DOI: 10.22122/jims.v36i475.9563 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۷۵/هفته‌ی سوم خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۱ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۳/۱۵

اثرات حفاظتی عصاره‌ی عناب در برابر نفوذپذیری سد خونی– مغزی، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در مدل سکته‌ی مغزی

فیروزه علویان[۱]، سعیده قیاسوند[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: عناب، گیاهی دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی است که در سرتاسر جهان به عنوان غذا و دارو مصرف می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد عصاره‌ی عناب، سبب سرکوب التهاب و کاهش آسیب استرس اکسیداتیو است. با توجه به این که سکته‌ی مغزی سومین عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه‌یافته است، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرات حفاظت نورونی عصاره‌ی عناب در برابر آسیب ناشی از سکته‌ی مغزی بر روی استحکام سد خونی- مغزی و فعالیت دو آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، از ۱۵ گروه ۷ تایی Rat نر نژاد Wistar استفاده شد که عبارت از دو گروه شاهد سالین، دو گروه Sham، دو گروه سکته‌ی مغزی، گروه‌های سالم و سکته با دوزهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روزانه از عصاره‌ی عناب بودند. پس از ۳۰ روز تیمار خوراکی، حیوانات به مدت ۶۰ دقیقه در معرض انسداد شریان مغز میانی قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت از برقراری جریان خون مجدد، میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز نواحی کورتکس و هیپوکمپ و همچنین، نفوذپذیری سد خونی- مغزی بررسی شد.

یافته‌ها: تجویز خوراکی عصاره‌ی عناب در دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در مدل سکته‌ی مغزی سبب کاهش نفوذپذیری سد خونی- مغزی در کورتکس شد. دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عناب در کورتکس و هیپوکمپ و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در هیپوکمپ، فعالیت کاتالاز را افزایش دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این مطالعه، به وضوح نشان می‌دهد که عناب دارای پتانسیل قابل‌توجهی در پیش‌گیری از سکته‌ی مغزی می‌باشد.

واژگان کلیدی: سکته‌ی مغزی، عناب، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز

ارجاع: علویان فیروزه، قیاسوند سعیده. **اثرات حفاظتی عصاره‌ی عناب در برابر نفوذپذیری سد خونی- مغزی، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در مدل سکته‌ی مغزی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۵): ۳۸۵-۳۷۹

مقدمه

سکته‌ی مغزی از عوامل اصلی مرگ و ناتوانی طولانی مدت در جهان است. با توجه به اهمیت و گستردگی عوارض این بیماری، در چند سال گذشته تلاش‌های زیادی برای توسعه‌ی روش‌های درمانی انجام شده است و چندین عامل حفاظت نورونی شناخته شده است که هیچ کدام از آن‌ها به طور کامل کارآمد نیستند (۱). در واقع، بافت مغزی به خوبی با عوامل دفاعی آنتی‌اکسیدانت مجهز نشده است. بنابراین، گونه‌های آزاد اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) و سایر رادیکال‌های آزادی که از سلول‌های آسیب دیده تولید می‌شوند، فعالیت حیاتی بافت‌های اطراف کانون ایسکمی را تهدید می‌کنند (۲).

در حال حاضر، مؤثرترین درمان برای سکته‌ی مغزی، استفاده از فعال کننده‌ی پلاسمینوژن بافتی نوترکیب (Recombinant tissue plasminogen activator یا rt-PA)، حداکثر ۴-۳ ساعت پس از وقوع سکته است که به علت مدت زمان کوتاه درمانی، بیشتر بیماران نمی‌توانند در این زمان خود را به بیمارستان برسانند. همچنین، یکی از عوارض استفاده از این دارو، وقوع خونریزی داخل جمجمه‌ای است (۳).

استحکام سد خونی- مغزی (Blood-brain barrier یا BBB) در حفاظت عصبی نقش به سزایی دارد و با وقوع سکته، ثبات این سد دگرگون می‌شود. مکانیسم‌های مختلفی مانند سمیت سلولی ناشی از

