

مقاله پژوهشی

اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی خرفه بر بهبود آسیب اکسیداتیو القا شده توسط لیپوپلی ساکارید در هیپوکمپ موش صحرایی

لیلا کریمی زندی، مریم نوربخش نیا^{*}، علی اکبر احسان پور، سمیه رجائیان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

پذیرش: ۲۶ مرداد ۹۵

دریافت: ۲۵ خرداد ۹۵

چکیده

مقدمه: یکی از مهم‌ترین عوامل بروز اختلالات نورودژنراتیو و بیماری‌هایی با نقص در یادگیری و حافظه مانند الزایمر و زوال عقل، التهاب دستگاه عصبی است که معمولاً با استرس اکسیداتیو همراه می‌شود. التهاب دستگاه عصبی می‌تواند منجر به فعال شدن سلولهای ایمنی و راه‌اندازی آشناری از واکنش‌های سلولی و شیمیایی شده و در نهایت باعث تولید مقادیر بسیار زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن گردد. مطالعات اخیر نشان داده اند که استفاده از گیاهانی که دارای مواد آنتی اکسیداتیو قوی هستند می‌تواند یک گزینه مناسب برای پیشگیری و درمان التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو باشد. گیاه خرفه به دلیل دارا بودن انواع اسیدهای چرب غیراشباع و آنتی اکسیدان‌هایی مانند: آلفا-توکوفرول، اسید اسکوربیک و گلوتاتیون احتمالاً می‌تواند اثرات مثبتی در جلوگیری از التهاب و استرس اکسیداتیو داشته باشد. در این تحقیق اثر عصاره هیدروالکلی خرفه بر بهبود آسیب اکسیداتیو القا شده توسط لیپوپلی ساکارید باکتریایی (LPS) در هیپوکمپ موشهای صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: موشهای صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی 10 ± 220 گرم در ۴ گروه قرار گرفتند. حیوانات عصاره خرفه (۴۰۰ mg/kg) را طی یک دوره ۱۴ روزه از طریق دهانی (گاواژ) دریافت نمودند. LPS (1mg/kg)، به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. میزان فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیداتیو شامل کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دسموتاز (SOD) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) در هیپوکمپ سنجیده شد. همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدی نیز به عنوان مارکری برای تعیین آسیب اکسیداتیو اندازه گیری شد.

یافته‌ها: LPS موجب تحریک و افزایش فعالیت آنزیم SOD، CAT و کاهش فعالیت GR نسبت به گروه کنترل شد. همچنین LPS موجب افزایش مالون دی آلدئید (MDA) شد. عصاره خرفه به صورت معناداری فعالیت آنزیم های SOD، CAT و GR را نسبت به گروه LPS افزایش داد و باعث کاهش معنادار MDA نسبت به گروه دریافت کننده LPS گردید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد گیاه خرفه به علت دارا بودن ترکیبات ویژه و اثرات آنتی اکسیدانی قوی می‌تواند به عنوان یک محصول طبیعی جهت پیشگیری و درمان آسیب های اکسیداتیو در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: آسیب اکسیداتیو، التهاب عصبی، خرفه، لیپو پلی ساکارید باکتریایی، موش صحرایی

مقدمه

این دستگاه است. این ساختار در طیف وسیعی از پستانداران از خارپشت تا انسان حفظ شده، هرچند جزئیات ساختاری آن در گونه‌های مختلف، متفاوت است [۱]. التهاب پاسخ فیزیولوژیکی به انواع مختلف آسیب‌های بافتی است که موجب راه‌اندازی آشناری از واکنش‌های سلولی و شیمیایی می‌شود. التهاب دستگاه عصبی که در اغلب بیماری‌های نورولوژیکی مشاهده می‌شود، هر دو دستگاه عصبی مرکزی و محیطی را شامل

دستگاه لیمبیک شامل بخش‌هایی از مغز است که برای حافظه، احساس و عملکردهای شناختی مهم هستند. هیپوکمپ که در لوب گیجگاهی میانی مغز قرار دارد، یکی از اجزاء مهم

^{*} نویسنده مسئول مکاتبات: m.noorbakhshnia@sci.ui.ac.ir
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

گیرنده‌ها در سطح بسیاری از سلول‌های ایمنی مانند مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها قرار دارند. به دلیل حضور گیرنده‌های TLR4 بر روی سلول‌های ایمنی ذاتی این فرضیه که التهاب دستگاه عصبی به صورت محیطی راه‌اندازی می‌شود، مورد قبول واقع شده است به این صورت که التهاب محیطی از راه عبور سایتوکاین‌ها از سد خونی- مغزی و اتصال به گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های ماکروفاژی مغزی و فعال نمودن آن‌ها و فعال نمودن سلول‌های میکروگلیا در پارانشیم مغز موجب تغییر عملکرد مغز می‌شود [۴]. هنگامی که میکروگلیاها در معرض LPS یا هر عامل محرک دیگری قرار می‌گیرند به شکل فعال و آمیبی خود در آمده و یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های خود به نام فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (Tumor Necrosis Factor- α [TNF- α]) را ترشح می‌کنند. پایدار شدن این سایتوکاین موجب فعال شدن فاکتور هسته‌ای کاپای بی (nuclear Factor kappaB [NF- κ B]) می‌شود. این فاکتور با تنظیم ژن‌های بیان‌کننده سایتوکاین‌های پیش التهابی، مولکول‌های چسبندگی و کموکاین‌ها در التهاب نقش اساسی را ایفا می‌کند. فاکتور هسته‌ای کاپا موجب فعال شدن آنزیم‌های مختلف از جمله NADPH اکسیداز میکرو گلیاها شده که باعث ایجاد پاسخ‌های التهابی بیشتر و مهم‌تر از آن ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود [۵].

