Physiology and Pharmacology, 17 (3), 328-338
Autumn 2013 [Article in Persian]

Physiology
and
Pharmacology

Effect of Olive Leaf Extract on the Behavioral Signs of Huntington's Disease and Antioxidant Enzymatic Activity in the Rat Brain

Sedigheh Khanjani Jelodar, Mohammad Reza Bigdeli*

Dept. of Physiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Behshti University, Tehran, Iran

Received: 8 Jul 2013 **Accepted: 10 Sept 2013**

Abstract

Introduction: Huntington's disease is a neurodegenerative disorder in which an increase in the global oxidative stress and a decrease in the antioxidant defense system are observed. Olea europaea's main phenolic components include oleuropein, dimethyl oleuropein, ligstroside and phenolic oleosides, which can be more than 140 mg per gram of fresh olives and 60-90 mg per gram of dried olive leaves. These phenolic components have great antioxidant and neuroprotective properties.

We aimed to study the neuroprotective effects of pretreatment with olive leaf extract on the behavioral signs and antioxidant enzymatic activity in the brains of Huntington animal models.

Methods: Rats were divided into 4 groups in separate cages. The first and the second groups received distilled water orally. The third and the fourth groups were gavaged by75 and 150 mg/Kg/day of olive leaf extract, respectively. To induce Huntington's disease, the animals were intraperitoneally injected with3-NP for 6 days.

Results: Pretreatment with olive leaf extract exerts neuroprotective effects and significantly reduces neurological disorders and increases superoxide dismutase, glutathione reductase and catalase activities.

Conclusion: Although more studies are required to explain the healing mechanism of olive leaf extract, it seems to exert its effects via protecting neurons through its antioxidant properties and its ability to increase enzyme activities including superoxide dismutase, glutathione reductase, catalase.

Key words: antioxidant, Huntington's disease, neuroprotective, superoxide dismutase, catalase

* Corresponding author e-mail: bigdelimohammadreza@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۳)، ۳۲۸ – ۳۳۸
پاییز ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بررسی اثر تغذیه با عصاره برگ زیتون بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و بهبود نقص‌های رفتاری هانتینگتون در مدل جانوری

صدیقه خانجانی جلودار، محمدرضا بیگدلی*
گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۱۷ تیر ۹۲ پذیرش: ۱۹ شهریور ۹۲

چکیده

مقدمه: ویژگی فارماکولوژیک میوه زیتون و برگ زیتون به دلیل ترکیبات فنولی آن در پزشکی و رژیم غذایی سالم شناخته شده است. در واقع این ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی اکسیدانتی و نوروپروتکتیوی قوی می‌باشند. هانتینگتون یک بیماری تحلیل بر عصبی است که افزایش استرس اکسیداتیو گلوبال (GOS) و کاهش عملکرد سیستم آنتی اکسیدانت با مراحل بیماری در بیماران HD همراه است. هدف از این مطالعه بررسی خواص آنتی اکسیدانتی و اثر نوروپروتکتیوی تغذیه با عصاره برگ زیتون بر علائم بالینی و نارسایی‌های نورولوژیک و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مختلف، در مدل جانوری بیماری هانتینگتون می‌باشد.

روش ها: جانوران به ۴ گروه دسته بندی شدند. گروه اول و دوم با آب مقطر تیمار می‌شدند. جانوران در گروه سوم و چهارم به ترتیب با دوز ۷۵ گرم در کیلوگرم وزن بدن و دوز ۱۵۰ گرم در کیلوگرم وزن بدن به روش گاواژ تیمار شدند. مدل سازی بیماری هانتینگتون با تزریق داخل صفاقی ۳-نیتروپروپیونیک اسید به مدت ۶ روز انجام گردید.

یافته ها: تغذیه با عصاره برگ زیتون اثرات نوروپروتکتیوی اعمال می‌کند و به صورت معنی داری باعث کاهش در نقص‌های نورولوژیک و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز می‌شود.

نتیجه گیری: اگرچه تحقیقات بیشتری برای شناخت مکانیسم بهبود دهنده عصاره لازم است، عصاره ظاهراً اثر خود را از طریق مقاوم سازی سلول با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مثل کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز اعمال می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدانت، هانتینگتون، نوروپروتکتیو، گلوتاتیون ردوکتاز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز

مقدمه

هانتینگتون یک بیماری تحلیل بر عصبی است که بوسیله تخریب عقده های قاعده ای (هسته دم دار و پوتامن) و کورتکس مغز شناخته شده است بنابراین موجب حرکات انقباضی غیرعادی می‌شود. این بیماری معمولاً در انسان‌ها در میانسالی (۳۵-۵۰) ظاهر می‌شود و الگوی وراثتی اتوزومی غالب دارد [۱۲]. آنالیز نوروپاتولوژیکی مغز بیماران هانتینگتون کاهش پیشرونده و ترجیحی نورون های گابانرژیک سایز متوسط خاردار (MSNs) در استریاتوم را نشان می‌دهد. همچنین با پیشرفت بیماری، تحلیل (آتروفی) کورتکس و آسیب به نواحی دیگر مغز مثل تالاموس و هیپوکمپ و آمیگدال، مشاهده می‌شود [۲۳]. در حقیقت هانتینگتون یک بیماری چند عاملی است که مکانیسم‌هایی از قبیل نقص در عملکرد میتوکندری، استرس اکسیداتیو و اکسیتوتوکسیتی (سمیت ناشی از تحریک) با همدیگر میان‌کنش می‌دهند و منجر به اختلالات نوروشیمیایی و رفتاری می‌شوند [۲]. در مدل رت هانتینگتون با اسید ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP)

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات:
bigdelimohammadreza@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

