

تأثیر روغن زیتون بر آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی و خونرسانی مجدد به مغز، در شروع القای ایسکمی در موش صحرایی

جواد رئوف سرشوری^۱، محمدحسین اسدی^۲، محمد تقی محمدی^۳

چکیده

زمینه و هدف: سکته مغزی، به عنوان سومین علت مرگ و مهمترین عامل ناتوانی در دنیا به شمار می‌رود. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که روغن زیتون، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی در زمان ایسکمی مغزی است. مطالعه حاضر، با هدف بررسی محافظت عصبی احتمالی روغن زیتون بر ضایعه مغزی و اختلالات عصبی در مدل ایسکمی موضوعی گذرا در موش صحرایی انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، از 30 سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار، در محدوده وزنی 270 تا 320 گرم استفاده شد. موش‌ها، در سه گروه (هر گروه 10 سر) شامل: گروه شاهد، گروه کنترل ایسکمی و گروه ایسکمی تیمارشده قرار گرفتند و آزمایش بر روی آنها انجام شد. ایسکمی مغزی، با 80 دقیقه انسداد شریان میانی مغز (MCAO) و 24 ساعت خونرسانی مجدد انجام گردید. روغن زیتون با دوز یک میلی‌لیتر بر کیلوگرم، به صورت داخل صفاقی، در شروع ایسکمی تزریق شد. ارزیابی اختلالات عصبی-حرکتی (NDS) و حجم ضایعه (رنگ‌آمیزی TTC) و مطالعات بافت‌شناسی، 24 ساعت پس از MCAO انجام گرفت.

یافته‌ها: روغن زیتون، به طور معنی داری توانست حجم ضایعه را در قشر و جسم مخطبه ترتیب: 65% و 52% کاهش دهد؛ همچنین این روغن توانست اختلالات عصبی-حرکتی را در موش‌های ایسکمی شده، از $3/4 \pm 0/1$ به $2/5 \pm 0/2$ در گروه تیمارشده کاهش دهد.

در بررسی‌های بافت‌شناسی، روغن زیتون، تعداد نورون‌های اوزنوتوفیلیک و آسیب‌دیده نواحی ایسکمی را کاهش داد ($P < 0/001$). نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که روغن زیتون، به طور مؤثری آسیب‌های ایسکمی خونرسانی مجدد را کاهش داد و اختلالات عصبی-حرکتی را بهبود می‌بخشد؛ همچنین روغن زیتون به عنوان عامل محافظت‌کننده عصبی، قادر است از تخريب نورونی در ایسکمی مغزی موضوعی گذرا و مرحله اولیه خونرسانی مجدد جلوگیری نماید.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی / خونرسانی مجدد؛ روغن زیتون؛ محافظت عصبی؛ ضایعه مغزی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1393(1): 56-67.

دريافت: 1392/09/02 پذيرش: 1393/02/06

^۱ دانشجوی رشته علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.

^۲ دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.

^۳ نويسنده مسؤول؛ استاديار، گروه فيزيولوژي و بيوفيزيك، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.

آدرس: تهران - اقدسیه - میدان ارشن - مجتمع آموزشی ولايت - دانشکده پزشکی - گروه فيزيولوژي و بيوفيزيك

تلفن: 09127713583 - نمبر: 021-26127257 - پست الکترونيک: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com - Mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir

مقدمه

مدیترانه‌ای)، باعث کاهش میزان سکته‌های مغزی و قلبی و سایر بیماری‌های ناشی از فرآیندهای اکسیداتیو می‌شود (6-8). این روغن، به مقدار فراوان در دسترس بوده و وجود آن در رژیم‌های غذایی، بهدلیل ثبات آن نسبت به روغن‌های دیگر و مدت نگهداری بیشتر، از اهمیت بالایی برخوردار است. این روغن، علاوه بر اسیدهای چرب غیراشباع فراوان (اسیداولئیک و اسیدلینولئیک)، حاوی ترکیبات فنلی مانند: تیروزول و هیدروکسیتیروزول است (7). ترکیبات فنلی، دارای خاصیت آنتی‌اسیدانی بوده و می‌توانند مانع اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها شوند (8). نتایج مطالعه انجام‌شده توسط ربیعی و همکاران نشان می‌دهد که مصرف خوارکی روغن زیتون از طریق گواژ به مدت 30 روز قبل از القای ایسکمی موضعی گذرا به مدت 60 دقیقه، حجم ضایعه مغزی، ادم و نفوذپذیری سدّ خونی–مغزی را در موش صحرایی کاهش داده است (9)؛ همچنین در مطالعه دیگری، زمانی و همکارانش گزارش کردند که مصرف خوارکی روغن زیتون به مدت یک هفته قبل از درمان و مصرف مجدد آن یک هفته پس از القای ایسکمی فراگیر (گلوبال) در موش سوری، می‌تواند میزان مرگ سلوی را در قشر گیجگاهی (Temporal) و ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش دهد و همچنین اختلال حافظه را بهبود بخشد (10). نتایج به دست‌آمده از مطالعات فوق نشان می‌دهند که مصرف طولانی‌مدت روغن زیتون، قبل و بعد از القای سکته مغزی، می‌تواند عوارض ناشی از سکته و ایسکمی مغزی را کاهش دهد. اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای که بتواند اثرات روغن زیتون را در مرحله اولیه خونرسانی مجدد (فاز حاد) و در حین بروز سکته و ایسکمی مغزی نشان دهد، انجام نشده است؛ بر این اساس، این مطالعه در نظر داشت تا تأثیر حفاظتی روغن زیتون در زمان ایسکمی مغزی موضعی گذرا و مرحله اولیه خونرسانی مجدد در موش صحرایی را مورد بررسی قرار دهد.