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: فیروزه علویان

Email: f.alavian@cfu.ac.ir

گلوتامات، تولید ROS، فعال شدن نیتریک اکسید سنتتاز القایی و انتشار عوامل سیتوتوکسیک از عوامل درگیر در شکستن BBB طی سکته هستند. استرس اکسیداتیو ناشی از انسداد شریان مغز میانی (Middle cerebral artery occlusion یا MCAO) با تولید بیش از حد ROS سبب تحریک سیستم‌های آنتی‌اکسیدان درون‌زاد و آسیب بیشتر نورونی می‌شود و به واسطه‌ی کاهش بیان پروتئین‌های اتصالی کلودین و آکلودین و کاهش سطح مولکول‌های چسباننده‌ی غشایی، افزایش بیان Aquaporin-4 (AQP-4 یا آکوپورین‌ها، کانال‌های آبی هستند که در زمان سکته‌ی مغزی بیان آن‌ها افزایش می‌یابد و موجب افزایش BBB می‌شوند) و ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (Matrix metalloproteinase-9 یا MMP-9) در یکپارچگی BBB خلل ایجاد می‌کند. عامل Zonal occludens-1 (ZO-1) نیز که به پروتئین‌های غشایی سد متصل است، به دنبال تحریکات پاتولوژیکی استرس اکسیداتیو ناشی از سکته و به واسطه‌ی فعال شدن پروتئین کیناز C، فسفریله می‌شود و به دنبال آن، اتصالات محکم BBB باز می‌شود. از سوی دیگر، ROS با تغییر وضعیت ریداکس سلول‌ها، موجب کاهش آنزیم‌های مسؤول بازسازی DNA، فعال شدن Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF-κB) و مسیرهای التهابی می‌شود (۵-۴).

آنتی‌اکسیدان‌ها را می‌توان به عنوان عوامل دفاعی بدن در برابر اکسیدان‌ها و حفظ تعادل اکسید و احیا در نظر گرفت. از فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های بدن می‌توان به گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase یا GPX) و کاتالاز اشاره کرد. GPX سبب تجزیه‌ی هیدروپراکسیدهای لیپیدی به الکل‌های خاص و تجزیه‌ی H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌شود. کاتالاز نیز یکی از فراوان‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسی‌زوم‌ها است و سبب تجزیه‌ی H_2O_2 می‌شود (۶).

مطالعات متعددی تأثیر انواع رژیم‌های غذایی بر روی روند پیشرفت سکته را مورد مطالعه قرار داده‌اند (۷). از بین گیاهان دارویی- تغذیه‌ای، عناب که اغلب در مناطق نیمه گرمسیری و گرمسیری آسیا و امریکا به عمل می‌آید، از ارزش غذایی بالایی برخوردار است و به طور معمول به عنوان میوه‌ای خوراکی، در طب سنتی چینی و برای درمان بیماری‌های مختلفی نظیر درمان آنفولانزا، آسم و تنگی نفس، کند کردن حرکات دستگاه گوارش و درمان اسهال، بهبود سرما خوردگی و سرفه و رفع گرفتگی صدا، التیام زخم، ترمیم بافت‌های آسیب دیده و تقویت عضلات، درمان نازایی و به عنوان دارویی آرام‌بخش استفاده می‌شود. مطالعات فیتوشیمیایی و فارماکولوژیک اخیر، نشان داده‌اند که پلی‌ساکاریدها از اجزای مهم فعال این میوه می‌باشند و دارای اثرات زیستی مختلفی نظیر فعالیت‌های ایمنی، آنتی‌اکسیدان، ضد تومور، حفاظت کبدی، هیپوگلیسمی، ضد التهاب، بهبود حافظه و یادگیری، اثرات محافظتی در سیستم قلبی- عروقی و دستگاه گوارش است (۹-۸). همچنین، اثرات حفاظت نورونی عناب ثابت شده است؛ به طوری‌که پیش تیمار با عصاره‌ی عناب سبب حفاظت سلول‌های عصبی برابر آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو است (۱۰).

گونه‌ی Ziziphus vulgaris بومی ایران است که در مطالعات قبلی، اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن بر روی برخی از بیماری‌ها بررسی شده است. با توجه به خواص ویژه‌ی آنتی‌اکسیدانی گیاه عناب، فرض بر این بود که عصاره‌ی عناب می‌تواند اثرات حفاظت عصبی بر روی عوامل مورد مطالعه داشته باشد. در این پژوهش، برای اولین بار اثرات حفاظت نورونی عصاره‌ی عناب گونه‌ی بومی ایران بر روی نفوذپذیری BBB ناشی از MCAO و فعالیت برخی از آنزیم‌های درگیر در حفاظت نورونی در محیط زنده، مورد بررسی قرار گرفت. به طور خلاصه، هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، معرفی برخی اثرات حفاظت عصبی عناب در پیش‌گیری از سکته‌ی مغزی بود.