گیاه خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* از تیره پرتولاسه بوده و به صورت خودرو در باغچه منازل، کنار جویها و در مناطق مرطوب می‌روید. خرفه به عنوان ضداسپاسم، ضدتب، شل کننده‌ی عضلانی، آنتی‌اکسیدان، تقویت کننده‌ی سیستم ایمنی، و در رفع تشنگی کاربرد درمانی دارد. آب، مواد لعابی، پکتین، کربوهیدرات، اسیدهای چرب بویژه اسیدهای چرب غیراشباع ۳- ω ، موادآنتی‌اکسیدانی و عناصر معدنی متعدد شامل: آهن، مس، منگنز، پتاسیم، کلسیم و فسفر در بخش‌های مختلف این گیاه وجود دارند. این گیاه سرشار از ترکیبات فنلی، پلی فنلی و موادآنتی اکسیدان است که مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدان آن شامل: آلفا-توکوفرول، اسیدآسکوربیک و گلوتاتیون می‌باشد. مقدار اسید چرب در برگ‌های خرفه ۲/۵-۱/۵ mg/kg، در ساقه ۰/۹-۰/۶ mg/g و در دانه ۱۷۰-۸۰ mg/g است که ۶۰٪ اسیدهای چرب برگ‌ها

می‌شود. هرگونه استرس وارد شده به بافت مغز مانند عفونت و یا محرک‌های التهابی سلول‌های اصلی ایمنی مغز را فعال می‌کنند. میکروگلیاها سلول‌هایی هستند که در التهاب مغزی فعال می‌شوند. فعال شدن میکروگلیا باعث ایجاد منبع عظیمی از سوپر اکسید و نیتریک اکساید می‌شود. چند منبع مهم تولید گونه‌های فعال اکسیژن در میکروگلیاها و آستروسیت‌ها وجود دارد که شامل NADPH اکسیداز، زنجیره انتقال الکترون، گزانتین اکسیداز (Xantin oxidase)، آنزیم‌های میتوکندریایی، سیکلواکسیژناز (Cyclooxygenase) و لیپواکسیژناز (Lipoxygenase) می‌باشند. عقیده بر این است که منبع اصلی گونه‌های فعال اکسیژن در مغز NADPH اکسیداز میکروگلیاها می‌باشد. NADPH اکسیداز نقش مهمی در ایمنی ذاتی به وسیله‌ی تسریع تشکیل سوپر اکسید دارد که تخریب میکروارگانیزم‌های مهاجم را در حین فاگوسیتوز تسهیل می‌کند. پس از فعال شدن NADPH اکسیداز، سوپر اکسید طی فرآیندی با نام انفجار تنفسی تولیدشده و در کشتار میکروبی شرکت می‌کند. سوپر اکسید تولیدی موجب تشکیل دیگر گونه‌های فعال اکسیژن قوی شامل رادیکال‌های هیدروکسیل، پروکسی نیتريت و دیگر اکسیدان‌ها می‌شود. تولید بیش از اندازه این رادیکال‌ها می‌تواند به بافت‌های مجاور ناحیه التهابی آسیب برسانند؛ بنابراین فعال شدن NADPH اکسیداز شدیداً تحت کنترل مجموعه‌ای از زیرواحدهای منفرد فعال در یک کمپلکس می‌باشد [۲].

یکی از مدل‌های ایجاد التهاب عصبی تزریق LPS است که از آن در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی جهت بررسی روند بیماری‌ها و اختلالات مرتبط با التهاب استفاده می‌شود. LPS یک اندوتوکسین قوی باکتریایی است که در اواخر قرن نوزدهم با شیوع وبا کشف شد. جزئیات ساختاری LPS از یک باکتری به باکتری دیگر متفاوت می‌باشد و این تنوع در مقدار اثرات سمی آن‌ها مؤثر است. غلظت‌های بالای LPS موجب القای تب، افزایش ضربان قلب، شوک عفونی و در نهایت مرگ می‌شود. اما غلظت‌های به نسبت پایین و متوسط آن موجب فعال شدن تعدیل‌کننده‌های ایمنی می‌شود که این تعدیل‌کننده‌ها می‌توانند باعث القای مقاومت غیراختصاصی در مقابل تهاجم میکروب شوند [۳].

LPS موجب تحریک گیرنده‌های عرض غشایی شبه تول ۴ (Toll-like receptor 4 [TLR4]) (TLR4) می‌شود. این

و ۴۰٪ اسیدهای دانه، اسیدچرب α -لینولنیک می باشد. در بررسی پروفایل اسیدهای چرب دانه‌های چندین واریته بومی و وارداتی خرفه در استرالیا اسیدهای چرب اصلی موجود در تمام بافت‌ها اسید لینولنیک (۳۳٪)، اسید لینولئیک (۵۶) و اسید پالمیتیک گزارش شده است [۶].

