

مقاله پژوهشی

بررسی اثر گیاه *سالویا ماسیلنتا* (*Salvia macilenta*) بر میزان سطح پروتئین CREB و فعالیت استیل کولین استرازی مغزی در موش‌های صحرایی نر مدل آلزایمرشبنم طاهری^۱، هومن شجعی^۱، قربانگل اصحابی^{۲*}، سولماز خلیفه^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات علوم اعصاب و شناخت، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: gh-ashabi@tums.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1941257.1311

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۴

چکیده

بیماری آلزایمر یکی از مهمترین بیماری‌های تخریب عصبی است که منجر به زوال عقل می‌گردد. مطالعات بسیاری در زمینه پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر انجام شده است. اثر محافظت نورونی گونه‌های مختلف گیاه *سالویا* در جلوگیری از مرگ نورونی به اثبات رسیده است. در این بررسی اثر گیاه *سالویا ماسیلنتا* (*Salvia macilenta*) در موش‌های آلزایمری مورد مطالعه قرار می‌گیرد. موش‌ها به چهار گروه شش‌تایی تقسیم شدند: با روش گاوژ به مدت ده روز عصاره الکلی گیاه *سالویا ماسیلنتا* را دریافت کردند سپس با تزریق آمیلوئید بتا آلزایمری شدند. سطح ملکولی $Ca^{2+}/CREB$ و استیل کولین استرازی در کورتکس پیش‌پیشانی و هیپوکمپ بررسی شد. این مطالعه نشان داد که پیش‌درمانی با عصاره گیاه *سالویا ماسیلنتا* سبب افزایش فسفوریلاسیون CREB نسبت به گروه آلزایمری در کورتکس پیش‌پیشانی و هیپوکمپ گردید (برای هر دو ناحیه $p < 0/001$). درمان با *سالویا ماسیلنتا* سبب کاهش درصد فعالیت استیل کولین استرازی نسبت به گروه آلزایمری در کورتکس پیش‌پیشانی و هیپوکمپ گردید ($p < 0/001$) برای کورتکس پیش‌پیشانی و $p < 0/01$ برای هیپوکمپ). *سالویا ماسیلنتا* اثرات حفاظتی بر علیه سمیت ایجاد شده به وسیله تزریق آمیلوئید بتا از طریق افزایش سطح فسفوریلاسیون CREB و تنظیم فعالیت استیل کولین استرازی دارد که یک داروی پیشنهادی مناسب برای بهبود آلزایمر می‌تواند باشد.

کلمات کلیدی: *سالویا ماسیلنتا*، فعالیت استیل کولین استرازی، CREB، آلزایمر، موش صحرایی.

مقدمه

نواحی مشخصی از مغز مانند ناحیه‌های هیپوکمپ و کورتکس پیشانی در طی آلزایمر اتفاق می‌افتند. با تجمع و رسوب پروتئین آمیلوئید بتا و تائو، استرس اکسیداتیو

آلزایمر یا دمانس مغزی یکی از مهمترین بیماری‌های زوال عقل در جهان محسوب می‌شود. تجمع خارج سلولی آمیلوئید بتا و داخل سلولی پروتئین تائو در

مسیرهای آنتی‌اکسیدانتی سبب کاهش مرگ نوروئی می‌شود (۹). *Salvia macilenta Boiss* به خانواده *Lamiaceae* تعلق دارد و بصورت وحشی در برخی از مناطق ایران مانند کرمان، هرمزگان، بلوچستان و یزد می‌روید (۱). با این وجود هنوز مطالعات *in vivo* بصورت گسترده در زمینه بیماری آلزایمر با استفاده از این گیاه انجام نگرفته است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که گیاه *سالویا ماسیلنتا* حاوی مقادیر فراوانی از پلی فنول‌ها است که سبب ایجاد خواص آنتی‌اکسیدانتی می‌شود (۱)، (۲۲). با توجه به این مطالب، در این بررسی به اثرات ضدکولین‌استرازی و اثر آن بر روی پروتئین *cAMP-response element binding protein* یا *CREB* در هیپوکمپ و کورتکس پیش‌پیشانی مغز موش‌های آلزایمری شده با آمیلوئید بتا و پیش درمان شده با گیاه *سالویا ماسیلنتا* می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین *CREB*، *pCREB* و β -actin از شرکت سل سیگنالینگ (آمریکا) تهیه شده است. کیت *Electrochemiluminescence (ECL)* از شرکت آمرشام (آمریکا) تهیه شده است. کاغذ *polyvinylidene difluoride (PVDF)* از شرکت میلیپور (آمریکا) گرفته شده است. آمیلوئید بتا و دیگر موادی که ذکر نشده است از شرکت سیگما تهیه گردیده است (آمریکا). گیاه *سالویا ماسیلنتا* از کرج در ایران توسط دکتر سنبلی جمع آوری شده و پس از شناسایی یک نمونه گیاه به شماره هرباریومی ۱۰۴۲ در هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواداولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی نگهداری شد. گیاه در هوا خشک شده و پودر شده است. پودر گیاه برای ۴ بار در متانول عصاره‌گیری شد. عصاره متانولی

