

# EFECTELE ULEIULUI DE OREGANO ASUPRA STATUSULUI OXIDATIV DIN HIPOCAMP LA UN MODEL ANIMAL DE DEMENTĂ



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" din IAȘI

[www.uaic.ro](http://www.uaic.ro)

Diana Fârte

Facultatea de Biologie, Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași

Coordonator științific:  
Șef lucrări dr. Marius Mihășan

e-mail: [dianafarte@yahoo.com](mailto:dianafarte@yahoo.com)

# Cuprins

I. Boala Alzheimer și stresul oxidativ;

II. Aplicații biomedicale ale extractelor din plante aparținând genului *Origanum*;

III. Materiale și metode;

IV. Rezultate și discuții.

# Boala Alzheimer



- ❖ cea mai comună formă de demență
- ❖ tulburare neurodegenerativă

## Cifre

## Manifestări

- pierderi de memorie;
- tulburări de percepție;
- lipsă de discernământ;
- emoții instabile;
- schimbări de personalitate.

- **18.000 \$ / an** - pentru bolnavii în stadiu incipient;
- **38.000 \$ / an** - pentru bolnavii în stadiu avansat;
- **604 miliarde de dolari / an** - pentru tratamentul maladiei la nivel mondial (2010) (Borda, 2006).

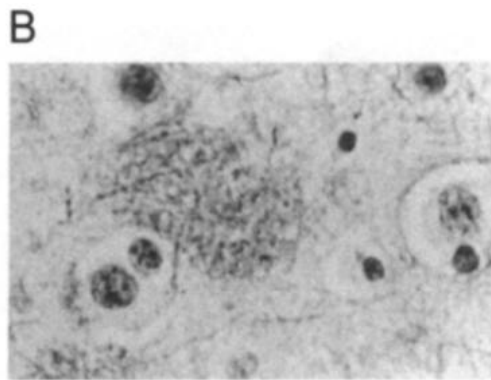
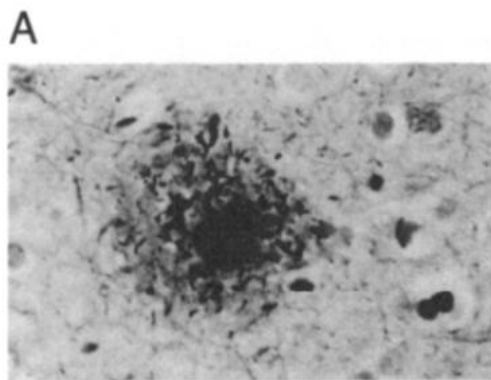
# Modificări ale creierului



- Atrofie masivă

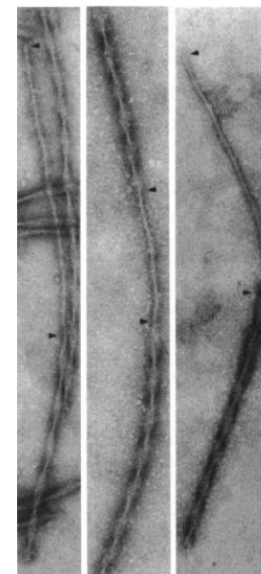
- Moarte neuronală

- Plăci de amiloid beta



Studiu de microscopie electronică. (A) Placă neuritică tipică, cu o formațiune centrală de amiloid înconjurată de axoni hipertrofiați. (B) Placă difuză, fără neurite îngroșate (Mirra și colab., 1993)

- Gheme neurofibrilare



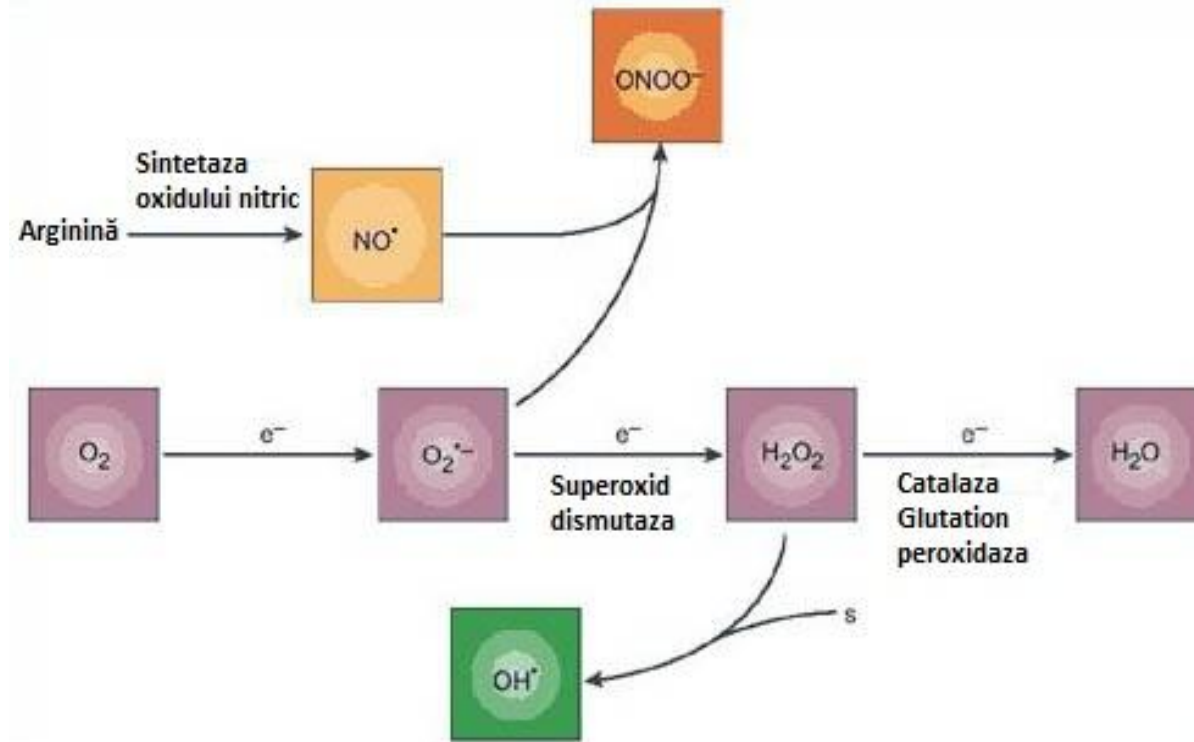
Micrografia electronică a unor fascicule neurofibrilare și a monomerilor lor în boala Alzheimer (Wischnik și colab., 1995)

