ORIGINAL ARTICLE

Neuroprotective Effect of Nigella sativa Essential Oil against Experimental Demyelination through Regulation of Endogenous Fatty Acid Levels in Rat Spinal Cord Tissue

Nafieseh Sadat Mirshafieyan[1],
Majid Hassanpour-ezatti[2],
Hossein Dehghan[3]

[1] MSc in Animal Physiology, School of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

(Received May 21, 2022 ; Accepted September 17, 2022)

Abstract

Background and purpose: Myelin degradation is one of the main causes of some neurological diseases. There is growing evidence that plant essential oils may reduce the risk of demyelination. In this experimental study, using a lipidomics approach, we investigated whether administration of *Nigella sativa* (NS) essential oil could improve changes in the profile of spinal fatty acids in demyelination model induced by intra-spinal administration of ethidium bromide (EB) in mice.

Materials and methods: In this experimental study, 30 male rats were studied in five groups (n=6). The groups included control without treatment, solvent, and black seed essential oil (2, 5, and 10 ml/kg, intraperitoneally). The essential oil of NS was prepared and its fatty acid composition was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The animals underwent intra-spinal administration of ET 0.2%. At the end of the experiments, samples were taken from the spinal cord of the rats and the concentration of seven different types of fatty acids in the homogenate of the spinal cord was measured and compared between the groups.

Results: Ethidium bromide disturbed the normal concentration of polyunsaturated fatty acids, increased arachidonic acid derivatives, and decreased docosahexaenoic acid in rat spinal cord. Treatment with NS essential oil significantly prevented these changes in a dose-dependent manner ($P<0.01$).

Conclusion: NS essential oil protects against EB-induced demyelination by regulating the level of endogenous fatty acids in spinal tissue.

Keywords: *Nigella sativa*, ethidium bromide, demyelination, spinal cord

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (214): 55-64 (Persian).

Corresponding Author: Majid Hassanpour-ezatti - School of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.
(E-mail: : hassanpour@shahed.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره ۲۱۴ آبان سال ۱۴۰۱ (۶۴-۵۵)

اثر محافظت عصبی اسانس سیاهدانه در برابر دمیلینه تجربی از طریق تنظیم سطح اسیدهای چرب درون زا در بافت نخاع موش های صحرائی

نفیسه السادات میرشفیعیان[1]
مجید حسن پورعزتی[2]
حسین دهقان[3]

چکیده

سابقه و هدف: تخریب میلین یکی از علل اصلی بیماری‌های عصبی متنوع است. شواهد زیادی وجود دارد که تجویز اسانس‌های گیاهی ممکن است خطر دمیلیناسیون را کاهش دهد. در این مطالعه، با استفاده از یک رویکرد لیپیدمی، تجویز اسانس سیاه دانه، *Nigella sativa* (NS) بر بهبود تغییرات پروفایل اسیدهای چرب نخاعی در مدل دمیلیناسیون ناشی از تجویز داخل نخاعی اتیدیوم بروماید (EB) در موش‌های صحرائی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر در قالب ۵ گروه (n=۶) مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه‌ها به کنترل بدون درمان، دریافت کننده حلال، درمان شده با دوزهای (۲، ۵ و ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم داخل صفاقی) از اسانس سیاه دانه تقسیم بندی شدند. اسانس سیاه دانه تهیه و ترکیب اسیدهای چرب آن توسط کروماتوگرافی گازی–اسپکترومتری جرمی (GC-MS) تعیین شد. موش‌های بزرگ نر بالغ نژاد ویستار تحت تجویز داخل نخاعی EB ۰/۲درصد قرار گرفتند. از نخاع موش‌ها نمونه‌برداری شد و غلظت هفت نوع مختلف از اسیدهای چرب در هموژنای نخاع بین گروه ها مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: تجویز EB باعث برهم خوردن غلظت طبیعی محتوای اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه، افزایش مشتقات اسید آراشیدونیک و کاهش اسید چرب دوکوزاهگزانوئیک اسید در نخاع موش‌ها شد. درمان با اسانس سیاه دانه به صورت معنی دار($P<۰/۰۱$) و وابسته به دوز از بروز این تغییرات ممانعت کرد.

استنتاج: استفاده از اسانس NS سبب محافظت در مقابل دمیلیناسیون ناشی از EB از طریق تنظیم سطح اسیدهای چرب درون‌زاد بافت نخاعی می‌شود.

واژه های کلیدی: سیاه دانه، اتیدیوم بروماید، دمیلیناسیون، نخاع

مقدمه

در دهه اخیر، ارزیابی پدیده تحلیل میلین اکتسابی در سیستم عصبی مرکزی نرخ رو به افزایشی را در جوامع مختلف نشان داده است(۱). در حال حاضر، مکانیسم‌های زیربنایی ایجادکننده چنین آسیب‌های بافتی به خوبی درک نشده‌اند، اما یکی از پیشنهادات مطرح در این ارتباط تغییر در محتوی و نسبت اسیدهای چرب

مولف مسئول: مجید حسن پور عزتی–تهران: بزرگراه خلیج فارس (تهران–قم)، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه E-mail: hassanpour@shahed.ac.ir
۱. کارشناس ارشد زیست شناسی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۱/۲/۳۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۱/۴/۵ تاریخ تصویب : ۱۴۰۱/۶/۲۶

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

تشکیل‌دهنده ساختار میلین در نخاع به دنبال فعال شدن عوامل القاکننده تحلیل میلین است(۲).