در نوروئها شروع شده و این سرآغاز ایجاد مرگ نوروئی برنامه ریزی شده یا آپتوز می‌باشد. همچنین نشان داده شده است که پپتید آمیلوئید بتا به تنهایی در مغز، می‌تواند سبب استرس اکسیداتیو می‌شود. با افزایش آپتوز نوروئی، برخی از علائم بیماری آلزایمر مانند دست دادن حافظه و علائم شناختی ظاهر می‌گردد (۱۵، ۲۵). مطالعات نشان داده‌اند که میزان مرگ نوروئی در نوروئهای کولینرژیک بسیار بیشتر از نوروئهای دیگر است که این موید این مطلب است که آلزایمر با از دست دادن حافظه همراه می‌باشد (۱۱، ۱۶).

دارو و مواد گیاهی بسیاری به منظور بهبود علائم بیماری آلزایمر پیشنهاد شده است ولی تاکنون داروی قطعی این بیماری مشخص نشده است. داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. اثرات مفید درمان با گیاه *سالویا (Salvia)* در طب چینی و باستانی در بیماری‌های مختلفی مانند بیماری‌های قلبی-عروقی و آسیب‌های مغزی مورد نشان داده شده است (۴). گونه‌های مختلف گیاه *سالویا* به عنوان داروهای ضد باکتریایی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی در مدل‌های آسیب عصبی معرفی شده‌اند (۸، ۱۰).

با توجه به اثرات مفید داروی *سالویا*، مطالعات بسیاری بر روی اثرات محافظتی گونه‌های مختلف *سالویا* در حیطه بیماری‌های نورودژنراتیو در حال انجام می‌باشد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که گونه‌های *Salvia officinalis* و *Salvia. lavandulaefolia* سبب افزایش حافظه و یادگیری در مدل دمانس مغزی شده‌اند (۱۹، ۲۱). از سوی دیگر فعالیت ضد کولین‌استرازی برخی گونه‌های *سالویا* به اثبات رسیده است (۲۰). یک بررسی نشان داده است که گیاه *سالویا* از طریق فعال کردن

بوده‌اند و پس از ۹ ساعت، ۱ میلی لیتر محلول عصاره گیاهی *سالویا ماسیلنتا* به مدت ۱۰ روز به آنها خورنده می‌شد. پس از اتمام ۱۰ روز موش‌ها بیهوش شده و تحت پروسه جراحی و تزریق PBS و یا آمیلوئید بتا قرار گرفتند. هفت روز پس از جراحی موش‌ها به وسیله دی‌اکسیدکربن بیهوش شده و سر آنها جدا شد. هیپوکمپ و کورتکس پیشانی از مغز موش‌ها جداسازی و در نیتروژن مایع قرار گرفت. جداسازی پروتئین‌ها بر اساس پروتکل نیمورا و همکارانش انجام شد (۱۷).

سپس هیپوکمپ و کورتکس پیش‌پیشانی برای انجام روش وسترن بلات و اندازه‌گیری فعالیت استیل‌کولین استرازی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت استیل‌کولین استرازی بر اساس روش المن انجام شد (۷).

اندازه‌گیری فعالیت استیل‌کولین استرازی: ماده Acetylthiocholine (ACThCh) به عنوان سوبسترا در غلظت ۰.۵ میلی مولار مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت استیل‌کولین استرازی به صورت نانو مول ACThCh hydrolyzed/min/mg در طول موج ۴۱۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. بافت مغزی در بافر فسفات‌های هوموژنیزه شد و ۰/۴ میلی‌لیتر از این محلول در کووت مخصوص اسپکتوفتومتر به همراه ۲/۶ میلی‌لیتر از بافر فسفات‌های قرار گرفت.

تست وسترن بلات: برای انجام تست وسترن بلات مقادیر مساوی از پروتئین توسط ژل پلی آکرلید آمید SDS-PAGE ۱۲ درصد جداسازی شد. بعد از مرحله الکتروفورز، پروتئین‌های ژل به کاغذ PVDF منتقل شده و کاغذ در محلول بلاکینگ برای ۱ ساعت قرار می‌گیرد. سپس کاغذ یک شب در آنتی‌بادی اولیه در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و در روز دوم ۳ بار با محلول TBST شستشو داده و کاغذ با آنتی‌بادی ثانویه به مدت

گیاه در شرایط فشار شدید غلظت یافته و سپس لیپوفیلیز شد. برای گاوژ کردن عصاره را در آب حل کرده‌ایم.

