

## اثر عصاره گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) بر غلظت مالون دی آلدئید در مواجهه با استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق درون بطنی مغزی استرپتوزوتوسین در موش های صحرائی نر

شهرام شاه محمدی<sup>۱</sup>، مریم خسروی<sup>۲</sup>، اکبر حاجی زاده مقدم<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال

<sup>۲</sup> استادیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال

<sup>۳</sup> استادیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

### چکیده

**سابقه و هدف:** استرس اکسیداتیو نتیجه عدم تعادل بین سیستم های اکسیداتیو و آنتی اکسیدان بدن می باشد. استرس اکسیداتیو در مغز موجب اختلال در عملکرد مغز، تخریب نورون ها و بیماریهایی چون آلزایمر می شود. در این مطالعه تجربی ما اثر حفاظتی عصاره گیاه مریم گلی را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از استرپتوزوتوسین در مغز موش های صحرائی مورد بررسی قرار دادیم. **روش بررسی:** در این تحقیق موش های صحرائی نر نژاد ویستار، در گروه های کنترل، شم و تجربی تقسیم شدند. عصاره مریم گلی با غلظت های ۲۵ mg/kg، ۵۰ و ۱۰۰، به مدت ۳ هفته روزانه به صورت درون صفاقی تزریق شد. در پایان هفته دوم، جراحی جهت کانون گذاری در بطن راست انجام گرفت و در پایان هفته سوم، استرپتوزوتوسین (STZ) با غلظت ۳ mg/kg در بطن راست مغز تزریق شد. در پایان هفته چهارم مغز موش ها خارج شد و در پایان سطح مالون دی آلدئید (MDA) در بافت نیمکره های مغز اندازه گیری شد. **یافته ها:** در گروه دریافت کننده STZ سطح MDA به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل و شم افزایش یافت ( $P < 0/001$ )، در حالی که تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره برگ گیاه مریم گلی، به طور معنی داری سطح MDA را نسبت به گروه دریافت کننده STZ کاهش داد ( $P < 0/001$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج نشان می دهد که عصاره مریم گلی می تواند از استرس اکسیداتیو القا شده با تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین در بافت نیمکره های مغز موش صحرائی جلوگیری نماید.

**واژگان کلیدی:** استرس اکسیداتیو، مریم گلی، استرپتوزوتوسین، مالون دی آلدئید، موش صحرائی.

### مقدمه

موجب آسیب به اجزای سلولی مانند پروتئین ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک می شود. استرس اکسیداتیو بیش از حد موجب حتی می تواند منجر به آپوپتوز و نکروز شود (۱). عدم تنظیم متابولیسم ROS می تواند عمل صحیح میتوکندری و سلول را به شدت تحت تأثیر قرار دهد. ارتباط بین افزایش تولید ROS میتوکندریایی و بعضی آسیب ها مانند آسیب آندوتلیال (۲)، نورودژنراسیون (۳)، پیرشدن سلول (۴)، ایسکمی - ریپرفیوژن مغزی (۵) و دیابت (۶) ثابت شده است.

استرس اکسیداتیو در بدن نشان دهنده عدم تعادل بین تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) و توان دفاع آنتی اکسیدانی برای سم زدایی این واسطه های فعال می باشد. افزایش ROS

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، دکتر مریم خسروی

(email: maryam.khosravi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۲/۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۳/۸

هفته بعد از انتقال موش ها به مکان حیوان خانه انجام شدند. همه آزمایشات با پیروی از قوانین و مقررات مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت که مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه مازندران بودند. برگ گیاه مریم گلی پس از خشک شدن به دور از نور مستقیم خورشید توسط آسیاب به پودر تبدیل شد. تهیه عصاره به شیوه خیساندن (Maceration) انجام گرفت (۱۶). مقدار ۱۰۰ گرم از پودر خشک گیاه با ۶۰۰ میلی لیتر اتانل ۷۰٪ در ارلن ریخته شده و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت محلول توسط کاغذ صافی (واتمن شماره ۱)، صاف گردید. محلول صاف شده جهت حذف حلال در دستگاه روتاری (Heidolph WD 2000, Brinkmann, Canada) با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. عصاره پس از غلیظ شدن در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا به عصاره خشک تبدیل گردد. وزن عصاره خشک مورد استفاده در این آزمایش ۸ گرم بود. با استفاده از آب مقطر غلظت‌های ۲۵ mg/kg، ۵۰ و ۱۰۰ از عصاره تهیه شد (۱۷). استرپتوزوتوسین (New life Science, USA) با محلول سالین به غلظت ۳ mg/kg تهیه گردید (۱۸).