هر ۱۰۰ گرم ساقه خشک خرفه حاوی ۹۲ گرم آب، ۷/۱ گرم پروتئین، ۴ گرم چربی، ۵/۲ گرم هیدرات‌های کربن، ۱۰۲ میلی‌گرم کلسیم، ۲۵۰۰ IU ویتامین A، ۳ میلی‌گرم تیامین، ۱ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۵ میلی‌گرم نیاسین و ۲ میلی‌گرم ویتامین C است [۶]. آزمایش‌های فیتوشیمیایی عصاره خرفه نشان داده که این گیاه حاوی ویتامین B1 و A، نورآدرنالین، دوپامین، اسیدهای ارگانیک مثل سینامیک، کافئیک، مالیک، اگزالیک، سیتریک و نیز کومارین‌ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای قلبی آنتراکینونی و آلکالوئیدها می‌باشد [۶].

همان‌طور که ذکر شد خرفه دارای مقادیر زیادی آنتی‌اکسیدان‌هاست. این گیاه یکی از غنی‌ترین گیاهان سبز حاوی ویتامین C، α -توکوفرول و گلوتاتیون می‌باشد. بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که این گیاه به علت ترکیبات خاص خود می‌تواند در پیشگیری اختلالات و آسیب‌های ناشی از فعالیت‌های اکسیداتیو موثر باشد. از آنجایی که مغز به دلیل مصرف بالای اکسیژن، سطح بالای اسیدهای چرب اشباع‌نشده، سطوح پایین آنتی‌اکسیدان‌ها و سطح نسبتاً بالای یون‌های فلزی و واسطه‌های اکسیداسیون-احیا (Redox) در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است بنابراین تجمع مواد اکسیداتیو منجر به آسیب به ماکرومولکول‌ها و در نهایت مرگ سلول‌های مغزی می‌شود [۷]. با توجه به مطالب ذکر شده بر آن شدیم تا اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاه خرفه را بر روی آسیب‌های اکسیداتیو القا شده توسط LPS در ناحیه هیپوکمپ مغز بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

جهت تهیه عصاره هیدروالکلی خرفه، گیاه خرفه از مزارع اطراف شهرستان مبارکه استان اصفهان در تاریخ ۹۲/۳/۱۲ جمع‌آوری شد. جنس و گونه این گیاه مورد تأیید متخصص بیوسیستماتیک گیاهی قرار گرفت. به منظور عصاره‌گیری، ابتدا برگ‌ها و ساقه گیاه خرفه جدا شد و پس از شستشو در سایه و زیر باد کولر خشک گردید. به منظور افزایش سطح تماس گیاه

با حلال، گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی به صورت پودر در آورده شد. ۱۵۰ گرم از گیاه خشک شده توسط ترازوی حساس وزن گردید و در ارلن یک لیتری ریخته شد و به آن ۶۰۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۶ درصد اضافه گردید، به گونه‌ای که سطح گیاه به‌طور کامل پوشانیده شد. ارلن به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه تکان دهنده قرار گرفت، سپس محلول توسط کاغذ صافی و قیف بوختر صاف شد و عصاره آن در ظرف جداگانه‌ای نگهداری شد. در مرحله بعد، به تفاله‌ی باقی مانده الکل ۷۰ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه تکان دهنده قرار گرفت. پس از صاف شدن، این محلول را با محلول صاف شده مرحله اول مخلوط نموده و در دستگاه تقطیر در خلا در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه تا ۱/۳ حجم اولیه تغلیظ شد. در مرحله بعد به‌منظور خشک شدن عصاره آن را در ظروف مخصوص ریخته و در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گذاشته شد.

لیپوپلی‌ساکارید باکتریایی (LPS)، گلوتاتیون دی سولفید و نیکوتین‌آمیدآدنین‌دی‌نیکلوتیدفسفات از شرکت Sigma خریداری شد.

در این مطالعه ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی 10 ± 220 گرم مورد مطالعه قرارگرفت. حیوانات در قفس‌های استاندارد نگهداری شده و آب و غذا (تهیه شده از شرکت به‌پرور) به صورت نامحدود در اختیار آنها قرار داده شد. محل نگهداری حیوانات دارای شرایط مطلوب دوره تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته و دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد بود. جنبه‌های اخلاقی کار با حیوانات به وسیله کمیته تحصیلات تکمیلی گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان مورد تأیید قرار گرفت. موش‌ها قبل از شروع مطالعه وزن شده و در ۴ گروه به صورت تصادفی تقسیم شدند. دوره مطالعه ۱۴ روز بود. موش‌ها در گروه‌های زیر تقسیم بندی شدند:

گروه ۱: این گروه به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. سرم فیزیولوژیک به مدت ۱۴ روز با روش گاواژ به موش‌ها تزریق شد.

گروه ۲: این گروه دریافت‌کننده لیپوساکارید باکتریایی (LPS) بودند. (۱ mg/kg) LPS به صورت دوز حاد مطابق با پروتکل گرفته شده از مقاله مربوطه، ۶ ساعت قبل از خارج نمودن هیپوکمپ به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد [۸].

گروه ۳: این گروه عصاره هیدروالکلی خرفه را با دوز ۴۰۰ mg/kg با روش گاواژ به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. دوز خرفه بر اساس مطالعات پایلوت و نیز مطالعات قبلی انتخاب گردید [۹، ۶].

