

بررسی اثر تجویز خوراکی فلفل قرمز بر آلزایمر موش‌های صحرائی نر بالغ

مسعود افشاری^{الف}، علی خواجوی^{الف}، منصور کشاورز^{الف}، محسن پرویز^{الف*}

^{الف} گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^ب پژوهشکده علوم شناختی و مغز، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آلزایمر یک بیماری نورودژنراتیو است که مشخصه آن کاهش حافظه و عملکردهای شناختی است. کتاب‌های نگارش شده در زمینه طب سنتی یکی از درمان‌های موثر برای فراموشی را فلفل قرمز ذکر کرده‌اند و در نسخه‌های متعدد طب اسلامی از فلفل قرمز برای درمان فساد ذکر (فراموشی) نام برده می‌شود. هدف از این مطالعه، تعیین اثر فلفل قرمز بر میزان استیل کولین استراز و دانسیته نورونی هیپوکمپ موش‌های صحرائی مبتلا به دمانس (به عنوان عوامل موثر بر بیماری) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ابتدا دوز مناسب فلفل قرمز بدست آمد و سپس ۲۱ راس موش صحرائی نر نژاد ویستار در سه گروه ۷تایی قرار گرفتند که عبارت است از: Sham، آلزایمر-رژیم معمولی و آلزایمر-رژیم فلفل. مدل آلزایمر با استفاده از جراحی استریوتاکس و تزریق استریوتوزوسین القا شد و پس از دریافت رژیم غذایی به مدت سه هفته، میزان استیل کولین استراز و دانسیته نورونی بافت هیپوکمپ در نواحی CA1، CA2 و CA3 بررسی شد. **یافته‌ها:** میزان استیل کولین استراز هیپوکمپ در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه آلزایمر-رژیم معمولی کاهش معنی داری ($p < 0.05$) نشان داد و دانسیته نورونی گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه آلزایمر-رژیم معمولی در نواحی CA1 ($p < 0.05$)، CA2 ($p < 0.01$) و CA3 ($p < 0.01$) افزایش داشت. **نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده نشان دادند که مصرف رژیم غذایی حاوی ده درصد فلفل قرمز توانست اختلال حافظه را در موش‌های نر مدل آلزایمر از طریق کاهش میزان استیل کولین استراز و افزایش دانسیته نورونی اصلاح نماید.

کلیدواژه‌ها: بیماری آلزایمر، فلفل قرمز، دانسیته نورونی، استیل کولین استراز.

تاریخ دریافت: تیر ۹۶

تاریخ پذیرش: آبان ۹۶

مقدمه:

انعکاس احساس شده در آن نقش نمی‌بندد. یا سردی همراه رطوبت است که نقش بسته را نگه نمی‌دارد» (۳).

سازمان بهداشت جهانی میزان شیوع آلزایمر را تا سال ۲۰۱۲ نزدیک به ۳۵/۶ میلیون نفر اعلام کرده است (۴). انتظار می‌رود که این بیماری با افزایش سن جمعیت، بسیار جدی‌تر گردد. ۲-۳٪ افراد ۶۵ ساله مبتلا به این بیماری هستند و با هر ۵ سال افزایش سن از ۶۵ سال احتمال ابتلا به این بیماری دو برابر می‌شود (۵).

مطالعات بسیاری در رابطه با آلزایمر وجود دارد، ولی دلایل و مکانیسم‌های دقیق این بیماری هنوز روشن نیستند و هیچ درمان موثری هنوز در دسترس نیست (۱). بیماری آلزایمر به دو نوع آلزایمر فامیلی و آلزایمر اسپورادیک یا تک گیر تقسیم