موش‌ها به ۶ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه اول: گروه کنترل که فقط آب و غذا دریافت کردند؛ گروه دوم: گروه شم که سالین (حلال STZ) را بصورت i.c.v. دریافت کردند؛ گروه سوم: دریافت کننده STZ (۳ mg/kg)؛ گروه چهارم تا ششم: دریافت کننده STZ (۳ mg/kg) که عصاره را به ترتیب با غلظت های ۲۵ mg/kg، ۵۰ و ۱۰۰ بصورت درون صفاقی دریافت نمودند.

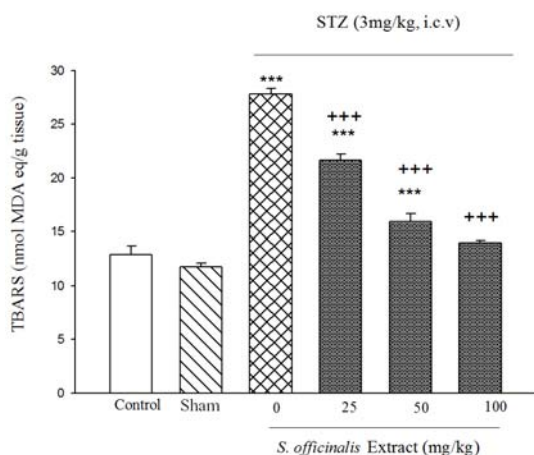
تزریق عصاره با غلظت‌های مختلف به صورت روزانه به مدت سه هفته و به شیوه درون صفاقی انجام گرفت. در پایان هفته دوم تزریق، موش‌ها ی گروه شم و تجربی جراحی شده و کانول گذاری در بطن راست مغز انجام گرفت. در آن مرحله، حیوانات با تزریق محلول زایلازین (۴ mg/kg) و کتامین (۵۰ mg/kg) بیهوش شده و جهت تثبیت و مختصات برداری در دستگاه استرنوتکسی (Stoelting, USA) قرار گرفتند. با استفاده از اطلس واتسون و پاکسینوس (۱۹) محل کانول گذاری (بطن راست مغز) با مختصات (۰/۸ میلی متر از برگما، ۱/۴ میلی متر از شیار میانی به طرف بطن جانبی راست و ۳/۶ میلی متر از سطح جمجمه به عمق) مشخص شد و کانول راهنمای شماره ۲۱ در جمجمه قرار داده شد. سپس با استفاده از سیمان دندانپزشکی کانول راهنما روی جمجمه ثابت گردید.

مالوندی آلدئید (MDA) محصول کوچک اما پایدار پراکسیداسیون لیپیدی است که از تجزیه پراکسیدهای ناپایدار اسیدهای چرب غیراشباع ایجاد شده است. غلظت دقیق MDA با کروماتوگرافی تعیین می‌شود. همچنین MDA به روش کلرومتری با استفاده از واکنشی که با اسید تیوباربتوریک می‌دهد تعیین می‌شود (۷). استروپتوزوتوسین (STZ) ماده‌ای شیمیایی است که به واسطه تخریب سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس، از آن برای درمان سرطان پانکراس استفاده می‌شود. تزریق این ماده به صورت درون صفاقی موجب القاء سریع دیابت و به صورت درون بطن مغزی (i.c.v.) باعث افزایش شاخص‌های اکسیداتیو در مغز می‌شود (۸).

