

مقاله پژوهشی

تأثیر سینئول بر روی پارامترهای رفتاری، بیوشیمیایی و هیستولوژیکی در موش‌های نر نژاد ویستار آلزایمری شده

الناز خامنه، پریچهره یغمایی*، مریم قبه*

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئولان مکاتبات: yaghmaei_p@yahoo.com, ghobeh@srbiau.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1943324.1325

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۲

چکیده

بیماری آلزایمر یکی از بیماری‌های تحلیل‌برنده سیستم عصبی است که جمعیت بسیاری را در سراسر جهان درگیر کرده و تا کنون درمان قطعی برای آن یافت نشده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر سینئول به عنوان یک ماده‌ی آنتی‌اکسیدان طبیعی بر پارامترهای رفتاری، بیوشیمیایی و هیستولوژیکی در بیماری آلزایمر بود. برای این منظور تعداد ۳۶ سر موش نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل بدون جراحی و تیمار خاص بودند. سایر گروه‌ها تحت جراحی قرار گرفته و به چهار گروه بتا آمیلوئید و به یک گروه PBS (حلال بتا آمیلوئید) تزریق شد. گروه شم با توین ۸۰ (حلال سینئول) تیمار شد و دو گروه تیمار هم با دوزهای ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌گرم/کیلوگرم سینئول تیمار شدند. گروه کنترل، گروه آلزایمری و گروه PBS هیچ تیماری دریافت نکردند. در نهایت پارامترهای رفتاری (زمان رفتن موش‌های به بخش تاریک دستگاه شاتل باکس)، بیوشیمیایی (مالون دی‌آلدهید، سوپراکسید دیسموتاز، $TNF-\alpha$) و بافتی (با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و تیوفلاوین S) مورد بررسی قرار گرفتند. در موش‌های آلزایمری مدت زمانی که طول می‌کشید تا موش به بخش تاریک شاتل باکس برود به طور معناداری ($p < 0/001$) کمتر از موش‌های کنترل بود. سطح مالون دی‌آلدهید و $TNF-\alpha$ نیز در موش‌های آلزایمری نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار و سطح سوپراکسید دیسموتاز کاهش معناداری داشت ($p < 0/001$). بررسی‌های بافتی نیز نشان داد که در موش‌های آلزایمری مرگ سلولی نوروونی به طور گسترده در هیپوکامپ رخ داده و پلاک‌های آمیلوئیدی نیز افزایش داشته‌اند ($p < 0/001$). تیمار موش‌ها با سینئول به صورت وابسته به دوز تمامی موارد ذکر شده را به طور معناداری بهبود بخشید. سینئول احتمالاً می‌تواند به عنوان یک ماده‌ی آنتی‌اکسیدان طبیعی مناسب در جهت درمان بیماری آلزایمر و کاهش علائم آن مورد استفاده قرارگیرد که این امر نیازمند انجام تحقیقات بیشتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: آلزایمر، سینئول، SOD، MDA، نوروزن، پلاک‌های آمیلوئیدی.

مقدمه

بیماری آلزایمر یک بیماری تحلیل‌برنده و پیش‌رونده-ی سیستم عصبی مرکزی است که باعث زوال عقل می‌گردد. به عبارت دیگر، آلزایمر نوعی اختلال مغزی است که در آن آسیب‌دیدگی و مرگ سلول‌های مغز باعث بروز اختلال در حافظه، تفکر و رفتار فرد می‌شود (۱). آلزایمر یک بیماری ایدئوپاتیک بوده و علت

میتوکندری‌ها داشته و منجر به اختلال مکانیسم انتقال الکترون، ساخت ATP و متابولیسم اکسیژن گردد. متعاقب این فرآیندها، میزان رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و پراکسید هیدروژن افزایش یافته و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌گردد. پراکسید هیدروژن میتوکندریایی به داخل فضای سیتوپلاسمی منتشر شده و رادیکال هیدروکسیل را تشکیل می‌دهد (۳۲).

همچنین فعال شدن میکروگلیاها توسط پپتید بتا آمیلوئید، میزان بالای از رادیکال‌های نیتریک اکسید را تولید می‌کند. گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین گونه‌های فعال نیتروژن با پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی و غشای اندامک‌ها، مواد سمی هیدروکسی نونال و مالون دی‌آلدهید تولید می‌کنند. پراکسیداسیون لیپیدی غشا همچنین باعث پیشبرد فسفریلاسیون پروتئین تائو و تجمع آن به منظور تشکیل کلافه‌های نوروفیبریلاری می‌شود (۵).

آسیب اکسیداتیو می‌تواند از طریق افزایش نفوذپذیری غشای سلول به یون کلسیم و سایر یون‌های دو ظرفیتی، تجمع کلسیم را در داخل سلول عصبی ایجاد و از این طریق منجر به سمیت عصبی و در نتیجه اختلال عملکرد آن گردد. در بیماری آلزایمر پپتید بتا آمیلوئید در داخل سلول عصبی می‌تواند باعث شکسته شدن توالی‌های DNA میتوکندریایی و در نتیجه کاهش تعداد سیناپس‌ها شود (۳۸). سینئول، که به عنوان اکالیپتول نیز شناخته می‌شود، سینئول یک ترکیب طبیعی آلی است که به شکل یک مایع بی‌رنگ می‌باشد (۳۴).

سینئول به دلیل دارا بودن عطر و بوی تازه، کافوری و طعم تند، به طور گسترده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی کاربرد دارد. این ماده مهمترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس برگ بسیاری از گونه‌های جنس اکالیپتوس است (۳۶). خواص دارویی مختلفی از

به وجود آمدن آن ناشناخته مانده است اما به طور کلی آنچه سبب پدیدار شدن این بیماری می‌شود، رسوب غیرعادی برخی مواد پروتئینی در درون و بیرون سلول‌های مغز است (۸). آلزایمر رایج‌ترین شکل بیماری‌های عصبی است و حدود ۷۰ درصد از تمام موارد زوال عقل را تشکیل می‌دهد. در افراد بالای ۶۵ سال، به ازای هر ۱۰-۵ سال افزایش سن، میزان ابتلا به بیماری آلزایمر دو برابر می‌شود (۳۳). داروهای استفاده شده توسط بیماران مبتلا به آلزایمر سبب بهبود حافظه، عملکرد شناختی و عملکرد اجتماعی بیمار می‌شوند و تا حدودی رفتارهای غیرطبیعی بیمار را نیز اصلاح می‌کنند اما به درمان قطعی این بیماری منجر نمی‌شوند و از سوی دیگر این داروها دارای عوارض جانبی متعددی نیز هستند. بنابراین تلاش برای یافتن راهکار درمانی مناسب برای این بیماری و تحقیقات در این زمینه همچنان ادامه دارد و ترکیبات گیاهی از جذاب‌ترین موارد برای انجام مطالعات در زمینه‌ی درمان آلزایمر هستند (۲۵).

