

بررسی اثر عصاره‌ی اتانولی ریزوم گیاه سعد کوفی بر تعادل حرکتی در موش صحرایی مدل آلزایمری

زهرا ربیعی^۱، مصطفی غلامی^۲، دکتر محمدرضا حجتی^۳

نویسنده‌ی مسول: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دانشکده‌ی پزشکی hojjatim@gmail.com

دریافت: ۹۲/۵/۲ پذیرش: ۹۲/۱۱/۷

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر (AD) یک اختلال دژنراتیو است که منجر به زوال شناختی پیشرونده می‌شود. اختلال حافظه در بیماری آلزایمر با کمبود قشری استیل کولین و از دست دادن نورون‌های کولینرژیک در هسته‌های قاعده‌ای ماینرت همراه شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره‌ی اتانولی ریزوم گیاه سعد کوفی بر تعادل حرکتی در موش‌های صحرایی مدل آلزایمری و موش‌های صحرایی سالم بود.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی از ۴۹ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار که به ۷ گروه آزمایشی تقسیم شدند، استفاده شد. برای این هدف جهت ایجاد مدل آلزایمری، در موش‌های صحرایی هسته ماینرت به صورت دوطرفه با جریان الکتریکی تخریب شد. گروه کنترل و شم آب مقطر دریافت کردند در حالی که گروه‌های آلزایمری عصاره‌ی اتانولی ریزوم گیاه سعد کوفی با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۰ روز دریافت کردند. گروه‌های سالم بدون هرگونه جراحی فقط عصاره دریافت کردند تعادل حرکتی موش‌های صحرایی با دستگاه روتارود سنجیده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنوا و تست تعقیبی LSD تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: عصاره‌ی اتانولی ریزوم گیاه سعد با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به مدت ۲۰ روز تعادل حرکتی را در موش‌های صحرایی آلزایمری به طور چشمگیری بهبود بخشید. عصاره‌ی این گیاه در موش‌های صحرایی سالم به مدت ۲۰ روز به طور چشمگیری تعادل حرکتی را وقتی با گروه کنترل مقایسه شد کاهش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند عصاره‌ی ریزوم گیاه سعد کوفی در موش‌های صحرایی آلزایمری از طریق القای تغییراتی در سطح استیل کولین در مغز تعادل حرکتی را به طور چشمگیری بهبود بخشیده، از این طریق اثراتش را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: آلزایمر، تعادل حرکتی، گیاه سعد کوفی، عصاره‌ی اتانولی، موش صحرایی

مقدمه

بیماری آلزایمر متاسفانه درمانی ندارد، اما می‌توان از پیشرفت آن جلوگیری کرد. بروز بیماری آلزایمر تا ۷۱ درصد به دلایل ژنتیکی و ۲۱ درصد به دلایل محیطی ایجاد می‌شود. وقوع

آلزایمر با از دست دادن حافظه‌ی کوتاه مدت، با فراموش کردن آدرس‌ها و اسم‌ها آغاز می‌شود و کم‌کم تا آنجا پیش می‌رود که فرد حتی راه بازگشت به خانه را فراموش می‌کند.

- ۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
- ۲- کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
- ۳- دکترای تخصصی فیزیولوژی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیر هستند (۵). کاهش در عملکرد حرکتی و کاهش در حافظه دو پارامتر رفتاری اصلی هستند که در دوران پیری در انسان و حیوانات رخ می‌دهند. این تغییرات حتی در غیاب بیماری‌هایی با تخریب عصبی خاص که مرتبط با سن باشد نیز اتفاق می‌افتد (۶). کورتکس مغزی و هیپوکامپ برای کنترل عملکردهای شناختی و حرکتی با هم در ارتباطند و به نظر می‌رسد نسبت به استرس اکسیداتیو حساس و به آنتی‌اکسیدان‌ها نیازمند می‌باشند. تصور می‌شود استرس اکسیداتیو یک عامل در کاهش عملکرد حرکتی و شناختی دیده شده در پیری است (۷). درمان اصلی بیماران مبتلا به آلزایمر به صورت فارماکولوژیک می‌باشد. شناخت جریان بیماری و بهتر شدن و آزمون‌های کلینیکی طراحی شده گامی به جلو بوده، درمان‌های مربوطه برای علامت‌های شناختی و غیرشناختی را بهتر ساخته است. استراتژی درمان فارماکولوژیک در بیماری آلزایمر شامل سه دسته دارو می‌باشد:

- ۱- گروهی که مکانیسم آن بر پایه‌ی درمان‌های اصلاح‌کننده بیماری است مانند ویتامین E و سلژین
- ۲- درمان‌هایی که مکانیسم آن بر پایه‌ی جبران نوروترانسمیترهاست مانند مهارکننده‌های کولین استراز
- ۳- عوامل سایکوتراپیک هستند که برای علامت‌های رفتاری بیماری تجویز می‌شوند (۸). سعد کوفی یا *Cyperus rotundus* از خانواده‌ی Cyperaceae است. در بخش ریزوم سعد گونه‌ی *Cyperus rotundus* یک اسانس مشخص شده که شامل پینن، مقدار کمی سینئول، سسکی‌ترین، و یک الکل جدید به نام ایزوسی پرول می‌باشد. به علاوه دارای چربی به میزان ۲/۷ درصد است و دارای یک ماده‌ی مومی خنثی، گلیسرول، اسید لینولنیک، اسید لینولئیک، اسید اولئیک، اسید میریستیک، و اسید استئاریک می‌باشد (۹). چندین ترکیب شیمیایی از عصاره‌ی اتانولی ریزوم گیاه *Cyperus rotundus* استخراج شده است که برخی از آن‌ها

