دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۲، صفحه ۳۴۱-۳۳۲ (۱۳۹۴)

اثر عصاره هیدروالکلی گل گیاه ازگیل ژاپنی (*Eriobotrya japonica* Lindl.) بر سطوح *CDNF*، *SOD* و *MDA* قشر مخ در مدل تجربی بیماری پارکینسون در موش صحرایی نر

جلیل اصلانی[۱*]، اکبر حاجی‌زاده مقدم[۲]، ضیاء فلاح محمدی[۳]، امیرحسین اسماعیلی[۴] و راضیه محمدی[۵]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر

پست الکترونیک: aslani_jalil68@yahoo.com

۲- استادیار، فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۳- دانشیار، فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر

۴- مربی، گروه بیوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر

۵- کارشناس ارشد، فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۲ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۲

چکیده

گل گیاه ازگیل ژاپنی (*Eriobotrya japonica* Lindl.) دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظتی است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر حفاظت نورونی با عصاره هیدروالکلی گل گیاه ازگیل ژاپنی بر سطوح *CDNF*، مالون دی‌آلدهید و سوپراکسیددیسموتاز قشر مخ در مدل تجربی بیماری پارکینسون در موش بزرگ نر بود. در این مطالعه تجربی، حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه ۹ تایی: کنترل، ضایعه دیده و ضایعه دیده تحت تیمار با عصاره (تیمار-عصاره) تقسیم شدند. ابتدا موش‌های گروه دوم و سوم به‌ترتیب حلال عصاره (سالین) و عصاره (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به مدت دوازده هفته و هر هفته سه روز به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند. برای ایجاد پارکینسون در موش‌ها، پس از ۱۲ هفته، *6-OHDA* به داخل بطن راست مغز تزریق شد و در نهایت پنج روز بعد از تزریق داخل بطنی، بافت‌برداری انجام و سطوح *CDNF*، *SOD* و *MDA* در قشر مخ اندازه‌گیری شد. داده‌ها به روش آزمون آماری واریانس یک‌طرفه بین گروه‌ها مورد مقایسه قرارگرفت. نتیجه این پژوهش نشان داد که پیش درمان با استفاده از عصاره گل ازگیل ژاپنی احتمالاً به‌دلیل وجود ترکیب‌های فنولیک در کنار ترکیب‌های فلاونوئیدی این گیاه که خواص آنتی‌اکسیدانی قوی دارد از راه افزایش سطح *CDNF* و *SOD* موجب کاهش سطح *MDA* قشر مخ شده، بنابراین به حفاظت از نورون‌ها در برابر تخریب اکسیداتیو ناشی از سمّیت *6-OHDA* کمک می‌کند. در نتیجه، می‌توان گفت که عصاره این گیاه نقش حفاظتی در برابر بیماری پارکینسون دارد.

واژه‌های کلیدی: گل گیاه ازگیل ژاپنی (*Eriobotrya japonica* Lindl.)، *CDNF*، *SOD*، *MDA*، پارکینسون.

مقدمه

استرس اکسیداتیو شرایطی است که در آن تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و نیتروژن (*RONS*) دفاع آنتی‌اکسیدانی موجود در بدن را از بین برده و ممکن است موجب اکسیداسیون و تخریب سلول‌ها شود (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). به‌طوری که تولید بیش از

حد *RONS* منجر به اکسیداسیون چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و تغییر در عملکرد طبیعی سلولی می‌شود (Dalle-Donne *et al*., 2006). به‌طور معمول استرس اکسیداتیو همراه با التهاب مزمن با پاتولوژی بیماری‌ها همراه است (Visioli *et al*., 2012). البته بافت‌هایی که به مدت طولانی در معرض استرس اکسایشی قرار می‌گیرند، دچار تطابق در سیستم اکسیدانی/ آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی از طریق تحریک فعالیت آنزیماتیک می‌شوند که شامل افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (*GPX*) و سوپراکسیداز (*SOD*) است. این آنزیم‌ها به همراه کاتالاز (*CAT*) و گلوتاتیون S ترانسفراز اولین خط دفاعی در برابر حمله انواع رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌باشند (Chung *et al*., 2009).

بیماری پارکینسون، شایع‌ترین اختلال نوروپاتوژنیک است که در نتیجه دژنراسیون نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه مغز و پایانه‌های آن در استراتیوم به‌وجود می‌آید (Sauer & Oertel, 1994). عواملی از قبیل استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش سطح گلوتاتیون، تخریب *DNA* و تجمع آهن از مهمترین علل دژنراسیون نورون‌های دوپامینرژیکی هستند (Schwarting & Huston, 1997). استرس اکسیداتیو، نه تنها نورون‌های دوپامینرژیکی را تخریب می‌کند، بلکه با ایجاد اختلال در فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو و کاهش تولید انرژی، منجر به مرگ سلول‌ها می‌شود (Dauer & Przedborski, 2003).