بنابراین درمان با ترکیبات موثر بر محتوای اسیدهای چرب سیستم عصبی مرکزی، می‌تواند یک راهکار درمانی در مقابل شرایط تحلیل برنده میلین باشد(۳). با این حال، هنوز جای بحث است که آیا الگوهای خاصی از تغییرات در اسیدهای چرب در این بیماری رخ می‌دهد یا خیر؟ آیا باز گردندان این تغییرات به شرایط اولیه اصلا امکان پذیر است؟ و آیا ارزیابی تغییرات رخ داده در شرایط مشابه با این بیماری یا دوره درمان می‌تواند ارزش تشخیصی یا درمانی در بیماری‌های تحلیل برنده میلین داشته باشد؟ امروزه محققان علوم پایه به کمک تزریق مستقیم ترکیب اتیدیوم برماید (Ethidium Bromide) یا به اختصار (EB) به درون نخاع یک مدل حیوانی ساده برای القا تخریب پوشش میلین آکسون‌های سلول‌های عصبی ابداع کرده‌اند که به کمک آن می‌توان فرایندهای تخریب و باز سازی میلین و اثر ترکیبات درمانی را به شکل تجربی بر این پدیده‌ها مورد مطالعه قرار داد(۴). این مدل به‌طور گسترده‌ای به عنوان یک مدل تحلیلی میلین در موش صحرائی مورد استفاده واقع می‌شود(۵).

از مکانیسم‌های پیشنهاد شده در ارتباط با بروز تحلیل میلین به صورت اکتسابی مطرح شده است که عوامل استرس اکسیداتیو، از طریق القا پراکسیداسیون در اسیدهای چرب ساختار میلین آکسون نورون‌های نخاعی سبب تشدید تولید و رهایش رادیکال‌های آزاد و محصولاتی می‌شوند که به نوبه خود منجر به آسیب یا تخریب بیش‌تر میلین می‌گردند(۶). نخاع به دلیل محتوای بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه، سیستم دفاعی آنتی اکسیدان ناکافی و تراکم بالایی از میتوکندری‌ها در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر می‌باشد(۹-۷). به عنوان مثال تغییر در متابولیسم چربی‌های نخاع مرتبط با اسکلروز جانبی آمیوتروفیک، به عنوان یک علامت آسیب به نخاع در بیماران مبتلا به این بیماری مطرح شده است(۱۰). گرچه تاکنون بر اساس مستندات موجود درمان یا پیشگیری قطعی و مشخصی برای بیماری‌های تحلیل برنده میلین در دست نمی‌باشد، ولی گزارش شده است که مصرف منظم روغن‌های طبیعی با کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های تخریب کننده میلین همراه بوده است(۱۱). گیاه سیاه دانه Black Cumin با نام علمی (*Nigella sativa*) از خانواده Ranunculaceae متعلق به منطقه خاورمیانه به خصوص ایران پتانسیل درمانی شناخته شده‌ای در درمان بیماری‌های عصبی از خود نشان داده است(۱۲). عصاره، اسانس و روغن به دست آمده از این گیاه در طب سنتی ایران کاربرد گسترده‌ای دارند(۱۳). گرچه سازوکار اثرات مفید اسانس این گیاه مشخص نشده است، اما تقویت مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و مهار تولید رادیکال‌های آزاد توسط اسانس سیاه دانه گزارش شده است(۱۵،۱۴). به تازگی گزارش شده است که ترکیبات موثره موجود در روغن‌های گیاهی اثرات مفیدی بر تنظیم سنتر میلین دارا می باشند(۱۶). این امر سوال اصلی این مطالعه را شکل داده است که آیا مصرف اسانس سیاه دانه می‌تواند اثر پیشگیری‌کننده‌ای بر تخریب میلین در مدل آزمایشگاهی القا تخریب میلین توسط EB داشته باشد.

در این مطالعه، ابتدا به بررسی تغییرات نیمرخ اسیدهای چرب بافت نخاعی در شرایط القا دمیلیناسیون ناشی از تزریق داخل نخاعی EB در موش پرداخته و سپس به ارزیابی اثرات تجویز داخل صفاقی اسانس سیاه دانه در این مدل پرداخته شده است.

مواد و روش ها

ماده گیاهی

بذرهای سیاه دانه از فروشگاه گیاهان داروئی شهر ری خریداری شدند و به تایید متخصص گیاه شناسی رسیدند. استاندارد خالص تیموکیئینون ۹۹درصد، متانول وهگزان نرمال با درجه خلوص کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا از شرکت سیگما خریداری شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

آماده سازی دانه‌های سیاه دانه

بذرهای سیاه دانه با آب شیر و آب مقطر تمیز شسته شدند و در فر با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت نگهداری و کاملا خشک شدند. بذرهای خشک شده در نهایت آسیاب شدند.