بیماری آلزایمر تا ۹۵ درصد بعد از ۶۰ سالگی رخ می‌دهد (۱). عوامل افزایش این بیماری‌ها در کشورهای اروپایی و آمریکایی نوع تغذیه و کاهش فعالیت‌های بدنی و فکری می‌باشد. مطالعات بسیار نشان می‌دهد که تا ۵۰ سال آینده تعداد افراد مبتلا به بیماری آلزایمر سه برابر خواهد شد. هزینه‌ی متوسط برای هر بیمار در حال حاضر ۱۵۰ هزار دلار تخمین زده شده است که پیش‌بینی می‌شود در آینده تا ۴۵۰ هزار دلار افزایش یابد (۱). نقش سیستم کولینرژیک مرکزی در فرآیند یادگیری و حافظه از اواخر دهه‌ی ۱۹۷۰ میلادی، که بعضی از محققین تحلیل رفتن بافت تولیدکننده‌ی استیل کولین در مغز بیماران آلزایمری را توصیف کردند، تحت بررسی قرار گرفت. بر همین اساس، فرضیه‌ی کولینرژیک که نقص ادراکی بیماری آلزایمر را به آسیب در سیستم کولینرژیک ربط می‌دهد، مطرح شد (۲). فرضیه‌ی کولینرژیک بیماری آلزایمر مطالعه پیرامون یادگیری و حافظه‌ی این گونه بیماران را در طی چند سال اخیر تحت تاثیر قرار داده است و این تحقیقات به کاهش روند تحلیل رفتن عصبی در اثر مصرف داروهای مقلد استیل کولین منجر شده‌اند (۳). مطالعات نشان داده که شدت فراموشی در بیماری آلزایمر به میزان زیادی به کاهش نورون‌ها در هسته قاعده‌ای با سلول‌های درشت مغز (NB: Nucleus Basalis of Meynert) وابسته است که با کاهش معنی‌داری در مقدار آنزیم استیل کولین ترانسفراز در قشر و آمیگدال و در نتیجه اختلال یادگیری همراه می‌شود (۴).

یکی از عواملی که در پاتوژنز بیماری آلزایمر نقش مؤثری بازی می‌کند، استرس اکسیداتیو بوده که یک عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی‌اکسیدان است. رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند به پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غشاهای چربی حمله کنند و در نتیجه تمامیت و عملکرد سلول را مختل نمایند. بافت مغز حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب اشباع نشده است که به‌ویژه نسبت به حملات

روشن بررسی

ریزوم‌های ریشه‌ی گیاه سعد کوفی (*Cyperus rotundus*) از عطاری تهیه شده، سپس در سایه خشک شد. سپس آسیاب شده و در الکل ۷۰ درصد قرار داده شد. ارلن محتوی گیاه بر روی گرداننده‌ی مغناطیسی با مگنت قرار داده شد و سپس به مدت ۱ هفته در دمای اتاق نگه داشته شد و سپس محتویات آن صاف شد. محلول صاف شده با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، الکل آن بخار شده و عصاره خشک شد (۹). گونه‌ی هرباریومی این گیاه با شماره‌ی ۴۲۲ در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد نگهداری می‌شود.

تعیین ترکیبات فنلی: مقدار ترکیبات فنلی تام بر اساس متد شرافتی و همکاران اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ی رقیق شده (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فولین سیوکالتیو اضافه گردید و پس از ۳ تا ۵ دقیقه مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر از کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در مقابل بلانک آب مقطر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف گالیک اسید تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فنل تام هر عصاره‌ی بر حسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه گردید (۱۴).

تعیین ترکیبات فلاونوئید: برای اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئید به‌طور خلاصه ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هر عصاره (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) با ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد مخلوط و مقدار ۳ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵ درصد به آن‌ها اضافه گردید. پس از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه گردید.