حیوانات و گروه‌بندی: موش صحرایی نر نژاد ویستار در وزن ۲۳۰-۲۶۰ گرم استفاده شد (انستیتو پاستور، تهران، ایران). موش‌ها در قفس‌های ۳ تایی در ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا قرار داشتند. تمام آزمایشات بر اساس قوانین نگهداری و استفاده از حیوانات دانشگاه شهید بهشتی صورت گرفته است (IR.TUMS.MEDICINE.REC. 1400.486). در این بررسی، حیوانات به چهار گروه شش‌تایی تقسیم شدند: گروه کنترل و گروه آمیلوئید بتا. این دو گروه برای ۱۰ روز ۱ میلی لیتر آب را بصورت گاوژ دریافت کرده و سپس ۳ ماکرولیتر PBS و یا آمیلوئید بتا (۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر) به درون هیپوکمپ آنها تزریق شد. دو گروه دیگر، ۱ میلی لیتر از عصاره گیاه *سالویا ماسیلنتا* با غلظت ۵۰ میلی-گرم/کیلوگرم دریافت کرده و پس از ۱۰ روز آمیلوئید بتا و یا PBS در ناحیه هیپوکمپ پستی تزریق شد.

بیهوش کردن حیوانات و تزریق آمیلوئید بتا: موش‌ها به وسیله تزریق دوران صفاقی کتامین (۵۰ میلی-گرم/کیلوگرم) و زایلزین (۴ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شده و در دستگاه استروتکس قرار داده شد. برای تزریق درون هیپوکمپی، از کانول راهنما ۲۳ گیج به طول ۶ میلی متر استفاده شد. مختصات ناحیه هیپوکمپ به وسیله اطلس پاکسینوس و واتسون یافت شد (۱۸). در مطالعات پیشین، برای تایید آلتزایمری شدن موش، تست‌های رفتاری مربوط به حافظه بر روی موش‌ها انجام گرفته بود (۱۳).

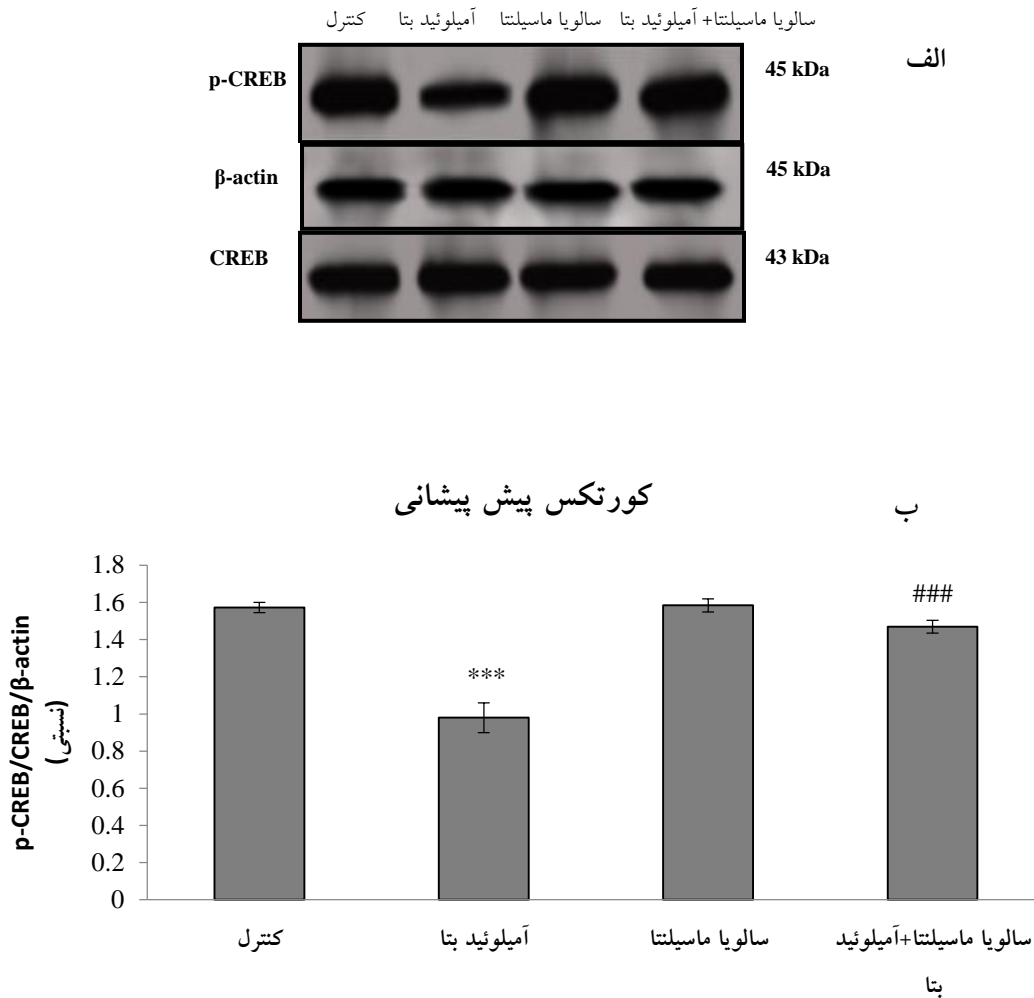
تیمار با عصاره گیاه *سالویا ماسیلنتا* و نمونه‌گیری: گروه‌ها به مدت ۹ ساعت از دسترسی به آب و غذا منع