روش تحقیق

سکته مغزی، سومین عامل مرگ و اوّلین عامل ناتوانی و یا ازکارافتادگی در افراد بالای 65 سال در جهان است (1). قطع کامل و یا کاهش شدید جریان خون در یک ناحیه از مغز، موجب سکته مغزی و یا ایسکمی در ناحیه مورد نظر می‌شود. بعد از زمان کوتاهی، سلول‌های ناحیه مرکزی (core) از بین رفته، ولی سلول‌های اطراف آن - ناحیه محیطی (penumbra) - بهدلیل دریافت خون از مناطق مجاور، مدت‌زمان طولانی‌تری زنده می‌مانند (2). کاهش یا توقف جریان خون ناحیه ایسکمی، سبب دیپولاریزاسیون غیرقابل کنترل نورونی شده و باعث آزادسازی اسیدهای آمینه تحریکی، افزایش سیتوکاین‌ها و عوامل التهابی، تولید رادیکال‌های آزاد، ایجاد اسیدوز و افزایش کلسیم داخل سلولی در نواحی ایسکمی‌شده می‌شود (1-3). همه موارد ذکر شده، در پاتوژنر القای مرگ نورونی و گسترش ضایعه ناشی از ایسکمی و سکته مغزی، نقش اساسی بر عهده دارند (3). خونرسانی مجدد پس از یک دوره ایسکمی، بهجای بازگشت فعالیت طبیعی بافت از طریق القای استرس اکسیداتیو، باعث افزایش رادیکال‌های آزاد و آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود (4). افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در حین ایسکمی مغز و بهویژه در زمان خونرسانی مجدد، نقش مهمی در آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی دارد (3)؛ از طرفی ترکیب این رادیکال‌ها با رادیکال‌های نیتریک اکساید، باعث ایجاد ترکیب بسیار خطرناکی در ناحیه ایسکمی بهنام پراکسی‌نیتریت می‌شود که نقش مهمی در آسیب به بافت عصبی، از جمله تشکیل نکروز بافتی و تحریک مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلوی برعهده دارد (5). بر این اساس، مطالعات اخیر، تمرکز ویژه‌ای بر جلوگیری از افزایش و مهار این رادیکال‌ها پس از سکته مغزی در جهت درمان سکته مغزی داشته‌اند.

نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهد که رژیم‌های غذایی غنی از فرآورده‌های گیاهی مانند روغن زیتون (رژیم غذایی

طولی، در خط وسط قسمت قدامی گردن آنها ایجاد گردید. بعد از کنار زدن پوست، غدد بزاقی و عضلات طرف راست ناحیه برش داده شده، شریان کاروتید مشترک، کاروتید خارجی و کاروتید داخلی راست، در معرض دید قرار گرفتند؛ سپس عصب واگ و جسم کاروتید، با دقّت از آنها جدا شدند. نخ نایلون 0-3 که قبلاً سر آن، با حرارت گرد شده بود، از طریق شریان کاروتید خارجی، به داخل شریان کاروتید داخلی هدایت شد تا به مقاومتی برخورد کند و شریان میانی مغز، مسدود شود. پس از 80 دقیقه ایسکمی، فیلامان، خارج شده و خونرسانی مجدد (24 ساعت) برقرار شد. در مدت جراحی، دمای بدن حیوان، از طریق مقعد توسط دماسنجه دیجیتال، اندازه‌گیری و با استفاده از لامپ و پد حرارتی، در حدود 37 درجه سانتی‌گراد حفظ شد.

ازیابی اختلالات عصبی-حرکتی:

اختلالات عصبی-حرکتی در گروه‌های ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی تیمارشده)، پس از 24 ساعت خونرسانی مجدد، توسط فردی که نسبت به گروه تیمارشده آگاهی نداشت، مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلالات عصبی-حرکتی (NDS)³، بهروش آزمون پنجنمره‌ای شرح‌داده شده توسط Plesnila⁴ مورد بررسی قرار گرفت (12). در این آزمون، به صورت قراردادی، اختلالات عصبی-حرکتی حیوان به شرح زیر، از نمره 1 تا 5 درجه‌بندی شده است. نمره یک، به حیوانی داده شد (از جمله حیوانات گروه شاهد) که هیچ‌گونه اختلال حرکتی از خود نشان نمی‌داد؛ نمره 2 برای حیوانی در نظر گرفته شد که دست سمت مقابل نیمکره ایسکمی شده (دست چپ) را موقع آویزان شدن از ذُم، خم می‌کرد (حالت Flexion); نمره 3، به حیوانی تعلق گرفت که در شروع حرکت بر روی یک سطح صاف، به سمت مقابل نیمکره ایسکمی شده (سمت چپ) شروع به چرخیدن کرده اما در وضعیت استراحت، به حالت طبیعی در می‌آمد؛ نمره 4 به حیوانی داده شد که رفلکس ایستادن (Righting reflex) را

در این مطالعه تجربی، از 30 سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار (Wistar)، در محدوده وزنی 270 تا 320 گرم که از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه 1 ... (عج) خریداری شدند، استفاده گردید. حیوانات، قبل از مطالعه و در طی آزمایش، در شرایط استاندارد 12 ساعت روشنایی و تاریکی، رطوبت مناسب، درجه حرارت 25°C و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایش‌ها، بر طبق مقررات اخلاقی کار با حیوانات، مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه 1 ... (عج) انجام گردید. حیوانات مورد مطالعه، به صورت تصادفی در سه گروه (n=10) به شرح زیر قرار گرفتند:

1- گروه شاهد: حیوانات این گروه، تحت جراحی گردن قرار گرفتند و تمام مراحل جراحی، تا قبل از فیلامان‌گذاری انجام شد، ولی فیلامان‌گذاری و القای ایسکمی، در حیوانات این گروه انجام نشد؛

2- گروه کنترل ایسکمی: حیوانات این گروه، تحت جراحی گردن و فیلامان‌گذاری قرار گرفتند و ایسکمی به مدت 80 دقیقه القا گردید؛

3- گروه تیمارشده با روغن زیتون: حیوانات این گروه، در شروع ایسکمی، روغن زیتون (1ml/kg)⁵ به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و بقیه پروتکل‌ها و جراحی، به منظور فیلامان‌گذاری، همانند گروه کنترل ایسکمی انجام گردید.