فاکتورهای نوروتروفیک پروتئین‌های ترشحی هستند که با اتصال به گیرنده‌های هدفشان مانع از کاهش سلول‌های عصبی می‌شوند (Hellman *et al*., 2010). *CDNF* (Cerebral dopamine neurotrophic factor)، یک عامل نوروتروفیک تازه شناسایی شده با فعالیت نوروتروفیک، محافظت نورونی و بازیابی عصبی است (Sun *et al*., 2011)، *CDNF* توانایی حفاظت از عملکرد سلول‌های دوپامینرژیکی را در موش‌های مدل پارکینسونی دارد. همچنین پروتئین *CDNF* می‌تواند در درمان بیماری پارکینسون سودمند باشد (Lindholm & Saarma, 2010) البته مکانیسم حفاظت عصبی *CDNF* به درستی مشخص نیست (Hellman *et al*., 2010). *CDNF* پروتئینی است که نه تنها در بقای سلول‌های عصبی بلکه در بقا، تکثیر و تفکیک سلول‌ها و بافت‌های غیرعصبی نیز نقش‌های مهمی دارد. *CDNF* عمدتاً در سلول‌های عصبی سیستم مرکزی ازجمله هیپوکامپ، قشر مغز، مغز میانی، مخچه، جسم سیاه و جسم مخطط توزیع شده است (Sun *et al*., 2011).

تصور می‌شود که استرس اکسیداتیو به دنبال تشکیل رادیکال‌های آزاد نقش اساسی در نوروپاتولوژی این بیماری دارد (Olanow, 1990). تزریق داخل استریاتال ۶-هیدروکسی دوپامین (*6-OHDA*) به میزان مشخص در موش بزرگ موجب از دست رفتن پیشرونده و تدریجی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه می‌گردد که روند آن شباهت بسیاری با نوروپاتولوژی بیماری پارکینسون دارد و به‌عنوان یک مدل تجربی معتبر برای نشان دادن مراحل شروع این بیماری محسوب می‌شود (Gerlach & Riederer, 1996). نوروتوکسین *6-OHDA* با تولید رادیکال‌های آزاد که خود سیتوتوکسیک هستند، سبب مختل نمودن هموستازی کلسیم از طریق افزایش ورود یا تشدید آزاد شدن از ذخایر داخل سلولی (Sautter *et al*., 1997)، اثر بر برنامه تنظیم ژنتیکی و القای آپوپتوز (Hellman *et al*., 2010) شده و موجب مرگ نورونی می‌شود.

درمان‌های آنتی‌اکسیداتیو در مراحل اولیه بیماری پارکینسون امروزه در کلینیک مطرح است. یکی از روشهای درمانی برای کاهش دادن اثرات استرس اکسیداتیو و محافظت نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هاست. آنتی‌اکسیدان‌های بیولوژیکی نقش حیاتی در محافظت از سلول‌ها در برابر فشار اکسایشی ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (*SOD*)، کاتالاز (*CAT*) و گلوتاتیون پراکسیداز (*GPX*) و ضداکسایش‌های غیرآنزیمی شامل ویتامین A، C، E، فلاونوئیدها، اسید اوریک، بیلی‌روبین (Billirubin)، فریتین، تیول‌ها مانند گلوتاتیون (*GSH*)، یوبی‌کویین (*Q10*) و ریزمغذی‌هایی مانند آهن، مس، روی، سلنیوم و منگنز هستند

(Bailey *et al.*, 2001). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در جهت جلوگیری از فرایندهای آسیب‌زای ناشی از تولید بیش از حد *RONS* و پیشگیری از ابتلا به بیماری پارکینسون مهم و حیاتی است، به‌طوری که جستجو برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد (Ito *et al.*, 2000). بخش فنولی و فلاونوئیدی گیاهان، آنتی‌اکسیدانت‌های قوی در محیط *In vitro* و *In vivo* محسوب می‌شوند (Esmaeili *et al.*, 2012). عصاره میوه، برگ و دانه گیاه ازگیل ژاپنی حاوی مقادیر زیادی ترکیب‌های فلاونوئیدی و فنولیک هستند و رابطه مثبت بین مقدار ترکیب‌های فلاونوئیدی و فنولیک در عصاره این گیاه با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مورد تأیید قرار گرفته است. وجود ترکیب‌های فنولیک در کنار ترکیب‌های فلاونوئیدی گل گیاه ازگیل ژاپنی باعث خواص آنتی‌اکسیدانی قوی این گیاه می‌شود (Ito *et al.*, 2000). در تحقیقی اثر محافظتی آنتی‌اکسیدان‌های عصاره هیدروالکلی گل گیاه ازگیل ژاپنی بر مسمومیت کبدی القاء شده با کلرید جیوه در موش تأیید شد (Esmaeili *et al.*, 2012). تاکنون در مورد تأثیر این عصاره در مدل تخریب نورون‌های دوپامینی پژوهشی انجام نشده است. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر یک دوره ۱۲ هفته‌ای تزریق زیر صفاقی عصاره هیدروالکلی گل گیاه ازگیل ژاپنی بر محافظت از نورون‌های دوپامینرژیک تخریب شده با ۶-هیدروکسی دوپامین در قشر مخ موش‌های صحرایی نر بود.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از ۲۷ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (دوازده هفته‌ای) از مرکز انستیتو پاستور آمل تهیه شد. تمام حیوانات در دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های ۳ تا ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. موش‌ها در دوره تاریکی/ روشنایی ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری گردیدند. میانگین وزن موش‌های گروه‌های مختلف پس از دسته‌بندی پژوهش به‌طور متوسط ۷±۲۱۰ گرم بود. سن همه آزمودنی‌ها ۱۰-۸ هفته بود. آزمودنی‌ها در ابتدای هر هفته وزن‌کشی می‌شدند.

