Archive of SID

بررسی تأثیر عصاره اتانولی اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*) بر حجم سکته مغزی در موش‌های صحرایی در معرض ایسکمی- خونرسانی مجدد

زهرا ربیعی[1]، فرهاد فتحی[1]، سمیرا اصغرزاده[2،3]، محمود رفیعیان کوپایی[1]*

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- دانشکده فناوری نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
* آدرس مکاتبه: شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
تلفن: ۳۳۳۴۶۶۹۲ (۰۳۸)، نمابر: ۳۳۳۳۰۷۰۹ (۰۳۸)
پست الکترونیک: Rafieian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۰ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۷/۱۱

چکیده

مقدمه: اسطوخدوس متعلق به خانواده **Labiatae** و با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است.

هدف: مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر حفاظتی عصاره اسطوخدوس بر حجم سکته مغزی و مکانیسم احتمالی آن در مدل سکته مغزی رت انجام شد.

روش بررسی: مطالعه از نوع تجربی بوده و ۴۲ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی در ۶ گروه ۷ تایی تقسیم‌بندی شدند. عصاره اسطوخدوس (با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی) به مدت ۲۰ روز متوالی به موش‌های صحرایی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۲ ساعت بعد از آخرین دوز، جراحی بستن شریان مغزی انجام و ۲۴ ساعت بعد از القای ایسکمی میزان حجم سکته مغزی اندازه‌گیری شد. همچنین میزان نیتریک اکسید **(NO)** سرم اندازه‌گیری شد. تحلیل آماری داده‌ها ازطریق آنالیز واریانس یک طرفه **(ANOVA)** انجام شد.

نتایج: تیمار رت‌ها با عصاره اسطوخدوس در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۰ روز منجر به یک کاهش معنی‌داری در حجم آسیب بافتی ناشی از سکته در ناحیه پنومبرا (کورتکس) و کانون (ساب کورتکس) مغز نسبت به کنترل شد (به ترتیب، $P=$ ۰/۰۴۴ و $P=$ ۰/۰۴۷). عصاره اسطوخدوس با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به طور معنی‌داری میزان نیتریک اکساید خون را افزایش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره اسطوخدوس فعالیت حفاظت مغزی در برابر ایسکمی مغزی دارد و حجم سکته مغزی را در موش‌های صحرایی در معرض ایسکمی کاهش می‌دهد که مکانیسم آن ممکن است در ارتباط با افزایش فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی دارو باشد. عصاره گیاه اسطوخدوس با افزایش سطح نیتریک اکساید اندوتلیالی، با مهار کاهش جریان خون مغزی باعث کاهش حجم سکته‌ی مغزی شده است.

گل‌واژگان: ایسکمی مغزی و خونرسانی مجدد، حجم سکته مغزی، عصاره اسطوخدوس، نیتریک اکساید

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

هر ساله میلیون‌ها نفر از مردم جهان، در سنین مختلف دچار سکته مغزی می‌شوند. سکته مغزی، سومین علت مرگ و میر در دنیاست. این بیماری به طور ناگهانی اتفاق نمی‌افتد و پزشکان می‌توانند افرادی را که در معرض ابتلا به آن هستند، مشخص کنند. در جوامع در حال توسعه، سرعت وقوع ایسکمی مغزی به طور ناگواری رو به افزایش است و دلیل اصلی ناتوانی جسمی مزمن شده است. حدود ۲۰ درصد بیماران در ماه اول پس از سکته می‌میرند و آنهایی که بیش از شش ماه زنده می‌مانند، برای زندگی کردن به سایرین وابسته‌اند [۱].

واژه ایسکمی از دو واژه یونانی *iskhein* به معنی مانع شدن و *haema* به معنی خون گرفته شده که در کل به معنای محدودیت در رسیدن خون به ارگان‌ها و بافت‌ها می‌باشد. ایسکمی مغزی یا سکته مغزی به قطع جریان خون به مغز یا قسمتی از مغز گفته می‌شود [۱]. ایسکمی در اثر عواملی چون ترومبوز، امبولی و کاهش خونرسانی سیستمیک به وجود می‌آید [۲]. ایسکمی کانونی (ناشی از امبولی و ترومبوز) و گلوبال (ناشی از ایست قلبی) مغزی از بیماری‌های شایع جوامع بشری هستند. بافت مغزی به دلیل متابولیسم بالا و ذخایر اکسیژن کم حساسیت بسیار زیادی به آسیب ایسکمی دارد [۳].

در ایسکمی مغزی کانونی و یا گلوبال، جریان خون مغزی (CBF: cerebral blood flow) در مناطقی از مغز که با اکسیژن تغذیه شده توسط رگ‌های مسدود کاهش می‌یابد که توسط ایست قلبی ایجاد می‌شود و یا قطع کانونی جریان خون مغز که ناشی از انسداد عروق است [۴].

ایسکمی مغزی و برقراری مجدد جریان خون با القاء تولید گونه‌های اکسیژن فعال (reactive oxygen species ROS:) شناخته شده است که به نوبه خود، منجر به آسیب اکسیداتیو لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها واسیدهای نوکلئیک می‌شود. کاهش آنتی‌اکسیدان‌های بافت، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و همچنین عمل محافظتی رفتگران برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدی در مدل‌های مختلف ایسکمی مغزی نشان داده شده است [۵]. همچنین اکسیدان‌ها آغازکننده‌های مسیرهای سیگنالینگ مرگ سلولی هستند که ممکن است به آپوپتوز منجر شود.

