زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۲، صفحات ۳۳- ۲۳

مقاله پژوهشی

اثر مقایسه‌ای تیمولول و عصاره متانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) با ویتامین E بر بیان ژن *APO E* و تغییرات رفتاری و بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی آلزایمری

سمیرا همایون پور، مریم بنانج*، مریم خسروی، هنگامه علی بیک

گروه زیست‌شناسی، واحد شمال تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: m_bananej@iau-tnb.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2023.1917661.1221

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۶

چکیده

بیماری آلزایمر رایج‌ترین شکل زوال عقل است که با کمبود حافظه و ادراک تشخیص داده می‌شود. ویتامین E، به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، نقش مهمی در احیای رادیکال‌های آزاد و تبدیل آنها به مواد بی خطر با دادن هیدروژن دارد. آویشن شیرازی دارای خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. هدف از این مطالعه، اثر مقایسه‌ای تیمولولول با عصاره متانولی آویشن شیرازی با ویتامین E بر آلزایمر در رت نر نژاد ویستار می‌باشد. تعداد ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۲۰۰ گرم به صورت تصادفی در ۵ گروه هشت‌تایی تقسیم‌بندی شدند. جهت القاء آلزایمر از بتاآمیلوئید ۴۲ استفاده شد. سپس، استخراج عصاره متانولی و تیمولول از گیاه آویشن شیرازی انجام شد. میزان بیان ژن *Apo E* به روش Real Time PCR و فاکتورهای بیوشیمیایی TC، LDL و HD ارزیابی گردید. بیان ژن *Apo E* در گروه‌های تجربی به طور معناداری نسبت به گروه آلزایمر افزایش نشان داد. بیان این ژن در گروه شم نسبت به گروه کنترل کاهش داشت. گروه موش های آلزایمری افزایش معنی‌داری در سطح توتال کلسترول (TC) و لیپو پروتئین کم دانسیته (LDL) سرم داشتند و میزان HDL نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد. تیمولول و عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی و ویتامین E دارای اثرات مثبتی بر بیان ژن *APOA E* در لوکوسیت‌ها هستند که در این میان تأثیر عصاره متانولی بر بیان ژن مذکور به طور معنی‌داری از دو تیمار دیگر هم بیشتر می‌باشد. از طرفی با تاثیر معنادار بر HDL می‌توان عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی را به عنوان فرآورده ای موثر برای پیشگیری و کم کردن عوارض بیماری آلزایمر استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آلزایمر، تیمولول، عصاره متانولی، آویشن شیرازی، ویتامین E.

مقدمه

آلزایمر رایج‌ترین شکل زوال عقل است که با کمبود حافظه و ادراک تشخیص داده می‌شود. شیوع آن، با افـزایش سن مـرتبط است؛ به این صورت که با ۵ تا ۱۰ درصد افـزایش، در افراد بالای ۶۵ سال و ۲۰ درصد افزایش در افراد بالای ۸۰ سال ظاهر می‌شود (۳۲). این بیماری با از دست رفتن سیناپس نورون‌ها در برخی مناطق مغز، نکروزه شدن سلول‌های مغز در مناطق مختلف سیستم عصبی، ایجاد ساختارهای پروتئینی کروی شکلی به نام پلاک‌های آمیلوئید در خارج نورون‌های برخی مناطق مغز و کلافه‌های نوروفیبریلاری داخل نورونی حاوی پروتئین میکروتوبولی تائو مشخص می‌شود (۲۲). یک از

مکانیسم‌های دخیل در کاهش شناختی می‌توان به آپوپتوز، آتروفی قشر و یا هیپوکامپ و مهار نوروژنز اشاره کرد (۲٤). الگوی وراثتی بیماری آلزایمر زودرس، اتوزومال غالب می‌باشد که ناشی از جهش در یکی از سه ژن پیش‌ساز آمیلوئید (APP)، پرسنیلین-۱ و پرسنیلین-۲ است که بیشترین جهش‌ها در ژن‌های APP و تولید یک پروتئین کوچک به نام Aβ 42 می‌باشد که جزء اصلی پلاک‌های پیری است. مشخص شد که نقص در آلل آپولیپوپروتئین E (*APO E*) عامل اصلی خطر ابتلا به بیماری آلزایمر در افراد مسن است. *APO E* در نگهداری و ترمیم سلول-های عصبی شرکت می‌کنند (۵). *APO E* لیپوپروتئین اصلی مغز است که در نقل و انتقالات لیپید و به خصوص کلسترول نقش دارد و در انسان سه ایزوفرم E2 و E3 و E4 وجود دارد که نوع ۳ شایع ترین ایزوفرم است. *APO E* در سوخت‌وساز چربی و تنظیم غلظت کلسترول و نقش دارد که دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی می‌باشد (۲). پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP) در سلول‌های دستگاه عصبی بیان می‌شود و در اتصال سلول‌ها به هم، تماس سلول‌ها و اتصال به ماتریکس خارج سلولی و اسکلت سلولی نقش دارد. پروتئین APP به‌وسیله‌ی سه نوع آنزیم پروتئولاتیک پردازش می‌شود. تخریب نورون‌های بزرگ کولینرژیک هسته قاعده‌ای ماینرت که معادل هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس جوندگان می‌باشد، مسئول بسیاری از نواقص شناختی و حافظه‌ای بیماری آلزایمر است (۳۷).

ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان نقش مهمی در احیای رادیکال‌های آزاد و تبدیل آنها به مواد بی‌خطر با دادن هیدروژن ایفا کرده و از فسفولیپیدهای غیراشباع غشای سلول در برابر تخریب اکسیداتیو محافظت می‌کند (۱، ۲۱). بنابراین می‌تواند در پیشگیری از اکسیداسیون LDL-C و استرس اکسیداتیو و پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی و دیابت نقش داشته باشد (۹، ۲۸). آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) یکی از گیاهان تیره نعناعیان است که به صورت بوته‌های پرپشت در دامنه‌های خشک و بین تخته سنگ‌های نواحی مختلف مدیترانه از جمله در کشورهای فرانسه، پرتغال، اسپانیا، ایتالیا و یونان می-روید (۳۳). از آویشن در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده متنوعی می‌شود. روغن آویشن دارای خواصی نظیر ضداسپاسم، بادشکن، ضدقارچ، ضدعفونی کننده، ضدکرم، ضدرماتیسم و خلط‌آور می‌باشد. اسانس آویشن از جمله ده اسانس معروف است که دارای خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی، نگهدارنده طبیعی غذا و تاخیردهنده پیری پستانداران است و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (۲۳). آویشن محتوی ۸ تا ۲.٦ درصد (معمولاً ۱ درصد) اسانس است که قسمت اعظم آن را فنول‌ها (۲۰ تا ۸۰ درصد)، هیدروکربن-های مونوترپنی (مانند a-terpinene, linalool و p-cymene) و الکل‌ها (مانند y-terpinen و thujan-4-ol) تشکیل می‌دهند که گاهی هر کدام از این ترکیبات تا ۸۰ درصد یا بیشتر از ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند. به‌طور طبیعی تیمول جزء اصلی فنولی در آویشن است و کارواکرول نیز یک جزء فرعی است که در طب گیاهی آلمان، چای حاوی مقدار ۱ تا ۲ گرم از گیاه خشک شده که حداقل ۰/۵ درصد از فنل، ماده تیمول باشد برای علایم برونشیت، سیاه سرفه و التهابات غشای مخاطی ترشحی از قسمت فوقانی دستگاه تنفسی استفاده می‌شود (۲۹).

تیمول به عنوان یک ضدعفونی کننده روی زخم‌ها و جوش‌ها مصرف می‌شود. همچنین، تیمولول به عنوان یک ماده متوقف کننده رشد باکتری و کشنده قارچ به فرم پودرها، لوسیون و پمادها مصرف می‌گردد. تیمول برای آلودگی‌های بلاستومیکوزیس، مونیلیازیس و

کوکسیدیازیس تجویز می‌شود البته برای ضدعفونی معده و روده، توصیه نشده است، به همین علت که سبب اسهال می‌شود و از طریق روده‌ها جذب و ۵۰ درصد آن در ادرار به صورت سولفات یا گلوکورونات دفع می‌گردد (۱۶). در این کار پژوهشی اثر مقایسه‌ای تیمولول و عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی با ویتامین E بر فاکتورهای بیوشیمیایی از قبیل: LDL، HDL، کلسترول و بیان ژن *APO E* بر آلزایمر در رت نر نژاد ویستار مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط نگهداری و گروه‌بندی حیوانات: در این مطالعه، تعداد ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۲۰۰ گرم و در قفس‌های استاندارد و با شرایط دمایی کنترل شده (۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (۵۰-۵۵ درصد) و قرار گرفتن در معرض نور ۱۲: ۱۲ ساعت نور و تاریکی با دسترسی آزاد به غذا و آب و بر طبق دستورالعمل و ضوابط اخلاقی کار با حیوانات نگهداری شدند. تحقیق مورد نظر بر اساس مدارک ارسالی مورد تصویب کمیته‌ی اخلاق قرار گرفت (IR.IAU.SRB.REC.1398.131). گروه‌های مطالعه به صورت تصادفی در ۵ گروه هشت‌تایی تقسیم بندی شدند که شامل: گروه اول شامل حیواناتی که در شرایط معمولی آزمایشگاه نگهداری و طی درمان سایر گروه‌ها روزانه ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم سالین دریافت کردند (گروه کنترل). گروه دوم شامل حیواناتی بودند که طی مدت ۲۰ روز با دریافت بتاآمیلوئید، مبتلا به آلزایمر شده و به مدت ۲۸ روز، روزانه ۱ میلی-گرم/کیلوگرم سالین دریافت کردند (گروه شم) (۱۵). گروه سوم دربرگیرنده‌ی حیواناتی بودند که طی مدت ۲۰ روز با دریافت بتاآمیلوئید، مبتلا به آلزایمر شده و بلافاصله به مدت ۲۸ روز، روزانه ۱۵ میلی-گرم/کیلوگرم داروی ویتامین E به صورت گاواژ دریافت نمودند. گروه چهارم حیواناتی بودند که طی مدت ۲۰ روز با دریافت بتاآمیلوئید، مبتلا به آلزایمر شده و بلافاصله به مدت ۲۸ روز، روزانه ۵۰ میلی-گرم/کیلوگرم فرآورده تیمولول به شکل گاواژ دریافت کردند (۳۶). در نهایت گروه پنجم حیواناتی بودند که طی مدت زمان ۲۰ روز با دریافت بتاآمیلوئید، مبتلا به آلزایمر شده و بلافاصله به مدت ۲۸ روز، روزانه ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره متانولی به صورت گاواژ دریافت نمودند (۳۶).