تهیه عصاره هیدروالکلی گل ازگیل ژاپنی

گل تازه گیاه ازگیل ژاپنی از مناطق اطراف بابلسر در محدوده زمانی اواخر پاییز جمع‌آوری و خشک گردید. برای تهیه عصاره هیدروالکلی گل گیاه ازگیل ژاپنی مقدار ۱۰۰ گرم از پودر گیاه با مخلوط آب و اتانول به نسبت ۸۰/۲۰ در حجم ۶۰۰ میلی‌لیتر اضافه شد. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر (مدل KS500) با قدرت چرخش ۳۲۵ دور در دقیقه قرارگرفت. در مرحله بعد ابتدا از پارچه سفید منفذدار و بعد دو بار از کاغذ صافی واتمن شماره۴ عبور داده شد. آنگاه محلول صاف شده وارد بالون تقطیر شد و به کمک دستگاه تبخیرکننده چرخان (rotary evaporator) تحت خلأ حلال‌پراکنی گردید. این عمل در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت انجام شد (Nishioka *et al.*, 2002). در نهایت بعد از خشک کردن با اضافه نمودن نرمال سالین، محلول آبی عصاره حاصل گردید.

گروه‌بندی حیوانات

حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه ۹ تایی: کنترل، ضایعه دیده و ضایعه دیده تحت تیمار با عصاره تقسیم شدند. موش‌های گروه دوم و سوم به‌ترتیب حلال عصاره (سالین) و عصاره (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به مدت دوازده هفته و هر هفته سه روز به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند (Esmaeili *et al.*, 2012).

ایجاد مدل پارکینسونی

در ادامه موش‌های گروه‌های تیمار با تزریق داخل صفاقی کتامین (۵۰mg/kg) و زایلازین (۴mg/kg) بی‌هوش شدند و به کمک دستگاه استروتاکس (مدل Steolting)، کانول راهنمای تزریق شماره ۲۲ درون بطن سمت راست مغز آنها با مختصات: قدامی-خلفی (AP): ۰/۸- میلی‌متر، جانبی (L): ۱/۶+ میلی‌متر و عمق از سطح جمجمه (V): ۳/۵ میلی‌متر قرارگرفت. در این مرحله به کمک سیمان دندانپزشکی کانول راهنما به جمجمه محکم متصل شد. یک

روز بعد از جراحی، تزریق‌های داخل مغزی به کمک کانول تزریق شماره ۲۷ که طول آن ۱ میلی‌متر بلندتر از طول کانول راهنما بود، انجام شد. کانول تزریق به کمک لوله پلی‌اتیلن به یک سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری متصل بود. ۶-هیدروکسی دوپامین (*6-OHDA*) با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در ۵ میکرولیتر محلول سالین حاوی اسید آسکوربیک ۰/۲٪ حل شده و در مدت ۶۰ ثانیه به موش‌های گروه تیمار تزریق شد (Shachar *et al.*, 2004). علاوه‌بر این، کانول تزریق به مدت ۶۰ ثانیه دیگر برای اطمینان از جذب دارو و جلوگیری از برگشت دارو به درون کانول راهنما در محل ماند.

بافت‌برداری

در روز پنجم بعد از تزریق *6-OHDA*، ابتدا موش‌های هر سه گروه بیهوش و بعد به سرعت بافت قشر مخ از سایر قسمت‌های مختلف مغز جدا شده و در ازت مایع قرار گرفت. در ادامه بعد از هموژنایز بافت در محلول بافر فسفات سالین با pH ۷/۴، نمونه در مدت ۲۰ دقیقه با دور g۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد (اصلانی، ۱۳۹۲).