یکی از وقایعی که به دنبال استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد، افزایش تشکیل ROS در سلول به دلیل افزایش فعالیت‌های متابولیک در میتوکندری است [۶]. افزایش ROS منجر به پروکسیده شدن لیپیدها، نیتراته شدن پروتئین‌ها، تغییر پتانسیل غشای داخلی میتوکندری و تخریب DNA می‌شود [۷]. ROS آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل گلوتاتیون را مصرف می‌کنند، می‌توانند فعالیت آنزیمی آنتی‌اکسیدان‌ها را تغییر دهند و نیز قابلیت در دسترس بودن گلوتاتیون پروکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را تحت تأثیر قرار دهند [۸]. کاهش میزان ROS می‌تواند یا به دلیل کاهش تولید آن و یا افزایش حذف کننده‌های رادیکال آزاد باشد. آسیب پمپ‌های یونی وابسته به انرژی، سبب دپلاریزه شدن سلولی و رها شدن گلوتامات به فضای خارج سلولی می‌شود. گیرنده‌ها (N-Methyl-D-aspartic acid or N-Methyl-D-aspartate) NMDA فعال شده و در نتیجه کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد، که خود مسئول تولید ROS و نیتریک اکسید (NO) است. هنگامی که NO با سوپراکسید ترکیب می‌شود، پراکسی نیتریت به وجود می‌آورد که سبب پراکسیداسیون لیپید می‌شود [۹].

طی سکته مغزی، دو پاسخ سلولی از نظر زمانی نسبت به ایسکمی در بافت مغزی اتفاق می‌افتد [۱۰]. طی ایسکمی، مغز به علت کاهش غلظت اکسیژن به گلیکولیز بی‌هوازی روی می‌آورد که این فرآیند از نظر تامین انرژی ناکارآمد است [۱۱]. این کمبود انرژی سبب بروز یکسری آبشارهای بیوشیمیایی آسیب زننده می‌شود. رادیکال‌های آزاد (تولید شده از محصولات زانتین) و پروستاگلاندین‌های ساخته شده به اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه غشای پلاسمایی حمله کرده، موجب آسیب و افزایش نفوذپذیری آن می‌شوند. زنجیره تنفسی میتوکندری، همچنین منبعی اصلی برای تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS) است و در پی تخریب عملکرد میتوکندری مرگ سلولی از نوع نکروز اتفاق می‌افتد [۱۱].

www.SID.ir

Archive of SID

موج دوم مرگ سلولی در پاسخ به ایسکمی توسط واسطه‌های التهاب نورونی اتفاق می‌افتد. طی ایسکمی میکروگلیاهای فعال شده می‌توانند سیتوکین‌های التهابی مثل IL-1β (Interleukin 1 beta) ،TNFα (Tumor necrosis factor) و ملکول‌های سیتوتوکسیک دیگری مثل NO و ROS تولید کنند [۱۲]. آستروسیت‌ها نیز مانند میکروگلیاها، قادر به تولید فاکتورهای التهابی مثل سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و NO هستند. سیتوکین‌ها بیان ملکول‌های چسبانی سلولها را افزایش داده، به طوری که ۴ تا ۶ ساعت پس از شروع ایسکمی، لکوسیت‌ها به دیواره رگ‌ها چسبیده و به بافت مغزی مهاجرت و شروع به ترشح واسطه‌های پیش برنده التهابی و آسیب ثانیه مغزی می‌کنند [۱۳]. تغییرات التهابی نورون‌ها در نهایت سبب تخریب سد خونی- مغزی، تشکیل ادم و مرگ سلولی می‌شود. بنابراین مسیرهای التهاب نورونی می‌توانند اهدافی برای پیشبرد داروها در درمان ایسکمی باشند [۱۴]. بافت مغزی به طور مناسبی با عوامل دفاعی آنتی اکسیدانت تجهیز نشده، بنابراین ROS و سایر رادیکال‌های آزاد و اکسیدان‌هایی که از سلول‌های دچار التهاب تولید می‌شوند، زندگی بافت‌های اطراف کانون ایسکمی را تهدید می‌کنند [۱۵]. نتایج حاصل از مطالعه نشان می‌دهد تیمار با عصاره اسطوخدوس باعث کاهش حجم سکته مغزی می‌شود که نشان‌دهنده‌ی کاهش میزان نکروز و آپوپتوز ناشی از سکته است.

ایسکمی مغزی موجب رها شدن بیش از حد اسید آمینه‌های تحریکی، فعال شدن گیرنده‌های آنها و در نتیجه ورود کلسیم به درون سلول، اختلالات الکتروفیزیولوژیکی و متابولیکی، پراکسیداسیون لیپید و سایر فرایندهای اکسیداتیو می‌شود [۱۶]. ایسکمی-خونرسانی مجدد (I-R)، فرایندی به نام استرس اکسیداتیو را به راه می‌اندازد که آسیب ایسکمی را تشدید می‌کند. استرس اکسیداتیو می‌تواند موجب تشکیل نیتریک اکسید و سوپر اکسید شود که آشفتگی در تولید یا متابولیسم هر یک از این دو می‌تواند عوارض آسیب‌شناسی داشته باشد [۱۷]. استرس اکسیداتیو می‌توانند به صورت مستقیم، توسط آسیب به فسفولیپیدهای غشایی و نوکلئوتیدها و به صورت غیر مستقیم، از طریق میانجی‌گری در آبشارهای سلولی سبب آسیب مغزی شود [۱۸]. بنابراین، مطالعات برای توسعه عوامل نوروپروتکتیو به منظور درمان سکته بر آنتی‌اکسیدان‌ها متمرکز شده‌اند. آنتی‌اکسیدان‌ها در بسیاری از آزمایش‌ها در محیط‌های in vitro و in vivo توسعه یافته و برخی از آنها نیز در مطالعات بالینی بررسی شده‌اند.