استخراج اسانس بذر سیاه دانه

ابتدا روغن سیاه دانه با استفاده از روش پرس سرد استخراج شد. سپس اسانس سیاه دانه بر اساس روش پیشنهادی Wajs و همکاران تهیه شد(۱۷). برای این منظور، ابتدا روغن دانه‌های خرد شده به کمک حلال هگزان استخراج شد. سپس با حذف حلال، باقیمانده قهوه‌ای رنگ آن تحت بخار تقطیر شد. در نهایت اسانس سیاه دانه به کمک دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) و به روش هیدرودیستلاسیون (hydrodistillation) تهیه شد.

ارزیابی اسیدهای چرب نخاع به کمک کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی

شناسایی ترکیب اسیدهای چرب روغن سیاه دانه استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی گازی (Agilent 7890B) مجهز به آشکارساز طیف سنجی جرمی (Agilent A5977) و ستون به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر (HP-5MS) انجام شد. هلیوم به عنوان گاز حامل (۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه) استفاده شد. دمای محفظه تزریق و بخش interface به‌ترتیب ۲۵۰ و ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شدند. دمای آون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد. انرژی یونیزاسیون در دتکتور بر روی ۷۰ الکترون ولت تنظیم شد. مقدار ۰/۵ میکرولیتر اسانس در حالت تقسیم (۱ به ۱۰۰) تزریق شد(۱۸). هویت اجزا روغن مورد آزمایش با مقایسه طیف جرمی آن‌ها با طیف‌های جرمی موجود در کتابخانه دستگاه مشخص شد. درصد اجزای منفرد بر اساس مناطق اوج GC بدون اصلاح فاکتور پاسخ FID محاسبه شد.

حیوانات

در این مطالعه تجربی، چهل دو سر موش نر نژاد ویستار (دانشگاه شاهد، تهران)، با وزن ۲۰ ± ۲۱۰ گرم (میانگین ± انحراف‌معیار) در محیطی با دمای کنترل شده (۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت نسبی (۵ ± ۶۰ درصد) نگهداری شدند. محل نگهداری از نظر نوری تحت چرخه ۱۲ ساعته تاریکی/ تاریکی مصنوعی بود. مراقبت و رسیدگی به حیوانات در تمام مراحل آزمایش مطابق با پروتکل‌های آزمایشی نیز توسط کمیته اخلاق حیوانات دانشگاه شاهد اجرا شد. غذا و آب به صورت آزاد در دسترس حیوانات بودند.

حیوانات به‌طور تصادفی به ۵ گروه آزمایشی مقابل تقسیم شدند (تعداد موش‌ها در هر گروه ۶ سر بود): گروه(۱) موش‌های گروه کنترل، این گروه هیچ گونه جراحی و تیماری دریافت نکردند. گروه(۲) موش‌های گروه شاهد، فقط نرمال سالین به صورت داخل نخاعی دریافت کردند. گروه(۳) موش‌های این گروه، EB ۰/۲ درصد را به صورت تزریق داخل نخاعی دریافت کردند. گروه(۴) موش‌های این گروه به صورت روزانه توبین را به صورت صفاقی و EB ۰/۲درصد را به صورت داخل نخاعی دریافت کردند. گروه(۵) موش‌های این گروه ابتدا به سه زیر گروه تقسیم شدند و هر یک از زیر گروه‌ها به صورت روزانه اسانس سیاه دانه را در یکی از دوزهای ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن به مدت یک هفته دریافت و سپس EB را به صورت داخل نخاعی دریافت کردند.

برای تزریق EB به موش‌ها از روش پیشنهادی Bondan استفاده شد(۱۹). موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (75 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) بیهوش شدند. سوراخی به کمک سر سوزن ۲۱ G در سمت راست مهره کمری شماره ۴ آن‌ها ایجاد شد. سپس EB ۰/۲ درصد با استفاده از یک سرنگ میکرولیتری از طریق روزنه ایجاد شده در مهره کمری، به درون نخاع پشتی تزریق شد. دلیل انتخاب این روش جلوگیری و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

تلاش برای به حداقل رساندن اثرات ناشی از جراحی لامینکتومی به‌خصوص تحریک فرایندهای التهابی ناشی از آن در موش‌ها بود.