القای ایسکمی موضعی-موقعی مغزی¹:

برای القای ایسکمی موضعی - موقعی مغزی، به مدت 80 دقیقه، شریان میانی مغز²، با استفاده از روش Intraluminal filament method ارائه شده توسط Longa و همکاران به شرح زیر مسدود گردید (11). موش‌های صحرایی، پس از اینکه توسط ایزوفلوران 2/5 درصد (Isoflurane, UK) بیهوش شدند، به پشت خوابانیده شده و ناحیه گردن آنها که قبلاً تراشیده شده بود، تمیز و ضد عفونی گردید. یک برش

³ Neurological Deficit Score

¹ Transient focal cerebral ischemia

² Middle cerebral artery (MCA)

بافتی، با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد تورم بافتی} = \frac{\text{حجم نیمکره چپ}}{\text{حجم نیمکره ضایعه دیده راست - حجم نیمکره سالم چپ}} \times 100$$

مطالعه میکروسکوپی:

در گروه شاهد، 24 ساعت پس از جراحی و در گروههای ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی تیمارشده)، 24 ساعت پس از خونرسانی مجدد، حیوانات، توسط اتر بیهوش شده و Transcardial (perfusion)، مغز از جمجمه خارج و برای تثبیت کامل، بعد از تثبیت، با روش پرفیوژن داخل قلبی (Coronal) بهمدت 12 ساعت درون فرمالین 10% قرار داده شد. پس از انجام فرایند بافتی و تهیه بلوک، برش‌گیری به صورت سریال 25 با ضخامت 5 میکرون انجام شد؛ برش‌ها، به فواصل 25 میکرون جمع‌آوری و پس از تهیه لام، توسط هماتوکسیلین-ائزوزین رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها، با میکروسکوپ نوری Nikon-japan (بررسی شدند. به صورت تصادفی، در هر لام، 4 تصویر از ناحیه قشر و 4 تصویر از ناحیه جسم مخطط نیمکره ایسکمی شده (راست) با بزرگنمایی 400، عکس برداری شد؛ سپس نورون‌هایی که به شدت اسیدوفیل و مثلثی شکل بوده و همچنین هسته متراکم و چروکیده داشتند، به عنوان نورون‌های ائوزینوفیلی (Eosinophilic neuron)، توسط نرمافزار موتیک (Motic) شمارش گردیدند؛ سپس تعداد سلول‌های شمارش شده در تصاویر موردنظر برای هر حیوان، در نرمافزار SPSS (ویرایش 17) ثبت شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

روش‌های آماری:

نتایج به دست آمده، به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین نمونه (Means \pm SEM) ارائه شده است. برای مقایسه داده‌های به دست آمده بین گروه کنترل ایسکمی و گروه تیمارشده با روغن زیتون، از نرمافزار SPSS (ویرایش 17) و روش آماری Student T-Test استفاده شد و در تمام مقایسه‌ها، $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری تلقی گردید.

از دست داده و در صورت فشاردادن حیوان به سمت‌های جانبی، مقاومت کمی در مقابل ایستادن داشت و در نهایت نمره 5 به حیوانی تعلق گرفت که قادر هرگونه حرکت خودبه‌خودی بود.

اندازه‌گیری حجم ضایعه مغزی:

پس از ارزیابی اختلالات عصبی-حرکتی، حیوانات، توسط اتر بیهوش شده و مغز آنها خارج و برای سختشدن و قوام‌گیری، به مدت 5 دقیقه، داخل نرم‌مال‌سالین 4 درجه در یخچال قرار داده شد؛ سپس با استفاده از ماتریکس مغزی (Coronal matrix)، شش برش عرضی (Brain matrix) به ضخامت 2 میلی‌متر تهیه و برای رنگ‌آمیزی، به مدت 20 دقیقه در محلول 2 درصد تری‌فیل‌تترازاولیوم کلراید (TTC, Sigma) در آب 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در این رنگ‌آمیزی، ناحیه ایسکمی شده به رنگ سفید و نواحی سالم به رنگ قرمز در می‌آید. برش‌ها برای تثبیت شدن، به مدت 24 ساعت در فرمالین 10 درصد بافرشده قرار گرفتند و بعد از آماده‌سازی نهایی، از هر شش برش، به طور جداگانه توسط دوربین دیجیتال (Cannon, Japan) عکس گرفته و با استفاده از کامپیوتر و نرم‌افزار مخصوص NIH image analyzer، سطح ناحیه ضایعه دیده در قسمت‌های قشر و جسم مخطط، به صورت جداگانه و بر حسب میلی‌متر مربع (mm^2) برای هر قطعه برش اندازه‌گیری شد. میزان حجم ضایعه، در کورتکس و جسم مخطط، بر حسب میلی‌متر مکعب (mm^3) برای تمامی برش‌ها جمع و بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{حجم ضایعه} = \{(\text{حجم نیمکره ایسکمی شده} - \text{حجم نیمکره ایسکمی شده} - \text{حجم ضایعه اندازه‌گیری شده})\}$$

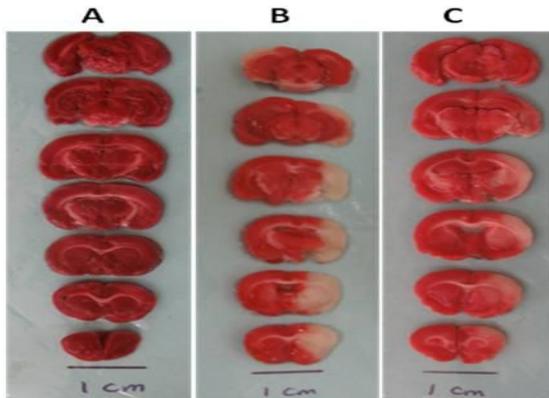
اندازه‌گیری درصد تورم بافتی (Tissue swelling %):

برای اندازه‌گیری درصد تورم بافتی، از روش Swanson و همکاران استفاده شد (13). در این روش، حجم نیمکره ضایعه دیده (راست) و نیمکره سالم (چپ)، بر حسب میلی‌متر مکعب در برش‌های رنگ‌آمیزی شده، تعیین و درصد تورم

یافته‌ها

مخاطط کاهش یافته است.