روش‌ها

حیوانات و شرایط آزمایشگاهی: در این مطالعه‌ی تجربی از Ratهای نر نژاد Wistar، در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. گروه‌بندی به طور تصادفی صورت گرفت. Ratها با دوره‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته، دمای حدود ۲۵-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد نگهداری شدند. کلیه‌ی اصول اخلاقی، طبق اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

حیوانات به‌طور تصادفی به ۱۵ گروه ۷ نفره تقسیم شدند که شامل دو گروه شاهد سالین، دو گروه سکته، دو گروه Sham (گروه‌های Sham در همان شرایط گروه سکته تیمار شدند، به جز عدم عبور نخ نایلونی)، گروه‌های شاهد و سکته به همراه عصاره با دوزهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روزانه بودند. در گروه‌های شاهد سالین و گروه‌های تیمار با عصاره‌ی عناب، حیوانات به مدت یک ماه در ساعت ۱۱-۱۰ صبح، آب مقطر یا عصاره را به صورت گاواژ دریافت می‌کردند (۱۱).

تهیه‌ی عصاره‌ی آبی میوه‌ی عناب: پس از تأیید گونه‌ی مورد نظر توسط گیاه‌شناس و جدا نمودن هسته، بخش‌های گوشتی میوه، در سایه خشک شد و با استفاده از آسیاب به قطعات بسیار ریز تبدیل شدند و ذرات حاصل در آب مقطر حل شد. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه جوشید و پس از سرد شدن، ۲۰ دقیقه با شتاب ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، محلول رویی جمع‌آوری شد و در فشار و دمای پایین به حالت پودری شکل تبدیل شد و در دمای ۷۰- درجه‌ی

سانتی‌گراد نگهداری شد. در زمان آزمایش، با اضافه کردن آب مقطر به این پودر، محلول‌هایی با غلظت‌های مورد نظر تهیه شد (۱۲).

القای مدل MCAO: حیوانات توسط ماده‌ی بیهوشی کلرال هیدرات ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (Merck, Germany) و به شکل داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس، برشی در خط وسط گردن ایجاد شد تا انشعاب راست کاروتید و شاخه‌ی خارجی آن مشخص شود. عصب واگ و بافت‌های مجاور از این شاخه جدا شد. قاعده‌ی کاروتید راست و شاخه‌ی خارجی آن با نخ بخیه محکم بسته شد. شاخه‌ی داخلی کاروتید راست و شریان پتریگوپالاتین توسط کلمپ ظریف، به طور موقت مسدود گردید. سپس، سوراخ کوچکی در تنه‌ی کاروتید راست ایجاد گردید و نخ نایلونی به ضخامت ۳-۰ و طول ۲۲-۲۰ میلی‌متر از آن عبور داده شد تا جایی که ابتدای سرخرگ سری جلویی توسط ابتدای نخ نایلونی لمس شود. ضمن جراحی، درجه‌ی حرارت ناحیه‌ی رکتال توسط دستگاه ترمومتر رکتال (Citizen-513w) بررسی و کنترل شد. جریان خون مغزی نیز به طور مداوم توسط لیزر داپلر (LDF; Moor Instrument, UK) ثبت شد. یک ساعت بعد، با خارج نمودن نخ نایلونی، جریان خون مجدد برقرار شد (۱۳). سپس، ناحیه‌ی شکافته شده در گردن، بخیه شد و حیوانات درون قفس‌های جداگانه منتقل شدند.

اندازه‌گیری نفوذپذیری سد خونی- مغزی: ثبات BBB با اندازه‌گیری میزان خروج اوانس‌بلو (Merck, Germany) ارزیابی شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه از القای سکته، حیوانات از طریق ورید دمی اوانس‌بلو ۲ درصد با غلظت ۴ میلی‌لیتر/کیلوگرم دریافت نمودند. ۳۰ دقیقه بعد، نخ نایلونی خارج شد و پس از ۲۴ ساعت، قفسه‌ی سینه‌ی حیوانات بی‌هوش باز شد و از طریق بطن چپ، اوانس‌بلو با تزریق ۲۵۰ میلی‌لیتر سالین، از بدن خارج شد. این کار تا زمانی ادامه داشت که مایع بی‌رنگ از دهلیز راست خارج شود. در مرحله‌ی بعد، مغز حیوان خارج شد و بافت مغز در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات هموژنیزه شد و به آن ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک ۶۰ درصد اضافه شد تا پروتئین‌های آن رسوب کند. به دنبال آن، ۵ دقیقه ورتکس شد و بعد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سرد شد. آن گاه، ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی جدا گردید. جذب نوری اوانس‌بلو توسط اسپکتروفتومتر (Genova, Jenway) در ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و طبق منحنی استاندارد، غلظت آن تعیین شد (۱۴).