گروه ۴: این گروه به عنوان گروه پیشگیری در نظر گرفته شد. در این گروه موشها، عصاره هیدروالکلی خرفه با دوز ۴۰۰ mg/kg را به روش گاواژ دریافت نمودند و (۱ mg/kg) LPS، ۶ ساعت قبل از خارج شدن هیپوکمپ به صورت داخل صفاقی به موشها تزریق شد.

در نهایت در روز چهاردهم، موشها ابتدا بوسیله کلورفرم ۷۰ درصد قربانی شدند. سپس هیپوکمپ آنها خارج شده و به فریز -۷۰ درجه سانتی گراد جهت سنجش آنزیمی انتقال داده شد.

میزان فعالیت سوپراکسید دسموتاز از طریق اندازه گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT) اندازه گیری شد. به این منظور بافت هیپوکمپ بر روی یخ هموژن گردید. بافر استخراج حاوی فسفات بافر ۵۰ میلی مولار در pH ۷/۸ تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به بافت هموژن اضافه و محلول به دست آمده به وسیله سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. بافر واکنش حاوی فسفات بافر ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۸، NBT ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۲ میکرومولار و L-متیونین ۱۳ میلی مولار آماده و مقدار ۱۵۰۰ میکرولیتر از آن به ۵۰ میکرولیتر از عصار آنزیمی اضافه شد، محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در معرض نور یکنواخت قرار گرفت. جذب محلول در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می شود که می تواند تا ۵۰ درصد مانع از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید گردد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی گرم پروتئین گزارش شد [۱۰].

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه شدن H_2O_2 و با استفاده از ضریب خاموشی $43/6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ تعیین گردید. به این منظور بافت هیپوکمپ بر روی یخ هموژن شد. بافر استخراج حاوی بافر فسفات سالین ۵۰ میلی مولار آماده و مقدار ۱۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به هموژن اضافه و در سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ

شد. بافر واکنش حاوی فسفات سالین ۵۰ میلی مولار و هیدروژن پروکسید ۱۰ میلی مولار تهیه شده و مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از آن به ۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی اضافه شد. جذب محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیمی کاتالاز بصورت تعداد ماکرومولکول H_2O_2 تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شد [۱۱].

میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز بر اساس کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر، به علت اکسیداسیون نیکوتین آمید دی نوکلئوتیدفسفات (NADPH) در ازای تبدیل ۱ مولکول گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به ۲ مولکول گلوتاتیون احیا شده (G-S)، بر آورد می شود. به این منظور، ۲ میکرولیتر بافر استخراج حاوی فسفات بافر ۱۰۰ میلی مولار با pH ۷ تهیه و به هموژن هیپوکمپ اضافه شد. پس از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۴۰۰۰، مقدار ۴۵۰ میکرولیتر از بافر واکنش حاوی فسفات بافر ۱۰۰ میلی مولار با pH ۷، GSSG ۱ میلی مولار، NADPH ۰/۱ میلی مولار و EDTA ۰/۵ میلی مولار به ۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی اضافه شد. جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد [۱۲].

به منظور سنجش میزان پراکسیداسیون لیپدهای غشا، غلظت مالون دی آلدید به عنوان محصول نهایی این واکنش در نظر گرفته و سنجیده شد. به این منظور ۲ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۵٪ به بافت هموژن اضافه شد. مخلوط در دور ۵۰۰۰ و به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ حاوی تیوباریتوریک اسید به محلول رویی اضافه شد. لوله های آزمایش به مدت ۲۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۹۵ سانتی گراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شد. مجدداً در دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. میزان MDA با استفاده از ضریب خاموشی $1 \text{ cm}^{-1} \cdot 10^{-5} \text{ mM} \cdot 1/56$ محاسبه شد [۱۳].

محتوی پروتئین ها با روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت های ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم به عنوان استاندارد تعیین شد.

آنالیز آماری باروش آنالیز واریانس یکطرفه و روش متعاقب توکی-کرامر صورت گرفت. در تمامی آزمایشها $p \leq 0/05$ به عنوان سطح معنادار بودن در نظر گرفته شد.

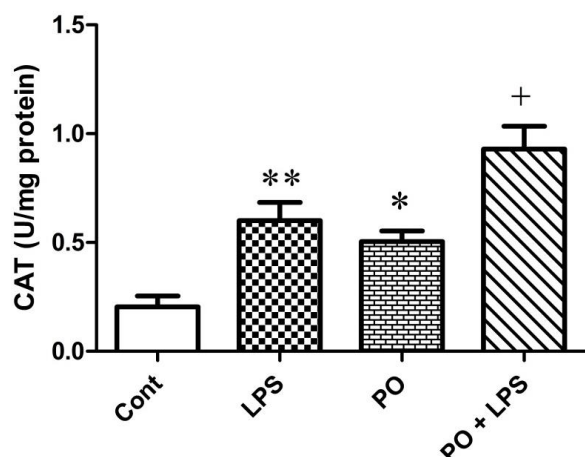
نتایج

تاثیر LPS و عصاره خرفه بر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکساید دسموتاز (SOD)

آنالیز واریانس یکطرفه بیانگر اختلاف معنادار بین چهار گروه مورد مطالعه بود [$F(3, 20) = 11.82, p < 0.001$]. مقایسه بین جفت گروه‌ها نشان داد که تزریق LPS باعث افزایش معنادار SOD نسبت به گروه کنترل گردیده است ($p < 0.05$). این امر بیانگر آن است که هیپوکمپ با افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان SOD سعی در مبارزه با شرایط نامساعد القا شده توسط LPS را دارد. از طرفی در گروه دریافت کننده عصاره خرفه نیز سطح SOD به صورت معناداری نسبت به کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$). همچنین در گروه پیشگیری مشاهده شد که خرفه به صورت معناداری سطح SOD را نسبت به گروه LPS افزایش داده است ($p < 0.05$).