فرآیندهای التهابی گوناگون و سایتوکاین‌ها نقش اساسی در پاتوژنز بیماری آلزایمر ایفا می‌کنند. در بافت مغزی بیماران مبتلا به آلزایمر و همچنین افراد سالم مسن، اختلالات عملکرد میتوکندریایی می‌تواند منجر به آزاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسید کننده و آسیب اکسیداتیو گردد (۳۷). مارکرهای استرس اکسیداتیو حتی می‌توانند پیش از تغییرات پاتولوژیک در بیماری آلزایمر دیده شوند و به نظر می‌رسد پپتید بتا آمیلوئید عامل اصلی در تشکیل این مارکرها باشد (۱۳).

پپتید بتا آمیلوئید از طریق مهار آنزیم‌های اصلی میتوکندریایی مانند سیتوکروم C اکسیداز و آنزیم‌های کلیدی چرخه‌ی کربس همچون آلفا-کتوگلو تارات و پیرووات دهیدروژناز می‌تواند اثر سمی روی عملکرد

شد. سینئول (سیگما-آمریکا) نیز در دو دوز ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۰/۵ میلی‌لیتر از توئین ۸۰ درصد حل شد. پس از بیهوش کردن موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین و قرار دادن آن‌ها در دستگاه جراحی استریوتاکسی، محل‌های تزریق با محاسبه دقیق مشخص شدند و با مته خیلی ریز به دقت دو سوراخ کم عمق ایجاد شد. در ادامه به وسیله‌ی سرنگ همیلتون، ۲ میکرولیتر بتا آمیلوئید به هیپوکامپ راست و ۲ میکرولیتر به هیپوکامپ چپ در بازه زمانی ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق شد. برای بستن محل جراحی از روش بخیه استفاده نموده و محل زخم با بتادین و آنتی‌بیوتیک سفازولین ضدعفونی شد. حیوانات بعد از جراحی به مدت یک هفته در قفس-های جداگانه دوره‌ی بهبودی را طی کردند که در این مدت مراقبت‌های لازم برای جلوگیری از بروز عفونت در حیوانات به عمل آمد.

گروه‌های آزمایش به ترتیب زیر تقسیم‌بندی شدند: گروه کنترل ۱: رت‌هایی که دست نخورده باقی ماندند و آب و غذای کافی دریافت نمودند.

گروه کنترل ۲: رت‌هایی که با تزریق داروی بتا آمیلوئید آلزایمری شدند و هیچ دارویی دریافت نکردند.

گروه کنترل ۳: رت‌هایی که با تزریق PBS جراحی شدند و هیچ دارویی دریافت نکردند.

گروه شم: رت‌هایی که با بتا آمیلوئید آلزایمری شدند و توئین ۸۰ درصد را به عنوان حلال سینئول، به مدت ۴ هفته دریافت کردند.

گروه تجربی ۱: رت‌هایی که با بتا آمیلوئید آلزایمری شدند و سینئول را با دوز ۰/۰۲ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۴ هفته دریافت کردند.

سینئول گزارش شده است. از جمله سینئول دارای خاصیت ضد درد، آرامبخش و ضد افسردگی است. همچنین نشان داده شده است که سینئول، به عنوان یک عامل ضد التهابی، می‌تواند در معالجه آسم، التهاب معده، سینوزیت، بیماری مزمن انسدادی ریه و همچنین در بیماری‌های عصبی مانند بیماری آلزایمر موثر باشد (۳). بر همین اساس هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر سینئول بر روی پارامترهای رفتاری، بیوشیمیایی و هیستولوژیکی در موش‌های نر نژاد ویستار آلزایمری شده بود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار با وزن حدودی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در ۶ گروه ۶ تایی مورد تحقیق و پژوهش قرار گرفتند. پس از انتقال حیوانات به حیوان‌خانه‌ی تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، جهت سازگاری و عادت به محیط در دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بین ۵۶ تا ۶۰ درصد و دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در طول آزمایش حیوانات از آب و غذای کافی برخوردار بودند. پس از هر جراحی موش‌هایی با علائم غیر نرمال از آزمایش حذف شدند و موش‌هایی با علائم و رفتارهای نرمال جایگزین شدند. در حین تمامی مراحل آزمایش همه‌ی موازین اخلاقی در جهت کار با حیوانات آزمایشگاهی در نظر گرفته و رعایت شده است.

داروی بتا آمیلوئید (سیگما-آمریکا) به میزان ۵۰ میکروگرم در ۵۰ میکرولیتر PBS محلول گردید و به مدت ۷ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از خارج نمودن محلول از انکوباتور حجم آن اندازه‌گیری شد و به میزان حجم محلول بخار شده، به آن آب مقطر اضافه نموده و درون فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری

گروه تجربی ۲: رت‌هایی که با بتا آمیلوئید آلزایمری شدند و سینثول رت با دوز ۰/۰۴ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۴ هفته دریافت کردند.

به منظور انجام مطالعات رفتاری و آموزش حیوان از دستگاه شاتل باکس استفاده شد. این دستگاه دارای دو بخش جعبه‌ی آموزش و دستگاه کنترل کننده می باشد. مرحله‌ی یادگیری احترازی غیر فعال (PAL) برای بررسی حافظه در موش‌های آزمایشگاهی در دو روز متوالی انجام شد. روز اول شامل آموزش دادن موش‌های آلزایمری شده در دستگاه و روز دوم برای تست کردن میزان حافظه‌ی موش‌های آموزش دیده بود. در این مرحله به حیوان آموزش داده شد که در صورت حضور در بخش تاریک شاتل باکس، شوک الکتریکی به آن وارد می‌شود. مرحله‌ی آزمون ۲۴ ساعت پس از آموزش انجام گرفت. در مرحله آزمون تحریک الکتریکی انجام نشد. برای بررسی حافظه، هر حیوان مانند روز اول در قسمت روشن دستگاه قرار گرفته و درب گیوتینی بعد از ۵ ثانیه باز شده و زمان تاخیر حیوان در ورود به قسمت تاریک دستگاه به عنوان معیاری برای بررسی میزان حافظه در نظر گرفته شد. بیشترین میزان تاخیر برای ورود به قسمت تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد. موش‌ها بعد از ۴ هفته تیمار با سینثول و پس از انجام تست رفتاری، به وسیله کلروفورم در دستگاه دسیکاتور کشته و با باز نمودن مجموعه‌ی آن‌ها، مغز حیوان به طور کامل خارج شد. مقداری از بافت مغز برداشته و پس از هموژن کردن بافت مغز، میزان پارامترهای بیوشیمیایی آن شامل مالون دی‌آلدهید (MDA)، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و میزان فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- α) با استفاده از کیت‌های مربوطه اندازه‌گیری شد. بخش دیگر مغز خارج شده در مرحله‌ی قبل، به کمک سرم فیزیولوژی شستشو

داده شد و سریعاً به فرمالین منتقل شد. برای مطالعات میکروسکوپی نمونه مغز به مدت ۲۴ ساعت جهت تثبیت در فرمالین قرار داده شد. پس از پاساژ بافتی و قالب‌گیری، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و تیوفلاوین S برای بررسی بافت مغز صورت گرفت. جهت تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Anova) و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey's test) استفاده گردید و مقادیر $p < ۰/۰۵$ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. جهت آنکه محاسبات آماری به طور دقیق انجام شود از نرم افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel استفاده شد.