مریم گلی *Salvia officinalis L.* یکی از گیاهان معطر از خانواده Lamiaceae است که در نقاط مختلفی از مدیترانه و آسیا می‌روید. با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات دارویی سنتی مریم گلی، این گیاه به اکسیر شهرت دارد. از این گیاه به عنوان ضد التهاب و ضد تعریق و تب استفاده می‌شود؛ همچنین به عنوان ضد اسپاسم، ضد عفونی کننده، ضد باکتری و قابض است و برای حفظ پوست و مو، مراقبت در برابر روماتیسم و ناتوانی جنسی، مشکلات قاعدگی و یائسگی، برای درمان بیماری‌های عصبی و روحی مفید می‌باشد (۹-۱۱). تاکنون تحقیقات متعددی اثرات ضد التهابی (۱۲)، ضد توموری (۱۳) و نیز آنتی اکسیدانی (۱۴-۱۵) این عصاره را گزارش نموده‌اند. در ادامه تحقیقات فوق، با توجه به اینکه اثر آنتی اکسیدانی عصاره مریم گلی در بافت مغز تا به حال مورد تحقیق قرار نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش حفاظتی عصاره هیدروالکلی مریم گلی در مقابل استرس اکسیداتیو القاء شده با تزریق درون بطنی STZ با اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی در نیمکره های مغز موش‌های صحرایی نر انجام شد.

## مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰ - ۲۵۰ گرم از پژوهشکده انستیتو پاستور آمل خریداری و به اتاق حیوانات گروه زیست شناسی دانشکده علوم مازندران انتقال داده شدند. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $24 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در طول دوره آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. به منظور سازگاری با محیط جدید، آزمایشات یک



شکل ۱. بررسی اثر تزریق درون بطنی مغزی STZ به تنهایی و یا به همراه تزریق درون صفاقی عصاره برگ گیاه مریم گلی بر غلظت MDA در بافت نیمکره های مغز. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار بیان شده است.  $n=8$ .  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل و  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه دریافت کننده STZ.

## بحث

مطالعه حاضر نشان داد که تزریق STZ، تغییرات معنی داری را در سیستم آنتی اکسیدانی در مغز موش ایجاد کرده، درحالی که تجویز عصاره مریم گلی قبل از تزریق STZ پاسخ آنتی اکسیدانی سلول های مغزی را افزایش داد. تزریق STZ در بطن های مغزی مدل رایجی است که برای توضیح مدل حیوانی بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار می گیرد. ROS در آسیب های سیستم عصبی مرتبط با پیری مانند آلزایمر نقش مهمی دارد (۲۱). مطالعات گذشته نشان داده اند تزریق درون مغزی STZ منجر به افزایش پروتئین تائو و  $\beta$  آمیلوئید در مغز شده و افزایش شکل گیری  $\beta$  آمیلوئید موجب افزایش فرایند التهاب و ایجاد رادیکال های آزاد می شود (۲۲). افزایش رادیکال های آزاد به تدریج سطح MDA و پراکسیداسیون لیپیدی را در سلول های عصبی افزایش می دهد که می تواند به مرگ سلولی منجر شود (۲۲). همان طور که در تحقیقات گذشته نشان داده شد، تزریق درون مغزی STZ در دوزهای پایین موجب افزایش سطح MDA در مغز موش های صحرایی می شود (۲۳). در این تحقیق نیز سطح MDA در مغز گروه های دریافت کننده STZ به طور معنی داری افزایش یافت. گیاه مریم گلی دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند رزمارینیک اسید (rosmarinic acid) و دیگر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است که ویژگی های درمانی گوناگونی دارند (۲۴). فلاونوئیدها می توانند رادیکال های آزاد را پاک سازی کنند

