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

مسعود افشاری[الف و ب]، علی خواجوی[الف]، منصور کشاورز[الف]، محسن پرویز[الف*]

[الف]گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[ب]پژوهشکدهٔ علوم شناختی و مغز، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آلزایمر یک بیماری نورودژنراتیو است که مشخصهٔ آن کاهش حافظه و عملکردهای شناختی است. کتاب‌های نگارش شده در زمینهٔ طب سنتی یکی از درمان‌های مؤثر برای فراموشی را فلفل قرمز ذکر کرده‌اند و در نسخه‌های متعدد طب اسلامی از فلفل قرمز برای درمان فساد ذکر (فراموشی) نام برده شده است. هدف از این مطالعه، تعیین اثر فلفل قرمز بر میزان استیل‌کولین استراز و دانسیتهٔ نورونی هیپوکمپ موش‌های صحرایی مبتلا به دمانس (به‌عنوان عوامل مؤثر بر بیماری) است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ابتدا دوز مناسب فلفل قرمز به دست آمد و سپس ۲۱ رأس موش صحرایی نر نژاد ویستار در سه گروه ۷ تایی قرار گرفتند که عبارت است از: Sham، آلزایمر-رژیم معمولی و آلزایمر-رژیم فلفل. مدل آلزایمر با استفاده از جراحی استریوتاکس و تزریق استرپتوزوسین القا شد و پس از دریافت رژیم غذایی به مدت سه هفته، میزان استیل‌کولین استراز و دانسیتهٔ نورونی بافت هیپوکمپ در نواحی CA1، CA2 و CA3 بررسی شد.

یافته‌ها: میزان استیل‌کولین استراز هیپوکمپ در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه آلزایمر-رژیم معمولی کاهش معنی‌داری ($p<0.05$) نشان داد و دانسیتهٔ 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 به دست 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 استیل‌کولین استراز و افزایش دانسیتهٔ نورونی اصلاح کند.

کلیدواژه‌ها: بیماری آلزایمر، فلفل قرمز، دانسیته نورونی، استیل‌کولین استراز.

تاریخ دریافت: تیر ۹۶
تاریخ پذیرش: آبان ۹۶

مقدمه:

بیماری آلزایمر یک اختلال نورودژنراتیو است که مشخصهٔ آن اختلالات حافظه و کاهش استیل‌کولین استراز و نورون‌های کولینرژیک در هیپوکمپ است. اگرچه علائم می‌تواند گوناگون باشد، اولین مشکلی که بسیاری از مردم مشاهده می‌کنند، فراموشی است که بر توانایی عملکرد روزانهٔ آنها تأثیر می‌گذارد (۱، ۲). ابن‌سینا، طبیب و دانشمند بزرگ ایرانی و اسلامی، بیماری دمانس یا آلزایمر را این‌گونه تعریف می‌کند: «منشأ بیماری فراموشکاری در قسمت عقب مغز است. زیرا فراموشکاری عبارت از کاهش یافتن کنشی از کنش‌های مغز یا از کار افتادن همهٔ کنش‌هاست. علت اصلی این بیماری غلبهٔ سردی است، خواه سردی ساده یا سردی همراه خشکی که 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 شود. 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 مؤثری هنوز در دسترس نیست (۱). بیماری آلزایمر به دو نوع آلزایمر فامیلی و آلزایمر اسپورادیک یا تک‌گیر تقسیم

* فرد مسئول مکاتبات: parvizmo@tums.ac.ir

می‌شود که نوع اسپورادیک ۹۵ درصد کل آلزایمرها را شامل می‌شود (۶). فرضیات مختلفی از جمله اختلال کولینرژیکی و سمیت گلوتاماتی در رابطه با ابتلا به این بیماری مطرح شده است و بر این اساس دو دسته دارو شامل مهارگرهای آنزیم استیل‌کولین استراز و آنتاگونیست‌های رسپتورهای NMDA است ولی با این وجود موفقیت‌های دارو درمانی بسیار محدود هستند (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 تجویز کرده‌اند که می‌توان به «انواع فلفل، کندر و زنجبیل» اشاره کرد (۹، ۱۰). در نسخه‌های متعدد طب سنتی و اسلامی انواع فلفل مکرراً به‌عنوان درمان فساد ذکر مطرح شده است. در مخزن الادویه فلفل به‌عنوان گیاهی که مقوی حافظه و اعصاب است مطرح شده است و در مورد طبیعت آن نیز درجات مختلفی از طبیعت گرم و خشک را قید کرده‌اند. گیاه جایگزین آن را زنجبیل و مصلح آن را عسل مصفی ذکر کرده‌اند (۹). همچنین در 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 (۱۳، ۱۲، ۱۱).