به‌طور موثری فعالیت آنتی‌استیل کولین استرازی نشان می‌دهند. استیل کولین یک مولکول در همه سلول‌های گیاهی و جانوری است و به‌عنوان یک نوروترانسمیتر به شمار می‌رود و آنزیم استیل کولین استراز باعث تجزیه‌ی استیل کولین می‌شود (۱۰). در یک مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدهای الیگومریک عصاره‌ی اتیل استاتی *Cyperus rotundus* در محیط *in vitro* مورد مطالعه قرار گرفته است و نشان می‌دهد که فلاونوئیدهای عصاره‌ی اتیل استاتی این گیاه باعث مهار فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز (XO)، مهار پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش اثر آپوپتوزی در محیط *in vitro* می‌شود (۱۱). در مطالعه‌ی دیگر اثر دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از فلاونوئیدهای الیگومریک عصاره‌ی سعد کوفی در موش‌های صحرایی در معرض ایسکمی و خون‌رسانی مجدد بررسی شد و این عصاره میزان گلوتامات، گلوتامین سنتتاز (GS) را کاهش داده، میزان فعالیت پمپ $Na^+/K^+ATPase$ را در مغز موش‌های صحرایی مدل سکته‌ی مغزی افزایش می‌دهد. همچنین تیمار با این فلاونوئیدها به‌طور معنی‌داری میزان آسیب‌های مغزی و میزان (MDA) مالون دی‌آلدهید را در مغز کاهش می‌دهد و همچنین میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و محتوی گلوتاتیون مغزی را در موش‌های صحرایی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد (۱۲). عصاره‌ی گیاه *Cyperus rotundus* دارای قدرت بالایی برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد در محیط *In vitro* نشان می‌دهد و قدرت بالایی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد مخصوصاً در برابر DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) و آنیون‌های سوپراکسید دارد. همچنین این عصاره پراکسیداسیون لیپیدی را در کبد موش صحرایی مهار می‌کند (۱۳). نظر به اینکه اثر عصاره‌ی اتانولی ریزوم سعد کوفی بر تعادل حرکتی در موش صحرایی مدل آلزایمری بررسی نشده است، این مطالعه طراحی و اجرا گردید.

دریافت نکردند و بعد از بهبود محل جراحی تحت تست رفتاری تعادلی با استفاده از دستگاه روتارود قرار گرفتند (n=7).

۳- گروه درمان با دوز ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم عصاره: این گروه درمانی تحت عمل جراحی تخریب دو طرفه هسته‌ی NBM قرار گرفت و عصاره با دوز ۱۰۰ میلی گرم به مدت ۲۰ روز به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و تحت تست رفتاری تعادلی با استفاده از دستگاه روتارود قرار گرفتند (n=7).

۴- گروه درمان با دوز ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم عصاره: گروه درمانی که تحت عمل جراحی تخریب دو طرفه NBM قرار گرفت و عصاره با دوز ۲۰۰ میلی گرم به مدت ۲۰ روز به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و تحت تست رفتاری تعادلی با استفاده از دستگاه روتارود قرار گرفتند (n=7).

۵- گروه شم: گروهی که هیچ‌گونه دارویی دریافت نکرد و تحت جراحی بدون تخریب هسته NBM قرار گرفت و بعد از بهبود محل جراحی تحت تست رفتاری تعادلی با استفاده از دستگاه روتارود قرار گرفت (n=7).

۶- گروه سالم با دوز ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم عصاره: این گروه فقط به مدت ۲۰ روز عصاره به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کرد و تحت تست رفتاری تعادلی با استفاده از دستگاه روتارود قرار گرفت (n=7).

۷- گروه سالم با دوز ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم عصاره: این گروه فقط به مدت ۲۰ روز عصاره به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کرد و تحت تست رفتاری تعادلی با استفاده از دستگاه روتارود قرار گرفت (n=7). دوزهای انتخابی بر اساس مطالعات انجام شده‌ی قبلی بود (۱۲).

جراحی: حیوانات با تزریق داخل صفاقی ۱۱۰ میلی گرم در کیلوگرم کتامین بیهوش شدند و موهای پشت سر آنها از ناحیه‌ی فاصله بین چشم‌ها تا گوش‌ها تراشیده شد و به دقت

جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونوئید هر عصاره بر حسب میلی گرم در هر گرم عصاره‌ی خشک محاسبه گردید (۱۵).

تعیین ترکیبات فلاونولی: جهت اندازه‌گیری ترکیبات فلاونولی ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر عصاره (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر متانول ۶۰ درجه) با ۰/۵ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد مخلوط و مقدار ۳ میلی لیتر استات سدیم ۵ درصد به آنها اضافه گردید. پس از ۲/۵ ساعت جذب نمونه‌ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۴۰ نانومتر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه گردید. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونول هر عصاره بر حسب میلی گرم در هر گرم عصاره‌ی خشک محاسبه گردید (۱۴).

این مطالعه از نوع تجربی بوده و حیوانات با روش تصادفی ساده در گروه‌های مختلف آزمایشی قرار گرفتند. در این مطالعه از ۴۹ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که از پژوهشکده‌ی علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی خریداری شدند، استفاده گردید. حیوانات حین و قبل از مطالعه در شرایط دوازده ساعته تاریکی - روشنایی در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و با غذای استاندارد موش‌های صحرایی تهیه شده از انستیتو پاستور ایران تغذیه شدند. حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل: گروهی که تحت هیچ‌گونه تزریق دارو یا جراحی قرار نگرفته و فقط آب مقطر دریافت می‌کردند و تحت تست رفتاری تعادلی با استفاده از دستگاه روتارود قرار گرفتند (n=7).

۲- ضایعه دیده (آنزایمیری): گروهی که تحت عمل جراحی استرئوتاکسیک الکتروود تخریب به صورت دو طرفه درون NBM (Nucleus Basalis of Meynert) وارد شده و با عبور جریان تخریب گردید. این گروه هیچ‌گونه دارویی

تزریق عصاره، موش‌های صحرایی بر روی گردونه دستگاه روتارود قرار گرفتند. به مدت ۳۰۰ ثانیه (ماکزیمم) گردونه می‌چرخد و مدت زمانی را که حیوان توانست تعادل خود را حفظ، و در مقابل حرکت گردونه مقاومت کند، به‌عنوان زمان مقاومت موش ثبت شد. حداکثر زمان مورد بررسی برای هر حیوان در این آزمون ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد (۱۷).