تصویر ۱- برش‌های عرضی (Coronal) رنگ‌آمیزی شده با

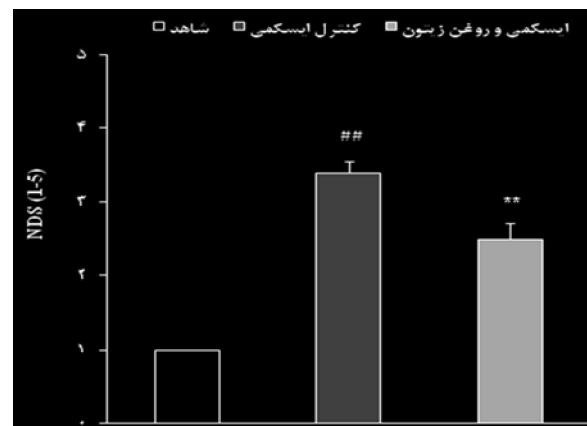


تری فیل ترازو لیوم کلراید (TTC) مغز در گروه شاهد (A)، 24 ساعت پس از جراحی در گروه کنترل ایسکمی (B) و گروه ایسکمی تیمارشده (C) با روغن زیتون (1 ml/kg) 24 ساعت پس از خونرسانی مجدد. ناحیه ایسکمی به رنگ سفید و ناحیه ایسکمی نشده به رنگ قرمز دیده شود.

نمودار ۲، میزان کمی حجم ضایعه مغزی ناشی از ایسکمی را در گروه‌های ایسکمی شده نشان می‌دهد. حجم ضایعه مغزی در قشر و جسم مخاطط به ترتیب: در گروه کنترل ایسکمی 159 ± 15 و 93 ± 12 میلی‌متر مکعب بود. تزریق داخل صفاقی روغن زیتون (1ml/kg) در شروع ایسکمی، حجم ضایعه مغزی را به ترتیب در قشر %65 (55/5 \pm 13) و در جسم مخاطط %52 (44/7 \pm 6)، به طور معنی‌داری (به ترتیب $P < 0.001$ و $P < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی کاهش داد.

همچنین ایسکمی مغزی، درصد تورم بافتی را به طور قابل ملاحظه‌ای در نیمکره ایسکمی شده (نیمکره راست) گروه کنترل ایسکمی، به دلیل ادم افزایش داد (نمودار ۳). میزان درصد تورم بافتی در نیمکره ایسکمی شده گروه کنترل ایسکمی، 24 ساعت پس از خونرسانی مجدد $4/9 \pm 0/3$ درصد بود؛ در صورتی که درصد تورم بافتی در گروه شاهد، 24 ساعت پس از جراحی برابر صفر بود. در گروه تیمارشده، دریافت روغن زیتون (1ml/kg) در شروع ایسکمی توانست درصد تورم بافتی را به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) به میزان

تمام حیوانات، از نظر اختلالات عصبی-حرکتی، قبل از شروع آزمون و 24 ساعت پس از جراحی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. هیچ‌گونه اختلال عصبی-حرکتی، قبل از شروع آزمون و 24 ساعت پس از جراحی در گروه شاهد مشاهده نشد (NDS=1). اختلالات عصبی-حرکتی در گروه کنترل ایسکمی $3/4 \pm 0/1$ بود که در گروه تیمارشده با روغن زیتون، به طور معنی‌داری ($P < 0.01$)، این مقدار را به $2/5 \pm 0/2$ کاهش داده (نمودار ۱) و باعث بهبود اختلال عصبی-حرکتی گردید.



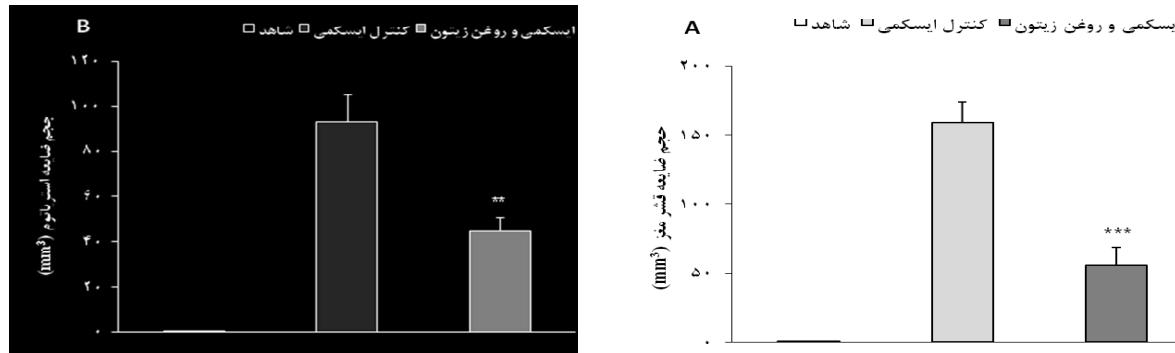
نمودار ۱- نمودار رتبه‌بندی اختلالات عصبی-حرکتی (NDS) در گروه شاهد، 24 ساعت پس از جراحی و در گروه‌های کنترل ایسکمی و ایسکمی تیمارشده با روغن زیتون (1ml/kg)، 24 ساعت پس از شروع خونرسانی مجدد. داده‌ها به صورت Means \pm SEM نشان داده شده است. ##: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد. *: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی.