نتایج

رفتار موش‌های مورد مطالعه با استفاده از شاتل باکس ارزیابی شد. موش‌های آلزایمری به دلیل اختلال در حافظه با سرعت بیشتری نسبت به موش‌های کنترل وارد قسمت تاریک جعبه شدند و این تفاوت زمان معنادار بود ($p < ۰/۰۰۱$). نشان داده شد که تیمار موش‌ها با سینثول موجب افزایش معنادار زمان رفتن موش‌های به بخش تاریک جعبه، نسبت به گروه آلزایمری می‌گردد ($p < ۰/۰۰۱$). این اثر سینثول وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت سینثول، اثربخشی آن در رفتار موش بیشتر بوده است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که گروه توپین ۸۰ (شم) تفاوت معناداری با گروه آلزایمری ندارند و در نتیجه اثری که در گروه‌های تیمار مشاهده شد مربوط به سینثول می‌باشد (نمودار ۱).

میزان مالون دی‌آلدهید سرمی در گروه آلزایمری (بتا‌آمیلوئید + PBS) نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش پیدا کرد ($p < ۰/۰۰۱$). میزان مالون دی‌آلدهید در گروه PBS به طور معناداری از گروه

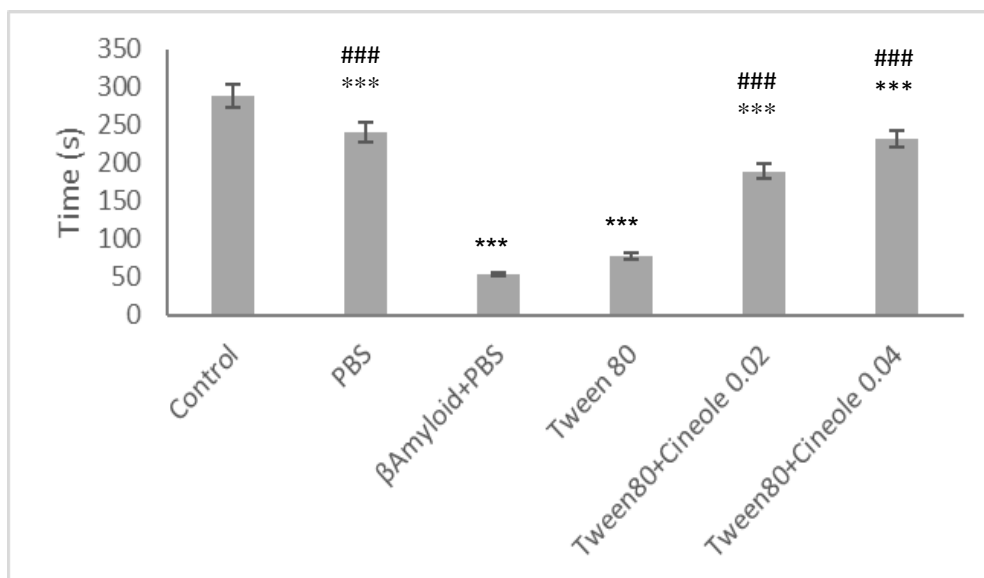
در TNF- α نسبت به گروه کنترل داشته‌اند اما میزان آن در این دو گروه نسبت به گروه آزرایمری به طور معناداری کمتر است. از طرف دیگر نشان داده شد که تیمار موش‌های با سینئول به صورت وابسته به دوز موجب کاهش معنادار TNF- α نسبت به گروه آزرایمری می‌گردد ($p < 0/05$) تا جایی که در گروه تیمار با ۰/۰۴ میلی‌گرم/کیلوگرم سینئول سطح TNF- α تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشته و در واقع به سطح نرمال خود رسیده است (نمودار ۴). بررسی فتومیکروگراف مقاطع ساژیتال ناحیه‌ی CAI هیپوکمپ گروه‌های مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین نشان دهنده‌ی مرگ سلولی به همراه کاهش تراکم سلولی و کاهش ضخامت هیپوکامپ در گروه آزرایمری نسبت به گروه کنترل می‌باشد. همچنین نکروز و حالت‌های هتروکروماتینی شده نیز در نمونه‌های آزرایمری قابل مشاهده بود. از سوی دیگر تیمار موش‌های با سینئول سبب افزایش سلول‌های پیرامیدال شده و ضخامت هیپوکامپ را تا حدی نسبت به گروه آزرایمری افزایش داده است (شکل ۱).

فتومیکروگراف مقاطع ساژیتال ناحیه‌ی هیپوکمپ گروه‌های مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی تیوفلاوین S در شکل ۲ نشان داده شده است. در این روش رنگ-آمیزی پلاک‌های آمیلوئیدی به صورت سبز روشن (روشن‌تر از زمینه) مشاهده می‌شوند. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه آزرایمری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است و در حالت تیمار با سینئول این پلاک‌ها کاهش یافته‌اند.