به دلیل فرآیند پاتولوژیک پیچیده، استفاده از تنها یک عامل در درمان ایسکمی ایده آل به نظر نمی‌رسد و بنابراین مطالعات برای یافتن ترکیبات و روش‌های مؤثر در حال گسترش می‌باشد. تا به امروز، هیچ درمان کارآمدی، به جز ترومبولیتیک نوترکیب فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی وجود ندارد که در کمتر از ۳ ساعت پس از شروع علائم ایسکمی مؤثر باشد. با توجه به اینکه مرگ سلولی آپوپتوز در فاز تأخیری ایسکمی و با سرعتی پایین اتفاق میافتد، استفاده از مهارکننده‌های آپوپتوز در مرحله بعدی درمان قرار گرفته است. در سال‌های اخیر توجه روز افزونی نسبت به گیاهان دارویی و ترکیبات فعال آنها به عنوان یک منبع بالقوه در درمان ایسکمی- خونرسانی مجدد شده است [۱۹].

اسطوخدوس از جمله گیاهانی است که از نظر فیتوشیمی به طور وسیع مطالعه شده، اما جنبه‌های درمانی این گیاه هنوز به طور کامل مورد مطالعه قرار نگرفته است. این گیاه در درمان اکثر بیماری‌های وابسته به دستگاه عصبی مرکزی مثل میگرن و صرع مؤثر است [۲۰].

از نظر غالب حکمای طب سنتی، گیاه اسطوخدوس طبیعت گرم و خشک دارد. برای تقویت ذهنی، حافظه، کنترل رشد و سرگیجه و تشنج توصیه شده است. محققان خواص متعددی درمانی از قبیل، ضد اضطراب، ضد افسردگی، ضد التهابی، ضد اسپاسم، ضد درد، ضد باکتری، ضد انگل، ضد ویروس، آرام‌بخشی، آنتی‌اکسیدانی را از این گیاه با ارزش گزارش کردند [۲۱].

از پیکر رویشی و گل‌های اسطوخدوس در معالجه افراد فلج و به کار انداختن دست و پای آنها استفاده کرده‌اند. همچنین در درمان بعضی از بیماری‌های مربوط به مغز ازجمله خون گرفتگی عروق مغزی، بیماری‌های مربوط به دستگاه عصبی و درمان روماتیسم استفاده‌های فراوانی می‌شده است [۲۲].

اسانس اسطوخدوس دارای حدود ۴۰ درصد لینالیل استات است. همچنین در آن ترکیب‌هایی نظیر اسید بو تیریک، اسید

www.SID.ir

Archive of SID

پروپیونیک و اسید والر یک، لینالول آزاد و ژرانیول وجود دارد. جداسازی برخی ترکیب‌ها نظیر لینالیل استات لینالول، کامفور، ژرانیول، کومارین، فلاونوئید و بورنئول از گیاهان این گونه گزارش شده است [۲۳].

محققان دانمارکی اثر مهارکنندگی عصاره اسطوخودوس روی آنزیم استیل کولین استراز را به اثبات رسانده و تأیید کرده‌اند [۲۴]. نتایج نشان داده که فعالیت زیاد آنزیم استیل کولین استراز و در نتیجه کاهش میزان استیل کولین و کاهش انتقال سیناپسی نیز میتواند در ایجاد آلزایمر و از بین رفتن حافظه فضایی نقش داشته باشد [۲۵].

در مطالعه‌ی رحمتی و همکاران که اثر اسانس اسطوخدوس را بر سطح نیتریک اکساید بافت مغز در موش‌های مدل صرعی بررسی کرده‌اند به این نتیجه رسیده‌اند که اسانس اسطوخدوس سطح نیتریک اکساید بافت مغزی را کاهش می‌دهد [۲۶].

در این مطالعه ما سعی کردیم با سنجش میزان ترکیبات پلی‌فنولی گیاه اسطوخدوس جمع‌آوری شده از منطقه چهارمحال و بختیاری، تأثیر این گیاه را بر میزان حجم سکته در مدل سکته‌ی مغزی موش صحرایی مورد بررسی قرار دهیم و از آنجایی‌که اثر این گیاه بر سطح نیتریک اکساید بافت مغزی مطالعه شده ولی اثر این گیاه بر سطح نیتریک اکساید سرم خون بررسی نشده است، در این مطالعه به آن می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره

گیاه اسطوخدوس (ساقه و برگ) در منطقه چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شده و نمونه‌های موردنظر توسط گیاه‌شناس در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی مورد تأیید قرار گرفت و سپس در سایه خشکانده شد. گیاه اسطوخدوس با شماره هرباریومی ۴۷۸ به مقدار ۵۰ گرم پودر شده با ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول (۹۶ درصد) به روش خیساندن عصاره‌گیری شد. پس از صاف کردن بوسیله کاغذ واتمن شماره یک، عصاره با روش تبخیر در خلاء در ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۷].