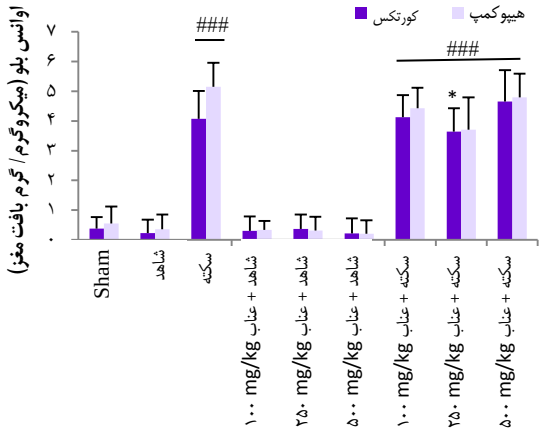
اندازه‌گیری سطح فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز: برای اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، از کیت سنجش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (Randox, UK)، طبق شیوه‌نامه‌ی شرکت مربوط استفاده شد. فعالیت GPX توسط اسپکتروفتومتر در برابر بلانک و در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با میلی‌واحد/میلی‌گرم پروتئین از بافت مشخص شد (۱۲). به منظور اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز، از کیت سنجش کاتالاز (ZellBio, Germany)، طبق شیوه‌نامه و توسط اسپکتروفتومتر، در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد. واحد فعالیت برای کاتالاز، مقداری از نمونه است که یک میکرومول H_2O_2 را طی یک دقیقه به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند (۱۵).

آنالیز آماری: در مطالعه‌ی حاضر، از نرم‌افزار Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. رسم نمودارها با استفاده از Microsoft Excel 2010 انجام شد. پارامترهای فیزیولوژیک با استفاده از آزمون One-way ANOVA بررسی شدند. برای مقایسه‌ی گروه‌ها، از آزمون Bonferroni استفاده شد. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

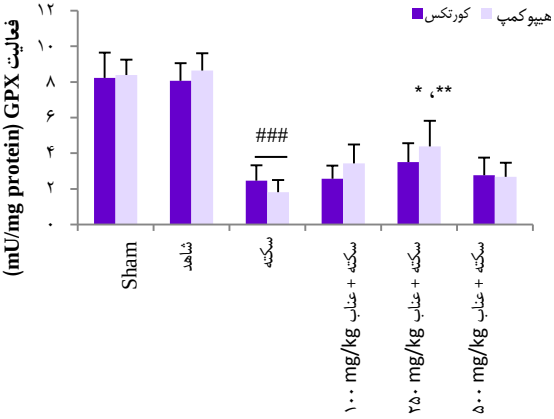
اثر عصاره‌ی عناب بر روی نفوذپذیری BBB: در Ratهای معرض MCAO که دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره‌ی عناب را دریافت کرده بودند، با تزریق ایوانس‌بلو، این رنگ در ناحیه‌ی مرکزی سکته و به میزان بسیار کمتری از سایر گروه‌ها مشاهده شد. این مدرک نشان داد که در همه‌ی این Ratها، انسداد شریان مرکزی مغز صورت گرفته است، اما به دلیل پدیده‌ی تحمل به ایسکمی وابسته به این دوز از عصاره، به ویژه در ناحیه‌ی قشر مغز، استحکام سد خونی- مغزی افزایش یافته بود. نتایج این تحقیق نشان داد که نفوذپذیری BBB در گروه سکته و گروه‌های سکته + تیمار با عصاره، در هر دو ناحیه‌ی کورتکس و هیپوکمپ در مقایسه با گروه‌های شاهد و Sham افزایش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۱$). دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره‌ی عناب باعث کاهش معنی‌دار نفوذپذیری BBB در گروه‌های سکته دریافت کننده‌ی عصاره در مقایسه با گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده، در ناحیه‌ی کورتکس شد ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین، در هیچ یک از گروه‌ها، بین کورتکس و هیپوکمپ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P < ۰/۰۵۰$) (شکل ۱).

اثر عصاره‌ی عناب بر روی فعالیت GPX: شکل ۲، بیانگر کاهش معنی‌دار سطوح فعالیت GPX نواحی کورتکس و هیپوکمپ، در گروه‌های مختلف سکته‌ی نسبت به گروه‌های Sham و شاهد است ($P < ۰/۰۰۱$). دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره در ناحیه‌ی هیپوکمپ سبب افزایش معنی‌دار فعالیت GPX در گروه‌های سکته‌ی تیمار شده با عصاره در مقایسه با گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده گردید ($P < ۰/۰۰۱$، $P < ۰/۰۵۰$). در هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری میان کورتکس و هیپوکمپ مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵۰$).