احتمالاً هر سه مکانیسم درگیرند [۱]. مکانیسم اولیه عملکردی این سم شامل مهار کمپلکس ۲ زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی می‌باشد. سوکسینات دهیدروژناز که یک آنزیم مهم در دمین داخلی غشا میتوکندریایی قرار گرفته و مسئوول اکسید کردن سوکسینات به فومارات می‌باشد، بوسیله 3-NP بلوکه می‌شود و در پی آن کاهش در سطح ATP، استرس اکسیداتیو و پروسه مرگ سلولی ممکن است، مشاهده شود. یافته های رفتاری در مدل حیوانی رت هانتینگتونی شامل ۳ مرحله، حالت خواب آلودگی، راهپیمایی ناهماهنگ و حرکات چرخشی و تمایل به سمت جانبی و شکمی می‌باشد. بیماری بر اساس ویژگی‌های فردی در افراد مختلف درجات مختلفی از اختلال حرکتی و شناختی را نشان می‌دهد. مطالعات بر روی بیماران هانتینگتونی و مدل آزمایشگاهی، نقش استرس اکسیداتیو و تخریب میتوکندریایی و در نتیجه تخریب نورونی که در این بیماران بوجود می‌آید را حمایت می‌کند [۷، ۸، ۱۹] و از طرف دیگر میوه زیتون و برگ زیتون به دلیل ترکیبات فنولی آن در پزشکی و رژیم غذایی سالم شناخته شده‌اند [۱۵]. یکی از ترکیبات فنولی مهم در عصاره برگ زیتون اولئوروپین می‌باشد. اولئوروپین فعالیت آنتی اکسیدانتی قویی در محیط آزمایشگاه در مقایسه با آنالوگ محلول در آب تکوفرول دارد. اولئوروپین آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل را جمع آوری کرده و از انفجار تنفسی نوتروفیل ها و رادیکال‌های مشتق اسیدی هیپوکلروس را مهار می‌کند. در مناطق مدیترانه ای محصولات زیتون بالاست و میزان بیماری‌های ناشی از آسیب‌های استرس اکسیداتیو از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، چاقی و دیابت پایین است [۱۳].

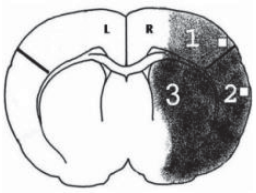
همانطور که گفته شده، هانتینگتون یک بیماری تحلیل بر عصبی است که مبنای آن سمیت حاصل از تحریک و استرس اکسیداتیو می‌باشد که موجب تخریب سلولی و آسیب بافتی می‌شود. همچنین همانطور که یادآور شده، عصاره برگ زیتون دارای خاصیت آنتی اکسیدانت و نوروپروتکتیو می‌باشد و باعث تنظیم افزایشی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی می‌شود. [۱۴] و از آنجاییکه یکی از راههای مقابله با گونه های واکنشی، که موجب استرس اکسیداتیو می‌شود، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی مانند گلوتاتیون ردوکتاز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز می‌باشد. به همین جهت در این مطالعه فرض بر این است که با تغذیه مداوم عصاره برگ زیتون، سلول‌های عصبی را برای مقابله با سمیت حاصل از تحریک و استرس اکسیداتیو آماده کرد. بر این اساس، هدف از این مطالعه بررسی اثر تغذیه با عصاره برگ زیتون بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و نقص‌های نورولوژیک بیماری هانتینگتون می‌باشد.

مواد و روش ها

در این آزمایش ۲۸رت نر بالغ (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرمی) که در شرایط استاندارد جهانی (۲۱ ساعت روشنایی و ۲۱ ساعت تاریکی، دسترسی آسان به آب و غذا و دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری می‌شدند، رت ها به طور تصادفی به ۴ گروه ۷ نفره تقسیم بندی شدند جانوران در گروه اول به عنوان گروه کنترل (تزریق سالین) و گروه دوم (تزریق اسید ۳-نیتروپروپیونیک) فقط با آب مقطر تیمار می‌شدند، جانوران در گروه سوم و چهارم به مدت سی روز به ترتیب با دوز ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره زیتون (عصارهٔ متانولی برگ زیتون از گونهٔ Olea europaea، توسط موسسهٔ تحقیقاتی رازی استان لرستان تهیه شد. قبل از مصرف این عصاره در آب مقطر حل شد. آنالیز ترکیبات و مقادیر ترکیبات فنولی این ماده قبلاً نشان داده شده است [۱۴]. تنها تفاوت ترکیبات این مطالعه با پروتکل ذکر شده مقدار الئوروپین آن می‌باشد که در عصاره‌ی مصرفی ما ۱۴٪ است.) به روش گاواژ دریافت کردند. در روز ۲۴ برای مدل سازی بیماری هانتینگتون جانوران گروه دوم، سوم و چهارم به مدت ۶ با روش تزریق درون صفاقی ۳-نیتروپروپیونیک اسید (سیگما) (روزانه ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن)، دریافت کردند [۲]. ۲۴ ساعت بعد از پایان روز سی‌ام تیمار که برابر با روز ششم تزریق بود، جانوران با آزمون‌های روتین رفتاری تحت آزمایش قرار گرفتند. این آزمایش‌ها به روش زیر صورت گرفتند: آزمایش صفحه شیبدار به روش ریولین و تاتور [۱۶] میزان عملکرد حرکتی بر روی سطح شیبدار مورد بررسی قرار گرفت، صفحه شیبدار شامل ۲ صفحه می‌باشد که به وسیله لولا توانایی ایجاد زوایای متغیر از صفر تا ۹۰ را دارد. حداکثر زمانی که موش

می‌تواند با حداکثر شیب به مدت ۵ ثانیه خود را روی شیب نگاه دارد به عنوان شاخص ثبت می‌شود. در آزمایش توانایی راه رفتن بر روی میله یا ارزیابی تعادل بر روی میله، رت ها به طور عمود بر روی یک میله افقی (۱×۱۰۰ سانتی متر) قرار می‌گرفتند. که فاصله این میله از زمین ۱متر بود [۸]. برای ارزیابی قدرت پنجه گیری به رت ها اجازه داده می‌شد که با پنجه دست سیم استیل به قطر ۲ میلی متر و طول ۳۵ سانتی متر را بگیرند. در این حالت رت ها با ارتفاع ۵۰ سانتی متری بالای سیم نگاه داشته می‌شدند، مدت زمانی که رت می‌توانست این میله را نگاه دارد ثبت می‌شد. مدت زمان لازم برای جدا شدن دست موش به عنوان قدرت پنجه گیری در نظر گرفته می‌شود [۱۸].