تعیین ترکیبات فنلی: برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فولین سیوکالتیو اضافه شد و پس از ۳ تا ۵ دقیقه مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر از کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در مقابل بلانک آب مقطر قرائت شد. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف اسید گالیک تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فنل تام هر عصاره بر حسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه شد [۲۷].

تعیین ترکیبات فلاونوئید: برای اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئید به طور خلاصه ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هر عصاره (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) با ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ مخلوط و مقدار ۳ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵٪ به آنها اضافه شد. پس از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونوئید هر عصاره بر حسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه شد [۲۷].

تعیین ترکیبات فلاونولی: جهت اندازه‌گیری ترکیبات فلاونولی ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هر عصاره (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) با ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ مخلوط و مقدار ۳ میلی‌لیتر استات سدیم ۵٪ به آنها اضافه شد. پس از ۲/۵ ساعت جذب نمونه‌ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۴۰ نانومتر قرائت شد. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونول هر عصاره بر حسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه شد [۲۷].

www.SID.ir

Archive of SID

حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه از نوع تجربی بوده و حیوانات با روش تصادفی ساده در گروه‌های مختلف آزمایشی قرار گرفتند. در این مطالعه از ۴۲ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند، استفاده شد. حیوانات حین و قبل از مطالعه در شرایط دوازده ساعته تاریکی- روشنایی در دمای ۲۲ درجه سیلسیوس نگهداری شدند و با غذای استاندارد موش‌های صحرایی تهیه شده از انستیتو پاستور ایران تغذیه شدند. حیوان‌ها به ۶ گروه ۷ تایی تقسیم شدند:

۱. **(Control-ischemia) گروه کنترل - ایسکمی:** گروهی که آب مقطر دریافت کرده و تحت ایسکمی مغزی کانونی سمت راست مغز قرار گرفت.

۲. **(sham) گروه شم:** گروهی که تحت جراحی بدون انسداد شریان مغزی قرار گرفت.

۳. **(ischemia+100):** گروهی که تحت جراحی ایسکمی مغزی قرار گرفته و عصاره اتانولی اسطوخدوس را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۲۷) دریافت کرد.

۴. **(ischemia+200):** گروهی که تحت جراحی ایسکمی مغزی قرار گرفته و عصاره اتانولی اسطوخدوس را با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۲۷) دریافت کرد.

۵. **(control-intact):** گروهی که تحت هیچ‌گونه جراحی قرار نگرفته و فقط آب مقطر دریافت کرد و از سرم خون آنها برای تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد.

۶. **(Intact100):** گروهی که تحت هیچ‌گونه جراحی قرار نگرفته و فقط عصاره با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم دریافت کرد و از سرم خون آنها برای تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد.

۷. **(Intact200)** گروهی که تحت هیچ‌گونه جراحی قرار نگرفته و فقط عصاره با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم دریافت کرد از و سرم خون آنها برای تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد.

عصاره به صورت داخل صفاقی و به مدت ۲۰ روز قبل از ایجاد انسداد در شریان میانی مغزی تزریق شد. دو ساعت بعد از آخرین تیمار گروه‌های ایسکمی تحت جراحی انسداد شریان مغزی قرار گرفتند و میزان حجم سکته مغزی آنها اندازه‌گیری شد و گروه‌های دست نخورده تحت بیهوشی عمیق از قلبشان خونگیری شد و تست نیتریک اکساید سرم انجام شد [۲۸].

جراحی

موش‌های صحرایی بوسیله تزریق داخل صفاقی کتامین ۵۰ mg/kg و زیلازین ۵ mg/kg مرک آلمان بیهوش شدند [۲۹]. مدل‌سازی جراحی انسداد شریان میانی مغز یا همان MCAO (middle cerebral artery occlusion) مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام شد. تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون ۰-۳ که با استفاده از حرارت سر آن گرد شده از طریق تنه شریان کاروتیدی خارجی وارد شریان کاروتیدی داخلی شد و تا رسیدن به شریان مغزی قدامی از میان شریان کاروتیدی داخلی با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده شد. در اثر تماس نخ بخیه با شریان مغزی قدامی جریان خون از هر طرف به شریان میانی مغزی بسته شد. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت [۳۰].

ارزیابی حجم آسیب بافتی ناشی از سکته مغزی

چون رت‌های مورد آزمایش عموماً بعد از ۷۲ ساعت از شروع انسداد می‌میرند، بعد از ۲۴ ساعت ارزیابی حجم آسیب بافتی انجام شد. رت‌ها با کلروفرم بیهوش شدند، بعد از جداسازی سر حیوان، مغز به سرعت خارج شده و آن را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در سالین سرد قرار دادیم، سپس مغز رت‌های مورد نظر را در ماتریکس مغز قرار دادیم و آن را به طور کرونال به مقاطع ۲ میلی‌متری برش دادیم. این مغزها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۲ درصد ۲، ۳، ۵، - تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای رنگ‌آمیزی حیاتی انکوبه شدند. سپس از برش‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال (Lumix-Panasonic, Japan) قابل اتصال به کامپیوتر عکس‌برداری شدند. آنگاه مساحت ناحیه آسیب بافتی (مناطقی که رنگ نمی‌گیرد) هر برش با استفاده از نرم‌افزار Image Tool UTHSCSA اندازه‌گیری شد و با ضرب کردن

www.SID.ir

Archive of SID

مساحت‌های مذکور در ضخامت ۲ میلی‌متر و جمع اعداد حاصل از ۸ برش حجم ناحیه آسیب بافتی محاسبه شد [۳۱].