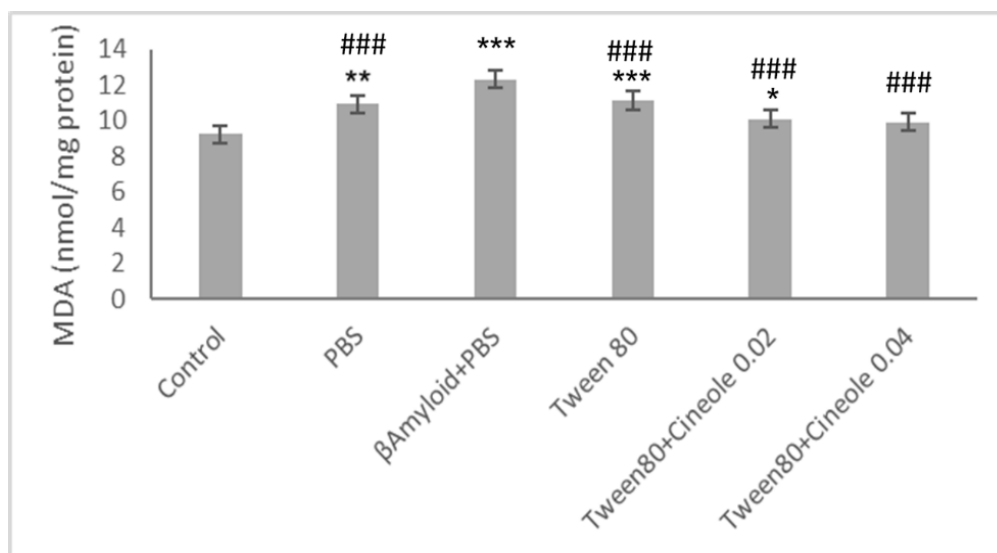
آزرایمری کمتر است ($p < 0/001$) و علت افزایشی که نسبت به گروه کنترل در این گروه مشاهده شده، احتمالاً قرار گرفتن در معرض جراحی می‌باشد. در گروه شم (تویین ۸۰) مقدار مالون دی‌آلدهید نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشته است ($0/001$) که نشان می‌دهد تویین به تنهایی قادر به کاهش مالون دی‌آلدهید نیست. در گروه‌های تیمار شده با سینئول در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم/کیلوگرم سطح سرمی مالون دی‌آلدهید به طور معناداری نسبت به گروه آزرایمری کاهش داشته است ($p < 0/05$). این تاثیر وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز سینئول، مالون دی‌آلدهید کاهش بیشتری داشته تا جایی که در غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم/کیلوگرم سینئول، سطح مالون دی‌آلدهید تفاوت معناداری با گروه کنترل سالم ندارد (نمودار ۲).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های آزرایمری به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش داشت. در دو گروه PBS و تویین ۸۰ نیز فعالیت SOD کاهش داشته است اما این کاهش به اندازه‌ی گروه آزرایمری نبوده و فعالیت SOD در این دو گروه نسبت به گروه آزرایمری به طور معناداری بیشتر است. همچنین نشان داده شد که تیمار با سینئول فعالیت SOD را به طور معناداری نسبت به گروه آزرایمری افزایش می‌دهد این افزایش وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز سینئول، فعالیت SOD نیز افزایش پیدا کرده است (نمودار ۳).

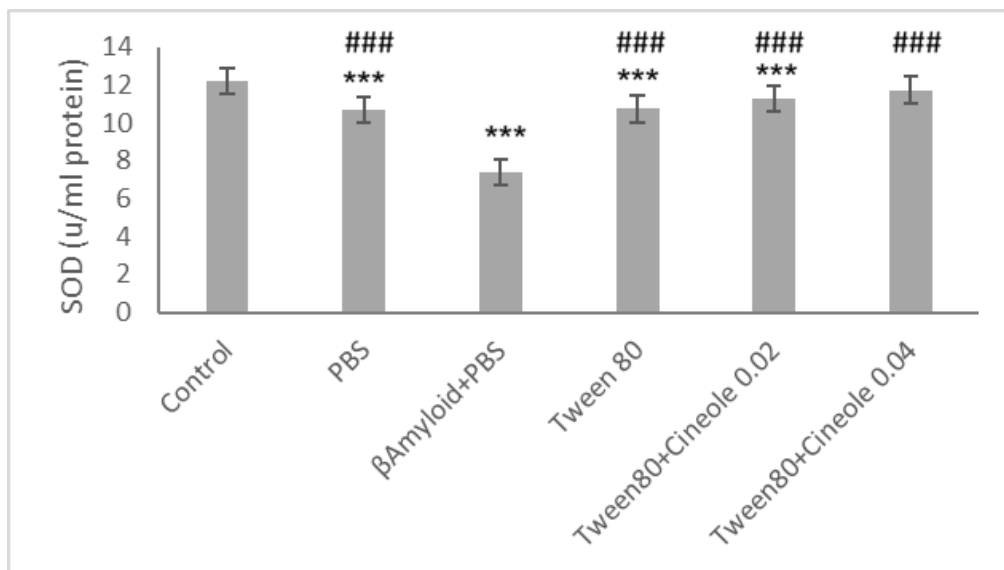
میزان TNF- α در موش‌های گروه آزرایمری افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشته است ($p < 0/001$) گروه‌های PBS و تویین ۸۰ نیز افزایش معناداری



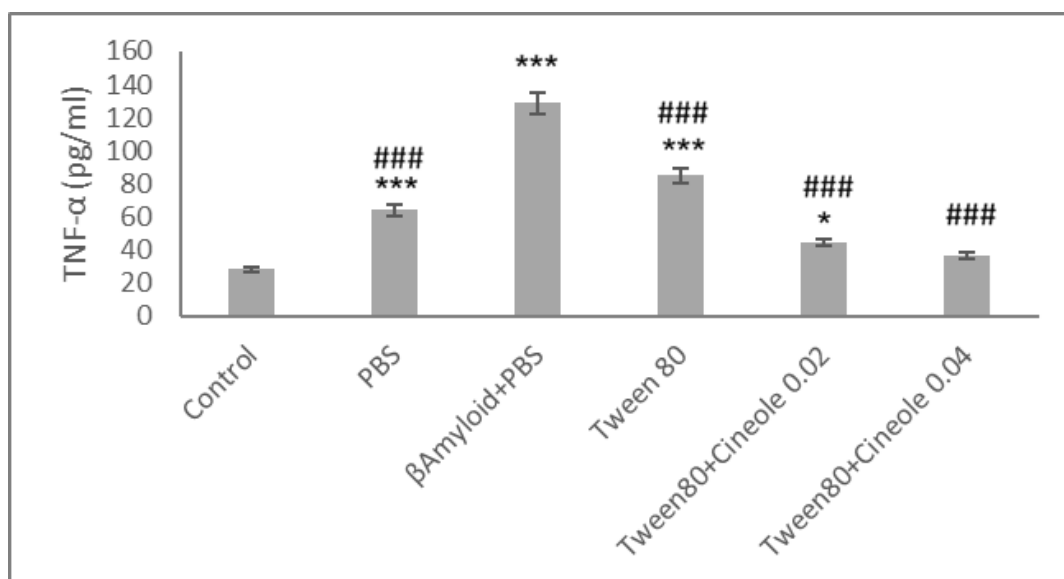
نمودار ۱- مقایسه زمان تاخیر موش‌ها در رفتن به بخش تاریک در شاتل باکس در گروه‌های مختلف. (***) اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $p < 0/001$. (###) اختلاف معنادار با گروه آلیزیمری در سطح $p < 0/001$.