تهیه نمونه بافت نخاعی

یک هفته پس از تجویز EB، حیوانات بیهوش و سپس قربانی شدند. ستون مهره‌های آن‌ها توسط روش پیشنهادی Tuzgen و همکاران در سال ۱۹۹۸ لامینکتومی شده و پس از کنار زدن پرده‌های محافظ و رگ‌های خونی از روی نخاع، نمونه نخاعی به سرعت به قطعاتی به طول ۱/۵ سانتی‌متر که حاوی قسمت آسیب دیده بود جداسازی شدند(۲۰). سپس به کمک روش پیشنهادی Siegert وهمکاران درسال۲۰۱۷ با کمی تغییرات درمراحل استخراج چربی‌های نخاع به شرح زیر استخراج شدند(۲۱). برای این منظور قطعاتی به وزن ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت‌های نخاع در نیتروژن مایع منجمد فرو برده شده و سپس کاملا پودر شدند. اسیدهای چرب موجود در نمونه توسط حرارت دادن در مجاورت با هگزان (۲/۵ میلی‌لیتر) و تری‌فلوراید برم (۱۴ درصد) (۲/۵ میلی‌لیتر) در متانول متیله شدند. محلول حاصل پس از رسیدن به دمای اتاق ورتکس شده و یک میلی‌لیتر آب به آن افزوده شد. در نهایت مخلوط حاصل به مدت ۴ دقیقه به آرامی و توسط تکان دادن با دست همزده شد. درنهایت مخلوط فاز آب و روغن توسط سانتریفوژ از هم تفکیک شد و فاز هگزان که حاوی اسیدهای چرب متیله بود جدا و توسط گاز نیتروژن خشک شد. ماده خشک حاصل به یک ویال اپندورف منتقل و مجدد در ۵۰ میکرولیترهگزان حل شد. در نهایت، غلظت اسیدهای چرب مختلف در هموژنای تهیه شده از نمونه‌های نخاعی اندازه‌گیری و تغییرات غلظت هفت اسید چرب شاخص که دارای تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های درمانی با EB بودند مورد مقایسه قرار گرفت.

تحلیل آماری

مقادیر به صورت میانگین ± SEM برای شش موش بیان شدند. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) یکطرفه با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ برای مقایسه داده‌های حاصل از سنجش اسیدهای چرب موجود در محتوی نخاع موش‌ها در گروه های درمان با دوزهای مختلف روغن سیاه دانه در مقایسه باگروه کنترل انجام شد. از آزمون تعقیبی T برای مقایسه گروه‌ها با یکدیگر استفاده شد.

یافته ها

ترکیب اسیدهای چرب موجود در روغن سیاه دانه

جدول شماره ۱ ترکیب اسیدهای چرب شناسایی شده در نمونه روغن سیاه دانه مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد. بیش‌ترین درصد اسیدهای چرب موجود در روغن استخراج شده در نمونه روغن مورد بررسی شامل ارتو- سایمن (۵۱/۱۵ درصد)، آلفا-توجن (۱۶/۳۶ درصد)، تیموکینون (۷/۸۸ درصد) می‌باشد.

جدول شماره ۱: ترکیبات موجود در اسانس سیاه دانه. شاخص‌های بازداری در مقایسه با n-آلکن محاسبه شده اند.

ردیف	نام ترکیب	درصد	شاخص بازداری
۱	α-Thujene	۱۶/۳۶	۹۲۸
۲	α-Pinene	۳/۳۲	۹۳۴
۳	Sabinene	۱/۳۵۴	۹۷۴
۴	β-Pinene	۳/۳۰۲	۹۷۹
۵	α-Terpinene	۰/۱۵۸	۱۰۱۸
۶	o-Cymene	۵۱/۱۵	۱۰۳۱
۷	D-Limonene	۲/۵۵۹	۱۰۳۳
۸	γ-Terpinene	۳/۱۷۷	۱۰۶۰
۱۱	Terpinene-4-ol	۰/۴۷۹	۱۱۸۰
۱۲	Thymoquinone	۷/۸۸۴	۱۲۵۶
۱۳	Carvacrol	۱/۰۶۸	۱۳۰۹
۱۴	α-Longipinene	۰/۴۸۸	۱۳۵۴
۱۵	1,4-Methanoazulene	۱/۹۰۴	۱۴۱۱

ارزیابی پروفایل‌های اسید چرب در بافت نخاعی موش ها

جدول شماره ۲، در صد تغییر سهم هر یک از اسیدهای چرب نخاعی به‌دنبال تجویز داخل نخاعی EB، در مقایسه با کنترل را نشان می‌دهد. بر اساس داده‌های این جدول، اسیدهای چرب موجود در نمونه‌های نخاع موش‌های گروه EB در ۶ اسید چرب از مجموع ۷ اسید چرب مختلف تفاوت معنی‌داری(P<۰/۰۵) را در مقایسه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

با محتوی اسیدهای یافت شده در نمونه نخاع موش‌های گروه کنترل نشان می‌دهد. این جدول، همچنین نشان می‌دهد که درمان موش‌ها با EB سبب شده است تا درصد اسیدهای چرب پالمیتک، واکسینیک، استئاریک و دکوزاهگزانوئیک اسید کاهش و درصد اولئیک، آراشیدونیک و آراشیدیک اسید در نخاع موش‌ها در مقایسه با موش‌های کنترل به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یابد.