در این تحقیق، جهت القاء آلزایمر از بتاآمیلوئید ۴۲ استفاده شد. ویال‌های یک میلی‌گرمی بتاآمیلوئید تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich پس از اضافه شدن ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به آنها به مدت یک هفته درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. حیوانات مورد آزمایش به وسیله تزریق کتامین و زایلوزین به نسبت ۱ به ۷ بیهوش شده و درون دستگاه استرئوتکس قرار گرفتند. سپس جمجمه حیوانات توسط دریل دندانپزشکی سوراخ شد و مقدار ۲ میکرولیتر از مایع بتا آمیلوئید که حاوی ۱۰ میکروگرم پروتئین بود به وسیله سرنگ همیلتون درون هیپوکامپ حیوانات تزریق گردید. پس از مدت زمان ۲۰ روز پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز حیوانات تشکیل شد که از طریق تهیه لام پاتولوژیک و رنگ‌آمیزی مخصوص پلاک قابل رویت گردید (۱۳).

استخراج عصاره متانولی و تیمولول از گیاه آویشن شیرازی: مقدار ۲۰ گرم برگ گیاه آویشن شیرازی در دستگاه سوکسیله حاوی متانول ۶۰ درصد قرار داده شد. به مدت ٤ ساعت چرخش متانول و آب بر روی پودر برگ گیاه که در قسمت ستونی سوکسیله قرار داشت، انجام گرفت و عصاره متانولی استخراج و به کمک دستگاه روتاری خشک گردید. سپس، جهت جداسازی تیمولول، ۱۰ گرم از برگ‌های جوان گیاه خرد شده آویشن به طور جداگانه به ۱۰۰ میلی لیتر

هیدرواتانول ۸۵ درجه و به آب مقطر اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه چرخاننده به آرامی مخلوط گردیده تا استخراج به خوبی صورت گیرد. در مرحله‌ی بعد، مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا تا عصاره‌های اولیه به دست آمد. عصاره‌ی اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء شده و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد حلال آنها به مدت یک ساعت به آرامی تبخیر گردید و عصاره تغلیظ شده به دست آمد که حاوی بیشترین مقدار تیمولول گیاه آویشن بود (۱٤، ۳۱).

سنجش میزان بیان Apo E به روش Real Time PCR: از هر رت نر نژاد ویستار، مقدار ۸ میلی‌لیتر خون گرفته شد و در لوله آزمایش حاوی EDTAریخته شد. سرم خون به وسیله ی دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰g طی مدت ۵ دقیقه جداسازی و جهت سنجش پارامترهای بیوشیمیایی از قبیل: توتال کلسترول، LDL و HDL استفاده گردید. برای خالص‌سازی لکوسیت‌ها از بخش سلولی باقیمانده طی دو مرحله لایزیزبافر (Lysis buffer) شامل (۸/۰۲ گرم NH_4CL، ۰/۸٤ گرم $NaHCO_3$، ۰/۳۷ گرم EDTA و یک لیتر H_2O) به خون اضافه گردید و در هر مرحله ۱۰ دقیقه در دستگاه Shaker گذشته و سپس از دستگاه سانتریفیوژ با دمای ٤ درجه سانتیگراد با دور ۱۸۰۰g به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. در انتها رسوب لوکوسیت‌ها با میزان کمی لایزیز بافر از ته لوله آزمایش شستشو داده و به میکروتیوب منتقل و جهت ته نشینی لکوسیت‌ها از دور ۷۰۰۰g سانتریفیوژ به مدت ۵۰ ثانیه استفاده و در انتها لایزیز بافر از میکروتیوب‌ها خالی گردید (۲۷). سپس RNA طبق پروتکل کیت RNx plus (شرکت سینا ژن، ساخت ایران) از لوکوسیت‌ها استخراج و غلظت آن به وسیله اسپکتروفوتومتر نانودراپ اندازه‌گیری گردید (٦).

