

مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی ناشی از لیزوزیم سفیده تخم مرغ توسط عصاره مرزه و اثر آن بر یادگیری و حافظه فضایی موش صحرائی

حسن رامشینی*^۱، نیره کوثری^۱، شهریار سعیدیان^۱

خلاصه

مقدمه: آلزایمر یک بیماری تحلیل برنده سیستم عصبی است که از ویژگی‌های اصلی آن رسوب پلاک‌های غیرطبیعی آمیلوئیدی A β در مغز می‌باشد. گرچه مطالعات گسترده‌ای برای ساخت داروهای مؤثر در درمان این بیماری انجام شده است، اما تاکنون دارویی که بتواند تشکیل این تجمعات را مهار و علائم بیماری را بهبود بخشد ساخته نشده است. یکی از روش‌های مهم درمانی، استفاده از عصاره گیاهان دارویی که غنی از ترکیبات آروماتیک هستند می‌باشد. در مطالعه حاضر، اثر عصاره مرزه در مهار تشکیل آمیلوئید حاصل از لیزوزیم سفیده تخم مرغ و همچنین اثر آن روی حافظه فضایی موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت. روش: تعداد ۲۴ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۸۰-۲۵۰ گرم به چهار گروه کنترل، دریافت کننده اسکوپولامین، دریافت کننده فیبرهای لیزوزیم و دریافت کننده فیبرهای لیزوزیم تشکیل شده در حضور عصاره مرزه تقسیم شدند. تمام موش‌ها به کمک ماز آبی تحت آزمون یادگیری و حافظه فضایی قرار گرفتند. یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق تجمعات آمیلوئیدی لیزوزیم به هیپوکامپ موش صحرائی باعث تخریب حافظه فضایی موش شده در حالی که تجمعات لیزوزیم تشکیل یافته در حضور عصاره مرزه غیر سمی بوده و با تزریق به موش روی یادگیری و حافظه فضایی موش صحرائی تأثیر ندارد. نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره مرزه قادر است به‌طور مستقیم تشکیل تجمعات آمیلوئیدی حاصل از لیزوزیم را مهار نماید و در نتیجه مانع تخریب حافظه فضایی در موش صحرائی گردد. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از پروتئین‌های مدل به‌عنوان یک ابزار معتبر در مطالعات مربوط به بیماری آلزایمر می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: لیزوزیم سفیده تخم مرغ، تجمع آمیلوئیدی، عصاره مرزه، آلزایمر، حافظه فضایی

۱- استادیار بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، گروه علمی زیست‌شناسی، تهران ۲- کارشناسی ارشد، بیمارستان مبینی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: hramshini@ibb.ut.ac.ir

پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۹/۲۵

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۹/۱۲

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۱۷

مقدمه

بیماری آلزایمر یک ناهنجاری تحلیل برنده سیستم عصبی است که با کاهش پیشرونده عملکرد شناختی همراه است. کاهش حافظه فضایی و تخریب یادگیری از ویژگی‌های مشترک همه بیماران آلزایمری است (۱). دو نشانه اصلی بیماری آلزایمر، وجود پلاک‌های سنیل (senile plaques) در خارج سلول و تنگله‌های (tangle) نوروفیبریلی داخل سلولی است که با همدیگر باعث مرگ سلول‌های عصبی می‌شوند (۲). سنیل پلاک‌ها و تنگله‌ها به ترتیب از آمیلوئید پپتید $A\beta$ و پروتئین تاو (t) تشکیل شده است. این رسوبات می‌تواند نواحی کورتکس مغز و لب‌های تمپورال را درگیر کنند و سریع‌ترین آسیب‌های پاتولوژیک آنها در نواحی آمیگدال‌های مغزی، سایبیکولوم، هیپوکامپوس، کورتکس انتورینال و نواحی ترانسانتورینال خود را نشان می‌دهد (۱).

مطالعات نشان می‌دهد که فیبرهای آمیلوئیدی خارج سلولی تشکیل شده به وسیله $A\beta$ ، به ویژه الیگومرهای کوچک تشکیل شده قبل از تشکیل فیبریل‌های بالغ با اتصال به سیناپس‌ها سبب تخریب عملکرد آنها می‌شوند (۳). همچنین الیگومرهای $A\beta$ باعث مهار تقویت طولانی مدت (LTP: long-term potentiation) می‌گردند (۴). مطالعات نشان داده است که اثرات نورولوژیکی آمیلوئیدهای پروتئین‌های مدل از جمله لیزوزیم در اثر تزریق در مغز مشابه با الیگومرهای $A\beta$ است و می‌تواند باعث تخریب حافظه فضایی شود (۵) به همین دلیل در مطالعه حاضر از لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (HEWL: hen egg white lysosome) به عنوان یک پروتئین مدل استفاده شد. این پروتئین به دلیل اینکه قادر به تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی است و از لحاظ مورفولوژیکی، ساختاری و رنگ‌پذیری کاملاً شبیه پروتئین $A\beta$ می‌باشد، در مطالعات مربوط به بیماری‌های آمیلوئیدی مکرراً مورد استفاده قرار گرفته است (۶،۷). درمان‌های

رایجی که امروزه برای بیماران آلزایمری در نظر گرفته شده اغلب علامتی بوده و کمتر در رابطه با ممانعت از وقوع چنین ساختارهایی در بدن می‌باشد (۸،۹). بنابراین به علت اهمیت موضوع در درمان این بیماری و با توجه به مؤثر نبودن داروهای موجود، محققین تلاش‌های گسترده‌ای را در راستای طراحی و ساخت ترکیبات دارویی مؤثرتر انجام داده‌اند. سابقه درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی به قدمت تاریخ زیست انسان در کره زمین بر می‌گردد. گیاهان مختلفی وجود دارند که از دیدگاه طب سنتی قادر به پیشگیری از بیماری آلزایمر می‌باشند. عصاره این گیاهان اغلب غنی از ترکیبات آروماتیک مثل پلی‌فنل‌ها می‌باشند. امروزه تأثیر گیاهانی مثل رزماری، زرچوبه و چای سبز برای جلوگیری از زوال عقل و تقویت حافظه فضایی بسیار موفقیت آمیز بوده است (۱۰،۱۱). در مطالعه حاضر، اثر گیاه مرزه (*Satureia hortensis*) روی مهار تجمع پروتئین HEWL و همچنین اثر این گیاه بر حافظه فضایی موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفته است. به دلیل وجود تنوع زیاد در ترکیبات شیمیایی موجود در این گیاه، ارزش درمانی آن در طب سنتی بسیار بالا می‌باشد. از جمله ترکیبات اصلی در عصاره این گیاه می‌توان به کارواکرول (در عصاره این گیاه بالاترین میزان را دارد)، تیمول، فنول و فلاوونیک اسید اشاره کرد که همگی آروماتیک می‌باشند (۱۲). عصاره مرزه به دلیل داشتن این ترکیبات در طب سنتی برای درمان بیماری‌هایی نظیر بیماری‌های قارچی، میکروبی و همچنین جلوگیری از اسپاسم و اسهال استفاده می‌شده است (۱۳). همچنین به دلیل داشتن مقدار زیادی از این ترکیبات آروماتیک می‌تواند بدن را در مقابل اکسیدانت‌ها که یکی از عوامل گسترش بیماری آلزایمر و تخریب سلول‌های عصبی می‌باشند حمایت کند (۱۴). مطالعات اخیر نشان داده است که مولکول‌های شیمیایی یا بیولوژیکی که دارای یک یا چند حلقه