تاثیر LPS و عصاره خرفه بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

آنالیز واریانس یکطرفه بیانگر اختلاف معنادار بین چهار گروه مورد مطالعه بود [$F(3, 20) = 15.56, p < 0.001$]. مقایسه بین جفت گروه‌ها نشان داد که تزریق LPS باعث افزایش معنادار CAT نسبت به گروه کنترل گردیده است ($p \leq 0.01$). این امر نشان دهنده آن است که هیپوکمپ



نمودار ۲- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هیپوکمپ. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند. * $p \leq 0.05$ و ** $p \leq 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل، + $p \leq 0.05$ در مقایسه با گروه LPS، $n = 6$.

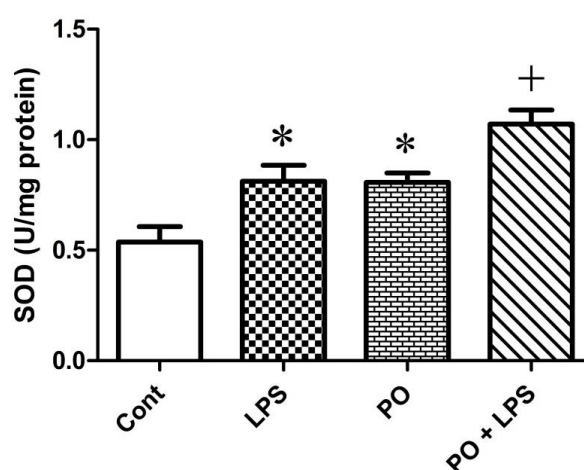
با افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان CAT سعی در مبارزه با شرایط نامساعد القا شده توسط LPS را دارد. از طرفی در گروه دریافت کننده عصاره خرفه نیز سطح CAT به صورت معناداری نسبت به کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$). همچنین در گروه پیشگیری مشاهده شد که خرفه به صورت معناداری سطح CAT را نسبت به گروه LPS افزایش داده است ($p < 0.05$).

تاثیر LPS و عصاره خرفه بر میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز (GR)

آنالیز واریانس یکطرفه بیانگر اختلاف معنادار بین چهار گروه مورد مطالعه بود [$F(3, 20) = 18.06, p < 0.001$]. مقایسه بین جفت گروه‌ها نشان داد که تزریق LPS باعث کاهش معنادار GR نسبت به گروه کنترل گردیده است ($p < 0.01$). حال آنکه در گروه دریافت کننده عصاره خرفه سطح GR به صورت معناداری نسبت به کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$). از طرفی در گروه پیشگیری مشاهده شد که خرفه به صورت معناداری سطح GR را نسبت به گروه LPS افزایش داده است ($p < 0.01$).

تاثیر LPS و عصاره خرفه بر میزان فعالیت آنزیم مالون دی آلدئید (MDA)

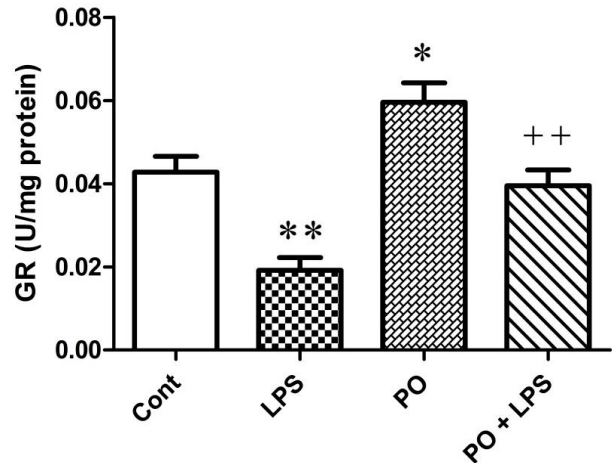
آنالیز واریانس یکطرفه بیانگر اختلاف معنادار بین چهار گروه مورد مطالعه بود [$F(3, 20) = 18.06, p < 0.001$].



نمودار ۱- میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز در هیپوکمپ. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند. * $p \leq 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل؛ + $p \leq 0.05$ در مقایسه با گروه LPS، $n = 6$.

MDA در موش‌های تحت تیمار LPS به صورت معناداری افزایش می‌یابد [۱۵]. در مطالعه حاضر نشان داده شد که تزریق LPS موجب افزایش سطح MDA در ناحیه هیپوکمپ مغز می‌شود. LPS با فعال کردن سلول‌های ایمنی و به دنبال آن افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن موجب پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که عصاره هیدرو الکلی گیاه خرفه باعث کاهش قابل توجه سطح MDA نسبت به گروه کنترل، در هیپوکمپ می‌گردد هر چند که این کاهش از نظر آماری معنادار نبود. از طرفی نتایج ما نشان داد که عصاره خرفه باعث کاهش معنادار MDA القا شده توسط LPS در هیپوکمپ می‌گردد.