(p). شکل ۲-الف و ۲-ب نشان دهنده میزان پروتئین CREB فسفریله و CREB توتال در هیپوکمپ مغز موش‌های آلزایمری می‌باشد. آنالیز آماری بلات‌های پروتئین CREB فسفریله و CREB توتال در هیپوکمپ نشان می‌دهد که نسبت p-CREB/CREB در موش‌های آلزایمری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است ($p < 0/001$). پیش‌درمانی با گیاه *سالویا ماسیلنتا* در موش‌های آلزایمری شده می‌تواند سبب افزایش نسبت p-CREB/CREB در هیپوکمپ نسبت به گروه آلزایمری گردد ($p < 0/001$). شکل ۳ نشان دهنده درصد فعالیت استیل‌کولین استرازی در کورتکس پیش‌پیشانی مغز موش‌های آلزایمری می‌باشد. آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که درصد فعالیت استیل‌کولین استرازی در گروه آلزایمری نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشته‌اند ($p < 0/001$). پیش‌درمانی با گیاه *سالویا ماسیلنتا* در موش‌های آلزایمری شده می‌تواند سبب کاهش فعالیت استیل‌کولین استرازی در کورتکس پیش‌پیشانی گردد ($p < 0/001$). همچنین، شکل ۴ نشان دهنده درصد فعالیت استیل‌کولین استرازی در هیپوکمپ مغز موش‌های آلزایمری می‌باشد. آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که درصد فعالیت استیل‌کولین استرازی در گروه آلزایمری نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشته‌اند ($p < 0/001$). پیش‌درمانی با گیاه *سالویا ماسیلنتا* در موش‌های آلزایمری شده می‌تواند سبب کاهش فعالیت استیل‌کولین استرازی در هیپوکمپ گردد ($p < 0/001$).

یک ساعت انکوبه شد. بعد از این مرحله کاغذها با کیت ECL پوشانده و با استفاده از فیلم رادیولوژی ظاهر شدند. بلات‌ها سپس در بافر استریپینگ شستشو داده شده و آنتی بادی بتا‌کتین روی کاغذ گذاشته شد و دوباره با آنتی بادی ثانویه انکوبه شد و بتا‌کتین کنترل هم در فیلم رادیولوژی ظاهر شده و توسط برنامه Image J باندهای بدست آمده دانسیتومتری شد. آنالیز آماری: هر آزمایش حداقل ۳ بار تکرار شده است. میانگین \pm SEM برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism® 5.0 صورت گرفت. آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست post hoc analysis Tukey برای تست‌های ملکولی مورد استفاده قرار گرفت. P-Value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار اطلاق شد ($p < 0/05$, $p < 0/01$, $p < 0/001$).

نتایج

شکل ۱-الف و ۱-ب نشان دهنده میزان پروتئین CREB فسفریله و CREB توتال در کورتکس پیش‌پیشانی مغز موش‌های آلزایمری می‌باشد. آنالیز آماری بلات‌های پروتئین CREB فسفریله و CREB توتال در کورتکس پیش‌پیشانی نشان می‌دهد که نسبت p-CREB/CREB در موش‌های آلزایمری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است ($p < 0/001$). پیش‌درمانی با گیاه *سالویا ماسیلنتا* در موش‌های آلزایمری شده می‌تواند سبب افزایش نسبت p-CREB/CREB در کورتکس پیش‌پیشانی نسبت به گروه آلزایمری گردد ($p < 0/001$).