روش تهیه آمیلوئید سفیده تخم مرغ: برای القای تشکیل آمیلوئید، ۲mg/ml پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ (خریداری شده از شرکت سیگما) در بافر گلايسين با ۲/۵ pH= به مدت ۴۸ ساعت همراه با همزدن مداوم در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت (۱۱، ۶). سپس ویال حاوی ماده فوق در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه و با ۱۳۰۰۰ RPM سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی به آرامی توسط سمپلر (گیلسون، فرانسه) برداشته شد به طوریکه هرگز سر سمپلر به دیواره ویال برخورد نمی کرد. پس از آن به مقدار محلول رویی برداشته شده سرم فیزیولوژی از کناره های ویال با آن اضافه و چندین بار عمل سمپلینگ انجام شد. سپس این ماده به عنوان آمیلوئید تشکیل شده در غیاب عصاره مورد استفاده قرار گرفت.

روش تهیه آمیلوئید لیزوزیم در حضور عصاره مرزه: عصاره مرزه با غلظت ۵۰ mg/ml در آب مقطر تهیه شد و به نسبت ۱ درصد حجمی/حجمی به ویال تهیه آمیلوئید (مطابق روش تهیه آمیلوئید) اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون قبل از تزیق، ویال حاوی این ماده در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۵ دقیقه و با قدرت ۱۳۰۰۰ RPM سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی (عصاره مرزه) دور ریخته شد و به همان حجم سرم فیزیولوژی اضافه گردید و چند بار عمل سمپلینگ انجام شد. سپس این ماده به عنوان آمیلوئید تشکیل شده در حضور عصاره مورد استفاده قرار گرفت (۱۱).

تصویربرداری میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده آمیلوئید روی میکا قرار گرفته و به وسیله جریان ملایم هوا خشک شد و تصاویر AFM در هوا با میکروسکوپ (solver next, NT_MDT, Russia) که به یک بخش اسکن کننده (ماکزیمم سایز اسکن ۱۰۰ μm) و یک کنترل کننده Nanoscope IIIa مجهز بود

آروماتیک هستند قادرند مانع تجمع پروتئین ها گردند (۸، ۱۵) و به دلیل اینکه ترکیبات موجود در عصاره مرزه که در بالا به آن اشاره شد دارای ساختار آروماتیکی هستند، در این پژوهش اثر عصاره مرزه بر مهار مستقیم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم سفیده تخم مرغ (یک پروتئین مدل برای مطالعه تجمعات آمیلوئیدی) و همچنین بر حافظه فضایی موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش بررسی

این مطالعه روی ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۸۰-۲۵۰ گرم انجام شد که از موسسه تحقیقاتی پاستور تهران خریداری شده و پس از انتقال به حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، تعداد ۴ سر در هر قفس قرار گرفتند و اجازه داده شد تا با محیط جدید سازگار شوند و به سن و وزن مورد نظر برسند. اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی (کد مجوز اخلاق: IR.MEDSAB.REC.1394.102) رعایت گردید.

روش تهیه عصاره: برگ مرزه از هر بار یوم گیاهی دانشگاه اصفهان تهیه شد و پس از تأیید گونه مورد نظر (*Satureia hortensis*) توسط کارشناس هر بار یوم، پودر شده و عصاره استونی و اتانولی آن با استفاده از دستگاه سوکسله و روتاری به دست آمد. ابتدا حلال در قسمت بالن ریخته شده و دمای آن به وسیله هیتر تنظیم شد (۵۰ درجه سانتی گراد) سپس گیاه پودر شده داخل کارتوش قرار گرفته و سپس در قسمت سوکسله قرار داده شد و این عمل تا وقتی که عصاره به اندازه کافی غلیظ شود ادامه یافت. (حدود ۵-۴ ساعت) سپس عصاره به دست آمده به دستگاه روتاری منتقل شده تا حلال آن در دمای پایین جدا شود. عصاره به دست آمده پس از خشک شدن کامل در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۱).

به دست آمد. فرکانس استفاده شده بین ۳۴۲ و ۳۴۱ کیلو هرتز و سرعت اسکن نیز بین ۰/۶ تا ۱ هرتز بود (۶).

انجام تزریقات

حیوانات پیش از عمل جراحی، با تزریق درون صفاقی کتامین ۱۰۰ mg/kg و زایلین ۱۰ mg/kg بیهوش شدند. سپس موهای سر حیوان قیچی شد و سر موش صحرایی در دستگاه استریوتاکس ثابت شد. پس از بتادینه نمودن سر، برشی طولی در حد فاصل چشم‌ها و گوش‌ها ایجاد گردید و سطح روی جمجمه با کمک پنبه الکلی تمیز شده و نقطه برگما مشخص گردید. سپس بر اساس اطلس پاکسینوس هیپوکامپ روی سطح جمجمه نسبت به برگما با مختصات $ap = -3/3 \text{ mm}$ و $l = 2 \text{ mm}$ و $v = 3/3 \text{ mm}$ با کمک دستگاه استریوتاکس تنظیم و علامت گذاری شد. پس از سوراخ کردن محل علامت گذاری شده به کمک دریل دندانپزشکی، کانول گذاری توسط سر سرنگ شماره ۲۳ انجام شد و سپس به وسیله محلول غلیظ سیمان دندانپزشکی کانول راهنمای تزریق در جایگاه خود فیکس شد. برای جلوگیری از عفونت‌های بعدی محل جراحی با آنتی‌بیوتیک پنی‌سلین آغشته شده و در انتها بخیه زده شد و سپس حیوان برای گذراندن دوره هفت روزه بهبودی به حیوان خانه منتقل شد. هفت روز پس از جراحی تزریقات هر حیوان انجام شد. تزریق مواد مورد نظر در همه گروه‌ها به مقدار ۱ میکرولیتر با کمک سرنگ همیلتون توسط پمپ میکرواینجکشن از طریق کانول راهنما به صورت داخل هیپوکامپی طی پنج دقیقه انجام شد. گروه‌بندی حیوانات به شرح ذیل انجام شد.

۱- گروه کنترل: نیم ساعت قبل از انجام آزمون رفتاری ماز آبی یک میکرولیتر سرم فیزیولوژی تزریق شد.