سنجش CDNF قشر مخ

برای سنجش *CDNF* قشر مخ از کیت ELISA موش شرکت CUSABIO کشور چین استفاده شد. ضریب پراکندگی و حساسیت روش مذکور به‌ترتیب ۰/۰۳۹ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۸٪ می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز، پروتئین و مالون دی‌آلدئید در قشر مخ

اندازه‌گیری سوپر اکسید دیسموتاز با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و برای سنجش پروتئین از روش مرسوم برادفورد انجام شده‌است (Baluchnejadmojarad & Roghani, 2011). اندازه‌گیری سطح MDA براساس روش واکنش تیوباربیوتوریک اسید (TBA) بود که در دمای جوش و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (Nasri *et al.*, 2011).

تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور بررسی تفاوت‌های موجود بین گروه‌های تجربی و کنترل از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد. همچنین آزمون تعقیبی LSD در سطح معنی‌داری $p\leq$۰/۰۵ برای بررسی تفاوت بین گروهی استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

نتایج

در جدول ۱ مقادیر بدست آمده هر یک از شاخص‌ها براساس انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده‌است. آزمون کولموگروف- اسمیرنف نشان داد که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردارند.

جدول ۱- مقادیر بدست آمده هر یک از متغیرها براساس انحراف معیار ± میانگین

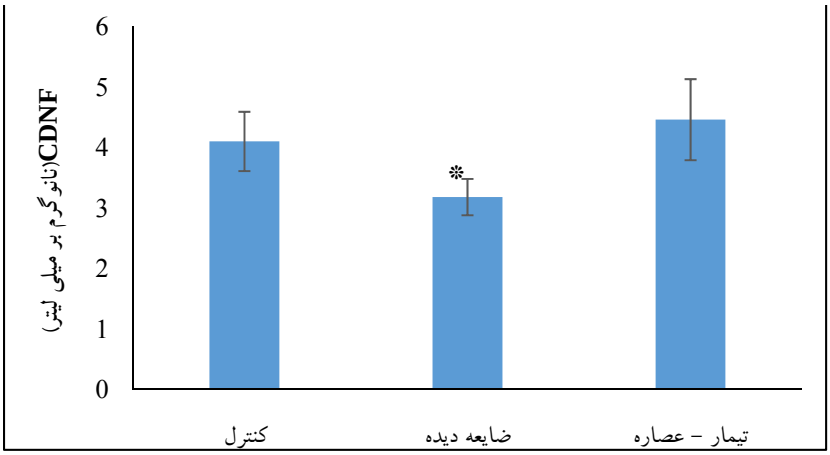
گروه‌ها	شاخص‌ها		
	CDNF (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	**SOD** (واحد در هر میلی‌لیتر)	**MDA** (میکرومول)
کنترل	۴/۱±۰/۴۹	۰/۰۰۲۷±۰/۰۰۰۴	۲۶/۷۲±۸/۶۶
ضایعه دیده	۳/۱۸±۰/۳۰	۰/۰۰۱۶±۰/۰۰۰۰۸	۶۲/۵۶±۲۹/۷۶
تیمار- عصاره	۴/۴۶±۰/۶۷	۰/۰۰۲۷±۰/۰۰۰۸	۲۴/۱۲±۸/۴۴

سطح CDNF قشر مخ

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده‌است، نتایج حاصل از بررسی نشان می‌دهد که تزریق درون بطنی ۶-هیدروکسی دوپامین در گروه ضایعه دیده در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی‌دار غلظت *CDNF* قشر مخ گردید. تزریق منظم عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی به مدت دوازده هفته توانست مانع از کاهش غلظت *CDNF* در قشر مخ آزمودنی‌ها گردد (شکل ۱).

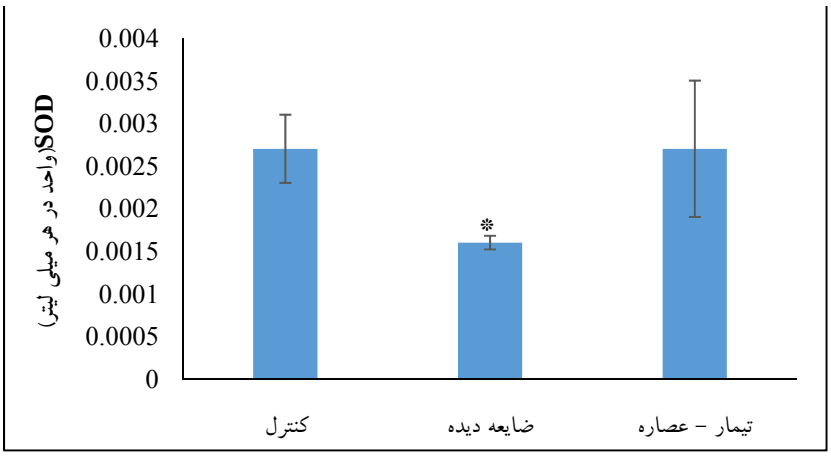
فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز

میزان فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز در بافت قشر مخ گروه ضایعه دیده با ۶-هیدروکسی دوپامین، در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. همچنین مصرف دوازده هفته‌ای عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی به‌صورت معنی‌داری از کاهش فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز جلوگیری کرد (شکل ۲).