اندازه‌گیری محتوای نیتریت و نیترات سرم

محتوای نیترات سرم خون توسط روش Navarro و همکارانش که در سال ۱۹۹۸ ارائه دادند، اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری نیتریت و نیترات بر اساس احیای نیترات به نیتریت توسط کادمیوم انجام شد. نمونه‌ها با افزودن محلول سولفات روی و هیدروکسید سدیم پروتئین‌زدایی شدند و پس از سانتریفوژ محلول رویی جدا و به آن بافر گلایسین افزوده شد. گرانول‌های کادمیوم در سولفات روی وبافر گلایسین به مدت ۵ دقیقه غلتانده شدند تا فعال شوند. سپس این گرانول‌های فعال شده به نمونه‌ها افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شدند. پس از طی زمان مزبور محلول حاصل به تیوپ‌های جدید منتقل شده و ماده واکنشگر Griess1 به نمونه‌ها افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در محیط تاریک انکوبه شدند. در نهایت ماده واکنشگر Griess2 افزوده می‌شود و بلافاصله جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد [۳۲].

آنالیز آماری

برای تحلیل آماری داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. در صورت وجود معنی‌داری از آزمون توکی جهت تعیین سطح تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد و $P< ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نرم‌افزار آماری استفاده شده SPSS 11 بود.

نتایج

استانداردسازی عصاره اتانولی اسطوخدوس

میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئید، فلاونول عصاره گیاه بر حسب میلی‌گرم بر گرم خشک عصاره در جدول شماره ۱ گزارش شده است.

اثر عصاره اسطوخدوس بر حجم آسیب ناشی از سکته مغزی

تیمار رت‌ها با عصاره اسطخودوس در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۱ روز منجر به یک کاهش معنی‌داری در حجم آسیب بافتی ناشی از سکته مغزی در ناحیه پنومبرا (کورتکس) و کانون (ساب کورتکس) مغز نسبت به گروه کنترل شد (به ترتیب، $P= ۰/۰۴۴$ و $P= ۰/۰۴۷$). از طرف دیگر در گروه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حجم کلی آسیب بافتی نسبت به کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P=0.037$). در حالی‌که دوز ۱۰۰ اثر معنی‌داری نداشت (شکل شماره ۱ و ۲).

اثر عصاره اسطوخدوس بر میزان نیتریک اکساید خون

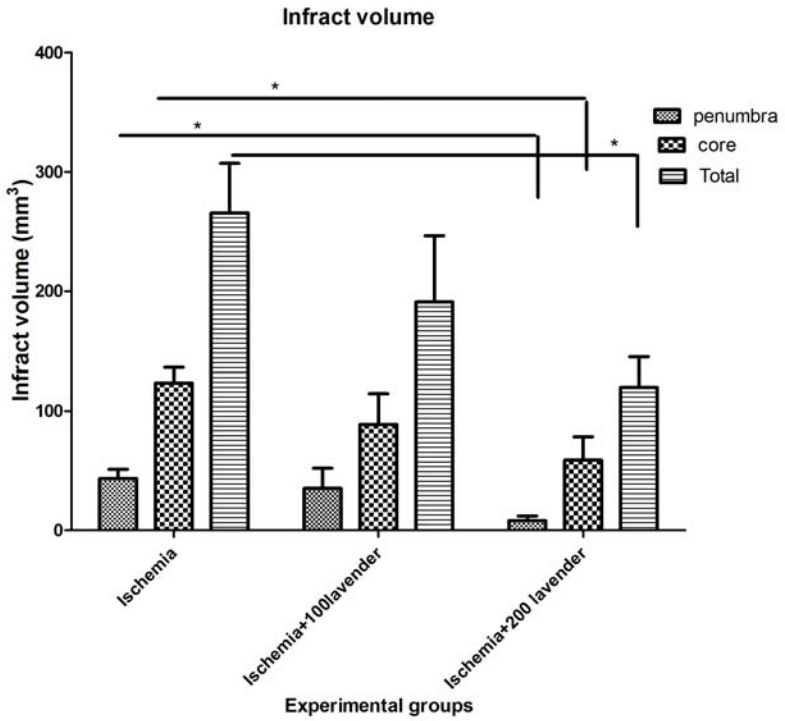
تیمار رت‌های سالم با عصاره اسطوخدوس در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۱ روز منجربه افزایش معنی‌دار میزان نیتریک اکساید خون در مقایسه با گروه کنترل می‌شود ($P<0.05$). تفاوت معنی‌داری بین گروه شم و کنترل وجود نداشت. گروه کنترل گروه سالم بدون جراحی است و گروه شم گروه جراحی شده بدون بستن شریان‌های کاروتید است (شکل شماره ۳).