میزان حجم ضایعه ایجادشده در گروه‌های مختلف، در تصویر یک ارائه شده است. در تصاویر تهیه شده از برش‌های عرضی رنگ‌آمیزی شده با TTC، در گروه شاهد، هیچ‌گونه علامتی از ضایعه ناشی از ایسکمی مشاهده نشد. در گروه کنترل ایسکمی، مناطقی از قشر و جسم مخاطط در نیمکره ایسکمی شده (نیمکره راست)، به صورت سفیدرنگ نمایان شد. در مقایسه چشمی تصاویر، میزان ناحیه ایسکمی (سفید رنگ) گروه تیمارشده نسبت به گروه کنترل ایسکمی در قشر و جسم

گروه کنترل ایسکمی شده، احتقان بافتی، افزایش فضای زیر لپتومنتر و اطراف عروق، نورون‌هایی با هسته متراکم و Eosinophilic چروکیده و همچنین نورون‌های اوزینوفیلی (neurons)، از جمله تغییراتی بودند که مشاهده گردیدند.

$2/5 \pm 0/3$ %49 کاهش دهد.

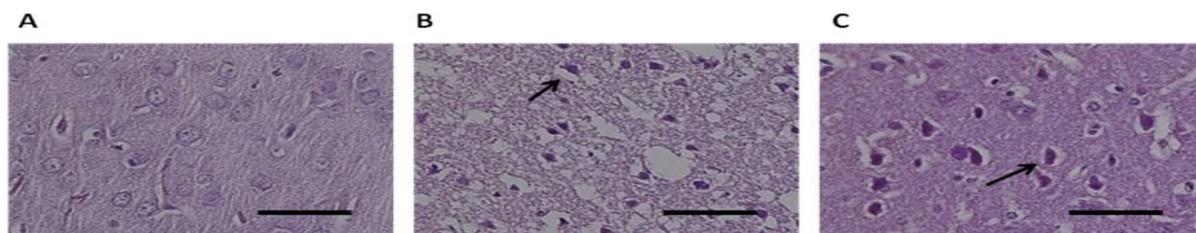
در مطالعات کیفی بافت‌شناسی (تصویر 2) توسط میکروسکوپ نوری، از برش‌های رنگ‌آمیزی شده با H&E در گروه شاهد، هیچ‌گونه تغییرات آسیب‌شناسی مشاهده نشد. در



نمودار 2- حجم خایجه مغزی قشر (A) و جسم مخطط (B) در گروه شاهد و گروه‌های ایسکمی (کنترل ایسکمی، ایسکمی تیمارشده با روغن زیتون) 24 ساعت پس از خونرسانی مجدد. داده‌ها به صورت $Means \pm SEM$ نشان داده شده است.*: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی. **: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی.



نمودار 3- درصد تورم بافتی در گروه شاهد، 24 ساعت پس از جراحی و در گروه‌های کنترل ایسکمی و ایسکمی تیمارشده با روغن زیتون، 24 ساعت پس از خونرسانی مجدد. داده‌ها به صورت $Means \pm SEM$ نشان داده شده است.*: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی.



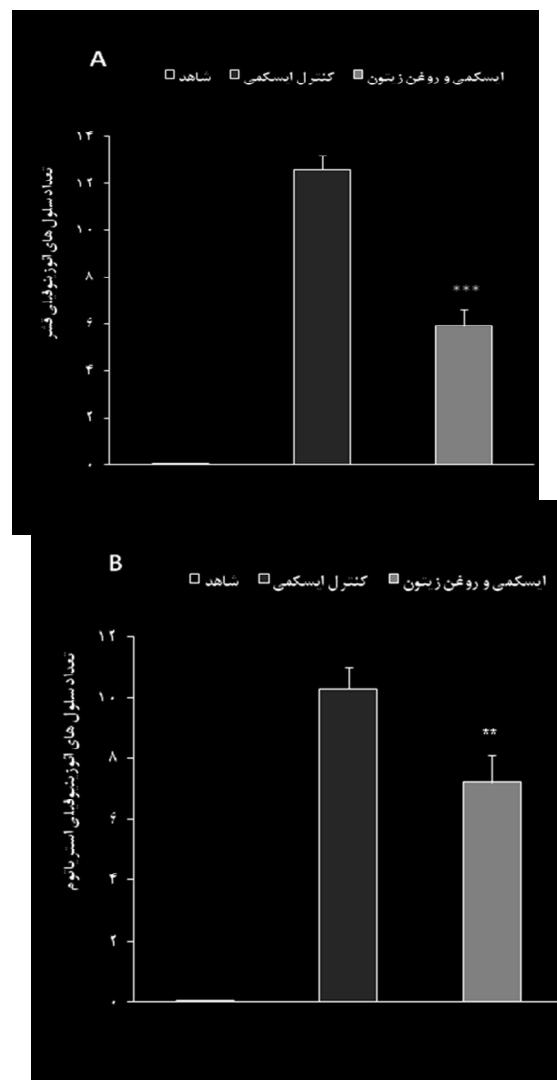
تصویر 2- برش‌های عرضی (Coron) رنگ‌آمیزی شده با هماتوكسیلین-اوزین (H&E) در حیوانات شاهد (A)، کنترل ایسکمی (B) و ایسکمی تیمارشده با روغن زیتون (C). نورون‌های اوزینوفیلی در گروه شاهد دیده نمی‌شود اما در گروه کنترل ایسکمی بهوفور دیده می‌شود (نوب پیکان) که میزان آنها در گروه تیمارشده کاهش یافته است

مطالعه کمی این نورون‌ها در گروه تیمارشده با روغن زیتون در قشر و جسم مخطط نسبت به گروه کنترل ایسکمی، به طور معنی‌داری (به ترتیب: $P<0/001$ و $P<0/01$) کاهش نشان داد (نمودار ۴).