پس از تعیین میزان RNA از کیت سنتز cDNA (شرکت پارس توس- ساخت ایران) شامل: ۱ میکرولیتر Oligo (dt) و DEPC-treated water و ۱۰ میکرولیتر RT premix به همراه ۱ میکروگرم Template RNA برای سنتز cDNA طبق پروتکل کیت استفاده شد. برای افزایش سنتز cDNA، میکروتیوب‌ها به PCR وارد شده و در طول دوره‌های مختلف cDNA سنتز شد و سپس باند بیان ژن نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید. جهت سنجش میزان بیان ژن *Apo E* به کمک دستگاه Real Tim PCR (Bio-Rad) از۲۰ میکرولیتر محلول شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix 2x، ۰.٤ میکرولیتر ROX dye 50x، یک میلی‌لیتر پرایمر پیشرو و ۱ میلی‌لیتر پرایمر پسرو، Template DNA و Sterilized D.W به روش سایبرگرین Real Tim PCR استفاده گردید. کیفیت مراحل آزمون در دمای ۷۵/۵ درجه سلسیوس در زمان یک ساعت و پنجاه و پنج دقیقه شامل سه فاز خطی، نمایی و کفه در ۵۲ سیکل ثبت گردید. از ژن *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphatdehydrogenase) برای house keeping استفاده شد و آنالیز داده‌های حاصله به صورت ΔΔCT بود (۱۷). طراحی پرایمرهای پیشرو و پسرو در جدول ۱ مشخص شده است (جدول ۱).

سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی TC، LDL و HD: پارامترهای بیوشیمیایی (TC، LDL و HDL) با استفاده از کیت‌های تشخیص کمی (شرکت پارس آزمون–ساخت ایران) به روش فتومتریک به کمک دستگاه اتوآنالایزر آلفا اندازه‌گیری شد. جهت سنجش لیپیدی، مخلوط ۱۰ میکرولیتر استاندارد، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف بلانک به همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر نمونه را در دمای ۲۵ درجه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه و سپس سنجش در طول

موج ٥٤٦ نانومتر انجام گرفت. فتومتر با بلانک روی صفر تنظیم شده بود (٢٦).

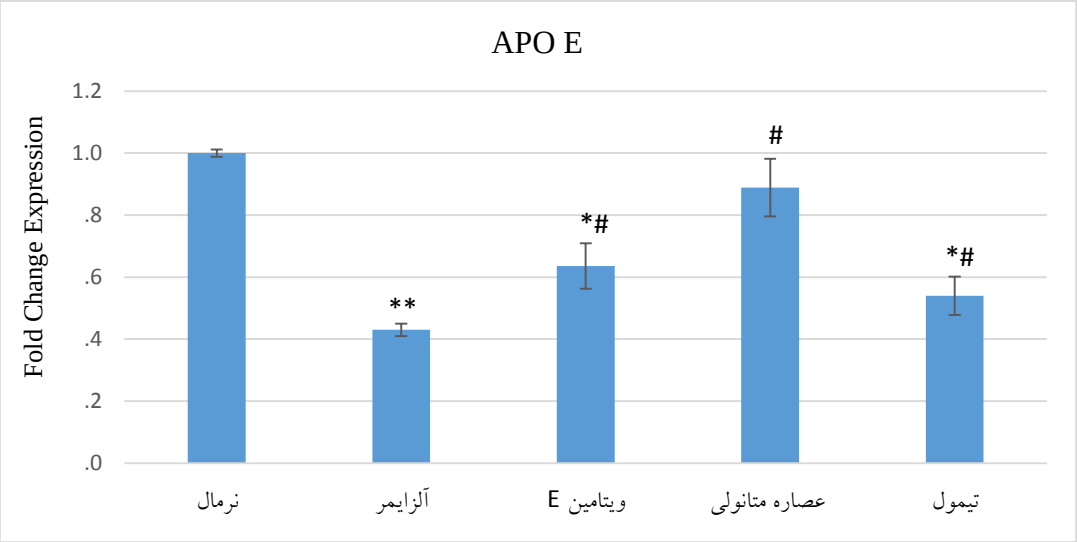
آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه با تست تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۸ در سطح خطای ۵ درصد تحلیل شدند.