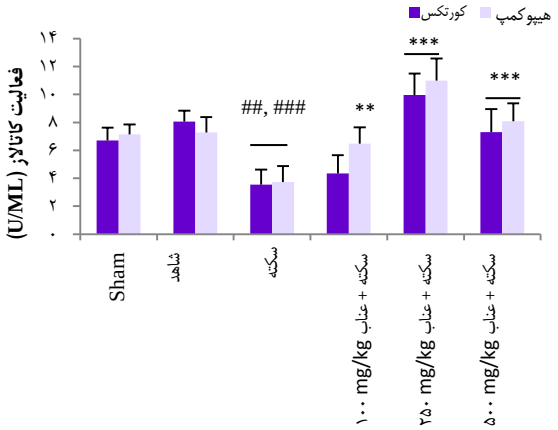
شکل ۱. بررسی اثرات عصاره‌ی عناب بر نفوذپذیری سد خونی- مغزی
نفوذپذیری Blood-brain barrier (BBB) با اندازه‌گیری خروج اوانس‌بلو از بافت مغز سنجیده شد. ### P < ۰/۰۰۱ گروه‌های مختلف سکته نسبت به گروه‌های شاهد و Sham سنجیده شده است. * P < ۰/۰۵۰ مقایسه‌ی گروه سکته‌ی دریافت کننده‌ی دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره‌ی عناب در ناحیه‌ی کورتکس نسبت به گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده در ناحیه‌ی هیپوکمپ است.

اثر عصاره‌ی عناب بر روی فعالیت کاتالاز: نتایج عملکرد کاتالاز در گروه‌هایی که عصاره دریافت نکردند، بیانگر این مطلب است که گروه‌های سکته در هر دو ناحیه‌ی کورتکس و هیپوکمپ نسبت به گروه Sham- کورتکس (P < ۰/۰۱۰) و Sham- هیپوکمپ (P < ۰/۰۰۱) کاهش معنی‌داری در فعالیت کاتالاز داشتند (شکل ۳).



شکل ۲. فعالیت Glutathione peroxidase (GPX) در گروه‌های آزمایش.
P < ۰/۰۰۱ مقایسه‌ی گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده نسبت به گروه‌های شاهد و Sham. * P < ۰/۰۵۰ مقایسه‌ی گروه سکته‌ی دریافت کننده‌ی دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره‌ی عناب در ناحیه‌ی هیپوکمپ نسبت به گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده. ** P < ۰/۰۱۰ مقایسه‌ی گروه سکته‌ی دریافت کننده‌ی ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره‌ی عناب در ناحیه‌ی هیپوکمپ نسبت به گروه سکته‌ی تیمار نشده در همین ناحیه.
mU/mg protein: میلی‌واحد در میلی‌گرم پروتئین از بافت

گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده نسبت به گروه‌های شاهد نیز کاهش معنی‌داری در فعالیت کاتالاز از خود نشان دادند (P < ۰/۰۰۱). پیش تیمار با عصاره‌ی عناب در دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در هر دو ناحیه‌ی مغز (P < ۰/۰۰۱) و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره در ناحیه‌ی هیپوکمپ (P < ۰/۰۱۰) سبب افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز نسبت به گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده در هر دو ناحیه شدند. بین کورتکس و هیپوکمپ هیچ گروهی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P > ۰/۰۵۰) (شکل ۳).



شکل ۳. فعالیت کاتالاز در گروه‌های آزمایش
P < ۰/۰۰۱ مقایسه‌ی گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده نسبت به گروه Sham- هیپوکمپ و گروه‌های شاهد. ## P < ۰/۰۱۰ مقایسه‌ی گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده نسبت به گروه Sham-کورتکس؛ *** P < ۰/۰۰۱ مقایسه‌ی پیش تیمار با عصاره‌ی عناب در دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده و ** P < ۰/۰۱۰ مقایسه‌ی پیش تیمار با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره‌ی عناب نسبت به گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده.
U/ML: واحد در میکرومول پروتئین از بافت