از طرفی، اندازه‌گیری تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌تواند در تشخیص بروز استرس اکسیداتیو و پیشنهاد راهکارهایی جهت اصلاح یا جلوگیری از بروز آن بسیار کارآمد باشد. در این پژوهش نشان داده شد که میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز در مغز گروه‌های دریافت‌کننده LPS افزایش معناداری پیدا کرده است. همچنین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز در گروه دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی خرفه پیش از تزریق LPS نیز به صورت معناداری افزایش یافت. مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز در شرایط بروز استرس افزایش می‌یابد. هریتکو و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز در مدل پارکینسونی بر اثر تزریق LPS افزایش می‌یابد [۱۶]. خرازی نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که فعالیت

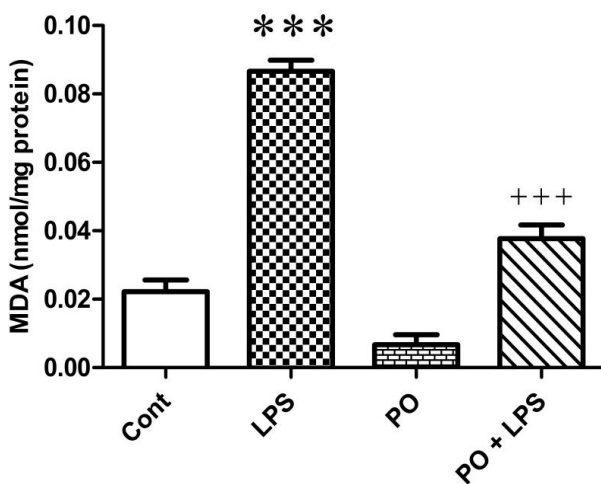


نمودار ۳- میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در هیپوکمپ. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند. * $p \leq 0.05$ و ** $p \leq 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل، ++ $p \leq 0.01$ در مقایسه با گروه LPS، $n = 6$.

مقایسه بین جفت گروه‌ها نشان داد که تزریق LPS باعث افزایش معنادار MDA نسبت به گروه کنترل گردیده است ($p < 0.001$). در گروه دریافت‌کننده عصاره خرفه سطح MDA اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل نداشت ($p > 0.05$). از طرفی در گروه پیشگیری مشاهده شد که خرفه به صورت معناداری سطح MDA را نسبت به گروه LPS کاهش داده است ($p < 0.001$, نمودار ۴).

بحث

استرس اکسیداتیو و اختلالات عصبی ناشی از آن در چند دهه اخیر یکی از مسائل مورد توجه محققین بوده است. از آنجایی که عوامل ایجادکننده استرس اکسیداتیو به طور طبیعی در بدن تولید می‌شوند، حذف یا کاهش اثرات آن می‌تواند به پیشگیری و یا درمان بسیاری از اختلالات عصبی کمک نماید. دستگاه عصبی مرکزی به علت بالا بودن میزان اکسیژن مصرفی و سطح پایین آنتی‌اکسیدان‌ها یکی از آسیب‌پذیرترین اندام‌های بدن می‌باشد [۲]. مطالعات گذشته نشان داده است که تزریق محیطی LPS با اثر بر رسپتورهای شبه تول ۴ (TLR4) که بر سطح بسیاری از سلول‌های ایمنی قرار دارد، موجب راه اندازی مسیرهای التهابی و در نتیجه تولید استرس اکسیداتیو می‌شود [۸، ۱۴]. از طرفی یکی از نشانه‌های اصلی جهت تشخیص استرس اکسیداتیو حضور مالون‌دی‌آلدئید (MDA) است که محصول پراکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد. مطالعات گذشته دانشمندانی چون سونکار نشان داد که میزان



نمودار ۴- تغییر سطح مالون دی آلدئید در هیپوکمپ. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند. *** $p \leq 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل و +++ $p \leq 0.001$ در مقایسه با گروه LPS، $n = 6$.

گلوتاتیون پروکسیداز به گلوتاتیون اکسید تبدیل می‌شود و طی این واکنش هیدروژن پروکسید به آب و اکسیژن تبدیل می‌شود. سپس گلوتاتیون اکسیدشده توسط گلوتاتیون ردوکتاز و با استفاده از NADPH احیا می‌شود.

گلوتاتیون اصلی‌ترین آنتی اکسیدان مغز می‌باشد مطالعه حاضر نشان داد که میزان فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در گروه دریافت‌کننده LPS نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش یافت. این کاهش فعالیت احتمالا به علت خالی شدن سلول‌ها از ذخایر گلوتاتیون احیا جهت پاکسازی رادیکال‌های آزاد تولیدشده می‌باشد. از طرفی ممکن است که تمامی NADPH سلولی بر اثر مصرف بیش از حد توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز، اکسیدشده و در نتیجه فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز مهار شود. در این رابطه دخیلی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که تولید استرس اکسیداتیو توسط رتنون موجب کاهش گلوتاتیون احیا سلول و همچنین کاهش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز می‌شود [۱۸]. در این مطالعه همچنین مشاهده شد که فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در گروه پیشگیری به‌صورت معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده LPS افزایش یافت. تصور می‌شود که خرفه به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی از گلوتاتیون می‌تواند گلوتاتیون مصرفی در سلول را جایگزین نماید. همچنین خرفه دارای اسیدآسکوربیک فراوانی است که طی چرخه گلوتاتیون اسید آسکوربیک می‌تواند بدون نیاز به آنزیم همدیگر را احیا کنند. مکانیسم اثر خرفه بر افزایش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز هنوز مشخص نیست. پیشنهاد می‌شود که بررسی بیان ژن این آنزیم در گروه‌های تیمار شده با خرفه می‌تواند در کمک به شناخت مکانیسم اثر خرفه بر این آنزیم موثر باشد. دخیلی و همکاران در ۲۰۱۱ نشان دادند که عصاره خرفه موجب افزایش گلوتاتیون احیا و فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز می‌شود [۱۸].