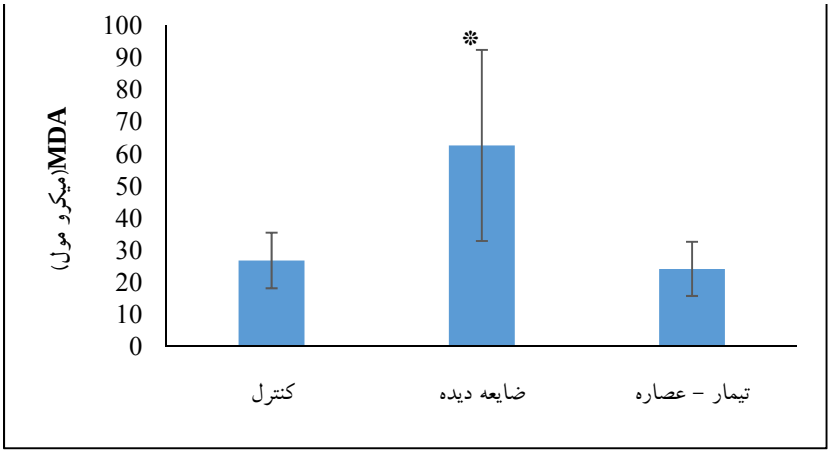
شکل ۱- مقدار *CDNF* در گروه‌های مختلف

(*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل سالم در سطح $p\leq۰/۰۵$)



شکل ۲- مقدار *SOD* در گروه‌های مختلف

(*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل سالم در سطح $p\leq۰/۰۵$)



شکل ۳- مقدار *MDA* در گروه‌های مختلف

(*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل سالم در سطح $p \leq ۰/۰۵$)

سطح مالون دی‌آلدهید

با اندازه‌گیری سطح *MDA* (شاخص استرس اکسیداتیو) مشخص شد که این پارامتر در گروه ضایعه دیده در برابر گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، اما مصرف عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی به‌صورت معنی‌داری مانع از افزایش *MDA* شد (شکل ۳).

بحث

نتایج این بررسی نشان داد موش‌هایی که *6-OHDA* دریافت کرده بودند کاهش معنی‌داری در سطح پروتئینی *CDNF* و فعالیت آنزیم *SOD* و همچنین افزایش قابل توجهی در سطح *MDA* قشر مخ داشتند. درمان با عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی مانع از کاهش غلظت *CDNF* و فعالیت آنزیم *SOD* و همچنین باعث کاهش قابل توجهی در سطح *MDA* قشر مخ در گروه تیمار عصاره می‌شود.

مطالعات قبلی نشان داده‌است که در بروز بیماری پارکینسون استرس اکسیداتیو نقش دارد. استرس اکسیداتیو به‌وسیله رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید بروز می‌کند. سطوح پایین این رادیکال‌های آزاد به‌وسیله فرایندهای آنتی‌اکسیدانی درون‌زا شامل واکنش با ویتامین E، C و یا آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز حفظ می‌شود. هرگونه اختلال در تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و فرایندهای آنتی‌اکسیدانی منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود (Van Kampen *et al.*, 2003). سطوح بالای مالون دی‌آلدهید و هیدروپراکسیدهای لیپید که مارکرهای تخریب اکسیداتیو هستند، در مغز میانی بیماران پارکینسونی گزارش شده‌است (Sankar *et al.*, 2007). استرس اکسایشی القا شده با *6-OHDA* به‌واسطه افزایش گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن می‌تواند به لیپید، پروتئین و *DNA* آسیب رسانده و موجب تخریب این نورون‌ها شود (Gerlach & Riederer, 1996). محققان با بررسی تغییرات رفتار حرکتی، تزریق درون بطنی *6-OHDA* به موش را به‌عنوان مدل حیوانی بیماری پارکینسون پیشنهاد کردند (Kabuto & Yamanushi, 2011).

مکانیسم اثر ۶-هیدروکسی دوپامین در مرحله تبدیل ال-دوپا به دوپامین رخ می‌دهد و آنزیم دوپادکربوکسیلاز را غیرفعال می‌کند. این فرایند از تولید دوپامین جلوگیری می‌کند و بدین ترتیب مدل بیماری پارکینسون ایجاد می‌گردد. در این تحقیق برای ایجاد مدل پارکینسون از تزریق داخل بطنی مقدار ۲۵۰ میکروگرم در حجم ۵ میکرولیتر به ازای هر موش انجام شد. ۶-هیدروکسی دوپامین از طریق

حامل‌های انتخابی دوپامین وارد پایانه‌های دوپامینرژیک استریاتوم شده و با تولید پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل مشتق از آن، موجب تخریب این نواحی می‌شود (Gerlach & Riederer, 1996).