بیماری آلزایمر یک اختلال نورودژنراتیو است که مشخصه آن اختلالات حافظه و کاهش استیل کولین استراز و نورون‌های کولینرژیک در هیپوکمپ می‌باشد (۲). اگرچه علایم می‌تواند گوناگون باشد، اولین مشکلی که بسیاری از مردم مشاهده می‌کنند، فراموشی است که بر توانایی عملکرد روزانه آنها تاثیر می‌گذارد (۱، ۲). ابن سینا، طبیبو دانشمند بزرگ ایرانی و اسلامی، بیماری دمانس یا آلزایمر را اینگونه تعریف می‌کند: «منشا بیماری فراموشکاری در قسمت عقب مغز است. زیرا فراموشکاری عبارت از کاهش یافتن کنشی از کنش‌های مغز یا از کار افتادن همه کنش‌ها است. علت اصلی این بیماری غلبه سردی است، خواه سردی ساده یا سردی همراه خشکی که

رژیم معمولی (SAD+Normal Diet) ۳. آلزایمر-رژیم فلفل (SAD+pepper Diet) قرار گرفتند.

القای مدل آلزایمر:

بر اساس مطالعات گذشته (۱۴) حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (60mg/kg) و زایلازین (5mg/kg) بیهوش می-شدند و پوست سر از مجموعه جدا گشته و طبق اطلس پاکسینوس کانول‌هایی در داخل بطن‌های طرفی مغز به مختصات ۰/۸ میلی‌متر خلف برگما، ۱/۵ میلی‌متر سمت راست یا چپ نسبت به شکاف ساجیتال و ۳/۵ میلی‌متر ارتفاع از سطح مجموعه قرار گرفتند. جهت القای مدل آلزایمر مقدار 3mg/kg استرپتوزوتوسین در بافر سیترات (0.5mol/L، pH=4.5) حل خواهد شد و به حجم ۲ میکرولیتر در هر بطن به آهستگی تزریق می‌شود.

روش تهیه غذا:

فلفل قرمز (Capsicum Annuum) از مزرعه‌ای در شهرستان بوکان تهیه شد و به تایید بخش فارماکونوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران از لحاظ نوع و گونه رسید. سپس به میزان ۱۰ درصد با غذای معمولی موش‌ها مخلوط گردید و بصورت آزادانه به مدت سه هفته در اختیار آنها قرار گرفت.

روش اندازه‌گیری فعالیت استیل کولین استراز (AChE) هیپوکمپ:

فعالیت استیل کولین استراز با استفاده از کیت آزمایش استیل کولین استراز Acetylcholinesterase Assay Kit QuntiChrom™ مربوط به شرکت BioAssay System کشور آمریکا، که بر اساس روش ارتقا یافته Ellman تهیه شده بود اندازه‌گیری شد. این روش بر پایه واکنش تیوکولین با اسید ۲-نیتروبنزویک و تشکیل رنگ زرد می‌باشد و شدت رنگ در طول موج ۴۱۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نوری خوانده شد که متناسب با میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در آن نمونه بود.

روش رنگ آمیزی Nissl جهت اندازه‌گیری دانسیته نورونی هیپوکمپ:

می‌شود که نوع اسپورادیک ۹۵ درصد کل آلزایمرها را شامل می‌شود (۶). فرضیات مختلفی از جمله اختلال کولینرژیک و سمیت گلوتاماتی در رابطه با ابتلا به این بیماری مطرح شده است و بر این اساس دو دسته دارو شامل مهارگرهای آنزیم استیل کولین استراز و آنتاگونیست‌های رسپتورهای NMDA می‌باشد ولی با این وجود موفقیت‌های دارو درمانی بسیار محدود می‌باشند (۷،۸).