جدول شماره ۲: درصد تغییرات هر یک از اسیدهای چرب نخاعی

	نام عمومی	نام شیمیایی اسید چرب	کنترل (سالین)	ایتدیوم برماید (۰/۲ درصد داخل نخاعی)
۱	اسید پالمیتیک	۱۶/۰۰	۰۰۲/۲۰ ± ۰	**۰۰۶/۸۸ ±۰/۱۹
۲	اسید اولئیک	۱۸/۱ ±۰/۹	۲۹/۶ ±۰/۲۱	**۱۱/۸۹ ±۰/۲۳
۳	اسید واکسینیک	۱۸/۰۱	۰۱/۸۸ ±۰/۴	**۶۶ ±۴
۴	اسید استاریک	۱۸/۰۰	۰۰۵/۸ ±۰/۲۱	۰/۲۷۰ ±۳۷/۲۰
۵	اسید آراشیدونیک	۲۰:۴ ، ω-6 (AA)	۰۰۸/۳ ±۰/۱۰	۶۲/۶۱۶ ±۰/۹
۶	دکوزاهگزانوئیک اسید	۲۲:۶ ، ω-3 (DHA)	۲۵/۶ ±۰/۱۳	**۲۲/۴۵ ±۰/۱۱
۷	آراشیدیک اسید	۲۰:۰۰	۰۰۴/۴۴ ±۰/۰	**۰۰۷/۰۱۴ ±۰/۱

**: P<۰/۰۱ ، t-test (n=۶).

در ادامه، در جدول شماره ۳ لیست اسیدهای چرب شناسائی شده در بافت نخاع موش‌های درمان شده با اسانس سیاه دانه (۲، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم) و دریافت‌کننده EB نشان داده شده است. یافته‌های این جدول گویای این نکته کلی است که بر حسب نوع اسید چرب شناسائی شده، اثر درمان با دوزهای مختلف اسانس سیاه دانه بر تغییرات درصد اسید چرب موجود در نخاع موش‌ها متفاوت است. درمان با EB سبب کاهش اسید پالمیتیک از میانگین ۲۲/۷۳ مول درصد در موش‌های کنترل به ۱۹/۸۸ مول درصد شد، در حالی که درمان با اسانس سیاه دانه در دوزهای ۲، ۵ ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم در موش‌های دریافت‌کننده EB به ترتیب سبب افزایش بیش‌تر این اسید چرب مستقل از دوز به مقادیر میانگین ۳۶/۰۱، ۲۲/۱۸ و ۲۵/۳۹ مول درصد شد. میانگین محتوی اسید اولئیک در موش‌های دریافت‌کننده EB، ۲۳/۸۹ مول درصد بود که در مقایسه با گروه کنترل (۱۷/۷۶ مول درصد) این میانگین افزایش معنی‌دار داشت و میزان آن به‌ترتیب ۲۳/۶۸، ۳۶/۴۳ و ۲۸/۳۸ مول درصد در گروه‌های درمان شده با دوزهای ۲، ۵ ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم اسانس سیاه دانه بود که فقط در دو دوز بالا اسانس اثر افزایشی (P <۰/۰۵) بر محتوی این اسید چرب مشاهده شد.

بر عکس، تجویز EB سبب کاهش معنی دار غلظت واکسینیک اسید در نخاع شد، تجویز دوزهای مختلف اسانس هم سبب کاهش بیش‌تر سطح این اسید چرب در نخاع موش‌ها شد. هم‌چنین تجویز EB سبب افزایش غلظت آراشیدونیک اسید در نخاع موش‌ها از میزان ۵/۸۰ در گروه کنترل به میزان ۹/۶۲ مول درصد شد. افزایش دکوزاهگزانوئیک اسید و آراشیدیک اسید از میزان متوسط ۴/۳ و ۳/۶۱ مول درصد در گروه کنترل به مقادیر به‌ترتیب ۱۱/۴۵ و ۳/۹ مول درصد درگروه EB مشاهده شد. تجویز اسانس توانست سبب کاهش بیش‌تر آراشیدونیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید در مقایسه با گروه EB شود و در مورد آراشیدیک اسید باعث افزایش معنی‌دار آن تا بیش از دو برابر مقدارش در گروه EB شد.