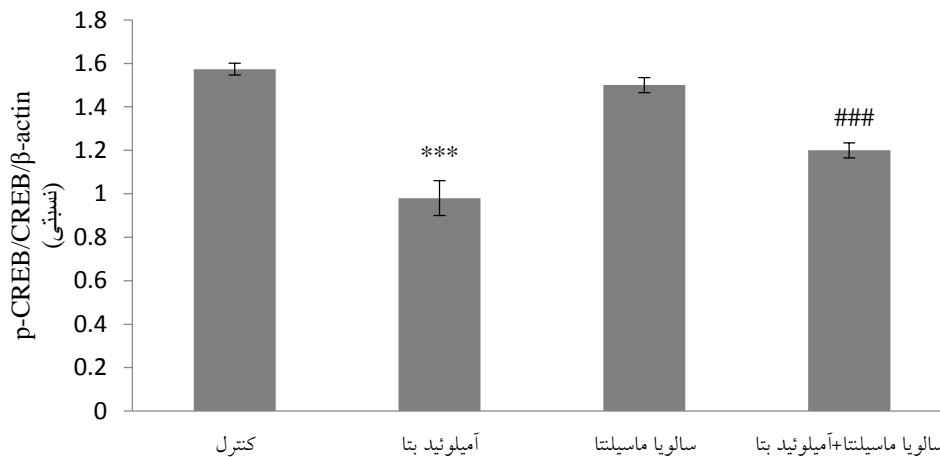


شکل ۱- بررسی میزان پروتئین CREB به صورت فسفوریله و توتال در کورتکس پیش پیشانی موش‌های دریافت کننده آمیلوئید بتا عصاره الکلی سالمویا ماسیلنتا. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار نشان داده شده است. $p < 0/001$ *** مقایسه نسبت به گروه کنترل و $p < 0/001$ ### مقایسه نسبت به گروه آمیلوئید بتا.



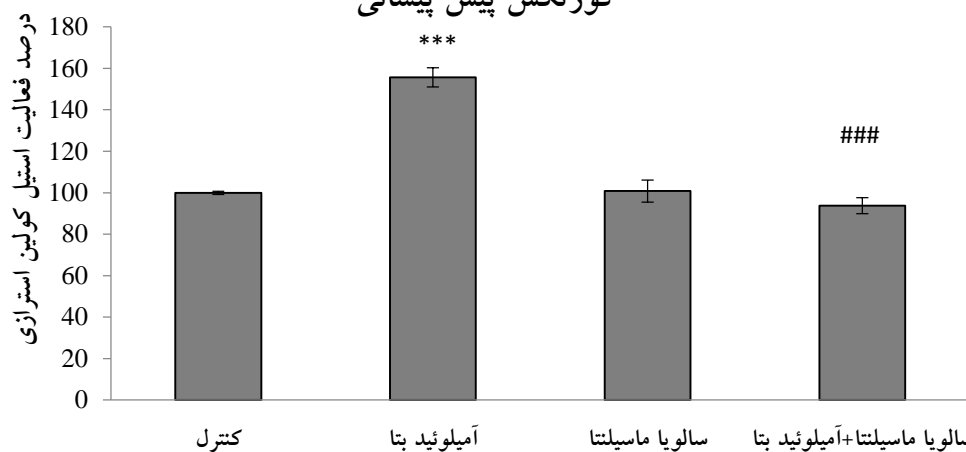
ب

هیپوکمپ

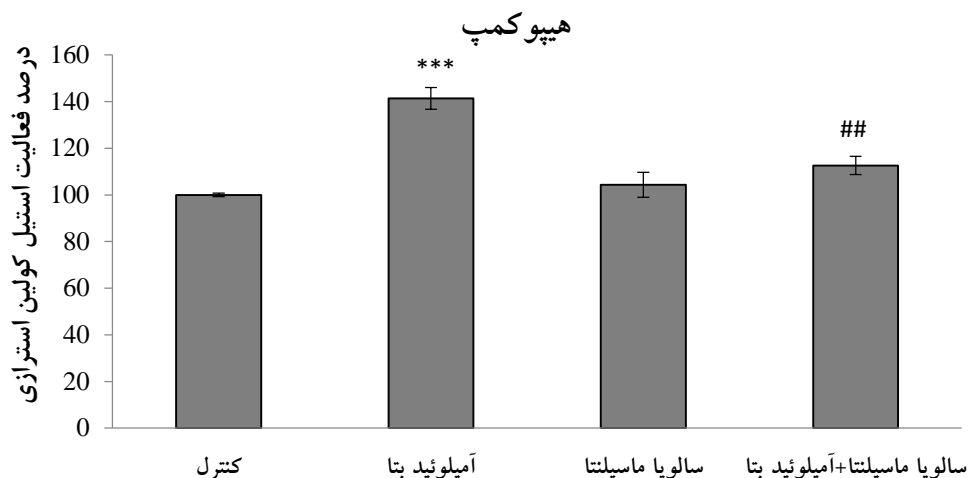


شکل ۲- بررسی میزان پروتئین CREB به صورت فسفوریله و توتال در هیپوکمپ موش‌های دریافت کننده آمیلوئید بتا و عصاره الکلی سالویا ماسیلنتا. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار نشان داده شده است. $p < 0/001$ *** مقایسه نسبت به گروه کنترل و $p < 0/001$ ### مقایسه نسبت به گروه آمیلوئید بتا.