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تیمار با عصاره‌ی عناب، تنها در کورتکس و دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم قادر به اعمال اثرات حفاظت عصبی در کاهش BBB در مدل MCAO است. همچنین، فعالیت هر دو آنزیم GPX و کاتالاز در گروه‌های سکته نسبت به گروه‌های شاهد و Sham، کاهش معنی‌داری داشت. اثر حفاظت عصبی عصاره در افزایش فعالیت GPX در مقایسه با گروه‌های سکته، تنها در ناحیه‌ی هیپوکمپ مشاهده شد. در مورد فعالیت کاتالاز، هر ۳ دوز عصاره با درجات متفاوتی، فعالیت کاتالاز را افزایش دادند و بیشترین فعالیت مربوط به دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم است. در هیچ یک از آزمایش‌ها، بین دو گروه جفت کورتکس و هیپوکمپ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

در این تحقیق، مطالعه‌ی عملکرد حفاظتی عصاره‌ی عناب بر عملکرد BBB برای اولین بار گزارش گردید. سد خونی- مغزی، یک عامل تنظیم کننده‌ی کلیدی در تعدیل حفاظت نورونی است. سلول‌های آندوتلیال مغزی، سدهای پاراسلولار و ترانس‌سلولاری را تشکیل می‌دهند که مانع از عبور بسیاری از مواد محلول از طریق اتصالات محکم منافذ کوچک رگ‌ها می‌شوند. ثبات BBB نقش مهمی در سلامت یا بیماری سیستم عصبی مرکزی دارد و گزارش‌های قبلی در مورد آسیب به BBB به دنبال سکته‌ی مغزی و جریان خون مجدد پس از آن، افزایش ادم وازوژنیک مغزی، خونریزی و مرگ و میر را به دنبال داشته‌اند (۱۶).

از طرف دیگر، دارویی چینی که در ترکیب آن عصاره‌ی عناب وجود دارد، سبب کاهش بیان AQP-4 و MMP-4 و افزایش بیان پروتئین‌های کلودین، آکلودین و ZO-1 در مدل MCAO شده است که این عوامل در ثبات BBB مؤثر می‌باشند (۵). در تحقیق حاضر، احتمال دارد دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عناب در ناحیه‌ی کورتکس از طریق این مسیرها عمل کرده باشد و با فعال کردن عوامل مهاری و مهار عوامل تحریکی در افزایش ثبات BBB وارد عمل شده باشد. در حالی که همین دوز در ناحیه‌ی هیپوکمپ نتوانست اثر حفاظتی در برابر افزایش BBB داشته باشد که احتمال می‌رود در این ناحیه با فعال شدن مکانیسم‌های دیگری، شکست BBB اتفاق افتاده است. این احتمال در مورد دوز بالاتر (۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) نیز وجود دارد که نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

اثر حفاظتی عناب بر روی حجم ادم و فعالیت برخی دیگر از آنزیم‌های حفاظت عصبی و مدل سکته‌ی مغزی در گزارشی بررسی شده است. بر اساس نتایج این تحقیق، عصاره‌ی عناب به صورت ترکیبی با Silymarin قادر به حفاظت نورونی در نواحی کورتکس، هیپوکمپ و استریاتوم است (۱۱). آنزیم‌های بررسی شده در این گزارش، همسو با آنزیم‌های بررسی شده در مطالعه‌ی حاضر، افزایش فعالیت داشتند.

در نتایج تحقیق حاضر، فعالیت هر دو آنزیم GPX و کاتالاز در گروه‌های سکته‌ی تیمار نشده نسبت به گروه‌های شاهد و Sham، کاهش معنی‌داری داشت که با نتایج مطالعه‌ی سایر محققان همسو است؛ به طوری‌که کاهش معنی‌دار فعالیت کاتالاز و GPX در ساعت اولیه پس از برقراری جریان مجدد، در روند سکته‌ی مغزی گزارش شده است (۱۷). کاتالاز و GPX با تجزیه‌ی H_2O_2 به آب، بدون تولید رادیکال آزاد، سلول‌ها را از اثرات سمی H_2O_2 محافظت می‌کنند. با این حال، پس از ایسکمی مغزی و به خصوص جریان مجدد خون، تولید رادیکال‌های آزاد به طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد. در این شرایط، تعادل موجود به هم می‌خورد و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آندروژن در هم می‌شکنند (۱۸). اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌آپوپتوز و ضد التهابی عناب بر روی بافت‌های مختلف نظیر کبد، کلیه و مغز اثبات شده است؛ به طوری‌که پیش‌درمان با عصاره‌ی میوه‌ی عناب به مدت ۸ هفته، مانع از بروز سندرم کبد- کلیه حاصل از اتانول می‌شود (۱۲-۱۱).