در پایان هفته سوم، تزریق STZ با دوز ۳ میلی گرم بر کیلوگرم به حجم ۲۰ میکرولیتر (۲۰) در بطن راست انجام گرفت. تزریق با سرسنگ شماره ۲۷ و توسط سرنگ هامیلتون ۵۰ میکرولیتری (Hamilton, Swiss) انجام گرفت. در پایان هفته چهارم همه گروه ها تشریح شدند و نیمکره های مغز جدا شده و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند و سپس در زمان مناسب توسط بافر فسفات سالین (PH=7.4) هموژناسیون انجام گرفت و پس از سانتریفیوژ (Hettich-Universal 320, Germany) محلول رویی جهت بررسی های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه گیری میزان MDA به روش استرابوئر و چیسمن (۱۹۹۰) انجام گرفت. در این روش محلول رویی بافت مغز پس از خارج کردن از فریزر به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس به ۱ میلی لیتر از محلول رویی، محلول های تری کلرواستیک اسید (۱ میلی لیتر، ۲۰٪) و تیوباربیتوریک اسید (۲ میلی لیتر، ۰/۶۷٪) اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند. سپس محلول از حمام آب جوش خارج شده، سرد شده و پس از سانتریفیوژ (۱۰۰۰ دور در ۱۵ دقیقه) و جدا نمودن رسوب، محلول رویی در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و MDA در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری شد. به منظور بررسی تفاوت های موجود بین گروه های تجربی و کنترل از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. همچنین از آزمون تعقیبی مناسب (Tukey) در سطح معنی داری  $P < 0.05$  برای بررسی تفاوت بین گروهی استفاده شد. تحلیل های آماری به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام شد.

## یافته ها

سطح پراکسیداسیون لیپیدی گروه های تجربی در شکل ۱ آمده است. با توجه به نتایج به دست آمده سطح MDA هموژنات مغز در مقایسه با گروه کنترل و شم به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0.001$ ). پیش درمانی عصاره هیدروالکلی مریم گلی در غلظت های ۵۰، ۲۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، سطح MDA را در مقایسه با گروه دریافت کننده STZ به طور معنی داری کاهش داد ( $P < 0.001$ ) که این کاهش وابسته به دوز بود. بیشترین مقدار کاهش MDA، در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود که این گروه با گروه کنترل، اختلاف معنی داری نداشت.

تحقیقات قبلی نشان داد تجویز عصاره مریم گلی پیش از تزریق STZ می‌تواند سطح MDA را در مغز موش به طور معنی‌داری کاهش دهد که احتمالاً به خاطر وجود ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی موجود در عصاره و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی بوده و این نتایج گزارشات قبلی را تأیید می‌کند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از خانم‌ها زهرا اسماعیلی فرد و سهیلا شهسوار به خاطر کمک‌های ارزنده‌شان در انجام کارهای آزمایشگاهی تشکر می‌کنند. همچنین از گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران که با در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری نهایت همکاری را داشتند، قدردانی می‌شود.

(۲۵). ترکیبات فنولی می‌توانند یک اتم هیدروژن را از گروه OH آروماتیک به رادیکال آزاد داده و آن را خنثی کنند (۲۶). پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد توسط ترکیبات فنولی برای ویژگی آنتی‌اکسیدانی آنها بسیار اهمیت دارد و می‌تواند با شکستن واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد، از شروع آن جلوگیری کند. ترکیبات فنولیک اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را در بدن موجودات زنده، احتمالاً با تحریک سیستم دفاعی اندوژن آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌کنند (۲۷-۲۵). نتیجه بعضی از تحقیقات نشان داده است عصاره مریم گلی با توانایی آنتی‌اکسیدانی خود از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کند (۲۸) و اثرات هیپوگلیسمی و آنتی‌هیپرلیپیدمی مریم گلی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی گزارش شده است (۲۹). همچنین ترکیبات فنولی عصاره مریم گلی می‌تواند چه به صورت وابسته به آنزیم و یا مستقل از آنزیم، از پراکسیداسیون لیپیدی لیپوزوم‌ها جلوگیری کند (۳۰). مطالعات ما نیز در ادامه