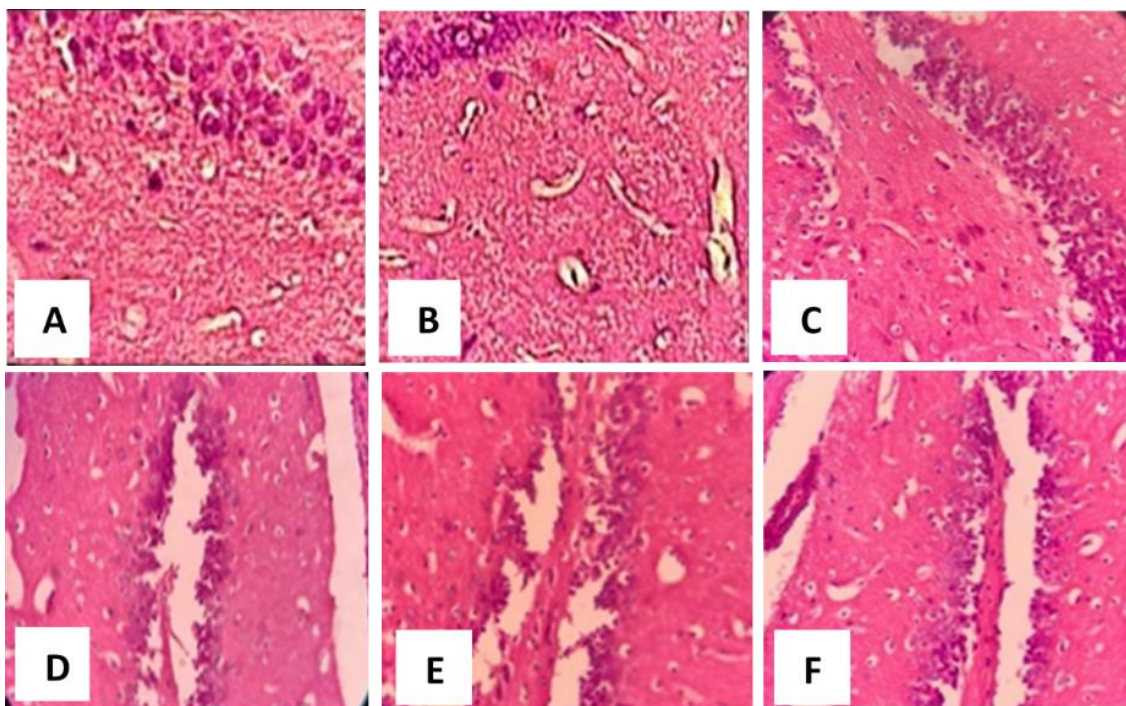
نمودار ۲- مقایسه میزان مالون دی‌آلدهید در گروه‌های مختلف (*): اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $p < 0/05$. (***) اختلاف معنادار با گروه آلیزیمری در سطح $p < 0/001$. (###) اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P < 0/001$.



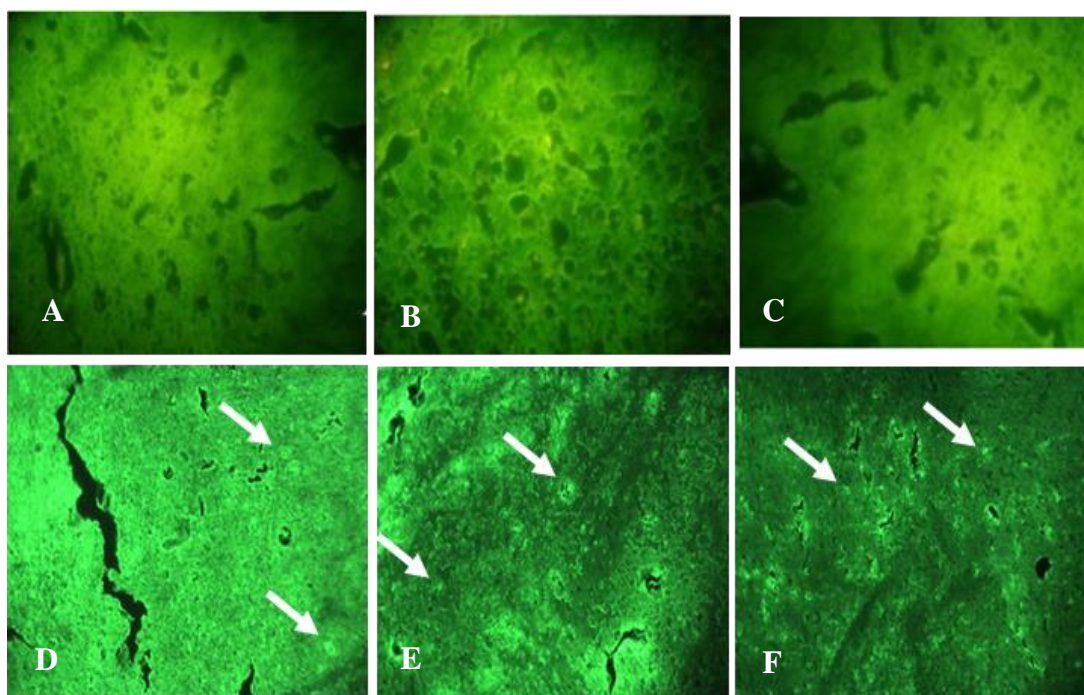
نمودار ۳- مقایسه فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در گروه‌های مختلف (***) اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $p < 0/001$. ### اختلاف معنادار با گروه آلزایمری در سطح $p < 0/001$



نمودار ۴- مقایسه میزان TNF-α در گروه‌های مختلف (*) اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P < 0/05$. ### اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P < 0/001$. ### اختلاف معنادار با گروه آلزایمری در سطح $P < 0/001$.



شکل ۱- - فتومیکروگراف از بخش CA1 (Cortex Area 1) ناحیه هیپوکامپ بافت مغز با رنگ آمیزی H&E. با بزرگنمایی (۴۰×). A: گروه کنترل منفی، B: گروه PBS، C: گروه آلزایمری، D: گروه تیمار شده با توپین ۸۰، E: گروه تیمار شده با ۰/۰۴ mg/kg سینتول، F: گروه تیمار شده با ۰/۰۲ mg/kg سینتول.



شکل ۲- فتومیکروگراف از مقاطع ساژیتال ناحیه هیپوکمپ گروه‌های مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی تیوفلاوین S با بزرگنمایی $\times 400$: A: گروه کنترل منفی، B: گروه PBS، C: گروه تیمار شده با توین ۸۰، D: گروه آلزایمری، E: گروه تیمار شده با 0.04 mg/kg سینتول، F: گروه تیمار شده با 0.02 mg/kg سینتول

بحث

ایجاد پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز موش‌های آلزایمری بود. از سوی دیگر تیمار موش‌های آلزایمری با دو دوز 0.02 mg/kg و 0.04 mg/kg سینتول موجب بهبود تمامی موارد ذکر شده به طور معناداری نسبت به گروه آلزایمری شد. این اثر سینتول در تمامی بخش‌های مورد مطالعه وابسته به دوز بود و دوز بالاتر سینتول اثرات مطلوب‌تری را نشان داد.