۲- گروه دریافت کننده اسکوپولامین: اسکوپولامین یک آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی است که باعث

اختلال موقت در حافظه فضایی شده و مدلی شبیه بیماری آلزایمر ایجاد می‌کند. ابتدا ۳ $\mu\text{g}/\text{rat}$ ماده اسکوپولامین هیدروبروماید (خریداری شده از شرکت سیگما) در یک میکرولیتر نرمال سالین ۰/۹ درصد حل شده و به صورت داخل هیپوکامپی و هر روز نیم ساعت قبل از انجام آزمون رفتاری ماز آبی تزریق انجام می‌شد. به دلیل اینکه اثر اسکوپولامین روی تخریب حافظه موقتی است و بعد از چند ساعت از بین می‌رود، در هر روز آموزش نیم ساعت قبل از تزریق انجام می‌گیرد (۱۶).

۳- گروه دریافت کننده تجمعات آمیلوئیدی لیزوزیم تهیه شده در غیاب عصاره مرزه که در روش کار توضیح داده شد.

۴- گروه دریافت کننده تجمعات آمیلوئیدی تشکیل شده در حضور عصاره مرزه که در روش کار توضیح داده شد. گروه‌های سوم و چهارم بیست روز پس از انجام تزریقات مورد ارزیابی مطالعه رفتاری قرار گرفتند (۱۷).

بررسی سمیت فیبرهای آمیلوئیدی و تأثیر آن بر حافظه فضایی موش صحرایی توسط آزمون رفتاری ماز آبی مورس انجام شد.

به منظور بررسی میزان حافظه فضایی حیوانات، ماز آبی مورس مورد استفاده قرار می‌گیرد. این وسیله از جمله وسایل و روش‌های مورد استفاده برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی در جوندگان است. ماز آبی از یک مخزن آب استوانه‌ای سیاه رنگ به قطر ۱۵۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر تشکیل شده است که تا ارتفاع ۳۲/۵ سانتی‌متری از آب پر می‌شود. دمای آب هم دمای اتاق آزمایشگاه و برابر با ۲۲ درجه سانتی‌گراد است. یک سکوی قابل تغییر به ارتفاع ۳۰ و قطر ۱۰ سانتی‌متر و به رنگ سیاه در مرکز یکی از ربع‌های مخزن قرار گرفته است که ۲/۵ سانتی‌متر زیر آب قرار دارد. در طول آزمایش حرکات حیوان توسط دوربین ویدئویی که درست در بالای ماز قرار دارد و از طریق نرم

آزمون و روش آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و با آزمون آماری ANAVA_MANAVA و به تناسب نوع آزمایشات از آنالیز واریانس یک طرفه (آزمون به خاطر آوری حافظه فضایی) و با آنالیز واریانس دوطرفه (روزهای آموزش) و در صورت معنی داری بودن آزمون، برای تأیید سطح معنی داری از آزمون تکمیلی SLD استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد و با در نظر گرفتن $P < 0.05$ به عنوان شاخص معنی داری محاسبه شد.

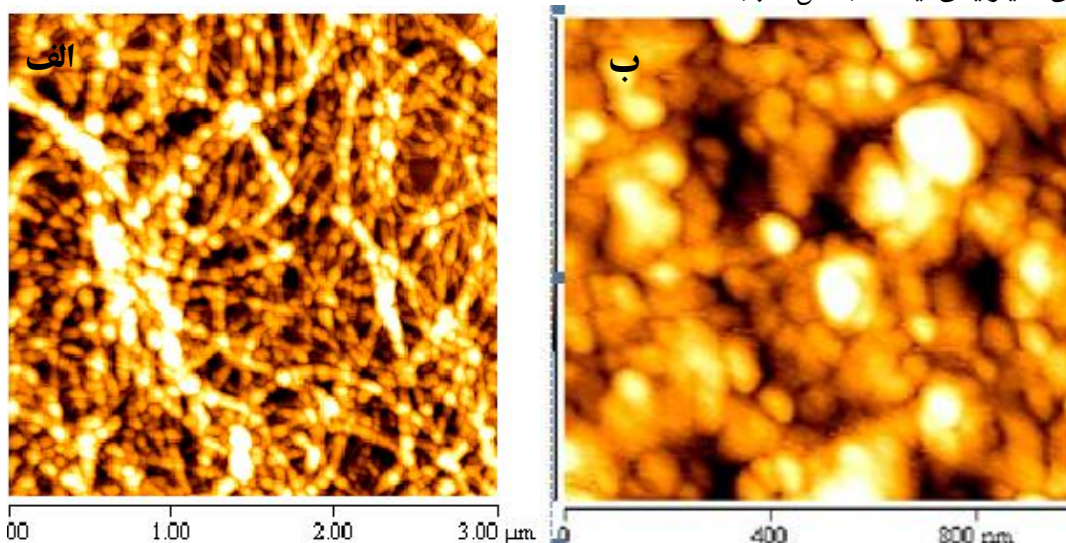
نتایج

القای تجمع آمیلوئیدی در لیزوزیم سفیده تخم مرغ

همانطور که در بخش مقدمه ذکر شد، در مطالعات مربوط به مهار آمیلوئید، از لیزوزیم سفیده تخم مرغ که به راحتی تبدیل به فیبر شده و ویژگی‌های آن به خوبی شناخته شده است، استفاده می‌شود. مطالعات قبلی ما در باره اثر عصاره مرزه روی تجمع آمیلوئیدی لیزوزیم نشان داد که نسبت یک درصد حجمی - حجمی آن بهترین اثر را برای مهار این فرآیند دارد (داده‌ها گزارش نشده است). در غلظت‌های بالاتر به دلیل کدر شدن محیط امکان بررسی اثر به وسیله روش‌های اسپکتروفتومتریکی مقدور نمی‌باشد و غلظت‌های پایین‌تر اثرات مهاری خیلی کمتری دارند؛ بنابراین از این غلظت برای مطالعه حاضر استفاده شد. در این مطالعه نیز بر اساس دستورالعمل ارائه شده در بخش روش‌ها HEWL تبدیل به فیبر آمیلوئیدی گردید و وجود این ساختارها بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از عکس میکروسکوپ نیروی اتمی تأیید شد. همانطور که شکل ۱الف نشان می‌دهد، در غیاب عصاره فیبرهای طویل و غیر منشعب آمیلوئیدی حاصل می‌شود ولی در حضور عصاره مرزه به طور مشخص از تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی جلوگیری به عمل آمده است و همانطور که در تصویر آمده