در منابع طب سنتی و اسلامی بیماری فراموشی (آلزایمر) با عنوان «فساد ذکر» مطرح شده است و برای آن داروهای گیاهی چندی را توصیه و نسخه نموده‌اند که می‌توان به «انواع فلفل، کندر و زنجبیل» اشاره کرد (۹،۱۰). در نسخه‌های متعدد طب سنتی و اسلامی انواع فلفل مکررا به عنوان درمان فساد ذکر مطرح شده است. در مخزن الادویه فلفل بعنوان گیاهی که مقوی حافظه و اعصاب می‌باشد مطرح شده است و در مورد طبیعت آن نیز درجات مختلفی از طبیعت گرم و خشک را قید نموده است. گیاه جایگزین آن را زنجبیل و مصلح آن را عسل مصفی آورده است (۹). همچنین مطالعات گوناگون خواص متعددی را برای فلفل قرمز ذکر کرده‌اند که شامل: «ضد افسردگی، ضد تشنج، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، حفاظت سلولی و بهبود اختلالات شناختی» است (۱۱،۱۲،۱۳).

مطالعه حاضر را با در نظر گرفتن فرضیه اختلال کولینرژیک در آلزایمر و خاصیت آنتی کولین استرازی فلفل قرمز و نیز با توجه به این که در جستجوهای انجام شده در رابطه با اثر فلفل قرمز بر اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از آلزایمر تحقیق مشابهی یافت نشد، انجام دادیم.

مواد و روش‌ها:

این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. ابتدا جهت تعیین دوز فلفل قرمز، ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن 210 ± 40 گرم در ۷ گروه چهارتایی قرار گرفتند و مطابق شرایط استاندارد محیطی نگهداری شدند. پس از مطالعه اولیه و تعیین دوز موثر (۱۰٪) جهت ادامه مطالعه اصلی ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ دیگر در سه گروه شامل: ۱. Sham ۲. آلزایمر-

داد ($p < 0.05$). این متغیر در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه Sham اختلاف معنی داری نشان نداد. محل نمودار ۱ اثر فلفل قرمز بر میزان دانسیته نورون‌های هرمی شکل نواحی CA1، CA2 و CA3 هیپوکمپ نتایج بررسی دانسیته نورون‌های هرمی شکل نواحی CA1، CA2 و CA3 هیپوکمپ در نمودار ۲ تا ۴ نشان داده شده است که بر اساس روش شمارش تعداد نورون‌های سالم در واحد سطح بیان شده است. دانسیته نورونی در گروه آلزایمر-رژیم معمولی نسبت به گروه Sham در هر سه ناحیه CA1، CA2 و CA3 کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.01$). در حالی که این متغیر در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه آلزایمر-رژیم معمولی در ناحیه CA2 و CA3 با $p < 0.01$ و در ناحیه CA1 با $p < 0.05$ افزایش معنی داری نشان داد. دانسیته نورونی در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه Sham در هیچ کدام از مناطق هیپوکمپ اختلاف معنی داری نشان نداد. محل نمودار های ۳ و ۴

بحث و نتیجه‌گیری:

تحقیق نشان داد که بهترین میزان فلفل برای تغذیه موش‌ها ده درصد می‌باشد و میزان بالاتر موجب کاهش شدید وزن و افزایش مرگ و میر آنها خواهد شد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که مصرف خوراکی فلفل قرمز به میزان ده درصد از رژیم غذایی موجب کاهش میزان استیل کولین استراز هیپوکمپ و افزایش معنی دار دانسیته نورونی هر سه ناحیه هیپوکمپ خواهد شد.

Agrawal و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که STZ باعث افزایش فعالیت AChE در مناطق مختلف مغز از جمله هیپوکمپ می‌شود و دانزیپیل که نوعی مهارگر استیل کولین استراز است از طریق مکانیسم‌های آنتی کولین استرازی و آنتی اکسیدانی در پیشگیری از SAD مفید واقع می‌شود (۱۵). در مطالعه حال حاضر نیز STZ موجب افزایش فعالیت استیل کولین استرازی در هیپوکمپ موش‌ها گردید. مطالعه ما نشان داد که مصرف فلفل قرمز می‌تواند باعث کاهش فعالیت AChE در هیپوکمپ شود. مطالعات قبلی نیز در مورد