با توجه به پاتولوژی بیماری آلزایمر و افزایش استرس اکسیداتیو در این بیماری، به نظر می‌رسد که ترکیبات آنتی‌اکسیدان بتوانند نقش مهمی در کاهش علائم آلزایمر ایفا کنند. محققین استفاده‌ی طولانی مدت از آنتی‌اکسیدان‌ها را عامل به تاخیر انداختن بیماری آلزایمر می‌دانند (۲۸، ۱۷). 1.8 سینتول اصلی‌ترین مونوترپن در بسیاری از اسانس‌ها می‌باشد که نشان

در تحقیق حاضر اثر سینتول که یک ترکیب مشتق از گیاهان به ویژه گیاه اکالیپتوس می‌باشد، بر ویژگی‌های رفتاری، بیوشیمیایی و بافتی موش‌های آلزایمری شده مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل به طور کلی نشان می‌داد که در موش‌های آلزایمری شده، تغییرات معناداری نسبت به موش‌های کنترل سالم ایجاد می‌شود. از جمله آنکه موش‌های آلزایمری شده آموزشی که در دستگاه شاتل باکس به آن‌ها داده شده بود را فراموش کرده و در زمان کوتاهی وارد قسمت تاریک دستگاه که به آن‌ها شوک الکتریکی وارد می‌کرد، شدند. همچنین پارامترهای بیوشیمیایی شامل سطح مالون دی‌آلدید، سوپراکسید دیسموتاز و $\text{TNF-}\alpha$ در موش‌های آلزایمری شده به طور معناداری نسبت به موش‌های سالم تغییر کرده بود. در نهایت بررسی‌های بافتی نیز نشان دهنده‌ی تخریب سلول‌های مغزی و

آموزش‌ها را به خاطر بسپارند. از سوی دیگر تیمار موش‌ها با سینتول موجب بهبود حافظه شده و رفتار موش‌های تیمار شده با سینتول به رفتار موش‌های گروه کنترل نزدیک شده بود. افزایش سطح مالون دی-آلدئید در نمونه‌های بیولوژیک افراد آلزایمری بارها گزارش شده است (۲۰، ۲۲، ۳۹).

در تحقیق حاضر نیز هم‌راستا با تحقیقات مذکور، اندازه‌گیری سطح مالون دی‌آلدئید نشان داد که این ترکیب در موش‌های آلزایمری به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا می‌کند. از سوی دیگر در تحقیق حاضر نشان داده شد که تیمار موش‌های آلزایمری با سینتول موجب کاهش سطح مالون دی‌آلدئید در آن‌ها می‌گردد.

Mirghaed و همکاران بیان کردند که مکمل رژیمی دارای ۱۸ سینتول موجب بهبود مارکرهای آنتی-اکسیدانی سرم ماهی قزل‌آلا می‌شود. آن‌ها گزارش کردند که سینتول به طور معناداری سبب کاهش مالون دی‌آلدئید و افزایش سوپراکسید دیسموتاز می‌گردد (۲۳).

Lori-Gooini و همکاران نیز با بررسی اثر اسانس گیاه بومادران بر سطح مالون دی‌آلدئید سرمی و مغزی موش‌های در معرض استرس اکسیداتیو، نشان دادند که سطح مالون دی‌آلدئید هم در سرم و هم در مغز کاهش معناداری می‌یابد. آن‌ها بیان کردند که یکی از ترکیبات موثر موجود در اسانس گیاه بومادران که موجب کاهش مالون دی‌آلدئید می‌شود، سینتول بوده که حدود ۱۰ درصد ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهد (۲۱). مطالب ذکر شده کاملاً با نتایج حاصل از آزمایش حاضر مبنی بر کاهش مالون دی‌آلدئید در حضور سینتول همخوانی دارد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برای جلوگیری از اختلالات تخریب سیستم عصبی مانند بیماری آلزایمر نیز اهمیت دارد (۴).

داده شده است که خواص دارویی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد درد دارد (۳۰).

در یک مطالعه نشان داده شده است که در موش‌هایی که تحت ایسکمی قرار گرفته‌اند، حافظه‌ی اجتنابی غیرفعال از بین می‌رود و تجویز ۱۸ سینتول موجب بهبود حافظه‌ی این موش‌ها می‌گردد (۱۰).

طی ایسکمی میکروگلیاهای فعال شده می‌توانند سایتوکاین‌های التهابی همچون TNF- α و سایر مولکول‌های سیتوتوکسیک مانند ROS تولید کنند (۱۲).

۱۸ سینتول به عنوان مهار کننده‌ی قوی TNF- α گزارش شده است (۱۵).

در یک مطالعه‌ی کارآزمایی بالینی میزان ۱۸ سینتول موجود در پلاسما با عملکرد شناختی بیماران به دنبال قرار گرفتن در معرض اسانس رزماری بررسی شد و نتایج نشان داد که عملکرد شناختی به میزان قابل توجهی با غلظت ۱۸ سینتول جذب شده همراه با عملکرد بهتر در غلظت‌های بیشتر مرتبط است (۲۶).

اثر بخشی سینتول سنتتیک در جلوگیری از الیگومریزاسیون پپتید بتا آمیلوئید و مهار تولید اکسیژن وابسته به آهن در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است. از آنجایی که آسیب اکسیداتیو، تجمع بتا آمیلوئید و از بین رفتن قابلیت زنده ماندن سلول، از ویژگی‌های شروع پاتولوژی بیماری آلزایمر است، نتایج این مطالعه نقش درمانی سینتول را در جلوگیری از بیماری آلزایمر تایید می‌کند (۲۷).

در مطالعات رفتاری در تحقیق حاضر مشاهده شد که حافظه‌ی موش‌های دریافت کننده‌ی بتا‌آمیلوئید دچار مشکل شده و با وجود آموزش به آن‌ها، مدت زمانی که طول کشید تا به قسمت تاریک شاتل باکس بروند بسیار کوتاه بود در حالی که در موش‌های گروه کنترل رفتن به بخش تاریک زمان بیشتری طول کشید چرا که آموزش آن‌ها موثر بوده و موش‌ها توانسته بودند

α توسط سینتول اشاره شده است (۱۸، ۱۹، ۴۰) که همگی هم‌راستا با تحقیق حاضر می‌باشد.

یکی دیگر از علائم بیماری آلزایمر کاهش تعداد نورون‌ها در مناطق مربوط به یادگیری و حافظه به ویژه در ناحیه هیپوکامپ است. در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر آپوپتوز به میزان وسیعی رخ می‌دهد. در بسیاری از بیماری‌های نورولوژیک مانند آلزایمر، معیارهای آپوپتوزی و مرگ نورونی یک ویژگی اصلی می‌باشد (۲، ۲۴، ۳۱).

در تحقیق حاضر نیز بررسی‌های بافتی نشان داد که در موش‌های آلزایمری، تخریب نورونی و افزایش پلاک‌های آمیلوئیدی رخ می‌دهد. سینتول ماده‌ای است که می‌تواند آسیب‌های سلولی و آپوپتوز سلول‌های عصبی را تا حد بسیاری بهبود بخشد. این مسئله هم در مطالعات بافت‌شناسی و هم مطالعات رفتاری تحقیق حاضر به وضوح قابل مشاهده بود.