مطالعهٔ حاضر را با در نظر گرفتن فرضیهٔ اختلال کولینرژیکی در آلزایمر و خاصیت آنتی‌کولین استرازی فلفل قرمز و نیز با توجه به این‌که در جستجوهای انجام‌شده در رابطه با اثر فلفل قرمز بر اختلال یادگیری و حافظهٔ فضایی ناشی از آلزایمر تحقیق مشابهی یافت نشد، انجام دادیم.

مواد و روش‌ها:

این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. ابتدا به‌منظور تعیین دوز فلفل قرمز، ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۴۰±۲۱۰ گرم در ۷ گروه چهارتایی قرار گرفتند و مطابق شرایط استاندارد محیطی نگهداری شدند. پس از مطالعهٔ اولیه و تعیین دوز مؤثر (۱۰٪) به‌منظور ادامهٔ مطالعه اصلی ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ دیگر در سه گروه شامل: ۱. Sham ۲. آلزایمر–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 می‌شدند و پوست سر از جمجمه 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 جمجمه قرار گرفتند. به‌منظور 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 تأیید بخش فارماکوگنوزی دانشکدهٔ داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران از لحاظ نوع و گونه رسید. سپس به میزان ۱۰ درصد با غذای معمولی موش‌ها مخلوط شد و به‌صورت آزادانه به مدت سه هفته در اختیار آنها قرار گرفت.

روش اندازه‌گیری فعالیت استیل‌کولین استراز (AChE) هیپوکمپ:

فعالیت استیل‌کولین استراز با استفاده از کیت آزمایش استیل‌کولین استراز Acetylecholinestrase Assay Kit QuntiChromTM مربوط به شرکت BioAssay System کشور امریکا، که بر اساس روش ارتقا یافته Ellman تهیه شده بود اندازه‌گیری شد. این روش بر پایهٔ واکنش تیوکولین با اسید ۲–نیتروبنزوییک و تشکیل رنگ زرد است و شدت رنگ در طول موج ۴۱۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نوری خوانده شد که متناسب با میزان فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در آن نمونه بود.

روش رنگ‌آمیزی Nissl به‌منظور اندازه‌گیری دانسیتهٔ نورونی هیپوکمپ:

این روش برای تشخیص اجسام نیسل در سیتوپلاسم نورون‌های فیکس‌شده در فرمالین یا پارافرمالدهید و برش‌های بافتی که در پارافین غوطه‌ور شده‌اند به کار می‌رود و به‌طور 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 رنگ‌آمیزی Nissl به‌صورت زیر است: ۱- خارج کردن مغز و برداشتن نیمهٔ راست ۲- فیکس کردن بافت در فرمالین ۱۰ درصد، تهیهٔ برش‌های ۲۰ میکرومتری به‌وسیلهٔ میکروتوم. ۳- دهیدراته کردن برش‌های بافتی در الکل ۱۰۰ درصد (۲بار و هر بار ۵ دقیقه)، الکل ۹۵ درصد و الکل ۷۰ درصد ۴- شست‌وشو با آب شیر و سپس با آب مقطر ۵- رنگ کردن برش در محلول Cresyl Violet به مدت ۱۰-۳ دقیقه ۶- آب‌کشی 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 کردن در الکل ۱۰۰ درصد ۲ تا ۵ دقیقه ۹- قرار دادن Coverslip ۱۰- مشاهده و عکس‌برداری به‌وسیلهٔ میکروسکوپ و شمارش نورون‌ها در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