بحث

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که مصرف تک‌دوز روغن زیتون (1mg/kg) به صورت داخل صفاقی در شروع القای ایسکمی، علاوه بر این که میزان ضایعه در نواحی قشر و جسم مخطط را کاهش داده، سبب بهبود اختلالات عصبی-حرکتی در گروه ایسکمی شده و تورم بافتی را در نیمکره ایسکمی شده نیز کاهش داده است؛ همچنین در بررسی‌های بافت‌شناسی مشخص گردید که مصرف تک‌دوز روغن زیتون در زمان القای ایسکمی، از تغییرات بافت‌آسیب‌شناسی جلوگیری به عمل آورده و میزان سلول‌های ائوزینوفیلی (سلول‌های اسیدوفیل و پیش‌نکروتیک) را در نواحی ایسکمی شده قشر و جسم مخطط، به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد.

آن‌تی‌اکسیدان‌ها، یکی از مداخلات درمانی هستند که می‌توانند عوارض ناشی از ایسکمی را در مغز کاهش دهند. در این میان، روغن زیتون، علاوه بر اسیدهای چرب غیر اشباع، حاوی ترکیبات فلی است. ترکیبات فلی این روغن، با جمع‌کردن رادیکال‌های آزاد و تعدیل کردن آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی، به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی محسوب می‌شوند (۸). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که درمان با روغن زیتون در زمان ایسکمی، می‌تواند ضایعه مغزی را به میزان زیادی در نواحی قشر و جسم مخطط کاهش دهد (تصویر ۲ و نمودار ۲). در مراحل اولیه القای ایسکمی، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، به طور انکارناپذیری، در تشکیل ادم و پیشرفت ضایعه مغزی ناشی از ایسکمی، نقش عمده‌ای دارند (۱۴)؛ همچنین آسیب‌هایی که در اثر خونرسانی مجدد ایجاد می‌شوند، در نتیجه آزادسازی



نمودار ۴- تعداد نورون‌های ائوزینوفیلی شمارش شده در ناحیه ایسکمی شده، در برش‌های عرضی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین-أوزن (H&E) گروه‌های ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی تیمارشده)، ۲۴ ساعت پس از شروع خونرسانی مجدد. روغن زیتون، به طور معنی‌داری، تعداد نورون‌های ائوزینوفیلی را در ناحیه ایسکمی کاهش داده است. داده‌ها به صورت $\text{Means} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است.*: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P<0/01$ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی.**: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P<0/001$ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی.

در گروه تیمارشده با روغن زیتون، تمامی تغییرات آسیب‌شناختی بافتی که در گروه کنترل ایسکمی، مشاهده شده بود، کمتر به چشم می‌آمد. برای مطالعه کمی، از تصاویر تهیه شده با بزرگنمایی $400\times$ از ناحیه قشر و جسم مخطط، توسط نرم‌افزار موتیک، نورون‌های ائوزینوفیلی شمارش شدند.

شکسته شدن سد خونی-مغزی و تشکیل ایدم به دنبال ایسکمی/خونرسانی مجدد مغز، نقش اساسی در مرگ نورونی و گسترش ضایعات مغزی دارد (21)؛ به طوری که حدود 50% مرگ و میر در آسیب‌های شدید مغزی مانند: سکته یا ترومما، ناشی از ایدم مغزی می‌باشد. ایدم مغزی، با افزایش فشار داخل جمجمه و تحت فشار قراردادن عروق مغزی و کاهش خونرسانی به بافت ایسکمی شده مغز، سبب گسترش ضایعه می‌شود (22). در مطالعه حاضر، ایدم مغزی، از طریق اندازه‌گیری درصد تورم بافتی محاسبه گردید که میزان آن پس از القای ایسکمی افزایش یافته بود؛ از طرفی، تزریق داخل صفاقی روغن زیتون قبل از القای ایسکمی در مطالعه حاضر توانست میزان ایدم را به مقدار قابل توجهی در نیمکره ایسکمی بهبود بخشد. تشکیل انواع رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در آسیب سد خونی-مغزی و تشکیل ایدم مغزی در زمان سکته مغزی دارد و این ایدم، سبب تشدید ضایعه ناشی از ایسکمی مغزی می‌شود. از آنجایی که ترکیبات فنلی روغن زیتون، به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی، از افزایش رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند، به نظر می‌رسد که در مطالعه حاضر، استفاده از روغن زیتون در هنگام القای سکته مغزی به صورت داخل صفاقی، از تجمع و تولید رادیکال‌های آزاد در منطقه ایسکمی شده جلوگیری کرده و بدین صورت، باعث حفظ سلامت سیستم سد خونی-مغزی شده و از تورم و ایدم بافتی جلوگیری کرده است. بررسی‌های محققین دیگر نیز نشان می‌دهد که ترکیبات فنلی روغن زیتون، از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد، سبب مهار فعالیت عامل رونویسی NF-*kB* و بیان ماتریکس متالوپروتئیناز-9 و در نهایت باعث تخریب سد خونی-مغزی شده است (22)؛ همچنین روغن زیتون می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو و تشکیل نیتریت-نیترات، باعث کاهش ایدم ناشی از هیپوکسی-اکسیژن‌رسانی مجدد در موش صحرایی شود (23).