جدول ۱- پرایمرهای پیشرو و پسرو مربوط به ژن *Apo E*

طول	توالی (٥' ← ٣')	پرایمر
٦٠	CTGGTTCGAGCCGCTAGTG	پرایمر پیشرو
٦٠	CCTGTATCTTCTCCATTAGGTTTGC	پرایمر پسرو

نتایج

در این مطالعه، اثر مقایسه‌ای تیمولول و عصاره متانولی استخراجی از گیاه آویشن شیرازی با ویتامین E بر روی بیان ژن *Apo E* در مدل رت نر نژاد ویستار انجام گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت معناداری در بیان ژن *Apo E* در سطح mRNA در گروه‌های تجربی، شم و کنترل مشاهده شد. به طوری که بیان ژن *Apo E* درگروه‌های تجربی مصرف کننده ویتامین E، تیمولول و عصاره متانولی به طور معناداری نسبت به گروه آلزایمر افزایش نشان داد ($p < ۰/۰۵$). بیان این ژن در گروه شم نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ($p < ۰/۰۱$). تجزیه و تحلیل منحنی ذوب نشان داد که کیفیت مراحل آزمون در دمای ۵۷/۵ درجه سلسیوس در زمان ۱/٤٥ دقیقه با سه فاز خطی، نمایی و کفه در تعداد ٤٥ سیکل ثبت گردید. گروه موش‌های آلزایمری افزایش معنی‌داری در سطح توتال کلسترول (TC) و لیپوپروتئین کم دانسیته (LDL) سرم ($p < ۰/۰۱$) داشتند و میزان HDL ($p < ۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد. ویتامین E و تیمول به همراه عصاره متانولی با ($p < ۰/۰۵$) باعث کاهش سطح توتال کلسترول (TC) و لیپوپروتئین کم دانسیته (LDL) سرم نسبت به گروه شم شدند. تأثیر عصاره متانولی بر کاهش LDL سرم نسبت به تیمولول و ویتامین E بیشتر بود ($p < ۰/۰۵$). تیمولول و عصاره متانولی موجب افزایش سطح HDL سرم در موش‌های آلزایمری نسبت به گروه های شم شدند ($p < ۰/۰۵$) که این افزایش در گروه مصرف کننده ویتامین E معنی‌دار نبود (جدول ۲).



نمودار ۱- نمودار تغییرات بیان ژن *APO E* بعد از ۲۸ روز تیمار. * $p < ۰/۰۵$ مقایسه با گروه کنترل ، ** $p < ۰/۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل؛ # $p < ۰/۰۱$ در مقایسه با گروه شم.

جدول ۲- اثرات ویتامین E، تیمولول و عصاره متانولی آویشن شیرازی بر لیپید های سرم.

گروه ها/پارامترها	کنترل	آلزایمر (شم)	ویتامین E	عصاره متانولی	تیمولول
TC (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۶۴/۰۳ ± ۱/۳۶	۱۴۱/۵ ± ۱۱/۳۵*	۷۱/۰۰ ± ۵/۹۰ #	۷۹/۲۳ ± ۴/۱۰ #	۸۶/۱۲ ± ۹/۳۰ *#
LDL (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۵۳/۱۷ ± ۶/۵۳	۱۰۶/۳۲ ± ۱۴/۳۶*	۸۶/۵۳ ± ۴/۱۱*#	۶۳/۸۱ ± ۶/۶۹ #	۷۱/۹۶ ± ۷/۱۶ *#
HDL (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۵۸/۹۸ ± ۸/۱۶	۳۹/۰۴ ± ۷/۲۵	۴۸/۳۰ ± ۶/۳۴	۵۱/۱۱ ± ۷/۰۴ #	۴۵/۰۲ ± ۲/۰۶ #

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد بیان شده‌اند. * $p < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل و # $p < ۰/۰۱$ در مقایسه با گروه شم.

بحث

بارزترین تظاهر زوال عقل، اختلال حافظه است که به تدریج توانایی‌های ذهنی بیمار تحلیل می‌رود و عامل یک نوع اختلال عملکرد مغزی بنام آلزایمر می‌گردد. در بیماری آلزایمر، ساختارهای پروتئینی کروی شکلی در خارج نورون‌های برخی مناطق مغز و ساختارهای پروتئینی رشته‌ای بنام اجسام آمیلوئیدی در جسم سلولی نورون‌ها تشکیل می‌شود. یکی از مهم‌ترین پروتئین‌هایی که در ایجاد آلزایمر نقش دارد، پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP) نام دارد. این پروتئین در سلول‌های دستگاه عصبی بیان می‌شود (۴، ۱۲). پپتیدهای آمیلوئید بتا از پروتئولیز پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید بتا ۱ و در اثر فعالیت آنزیم‌های خانواده سکرتازها تشکیل می‌شوند. اکثر فرآیندهای مربوط به اثرات نوروتوکسیک آمیلوئید بتا مربوط به نوع ۱-۴۲ می‌باشد که سبب آسیب فعالیت سیناپسی می‌شود. پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید بتا یک پروتئین غشایی می‌باشد که در انتهای آکسون‌های پیش سیناپسی وجود دارد (۲۶).