جدول شماره ۳: غلظت اسیدهای چرب در محتوی نخاع

	نام اسید چرب	نام شیمیایی	درمان با EB	شم	NS (2ml/kg) + EB	NS (5ml/kg) + EB	NS (10ml/kg) + EB	اثر خالص درمان با اسانس بر اتیدیوم برماید
۱	اسید پالمیتیک	۱۶/۰۰	۱/۸ ± ۱۹/۸۸	*۲/۴ ± ۲۲/۷۳	***۰/۶ ±۳۱/۰۶	۰/۵ ± ۲۲/۱۸	***۰/۴ ±۲۵/۳۹	↑
۲	اسید اولئیک	۱۸/۱ ،۰/۹	۴/۲۳ ±۸۹/۲	**۵/۱۷ ±۷۶/۱	۲/۲۳ ±۶۸/۰	***۶/۳۶ ±۴۳/۰	***۲/۲۸ ±۳۸/۰	↑
۳	واکسینیک اسید	۱۸/۰۱	۴/۴ ±۶۶/۰	**۲/۲ ±۴۳/۰	***۲/۲ ±۱۵/۰	***۱/۸۳ ±۰/۱	***۰۵/۲۹ ±۰/۲	↓
۴	استاریک اسید	۱۸/۰۰	۱/۹ ±۳۷/۲۰	**۱/۶ ±۱۶/۷۹	۱/۱ ±۲۰/۱۱	۰/۴ ±۱۸/۰۵	***۲۶ ±۲۸/۰	↑
۵	آراشیدونیک اسید	20:4, ω-6 (AA)	۸۵/۶۲ ±۰/۹	**۴۵/۰۸ ±۰/۵	***۰۳/۶۱ ±۰/۳	***۰۷/۶۱ ±۰/۳	***۰۶/۹ ±۰/۳	↓
۶	دکوزاهگزانوئیک اسید	22:6, ω-3 (DHA)	۹/۴۵ ±۰/۱۱	** ۴/۳ ±۰/۴	***۳/۰۵ ±۰/۳	***۰۵/۸۵ ±۰/۲	***۰۴/۹۵ ±۰/۲	↓
۷	آراشیدیک اسید	20:4(ω-6)	۳/۹ ±۰/۳	۳/۶۱ ±۰/۳	***۱/۹ ±۶۱۶/۰	***۲/۱۰ ±۳/۰	***۲/۱۰ ±۳/۰	↑

داده (میانگین± SEM) در مقایسه با گروه EB (*P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱، ***P<۰/۰۰۱).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

بدین‌ترتیب که درمان با اسانس NS توانسته است که اثر EB بر اسید پالمتیک، اولئیک، استئاریک و آراشیدیک اسید را افزایش داده و برعکس اثر افزایشی EB بر واکسینیک، آراشیدونیک و دکوزاهگزانوئیک اسید را به‌طور معنی‌دار(P<۰/۰۵) کاهش دهد.

بحث

نتایج ارزیابی اسیدهای چرب موجود در اسانس به دست آمده از بذر سیاه دانه وجود اسیدهای چربی چون α-Thujene، o-Cymene و تیموکوئینین را در آن مشخص ساخت. این اسیدهای چرب در اسانس‌های گیاهی دیگری نیز یافت شده‌اند که تجویز آن‌ها منجر به اثرات محافظت‌کننده عصبی در مقابل استرس اکسیداتیو شده است(۲۲). نتایج این مطالعه هم‌چنین نشان داد که تجویز داخل نخاعی EB باعث کاهش معنی‌دار در سطح اسیدهای چرب با خاصیت محافظت‌کنندگی عصبی در نخاع می‌شود. در ادامه پیش‌درمانی با دوزهای مختلف اسانس سیاه دانه سبب پیشگیری و تخفیف اثرات EB بر محتوای اسیدهای چرب نخاعی شد. در تایید این یافته‌ها، تجویز خوراکی بذرسیاه دانه به مدت ۲ هفته توانسته است تخریب میلین به‌دنبال انسفالومیلیت ناشی از واکنش‌های خودایمنی را در موش‌های صحرائی کاهش دهد(۲۳). تغییر در میزان اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه سبب می‌شود تا طیف وسیعی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی حفاظت‌کننده ساختار میلین فعال شوند(۲۵،۲۴). در این راستا نشان داده شده است که تجویز ترکیبات با اسیدهای چرب غیر اشباع n-3 می‌تواند با بروز پراکسیداسیون اسیدهای چرب در ساختار میلین مقابله کنند(۲۶). تجویز EB سبب افزایش معنی‌دار در محتوی اسید پالمیتیک، اسید استئاریک و اسید اولئیک در نخاع موش‌ها شد. دراین راستا، یک افزایش در میزان اسید پالمیتیک و اسید اولئیک در شرایط تخریب میلین مشاهده شده است(۲۸،۲۷). مشابه با یافته‌های این مطالعه، رابطه معکوسی بین مصرف ترکیبات حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع با میزان اسید آراشیدونیک بافت‌های بدن در مطالعات حیوانی کشف شده است(۳۰،۲۹). در این مطالعه کاهش معنی‌داری در غلظت واکسینیک اسید نخاع بدنبال تجویز EB یا اسانس سیاه دانه مشاهده شد. افزایش این اسید چرب دال بر اختلال در سیستم عصبی مرکزی است و کاهش آن می‌تواند یک اثر مفید در شرایط تخریب میلین باشد(۳۲،۳۱). مشابه با اثرات EB بر نخاع در مطالعه حاضر، افزایش اسید استئاریک در شرایط شبه آلزایمر مشاهده شده است(۳۳) و کاهش آن دال بر کاهش التهاب عصبی و تخریب میلین است(۳۴). هم‌چنین یافته‌های این مطالعه افزایش اسید آراشیدونیک را به دنبال تجویز EB نشان داد. یافته‌های Palumbo و همکاران در سال ۲۰۱۱ افزایش این اسید چرب را در سیستم عصبی مرکزی در شرایط تخریب‌کننده میلین گزارش کرده است(۳۵). هم‌چنین مشابه با اثرات کاهش دهنده اسانس سیاه دانه بر غلظت اسید آراشیدونیک، مطالعات دیگری اثر مفید روغن‌های گیاهی دیگر را در مهار تولید این اسید چرب گزارش کرده‌اند(۳۶).