در راستای این مطالعه برخی از پژوهش‌ها، تأثیر مصرف عصاره‌های گیاهی را بر مدل حیوانی بیماری پارکینسون گزارش نمودند. برای نمونه، مصرف خوراکی عصاره گیاهی جینسینگ باعث توقف تخریب سلولی جسم سیاه و کاهش بروز اختلالات عملکردی در موش‌های پارکینسونی شد (Van Kampen *et al.*, 2003). در مطالعه‌ای دیگر که روی گیاه ژینگو بیلوبا انجام گردید، مشخص شد که عصاره برگ این گیاه باعث کاهش اختلالات رفتاری ناشی از آسیب‌های ایجاد شده توسط ۶-هیدروکسی دوپامین می‌شود (Kim *et al.*, 2004).

مکمل‌ها و عصاره‌های گیاهی فراوانی نقش بهبود آسیب‌های بافتی به‌وسیله کیفیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داده‌اند (Li *et al.*, 2011). فنول‌ها و مکمل‌های پلی‌فنولی، از قبیل فلاوونوئیدها، عمدتاً در فراورده‌های غذایی مشتق از منابع گیاهی یافت می‌شوند و این مواد دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی هستند (Van Acker *et al.*, 1996). ترکیب‌های فنولی و فلاوونوئیدی که در گیاهان به مقدار زیادی وجود دارند به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه، بر سلامت انسان و کاهش خطر چندین بیماری از طریق کاهش استرس اکسیداتیو اثر می‌گذارند (Esmaeili *et al.*, 2012). ترکیب‌های فنولی و فلاوونوئیدی قادر هستند آسیب‌های ناشی از پراکسیداسیون لیپید و اکسیداسیون پروتئین‌ها را کم کنند. مطالعات دیگر نشان داده است که این ترکیب‌های فنولی می‌توانند سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی مغز را افزایش دهند. مغز دارای سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی است که به‌عنوان سد دفاعی در برابر رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند، اما با افزایش سن و بروز کهنسالی این سیستم‌های دفاعی تضعیف می‌شوند. از آنزیم‌های موجود در این سیستم‌ها می‌توان به آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز اشاره کرد. آنزیم *SOD* نقش کلیدی در کاهش سمّیت آنیون‌های سوپر اکسید دارد. کاهش فعالیت این آنزیم در ارتباط با بیماری پارکینسون بیانگر نقش اصلی و مهم آن در رویارویی با رادیکال‌های آزاد تولید شده در مغز است (Dani *et al.*, 2008).

گل گیاه ازگیل ژاپنی حاوی مقادیر زیادی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی و فنولی است. چندین مطالعه اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی را گزارش کرده‌اند (Esmaeili *et al.*, 2012). عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی دارای ترکیب‌های مختلفی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان می‌دهند، که ازجمله آنها اسیدکافئیک، اسیدکلروژنیک، اسیداولنولیک، اسید اورسولیک و آمیگدالین می‌باشند. همچنین بتا-سیتو استرول که از تولید اکسیژن فعال به‌وسیله نوتروفیل‌ها جلوگیری می‌کند ولی در پایداری غشاء سلول نقش دارد (Nishioka *et al.*, 2002).

Yokota و همکاران (۲۰۰۶) فعالیت پاکسازی *ROS* را توسط عصاره دانه گل گیاه ازگیل ژاپنی گزارش کرده‌اند. پاکسازی H_2O_2 توسط عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی ممکن است به ترکیب‌های فنولی آنها نسبت داده شود (گالیک اسید) که می‌تواند یک الکترون به H_2O_2 داده و آن را به H_2O و O_2 تبدیل کند. مطالعاتی نیز رابطه مثبت مقدار ترکیب‌های فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های گیاهی را با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تأیید کردند (Ding *et al.*, 2001). Perumal و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که پیش درمان با ویتامین E خوراکی، اثر سمّی *6-OHDA* را بر میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجود در تنه مغزی و هسته ساب تالامیک کاهش می‌دهد. عصاره گیاه ماریتیغال نیز که غنی از آنتی‌اکسیدان سیلی‌مارین است، موجب بقای نورون‌های نیگرواستریاتال در بخش متراکم جسم سیاه حتی پس از نورودژنراسیون القا شده به‌وسیله نوروتوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین می‌شود (بلوچ‌نژاد مجرد و روغنی، ۱۳۸۹). همچنین گزارش شده که پیش درمانی عصاره ازگیل ژاپنی به‌طور معنی‌داری به‌واسطه کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت *SOD*، باعث بهبود اختلالات رفتاری و کاهش

استرس اکسایشی القا شده با آمیلوئید بتا می‌گردد (Kim *et al.*, 2004).