با استفاده از آنالیز پیوستگی، ژن های دیگری نیز در ارتباط با آلزایمر دیر هنگام فامیلی شناسایی شده است. یکی از این جایگاه‌ها، بر روی کروموزوم ۱۹ در ناحیه ۲q13.19 قرار دارد که در آن ژن *APO E* که

آپولیپوپروتئین E را کد می‌کند، قرار دارد (۸). آپولیپوپروتئین E در شیلومیکرون و لیپوپروتئین‌های با دانسیته متوسط یافت می‌شود و در کاتابولیسم نرمال زیرمجموعه‌ای لیپوپروتئینی غنی از تری‌گلیسیرید نقش اساسی دارد (۳٤). همچنین، آپولیپوپروتئین E عمدتاً به وسیله کبد و ماکروفاژها تولید می‌شود و در متابولیسم کلسترول نقش دارد. وظیفه آپولیپوپروتئین E انتقال لیپوپروتئین‌ها، ویتامین‌های محلول در چربی و کلسترول به سیستم لنف و خون می‌باشد (۱۱). یکی از مهمترین وظایف *APO E*، القاء برش در پپتید آمیلوئید بتا و در نتیجه پاک‌سازی سلول‌ها از آن می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که آلل E4 مانند انواع دیگر *APO E* در این عمل وارد نمی‌شود و در نتیجه سبب افزایش میزان پپتید آمیلوئید بتا و تحریک تشکیل پلاک آمیلوئیدی می‌گردد (۳، ۱۹). امروزه جهت انجام مطالعات در زمینه تشخیص و درمان آلزایمر از مدل‌های حیوانی استفاده می‌شود. یکی از راه‌های ایجاد مدل حیوانی در بیماری آلزایمر، تزریق پپتید آمیلوئید بتا درون بطن مغز حیوانات می‌باشد (۷، ۲۵). در این تحقیق اثر و مقدار ۲ میکرولیتر از مایع بتا آمیلوئید که حاوی ۱۰ میکروگرم پروتئین بود به وسیله ی سرنگ همیلتون درون هیپوکامپ حیوانات تزریق شد. پس از ۲۰ روز پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز حیوانات تشکیل گردید که نتیجه این عمل افزایش معنادار میزان LDL و کلسترول موش و کاهش بیان ژن *APO E* نسبت به رت‌های گروه کنترل گردید.

پاکسازی نواحی مختلف مغز از حضور پپتیدهای آمیلوئید بتا یکی از مهمترین روش‌های درمانی پیشنهاد شده برای آلزایمر است. نشان داده شد که حذف و یا کاهش پلاک‌های آمیلوئیدی از هیپوکمپ موش‌های صحرایی آلزایمری منجر به افزایش حافظه آنها می‌شود. حذف پپتیدهای آمیلوئید بتا توسط کبد و با میانجی گری پروتئین وابسته به رسپتور LDL (LRP-1) از جمله مکانیسم‌های شناخته شده در این زمینه می‌باشد. عمل سلول‌های میکروگلیا در بلع و فاگوسیتوز پپتیدهای آمیلوئید بتا نیز از دیگر روش‌های پاکسازی آمیلوئید بتا در بدن می‌باشد (۱۰، ۳۵، ۳۸).

درمان رت‌های آلزایمری با ویتامین E، تیمولول و عصاره متانولی استخراجی از گیاه آویشن شیرازی باعث کاهش معنادار LDL و توتال کلسترول پلاسما در قیاس با گروه شم (آلزایمری) گردید و همچنین افزایش معنادار *APO E* در قیاس با گروه شم را نشان می‌دهند و تاثیر دیگر عصاره متانولی و تیمولول استخراجی از گیاه آویشن شیرازی افزایش معنادار HDL خون در قیاس با گروه آلزایمری می‌باشد. مطالعات قبلی، تاثیر معنادار ویتامین E بر تنظیم لیپوپروتئین‌های خون را نشان دادند که این فعالیت همزمان با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی است و به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی و طبیعی عمل می‌کند (۱۸، ۲۰، ۳۰).

نتیجه‌گیری

تیمولول و عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی و ویتامین E دارای اثرات مثبتی بر بیان ژن *APOA E* در لوکوسیت‌ها هستند که در این میان تأثیر عصاره متانولی بر بیان ژن مذکور به طور معنی‌داری از دو تیمار دیگر هم بیشتر می‌باشد. از طرفی با تاثیر معنادار بر HDL می‌توان عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی را به عنوان فرآورده‌ای موثر برای پیشگیری و کم کردن عوارض بیماری آلزایمر استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه دانشجویی مقطع دکترا است. از تمام کسانی که حامی این پژوهش بودند کمال تشکر را دارم.

منابع

1. Aliashrafi S., Ebrahimi-Mameghani M., Jafarabadi M.A., Lotfi-Dizaji L., Vaghef-Mehrabany E., Arefhosseini S.R. 2020. Effect of high-dose vitamin D supplementation in combination with weight loss diet on glucose homeostasis, insulin resistance, and matrix metalloproteinases in obese subjects with vitamin D deficiency: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 45(10):1092-1098.