تصاویر تهیه از بافت مغز موش‌های تیمار شده با سینتول نشان می‌داد که مرگ سلولی نورون‌ها به شدت کاهش یافته و همچنین تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی نیز کم شده بود. این مسئله در رفتار موش‌ها نیز قابل مشاهده بود. موش‌های آلزایمری تاخیر کمی برای رفتن به بخش تاریک شاتل باکس داشتند در حالی که موش‌های تیمار شده با سینتول زمان بیشتری را تاخیر کرده و رفتار آن‌ها شبیه به موش‌های گروه کنترل شده بود. همگی این موارد به طور کلی تایید کننده نقش مثبت و موثر سینتول در بهبود علائم آلزایمر می‌باشد.

ضمن تلاش محققین برای دستیابی به ترکیبات دارویی برای درمان بیماری آلزایمر، ترکیبات طبیعی نقش مهمی در این زمینه دارند. سینتول یک ترکیب طبیعی مشتق از گیاهانی همچون اکالیپتوس، بومادران و رزماری است که دارای توانایی بالقوه در درمان آلزایمر می‌باشد.

کاهش سوپراکسید دیسموتاز در بیماری آلزایمر بارها گزارش شده است (۶، ۲۹، ۴۱).

در تحقیق حاضر نیز کاهش این آنزیم در موش‌های آلزایمری مشاهده شد. سینتول فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد و نشان داده شده است که این ماده می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از TCDD را در کبد موش‌های صحرایی به طور وابسته به زمان از بین ببرد. نتایج این تحقیق نشان داد که سینتول به طور معناداری سطح گلوتاتیون احیا شده، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز آهن-روی را در بافت کبد افزایش می‌دهد (۷).

اثر آنتی‌اکسیدانی سینتول در تحقیقات بسیاری با توانایی آن در افزایش سوپراکسید دیسموتاز تایید شده است (۱۱، ۱۶، ۲۳).

در تحقیق حاضر نیز نشان داده شده که سینتول موجب افزایش معنادار سوپراکسید دیسموتاز می‌گردد که با تحقیقات مذکور کاملاً هم‌راستا می‌باشد.

در مدل‌های سلولی و حیوانی آلزایمر نشان داده شده است که پپتید بتا آمیلوئیدی بیان $TNF-\alpha$ را تحریک می‌کند (۹، ۱۴، ۳۵).

فعال شدن $TNF-\alpha$ می‌تواند نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری آلزایمر داشته باشد و ممکن است نشانگر خطر برای پیشرفت این بیماری در مراحل اولیه باشد. در تحقیق حاضر مشاهده شد که در موش‌های آلزایمری سطح $TNF-\alpha$ به طور معناداری نسبت به موش‌های گروه کنترل افزایش می‌یابد. این مساله هم‌سو با سایر مطالعات می‌باشد. تیمار موش‌های آلزایمری با سینتول سبب کاهش معنادار $TNF-\alpha$ در آن‌ها شد. Juergens و همکاران نیز بیان کردند که یکی از راهکارهای ۱۸ سینتول برای انجام نقش ضد التهابی خود، کاهش سطح $TNF-\alpha$ می‌باشد (۱۵). در تحقیقات دیگری نیز به کاهش سطح $TNF-$

8. Cummings J., Lee G., Ritter A., Zhong, K., 2018. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. *Alzheimer's and Dementia. Translational Research and Clinical Interventions*, 4: 195-214.

9. Cunningham C., Campion S., Lunnon K., Murray C.L., Woods J.F., Deacon R.M., Rawlins J.N.P., Perry V.H., 2009. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biological Psychiatry*, 65(4): 304-312.

10. Farivar M., Hooshmandi Z., Setorki M., Amini S., 2020. Protective Effect of 1, 8-cineole on Learning and Memory Impairment Induced by Cerebral Hypoperfusion in Male Rats. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 14(4): 40-47.

11. Hoseini S.M., Rajabiesterabadi H., Khalili M., Yousefi M., Hoseinifar S.H., Van Doan H., 2020. Antioxidant and immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*) anesthetized by cineole: Effects of anesthetic concentration. *Aquaculture*, 520: 734680.

12. Huang J., Upadhyay U.M., Tamargo R.J., 2006. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical Neurology*, 66(3): 232-245.

13. Huang W.J., Zhang X., Chen W.W., 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*, 4(5): 519-522.

14. Jimenez S., Baglietto-Vargas D., Caballero C., Moreno-Gonzalez I., Torres M., Sanchez-Varo R., Ruano D., Vizuete M., Gutierrez A., Vitorica J., 2008. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *Journal of Neuroscience*, 28(45): 11650-11661.

15. Juergens L.J., Racké K., Tuleta I., Stoeber M., Juergens U.R., 2017. Anti-inflammatory effects of 1,8-cineole

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر نشان داده شد که این ماده قادر است علائم رفتاری، بیوشیمیایی و بافتی بیماری آلزایمر را تا حد بسیاری بهبود بخشد. امید می‌رود که با انجام مطالعات گسترده‌تر و همه‌جانبه بر روی توانایی سینثول، بتوان از آن به عنوان یک عامل درمانی بالفعل در درمان بیماری آلزایمر استفاده نمود.

منابع

1. Alzheimer's Association Report, 2018. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 14(3): 367-429 .

2. Baek S., Kim S.H., 2016. Treadmill exercise ameliorates symptoms of Alzheimer disease through suppressing microglial activation-induced apoptosis in rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 12(6): 526.

3. Bhowal M., Gopal M., 2015. Eucalyptol: Safety and pharmacological profile. *Journal of Pharmaceutic Science*, 5: 125-131.

4. Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1): 1.

5. Butterfield D.A., Halliwell B., 2019. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(3): 148-160.

6. Cao K., Dong Y.T., Xiang J., Xu Y., Hong W., Song H., Guan, Z.Z., 2018. Reduced expression of SIRT1 and SOD-1 and the correlation between these levels in various regions of the brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Pathology*, 71(12): 1090-1099.

7. Ciftci O., Ozdemir I., Tanyildizi S., Yildiz S., Oguzturk, H., 2011. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1, 8-cineole against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicology and industrial health*, 27(5): 447-453.