قریشی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند درمان با خرفه موجب افزایش گلوتاتیون احیا و افزایش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در سرم حیوانات مدل‌سازی شده پارکینسون می‌شود [۱۹].

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این تحقیق برای اولین بار نشان داد که عصاره هیدروالکلی خرفه می‌تواند نقش مؤثری در پیشگیری از

آنزیم سوپر اکسید دسموتاز در سرم رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین به صورت معناداری افزایش می‌یابد. که این افزایش در اثر تولید گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از فعالیت میکروگلیاهای مغزی، نوتروفیل‌ها، گلبول‌های قرمز موجود در خون و سلول‌های ستاره‌ای شکل کبد می‌باشد [۱۷]. از آنجایی که آنزیم سوپر اکسید دسموتاز اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدانی در بدن است این افزایش در فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز منطقی است، به نظر می‌رسد خرفه با کمک به افزایش فعالیت سوپر اکسید دسموتاز توانسته که در پاکسازی بدن از رادیکال‌های تولیدشده به‌وسیله LPS کمک نماید که البته مکانیسم اثر خرفه در این رابطه مشخص نیست. پیشنهاد می‌شود که خرفه با دارا بودن یون‌های فلزی مانند مس، آهن و منگنز که نقش اساسی را در عمل آنزیم سوپر اکسید دسموتاز دارند، در احیای آنزیم‌های آسیب دیده در طی استرس اکسیداتیو شرکت می‌کند. همچنین، در پژوهش حاضر نشان داده شد که فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه دریافت‌کننده LPS نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. از آنجایی که کاتالاز مسئول تخریب هیدروژن پراکسید تولیدی توسط بافت‌ها، سلول‌های ایمنی و آنزیم سوپر اکسید دسموتاز است بنابراین با افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد. نتایج ما بیانگر آن بود که خرفه توانسته است میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش دهد و نتایج قبلی را تایید می‌نماید. چنگیزی آشتیانی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که خرفه فعالیت آنزیم کاتالاز در رت‌های مبتلا به هاپرکلسترومی را افزایش می‌دهد [۶]. احتمال می‌رود که خرفه با احیای آنزیم‌های آسیب دیده موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شده باشد.

یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی در این زمینه افزایش بیان ژن این آنزیم می‌باشد. همچنین پیشنهاد می‌شود که خرفه با دارا بودن آنتی‌اکسیدان‌های فراوانی چون ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و اسیدهای چرب غیراشباع اثر محافظتی داشته و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را از آسیب به‌وسیله رادیکال‌های آزاد حفظ می‌نمایند. استرس اکسیداتیو موجب خالی شدن ذخیره گلوتاتیون در سلول می‌شود. نشان داده شده که با بروز استرس در بدن میزان گلوتاتیون احیا کاهش می‌یابد احتمال داده شده که این کاهش در نتیجه نقص در سنتز، استفاده بیش از حد و تخریب گلوتاتیون احیا باشد. گلوتاتیون احیا به‌وسیله‌ی

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

ل.ک.ز: انجام مطالعه و نگارش مقاله; م.ن: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; ع.ا: مشاوره; س.ر: اجرای بخشی از مطالعه.

فهرست منابع

- [1] Sivanandan R, Saraswathi P, Rajenderan M, Behavioral effect of *Fructus psoralea* on ethanol induced neurodegeneration of hippocampus in Wistar albino rat. **Recent Res in Sci Tech** 3 (2011) 98-102.
- [2] Calvello R, Panaro MA, Carbone ML, Cianciulli A, Perrone MG, Vitale P, Malerba P, Scilimati A, Novel selective COX-1 inhibitors suppress neuroinflammatory mediators in LPS-stimulated N13 microglial cells. **Pharmacol Res** 65 (2012) 137-148.
- [3] Beutler B, Rietschel ET, Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature Rev Immunol** 3 (2003) 169-176.
- [4] Akira S, Uematsu S, Takeuchi S, Pathogen recognition and innate immunity. **Cell** 124 (2006) 783-801.
- [5] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M, Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 14 (2010) 883-899.
- [6] Changizi-Ashtiyani S, Zarei A, Taheri S, Rasekh F, Ramazani M, The effects of *Portulaca oleracea* alcoholic extract on induced hypercholesterolemia in rats. **Zahedan J Res Med Sci** 15 (2013) 34-39.
- [7] Gandhi S, Abramov AY, Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev** 20 (2012) 12-20.
- [8] Kaur G, Tirkey N, Bharrhan S, Chanana V, Rishi P, Chopra K, Inhibition of oxidative stress and cytokine activity by curcumin in amelioration of endotoxin-induced experimental hepatotoxicity in rodents. **Clin Exp Immunol** 145 (2006) 313-321.
- [9] Hozayen W, Bastawy M, Elshafeey H, Effects of aqueous purslane (*Portulaca oleracea*) extract and fish oil on gentamicin nephrotoxicity in Albino rats. **Nature Sci** 9 (2011) 47-62.
- [10] Beauchamp C, Fridovich I, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem** 44 (1971) 276-287.