2. Ang L.S., Cruz R.P., Hendel A., Granville D.J. 2008. Apolipoprotein E, an important player in longevity and age-related diseases. *Experimental Gerontology*, 43(7):615-622.

3. Ba M., Kong M., Li X., Ng K.P., Rosa-Neto P., Gauthier S. 2016. Is ApoE ε 4 a good biomarker for amyloid pathology in late onset Alzheimer's disease? *Translational Neurodegeneration*, 5(1):1-4.

4. Babri S., Mohaddes G., Feizi I., Mohammadnia A., Niapour A., Alihemmati A., Amani M. 2014. Effect of troxerutin on synaptic plasticity of hippocampal dentate gyrus neurons in a β-amyloid model of Alzheimer ′s disease: An electrophysiological study. *European Journal of Pharmacology*, 732:19-25.

5. Bagyinszky E., Youn Y.C., An S.S.A., Kim S. 2014. The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, 9:535-551.

6. Boyd M., Tennant S., Melendez J., Toema D., Galen J., Geddes C., Levine M. 2015. Adaptation of red blood cell lysis represents a fundamental breakthrough that improves the sensitivity of S almonella detection in blood. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5):1199-1209.

7. Calkins M.J., Reddy P.H. 2011. Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(4):507-513.

8. Chang T.-Y., Chang C. 2017. ApoE and lipid homeostasis in Alzheimer's disease: introduction to the thematic review series. *Journal of Lipid Research*, 58(5):823-823.

9. De Sanctis V., Soliman A.T., Elsedfy H., Soliman N.A., Elalaily R., El Kholy M. 2016. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: a review in different countries. *Acta Biomedica*, 87(3):233-246.

10. Deane R., Bell R., Sagare A., Zlokovic B. 2009. Clearance of amyloid-β peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS and Neurological Disorders-Drug Targets*, 8(1):16-30.

11. Di Battista M.A., M Heinsinger N., William Rebeck G. 2016. Alzheimer's disease genetic risk factor APOE-ε4 also affects normal brain function. *Current Alzheimer Research*, 13(11): 1200-1207.

12. Farbood Y., Sarkaki A., Dianat M., Khodadadi A., Haddad M.K., Mashhadizadeh S. 2015. Ellagic acid prevents cognitive and hippocampal long-term potentiation deficits and brain inflammation in rat with traumatic brain injury. *Life Sciences*, 124:120-127.

13. Goryacheva A.V., Kruglov S.V., Pshennikova M.G., Smirin B.V., Malyshev I.Y., Barskov I.V., Viktorov I.V., Downey H.F., Manukhina E.B. 2010. Adaptation to intermittent hypoxia restricts nitric oxide overproduction and prevents beta-amyloid toxicity in rat brain. *Nitric Oxide*, 23(4):289-299.

14. Goudarzi m., Satari M., Najar P.S., Goudarzi G.R., Bigdeli M. 2006. Antibacterial effects of aqueous and alcoholic extracts of Thyme on enterohemorrhagic Escherichia coli. *Yafteh*, 3(29):63-69.

15. Hajipour S., Sarkaki A., Farbood Y., Eidi A., Mortazavi P., Valizadeh Z .۲۰۱۶ .

23. Khan I.A., Abourashed E.A. 2011. Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics: John Wiley and Sons.

24. Kim S.R., Choi S.H., Ha C.K., Park S.G., Pyun H.W., Yoon D.H. 2009. Plasma total homocysteine levels are not associated with medial temporal lobe atrophy, but with white matter changes in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Neurology*, 5(2):85-90.

25. Korani M.S., Farbood Y., Sarkaki A., Moghaddam H.F., Mansouri M.T. 2014. Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. *European Journal of Pharmacology*, 733:62-67.

26. Leal N.S., Schreiner B., Pinho C.M ,. Filadi R., Wiehager B., Karlström H., Pizzo P., Ankarcrona M. 2016. Mitofusin-2 knockdown increases ER–mitochondria contact and decreases amyloid β-peptide production. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(9):1686-1695.

27. Lekar A., Borisenko S., Vetrova E., Sushkova S., Borisenko N. 2014. Extraction of quercetin from Polygonum hydropiper L. by subcritical water. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 9(1):1-5.

28. Leo F., Rossodivita A.N., Segni C., Raimondo S., Canichella S., Silvestrini A., Miggiano G.A.D., Meucci E., Mancini A. 2016. Frailty of obese children: evaluation of plasma antioxidant capacity in pediatric obesity. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 124(08):481-486.

29. Leung A.Y. 1980. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics: Wiley Publicaion.

30. Longe A., Momoh J., Adepoju P. 2015. Effects of cinnamon aqueous extract on blood glucose level, liver biomarker enzymes, hematological and lipid profile

Effect of gallic acid on dementia type of Alzheimer disease in rats: electrophysiological and histological studies. *Basic and Clinical Neuroscience*, 7(2):97-106.