این روش برای تشخیص اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورون‌های فیکس شده در فرمالین یا پارافرمالدهید و برش‌های بافتی که در پارافین غوطه ور شده‌اند به کار می‌رود و بطور معمول برای تشخیص ساختار پایه نورون‌ها در بافت مغز و نخاع به کار می‌رود و در آن اجسام نیسل رنگ صورتی و بنفش به خود می‌گیرند. مراحل رنگ آمیزی Nissl بصورت زیر است: ۱- خارج کردن مغز و برداشتن نیمه راست ۲- فیکس نمودن بافت در فرمالین ۱۰ درصد، تهیه برش‌های ۲۰ میکرومتری به وسیله میکروتوم. ۳- دهیدراته نمودن برش‌های بافتی در الکل ۱۰۰ درصد (۲بار و هر بار ۵ دقیقه)، الکل ۹۵ درصد و الکل ۷۰ درصد ۴- شست و شو با آب شیر و سپس با آب مقطر ۵- رنگ نمودن برش در محلول Cresyl Violet به مدت ۱۰-۳ دقیقه ۶- آب کشی سریع با آب مقطر ۷- قرار دادن در الکل اتیل ۹۵ درصد به مدت ۳-۲ دقیقه و کنترل میکروسکوپی برای حصول بهترین نتیجه ۸- دهیدراته نمودن در الکل ۱۰۰ درصد ۲ تا ۵ دقیقه ۹- قرار دادن Coverslip ۱۰- مشاهده و عکس برداری بوسیله میکروسکوپ و شمارش نورون‌ها در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این مطالعه کلیه نتایج بصورت Mean±SEM گزارش شد. جهت مقایسه داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و پس از آن در صورت وجود اختلاف معنی دار از تست تکمیلی Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) استفاده شد و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

اثر فلفل قرمز بر فعالیت استیل کولین استراز هیپوکمپ نتایج بررسی میزان استیل کولین استراز در نمودار ۱ نشان داده شده است. مقایسه گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که میزان فعالیت استیل کولین استراز در گروه آلزایمر-رژیم معمولی نسبت به گروه Sham افزایش معنی داری داشت ($p < 0.05$) در حالی که این متغیر در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه آلزایمر-رژیم معمولی کاهش معنی داری نشان

دیده شد که می‌تواند موجب کاهش نورودژنراسیون و افزایش دانسیته نورونی در مدل آلزایمری گردد (۲۲). در مطالعه حال حاضر نشان داده شد که فلفل قرمز موجب کاهش نورودژنراسیون نورونی در بافت هیپوکمپ می‌شود و این پیشگیری احتمالاً مربوط به آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی می‌باشد و مطالعات بیشتری برای شناخت مکانیسم دقیق آن مورد نیاز است.

نسخه‌های متعدد طب سنتی و اسلامی انواع فلفل را مکرراً به عنوان درمان فساد ذکر (فراموشی) توصیه کرده‌اند و مقالات جدید نیز خواص متعددی از آن را نشان داده‌اند. این مطالعه نشان داد که فلفل قرمز می‌تواند موجب بهبود حافظه و یادگیری در موش‌ها و کاهش عوارض آلزایمر گردد که خود تاییدی بر اهمیت طب سنتی و نسخه‌های آن می‌باشد.

تداخل عمل انواع فلفل و از جمله فلفل قرمز با سیستم‌های کولینرژیک در مغز و دیگر بخش‌های بدن موید این مطلب می‌باشد چرا که بیان شده است که ماده موثره فلفل قرمز (کپسایسین) موجب تعدیل عملکرد کولین استراز می‌شود (۱۶). همچنین کپسایسین می‌تواند رهایش استیل کولین را نیز تحریک کند (۱۳). بنابراین فلفل قرمز نیز که حاوی همان ماده در ساختار خود است نیز می‌تواند باعث کاهش استیل کولین استراز در هیپوکمپ و بهبود فرایند حافظه گردد.