استرس اکسیداتیو ناشی از التهاب القا شده توسط LPS در هیپوکمپ داشته باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد لیلا کریمی زندی می باشد و در گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان و با حمایت مالی بخش تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان صورت گرفت.

- [11] Aebi H, Catalase in vitro. **Methods enzymol** 105 (1984) 121-126.
- [12] Schadendorf D, Jurgovsky K, Kohlmus CM, Czarnetzki, BM, Glutathione and related enzymes in tumor progression and metastases of human melanoma. **J Invest Dermatol** 105 (1995) 109-112.
- [13] de Sá-Nakanishi AB, Effects of the continuous administration of an *Agaricus blazei* extract to rats on oxidative parameters of the brain and liver during aging. **Molecules** 19 (2014) 18590-18603.
- [14] Stigger F, Lovatel G, Marques M, Bertoldi K, Moysés F, Elsner V, Siqueira IR, Achaval M, Marcuzzo S, Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia. **Int J Dev Neurosci** 31 (2013) 820-827.
- [15] Swarnkar S, Goswami P, Kamat PK, Patro IK, Singh S, Nath C, Rotenone-induced neurotoxicity in rat brain areas: A study on neuronal and neuronal supportive cells. **Neuroscience** 230 (2013) 172-183.
- [16] Hritcu L, Ciobica A, Stefan M, Mihasan M, Palamiuc L, Nabeshima T, Spatial memory deficits and oxidative stress damage following exposure to lipopolysaccharide in a rodent model of Parkinson's disease. **Neurosci Res** 71 (2011) 35-43.
- [17] Khrasinezhad I, Nakhei A, Taheri M, Increased serum enzymes superoxide dismutase and catalase in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Med Lab Sci** 7 (2014) 15-20.
- [18] Dkhil MA, Abdel Moniem A, Al-Quraishy S, Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. **J Med Plant Res** 5 (2011) 1589-1563.
- [19] Al-Quraishy S, Dkhil MA, Abdel Moneim AE, Protective effects of *Portulaca oleracea* against rotenone mediated depletion of glutathione in the striatum of rats as an animal model of Parkinson's disease. **Pest Biochem Physiol** 103 (2012) 108-114.

Research paper

Protective effect of hydro-alcoholic extract of *Portulaca oleracea* on LPS-induced oxidative damage in the hippocampus of rats

Leila Karimi Zandi, Maryam Noorbakhshnia*, Ali Akbar Ehsanpour, Somayeh Rajaeian

Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 14 June 2016

Accepted: 16 August 2016

Abstract

Introduction: One of the main causes of neurodegenerative disorders and diseases with deficits in learning and memory is nervous system inflammation (neuroinflammation), which is usually associated with oxidative stress. Neuroinflammation can activate immune cells with a cascade of cellular and chemical reactions and finally produce large amounts of reactive oxygen species. Recent studies have shown that the use of plants with a high amount of antioxidants can be a proper candidate for the prevention and treatment of neuroinflammation and oxidative stress. *Portulaca oleracea* is rich in unsaturated fatty acids and antioxidants such as: α -tocopherol, ascorbic acid and glutathione, so can have positive effects on the prevention of neuroinflammation and oxidative stress. In this study, effect of a hydro-alcoholic extract of *Portulaca oleracea* on improvement of oxidative damage induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) was assessed in rat hippocampus.

Methods: Male wistar rats (220 ± 10 g) were divided to 4 groups. Animals received hydro-alcoholic extract of *Portulaca oleracea* (400 mg/kg) for 14 days by oral gavage. LPS (1mg/kg) was injected intraperitoneally. The antioxidant enzymes activity was determined by measuring catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione Reductase (GR) in the hippocampus. Also, lipid peroxidation was measured as a marker of oxidative damage.

Results: LPS stimulated and increased the activity of SOD and CAT but reduced the activity of GR compared to control group. Also, LPS enhanced malondialdehyde (MDA) level. Pre-treatment with *Portulaca oleracea* significantly increased SOD, CAT and GR and decreased MAD compared to LPS group.

Conclusion: It seems *Portulaca oleracea* can be introduced as a natural product for prevention and treatment of oxidative damage due to its special compounds and powerful antioxidative activity.

Keywords: Bacterial lipopolysaccharide, Neuro-inflammation, Oxidative damage, *Potrulaca oleracea*, Rat

Please cite this article as follows:

Karimi Zandi L, Noorbakhshnia M, Ehsanpour AA, Rajaeian S, Protective effect of hydro-alcoholic extract of *Portulaca oleracea* on LPS-induced oxidative damage in the hippocampus of rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 1 (2018) 8-16.

*Corresponding author e-mail: m.noorbakhshnia@sci.ui.ac.ir

Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>

E-mail: ijpp@phypha.ir