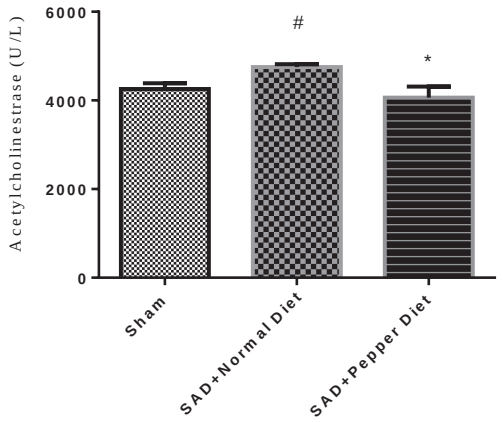
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این مطالعه کلیهٔ نتایج به‌صورت Mean±SEM گزارش شد. به‌منظور مقایسهٔ داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و پس از آن در صورت وجود اختلاف معنی‌دار از تست تکمیلی Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) استفاده شد و $p<0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

اثر فلفل قرمز بر فعالیت استیل‌کولین استراز هیپوکمپ

نتایج بررسی میزان استیل‌کولین استراز در نمودار ۱ نشان داده شده است. مقایسه گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که میزان فعالیت استیل‌کولین استراز در گروه آلزایمر-رژیم معمولی نسبت به گروه Sham افزایش معنی‌داری داشت ($p<0.05$) در حالی‌که این متغیر در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه آلزایمر-رژیم معمولی کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<0.05$). این متغیر در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه Sham اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



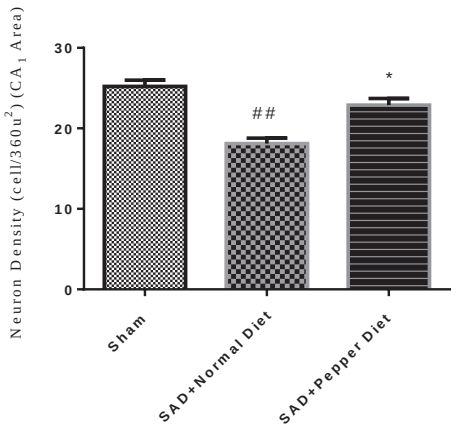
نمودار۱: مقایسهٔ میزان استیل‌کولین استراز هیپوکمپ در سه گروه Sham، SAD+Normal Diet و SAD+pepper Diet(10%)

*مقایسه با گروه SAD+Normal Diet با سطح معنی‌داری ($p<0.05$)

#مقایسه با گروه Sham با سطح معنی‌داری ($p<0.05$)

اثر فلفل قرمز بر میزان دانسیتهٔ نورون‌های هرمی‌شکل نواحی CA1، CA2 و CA3 هیپوکمپ

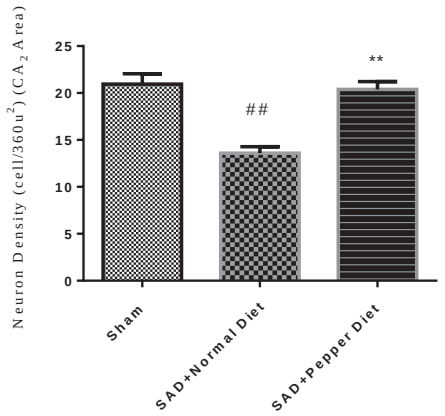
نتایج بررسی دانسیتهٔ نورون‌های هرمی‌شکل نواحی CA1، CA2 و CA3 هیپوکمپ در نمودار ۲ تا ۴ نشان داده شده است که بر اساس روش شمارش تعداد نورون‌های سالم در واحد سطح بیان شده است. دانسیتهٔ نورونی در گروه آلزایمر-رژیم معمولی نسبت به گروه Sham در هر سه ناحیه CA1، CA2 و CA3 کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<0.01$). در حالی‌که 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 معنی‌داری نشان داد. دانسیتهٔ نورونی در گروه آلزایمر-رژیم فلفل نسبت به گروه Sham در هیچ‌کدام از مناطق هیپوکمپ اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