بافت شناسی: برای بررسی صحت محل ضایعه در مغز، بعد از اتمام آزمایشات رفتاری حیوان‌ها با تزریق داخل صفاقی داروی بیهوشی به‌طور برگشت‌ناپذیری بیهوش شده و بعد از پرفیوز قلبی مغز حیوانات خارج شده و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند. برش‌های عرضی با ضخامت ۴۰ میکرومتر با استفاده از دستگاه میکروتوم تهیه شد. برش‌های مغزی با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. از لام‌های تهیه شده عکس برداری شد و گستردگی محل ضایعه در آن‌ها مشخص شد (۱۶).

آنالیز آماری: برای تحلیل آماری داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. در صورت وجود معنی‌داری از آزمون LSD جهت تعیین سطح تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

استاندارد سازی عصاره‌ی اتانولی ریزوم سعد کوفی:

برای استانداردسازی عصاره‌ی گیاهی، فنل تام، فلاونوئید و ترکیبات فلاونول ریزوم گیاه سعد کوفی اندازه‌گیری شد. میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئید، فلاونول عصاره‌ی ریزوم گیاه بر حسب میلی‌گرم بر گرم خشک عصاره در جدول ۱ گزارش شده است.

ضد عفونی شدند و در دستگاه استرئوتکس ثابت شده، به کمک کوتر جراحی یک برش طولی در پوست ناحیه‌ی پشت سر آن‌ها داده شد و بعد از کنار زدن بافت‌های پیوندی محل مورد نظر با آب اکسیژنه رقیق ضد عفونی و تمیز گردید تا درزهای مجسمه نمایان گردد. نقاط برگما و لامبدا بر اساس اطلس جراحی استرئوتاکسیک مغز موش صحرایی در یک سطح قرار داده شدند. مختصات استرئوتاکسیک به ترتیب برای هسته‌ی NBM به صورت $AP = -1/3$ ، $ML = \pm 2/2$ ، $DV = -7$ است و با استفاده از دستگاه ایجاد کننده‌ی ضایعه با عبور جریان الکتریکی مستقیم ۲ میلی‌آمپر به مدت ۱۵ ثانیه به کمک الکتروود تخریب که از جنس فولاد زنگ نزن و قطر 0.8 میلی‌متر می‌باشد هسته NBM در هر دو نیمکره‌های مغزی به صورت الکتریکی تخریب گردید و بعد از طی شدن دوره‌ی بهبودی (۷ تا ۱۰ روز) حیوان‌ها تحت آموزش رفتاری تعادلی قرار گرفتند (۱۶).

آزمون هماهنگی روانی - حرکتی با دستگاه روتارود: قدرت حفظ تعادل و مقاومت حرکتی موش‌ها با استفاده از دستگاه روتارود مورد بررسی قرار گرفت. روتارود دستگاهی است که با استفاده از آن مقاومت حرکتی و حفظ تعادل حیوانات سنجیده می‌شود. این دستگاه شامل یک گردونه است که سرعت چرخیدن آن صفر تا ۴۰ rpm می‌باشد.

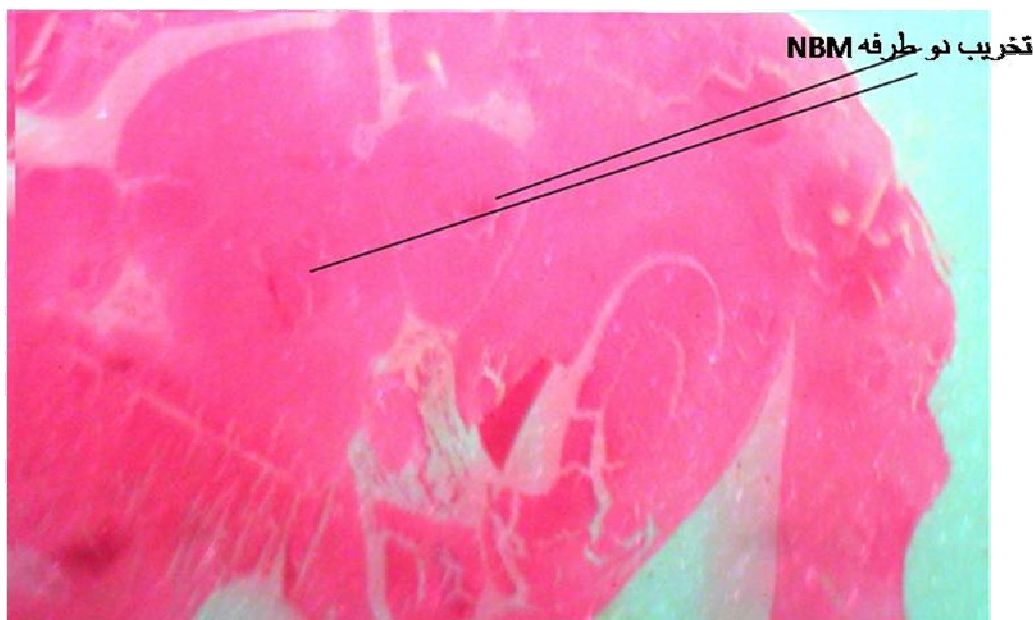
در ابتدا جهت آشنایی حیوان با دستگاه، بر روی میله‌ی غلتان روتارود قرار می‌گیرد و حرکت کردن بر روی آن آموزش داده می‌شود. دستگاه روتارود تسمه‌ای دارد که با جابجا کردن آن روی محل قرار گرفتن تسمه می‌توان سرعت چرخیدن گردونه را تنظیم کرد. در این بررسی سرعت چرخیدن 10rpm با شتاب 7rpm^2 در نظر گرفته شد که تقریباً ۱۰ تا ۱۱ دور در دقیقه است. در هر یک از گروه‌های آزمایشی، ۱ ساعت بعد از