بافت مغز، به دلیل اینکه حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع فراوان می‌باشد، به‌آسانی تحت پراکسیداسیون لیپیدها قرار

فاکتورهای التهابی و رادیکال‌های آزاد در بافت ضایعه دیده مغزی ناشی می‌شوند (15). بر طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه و تأثیرات آنتی‌اکسیدانی قوی روغن زیتون که از مطالعات دیگران به دست آمده است، به نظر می‌رسد در این تحقیق، روغن زیتون، به واسطه این تأثیرات آنتی‌اکسیدانی توانسته است میزان ضایعه ناشی از ایسکمی مغزی را کاهش دهد. در مطالعه حاضر، درمان با روغن زیتون در زمان ایسکمی مغزی، میزان اختلالات عصبی-حرکتی را به مقدار زیادی بهبود بخشد. بر اساس مطالعات انجام شده اخیر، افزایش میزان تولید رادیکال‌های آزاد نیز نقش مهمی در بروز اختلالات عصبی-حرکتی به دنبال القای ایسکمی مغزی به دلیل تخریب سلول‌های مناطق ایسکمی شده دارد که میزان نیز این اختلالات عصبی-حرکتی، به میزان ضایعه ایجاد شده در بستگی دارد (16). رادیکال‌های آزاد-به عنوان اکسیدان‌ها در بدن- با چربی‌های اشباع واکنش داده و با تولید پراکسیدها، باعث تخریب DNA، لیپیدها و سایر ترکیبات غشایی می‌شوند (17)؛ همچنین تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در سمیت نورونی حاصل از تحریک زیاد داشته و باعث مرگ سلولی در برخی از نورون‌ها می‌شود که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی قادرند این نوع آسیب نورونی را مهار نمایند (18). بر این اساس، به نظر می‌رسد که در مطالعه حاضر نیز کاهش اختلالات عصبی-حرکتی به دنبال استفاده از روغن زیتون، به نوعی به دلیل کاهش ضایعه مغزی بوده که آن هم به علت اثرات آنتی‌اکسیدانی این ترکیب گیاهی است. نتایج به دست آمده از این تحقیق، با برخی از مطالعات انجام شده اخیر، به طور کامل همخوانی دارد؛ برای مثال، Fk1 و همکاران در تحقیقی نشان دادند، هیدروکسی‌تیروزول، با افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سبب کاهش پراکسیداسیون لیپید می‌شود (19)؛ همچنین در مطالعه Bu و همکاران، تزریق داخل صفاقی تیروزول پس از القای ایسکمی در موش صحرایی، باعث کاهش حجم ضایعه مغزی و بهبود عملکردهای عصبی-حرکتی شده است (20).

مرحله غیر قابل برگشت نکروز شده‌اند. نتایج مورفولوژی به دست آمده از مطالعه حاضر، با برخی مطالعات انجام شده کاملاً تطابق دارد؛ برای مثال در یک مطالعه، مصرف خوارکی روغن زیتون به مدت یک هفته در موش سوری، پس از القای ایسکمی فراگیر (گلوبال)، توانسته است میزان مرگ سلولی در قشر گیجگاهی و ناحیه CA1 هیپوکامپ را کاهش دهد (10)؛ همچنین نتایج تحقیق De و همکارانش نشان داد که تجویز روغن زیتون در موش صحرایی مدل دیابت نوع یک، توانسته است آسیب‌های سلولی را نیز پس از القای هیپوکسی-اکسیژن‌رسانی مجدد کاهش دهد (25). این مطالعات، تأیید کننده این موضوع بوده که روغن زیتون می‌تواند تغییرات بافت‌آسیب‌شناسی ایجاد شده پس از ایسکمی مغزی را کاهش دهد که بسیار مشابه با نتایج به دست آمده از تحقیق ما می‌باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که روغن زیتون، به طور مؤثری آسیب‌های ایسکمی/خونرسانی مجدد را کاهش داده و علائم عصبی را بهبود می‌بخشد؛ همچنین روغن زیتون به عنوان یک عامل محافظت‌کننده عصبی قادر است که از تخریب نورونی در نواحی ایسکمی جلوگیری نماید. بر این اساس، روغن زیتون می‌تواند به عنوان یک عامل مؤثر در پیشگیری یا کاهش عوارض سکته مغزی، به صورت تنها یا همراه با سایر داروها مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) که هزینه‌های مالی این تحقیق را فراهم نموده و همچنین از همکاری‌های فراوان مرکز علوم اعصاب این دانشگاه برای همکاری در انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

می‌گیرد (1)؛ از طرفی به دلیل اینکه مغز، اکسیژن زیادی مصرف کرده و فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ضعیفی دارد، مستعد ابتلا به آسیب‌های اکسیداتیو است (3)؛ بنابراین با افزایش رادیکال‌های آزاد به دنبال ایسکمی مغزی و عدم توانایی کافی در مقابله با آنها، سلول‌های مختلف بافت مغزی، دچار آسیب شده و تغییرات بافت‌آسیب‌شناسی فراوان در آنها ایجاد می‌شود. در مطالعات متعدد، بافت‌آسیب‌شناسی از نمونه‌های گرفته شده از مغز بیماران مبتلا به سکته مغزی و حیوانات آزمایشگاهی با مدل سکته مغزی، تغییرات آسیب‌شناختی گوناگونی از جمله: افزایش فضای زیر لپتومنتر و اطراف عروق، تشکیل نورون‌های اوزینوفیلی (نورون‌های با هسته پیکنوتیک و چروکیده و به شکل متراکم و مثنی با Ghost سیتوپلاسم به شدت اسیدوفیل) و نورون‌های (نورون‌هایی که کمتر اسیدوفیل بوده و هسته‌ای تیره‌تر از طبیعی دارند) گزارش شده است (24، 25)؛ همچنین مطالعه Otilia نشان داد که در روز اول بعد از ایسکمی مغزی، نورون‌های اوزینوفیلی و سلول‌های Ghost، در ناحیه انفارکت دیده می‌شوند که این تغییرات، در میمون به مدت 16 روز و در انسان 35 تا 60 روز باقی می‌ماند (24). در مطالعه حاضر، تغییرات بافت‌آسیب‌شناسی، 24 ساعت پس از جراحی در گروه شاهد وجود نداشت؛ در صورتی که در گروه‌های ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی تیمارشده)، پس از 80 دقیقه MCAO و 24 ساعت خونرسانی مجدد، تغییرات ریخت‌شناسی و بافت‌آسیب‌شناسی مشابه یافته‌های گزارش شده محققین، در نیمکره ایسکمی شده مشاهده گردید که این تغییرات، پس از تزریق داخل صفاقی روغن زیتون در شروع القای ایسکمی، در گروه درمان شده کمتر دیده شد؛ همچنین شمارش نورون‌های اوزینوفیلی نشان داد که تعداد این سلول‌ها در گروه تیمارشده، به طور معنی‌داری در قشر و جسم مخطط نسبت به گروه کنترل ایسکمی کاهش یافته است. نورون‌های اوزینوفیلی، نورون‌هایی هستند که وارد