مطالعات گذشته نشان دادند که STZ موجب نورودژنراسیون و کاهش دانسیته نورونی هیپوکمپ در تزریق داخل بطنی مغز می‌شود (۱۷) که این موضوع نیز در مطالعه ما نشان داده شد. مطالعات نشان داده‌اند که فلفل قرمز دارای خواص فیزیولوژیکی و فارماکولوژی گسترده‌ای است که می‌توان به خواص ضد میکروبی، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، کاهش وزن و لیپولیز و معالجه سوءهاضمه نام برد (۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱). در مورد دیگر گونه‌های فلفل مانند فلفل سیاه

References:

1. Kihara T, Shimohama S. Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *ActaNeurobiolExp (Wars)*. 2004;64(1):99-105.
2. Heppner FL, Gandy S, McLaurin J. Current concepts and future prospects for Alzheimer disease vaccines. *Alz Dis Assoc Dis*. 2004;18(1):38—43.
3. M. Azma, M. Karimi, A. Akbari kamrani, F. Gharat, G. Ansari, R. sahaf. Prevention and Treatment of Memory and Cognitive Disorders in Traditional Medicine: a Review Study. *Journal of Islamic and Iranian traditional medicine*. 2014, 1(5): 10-20
4. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature ReviewNeurology*. 2011;7(3): 137-52.
5. Gorelick PB. Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke*. 2004 Nov;35(11 Suppl 1):2620-2
6. Koro C, Barrett S, Qizilbash N. Cancer risks in thiazolidinedione users compared to other anti-diabetic agents. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2007; 16(5):485-92.
7. Terry AV, Jr., Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease—related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J PharmacolExpTher*. 2003;306(3):821-7,
8. Qizilbash N, Birks J, Lopez Arrieta J, Lewington S, Szeto S. Tacrine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(3).
9. MH Aghili. *Makhzan-al-Advia (Persian)*, Tehran University of Medical Sciences, Tehran (2009). 728-731
10. Avicenna (Abu Ali Sina). *Ghanoon dar teb [Canon of medicine]*, Abdolrahman Sharafkandi (trans.). Tehran: Soroush Publications. 1984. 118-120
11. D'Hooge R, Pei YQ, R365 A, chrun P, van Bogaert PP, de Deyn PP. Anticonvulsant activity of piperine on seizures induced by excitatory amino acid receptor agonists. *Arzneimittelforschung*. 1996;46(6):557-60.
12. Selvendiran K, Singh JP, Krishnan KB, Sakthisekaran D. Cytoprotective effect of piperine against benzo[a]pyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in Swiss albino mice. *.Fitoterapia*. 2003;74(11-2):109—15.
13. Bai YF, Xu H. Protective action of piperine against experimental gastric ulcer. *ActaPharmacol Sin*. 2000;21(4):357-9.
14. Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. *Journal of Neuroimmunology*. 2013;254(1—2):1—9.
15. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology*. 2009;56(4):779-87.
16. Orhan I, Naz Q, Kartal M, Tosun F, Sener B, Choudhary MI. In vitro anticholinesterase activity of various alkaloids. *Z Naturforsch C*. 2007; 62(9-10):684-8.
17. Santos TdO, Mazucanti CHY, Xavier GF, Torra'io AdS. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiology & Behavior*. 2012;107(3):401-13.
18. Spiller F, Alves MK, Vieira SM, Carvalho TA, Leite CE, Lunardelli A, et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(4):473-8. “
19. Jeong SH, Lee H, Jung JY, Lee SH, Seo HY, Park WS, et al. Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2013;160(3):252.,9-

20. Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, et al. Antiobesity effect of Kochujang (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3—L1 adipocytes. *J Med Food*. 2006;9(1):15-21.
21. Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem*. 2002;50(23):6910-6.
22. Chonpathompikunlert P, Wattanathom J, Muchimapura S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(3):798-802,