جدول شماره ۱- میزان ترکیبات موجود در عصاره، فنول تام، فلاونوئید و ترکیبات فلاونول عصاره گیاه اسطوخدوس بر حسب میلی‌گرم بر گرم عصاره خشک

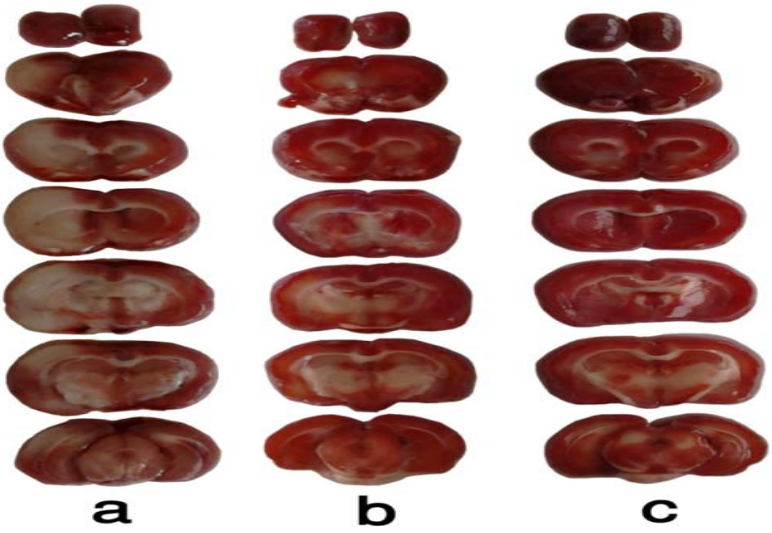
فلاونول‌ها	فلاونوئیدها	فنول تام	
۲۰/۵	۴۶/۶	۷۶/۴	عصاره اسطوخدوس
mg/g dry extract	mg/g dry extract	mg/g dry extract	mg

www.SID.ir

Archive of SID



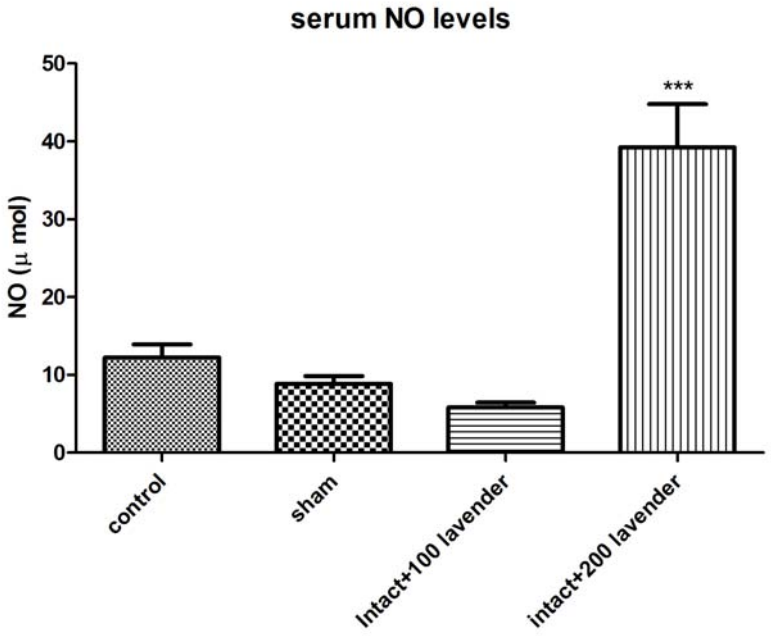
شکل شماره ۱- نمودار اثر دوزهای مختلف (کنترل، دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عصاره اسطوخدوس بر حجم آسیب ناشی از سکته مغزی در گروه‌های آزمایشی مختلف در ناحیه پنومبرا (کورتکس)، کانون (ساب کورتکس) و کل مغز را نشان می‌دهد (*P<0.05; n=7). Ischemia: گروه‌هایی که تحت انسداد شریان کاروتید قرار می‌گیرند.



شکل شماره ۲- شکل‌ها نمایانگر اثر نوروپروتکتیو عصاره اسطوخدوس بر ایسکمی کانونی مغزی هستند. همه برش‌ها با رنگ TTC، ۲۴ ساعت پس از ۶۰ دقیقه القای ایسکمی رنگ شده‌اند. هر ستون نمایانگر برش‌های کرونال مغزی یک رت هستند. a) برش‌های مغزی رتی از گروه شاهد b و c به ترتیب، برش‌های مغزی رت‌هایی از گروه‌هایی که با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن با عصاره اسطوخدوس تیمار شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۳- نمودار اثر دوزهای مختلف (کنترل، شم، دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عصاره اسطوخدوس بر سطح NO سرم خون در گروه‌های آزمایشی. Intact: گروه‌های سالم دریافت‌کننده‌ی عصاره

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که تیمار با عصاره اتانولی اسطوخدوس باعث کاهش معنی‌دار حجم سکته مغزی در رت‌های مدل سکته مغزی می‌شود.

حاج هاشمی و همکاران در مطالعه‌ای اثرات ضد التهابی عصاره‌ی هیدروالکلی و اسانس اسطوخدوس را در موش سوری مورد مطالعه قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اثرات ضد التهابی قابل توجهی ندارد ولی اسانس با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثرات خوبی بر کاهش میزان التهاب دارد. همچنین در این مطالعه اثر ضد دردی با تست فرمالین مورد بررسی قرار گرفت که عصاره هیدروالکلی اسطوخدوس اثر ضددردی معنی‌داری در فاز اولیه نشان نداده درحالی‌که در فاز تاخیری اثر ضد دردی معنی‌داری دیده شده است که این اثر در دوزهای ۴۰۰، ۸۰۰ ۱۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دیده شده است [۲۲]. برخی از شواهد نشان می‌دهد که اسانس اسطوخدوس به طور قابل توجهی فاکتور نکروز تومور (TNF-α) را در سلول‌های ماست سل جدا شده رت کاهش می‌دهد [۲۲].