در کل مطالعه حاضر وقوع تغییرات نامطلوب در محتوی اسیدهای چرب نخاع تحت تاثیر تجویز داخل نخاعی EB را نشان داد که این تغییرات مشابه با شرایط گزارش شده برای بیماران مبتلا به اماس بود. پیش درمانی با اسانس بذر سیاه دانه توانست تغییرات در میزان محتوی اسیدهای چرب نخاع ناشی از تزریق EB را کاهش دهد. در تایید مشاهدات مطالعه حاضر تجویز ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدان و ضد التهابی اثر محافظت‌کننده‌ای در تخریب میلین داشته و سبب اصلاح محتوای اسیدهای چرب در این شرایط شده‌اند(۳۷). بنابراین در توجیه اثرات مشاهده شده از اسانس سیاه دانه می‌توان بخشی از اثرات محافظت‌کننده آن در مقابل EB را به تعدیل محتوی اسیدهای چرب نخاعی نسبت داد(۳۸). از آن‌جاکه این مطالعه دارای محدودیت‌هایی است، بنابراین پیشنهاد می‌شود مطالعات

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

تکمیلی با زمینه ایمونوهیستوپاتولوژی و ملکولی جهت تکمیل نتایج در آینده انجام شود.

سپاسگزاری

از تمامی عزیزانی که مارا در انجام این پایان‌نامه یاری دادند سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Duncan ID, Radcliff AB. Inherited and acquired disorders of myelin: the underlying myelin pathology. Exp Neurol 2016; 283 (Pt B): 452-475.
2. Nogueras L, Gonzalo H, Jové M, Sol J, Gil-Sanchez A, et al. Lipid profile of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients: a potential tool for diagnosis. Sci Rep 2019; 9(1): 11313.
3. Dimas P, Montani L, Pereira JA, Moreno D, Trötzmüller M, Gerber J, et al. CNS myelination and remyelination depend on fatty acid synthesis by oligodendrocytes. Elife 2019; 8: e44702.
4. Bondan EF, Lallo MA, Sinhorini IL, Pereira LA,Graça DL. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. J Submicrosc Cytol Pathol 2000; 32(4): 603-612.
5. Kuypers NJ, James KT, Enzmann GU, Magnuson DS, Whittemore SR. Functional consequences of ethidium bromide demyelination of the mouse ventral spinal cord. Exp Neurol 2013; 247: 615-622.
6. Adamczyk B, Adamczyk-Sowa M. New insights into the role of oxidative stress mechanisms in the pathophysiology and treatment of multiple sclerosis. Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 1973834.
7. Salem SS, Fouda A. Green synthesis of metallic nanoparticles and their prospective biotechnological applications: an overview. Biol Trace Elem Res 2021; 199(1): 344-370.
8. Pollari E, Goldsteins G, Bart G, Koistinaho J, Giniatullin R. The role of oxidative stress in degeneration of the neuromuscular junction in amyotrophic lateral sclerosis. Front Cell Neurosci 2014; 8: 131.
9. Cenini G, Lloret A, Cascella R. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. Oxid Med Cell Longev 2019; 2019: 2105607.
10. Chaves-Filho AB, Pinto IFD, Dantas LS, Xavier AM, Inague A, Faria RL, et al. Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. Sci Rep 2019; 9(1): 11642.
11. Sanchez-Rodriguez E, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Calleja MA, Espejo-Calvo JA, Gil-Extremera B, et al. Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. Nutrients 2019; 11(3): 561.
12. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on Clinical Trials of Black Seed (Nigella sativa) and Its Active Constituent, Thymoquinone. J Pharmacopuncture 2017; 20(3): 179-193.
13. Mazaheri Y, Torbati M, Azadmard-Damirchi S, Savage GP. A comprehensive review of the physicochemical, quality and nutritional properties of Nigella sativa oil. Food Rev Int 2019; 35(4): 342-362.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

