. عصاره آبی پس از فریز شدن در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد، با دستگاه freeze dryer به پودر عصاره آبی تبدیل شد. برای تعیین میزان در عصاره برگ ریحان از روش دگرسیون برای سریال دیلوشن استفاده شد.

در مرحله بعدی، از قسمت هیپوکامپ مغز رت ها مطابق با اصول اخلاق نمونه برداری شد. برای این منظور ابتدا پس از بی هوش نمودن رت با زایلازین و اتر، مغز جهت نمونه برداری برداشته شده و قسمت هیوکامپ در محیط استریل و آزمایشگاهی در مدت زمان کوتاهی جدا شده و پس از تقسیم به دو قسمت، قسمت هیپوکامپ هر بخش از مغز جدا سازی و در محلول فرمالین ۱۰٪ نگهداری گردید. پس از انجام دوره فوق، از نمونه بافت بلوک تهیه رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین ائوزین (H&E) صورت گرفت.

در نهایت مقایسه اختلاف معنی دار بین در سطح احتمال کمتر از ۱٪ از آزمون ANOVA و دانکن استفاده گردید. این تحلیلها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج:

نتایج تست رفتاری:

ابتدا تایید ایجاد بیماری آلزایمر در رت ها انجام شد. برای این کار از دستگاه تست رفتاری استفاده شد. طبق مشاهدات آنالیز آماری به روش آزمون t در جدول (۱) رت آلزایمری شده بطور معنی داری ($Pvalue < 0.01$) بیشتر از رت سالم به منطقه شوک وارد شده و این نشان می دهد که رت های آلزایمری شده، دچار از دست دادن حافظه و فراموشی شده اند.

جدول (۱) نتایج آزمون T مستقل برای تعداد دفعات ورود رت به ناحیه شوک در ۵ ساعت در دو گروه سالم و القا شده الزایمر

رت	تعداد دفعات	انحراف معیار	T	P value
سالم	۱۱	۳,۲	۱۱,۲۷	$< 0/01$
آلزایمری	۳۵	۴,۲۶		

پس از انجام تیمار با عصاره برگ ریحان، دو گروه از لحاظ ورود به ناحیه شوک، به روش دانکن مقایسه شدند. طبق نتایج آزمون دانکن تعداد ورود به ناحیه شوک در ۵ ساعت در رت تیمار شده با عصاره برگ ریحان نسبت به رت سالم تفاوت معنی دار نداشته و در یک سطح قرار دارند ($P value > 0.05$) اما رت های آلزایمری شده به صورت معنی داری بیشتر از دو گروه رت های سالم و رت های آلزایمری تیمار شده، وارد ناحیه شوک شده اند ($P value < 0.01$) این نتیجه نشان می دهد که رت های آلزایمری تیمار شده با عصاره حاصل از برگ ریحان به طور نسبی بهبود یافته اند (جدول ۲).

جدول (۲) نتایج آزمون دانکن در سطح ۵٪ احتمال برای تعداد دفعات ورود رت به ناحیه شوک در ۵ ساعت در گروه سالم و القا شده الزایمر تیمار شده

تیمار	تعداد دفعات	انحراف معیار
سالم	A _{۱۳/۲}	۲/۱۵
آلزایمری + ریحان سی سی ۰/۵	C _{۲۰/۳۱}	۰/۹۹
آلزایمری + ریحان ۱ سی سی	B _{۱۸/۴}	۱/۹۲
آلزایمری + ریحان ۲ سی سی	A _{۱۶/۲۴}	۲/۵۲
آلزایمری	C _{۳۲}	۴/۶۴

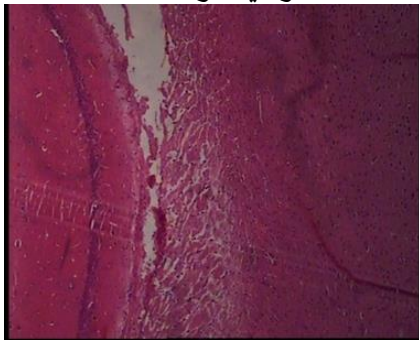
حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ به روش دانکن

هیستوپاتولوژی:

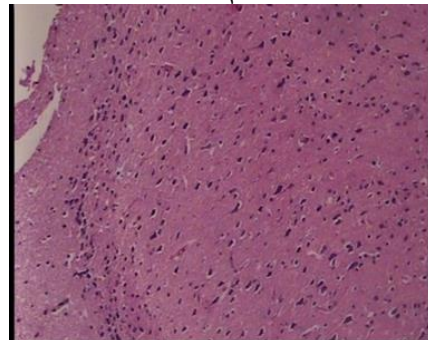
رنگ آمیزی ناحیه هیپوکامپ با هماتوکسیلین ائوزین (شکل ۱) نشان داد که در گروه آلزایمری نورون های تشکیل دهنده ناحیه هیپوکامپ و ناحیه هتروکروماتین شده (ائوزینه) شدن دیده می شود و تراکم نورونی کمتر شده است. ائوزینه شدن در برخی ناحیه هیپوکامپ و شدت بیشتر آن نشان دهنده شدت التهاب بوده و فاصله گرفتن آن مربوط به آمورف بودن و نکروز شدن آن می باشد. در صورتی که در رت های سالم تغییر قابل توجهی دیده نمی شود.

بررسی هیستوپاتولوژی ناحیه هیپوکامپ (CA1) پس از اعمال تیمارها در رت ها (شکل ۱) نشان داد، اولاً در ناحیه هیپوکامپ رت های آلزایمری ایوزینه شدن نورون ها بیشتر (شکل ۱ - B) بوده و حداکثر زمانی دیده می شود که رت القا شده آلزایمر تحت تیمار عصاره برگ ریحان ۲ cc (6 mg) (شکل ۱ - C) قرار گیرد.

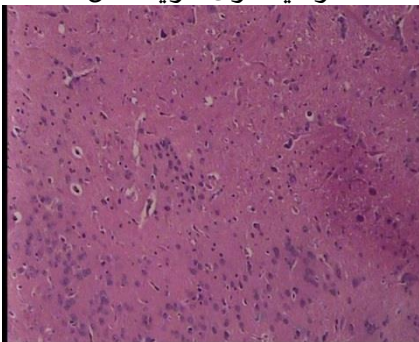
B آلزایمری (شاهد)



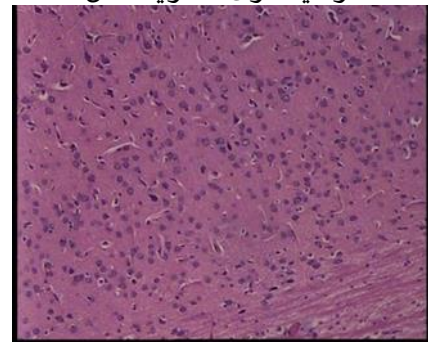
A سالم (شاهد)