منابع:

- 1- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008; 55(3): 310-8.
- 2- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999; 22(9): 391-7.
- 3- Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2004; 35(9): 2220-5.
- 4- Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK. Oxidative stress- assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol*. 2012; 50(3): 219-30.
- 5- Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol*. 2004; 207(18): 3221-31.
- 6- McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother*. 2005; 59(4): 139-42.
- 7- Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981; 12(6):723-5.
- 8- Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*. 2002; 22(1): 65-75.
- 9- Rabiei Z, Bigdeli MR, Rasoulian B. Neuroprotection of dietary virgin olive oil on brain lipidomics during stroke. *Curr Neurovasc Res*. 2013; 10(3): 231-7.
- 10- Zamani M, Hassanshahi J, Soleimani M, Zamani F. Neuroprotective effect of olive oil in the hippocampus CA1 neurons following ischemia: Reperfusion in mice. *J Neurosci Rural Pract*. 2013; 4(2): 164-70.
- 11- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20(1): 84-91.
- 12- Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, et al. BID mediates neuronal cell death after oxygen/glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(26): 15318-23.
- 13- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990; 10(2): 290-3.
- 14- Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(8): 1505-17.
- 15- Huang L, Chen N, Ge M, Zhu Y, Guan S, Wang JH. Ca^{2+} and acidosis synergistically lead to the dysfunction of cortical GABAergic neurons during ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 394(3): 709-14.
- 16- Mirmiran P, Esmaillzadeh A, Azizi F. Detection of cardiovascular risk factors by anthropometric measures in Tehranian adults: receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. *Eur J Clin Nutr*. 2004; 58(8): 1110-8.
- 17- Pradillo JM, Hurtado O, Romera C, Cárdenas A, Fernández-Tomé P, Alonso-Escalon D, et al. TNFR1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience*. 2006; 138(4): 1171-8.
- 18- Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Heidianpour A, Rasoulian B, Asgari AR, et al. Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-alpha level. *Exp Neurol*. 2008; 212(2): 298-306.
- 19- Fki I, Sahnoun Z, Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(3): 624-31.

- 20- Bu Y, Rho S, Kim J, Kim MY, Lee DH, Kim SY, et al. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2007; 414(3): 218-21.
- 21- Lundgren J, Zhang H, Agardh CD, Smith ML, Evans PJ, Halliwell B, et al. Acidosis-induced ischemic brain damage: are free radicals involved? *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991; 11(4): 587-96.
- 22- Sharma HS, Drieu K, Alm P, Westman J. Role of nitric oxide in blood-brain barrier permeability, brain edema and cell damage following hyperthermic brain injury. An experimental study using EGB-761 and Gingkolide B pretreatment in the rat. *Acta Neurochir Suppl.* 2000; 76: 81-6.
- 23- González-Correa JA, Muñoz-Marín J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, López-Villardres JA, et al. Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids.* 2007; 42(10): 921-9.
- 24- Mărgăritescu O, Mogoantă L, Pirici I, Pirici D, Cernea D, Mărgăritescu C. Histopathological changes in acute ischemic stroke .*Rom J Morphol Embryol.* 2009; 50(3): 327-39.
- 25- De La Cruz JP, Del Río S, Arrebola MM, López-Villardres JA, Jebrouni N, González-Correa JA. Effect of virgin olive oil plus acetylsalicylic acid on brain slices damage after hypoxia-reoxygenation in rats with type 1-like diabetes mellitus. *Neurosci Lett.* 2010; 471(2): 89-93.

Effect of olive oil on the cerebral reperfusion following ischemia injuries in rats

Javad Raouf Sarshoori¹, Mohammad Hossien Asadi², Mohammad Taghi Mohammadi³

Background and Aim: Stroke is the third leading cause of death and the most important factor of disability in the world. Recent studies have shown that olive oil has antioxidant effects during cerebral ischemia. The present study investigated the probable protective effects of olive oil on the brain infarction and neurological disability after a transient model of focal cerebral ischemia/reperfusion in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 30 adult male wistar rats whose weight ranged 270-320 g were divided into three equal groups. sham, control ischemia, and ischemia treated .. Transient focal cerebral ischemia was induced by means of 80 min middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 hours reperfusion. Olive oil (1 ml/kg) was intraperitoneally injected into the cases at the beginning of ischemia . Neurologic outcome (NDS scale), infarct volume 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC staining) and histological studies were done 24 hours after the end of MCAO.

Results: Treatment with olive oil significantly reduced the cortical and striatal infarct volume by 65% and 52%, respectively. Olive oil also decreased the NDS of ischemic rats from 3.4 ± 0.1 to 2.5 ± 0.2 in the treated group. Besides, histological studies showed that olive oil reduced the number of eosinophilic and damage neurons in the ischemic area ($P < 0.001$).

Conclusion: The findings of the current study indicated that olive oil effectively reduced ischemia, helped to the reperfusion of injuries, and improved neurological outcome. Olive oil is also a potent neuroprotective factor that is able to prevent neurodegeneration of transient focal ischemia in the beginning of reperfusion at ischemic areas.

Key Words: *Ischemic/reperfusion; Olive oil; Neuroprotection; Brain infarction*

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21 (1): 56-67.

Received: November 23, 2013

Accepted: April 26, 2014

¹ Student of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

² Associate professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³ corresponding author, Assistant professor, Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran *Mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir, Mohammadi.mohammadt@yahoo.com*