افزار ردیاب ثبت می‌شود. این نرم افزار قادر به اندازه گیری مسافت طی شده توسط حیوان و نیز مدت زمانی که حیوان در هر قسمت از ماز و ربع هدف به سر می‌برد می‌باشد. کل آزمایش شامل چهار روز آموزش (مرحله یادگیری یا آموزش) و یک روز آزمون (مرحله بازخوانی یا پروب) بود. در مرحله‌ی اول هر چهار روز آموزش شامل چهار بارها کردن حیوان در ماز آبی است برای انجام این کار ماز به چهار قسمت مساوی تقسیم می‌شود و موش ۴ بار و هربار از یکی از سمت‌های چهارگانه‌ی شمال، جنوب، مغرب و مشرق که توسط برنامه ردیاب اعلام می‌شود در مخزن رها می‌شود. در طی این آزمایش ۶۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شود تا حیوان بتواند به طور اتفاقی سکوی مخفی را بیابد و روی آن قرار گیرد. بعد از یافتن به موش به مدت ۱۰ ثانیه زمان داده می‌شود تا با دیدن علائم موجود در اطراف موقعیت خود را شناسایی کند، این عمل به حیوان کمک می‌کند تا در جلسات بعدی با استفاده از علائم جایگاه را پیدا نماید. بعد از ۱۰ ثانیه موش دوباره از جهت دیگر در استخر رها می‌شود. اما اگر در مدت ۶۰ ثانیه حیوان قادر به پیدا کردن سکو نباشد به آرامی به طرف سکو راهنمایی می‌شود. پس از پیدا کردن سکو به او اجازه داده می‌شود تا ۱۰ ثانیه بر روی سکو قرار گیرد و بعد از ۱۰ ثانیه دوباره از جهت دیگر در استخر رها می‌شود. بعد از ۴ بار موش از استخر خارج شده و به آرامی توسط حوله خشک و به قفس برگردانده می‌شود. در روز پنجم آزمون پروب انجام می‌شود بدین ترتیب که سکو را از داخل استخر خارج کرده و هر کدام از حیوانات یک بار از نقطه مشخصی به داخل استخر گذاشته می‌شوند. در مدت ۶۰ ثانیه حضور حیوان در استخر، کل مسافت طی شده، تعداد دفعات ورود به ربع هدف و مدت زمانی که حیوان در ربع هدف از استخر (که سکو در آن قرار داشت) شنا می‌کند. اندازه گیری می‌شود (۱۷).

است، در حضور عصاره تجمعات بی‌شکل حاصل شده و اثری از فیبرهای آمیلوئیدی نیست (شکل ۱ ب).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی ۲ میلی گرم بر میلی لیتر لیزوزیم در بافر گلايسين با $pH=2/5$ بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد در غیاب عصاره مرزه (الف) و در حضور ۵۰ میلی گرم عصاره مرزه (به میزان یک درصد حجمی/حجمی) (ب).

آموزش ($F(3-92) p=0/001$) نشان می‌دهد. این در حالی است که بین روزهای آموزشی و گروه‌های مختلف ($F(9-92) p=0/26$) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین آزمون تکمیلی LSD نشان داد که در مقایسه درون گروهی، گروه‌های اسکوپولامین (کنترل مثبت) و دریافت‌کننده آمیلوئید (در غیاب عصاره) در روز چهارم نسبت به روز اول تفاوت معنی‌داری ($P=0/000$) داشتند. در گروه تیمار (گروه دریافت‌کننده آمیلوئیدهای تشکیل شده در حضور عصاره مرزه) در روزهای سوم و چهارم نسبت به روز اول کاهش معنی‌دار ($P=0/002$) بود. در مقایسه بین گروهی مشخص شد ضمن اینکه گروه‌های اسکوپولامین و لیزوزیم در هر چهار روز آموزشی نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌دار ($p=0/354$) نداشتند، این دو گروه در هر چهار روز نسبت به گروه کنترل (شاهد) تفاوت معنی‌دار ($p=0/005$) نشان دادند. گروه دریافت‌کننده آمیلوئید تشکیل شده در حضور عصاره مرزه در هر چهار روز

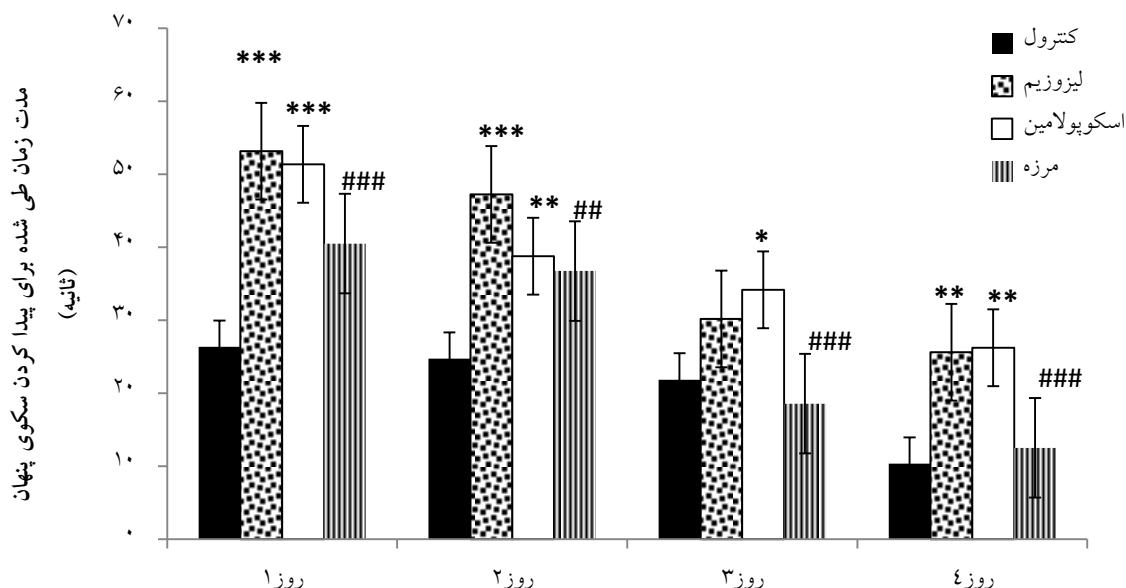
پیش‌بینی ما این بود که فیبرهای تشکیل شده در غیاب عصاره برای نرون‌ها سمی بوده و باعث تخریب حافظه فضایی موش گردد ولی الیگومرهای تشکیل شده در حضور عصاره نباید تخریب معنی‌داری روی سلول‌های نورونی و در نتیجه حافظه فضایی موش صحرایی بعد از تزریق به هیپوکامپ بگذارد. برای سنجش اثر تجمعات تشکیل شده در حضور و یا غیاب عصاره روی یادگیری از ماز آبی موریس بر اساس توضیحات ارائه شده در بخش روش‌ها استفاده گردید.

نتایج روزهای آموزش

زمان شنا کردن

بر اساس نتایج نشان داده شده در نمودار شماره ۱ و همچنین آنالیز واریانس دو طرفه، پارامتر زمان پیدا کردن سکوی نجات تفاوت معنی‌دار بین چهار گروه مورد آزمایش ($F(3-92) p=0/001$) و روزهای مختلف

آموزش نسبت به گروه‌های اسکوپولامین (کنترل مثبت) و آمیلوئید (در غیاب عصاره) تفاوت معنی‌دار ($p=0/00$) نشان دادند.