بعد از انجام آزمایش‌های بالینی رت ها سربریده و برش گیری و تقسیم بندی مغز به کمک ماتریکس مغزی و به طور کرونال به مقاطع ۲ میلی متر انجام شد سپس هر نیمکره مغز، به ۳ ناحیه کورتکس و پنومبرا و ساب کورتکس تقسیم شدند.



۱)کورتکس
۲)پنومبرا
۳)ساب کورتکس

به منظور سنجش آنزیمی، نمونه‌ها (نیمکره چپ مغز که به سه ناحیه کورتکس، ساب کورتکس و پنومبرا) را در یک و نیم میلی لیتر بافر (۰/۳۲ مول در لیتر ساکارز، ۱میلی مول در لیتر EDTA و ۱۰ نانومول در لیتر تریس هیدروکلرید با (pH ۴/۷) با هموژنایزر (BANDELIN SONOPULS, HD2200, MS72) به مدت ۱دقیقه در حمام آب یخ هموژن می‌شدند. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۳۶۰۰ به مدت نیم ساعت سانتریفیوژ می‌شدند، سوپرناتانت جمع آوری شده و برای سنجش آنزیم کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز مورد استفاده قرار گرفتند [۳]. غلظت پروتئین‌های نمونه نیز با روش برادفورد [۶]. با استفاده آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد، اندازه گیری می‌شدند. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به واسطه روش جنت و همکارانش با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل ۱ میلی لیتر حاوی ۵۰ میلی مولار بافر سدیم فسفات، ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۴۸/۰ میلی مولار پیروگالل و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. تغییر جذب نوری در ۴۲۰ نانومتر در مدت ۴ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با محلول بلانک که حاوی همه مواد به غیر از بافت هموژن شده، اندازه گیری شده است.

یک واحد از آنزیم سوپراکسید دسموتاز، طبق تعریف مقداری از آنزیم است که موجب مهار نصف حداکثر مقدار اتواکسیداسیون پیروگالل می‌شود.

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش جنت و همکارانش (۲۰۰۲) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل ۱ میلی لیتر حاوی ۵۰ میلی مولار بافر سدیم فسفات، ۱۰میلی مولار هیدروژن پراکسیدات و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. تغییر جذب نوری در ۲۴۰ نانومتر در مدت زمان ۲ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با محلول بلانک که حاوی همه مواد به غیر از بافت هموژن شده، اندازه گیری شده است. یک واحد از آنزیم طبق تعریف، مقدار آنزیمی است که برای تجزیه ۱ میکرومول از H_2O_2 در ۱ میلی گرم پروتئین در مدت زمان ۱دقیقه، لازم است.

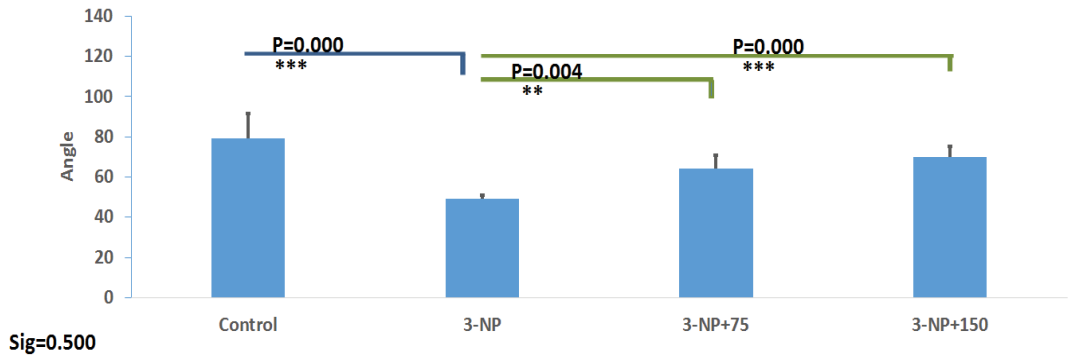
فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به روش رومرو و همکاران (۲۰۰۰) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل ۱میلی لیتر شامل بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با pH حدود ۷ و ۲/۵ میلی مولار GSSG و ۱۲۵ میکرومولار NADPH می‌باشد. تغییر جذب نوری در۳۴۰ نانومتر در مدت زمان ۲ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با محلول بلانک حاوی همه مواد غیر از بافت هموژن شده، اندازه گیری شده است [۳].

یک واحد از آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز طبق تعریف، مقدار آنزیمی است که برای اکسیده شدن ۱ مول از NADPH در ۱ میلی گرم از پروتئین در مدت زمان ۱ دقیقه لازم است.

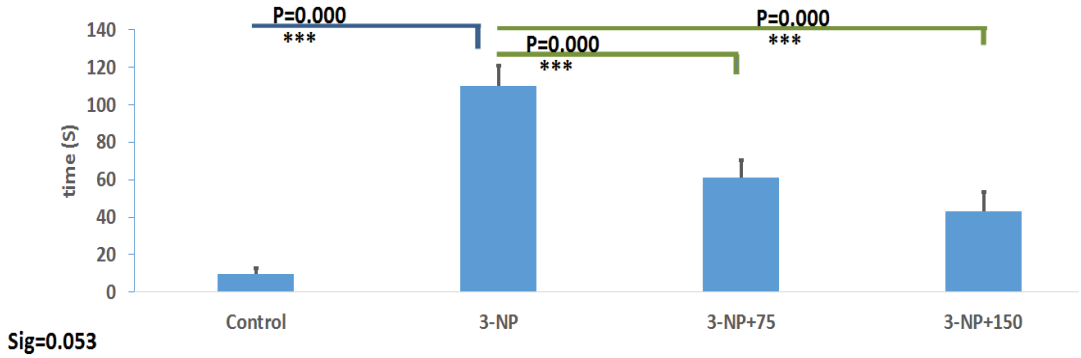
داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده است. تست Post–hock استفاده شده برای موارد داده‌ها Tuky است. $P<0.05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شده‌اند.