22. Miguélez L., de Toda I.M., De la Fuente M., 2018. Oxidative stress in blood cells of men and women with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 120: S98.
23. Mirghaed A.T., Fayaz S., Hoseini S.M., 2019. Effects of dietary 1, 8-cineole supplementation on serum stress and antioxidant markers of common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 509: 8-15.
24. Mohammadzadeh E., Alipour F., Khallaghi B., 2014. Evaluation of spatial memory impairment after intracerebroventricular streptozocin injection in adult rats. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*, 2(1): 40-45.
25. Morales I., Cerda-Troncoso C., Andrade V., Maccioni R.B., 2017. The natural product curcumin as a potential coadjuvant in Alzheimer's treatment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(2): 451-460.
26. Moss M., Oliver L., 2012. Plasma 1, 8-cineole correlates with cognitive performance following exposure to rosemary essential oil aroma. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2(3): 103-113.
27. Paul K., Ganguly U., Chakrabarti S., Bhattacharjee P., 2020. Is 1, 8-Cineole-Rich Extract of Small Cardamom Seeds More Effective in Preventing Alzheimer's Disease than 1, 8-Cineole Alone? *Neuromolecular Medicine*, 22(1): 150-158.
28. Pinto A., Bonucci A., Maggi E., Corsi M., Businaro R., 2018. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of ketogenic diet: new perspectives for neuroprotection in Alzheimer's disease. *Antioxidants*, 7(5): 63.
29. Proctor P., 2019. RE: SOD1 and SOD-mimetics as Alzheimer's Treatments. *Clinical Pharmacology and Toxicology* <https://www.science.org/doi/10.1126/comment.728226/full/>
- (eucalyptol) improve glucocorticoid effects in vitro: a novel approach of steroid-sparing add-on therapy for COPD and asthma? *Synergy*, 5: 1-8.
16. Juergens L.J., Tuleta I., Stoeber M., Racké K., Juergens U.R., 2018. Regulation of monocyte redox balance by 1, 8-cineole (eucalyptol) controls oxidative stress and pro-inflammatory responses in vitro: A new option to increase the antioxidant effects of combined respiratory therapy with budesonide and formoterol? *Synergy*, 7: 1-9.
17. Kryscio R.J., Abner E.L., Caban-Holt A., Lovell M., Goodman P., Darke A.K., Yee M., Crowley J., Schmitt F.A., 2017. Association of antioxidant supplement use and dementia in the prevention of Alzheimer's disease by vitamin E and selenium trial (PREADViSE). *JAMA Neurology*, 74(5): 567-573.
18. Lai Y.N., Li Y., Fu L.C., Zhao F., Liu N., Zhang F.X., Xu P.P., 2017. Combinations of 1, 8-cineol and oseltamivir for the treatment of influenza virus A (H3N2) infection in mice. *Journal of Medical Virology*, 89(7): 1158-1167.
19. Li Y., Lai Y., Wang Y., Liu N., Zhang F., Xu P., 2016. 1, 8-cineol protect against influenza-virus-induced pneumonia in mice. *Inflammation*, 39(4): 1582-1593.
20. López-Riquelme N., Alom-Poveda J., Viciano-Morote N., Llinares-Ibor I., Tormo-Díaz, C., 2016. Apolipoprotein E ϵ 4 allele and malondialdehyde level are independent risk factors for Alzheimer's disease. *SAGE Open Medicine*, 4: 2050312115626731.
21. Lori-Gooini Z., Rabiei Z., Farhadi B., Bijad E., Azomon E., Rafieian-Kopaei M., 2018. Investigation of chemical compounds and effects of *Achillea wilhelmsii* L essential oil on antioxidant and malondialdehyde levels of serum and brains of reserpined mice. *Iranian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2(3): 176-166.

35. Tine Y., Diallo A., Diop A., Costa J., Boye C.S.B., Wélé A., Paolini J., 2020. The Essential oil of Eucalyptus alba L. Growing on the Salt Zone of Fatick (Senegal) as a Source of 1, 8- Cineole and Their Antibacterial Activity. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(1-s): 140-143.
36. Tönnies E., Trushina E., 2017. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4): 1105-1121 .
37. Tramutola A., Lanzillotta C., Perluigi M., Butterfield D.A., 2017. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*, 133: 88-96 .
38. Turunc Bayrakdar E., Uyanikgil Y., Kanit L., Koylu E., Yalcin A., 2014. Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in A β (1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radical Research*, 48(2): 146-158.
39. Wang L., Zhao C.Z., 2016. Effect of 1, 8-cineol pretreatment on inflammatory response induced by A β (25-35) in primary cultured cortical neurons. *Chinese Journal of Gerontology*, 7: 2.
40. Zhang Y., Dong H., Liu X., Huang M., 2018. The efficacy of butylphthalide soft capsules combined with donepezil tablet in patients with alzheimer disease and its effect on Serum A beta, GSH-Px and SOD. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 6(1): 21-27.
29. Qian Z.J., Jung W.K., Kim S.K., 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99(6): 1690-1698.
30. Rai S., Kamat P.K., Nath C., Shukla R., 2014. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 117: 104-117.
31. Schoneich C., Hewarathna A., Pal R., Jiang L., Michaelis, E., 2017. Oxidative stress markers of Alzheimer's disease in peripheral cell mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 108: S100 .
32. Selkoe D.J., Hardy J., 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6): 595-608.
33. Sharma A. D., Kaur, I., 2020. Eucalyptol (1, 8 cineole) from eucalyptus essential Oil a potential inhibitor of COVID 19 corona virus infection by molecular docking studies. *Preprint*, 2020: 2020030455.
34. Teixeira A.L., Reis H.J., Coelho F.M., Carneiro D.S., Teixeira M.M., Vieira L.B., Mukhamedyarov M.A., Zefirov A.L., Janka Z., Palotás A., 2008. All-or-nothing type biphasic cytokine production of human lymphocytes after exposure to Alzheimer's β -amyloid peptide. *Biological Psychiatry*, 64(10): 891-895.

The Effect of Cineole on Biochemical, Behavioral and Histological Parameters in Alzheimer's Male Wistar Rat Model

Elnaz Khameneh, Parichehreh Yaghmaei*, Maryam Ghobeh*

Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Abstract

The Alzheimer's disease is one of the neurodegenerative diseases affecting many individuals around the world with no definitive cure. The aim of this study was to investigate the effect of cineole, as a natural antioxidant, on the behavioral, biochemical, and histological symptoms of Alzheimer's disease in Wistar rats. Thirty-six male Wistar rats were randomly assigned to six groups. The control group underwent any surgery with no special treatment. The other groups underwent surgery and were assigned to four beta-amyloid groups: one group receiving PBS (beta-amyloid solvent); the sham group was treated with tween 80 (cineole solvent) and the two experimental groups were treated with cineole at 0.02 and 0.04 mg/kg doses. The control group, the Alzheimer's group and the PBS group did not receive any treatments. Finally, behavioral (Shuttle box), biochemical (malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase, TNF- α) and histological parameters (H&E and Thioflavine S staining) were investigated. In Alzheimer's-induced rats, the time it took for the rats to go to the dark part of the shuttle box was significantly ($p < 0.001$) shorter than that of the control group. The levels of malondialdehyde and TNF- α in these rats were significantly increased and the level of superoxide dismutase was significantly decreased compared to the control group ($p < 0.001$). Furthermore, histological studies showed that in Alzheimer's-induced rats, neuronal cell death occurred extensively in the hippocampus and amyloid plaques increased. Treatment of rats with cineole improved all of the investigated parameters significantly in a dose-dependent manner. Cineole may be used as a suitable natural antioxidant to treat Alzheimer's disease and reduce its symptoms, requiring further research.

Keywords: Alzheimer's Disease, Cineole, SOD, MDA, Neurogenesis, Amyloid Plaques