جدول ۱: میزان ترکیبات موجود در عصاره ترکیبات فلاونول، فلاونوئید، فنل تام عصاره ریزوم گیاه سعدکوفی بر حسب میلی‌گرم بر گرم عصاره‌ی خشک

فنل تام	فلاونوئید	فلاونول
عصاره ریزوم سعد کوفی	146/2 mg/g extract	82/1 mg/g extract
		34/9 mg/g extract

در موش‌های صحرایی در شکل ۱ نمایش داده شده است که تاییدی بر ایجاد مدل آلزایمری است.

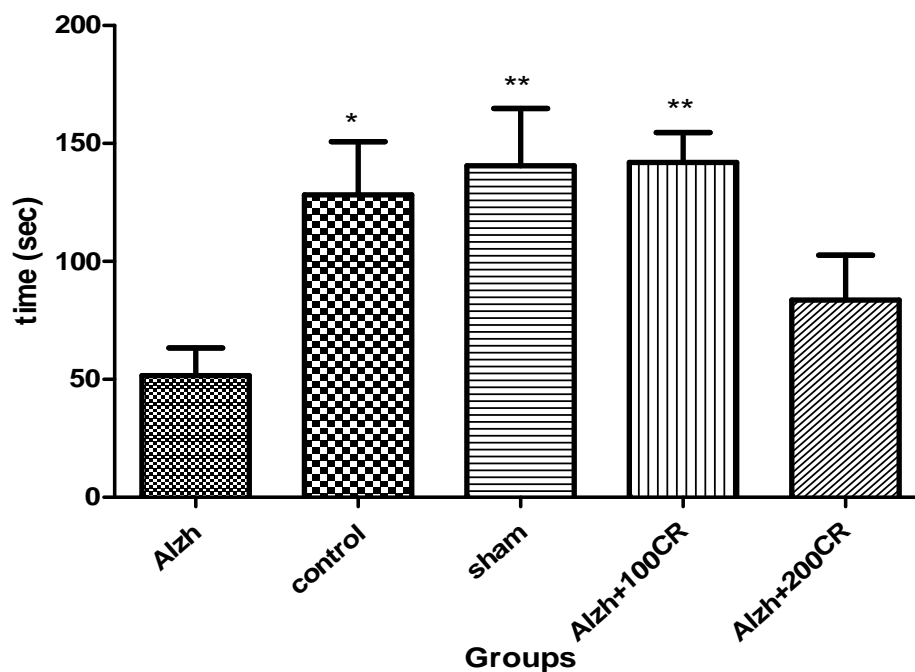
بافت شناسی: بررسی بافت شناسی برای نمایش ضایعه الکتریکی دوطرفه NBM در قاعده‌ی مغز جلویی



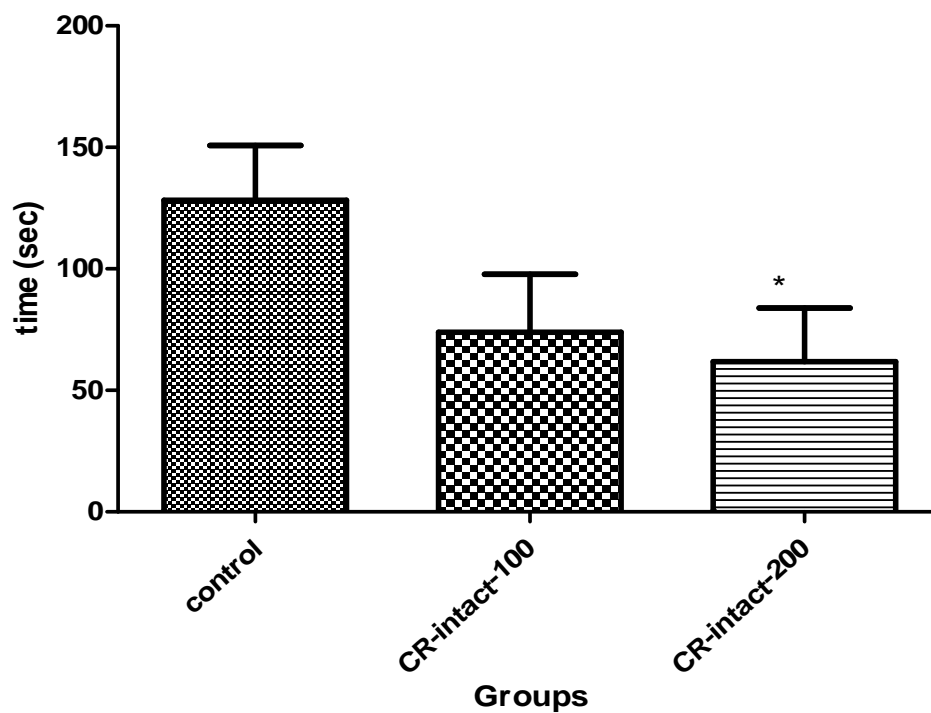
شکل ۱: بررسی بافت شناسی محل ضایعه تخریب دوطرفه هسته NBM