یافته ها

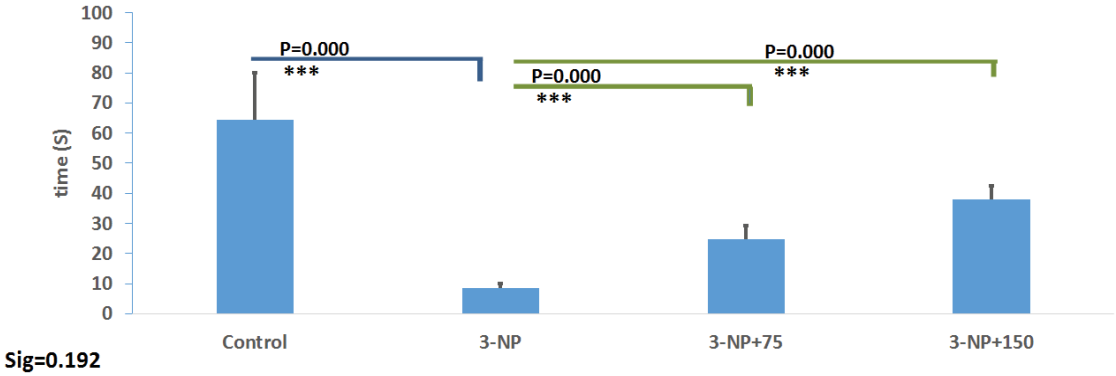
تجویز ۳-نیتروپروپیونیک اسید به تنهایی، کاهش عملکرد



شکل ۱- اثر تیمار با دوزهای مختلف عصاره برگ زیتون بر زاویه افتادن از سطح شیبدار در مقایسه با گروه 3-NP (n=7,p<0.05)



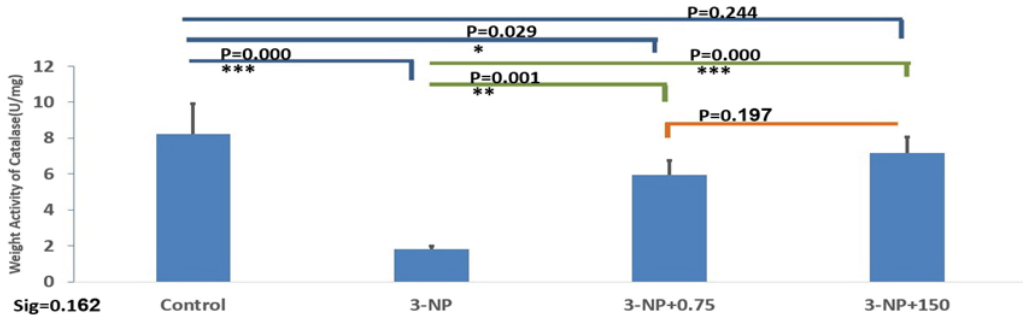
شکل ۲- اثر تیمار با دوزهای مختلف عصاره برگ زیتون بر تعادل بر روی میله در مقایسه با گروه 3-NP (n=7,p<0.05)



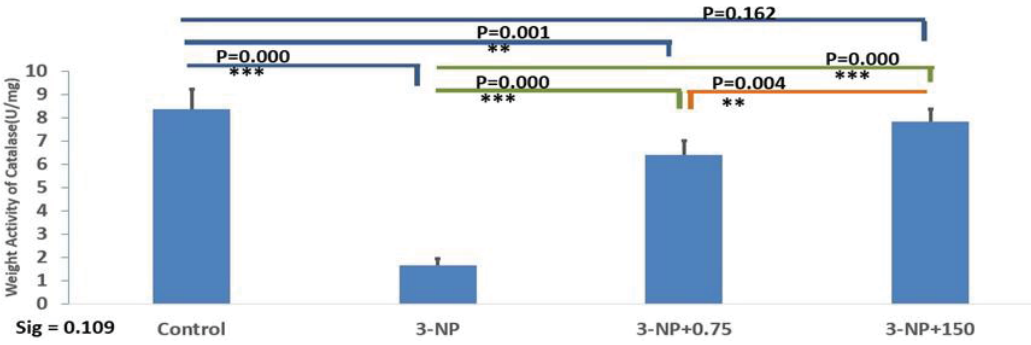
شکل ۳- اثر تیمار با دوزهای مختلف عصاره برگ زیتون مدت زمان پنجه گیری در مقایسه با گروه 3-NP (n=7,p<0.005)

حرکتی رت ها در صفحه شیبدار (میزان زاویه ای که توانایی تحمل آن را داند و در آن زاویه توانایی ماندن بر روی سطح شیبدار را دارا می‌باشند)، بواسطه کاهش زاویه در این گروه (۵۳/۵۷۱±۲/۶) نسبت به گروه کنترل (۷۹/۱۴±۰/۷۰) نشان می‌دهد. تیمار با دوزهای مختلف عصاره برگ زیتون باعث افزایش توانایی رت ها در سطح شیبدار می‌شود. به طوری که در موش‌های تیمار شده با دوز ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم عصاره زیتون به ترتیب، افزایش معنی داری در افزایش زاویه (۷۱±۱/۸۸) نسبت به گروه بیمار از خود نشان می‌دهند. (شکل۱).