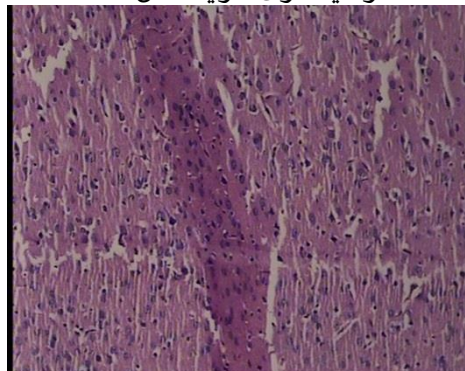
D آلزایمری+ریحان ۱cc



C آلزایمری+ریحان ۲cc



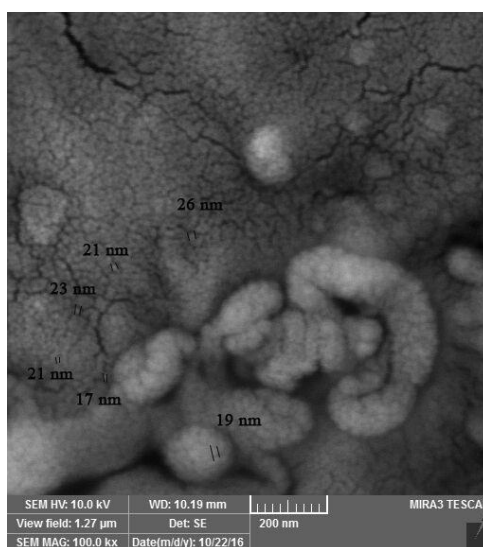
E آلزایمری+ریحان ۰,۵cc



شکل ۱- هیستوپاتولوژی ناحیه هیپوکامپ پس از اعمال تیمارها در رت ها با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین. (A) نمونه سالم. (B) نمونه آلزایمری. (C) نمونه های آلزایمری به همراه تیمار ریحان ۲ CC. (D) نمونه آلزایمری به همراه تیمار ریحان ۱CC. (E) نمونه آلزایمری به همراه تیمار ریحان ۰.۵CC.

بحث:

نفوذ نانو بعد از تزریق به شکل داخل صفاقی نانو منگنز (شکل ۲) به میزان ۶۰ میلی گرم به ازای هر موش به مدت ۲۱ روز اثبات و آلزایمری آن با استفاده از دستگاه تست رفتاری و رنگ آمیزی هماتوکسیلین (هیستوپاتولوژی) (شکل ۱) تایید شد. تکرار ورود به ناحیه شوک و فراموش کردن اتفاقی آن منطقه از یک طرف، و از طرف دیگر اتوزینه شدن و تراکم کم نرون ها، حاصل مصرف نانو منگنز و نهایتا ایجاد بیماری آلزایمر بود.



شکل ۲- اندازه نانو پودر منگنز

نانو منگنز نشان داد که رفتار رت ها با اعمال تیمارها بطور معنی دار تغییر یافته بود و با اعمال تیمار عصاره برگ ریحان بهبودی در فراموشی را نشان داد (جدول ۲). مصرف عصاره حاصل از برگ ریحان از لحاظ اتوزینه شدن نرون ها در حد نمونه سالم بود که نشان دهنده بهبود وضعیت آلزایمری بوده است. بطوریکه با اعمال تیمار ۲CC بیشترین میزان تاثیر را دارا بود (شکل ۱).

عصاره موجود در ریحان دارای خواص آنتی اکسیدانی است که می تواند با از بین بردن واکنش های اکسیداسیون به جلوگیری از استرس اکسیداتیو و در نتیجه جلوگیری از آپوپتوز سلولی و مرگ سلولی کمک کند (۱۲).

ریحان با داشتن به دلیل وجود تانن ها، فنل ها و فلاونوئیدها باعث مهار استیل کولین استراز می شود و از طرفی با مهار

استرس اکسیداتسو باعث ایجاد تعادل در بین ژن ها خانواده ABC ها می شود که از این مسیر نیز باعث پیشگیری از ایجاد بستر برای سایر هیپرفسفریلاسیون پروتئین تائو و دیگر ژن ها می شود که در نتیجه آن باعث مهار بیماری آلزایمر می شود. در نتیجه آن ماده موثره موجود در عصاره ریحان باعث پاکسازی و عدم بیان بیش از حد پروتئین تائو می شود (۱۳). که با نتایج ما همخوانی دارد. مصرف آنتی اکسیدان ها به منظور کاهش ROS در آلزایمر توصیه شده است (۱۴). فلاونوئیدهای موجود در ریحان به دلیل داشتن باندهای OH دارای خصلت آنتی اکسیدانی می باشد (۱۵).

نتیجه گیری:

رت های آلزایمر شده با نانو منگنز با تیمار عصاره بدست آمده از برگ ریحان بطور معنی دار با ائوزینه شدن و افزایش تراکم نورون ها در ناحیه هیپوکامپ جلوگیری می کند.

یافته های حاصل از این پژوهش نشان از تاثیر بالقوه برگ ریحان در بیماری نوروژنتیکی است که می تواند به عنوان درمان مناسب و هدفمند مطرح شود.

پیشنهاد:

- ۱- بررسی مولکولی عصاره برگ ریحان در موش مدل آلزایمر.
- ۲- طراحی و ساخت داروهای شاتل دراگ مغناطیس، پارامغناطیس و بررسی آن در سطح مولکولی.
- ۳- جداسازی کامل عصاره برگ ریحان و استانداردسازی و بررسی آن.
- ۴- در صورت اخذ نتایج اولیه، بررسی در سطح فاز یک بالینی.