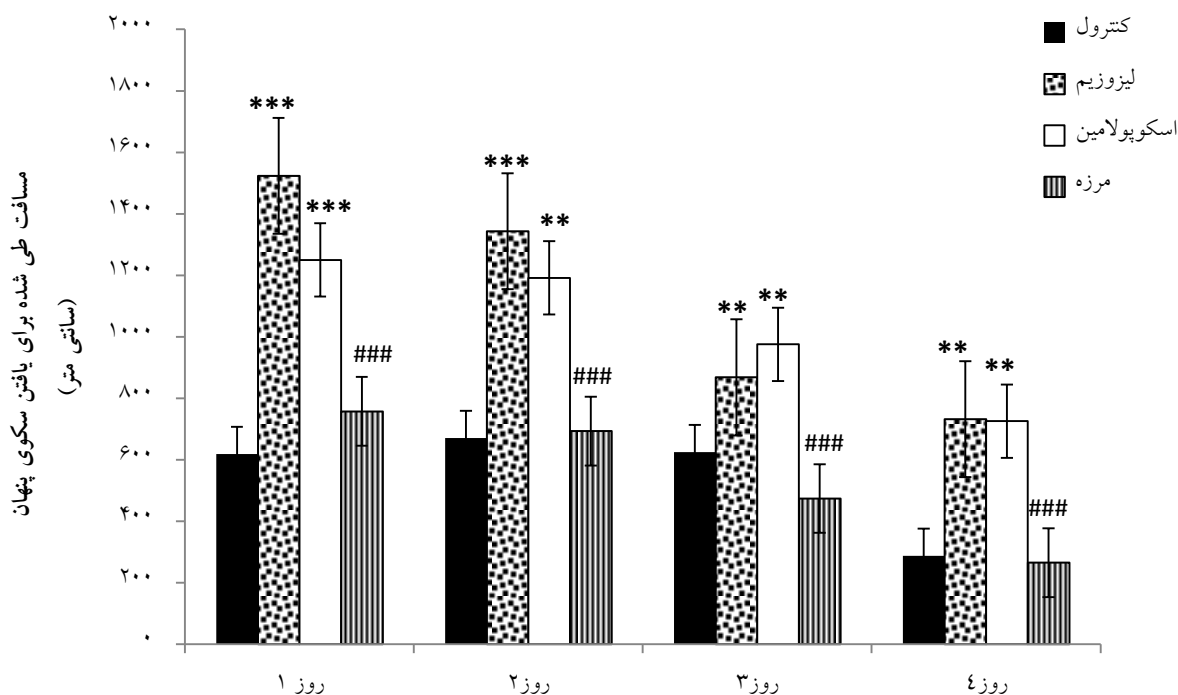
نمودار شماره ۱. مدت زمان طی شده در ماز آبی مورب برای یافتن سکوئی پنهان توسط موش‌های گروه‌های مختلف در دوره آموزش.

داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. با توجه به نتایج آزمون آماری روند یادگیری بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت. *** نشان دهنده $P < 0/001$ ، ** نشان دهنده $P < 0/01$ ، * نشان دهنده $P < 0/05$ نسبت به کنترل و #### نشان دهنده $P < 0/001$ ، ### نشان دهنده $P < 0/01$ در مقایسه با گروه دریافت کننده آمیلوئید لیزوزیم

معنی‌داری داشتند. گروه آمیلوئید (تشکیل شده در حضور عصاره مرزه) نیز در روزهای سوم و چهارم نسبت به روز اول کاهش معنی‌دار ($p=0/008$) را نشان می‌داد. در مقایسه بین گروهی مشخص شد ضمن اینکه گروه‌های اسکوپولامین و آمیلوئید (غیاب عصاره) در هر چهار روز آموزشی نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌دار ($p=0/8$) نداشتند، این دو گروه در هر چهار روز نسبت به گروه کنترل (شاهد) تفاوت معنی‌دار ($p=0/005$) نشان دادند. گروه تیمار یا عصاره مرزه در هر چهار روز آموزش نسبت به گروه‌های اسکوپولامین (کنترل مثبت) و آمیلوئید (در حضور عصاره) تفاوت معنی‌دار ($p=0/008$) نشان دادند.

مسافت طی شده برای یافتن سکو

آنالیز واریانس دو طرفه پارامتر مسافت طی شده (بر اساس داده‌های ارائه شده در نمودار شماره ۲) برای پیدا کردن سکوئی نجات نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین چهار گروه مورد آزمایش ($F(3-92) p=0/005$) و روزهای مختلف آموزش ($F(3-92) p=0/00$) است. این در حالی است که بین روزهای آموزشی و گروه‌های مختلف $F(9-92) p=0/1$ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. همچنین آزمون تکمیلی LSD نشان داد که در مقایسه درون گروهی، گروه‌های اسکوپولامین (کنترل مثبت) ($p=0/00$) و آمیلوئید (تشکیل شده در غیاب عصاره) ($p=0/003$) در روز چهارم نسبت به روز اول تفاوت



نمودار شماره ۲. مسافت طی شده در ماز آبی موريس برای یافتن سکوی مخفی توسط موش‌های گروه‌های مختلف در روزهای آموزش.

داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. با توجه به نتایج آزمون آماری روند یادگیری بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت. *** نشان دهنده $P < 0.001$ ، ** نشان $P < 0.01$ ، # نشان دهنده $P < 0.05$ نسبت به کنترل و ### نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه دریافت کننده آمیلوئید لیزوزیم

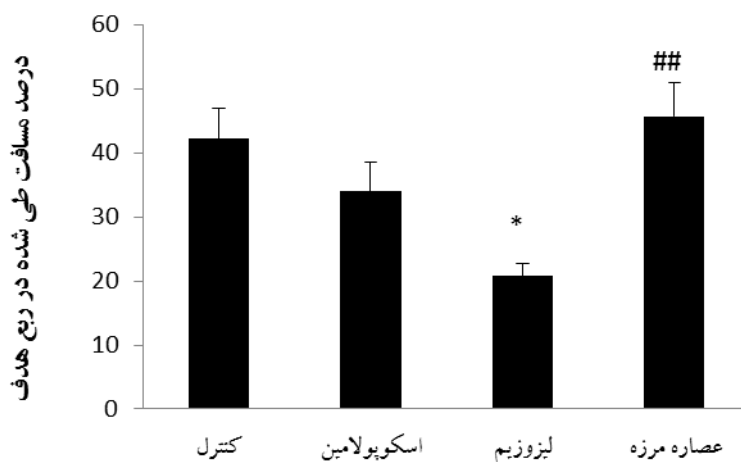
یافته‌های آزمون به خاطر آوری

برای ارزیابی و توانایی به خاطر آوری (روز پروب)، حیوانات در ماز قرار گرفتند و به آنها فرصت داده شد تا ۶۰ ثانیه شنا کنند. مدت زمان سپری شده در ربع هدف، درصد مسافت طی شده در ربع هدف و تعداد دفعات ورود حیوان به ربع هدف در روز آزمون به خاطر آوری بررسی شد. میزان این شاخص‌ها در ربع هدف توسط حیوان در آزمون به خاطر آوری از شاخص‌های مهمی می‌باشند که حافظه فضایی و توانایی به خاطر آوری حیوان را می‌سنجد.