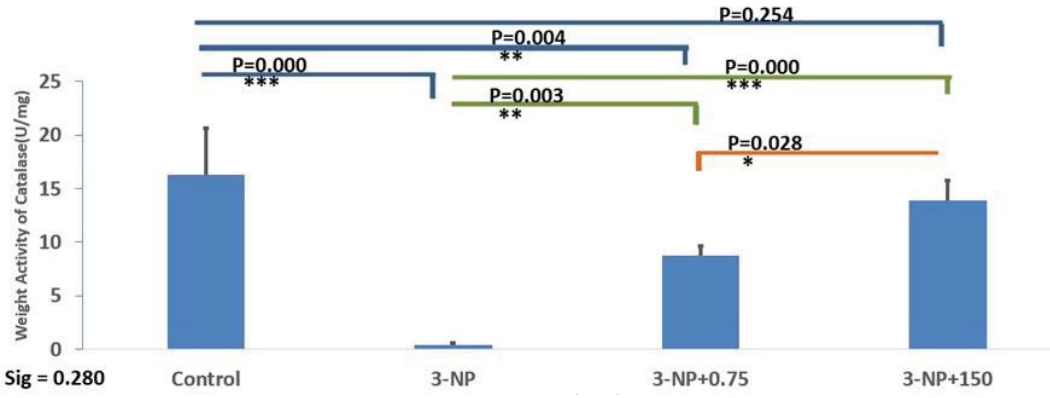
تقریباً تمامی موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید را به تنهایی دریافت کردند، توانایی عبور از میله باریک افقی ۱۰۰×۱ سانتی متر را نداشتند و زمان ۱۲۰ ثانیه برایشان ثبت شده است. در حالی که موش‌هایی که به عنوان کنترل، سالین دریافت کرده بودند در مدت زمان ۹/۴۳±۱/۲۱ ثانیه این میله را طی کردند. موش‌هایی که در دو گروه دیگر با دوز ۷۵ و



شکل ٤-١) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ناحیه کورتکس مغز رت، دوز ۷۵ ، ۱۵۰ (p<0.05,n=3)



شکل ٤-٢) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ناحیه پنومبرای مغز رت، دوز ۷۵،۱۵۰ (p<0.05,n=3)

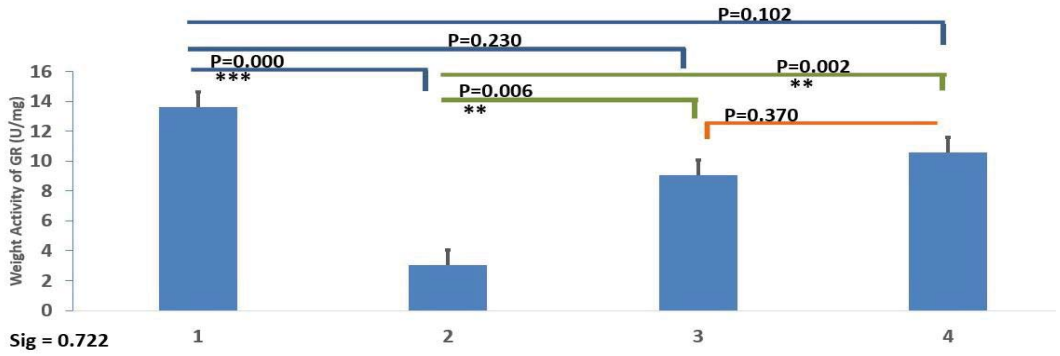


شکل ٤-٣) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ناحیه ساب کورتکس مغز رت، دوز ۷۵، ۱۵۰ (p<0.05,n=3)

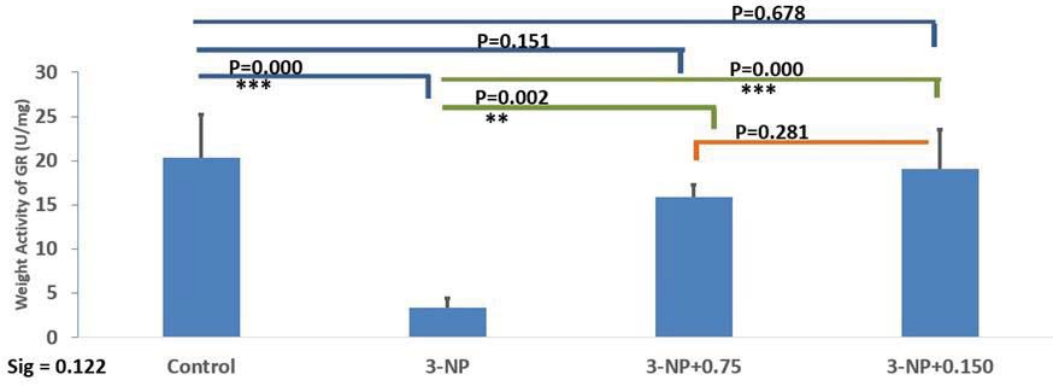
۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم عصاره برگ زیتون تیمار شده بودند، به طور معنی داری توانایی‌شان در عبور از میله افزایش یافت. به ترتیب در مدت زمان ۳/۳۴±۶۲/۷۰، ۱/۲۱±۴۰/۴۸ ثانیه میله را طی کردند. (n=7, p<0.005) (شکل ۲).

موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید دریافت کرده بودند، مدت زمان پنجه گیری (۰/۵۴±۸/۶۲) به طور چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل (۵/۸۲±۶۴/۴۹) کاهش یافته است. مدت زمان پنجه گیری را در موش‌هایی که دوز ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن عصاره برگ زیتون را دریافت کردند، در مقایسه با گروه بیمار، افزایش یافته است.این مدت زمان در موش‌های دوز ۷۵ برابر با ۲/۱۹±۲۳/۹۱ ثانیه و در موش‌هایی که دوز ۱۵۰ را دریافت کرده‌اند برابر با ۱/۶۶±۳۶/۶۹ ثانیه می‌باشد. (n=7, p<0.005) (شکل۳).