(Alzh+100 CR) در مدت زمان مقاومت و ماندن بر روی گردونه دستگاه روتارود اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P=0/005$) و نشان داد که حیواناتی که آلزایمری شدند و عصاره با دز ۱۰۰ میلی‌گرم دریافت کردند، در مقایسه با گروهی که فقط آلزایمری شده‌اند از تعادل بیشتری برخوردار بوده و خود را مدت زمان بیشتری بر روی گردونه دستگاه روتارود نگه می‌داشتند (شکل ۱).

آزمون آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه آلزایمری و گروه کنترل در مدت زمان مقاومت و ماندن بر روی گردونه دستگاه روتارود وجود داشت ($P=0/015$). همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین گروه آلزایمری و گروه شام وجود دارد ($P=0/006$). نتایج آزمون تعقیبی LSD نشان داد که میان گروه آلزایمری و گروه آلزایمری دریافت‌کننده‌ی دز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی سعد کوفی



شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین آزمون حرکتی با استفاده از دستگاه روتارود بین گروه‌های آزمایشی ($P < 0/05$ ، $P < 0/01$).



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین آزمون حرکتی با استفاده از دستگاه روتارود بین گروه‌های آزمایشی سالم و گروه کنترل ($P < 0/05$).

در این آزمایش پس از تزریق عصاره اتانولی گیاه سعد کوفی به مدت ۲۰ روز در گروه‌های سالم مدت زمان مقاومت و ماندن بر روی گردونه دستگاه روتارود کاهش چشمگیری داشت که این کاهش در گروه سالم با دریافت دز ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P=0/045$). کاهش در مقاومت و ماندن بر روی گردونه دستگاه روتارود در گروه سالم که عصاره با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم دریافت کرد، در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P=0/096$). (شکل ۲).

بحث

الگوهای تخریب هسته‌ی کولینرژیک NBM برای مطالعه‌ی نقش سیستم کولینرژیک قشری در عمل هوشیاری و درک به کار می‌رود و بر نقص‌های ادراکی ایجاد شده در بیماری آلزایمر دلالت دارد (۱۸). نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهند که تخریب الکتریکی هسته NBM باعث کاهش معنی‌دار در مدت زمان مقاومت و ماندن بر روی گردونه‌ی دستگاه روتارود در حیوانات گروه آلزایمری در مقایسه با گروه کنترل می‌شود و تیمار با عصاره‌ی اتانولی ریزوم گیاه سعد کوفی به مدت ۲۰ روز بعد از ایجاد تخریب الکتریکی در هسته‌ی NBM باعث بهبودی در مدت زمان مقاومت و ماندن بر روی گردونه دستگاه روتارود می‌شود؛ در حالی که تزریق عصاره‌ی اتانولی ریزوم این گیاه در حیوانات گروه سالم به مدت ۲۰ روز باعث کاهش معنی‌دار مدت زمان مقاومت و ماندن بر روی گردونه دستگاه روتارود در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. قاعده‌ی مغز جلویی در تعدادی از عملکردهای مهم رفتاری مانند یادگیری و حافظه، توجه، تحریک، خواب، یکپارچگی حسی - حرکتی و فعالیت‌های حرکتی نقش دارد. قاعده‌ی مغز جلویی از لحاظ آناتومیک

پیچیده است و از جمعیت ناهمگن و درهمی از نورون‌ها تشکیل شده است. اکثر سلول‌های هسته ماینرت (NBM) که در قاعده‌ی مغز جلویی قرار گرفته آن از نوع کولینرژیک هستند. استیل کولین استراز آنزیم کلیدی در شکست استیل کولین است (۱۶). بیماری آلزایمر (AD) توسط تغییرات دژنراتیو در مغز به همراه از دست دادن حافظه، به خصوص برای حوادث اخیر مشخص می‌شود. در حال حاضر بر اساس داده‌های بالینی و تجربی به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده که یادگیری و حافظه به میزان زیادی با وضعیت عملکردی سیستم کولینرژیک مرکزی همراه است (۱۹). قاعده‌ی مغز جلویی منبع اصلی از ورودی‌های کولینرژیک به نئوکورتکس و هیپوکامپ را فراهم می‌کند. مسیرهای اصلی کولینرژیک در مغز جلویی پستانداران انشعابات از هسته‌ی سپتال میانی و هسته‌ی Vertical Limb به هیپوکامپ هستند (۱۹). موش‌های صحرایی با تخریب NBM کاهش در مارکرهای کولینرژیک را نشان می‌دهند که شامل سطح استیل کولین، آزادسازی و تغییر و تبدیل استیل کولین، بازجذب استیل کولین، فعالیت استیل کولین استراز و تعداد رسپتورهای کولینرژیک موسکارینی در کورتکس فرونتال است (۱۹). به دلیل اینکه انشعابات کولینرژیک از هسته‌ی ماینرت به قشر و سپتوم فرستاده می‌شود تخریب الکتریکی هسته‌ی NBM باعث مرگ سلول‌های کولینرژیک در این هسته شده و در نتیجه موجب کاهش میزان استیل کولین موجود در قشر می‌شود (۲۰). مطالعات قبلی نشان داده که تخریب در هسته‌ی NBM باعث ایجاد نقص در فعالیت حرکتی و تعادل بر روی دستگاه Ladder Walking می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده که بهبود در تعادل حرکتی حتی بعد از ۴ هفته پس از ایجاد تخریب در NBM در مقایسه با گروه کنترل بر روی دستگاه Ladder Walking دیده نشده است (۲۱). کاهش در عملکرد حرکتی و کاهش در حافظه دو پارامتر رفتاری اصلی