### REFERENCES

- Rosenfeldt F, Wilson M, Lee G, Kure C, Ou R, Braun L, de Haan J. Oxidative stress in surgery in an ageing population: pathophysiology and therapy. *Exp Gerontol* 2013; 48:45-54.
- Widlansky M.E, Gutterman D.D. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal* 2011; 15: 1517-30.
- Orsucci D, Mancuso M, Ienco EC, LoGerfo A, Siciliano G. Targeting mitochondrial dysfunction and neurodegeneration by means of coenzyme Q10 and its analogues. *Curr Med Chem* 2011; 18: 4053-64.
- Terzioglu M, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction in mammalian ageing. *Novartis Found Symp* 2007; 287:197-208.
- Chen SD, Yang DI, Lin TK, Shaw FZ, Liou CW, Chuang YC. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 7199-215.
- Naudi A, Jove M, Ayala V, Cassanye A, Serrano J, Gonzalo H, et al. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. *Exp Diab Res* 2012; 2012: 1-14.
- Tug T, Karatas F, Terzi S.M. Antioxidant vitamins (A, C and E) and malondialdehyde levels in acute exacerbation and stable periods of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Investig Med* 2004; 27: 123-28.
- Salkovic-Petrisic M. Amyloid cascade hypothesis: is it true for sporadic Alzheimer's diseases. *Periodicum Biologorum* 2008; 110:17-25.
- Wang M, Kikuzaki H, Zhu N, Sang S, Nakatani N, Ho CT. Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis L.*). *J Agric Food Chem* 2000; 48:235-38.
- Lu YR, Foo LY. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 1999; 51: 91-94.
- Dweck AC. The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. In: Kintzios SE, Editor. *SAGE - The Genus Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. P.1-25.
- Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis L.* leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 2001; 75:125-32.
- Bidmeshkipour A, Keshavarz M, Mostafaie A. Anti tumor activity of *Salvia officinalis* is due to its anti-antigenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *Yakhteh* 2011; 4: 477-82.
- Grzegorzczak I, Matkowski A, Wysokinska H. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis L.* *Food Chemistry* 2007; 104: 356-341.
- Capek P, Machova E, Turjan J. Scavenging and antioxidant activities of immunomodulating polysaccharides isolated from *Salvia officinalis L.* *Int J Biol Macromol* 2009; 44: 75-80.

16. Kermanshah H, Hashemi-Kamangar S, Mirsalehian A, Kamalinejad M, Karimi M, et al. Antibacterial effect of Hydroalcoholic extract of *Salvia Officinalis* and *Achillea millefolium* against cariogenic microorganisms. The Journal of Islamic Dental Association of Iran 1388; 21: 215-20.
17. Eidi M, Eidi A, Bahar M. Effect of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. Nutrition 2006; 22: 321–326.
18. Müller D, Nitsch RM, Wurtman RJ, Hoyer S. Streptozotocin increases free fatty acids and decreases phospholipids in rat brain. J Neural Transm 1998; 105:1271-81.
19. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1986.
20. Weerateerangkull P, Praputpittaya C, Banjerdpongchai R. Effects of Ascorbic Acid on Streptozotocin-induced Oxidative Stress and Memory Impairment in Rats. TJPS 2008; 20: 54-68.
21. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long term diminution in learning and memory abilities and cerebral energy metabolism in adult rats. Behav Neurosci 1998; 112: 1199-208.
22. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Effect of Naringenin on Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Cognitive Deficits in Rat: A Behavioural Analysis. Pharmacol 2006; 78: 193–97.
23. Blokland A, Jolles J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. Pharmacol Biochem Behav 1994; 47: 833–37.
24. Lima CF, Carvalho F, Fernandes E, Bastos M, Santos-Gomes P, Fernandes-Ferreira M, et al. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. Toxicology in Vitro 2004; 18:457-65.
25. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med 1996; 20: 933-56.
26. Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2000; 3: 447-51.
27. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. Ann NY Acad Sci 1998; 854:435-42.
28. Cuppett SL, Hall CA, editors. Antioxidant activity of the Labiatae. In advances in food and nutrition research. London: Academic Press; 1998. P.245-71.
29. Ninomiya K, Matsuda H, Shimoda H, Nishida N, Kasajima N, Yoshino T, Morikawa T, Yoshikawa M. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. Bioorg Med Chem Lett 2004 19; 14:1943-46.
30. Zupko I, Hohmann J, Redei D, Falkay G, Janicsak G, Mathe I. Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. Planta medica 2001; 67: 366-68.