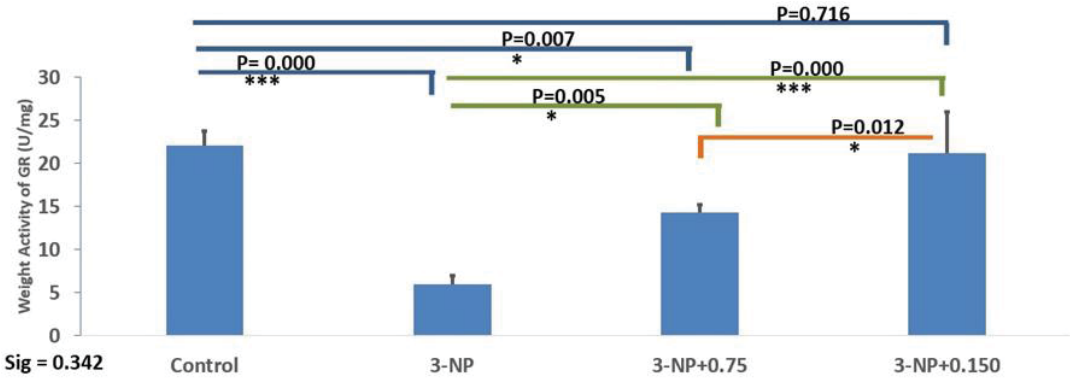
شکل ۴ نشان می‌دهد، فعالیت آنزیم کاتالاز در موش‌هایی که علاوه بر تزریق ۳-نیتروپروپیونیک اسید تحت تیمار عصاره



شکل ۵-۱) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در ناحیه کورتکس مغز رت، دوز ۷۵، ۱۵۰ ($p<0.05, n=3$)



شکل ۵-۲) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در ناحیه پنومبرای مغز رت، دوز ۷۵، ۱۵۰ ($p<0.05, n=3$)

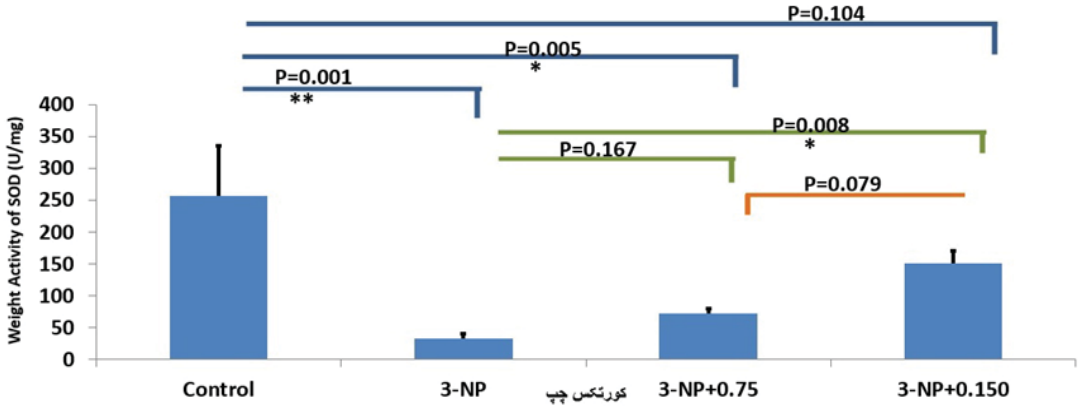


شکل ۵-۳) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در ناحیه ساب کورتکس مغز رت، دوز ۷۵، ۱۵۰ ($p<0.05, n=3$)

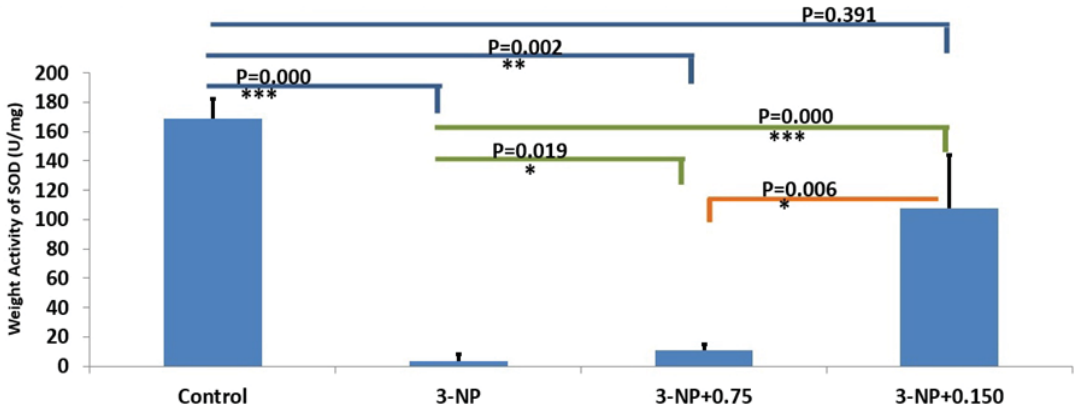
برگ زیتون قرار گرفته‌اند در مقایسه با گروهی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید به تنهایی دریافت کردند، فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته. از طرف دیگر سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه مدل هانتینگتون در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است. ($p<0.05, n=3$).

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌کنید، فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در موش‌هایی که علاوه بر اینکه تحت تزریق ۳-نیتروپروپیونیک اسید قرار گرفته‌اند با عصاره برگ زیتون نیز تیمار شدند، به طور معنی داری افزایش یافته است. سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در گروه مدل هانتینگتون در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داده است.

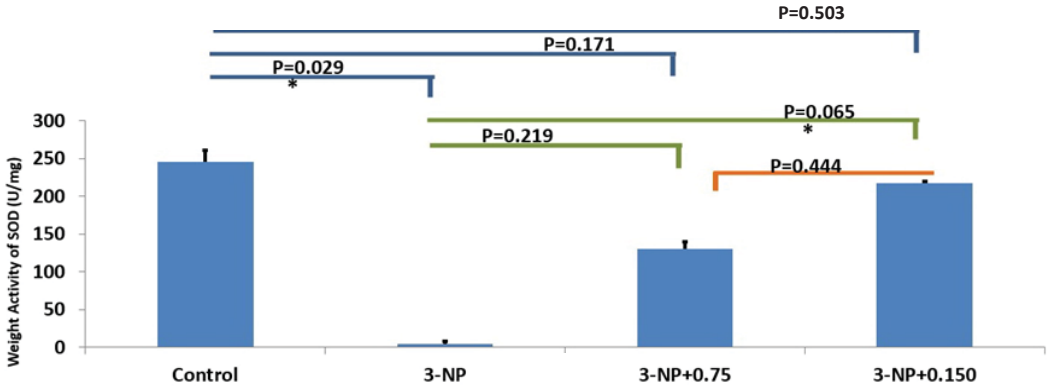
شکل ۶ نشان می‌دهد، موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید همراه با عصاره برگ زیتون دریافت کردند در مقایسه با آنهایی که فقط تحت تزریق ۳-نیتروپروپیونیک اسید قرار