درصد مسافت طی شده در ربع هدف

نتایج درصد مسافت طی شده در ربع هدف (در روز پروب) در نمودار شماره ۳ آورده شده است. آنالیز

واریانس یک طرفه حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌هاست ($F(3-20), p = 0.00$). آزمون تکمیلی LSD نشان داد که درصد مسافت طی شده در ربع هدف در گروه دریافت کننده آمیلوئید لیزوزیم در غیاب عصاره نسبت به گروه کنترل ($p = 0.00$) و در گروه اسکوپولامین نیز نسبت به گروه کنترل ($P = 0.009$) تفاوت معنی‌داری دارد. در پژوهش حاضر، گروه دریافت کننده آمیلوئید تشکیل شده در حضور عصاره مرزه ($p = 0.0095$) نسبت به گروه آمیلوئید تشکیل شده در غیاب آن تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. افزایش درصد مسافت طی شده در ربع هدف نشان دهنده کارایی بالاتر حافظه فضایی می‌باشد.



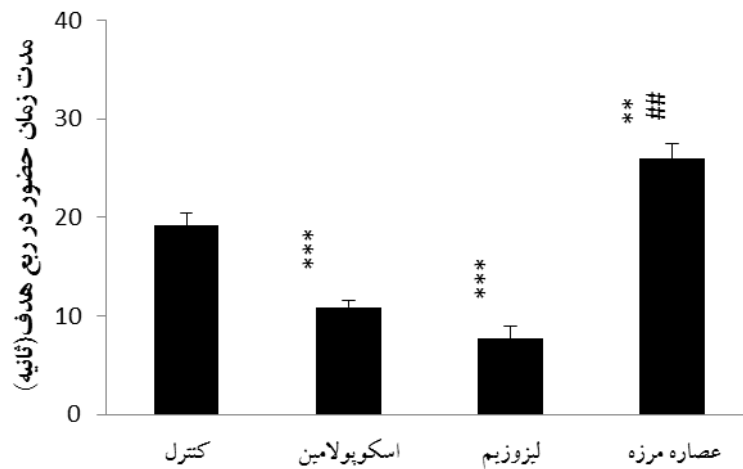
نمودار شماره ۳. مقایسه درصد مسافت طی شده در ربع هدف ماز آبی در آزمون به خاطر آوری.

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. با توجه به نتایج آزمون آماری روند مسافت طی شده در ربع هدف بین گروه تیمار و گروه‌های اسکوپولامین و لیزوزیم تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد. * نشان دهنده $P < 0/05$ نسبت به گروه کنترل و ## نشان دهنده $P < 0/01$ در مقایسه با گروه دریافت کننده آمیلوئید لیزوزیم

مدت زمان حضور در ربع هدف

مدت زمان حضور هر یک از گروه‌ها در ربع هدف در روز پروب مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج آن در نمودار شماره ۴ آورده شده است. آنالیز واریانس یک طرفه حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد. ($F(3-20) p = 0/00$). آزمون تک‌میلی LSD نشان داد که زمان حضور در ربع هدف در دو گروه دریافت کننده

اسکوپولامین و آمیلوئید (در غیاب عصاره) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($p = 0/001$). گروه آمیلوئید (در حضور عصاره مرزه) نسبت به گروه آمیلوئید (در غیاب عصاره) افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p = 0/01$) این نشان دهنده این است که آمیلوئیدهای تشکیل شده در حضور عصاره سمیتی نداشته‌اند و لذا روی حافظه فضایی تأثیری ندارند.



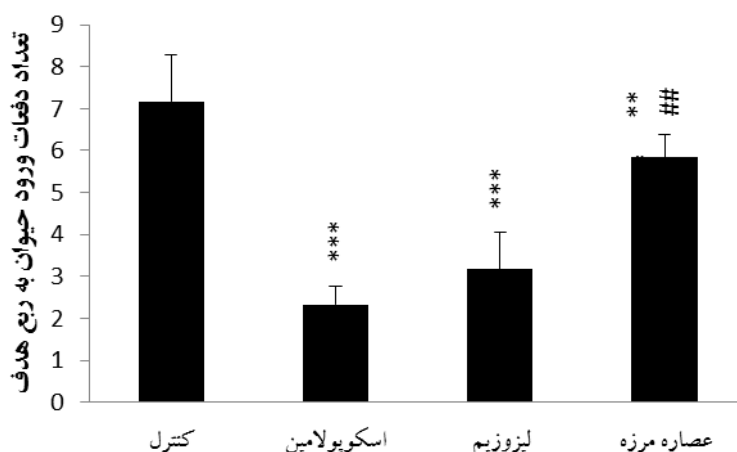
نمودار شماره ۴. مقایسه مدت زمان حضور در ربع هدف ماز آبی در آزمون به خاطر آوری.

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. با توجه به نتایج آزمون آماری مدت زمان حضور در ربع هدف بین گروه تیمار و گروه‌های اسکوپولامین و لیزوزیم تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد. *** نشان دهنده $P < 0/001$ ، ** نشان دهنده $P < 0/01$ نسبت به گروه کنترل و ## نشان دهنده $P < 0/01$ در مقایسه با گروه دریافت کننده آمیلوئید لیزوزیم

تعداد دفعات ورود حیوان به ربع هدف

یکی دیگر از پارامترهای مورد مطالعه تعداد دفعاتی است که هر یک از گروه‌ها در روز پروب وارد ربع هدف می‌شوند. نتایج حاصل از این مطالعه در نمودار شماره ۵ آورده شده است. آنالیز واریانس یک طرفه بیانگر وجود تفاوت معنی دار از این نظر در بین گروه‌ها می‌باشد. ($F(3-20) p=0/002$) و آزمون تکمیلی LSD نشان داد، گروه اسکوپولامین ($p=0/001$) و گروه آمیلوئید (غیاب عصاره)

($p=0/005$) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را از نظر تعداد دفعات ورود به ربع هدف داشتند. گروه تیمار (آمیلوئید در حضور عصاره مرزه) نسبت به آمیلوئید (در غیاب عصاره) افزایش معنی داری از نظر تعداد دفعات ورود به ربع هدف نشان دادند ($p=0/02$). از نظر تعداد دفعات ورود به ربع هدف نیز موش‌هایی که آمیلوئید تشکیل شده در حضور عصاره (آمیلوئید غیر سمی) دریافت کرده بودند عملکرد خیلی بهتری را نشان دادند.