منابع:

1. Chengxuan Qiu, Miia Kivipelto & Eva von Strauss. *Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. Dialogues in Clinical Neuroscience, Volume 11, 2009 - Issue 2, Pages 111-128.*
2. Holger Jahn. *Memory loss in Alzheimer's disease. Dialogues in Clinical Neuroscience. Volume 15, 2013 - Issue 4, Pages 445-454.*
3. Dieter Petit and et al. *Aβ profiles generated by Alzheimer's disease causing PSEN1 variants determine the pathogenicity of the mutation and predict age at disease onset. Molecular Psychiatry. 01 April 2022.*
4. Lorenzo Falsetti et al. *Shared Molecular Mechanisms among Alzheimer's Disease, Neurovascular Unit Dysfunction and Vascular Risk Factors: A Narrative Review. Biomedicines 2022, 10(2), 439.*
5. Takumi Satoh and et al. *Potential Therapeutic Use of the Rosemary Diterpene Carnosic Acid for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Long-COVID through NRF2 Activation to Counteract the NLRP3 Inflammasome. Antioxidants 2022, 11(1), 124.*
6. Julie Zissimopoulos, Mireille Jacobson, Yi Chen, et al. *Knowledge and Attitudes Concerning Aducanumab Among Older Americans After FDA Approval for Treatment of Alzheimer Disease. JAMA Netw Open. 2022;5(2):e2148355.*

7. Kamsala Venkata Ratnam, Lepakshi Md. Bhakshu & Rudraraju Reddy Venkata Raju. *Herbal Drugs: Its Mechanism to Prevent Alzheimer's Disease with Special Reference to Non-phenolic Secondary Metabolites. Nutritional Neurosciences, Role of Nutrients in Neurological Disorders* pp 303–317.
8. Lethicia Barreto Brandão, Lizandra Lima Santos, Rosany Lopes Martin and et al. *The Potential Effects of Species Ocimum basilicum L. on Health: A Review of the Chemical and Biological Studies. Pharmacogn Rev.* 2022;16(31):22-26.
9. Guedri Mkaddem Mounira, Zrig Ahlem, Ben Abdallah Mariem and et al. *Essential Oil Composition and Antioxidant and Antifungal Activities of Two Varieties of Ocimum basilicum L. (Lamiaceae) at Two Phenological Stages. Agronomy, Volume 12, Issue 4, 10.3390.*
10. Nadjama B.do Prado, Claudia B.de Abreu, Cyndi S.Pinho and et al. *Application of multivariate analysis to assess stress by Cd, Pb and Al in basil (Ocimum basilicum L.) using caffeic acid, rosmarinic acid, total phenolics, total flavonoids and total dry mass in response. Food Chemistry. Volume 367, 15 January 2022, 130682.*
11. Eunice M.Bajomo, Melanie S.Aing, Lucas S.Ford and et al. *Chemotyping of commercially available basil (Ocimum basilicum L.) varieties: Cultivar and morphotype influence phenolic acid composition and antioxidant properties. NFS Journal. Volume 26, March 2022, Pages 1-9.*
12. Pandurangan Subash-Babu, Hussah Mohammed Alowaidh, Laila Naif Al-Harbi and et al. *Ocimum basilicum L. Methanol Extract Enhances Mitochondrial Efficiency and Decreases Adipokine Levels in Maturing Adipocytes Which Regulate Macrophage Systemic Inflammation. Molecules 2022, 27(4), 1388.*
13. Abdul Raouf Malik, Sadia Sharif, Fozia Shaheen and et al. *Green synthesis of RGO-ZnO mediated Ocimum basilicum leaves extract nanocomposite for antioxidant, antibacterial, antidiabetic and photocatalytic activity. Journal of Saudi Chemical Society. Volume 26, Issue 2, March 2022, 101438.*
14. Luka Lawrence , Attama Chika , Yahaya Muhammad Falalu and et al. *Phytochemical screening and bioassay of the ethanolic extracts of Ocimum basilicum and Commiphora kerstingii leaves. PSJD. 2022 | 167 | 28-40.*