عصاره اتانولی اسطوخدوس با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در موش سوری اثر آرام‌بخشی معنی‌دار بر روی سیستم عصبی مرکزی ایجاد می‌کند درحالی‌که عصاره آبی اسطوخدوس در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اثر معنی‌دار ایجاد نمی‌کند [۳۳].

در مطالعه‌ای دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره اسطوخدوس باعث مهار چشمگیر حملات صرعی ناشی از PTZ در موش‌های صحرایی شده. همچنین عصاره اسطوخدوس با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی که دارد در دوز ۴۰۰ میلی‌گرم باعث کاهش چشمگیر سطح مالون دی آلدهید بافت مغز شده است. عصاره اسطوخدوس در ۳ دوز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم باعث کاهش سطح NO موجود در بافت مغز می‌شود [۳۴].

در مطالعه‌ی ربیعی و همکاران که به بررسی اثر عصاره گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

اسطوخدوس بر نفوذپذیری سد خونی مغزی در رت‌های مدل ایسکمی پرداخته اند نتایج نشان می‌دهد تیمار با عصاره اسطوخدوس باعث کاهش معنی‌داری در میزان نفوذپذیری سد خونی مغزی شده و همچنین این عصاره باعث کاهش معنی‌دار در سطح مالون دی آلدهید سرم شده است.

NO در غلظت‌های فیزیولوژیکی به عنوان یک نوروترانسمیتر گازی شکل و در غلظت‌های بالا، عامل آسیب‌های پاتولوژیکی بسیاری از بیماری‌هاست [۳۵]. سه ایزوفرم NOS تا کنون شناخته شده است: نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS)، نورونی (nNOS) و القاپذیر (iNOS). پس از ایسکمی تمام انواع NOS دچار تنظیم مثبت شده و NO افزایش پیدا کرده به سرعت با رادیکال‌های سوپراکسید واکنش داده و سبب تولید پراکسی نیتریت و سایر گونه‌های واکنشی نیتروژن می‌شود [۳۶، ۳۵] که لیپیدها، DNA و پروتئین‌ها را دچار نیتراسیون کرده و آسیب‌رسان هستند. آزمایشات نشان داده که فعال شدن nNOS و iNOS نوروتوکسیک، ولی فعال شدن eNOS، توسط مهار کاهش جریان خون مغزی، نوروپروتکتیو است [۳۵].

در مطالعه‌ی رحمتی و همکاران نشان داده شده که تیمار با عصاره اسطوخدوس به طور چشمگیری سطح NO مغزی را کاهش می‌دهد در حالی‌که رت‌های دریافت‌کننده‌ی پنتیلن تترازول سطح نیتریک اکساید مغزی افزایش نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ی Costantino Iadecola نشان داده شده است که بیان mRNA مربوط به iNOS در گروه شم به میزان کمی بوده همچنین میزان بیان این ژن در گروه کنترل نیز به میزان کمی بوده است و بعد از ایسکمی میزان بیان ژن iNOS به میزان چشمگیری افزایش یافته است [۳۷].

در مطالعه‌ی S Love نشان داده شده است که ایسکمی مغزی باعث کمی کاهش در سطح eNOS می‌شود در حالی‌که باعث افزایش قابل توجهی در میزان nNOS و iNOS می‌شود [۳۸].

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد تیمار با عصاره اسطوخدوس با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم باعث افزایش معنی‌دار سطح نیتریک اکساید اندوتلیالی (eNOS) شده که با مهار کاهش جریان خون مغزی در طی ایسکمی و خونرسانی مغزی اثرات محافظت نورونی نشان می‌دهد در این مطالعه که فقط از رت‌های گروه کنترل، شم و گروه‌های سالم که فقط عصاره دریافت کرده‌اند برای اندازه‌گیری eNOS استفاده شده است نتایج نشان می‌دهد که سطح eNOS در گروه کنترل سالم که فقط آب مقطر دریافت کرده‌اند و گروه شم که جراحی بدون بستن شریان‌های کاروتید داشتن افزایش نداشته است.

عصاره اسطوخدوس حاوی ترکیبات مؤثره متعدد از جمله مونوترپن و سزکویی ترپن‌ها مانند لینالول، لینال استات و فلاونوئیدهایی مثل لوتئولین است و احتمالاً تأثیر این گیاه را بر مناطق مختلف سیستم عصبی تقویت می‌کند.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که این گیاه ممکن است اثرات حفاظت مغزی مفیدی داشته باشد که این اثرات احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه می‌باشد که در نتیجه‌ی آن سطح نیتریک اکساید اندوتلیالی که یک فاکتور نوروپروتکتیو است افزایش پیدا کرده و آسیب‌های ناشی از ایسکمی- خونرسانی مجدد را از طریق مهار استرس اکسیداتیو کاهش می‌دهد.

منابع

1. Bhuiyan MIH and Kim YJ. Mechanisms and prospects of ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning. *Int. Neurourol J.* 2010; 14 (4): 203.

2. Lakhan SE, Kirchgessner A and Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J. Transl. Med.* 2009; 7 (1): 97.

3. Warner DS, Sheng H and Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J. Exp. Biol*. 2004; 207 (18): 3221.

4. Crack PJ and Taylor JM. Reactive oxygen

www.SID.ir

Archive of SID

species and the modulation of stroke. *Free Radic. Biol.* 2005; 38 (11): 1433 - 44.