نمودار۲: مقایسهٔ میزان دانسیتهٔ نـورونی هیپوکمـپ (CA1) در سـه گـروه Sham، SAD+Normal Diet و SAD+pepper Diet(10%)

*مقایسه با گروه SAD+Normal Diet با سـطح معنـی‌داری (p<0.05)

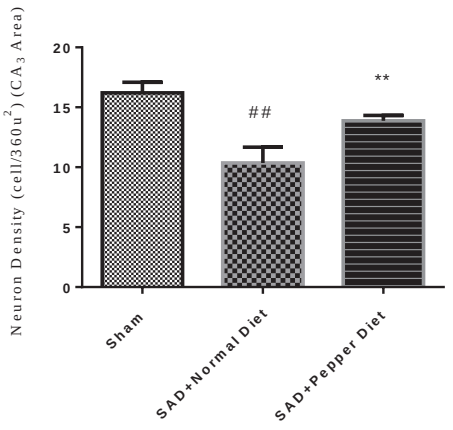
##مقایسه با گروه Sham با سطح معنی‌داری (*p*<0.01)



نمودار۳: مقایسهٔ میزان دانسیتهٔ نـورونی هیپوکمـپ (CA2) در سـه گـروه Sham، SAD+Normal Diet و SAD+pepper Diet(10%)

**مقایسه با گـروه SAD+Normal Diet بـا سـطح معنـی‌داری (p<0.01)

##مقایسه با گروه Sham با سطح معنی‌داری (p<0.01)



نمودار۴: مقایسهٔ میزان دانسیتهٔ نـورونی هیپوکمـپ (CA3) در سـه گـروه Sham، SAD+Normal Diet و SAD+pepper Diet(10%)

**مقایسه با گـروه SAD+Normal Diet بـا سـطح معنـی‌داری (p<0.01)

##مقایسه با گروه Sham با سطح معنی‌داری (*p*<0.01)

بحث و نتیجه‌گیری:

تحقیق نشان داد که بهترین میزان فلفل برای تغذیهٔ موش‌هـا ده درصد است و میـزان بـالاتر موجـب کـاهش شـدید وزن و افزایش مرگ‌ومیر آنها خواهد شد. در مطالعهٔ حاضر نشـان داده شد که مصرف خوراکی فلفل قرمز به میزان ده درصد از رژیـم غذایی موجب کاهش میزان اسـتیل‌کـولین اسـتراز هیپوکمـپ و افزایش معنی‌دار دانسیتهٔ نورونی هر سه ناحیهٔ هیپوکمپ خواهد شد.

Agrawal و همکـاران در مطالعـه‌ای در سـال ۲۰۰۹ نشـان دادند که STZ باعث افزایش فعالیت AChE در مناطق مختلـف مغز از جمله هیپوکمپ می‌شـود و دانزپیـل کـه نـوعی مهـارگر استیل‌کولین استراز است از طریـق مکانیسـم‌هـای آنتـی‌کـولین استرازی و آنتـی‌اکسـیدانی در پیشـگیری از SAD مفیـد واقـع می‌شـود (۱۵). در مطالعـهٔ حاضـر نیـز STZ موجـب افـزایش فعالیت استیل‌کولین استرازی در هیپوکمپ موش‌ها شد. مطالعهٔ ما نشان داد که مصـرف فلفـل قرمـز مـی‌توانـد باعـث کـاهش فعالیت AChE در هیپوکمپ شود. مطالعات قبلی نیـز در مـورد تداخل عمل انواع فلفل و از جمله فلفل قرمـز بـا سیسـتم‌هـای

کولینرژیک در مغز و دیگر بخش‌های بدن مؤید این مطلب است چرا که بیان شده است که ماده مؤثرهٔ فلفل قرمز (کپسایسین) موجب تعدیل عملکرد کولین استراز می‌شود (۱۶). همچنین کپسایسین می‌تواند رهایش استیل‌کولین را نیز تحریک کند (۱۳). بنابراین فلفل قرمز نیز که حاوی همان ماده در ساختار خود است می‌تواند باعث کاهش استیل‌کولین استراز در هیپوکمپ و بهبود فرآیند حافظه شود.