کورتکس پیش پیشانی



شکل ۳- بررسی درصد فعالیت استیل کولین استرازی در کورتکس پیش پیشانی موش‌های دریافت کننده آمیلوئید بتا و عصاره الکلی سالویا ماسیلنتا. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار نشان داده شده است. $p < 0/001$ *** مقایسه نسبت به گروه کنترل و $p < 0/001$ ### مقایسه نسبت به گروه آمیلوئید بتا.



شکل ۴- بررسی درصد فعالیت استیل کولین استرازی در هیپوکمپ موش‌های دریافت کننده آمیلوئید بتا و عصاره الکی سالویا ماسیلنتا. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار نشان داده شده است. $p < 0/001$ *** مقایسه نسبت به گروه کنترل و $p < 0/01$ ## مقایسه نسبت به گروه آمیلوئید بتا.

بحث

دادند که میزان فسفوریلاسیون CREB ارتباط مشخصی با حافظه و دمانس دارد، به نحوی که افزایش فسفوریلاسیون CREB سبب کاهش اثرات آلزایمری و بهبود حافظه در افراد می‌گردد (۱۳). همچنین، پیش‌درمانی با گونه دیگر سالویا- سالویا هیدرانتر/ سبب افزایش فسفوریلاسیون CREB شده و اثرات مخرب نورونی و آپتوز را کاهش می‌دهد (۱۳).

بررسی‌های بیشتر بر روی تخریب نورونی آمیلوئید بتا و اثر گیاه سالویا ماسیلنتا، در مطالعه‌ای دیگر انجام شده است و این بررسی‌ها تحت داروی می‌باشند. نشان داده شده است که گیاه سالویا ماسیلنتا با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی سبب کاهش آپتوز و مرگ نورونی می‌شود (مطالعه تحت داروی است). مطالعه حاضر نشان داد که گیاه سالویا ماسیلنتا مانند گونه دیگر سالویا- سالویا هیدرانتر/ با افزایش دادن فسفوریلاسیون CREB سبب بهبود علائم تخریب نورونی القا شده با

در مطالعه حاضر، در ابتدا، با تزریق آمیلوئید بتا در ناحیه هیپوکمپ موش، مدل حیوانی آلزایمر را ایجاد کرده‌ایم. قابل ذکر است که القا مدل آلزایمر به وسیله تزریق آمیلوئید بتا به وسیله تست‌های رفتاری در مطالعات پیشین مورد بررسی قرار گرفته است (۲، ۱۳). اثرات حفاظت نورونی عصاره گیاه سالویا ماسیلنتا به وسیله فسفریله کردن پروتئین CREB و مهار فعالیت استیل کولین استرازی در این بررسی مشخص شد. با توجه به نقش اصلی دو ناحیه کورتکس پیش‌پیشانی و هیپوکمپ در بیماری آلزایمر و همچنین حساسیت نورون‌های این دو ناحیه در برابر استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط آمیلوئید بتا، از این نواحی نمونه برداری و آزمایش شد (۳، ۱۲، ۲۴). بررسی‌های ما نشان داد که گیاه سالویا ماسیلنتا سبب افزایش فسفوریلاسیون CREB در کورتکس پیش‌پیشانی و هیپوکمپ موش‌های آلزایمری می‌شوند. یافته‌های پیشین ما نشان

کاهش داده و از طریق مکانیسم‌های ملکولی نظیر افزایش فسفوریلاسیون CREB و مهار استیل کولین استراز سبب کاهش تخریب نورونی شود. این روند بهبود حافظه را می‌توان به اجزای فنولی و خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی در این گیاه مربوط دانست.