نمودار شماره ۵. مقایسه تعداد دفعات ورود موش‌ها به ربع هدف ماز آبی در آزمون به خاطر آوری.

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. با توجه به نتایج آزمون آماری تعداد دفعات ورود موش‌ها به ربع هدف بین گروه بیمار و گروه‌های اسکوبولامین و لیزوزیم تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد. *** نشان دهنده $P < 0.001$ ، ** نشان دهنده $P < 0.01$ نسبت به گروه کنترل و ## نشان دهنده $P < 0.01$ در مقایسه با گروه دریافت کننده آمیلوئید لیزوزیم

بحث و نتیجه گیری

تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که ترکیبات پلی فنولیک و ایندولی (صرف نظر از نقش آنتی اکسیدانی خود) قادرند مستقیماً روی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی تأثیر گذاشته و مانع رشد و بلوغ فیبرهای آمیلوئیدی گردند (۸،۹). این مولکول‌ها از طریق بخش‌های آروماتیکی خود وارد هسته‌های اولیه تجمع شده و مانع جهت یابی صحیح هسته‌های اولیه تجمع و ایجاد اندرکنش مناسب‌شان شده و از این راه مانع رشد و تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌گردند (۸،۱۵). از طرف دیگر ماده مؤثره اغلب گیاهان دارویی که باعث تقویت حافظه فضایی می‌گردد دارای ترکیبات پلی فنولیک و مولکول‌های کوچک آروماتیک است (۱۸). در یک مطالعه مروری، آدامز و همکاران به گیاهانی که به طور سنتی برای تقویت حافظه فضایی و جلوگیری از بیماری‌های مربوط به تحلیل حافظه فضایی در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند، اشاره کرده‌اند. در این مطالعه ذکر شده که اغلب گیاهان خانواده Lamiaceae دارای چنین نقشی

بوده و اغلب این گیاهان دارای ماده مؤثره پلی فنولیک و آروماتیک هستند (۱۸). همانطور که در بخش مقدمه اشاره شد در طب سنتی از برگ گیاه مرزه برای تقویت حافظه فضایی و جلوگیری از آلزایمر استفاده می‌شود (۱۹). در این مطالعات بیشتر به نقش آنتی اکسیداتی این عصاره اشاره شده است. در مطالعه حاضر اثر عصاره مرزه روی مهار مستقیم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی و همچنین جلوگیری از تخریب حافظه فضایی موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات ما روی ماز آبی نشان داد که هر چهار گروه مورد مطالعه در مورد دو فاکتور زمان سپری شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در آزمون یادگیری از روز اول تا چهارم روند کاهشی داشته و تمام گروه‌ها در روز چهارم نسبت به روز اول کاهش معنی داری را نشان دادند (نمودارهای شماره ۲ و ۱). معنی دار بودن کاهش زمان یافتن سکو و مسافت طی شده در روزهای چهارم در مقایسه با روز اول در تمام گروه‌ها به معنای یادگیری ماز برای همه گروه‌ها در پایان آموزش

است. همچنین مدت زمان سپری شده در ربع هدف، درصد مسافت طی شده در ربع هدف و تعداد دفعات ورود حیوان به ربع هدف در روز آزمون به خاطر آوری (پروب) نشان داد که گروه‌های آسیب (دریافت کننده اسکوپولامین و آمیلوئیدهای لیزوزیم در غیاب عصاره) نسبت به گروه‌های کنترل و گروه دریافت کننده آمیلوئید (در حضور عصاره) از عملکرد حافظه فضایی ضعیف‌تری برخوردار بودند و در واقع ماده اسکوپولامین و آمیلوئیدی (تشکیل شده در غیاب عصاره) توانسته‌اند باعث ایجاد اختلال در حافظه فضایی حیوان شوند و عملکرد بهتر گروه‌های تیمار (آمیلوئید در حضور عصاره مرزه) نسبت به گروه‌های آسیب نشان می‌دهد که گروه‌های تیمار دچار اختلال حافظه فضایی نشده‌اند و احتمالاً عصاره مرزه به‌طور مؤثرتری توانسته است از آمیلوئیدی شدن لیزوزیم (با وجود شرایط القایی) قبل از تزریق به حیوان، جلوگیری نموده و مانع ایجاد آلزایمر در حیوان شود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پلی‌فنل‌های آروماتیک گیاهان دارویی باعث بهبود حافظه فضایی موش صحرایی می‌گردند. از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه اثر عصاره زعفران توسط حسین‌زاده و همکاران (۲۰)، اثر آب انگور توسط سیاه‌مرد و همکاران (۲۱) و عصاره آبی سنجد توسط تمناچی و همکاران اشاره کرد (۲۲). رامشینی و همکاران اثر مستقیم عصاره دارچین و چای سبز را روی مهار مستقیم فیبرهای آمیلوئیدی مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که این عصاره‌ها باعث تخریب فیبرهای آمیلوئیدی می‌گردند (۱۱). ما در یک مطالعه دیگر مشابه مطالعه حاضر اثر تجمعات آمیلوئیدی تشکیل شده در حضور عصاره چای سبز روی حافظه فضایی موش صحرایی را نیز بررسی کرده و نشان داده‌ایم که این تجمعات باعث تخریب حافظه فضایی موش

صحرایی نمی‌شوند (داده‌های منتشر نشده). مطالعات محققین دیگر نیز با القای تجمع آمیلوئیدی در پروتئین‌های غیر وابسته به بیماری (پروتئین‌های مدل) مثل انسولین و یک پروتئین سنتتیک به نام HypF-N و تزریق آن به موش صحرایی توانسته‌اند باعث بیماری آلزایمر در موش‌های صحرایی شوند. (۷، ۲۳). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که آمیلوئیدهای تشکیل شده به وسیله یک پروتئین که هیچ ارتباطی با بیماری‌ها ندارد (پروتئین مدل) قادر است تولید آمیلوئیدهای سمی مشابه $A\beta$ نموده و حافظه فضایی موش صحرایی را نیز مشابه آن تخریب نماید و نشان داده شد که ترکیبات پلی‌فنلیک موجود در عصاره مرزه قادرند مانع تشکیل فیبرهای سمی آمیلوئیدی شده و به دنبال آن حافظه فضایی موش نیز در حضور این فیبرهای غیرسمی شده در حضور عصاره مرزه تخریب نمی‌گردد (۲۴). این نتایج فرصتی را فراهم می‌آورد که برای مطالعه بیماری آلزایمر از پروتئین‌های مدل استفاده شود که ضمن اینکه دقیقاً مشابه پروتئین $A\beta$ قادر به تخریب حافظه فضایی و ایجاد آلزایمر هستند، دارای مزایایی دیگری مثل پایداری زیاد و تکرارپذیری بالا بوده و همچنین به دلیل ارزان‌ی این پروتئین‌ها نسبت به $A\beta$ از لحاظ اقتصادی صرفه جویی در هزینه‌ها را به همراه دارند (۷). این یافته‌ها همچنین این فرضیه که علاوه بر $A\beta$ پروتئین‌های دیگری نیز در ایجاد بیماری آلزایمر مشارکت می‌کنند را قویاً اثبات می‌کند (۷). در نهایت نتیجه این پژوهش نشان داد عصاره مرزه قادر است تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم را مهار و به تجمعات بی‌شکل و غیر سمی تبدیل کند که این تجمعات تشکیل شده در حضور عصاره قادر به تخریب حافظه موش صحرایی نیستند.