در تحقیق حاضر به‌دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی و نقش حفاظت نورونی که این آنتی‌اکسیدان دارد برای اولین بار اثر پیش درمانی بلندمدت (۱۲ هفته) عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی را که نسبت به خود میوه یا هسته ازگیل ژاپنی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری است، بر میزان غلظت پروتئین *CDNF* و فعالیت آنزیم *SOD* و میزان *MDA* قشر مخ در برابر آسیب نورونی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتیجه این پژوهش پیشنهاد می‌گردد که مصرف عصاره گل گیاه ازگیل ژاپنی سطح CDNF را افزایش داده و باعث محافظت از نورون‌های دوپامینرژیک قشر مخ در برابر ضایعه ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین می‌شود و احتمالاً می‌تواند نقش حفاظتی در برابر بیماری پارکینسون داشته باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که این تحقیق با اندازه‌گیری فاکتورهای اکسایشی و ضداکسایشی بیشتری انجام شود.

منابع مورد استفاده

- اصلانی، ج.، ۱۳۹۲. اثر حفاظتی تمرین اختیاری چرخ دوارهمراه با مصرف عصاره‌ی هیدروالکلی گل گیاه ازگیل ژاپنی بر سطح CDNF، SOD و MDA قشر مخ موش‌های پارکینسونی شده در اثر القاء۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ۲۰۰ صفحه.
- بلوچ‌نژاد مجرد، ت. و روغنی، م.، ۱۳۸۹. نقش گیرنده‌های استروژنیک و استرس اکسیداتیو در اثر حفاظتی عصاره آبی گیاه *Silybum marianum* در موش صحرایی نیمه پارکینسونی. پزشکی کوثر، ۱۵(۴): ۲۱۲-۲۰۷.
- Bailey, D.M., Davies, B., Young, I.S., Hullin, D.A. and Seddon, P.S. 2001. A potential role for free radical-mediated skeletal muscle soreness in the pathophysiology of acute mountain sickness. Aviation, Space, and Environmental Medicine, 72(6): 513-521.
- Baluchnejadmojarad, T. and Roghani, M., 2011. Chronic epigallocatechin-3-gallate ameliorates learning and memory deficits in diabetic rats via modulation of nitric oxide and oxidative stress. Behavioural Brain Research, 224(2): 305-310.
- Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A.Y., Carter, C., Yu, B.P. and Leeuwenburgh, C., 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. Ageing Research Reviews, 8(1): 18-30.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. and Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clinical Chemistry, 52(4): 601-623.
- Dani, C., Pasquali, M.A., Oliveira, M.R., Umezu, F.M., Salvador, M., Henriques, J.A. and Moreira, J.C. 2008. Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brains of adult Wistar rats. ournal of Medicinal Food, 11(1): 55-61.
- Dauer, W. and Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: Mechanisms and models. Neuron, 39(6): 889-909.
- Ding, CK., Chachin, K., Ueda, Y., Imahori, Y. and Wang, C.Y., 2001. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6): 2883-2888.
- Esmaeili, A., Khavari-Nejad, RA., Hajizadeh moghaddam, A., Chaichi, M. and Ebrahimzadeh, M., 2012. Effects of *Eriobotrya japonica* Lindl. flower extracts on mercuric chloride-induced hepatotoxicity in rats. Chinese Science Bulletin, 57(30): 3891-3897.
- Fisher-Wellman, K. and Bloomer, R.J., 2009. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. Dynamic Medicine, 8(1): 1-25.
- Gerlach, M. and Riederer, P., 1996. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. Journal of Neural Transmission, 103(8-9): 987-1041.
- Hellman, M., Peränen, J., Saarma, M. and Permi, P., 2010. 1H, 13C and 15N resonance assignments of the human mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor. Biomolecular NMR Assignments, 4(2): 215-217.
- Ito, H., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Li, S.H., Hatano, T., Sakagami, H., Kusama, K., Satoh, K., Sugita, D., Shimura, S., Itoh, Y. and Yoshida, T., 2000. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 48(5): 687-693.
- Kabuto, H. and Yamanushi, T.T., 2011. Effects of zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone] and eugenol [2-methoxy-4-(2-