منابع

1. Asadi S., Ahmadiani A., Esmaeili M.A., Sonboli A., Ansari N., Khodaghohi F. 2010. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5): 1341-1349.
2. Ashabi G., Ramin M., Azizi P., Taslimi Z., Alamdary S.Z., Haghparast A., Ansari N., Motamedi F., Khodaghohi F. 2012. ERK and p38 inhibitors attenuate memory deficits and increase CREB phosphorylation and PGC-1alpha levels in Abeta-injected rats. *Behavioral Brain Research*, 232(1): 165-173.
3. Bazzigaluppi P., Beckett T.L., Koletar M.M., Lai A.Y., Joo I.L., Brown M.E., Carlen P.L., McLaurin J., Stefanovic B. 2018. Early-stage attenuation of phase-amplitude coupling in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 144(5): 669-679.
4. Bi H.C., Zuo Z., Chen X., Xu C.S., Wen Y.Y., Sun H.Y., Zhao L.Z., Pan Y., Deng Y., Liu P.Q., Gu L.Q., Huang Z.Y., Zhou S.F., Huang M. 2008. Preclinical factors affecting the pharmacokinetic behaviour of tanshinone IIA, an investigational new drug isolated from *Salvia miltiorrhiza* for the treatment of ischaemic heart diseases. *Xenobiotica*, 38(2): 185-222.
5. Clifford M.N., Wu W., Kirkpatrick J., Jaiswal R., Kuhnert N. 2010. Profiling and characterisation by liquid chromatography/multi-stage mass spectrometry of the chlorogenic acids in *Gardeniae Fructus*.

آمیلوئید بتا می‌شود. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانتی گیاه *سالویا ماسیلنتا*، می‌توان پیشنهاد کرد که فعال شدن فسفوریلاسیون CREB از طریق سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی صورت پذیرفته است (۲۲). با توجه به نقش مهم دو ناحیه کورتکس پیش‌پیشانی و هیپوکمپ، این مطالعه نشان داد که گیاه *سالویا ماسیلنتا* سبب بهبود فعالیت CREB در هر دو ناحیه شده است.

نقش تاثیرگذار پروتئین CREB بر روی فعالیت استیل کولین و استیل کولین استراز در بیماری‌های تخریب عصبی به وضوح مشخص شده است (۱۴، ۲۶). یافته‌ها نشان می‌دهند که کلوروژنیک اسید و فلوریک اسید، دو ماده مهم در گیاه گونه *سالویا*، می‌تواند سبب کاهش فعالیت استیل کولین استراز (۵، ۶) همچنین برخی منابع نشان داده‌اند که ماده مهارکننده فعالیت استیل کولین استراز از گیاه‌های *S. officinalis* و *S. miltiorrhiza* به دست آمده است که مستقیماً سبب مهار استیل کولین استراز و بهبود حافظه در بیماری تخریب عصبی می‌شود (۲۰، ۲۳). یافته‌های مطالعه در راستای مطالعات پیشین می‌باشد و نشان داده است که عصاره گیاه *سالویا ماسیلنتا* می‌تواند سبب مهار فعالیت استیل کولین استراز در دو ناحیه کورتکس پیش‌پیشانی و هیپوکمپ گردد. این اثر مهار فعالیت استیل کولین استراز گیاه *سالویا ماسیلنتا* به صورت تنظیم فعالیت فسفوریلاسیون CREB و یا به طور مستقیم صورت می‌پذیرد. بررسی‌های بیشتری برای درک مکانیسم تنظیم کننده گیاه *سالویا ماسیلنتا* بر روی فعالیت استیل کولین استراز نیاز است.

نتیجه‌گیری

نتایج پیش رو نشان می‌دهد که، *سالویا ماسیلنتا* می‌تواند خواص سمی ناشی از تزریق آمیلوئید بتا را در موش‌ها

- modulates CREB and its down-stream molecules and decreases apoptosis in amyloid beta-injected rats. *Behavioral Brain Research*, 241: 62-69.
14. Lee J.E., Song H.S., Park M.N., Kim S.H., Shim B.S., Kim B. 2018. Ethanol Extract of *Oldenlandia diffusa* Herba Attenuates Scopolamine-Induced Cognitive Impairments in Mice via Activation of BDNF, P-CREB and Inhibition of Acetylcholinesterase. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2): 363.
15. Lindeboom J. and Weinstein H. 2004. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. *European Journal of Pharmacology*, 490(1-3): 83-86.
16. Ma S., Zang T., Liu M.L., Zhang C.L. 2020. Aging-relevant human basal forebrain cholinergic neurons as a cell model for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1): 61.
17. Niimura M., Takagi N., Takagi K., Mizutani R., Ishihara N., Matsumoto K., Funakoshi H., Nakamura T., Takeo S. 2006. Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(11): 1354-1365.
18. Paxinos G., Watson C. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam; Boston Academic Press/Elsevier.
19. Perry N.S.L., Menzies R., Hodgson F., Wedgewood P., Howes M.R., Brooker H.J., Wesnes K.A., Perry E.K. 2018. A randomised double-blind placebo-controlled pilot trial of a combined extract of sage, rosemary and melissa, traditional herbal medicines, on the enhancement of memory in normal healthy
- Rapid Communication Mass Spectrometry*, 24(21): 3109-3120.
6. Clifford M.N., Zheng W. and Kuhnert N. 2006. Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC-MS(n). *Phytochemical Analysis*, 17(6): 384-393.
7. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Jr., Feather-Stone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, 7: 88-95.
8. Esmaeili M.A. and Sonboli A. 2010. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3): 846-853.
9. Firuzi O., Javidnia K., Gholami M., Soltani M., Miri R. 2010. Antioxidant activity and total phenolic content of 24 Lamiaceae species growing in Iran. *Natural Product Communication*, 5(2): 261-264.
10. Hu S., Chen S.M., Li X.K., Qin R., Mei Z.N. 2007. Antitumor effects of chi-shen extract from *Salvia miltiorrhiza* and *Paeoniae radix* on human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28 (8): 1215-1223.
11. Jiang P., Yang X. and Sun Z. 2020. Dynamics analysis of the hippocampal neuronal model subjected to cholinergic action related with Alzheimer's disease. *Cognitive Neurodynamics*, 14(4): 483-500.
12. Kalaria R.N., Andorn A.C., Tabaton M., Whitehouse P.J., Harik S.I., Unnerstall J.R. 1989. Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: increased beta 2-receptors in prefrontal cortex and hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 53(6): 1772-1781.
13. Khodaghali F. and Ashabi G. 2013. Dietary supplementation with *Salvia sahendica* attenuates memory deficits,