علاوه بر این، پیش تیمار با پودر میوه‌ی عناب، به طور چشم‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم حیوانات مبتلا به دیابت را افزایش داده است (۱۹). اهمیت GPX در کاهش استرس اکسیداتیو با حذف ژن این آنزیم و افزایش حساسیت در موش‌ها به استرس اکسیداتیو ثابت شده است (۲۰). همچنین، القای بیان کاتالاز قبل از وقوع ایسکمی توسط وکتورهای ویروسی، سبب افزایش دو برابری در حیات نورون‌ها می‌شود (۲۱). به طور کلی، افزایش فعالیت کاتالاز و GPX با کاهش آپوپتوز، خروج عوامل ضد التهابی و فعال‌سازی میکروگلیاها و آستروسیت‌ها همراه است که این عوامل به حفظ حیات نورون‌ها کمک می‌کنند (۲۲). تریترپن‌ها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها و فیتواسترول‌ها از جمله آنتی‌اکسیدان‌های میوه‌ی عناب هستند که ممکن است در زمان پیش تیمار با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، سطح آن‌ها افزایش یافته باشد. این که در این شرایط چه تغییراتی در سطح کلی عوامل آنتی‌اکسیدان اتفاق می‌افتد، موضوعی است که نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

تفاوت در پاسخ نواحی کورتکس و هیپوکمپ در برخی از گروه‌ها نسبت به هم، ممکن است به دلیل تفاوت میان سلول‌های مغزی و یا مسیرهای سیگنالینگ باشد که نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

در مجموع، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بهترین دوز حفاظت نورونی عصاره‌ی عناب در حفظ یکپارچگی BBB و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم است. بنابراین، احتمال می‌رود مصرف روزانه و مناسب عناب می‌تواند در برابر سکته‌ی مغزی نقش حفاظت عصبی پیش‌گیرانه داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مشاوره‌ی علمی سرکار خانم دکتر اعظم عسگری و حمایت مسؤولین و کارکنان حیوان‌خانه‌ی دانشگاه تربیت مدرس تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. Ganesh A, Luengo-Fernandez R, Wharton RM, Gutnikov SA, Silver LE, Mehta Z, et al. Time course of evolution of disability and cause-specific mortality after ischemic stroke: Implications for trial design. J Am Heart Assoc 2017; 6(6): e005788.
2. Kodavanti PR, Royland JE, Moore-Smith DA, Besas J, Richards JE, Beasley TE, et al. Acute and subchronic toxicity of inhaled toluene in male Long-Evans rats: Oxidative stress markers in brain. Neurotoxicology 2015; 51: 10-9.
3. Wang XH, You YP. Epigallocatechin gallate extends therapeutic window of recombinant tissue plasminogen activator treatment for brain ischemic stroke: A randomized double-blind and placebo-controlled Trial. Clin Neuropharmacol 2017; 40(1): 24-8.
4. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21(1): 2-14.
5. Li L, Wang N, Jin Q, Wu Q, Liu Y, Wang Y. Protection of Tong-Qiao-Huo-Xue decoction against Cerebral Ischemic Injury through Reduction Blood-Brain Barrier Permeability. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2017; 65(11): 1004-10.
6. Aldini G, Yeum KJ, Niki E, Russell RM. Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications. Hoboken, NJ: Wiley; 2011.
7. Kiani A, Khorvash F, Hasanzadeh A, Askari G. Relationship between dietary intake and body composition with carotid intima-media thickness in patients with transient ischemic attack. J Isfahan Med Sch 2017; 34(414): 1617-26. [In Persian].
8. Ji X, Peng Q, Yuan Y, Shen J, Xie X, Wang M. Isolation, structures and bioactivities of the polysaccharides from jujube fruit (Ziziphus jujuba Mill.): A review. Food Chem 2017; 227: 349-57.
9. Li JW, Fan LP, Ding SD, Ding XL. Nutritional composition of five cultivars of chinese jujube. Food Chemistry 2007; 103(2): 454-60.
10. Lam CT, Gong AG, Lam KY, Zhang LM, Chen JP, Dong TT, et al. Jujube-containing herbal decoctions induce neuronal differentiation and the expression of anti-oxidant enzymes in cultured PC12 cells. J Ethnopharmacol 2016; 188: 275-83.
11. Gupta S, Gupta YK. Combination of Zizyphus jujuba and silymarin showed better neuroprotective effect as compared to single agent in MCAo-induced focal cerebral ischemia in rats. J Ethnopharmacol 2017; 197: 118-27.
12. Taati M, Alirezaei M, Meshkatalsadat M H, Rasoulian B, Dezfolian O, Neamati S. Antioxidant effects of aqueous fruit extract of Ziziphus jujuba on ethanol-induced oxidative stress in the liver and kidney of male rats. Yafte 2011; 13(2): 54-68. [In Persian].
13. Varnaseri M, Rahnema M, Bigdeli M. The effect of pre-feeding with Purslane seed oil (Portulaca oleracea) on brain stroke volume (MCAO model) in the rat animal model. J Isfahan Med Sch 2015; 33(344): 1197-1210. [In Persian].
14. Alavian F, Hajizadeh S, Bigdeli MR, Javan M. The role of protein kinase C in ischemic tolerance induced by hyperoxia in rats with stroke. EXCLI J 2012; 11: 188-97.
15. Miri M M, Mohammadi P. Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with medullary thyroid carcinoma and compared to healthy subjects. J Mil Med. 2017; 19 (1): 84-90. [In Persian].
16. Knowland D, Arac A, Sekiguchi KJ, Hsu M, Lutz SE, Perrino J, et al. Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. Neuron 2014; 82(3): 603-17.
17. Lerouet D, Beray-Berthat V, Palmier B, Plotkine M, Margaill I. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. Brain Res 2002; 958(1): 166-75.
18. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev 1999; 79(4): 1431-568.
19. Asgary S, Rafieian-kopaei M, Goli-malekabadi N. The Effects of Jujube Fruit (Ziziphus vulgaris) Powder in Antioxidant Capacity Elevation and Prevent of Inflammation Detection Due to Diabetes in Wistar Rat. J Ilam Univ Med Sci 2016; 24(5): 55-64. [In Persian].
20. Fu Y, Cheng WH, Porres JM, Ross DA, Lei XG. Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. Free Radic Biol Med 1999; 27(5-6): 605-11.
21. Gu W, Zhao H, Yenari MA, Sapolsky RM, Steinberg GK. Catalase over-expression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. Neuroreport 2004; 15(3): 413-6.
22. Brekke E, Berger HR, Wideroe M, Sonnewald U, Morken TS. Glucose and Intermediary Metabolism and Astrocyte-Neuron Interactions Following Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rat. Neurochem Res 2017; 42(1): 115-32.