14. Yimer EM, Tuem KB, Karim A, Ur-Rehman N, Anwar F. Nigella sativa L. (Black Cumin): A promising natural remedy for wide range of illnesses. Evid Based Complement Alternat Med 2019; 2019: 1528635.
15. Bordoni L, Fedeli D, Nasuti C, Maggi F, Papa F, Wabitsch M, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Nigella sativa Oil in Human Pre-Adipocytes. Antioxidants (Basel). 2019; 8(2): 51.
16. Lewkowicz N, Piątek P, Namiecińska M, Domowicz M, Bonikowski R, Szemraj J, et al. Naturally Occurring Nervonic Acid Ester Improves Myelin Synthesis by Human Oligodendrocytes. Cells 2019; 8(8): 786.
17. Wajs A, Bonikowski R, Kalemba D. Composition of essential oil from seeds of Nigella sativa L. cultivated in Poland. Flavour Fragr J 2008; 23(2): 126-132.
18. Ghahramanloo KH, Kamalidehghan B, Akbari Javar H, Teguh Widodo R, Majidzadeh K, Noordin MI. Comparative analysis of essential oil composition of Iranian and Indian Nigella sativa L. extracted using supercritical fluid extraction and solvent extraction. Drug Des Devel Ther 2017; 11: 2221-2226.
19. Bondan EF, Lallo MA, Graça DL. Ultrastructural study of the effects of cyclosporine in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide demyelinating model. Arq Neuro-Psiquiatr 2008; 66(2B): 378-384.
20. Tüzgen S, Kaynar MY, Güner A, Gümüştaş K, Belce A, Etuş V, et al. The effect of epidural cooling on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. Spinal Cord 1998; 36(9): 654-657.
21. Siegert E, Paul F, Rothe M, Weylandt KH. The effect of omega-3 fatty acids on central nervous system remyelination in fat-1 mice. BMC Neurosci 2017; 18(1): 19.
22. Sharma N, Tan MA, An SSA. Mechanistic Aspects of Apiaceae Family Spices in Ameliorating Alzheimer's Disease. Antioxidants (Basel) 2021; 10(10): 1571.
23. Noor NA, Fahmy HM, Mohammed FF, Elsayed AA, Radwan NM. Nigella sativa amliorates inflammation and demyelination in the experimental autoimmune encephalomyelitis-induced Wistar rats. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8(6): 6269-6286.
24. Chen S, Zhang H, Pu H, Wang G, Li W, Leak RK, et al. n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. Sci Rep 2014; 4:7458.
25. Devassy JG, Leng S, Gabbs M, Monirujjaman M, Aukema HM. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Oxylipins in Neuroinflammation and Management of Alzheimer Disease. Adv Nutr 2016; 7(5): 905-916.
26. Knöchel C, Voss M, Grüter F, Alves GS, Matura S, Sepanski B, et al. Omega 3 Fatty Acids: Novel neurotherapeutic targets for cognitive dysfunction in mood disorders and schizophrenia? Curr Neuropharmacol 2015; 13(5): 663-680.
27. Židó M, Kačer D, Valeš K, Svobodová Z, Zimová D, Štětkárová I. Metabolomics of Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis Compared With Healthy Controls: A Pilot Study. Front Neurol 2022; 13: 874121.
28. Trépanier MO, Hildebrand KD, Nyamoya SD, Amor S, Bazinet RP, Kipp M. Phosphatidylcholine 36:1 concentration decreases along with demyelination in the cuprizone animal model and in post-mortem multiple sclerosis brain tissue. J Neurochem 2018; 145(6): 504-515.
29. Ayalew-Pervanchon A, Rousseau D, Moreau D, Assayag P, Weill P, Grynberg A. Long-term effect of dietary {alpha}-linolenic acid

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]

or decosahexaenoic acid on incorporation of decosahexaenoic acid in membranes and its influence on rat heart in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 293(4): H2296-2304.

30. Robbez Masson V, Lucas A, Gueugneau AM, Macaire JP, Paul JL, Grynberg A, et al. Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rats. J Nutr 2008; 138(10): 1915-1922.
31. McNamara RK, Liu Y, Jandacek R, Rider T, Tso P. The aging human orbitofrontal cortex: decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearoyl-CoA desaturase activity. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2008; 78(4-5): 293-304.
32. Heller A, Won L, Bubula N, Hessefort S, Kurutz JW, Reddy GA, et al. Long-chain fatty acids increase cellular dopamine in an immortalized cell line (MN9D) derived from mouse mesencephalon. Neurosci Lett 2005; 376(1): 35-39.
33. Patil S, Chan C. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. Neurosci Lett 2005; 384(3): 288-293.
34. Hussain G, Schmitt F, Loeffler JP, Gonzalez de Aguilar JL. Fatting the brain: a brief of recent research. Front Cell Neurosci 2013; 7: 144.
35. Palumbo S, Toscano CD, Parente L, Weigert R, Bosetti F. Time-dependent changes in the brain arachidonic acid cascade during cuprizone-induced demyelination and remyelination. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2011; 85(1): 29-35.
36. Moreno JJ, Carbonell T, Sánchez T, Miret S, Mitjavila MT. Olive oil decreases both oxidative stress and the production of arachidonic acid metabolites by the prostaglandin G/H synthase pathway in rat macrophages. J Nutr 2001; 131(8): 2145-2149.
37. Umemoto H, Yasugi S, Tsuda S, Yoda M, Ishiguro T, Kaba N, et al. Protective Effect of Nervonic Acid Against 6-Hydroxydopamine-Induced Oxidative Stress in PC-12 Cells. J Oleo Sci 2021; 70(1): 95-102.
38. Oskouei Z, Akaberi M, Hosseinzadeh H. A glance at black cumin (Nigella sativa) and its active constituent, thymoquinone, in ischemia: a review. Iran J Basic Med Sci 2018; 21(12): 1200-1209.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-15]