References

- Castellani RJ, Rolston, RK, Smith M.A. Alzheimer disease. *Dis Mon* 2010; 56(9): 484-546.
- Lee CY, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* 2010; 117(8): 949-60.
- Stéphan A, Laroche S, Davis S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci* 2001; 21(15): 5703-14.
- Wang J, Ikonen S, Gurevicius K, Van Groen T, Tanila H. Altered auditory-evoked potentials in mice carrying mutated human amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Neuroscience* 2003; 116(2): 511-17.
- Arnaudov LN, de Vries R. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophys J* 2005; 88(1): 515-26.
- Ramshini H, Mohammad-Zadeh M, Ebrahim-Habibi A. Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by a chemical analog of Curcumin as a stable inhibitor. *Int J Biol Macromol* 2015; 78: 396-404.
- Tatini F, Pugliese AM, Traini C, Niccoli S, Maraula G, Ed Dami T, et al. Amyloid- β oligomer synaptotoxicity is mimicked by oligomers of the model protein HypF-N. *Neurobiol Aging* 2013; 34(9): 2100-9.
- Burley SK, Petsko GA. Aromatic-aromatic interaction: A mechanism of protein structure stabilization. *Science* 1985; 229(4708): 23-8.
- Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T. et al. Small molecule inhibitors of alpha synuclein filament assembly. *Biochemistry* 2006; 45(19): 6085-69
- Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). *Behav Brain Res* 2007; 180(2): 139-45.
- Ramshini H, Ayoubi F. Inhibitory Effect of *Cinnamomum Zeylanicum* and *Camellia Sinensis* Extracts on the Hen Egg-White Lysozyme Fibrillation. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 2014; 21(4): 290-301 [Persian].
- Zgorka G, Glowniak K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to Lamiaceae family. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 26(1): 79-87.
- Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Iran J Microbiol* 2011; 3: 194-200.
- Yazdanparast R, Shahriyary L. Comparative effects of *Artemisia dracunculus*, *Satureja hortensis* and *Origanum marjorana* on inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion. *Vascul Pharmacol* 2008; 48(1): 32-7.

15. Hunter C.A, Lawson K.R, Perkins J, Urch C.J. Aromatic interactions. *J Chem Soc Perkin Trans* 2001; 2: 651-69.
16. Ebert U, Kirch W. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(11): 944-9.
17. Wilcock DM, Gordon MN, Morgan D. Quantification of cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques with Congo red histochemical stain. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1591-95.
18. Adams M, Gmünder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders a survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol* 2007; 113(3): 363-81.
19. Momtaz S, Abdollahi M. An update on pharmacology of Satureja species from antioxidant, antimicrobial, antidiabetes and anti-hyperlipidemic to reproductive stimulation. *International Journal of Pharmacology* 2010; 6(4): 454-61.
20. Hosseinzadeh H, Ziaei T. Effects of Crocus sativus Stigma Extract and its Constituents, Crocin and Safranal, on Intact Memory and Scopolamine-Induced Learning Deficits in Rats Performing the Morris Water Maze Task. *JMP* 2006; 5(19): 40-50.
21. Siahmard Z, Alaei H , Reisi P, Pilehvarian AA. Evaluation of the Effects of Red Grape Juice on Alzheimer's Disease in Rat. *Journal of Isfahan Medical School* 2012; 29: 2383-90 [Persian].
22. Tamtaji, OR, Taghizadeh M, Takhtfiroozeh SM, Talaei SA. The Effect of Elaeagnus Angustifolia Water Extract on Scopolamine-Induced Memory impairment in rats. *Journal of Zanzjan University of Medical Sciences* 2014; 22(95): 101-11 [Persian].
23. Kheirbakhsh R, Chinisaz M, Khodayari S, Amanpour S, Dehpour AR, Muhammadnejad A, et al. Injection of insulin amyloid fibrils in the hippocampus of male Wistar rats: report on memory impairment and formation of amyloid plaques. *Neurol Sci* 2015; 36(8): 1411-6.
24. Ladiwala AR, Dordick, JS, Tessier PM. Aromatic small molecules remodel toxic soluble oligomers of amyloid beta through three independent pathways. *J Biol Chem* 2011; 286(5): 3209-18.

Inhibition of Amyloid Fibrils Formation from Hen Egg White Lysozyme by *Satureia Hortensis* Extract and its Effect on Learning and Spatial Memory of Rats

Hasan Ramshini, Ph.D.^{1*}, Nayerreh Kosari, M.Sc.², Shahriar Saeidian, Ph.D.¹

1. Assistant Professor of Biochemistry, Payam-e- Noor University, Department of Biology, Tehran, Iran

2. Mobini hospital, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

* Corresponding author; e-mail: hramshini@ibb.ut.ac.ir

(Received: 7 July 2015 Accepted: 15 Dec. 2015)

Abstract

Background & Aims: Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by the abnormal aggregation of amyloid- β plaques in the brain. Although several studies have been done for finding effective medicines in the treatment of this disease, a drug that inhibits amyloid β aggregation and ameliorates the disorder has not been approved so far. One important therapeutic approach is use of herbal extracts which are rich in aromatic compounds. In the present study, we induced amyloid aggregation in hen egg white lysozyme (HEWL), and the therapeutic efficacy of *Satureia hortensis* extract on amyloid aggregation inhibition, learning and spatial memory of rats were investigated.

Methods: A total of 24 male wistar rates (250-280 gr) were divided into the 4 groups (n=4): control, scopolamine- received, lysozyme- received, and lysozyme- received in presence of *Satureia hortensis* extract. Morris Water maze was used for studying the learning and spatial memory.

Results: The results showed that the hippocampal injection of HEWL causes damage to the spatial memory of rats, but amyloid aggregation formed in the presence of *Satureia hortensis* is not toxic and has, no significant effect on spatial memory of rat.

Conclusions: These observations suggest that *Satureia hortensis* extract is capable of inhibiting amyloid aggregation. Moreover, the study showed the importance of using model proteins as a valid tool in studies on Alzheimer's disease.

Keywords: Hen egg white lysozyme, Amyloid aggregation, *Satureia hortensis* extract, Alzheimer's disease, Spatial memory

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(3): 271-285