DOI: 10.22122/jims.v36i475.9563 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 475, 3rd Week, June 2018**

Received: 29.01.2018 Accepted: 11.05.2018 Published: 05.06.2018

Protective Effects of Jujube Extract against Permeability of Blood-Brain Barrier, and the Activity of Glutathione Peroxidase and Catalase in Stroke Model

Firoozeh Alavian[1], Saeedeh Ghiasvand[2]

Original Article

Abstract

Background: Jujube is a medicinal plant, with strong antioxidant properties that is consumed in worldwide as food and medicine. Recent studies indicate that jujube extracts can suppress inflammation and reduce oxidative stress. Considering that brain ischemia is the third most common cause of death in developed countries, the aim of this study was to investigate the effects of juvenile neuronal protection against stroke-induced damage on the blood-brain barrier, and the activity of two anti-oxidants, glutathione peroxidase and catalase.

Methods: In this experimental study, 15 groups of 7 Wistar male rats were used as follows: 2 control groups of saline, 2 sham groups, 2 groups of stroke, and control and stroke groups at doses of 100, 250, and 500 mg/kg/day of jujube extract. After 30 days of oral administration, the animals were subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 60 minutes. After 24 hours of reperfusion, the activity levels of glutathione peroxidase (GPX) and catalase were investigated in the areas of cortex and hippocampus; the permeability of the blood-brain barrier (BBB) was investigated as well.

Findings: Oral administration of jujube extract at the dose of 250 mg/kg/day reduced the permeability of the blood-brain barrier in stroke model. Doses of 500 and 250 mg/kg/day of jujube in the cortex and hippocampus, and the dose of 100 mg/kg/day in the hippocampus increased catalase activity.

Conclusion: The results of this study clearly show that jujube has a significant potential for stroke prevention.

Keywords: Stroke, Jujube, Glutathione peroxidase, Catalase

Citation: Alavian F, Ghiasvand S. **Protective Effects of Jujube Extract against Permeability of Blood-Brain Barrier, and the Activity of Glutathione Peroxidase and Catalase in Stroke Model.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(475): 379-85.

1- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Malayer University, Malayer, Iran
Corresponding Author: Firoozeh Alavian, Email: f.alavian@cfu.ac.ir