شکل ٦-١) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ناحیه کورتکس مغز رت، دوز ۷۵، ۱۵۰ ($p<0.05, n=3$)



شکل ٦-٢) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ناحیه پنومبرای مغز رت، دوز ۷۵، ۱۵۰ ($p<0.05, n=3$)



شکل ٦-٣) اثر عصاره برگ زیتون بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ناحیه ساب کورتکس مغز رت، دوز ۷۵، ۱۵۰ ($p<0.05, n=3$)

گرفته‌اند، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را نشان می‌دادند. از طرف دیگر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های مدل هانتینگتون در مقایسه با موش‌های گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است. ($n=3, p<0.05$)

بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مصرف خوراکی عصاره برگ زیتون به طور مزمن (تیمار۳۰ روزه بصورت گاواژ) باعث افزایش مقاومت مغز در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از

۳-نیتروپروپیونیک اسید در مدل جانوری بیماری هانتینگتون می‌شود. بدین ترتیب باعث بهبود نقص‌های نورولوژیک مرتبط با رفلکس‌های تعادلی، حفظ وضعیت، و نارسایی پنجه گیری می‌شود. همچنین باعث افزایش فعالیت‌های آنزیم آنتی اکسیدانت سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، و گلوتاتیون ردوکتاز می‌شود. و بدین ترتیب تا حدی استرس اکسیداتیو ناشی از ۳-نیتروپرپیونیک اسید را خنثی می‌کند. یافته های این آزمایش با گزارش‌های پیشین در مورد اختلالات رفتاری و حرکتی در رت ها بر اثر تزریق ۳-نیتروپروپیونیک اسید، تطابق دارد [۵، ۲].

همچنین علائم بیماری بر اثر تزریق ۳-نیتروپروپیونیک اسید مطابق با علائم بیماری هانتینگتون می‌باشد [۲۲]. پیش درمان با عصاره برگ زیتون می‌تواند موجب حفاظت عصبی در رت ها در برابر استرس اکسیداتیو و نارسایی‌های حرکتی القاء شده توسط ۳-نیتروپرپیونیک اسید، شود. مکانیسم‌های مختلفی می‌تواند موجب حفاظت عصبی ناشی از تیمار با عصاره برگ زیتون شود. عصاره برگ و روغن زیتون دارای ترکیبات فنولی مهم مختلفی می‌باشد که تأثیرات فارماکولوژیک مختلفی را القاء می‌کنند. یکی از این ترکیبات، هیدروکسی تیروزول می‌باشد که فعالیت آنتی اکسیدانت اندوژن را در مغز به وسیله‌ی میانکنش انتخابی با آبشار های سیگنال دهی مثل تیروزین کیناز، مسیر های PtdIns 3-kinase/Akt, PKC، MAP کیناز، اعمال می‌کند. این مسیرها بقای سلولی را در طی بروز استرس اکسیداتیو تنظیم می‌کنند [۲۱].

هیدروکسی تیروزول با خاصیت جمع کنندگی یون آهن و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی سبب کاهش پراکسیداسیون لیپید می‌شود. هیدروکسی تیروزول می‌تواند موجب هیپرپلاریزه کردن ملایم پتانسیل غشای میتوکندری در سلول‌های مغزی شود و از این طریق اختلالی را که در عملکرد میتوکندری در اثر دپلاریزه شدن غشای آن به وجودمی‌آید را جبران کند در نتیجه رها شدن متابولیت های قوی از میتوکندری کاهش یافته و باعث بهبود مقاومت نسبت به استرس می‌شود [۱۷]. از آنجایی که هانتینگتون نیز یک بیماری است که با اختلال عملکرد میتوکندری همراه است، این خاصیت عصاره می‌تواند در بهبود روند بیماری ایفای نقش کند.

یکی دیگر از ترکیبات فنولی که به مقدار زیاد در عصاره برگ زیتون وجود دارد، اولئوروپین می‌باشد، اولئوروپین فعالیت آنتی اکسیدانتی قویی در محیط آزمایشگاه در مقایسه با آنالوگ محلول در آب تکوفرول دارد. اولئوروپین آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل را جمع آوری کرده و از انفجار تنفسی نوتروفیل ها و رادیکال‌های مشتق اسیدی هیپوکلروس را مهار می‌کند و از این طریق باعث ایجاد پدیده تحمل در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود [۴ ، ۲۰].

همچنین مشخص شده که مصرف عصاره برگ زیتون بیان پروتئین کموتاکتیک مونوسیت Mcp-1 (فاکتوری کموتاکتیک به خصوص برای مونوسیت ها که تحت تحریک‌های مختلف از سلول‌های اندوتلیالی و یا سلول‌های ماهیچه صاف تولید می‌شود) را در سطح پروتئین و mRNA و بیان مولکول‌های چسبان رگ‌ها را در سطح پروتئین کاهش می‌دهد. در این آزمایش احتمالاً عصاره برگ زیتون موجب کاهش فعالیت NFkB و کاهش بیان TNFα شد که نشان دهنده مهار التهاب است. همچنین این عصاره سبب کاهش سطح مالون دی آلدهید (MDA) که نشانگر پراکسیداسیون لیپید است هم شده است [۲۳].

لذا می‌توان نتیجه گرفت که عصاره برگ زیتون از طریق کاهش NFKB و کاهش بیان TNFα و همچنین کاهش رادیکال‌های مشتق اسیدی و آنیون‌های پراکسید نقش خود را ایفا می‌کند. همچنین در برخی دیگر از آزمایش‌ها ثابت شده است که پیش تیمار با اولئوروپین به طور بارزی تولید آنیون سوپر اکسید و نیتریک اکسید را بعد از ایسکمی کاهش می‌دهد و فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در هیپوکامپ را افزایش می‌دهد و از پراکسیداسیون لیپید ها ممانعت می‌کند.