inhibitor from *Salvia miltiorrhiza*, ameliorates scopolamine-induced amnesia in Morris water maze task. *Planta Medica*, 76(3): 228-234.

24. Xu F., Ono M., Ito T., Uchiumi O., Wang F., Zhang Y., Sun P., Zhang Q., Yamaki S., Yamamoto R., Kato N. 2021. Remodeling of projections from ventral hippocampus to prefrontal cortex in Alzheimer's mice. *Journal of Comparative Neurology*, 529(7): 1486-1498.

25. Yatin S.M., Varadarajan S., Link C.D., Butterfield D.A. 1999. In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiology of Aging*, 20(3): 325-330.

26. Zhang L., Xie J.W., Yang J., Cao Y.P. 2013. Tyrosine phosphatase STEP61 negatively regulates amyloid beta-mediated ERK/CREB signaling pathways via alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience Research*, 91(12): 1581-1590.

subjects, including influence of age. *Phytomedicine*, 39: 42-48.

20. Sallam A., Mira A., Ashour A., Shimizu K. 2016. Acetylcholine esterase inhibitors and melanin synthesis inhibitors from *Salvia officinalis*. *Phytomedicine*, 23(10): 1005-1011.

21. Tildesley N.T., Kennedy D.O., Perry E.K., Ballard C.G., Savelev S., Wesnes K.A., Scholey A.B. 2003. *Salvia lavandulaefolia* (Spanish sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3): 669-674.

22. Tusi S.K. and Khodagholi F. 2014. *Salvia macilenta* exhibits antiglycating activity and protects PC12 cells against H₂O₂-induced apoptosis. *Cytotechnology*, 66(1): 169-179.

23. Wong K.K., Ho M.T., Lin H.Q., Lau K.F., Rudd J.A., Chung R.C., Fung K.P., Shaw P.C., Wan D.C. 2010. Cryptotanshinone, an acetylcholinesterase

Evaluating the Effect of *Salvia Macilenta* Extract on CREB Protein Level and Acetylcholine Esterase Activity in the Brain of Alzheimer's Disease in Male Rats

Shabnam Taheri¹, Hooman Shajiee¹, Ghorbangol Ashabi^{2*}, Solmaz Khalifeh³

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

2- Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Cognitive and Neuroscience Research Center (CNRC), Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease leading to dementia. There are many studies to find the pretreatment and treating drugs in AD. The neuroprotective role of *Salvia* genus against neuronal death is well known. In this study, the protective role of *Salvia macilenta* (*S. macilenta*) extract on AD was investigated. Rats were gavaged by *S. macilenta* for 10 days. Then, they were injected by Amyloid beta. The molecular level of Ca²⁺/cAMP response element binding (CREB), and acetylcholine esterase activity were evaluated in the prefrontal cortex and hippocampus. Our results revealed that *S. macilenta* pretreatment can improve CREB phosphorylation compared to AD model in the prefrontal cortex and hippocampus (both P<0.001). Pretreatment with *S. macilenta* reduced percentage of acetylcholine esterase activity compared to AD model in the prefrontal cortex and hippocampus (P<0.001 and P<0.01, respectively). *S. macilenta* has a protective role against amyloid beta-induced toxicity through enhancement of CREB and regulation of the acetylcholine esterase activity that can be a dominant potential candidate in improving AD.

Keywords: *S. Macilenta*; Acetylcholine Esterase Activity, CREB, Alzheimer's Disease, Rat