16. Halberstein R.A. 2005. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology*, 15(9):686-699.

17. Hamidinia M., Boroujerdnia M.G., Talaiezadeh A., Solgi G., Roshani R., Iranprast S., Khodadadi A. 2015. Increased P-35, EBI3 transcripts and other treg markers in peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients with different clinical stages. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(2):261-267.

18. Hathcock J. 2004. Vitamin and mineral safety. Council for Responsible Nutrition. Washington: CRN Press.

19. Huynh T.-P.V., Davis A.A., Ulrich J.D., Holtzman D.M. 2017. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid-β and other amyloidogenic proteins. *Journal of Lipid Research*, 58(5):824-836.

20. Ibrahim S.A., Sabahelkhier M.K. 2017. Evaluation of the toxic influence of vitamin E (dl-alpha-tocopheryl acetate) and treatment with aqueous extracts of cinnamon or anise on lipid profile and liver functions of female wistar rats. *International Journal of Medicine*, 5(2):248-253.

21. Janel N., Alexopoulos P., Badel A., Lamari F., Camproux A., Lagarde J., Simon S., Feraudet-Tarisse C., Lamourette P., Arbones M. 2017. Combined assessment of DYRK1A, BDNF and homocysteine levels as diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*, 7(6):e1154-e1154.

22. Khanahmadi M., Farhud D.D., Malmir M. 2015. Genetic of Alzheimer's disease: A narrative review article. *Iranian Journal of Public Health*, 44(7):892-901.

parameters in alloxan-induced diabetic male albino rats. *European Scientific Journal*, 11(3):418-426.

31. ۱۹Mehran M., Hoseini H., Hatami A., Taghizade M. 2016. Investigation of components of seven Species of Thyme Essential oils and comparison of their antioxidant properties. *Journal of Medicinal Plants*, 2(58):134-140.

32. Qiu C., Kivipelto M., von Strauss E. 2009. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11(2):111-128.

33. Rabiei Z., Mokhtari S., Asgharzade S., Gholami M., Rahnama S., Rafieian-Kopaei M. 2015. Inhibitory effect of Thymus vulgaris extract on memory impairment induced by scopolamine in rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(10):845-851.

34. Riedel B.C., Thompson P.M., Brinton R.D. 2016. Age, APOE and sex: triad of risk of Alzheimer's disease .*The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160:134-147.

35. Sa'adah N.N., Purwani K.I., Nurhayati A.P.D., Ashuri N.M., 2017. Analysis of lipid profile and atherogenic index in hyperlipidemic rat (Rattus norvegicus Berkenhout, (1769) that given the methanolic extract of Parijoto (Medinilla speciosa). AIP Conference Proceedings, AIP Publishing LLC.

36. Setorki M., Mirzapoor S. 2017. Evaluation of Thymus vulgaris Extract on Hippocampal Injury Induced by Transient Global Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rat. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 19(5):e9216.

37. Whitehouse P.J., Price D.L., Struble R.G., Clark A.W., Coyle J.T., Delon M.R. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215(4537):1237-1239.

38. Wood H. 2015. Scanning ultrasound elicits amyloid-β clearance in mice. *Nature Reviews Neurology*, 11(5):247-247.

Comparative Effect of Timolol and Methanolic Extract of *Zataria multiflora* with Vitamin E on APO E Gene Expression and Behavioral and Biochemical Changes in Alzheimer's Rats

Samira Homayounpour, Maryam Bananej*, Maryam Khosravi, Hengameh Alibeik

Department Biology, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Alzheimer's Disease is the most common form of dementia, characterized by memory and cognitive deficits. Vitamin E, as an antioxidant, plays an important role in reviving free radicals and converting them into safe substances by giving hydrogen. Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) has antibacterial, antifungal and antioxidant properties. The aim of this study is the comparative effect of timolol with methanol extract of *Zataria multiflora* with vitamin E on Alzheimer's disease in male Wistar rats. 40 male Wistar rats weighing approximately 200 grams were randomly divided into 5 groups of eight. Beta-amyloid 42 was used to induce Alzheimer's disease. Then, methanolic and timolol extracts were extracted from *Zataria multiflora*. The level of Apo E gene expression was evaluated by Real Time PCR and TC, LDL and HD biochemical factors. The expression of Apo E gene in the experimental groups increased significantly compared to the Alzheimer's group. The expression of this gene was decreased in the sham group compared to the control group. The group of Alzheimer's mice had a significant increase in total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein (LDL) serum levels, and the level of HDL showed a significant decrease compared to the control group. Timolol, methanolic extract of *Zataria multiflora* and vitamin E have positive effects on the expression of APOA E gene in leukocytes. On the other hand, with a significant effect on HDL, the methanolic extract of *Zataria multiflora* can be used as an effective product to prevent and reduce the complications of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's Disease, Thymolol, Methanolic Extract, *Zataria multiflora*, Vitamin E.