5. Asgharzade S, Rabiei Z and Rafieian-kopaei M. Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* Extract on Memory Impairment Induced by Scopolamine in Rat. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 2015; 5 (10): 792 - 5.

6. Rabiei Z, Mokhtari S, Asgharzade S, Gholami M, Fathi F and Rafieian-kopaei M. Effects of *Matricaria chamomilla* extract on motor coordination impairment induced by scopolamine in Rat. *Asian Pac. J. Trop Biomed* 2015; 5 (10): 845 - 51.

7. Moopanar TR and Allen DG. Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca2+ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 C. *J. Physiol*. 2005; 564 (1): 189 - 99.

8. Vincent AM, Russell JW, Low P and Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr. Rev*. 2004; 25 (4): 612 - 28.

9. Shalak L, Perlman JM. Hypoxic–ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum*. 2004; 80 (2): 125 - 41.

10. Parsaei P, Karimi M, Asadi SY and Rafieian-Kopaei M. Bioactive components and preventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on postlaparotomy intra-abdominal adhesion in rats. *Int J Surg.* 2013; http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2013.08.014

11. Broughton BR, Reutens DC and Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009; 40 (5): e331-e9.

12. Vannucci RC, Brucklacher RM and Vannucci SJ. The effect of hyperglycemia on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. *JCBFM.* 1996; 16 (5): 1026 - 33.

13. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg* 1992; 77 (2): 169 - 84.

14. Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH and Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J. Clin. Invest*. 2007; 117 (4): 910 - 8.

15. Lakhan SE, Kirchgessner A and Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J. Transl. Med*. 2009; 7 (1): 97.

16. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 1999; 79 (4): 1431 - 568.

17. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J*. 2003; 44 (2): 85-95.

18. Margaill I, Plotkine M and Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic. Biol*. 2005; 39 (4): 429 - 43.

19. Faraci FM. Protecting against vascular disease in brain. *Am. J. Physiol*. 2011; 300 (5): 1566-82.

20. Jivad N and Rabiei Z. Review on herbal medicine on brain ischemia and reperfusion. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 2015; 5 (10): 789 - 95.

21. Kim HM and Cho SH. Lavender oil inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats. *J. Pharmacy Pharmacol*. 1999; 51: 221 -26.

22. Gamez MJ, Jimenez J, Navarro C and Zarzuelo A. Study of essential oil of *Lavendula dentata* L. *Pharmazie*. 1990; 45 (1): 69 - 70.

23. Hajhashemi V, Ghannadi A and Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of Lavandula angustifolia Mill. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 89 (1): 67 - 71.

24. Rabiei Z, Rafieian-Kopaei M, Mokhtari S, Alibabaei Z and Shahrani M. The effect of pretreatment with different doses of Lavandula officinalis ethanolic extract on memory, learning and nociception. *Biomed & Aging Patholy*. 2013; 4 (1): 71 - 6.

25. Adsersen BG, Gudiksen L and Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol*. 2006; 104: 418 - 22.

26. Alvarez A, Opazo C, Alarco AR, Garrido J and Inestrosa NC. Acetylcholinesterase promotes the

www.SID.ir

Archive of SID

aggregation of the amyloid-β-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol*. 1997; 272: 348 - 61.

27. Rahmati B, Khalili M, Roghani M and Ahghari P. Anti-epileptogenic and antioxidant effect of Lavandula officinalis aerial part extract against pentylenetetrazol-induced kindling in male mice. *J. Ethnopharmacol*. 2013; 148 (1): 152 - 7.

28. Rabiei Z, Rafieian-Kopaei M, Mokhtari S, Alibabaei Z and Shahrani M. The effect of pretreatment with different doses of Lavandula officinalis ethanolic extract on memory, learning and nociception. *Biomed & Aging Patholy* 2013; 4 (1): 71 - 76.

29. Rabiei Z, Bigdeli M, Mohagheghi F and Rasolian B. Relationship between dietary virgin olive oil on brain cholesterol, cholesteryl ester and triglyceride levels and Blood Brain Barrier (BBB) permeability in a rat stroke model. *J. Physiol. Pharmacol.* 2012; 16: 245 - 54.

30. Adsersen BG, Gudiksen L and Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol*. 2006; 104: 418 - 22.

31. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S and Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20: 84 - 91.

32. Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Heidarianpour A, Rasoulian B, Asgari AR, Pourkhalili K and Khoshbaten A. Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-α level. *Exp. Neurol*. 2008; 212: 298 - 306.

33. Navarro-Gonzálvez JA, García-Benayas C and Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clinical Chem*. 1998; 44 (3): 679 - 81.

34. Alnamer R, Alaoui K, Bouididael H, Benjouad A and Cherrah Y. Sedative and Hypnotic Activities of the Methanolic and Aqueous Extracts of Lavandula officinalis from Morocco. *Adv. Pharmacol. Sci*. 2012; 5: 1 - 5.

35. Asgharzade S, Rafieian-kopaei M, Mirzaeian A, Reiisi S and Salimzadeh L. *Aloe vera* toxic effects: expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in testis of Wistar rat. *Iran. J. Basic. Med. Sci*. 2015; 18 (10): 967 - 73.

36. Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N and et al. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol. Cancer Bio*. 2007; 6 (6): 1718 - 27.

37. Iadecola C ,Zhang F, Xu S, Casey R and Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1995; 15 (3): 378 - 84.

38. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol*. 1999; 9 (1): 119 - 31.

www.SID.ir