مطالعات گذشته نشان دادند که STZ موجب نورودژنراسیون و کاهش دانسیتهٔ نورونی هیپوکمپ در تزریق داخل بطنی مغز می‌شود (۱۷) که این موضوع نیز در مطالعهٔ 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 معالجهٔ سوءهاضمه نام برد (۲۱، ۲۰، ۱۹، ۱۸). در مورد دیگر گونه‌های فلفل مانند فلفل سیاه دیده شد که می‌تواند موجب کاهش نورودژنراسیون و افزایش دانسیتهٔ نورونی در مدل آلزایمری شود (۲۲). در مطالعهٔ حال حاضر نشان داده شد که فلفل قرمز موجب کاهش نورودژنراسیون نورونی در بافت هیپوکمپ می‌شود و این پیشگیری احتمالاً مربوط به اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است و مطالعات بیشتری برای شناخت مکانیسم دقیق آن مورد نیاز است.

نسخه‌های متعدد طب سنتی و اسلامی انواع فلفل را مکرراً به‌عنوان 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 شود که خود تأئیدی بر اهمیت طب سنتی و نسخه‌های آن است.

References:

1. Kihara T, Shimohama S. Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. Acta neurobiologiae experimentalis. 2004 Jan 1;64(1):99-106.
2. Heppner FL, Gandy S, McLaurin J. Current concepts and future prospects for Alzheimer disease vaccines. Alzheimer Disease & Associated Disorders. 2004 Jan 1;18(1):38-43.
3. M. Azma, M. Karimi, A. Akbarikamrani, 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 Reviews Neurology. 2011 Mar;7(3):137.
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. Pharmacoepidemiology and drug safety. 2007 May 1;16(5):485-92.
7. Terry AV, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2003 Sep 1;306(3):821-7.
8. Qizilbash N, Birks J, Lopez Arrieta J, Lewington S, Szeto S. Tacrine for Alzheimer'sdisease. Cochrane Database Syst Rev. 2007(3).
9. Aghili Alavi MH. *Makhzan-al-Advia*. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2009.
10. Avicenna. *Al Qanun fi al-Tibb* [The Canon of medicine]. Tehran: Soroush Publications. 1984. 118-120.
11. D'Hooge R, Pei YQ, Raes A, Lebrun P. Anticonvulsant activity of piperine on seizures induced by excitatory amino acid receptor agonists. Arzneimittel-Forschung. 1996 Jun;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 Feb 1;74(1-2):109-15.
13. Bai YF, Xu H. Protective action of piperine against experimental gastric ulcer. Acta Pharmacologica Sinica. 2000 Apr;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 Jan 15;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 Mar 1;56(4):779-87.
16. Orhan I, Naz Q, Kartal M, Tosun F, Şener B. In vitro anticholinesterase activity of various alkaloids. Zeitschrift für Naturforschung C. 2007 Oct 1;62(9-10):684-8.
17. de Oliveira Santos T, Mazucanti CH, Xavier GF, da Silva Torrão A. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. Physiology & behavior. 2012 Oct 10;107(3):401-13.
18. Spiller F, Alves MK, Vieira SM, Carvalho TA, Leite CE, Lunardelli A, Poloni JA, Cunha FQ, de Oliveira JR. Anti-inflammatory effects of red pepper (Capsicum baccatum) on carrageenan-and antigen-induced inflammation. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2008 Apr;60(4):473-8.
19. Jeong SH, Lee HJ, Jung JY, Lee SH, Seo HY, Park WS, Jeon CO. Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. International journal of food microbiology. 2013 Jan 1;160(3):252-9.
20. Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim H, et al. Antiobesity effect ofKochujang (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3—L1 adipocytes. JMed Food. 2006;9(l):15-21.
21. Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of commonvegetables. J Agric Food Chem. 2002;50(23):6910-6.
22. Chonpathompikunlert P, Wattanathom J, Muchimapura S. Piperine, the mainalkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegenerationandcognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition ofAlzheimer’s disease. Food and Chemical Toxicology. 2010;48(3):798-802.