آنتی‌اکسیدانی قوی این گیاه باشد و کاهش در مقاومت و مدت زمان ماندن بر روی گردونه دستگاه روتارود در گروه‌های سالم با دریافت عصاره شاید به دلیل به هم خوردن تعادل نوروترانسمیتر استیل کولین به دلیل مصرف طولانی مدت عصاره‌ی ریزوم گیاه سعد باشد.

نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد به دلیل وجود ارتباطات کولینرژیک بین هسته‌ی ماینرت در قاعده‌ی مغز جلویی و کورتکس مغزی، تخریب هسته‌ی ماینرت و از بین رفتن این ارتباطات باعث کاهش معنی‌دار در تعادل حرکتی در موش‌های صحرایی می‌شود. ممکن است تیمار با عصاره‌ی اتانولی ریزوم گیاه سعد کوفی به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌استیل کولین استرازی اثرات مفید خود را اعمال کرده و باعث بهبودی در تعادل حرکتی در موش‌های صحرایی آلزایمری شود.

تقدیر و تشکر

در پایان بر خود لازم می‌دانیم از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و کلیه‌ی عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، قدردانی نماییم.

References

- 1- Herring A, Ambre O, Tomm M, et al. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with alzheimer-like pathology. *Exp Neurol*. 2009; 216: 184-92.
- 2- Lawrence A, Sahakian B. The cognitive psychopharmacology of alzheimer's disease: focus on cholinergic systems. *Neurochem*. 1998; 23:

هستند که در دوران پیری در انسان و حیوانات تغییر می‌یابند. این تغییرات حتی در غیاب بیماری نورودژنریتیو خاص که مرتبط با سن باشد، نیز اتفاق می‌افتد (۶). کورتکس مغزی و هیپوکامپ برای کنترل عملکردهای شناختی و حرکتی با هم در ارتباطند و به نظر می‌رسد نسبت به استرس اکسیداتیو حساس باشند و نیاز به آنتی‌اکسیدان‌ها داشته باشند. تصور می‌شود استرس اکسیداتیو یک عامل در کاهش عملکرد حرکتی و شناختی دیده شده در پیری است (۷). ریزوم گیاه سعد کوفی خاصیت مهار قوی بر استیل کولین استراز دارد و این خاصیت به‌عنوان عاملی محافظتی در برابر حیوانات گیاهخوار و سایر گیاهانی که در نزدیکی آن رشد می‌کنند، است (۱۰). موش‌های صحرایی که تحت انسداد شریان میان مغزی قرار گرفته‌اند، وقتی که با فلاونوئیدهای اولیگومریک جدا شده از ریزوم گیاه سعد کوفی تیمار می‌شوند باعث بهبود تعادل و عملکردهای حرکتی می‌شود (۱۲).

بهبودی در مقاومت و مدت زمان ماندن بر روی گردونه دستگاه روتارود در گروه‌های آلزایمری که عصاره دریافت می‌کنند، شاید به دلیل جبران نوروترانسمیتر استیل کولین در پایانه‌های سیناپسی در قشر مغز باشد. به‌دلیل تخریب نورون‌های کولینرژیک هسته‌ی NBM که انشعابات آن‌ها به قشر مغز فرستاده می‌شود و یا شاید به دلیل خاصیت

787-94.

- 3- Camacho F, Smith CP, Vargas HM, Winslow JT. Adrenoceptor antagonists potentiate acetylcholinesterase inhibitor effects on passive avoidance learning in the rat. *Psychopharmacology*. 1996; 124: 347-54.
- 4- Butt AE, Hodge GK. Simple and configural association learning in rats with bilateral quisqualic acid lesions of the nucleus basalis