از طرف دیگر می‌دانیم که آنزیم‌های آنتی اکسیدان دستگاه عصبی را در برابر گونه های واکنشی حفظ می‌کنند [۱۱]. آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به عنوان رفتگر گونه های واکنشی مثل پر اکسید هیدروژن، در سلول عمل می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان درون زاد، مثل کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز باعث کاهش مرگ برنامه ریزی شده سلول، فعال سازی آستروسیت‌ها و میکروگلیاها و خروج عناصر ضد التهابی

می‌شود [۹].

همچنین مطالعات انجام شده، در موش‌های هانتینگتونی شده نشان دهنده اثر آنتی اکسیداتیو روغن زیتون در بافت مغز می‌باشد، که بر این اساس پیشنهاد شده است که احتمال دارد روغن زیتون خاصیت نوروپروتکتیو داشته باشد. این مطالعات یک کاهش در اکسیداسیون لیپید و افزایش در سطح GSH را نشان می‌دهد. که این نتایج نشان دهنده کاهش استرس اکسیداتیو می‌باشد. اثرات سودمند روغن زیتون از مسیرهای مختلفی اعمال می‌شود، از جمله: ۱) داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی بدلیل وجود ترکیبات فنولی ۲) از طریق تحریک فاکتور Nrf2 در هسته با تحریک ثانویه پروتئین‌های آنتی اکسیدان سایتوپروتکتیو (Cytoprotective) در فاز ۲ تقسیم ۳) افزایش توانایی میتوکندری و تولید ثانویه ATP [۲۱].

در مجموع عصاره برگ زیتون به طور قابل توجهی آسیب‌های سلولی جسم مخطط و نقص‌های نورولوژیک ناشی از ۳-نیتروپرپیونیک اسید را کاهش می‌دهد. عصاره برگ زیتون احتمالاً از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی داخل سلولی و همچنین از طریق کاهش فاکتورهای التهاب مثل NFKB و TNFα باعث کاهش تخریب سلولی ناشی از القای ۳-نیتروپرپیونیک اسید می‌شود.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت های مالی و معنوی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی به انجام رسید.

References

[1] Alexi T, Hughes PE, Faull RL, Williams CE, 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. ***Neuroreport*** 9 (1998) 57-64.

[2] Bigdeli M., Rahnema M., The Effect of Normobaric Hyperoxia on Superoxide Dismutase Activity and Neurological Deficits in an Animal Model of Huntington disease. ***Physiol Pharmacol*** 13 (2009) 18-27.

[3] Bigdeli MR, Rasoulian B, Meratan AA, In vivo normobaric hyperoxia preconditioning induces different degrees of antioxidant enzymes activities in rat brain tissue. ***Eur J Pharmacol*** 611 (2009) 22–29.

[4] Boccio J, Salgueiro J, Lysionek A, Zubillaga M, Weill R, Goldman C, Caro R, Current knowledge of iron metabolism. ***Biol Trace Elem Res*** 92 (2003) 189-212.

[5] Borlongan CV, Nishino H, Sanberg PR, Systemic, but not intraparenchymal, administration of 3-nitropropionic acid mimics the neuropathology of Huntington's disease: a speculative explanation. ***Neurosci Res*** 28 (1997) 185-189.

[6] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem*** 72 (1976) 248-254.

[7] Browne SE, Beal MF., Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. ***Antioxid Redox Signal*** 8 (2006) 2061-2073.

[8] Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF, Oxidative stress in Huntington's disease. ***Brain Pathol*** 9 (1999) 147-163.

[9] Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, and Nicoletti F, Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 21 (2001) 1013-1033.

[10] Haik KL, Shear DA, Scheroder U, Sabel BA, Dunbar GL, Quinolinic acid released from polymeric brain implants causes behavioral and neuroanatomical alterations in rodent model of Huntington's disease. ***Exp Neurol*** 163 (2000) 430-439.

[11] Johri A, Beal MF., Antioxidants in Huntington's disease Ashu Johri, ***Biochim Biophys Acta*** 1822 (2012) 664-674.

[12] MacDonald, M.E., et al. A novel gene containing atrinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. ***Cell*** 72 (1993) 971-983.

[13] McCord JM, Edeas MA, SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. ***Biomed Pharmacother*** 59 (2005) 139-142.

[14] Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulian B, Zeinanloo

AA, Khoshbaten A, Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain injury in rats subjected to ischemia-reperfusion. ***Scientific World J*** 10 (2010) 1180-1191.

[15] Perez-De La Cruz V, Santamaria A, Santamaría, Integrative Hypothesis for Huntington's Disease: A Brief Review of Experimental Evidence. ***Physiol Res*** 56 (2007) 513-526.

[16] Rivlin AS, Tator CH, Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. ***J Neurosurg*** 47 (1977) 577-581.

[17] Schaffer S, Podstawa M, Visioli F, Bogani P, Müller WE, Eckert GP, Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. ***J Agric Food Chem*** 55 (2007) 5043-5049.

[18] Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL, Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. ***Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*** 22 (1998) 1217-1240.

[19] Stack E.C., Matson W.R., Ferrante R.J., Evidence of oxidant damage in Huntington's isease: ranslational strategies using antioxidants. ***Ann NY Acad Sci*** 1147 (2008) 79-92.

[20] Tan HW, Tuck KL, Stupans I, Hayball PJ, Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. ***J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*** 785 (2003) 187-191.

[21] Tasset I, Pontes AJ, Hinojosa AJ, de la Torre R, Túnez I, Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced Huntington\'s disease-like rat model. ***Nutr Neurosci*** 14 (2011) 106-111.

[22] Visioli F, Poli A, Gall C, Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. ***Med Res Rev*** 22 (2002) 65-75.

[23] Wang L, Geng C, Jiang L, Gong D, Liu D, Yoshimura H, Zhong L, The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis. ***Eur J Nutr*** 47 (2008) 235-243.