and immunocytochemical study in the rat. Neuroscience, 59(2): 401-415.
- Sautter, J., Kupsch, A., earl, C.D. and Oertel, W.H., 1997. Degeneration of pre-labelled nigral neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat: behavioral and biochemical changes and pretreatment with the calcium-entry blocker nimodipine. Experimental Brain Research, 117: 111-119.
- Schwarting, R.K. and Huston, J.P., 1997. Behavioral and neurochemical dynamics of neurotoxic meso-striatal dopamine lesions. Neurotoxicology, 18(3): 689-708.
- Shachar, D.B., Kahana, N., Kampel, V., Warshawsky, A. and Youdim, M.B., 2004. Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lession in rats. Neuropharmacology, 46(2): 254-263.
- Sun, Z.P., Gong, L., Huang, S.H., Geng, Z., Cheng, L. and Chen, Z.Y., 2011. Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells. Journal of Neurochemistry, 117(1): 121-132.
- Van Acker, S.A., Van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van der Vijgh, W.J. and Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine, 20(3): 331-342.
- Van Kampen, J., Robertson, H., Hagg, T. and Drobitch, R., 2003. Neuroprotective actions of the ginseng extract G115 in two rodent models of Parkinson's disease. Experimental Neurology, 184(1):521-529.
- Visioli, F., Giordano, E., Nicod, N.M. and Dávalos, A., 2012. Molecular targets of omega 3 and conjugated linoleic Fatty acids - "micromanaging" cellular response. Frontiers in Physiology, 3: 42.
- Yokota, J., Takuma, D., Hamada, A., Onogawa, M., Yoshioka, S., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S. and Nishioka, Y., 2006. Scavenging of reactive oxygen species by *Eriobotrya japonica* seed extract. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 29(3): 467-471.
propenyl)phenol] on the pathological progress in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease mouse model. Neurochemical Research, 36(12): 2244-2249.
- Kim, M.S., Lee, J.I., Lee, W.Y. and Kim, S.E., 2004. Neuroprotective effect of Ginkgo biloba L. extract in a rat model of Parkinson's disease. Phytotherapy Research, 18(8): 663-666.
- Li, X., Zhang, J.Q., Liu, W., Li, X.N., Zhang, X., Jiang, Y.S., Zhou, J. and Jin, Y.H., 2011. Serum levels of perfluorinated compounds in the general population in Shenzhen, China. Chinese Science Bulletin, 56(28-29): 3092-3099.
- Lindholm, P. and Saarma, M., 2010. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. Developmental Neurobiology, 70(5): 360-371.
- Nasri, S., Roghani, M., Baluchnejadmojarad, T., Rabani, T. and Balvardi, M., 2011. Vascular mechanisms of cyanidin-3-glucoside response in streptozotocin-diabetic rats. Pathophysiology, 18(4): 273-278.
- Nishioka, Y., Yoshioka, S., Kusunose, M., Cui, T., Hamada, A., Ono, M., Miyamura, M. and Kyotani, S., 2002. Effects of extract derived from *Eriobotrya japonica* on liver function improvement in rats. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 25(8): 1053-1057.
- Olanow, C.W., 1990. Oxidation reactions in Parkinson's disease. Neurology, 40: 32-37.
- Perumal, A.S., Gopal, V.B., Tordzro, W.K., Cooper, T.B. and Cadet, J.L., 1992. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. Brain Research Bulletin, 29(5): 699-701.
- Sankar, S.R., Manivasagam, T., Krishnamurti, A. and Ramanathan, M., 2007. The neuroprotective effect of *Withania somnifera* root extract in MPTP-intoxicated mice: an analysis of behavioral and biochemical variables. Cellular & Molecular Biology Letters, 12(4): 473-481.
- Sauer, H. and Oertel, W.H., 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing

Effects of hydro-alcoholic extract of *Eriobotrya japonica* Lindl. flowers on CDNF, SOD and MDA levels of cerebral cortex in experimental model of Parkinson's disease in rat

J. Aslani[1*], A. Hajizadeh Moghaddam[2], Z. Fallah Mohammadi[3], A.R. Ismaili[4] and R. Mohammadi[3]

1* - Corresponding author, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
E-mail: aslani_jalil68@yahoo.com
2- Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
3- Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
4- Department of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received: May 2013 ` Revised: November 2013 Accepted: December 2013

Abstract

The flowers of *Eriobotrya japonica* Lindl. have antioxidant and protective effects. The aim of this study was to investigate the effects of neuroprotection with hydro-alcoholic extract of *Eriobotrya japonica* flowers on *CDNF*, malondialdehyde and superoxide dismutase levels in the rat cerebral cortex in an experimental model of Parkinson's disease. In this study, animals were randomly divided into three groups of nine each (control, damaged and damaged treated with plant extract). At first, the second and third groups of rats received the solvent of extract (saline) and the extract (200 mg/kg body weight) intraperitoneally for twelve weeks and three days per week, respectively. For Parkinson's disease in rats, 6-OHDA was injected into the right ventricle of the brain after 12 weeks. After five days, rats were sacrificed and CDNF, SOD and MDA levels in their cortex were measured. Data were analyzed using ANOVA test. Our results showed that pre-treatment with the flower extract of *Eriobotrya japonica*, increased CDNF and SOD and decreased MDA levels of cerebral cortex. These effects may be caused by phenolic and flavonoid compounds of this plant with strong antioxidant properties. Therefore, it could be concluded that this plant extract has protective role against Parkinson's disease because of protecting neurons against oxidative damage of toxic 6-OHDA.

Keywords: *Eriobotrya japonica* Lindl. flowers, CDNF, SOD, MDA, Parkinson.