- magnocellularis. *Behav Brain Res.* 1997; 89: 71-85.
- 5- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41: 1819-28.
- 6- Dean RL, Scozzafava J, Goas JA, Regan B, Beer B, Bartus RT. Age-related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse. *Exp Aging Res.* 1981; 7: 427-51.
- 7- Richardson JS. Free radicals in the genesis of alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 695: 73-6.
- 8- Bush AI. The metallobiology of alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 207-14.
- 9- Rabiei Z, Hojjati M, Rafieian-Kopaeia M, Alibabaei Z. Effect of *Cyperus rotundus* tubers ethanolic extract on learning and memory in animal model of alzheimer. *Biomedicine & Aging Pathology.* 2013; 3: 185-91.
- 10- Sharma R, Gupta R. *Cyperus rotundus* extract inhibits acetylcholinesterase activity from animal and plants as well as inhibits germination and seedling growth in wheat and tomato. *Life Sci.* 2007; 80: 2389-92.
- 11- Kilani-Jaziri S, Neffati A, Limem I, et al. Relationship correlation of antioxidant and antiproliferative capacity of *Cyperus rotundus* products towards K562 erythroleukemia cells. *Chem Biol Interact.* 2009; 181: 85-94.
- 12- Sunil AG, Kesavanarayanan KS, Kalaivani P, et al. Total oligomeric flavonoids of *Cyperus rotundus* ameliorates neurological deficits, excitotoxicity and behavioral alterations induced by cerebral ischemic-reperfusion injury in rats. *Brain Res Bull.* 2011; 84: 394-05.
- 13- Yazdanparast R, Ardestani A. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Cyperus rotundus*. *J Med Food.* 2007; 10: 667-74.
- 14- Rabiei Z, Rafieian-Kopaei M, Mokhtari S, Alibabaei Z, Shahrani M. The effect of pretreatment with different doses of *Lavandula officinalis* ethanolic extract on memory, learning and nociception. *Biomedicine & Aging Pathology.* In press.
- 15- Asgary S, Moshtaghian SJ, Setorki M, et al. Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) on alloxan-induced diabetic rats. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2001; 5: 2620-6.
- 16- Vale-Martnez A, Guillazo-Blanch G, Mar-Nicolovius M, Nadal R, Arvalo-Gara R, Morgado-Bernal I. Electrolytic and ibotenic acid lesions of the nucleus basalis magnocellularis interrupt long-term retention, but not acquisition of two-way active avoidance, in rats. *Exp Brain Res.* 2002; 142: 52-66.
- 17- Luesse HG, Schiefer J, Spruenken A, Puls C, Block F, Kosinski CM. Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res.* 2001; 126: 185-95.
- 18- Mallet PE, Beninger RJ, Flesher SN, Jhamandas K, Boegman RJ. Nucleus basalis lesions: Implication of basoamygdaloid

cholinergic pathways in memory. *Brain Res Bull.* 1995; 36: 51-6.

19- Bhattacharya SK, Kumar A, Jaiswal AK. Effect of mentat, a herbal formulation, on experimental models of alzheimer's disease and central cholinergic markers in rats. *Fitoterapia.* 1995; 3: 216-22.

20- McGaughy J, Decker MW, Sarter M. Enhancement of sustained attention performance

by the nicotinic acetylcholine receptor agonist ABT-418 in intact but not basal forebrain-lesioned rats. *Psychopharmacology.* 1999; 144: 175-82.

21- Elliott PJ, Garofalo L, Cuello AC. Limited neocortical devascularizing lesions causing deficits in memory retention and choline acetyltransferase activity effects of the monosialoganglioside GM1. *Neuroscience.* 1989; 31: 63-76.

The Effect of *Cyperus Rotundus* Ethanolic Extract on Motor Coordination in a Rat Model of Alzheimer

Rabiei Z¹, Gholami M², Hojjati MR³

¹Medical Plants Research Center, Shahr-e-kord University of Medical Sciences, Shahr-e-kord, Iran

²Clinical Biochemistry Research Center, Shahr-e-kord University of Medical Sciences, Shahr-e-kord, Iran

³Dept. Of Physiology and pharmacology Department, Medical Faculty, Shahr-e-kord University of Medical Sciences, Shahr-e-kord, Iran

Corresponding Author: Hojjati MR, Dept. Of Physiology and pharmacology Department, Medical Faculty, Shahr-e-kord University of Medical Sciences, Shahr-e-kord, Iran

E-mail: hojjatim@gmail.com

Received: 24 Jul 2013 **Accepted:** 27 Jan 2014

Background and Objective: Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disorder that leads to progressive cognitive decline. The memory dysfunction of AD has been associated with a cortical cholinergic deficiency and loss of cholinergic neurons of the nucleus basalis of Meynert (NBM). This study investigated the effect of ethanolic extract of *Cyperus rotundu* tubers (CRT) on motor activity in NBM-lesioned rat model of AD and intact rats.

Materials and Methods: In this experimental study 49 Wistar rats were divided into 7 groups. For this purpose, Wistar rats received bilateral electric lesions of the NBM. The control and sham groups received distilled water while NBM-lesioned group received CRT extract for 20 days with doses of 100 and 200 mg/kg. Intact rats received CRT extract for 20 days without any surgery. The motor activity was assessed with Rotarod apparatus. Data were analyzed using one- way Anova and LSD test.

Results: Use of ethanolic extract of CRT for 20 days improved motor activity in NBM-lesioned rats that received extract with a dose of 100 mg/kg. Ethanolic extract of CRT in the intact rats for 20 days significantly reduced motor activity when compared with the control group.

Conclusion: The results of this study suggest that ethanolic extract of CRT is useful in NBM-induced lesion rats via inducing some changes in acetylcholine levels in the brain.

Keywords: Alzheimer's disease, *Cyperus rotundu* tubers, Motor coordination, Ethanolic extract, Rat