❖ Mai ales la nivelul **hipocampului** - centrul memoriei declarative și spațiale

- Mirra, S.S. și colab. (1993): *Making the diagnosis of Alzheimer's disease. A primer for practicing pathologists*, Arch. Pathol. Lab. Med., 117(2), 132-144
- Wischnik și colab. (1995): Structure, biochemistry and molecular pathogenesis of paired helical filaments in Alzheimer's Disease, (Ed. Alison Goate & Frank Ashall), *Pathobiology of Alzheimer's Disease* (9-35), Academic Press Inc., San Diego

# Stresul oxidativ

numărul de specii reactive de oxigen (SRO) ➤ nivelul de antioxidanți



Speciile reactive de oxigen (Andersen, 2004)

- Andersen, J.K. (2004): *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?*, Nat. Rev. Neurosci., 5, S18 - S25

# Origanum vulgare



Utilizat de mii de ani în medicina tradițională, în tratamentul:

- migrenelor;
- spasmelor;
- infecțiilor virale;
- bolilor vasculare;
- inflamațiilor;
- tumorilor.

**Ulei esențial** → **ANTIOXIDANȚI** { Acid rozmarinic  
Carvacrol  
Timol

## ❖ Efecte demonstrate:

- inhibă activitatea AChE (Jukic și colab., 2007);
- activează SNC (Hotta și colab., 2010; Trabace și colab., 2011);
- inhibă canalul potențialului receptor de tranziție (TRP), cu rol în medierea morții neuronale anoxice (Parnas și colab., 2009);
- induce relaxarea vasculară, în special a arterelor mari de la nivel intracranian (Hăncianu și colab., 2014).

- Hăncianu, M. și colab. (2014): *Plante medicinale de la A la Z* (Ursula Stănescu ed.), Ed. a 2-a, rev., Iași, Polirom, 436-438
- Hotta, M. și colab. (2010): *Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression*, J. Lipid. Res., 51, 132-139
- Jukic, M. și colab. (2007): *In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone*, Phytother. Res., 21, 259-261
- Parnas, M. și colab. (2009): *Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels*, Cell Calcium, 45, 300-339
- Trabace, L.Z.M. și colab. (2011): *Estrous cycle affects the neurochemical and neurobehavioral profile of carvacrol-treated female rats*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 255, 169-175



1. **Obținerea uleiului volatil** - prin hidrodistilare (aparat Clevenger);
2. **Tratamentul aplicat șobolanilor** (masculi, rasa Wistar, 4 loturi):
  - Injectarea intracerebroventriculară a **amiloidului beta (1-42)**;
  - După 20 zile - inhalarea uleiului volatil de *O. vulgare* de concentrație 1% și 3%;
  - Colectarea țesuturilor din **hipocamp**;
3. **Obținerea extractului enzimatic** - cu soluție-tampon de fosfat de potasiu;
4. **Determinarea concentrației proteice** - micrometoda cu BCA (Mihășan și colab., 2012);
5. **Determinarea activității superoxid dismutazei** - metoda de reducere fotochimică a NBT (Artenie și colab., 2012);
6. **Determinarea activității glutatión peroxidazei** - metoda lui Fukuzawa și Tokumura, adaptată de Artenie și colab. (2012) - reacția GSH + DTNB;

- Artenie, V.G. și colab. (2008): *Metode de investigare a metabolismului glucidic și lipidic: manual de lucrări practice*, Editura Pim, Iași, 1-82
- Mihășan, M. și colab. (2012): *Biologie Moleculară. Metode experimentale*, Editura Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, 231-232



7. **Determinarea cantității de malondialdehidă** - testul de acid tiobarbituric (Artenie și colab., 2012);
8. **Determinarea nivelului de carbonilare a proteinelor** - metoda cu ATC și DNPH (Oliver și colab., 1987; Luo și Wehr, 2009);
9. **Determinarea gradului de fragmentare a ADN-ului** -
  - a) **Extracție cu fenol și izoamilalcool** (Ausubel, 2002);
  - b) **Electroforeză în gel de agaroză - 0,75%, în tampon TAE** (Mihășan și colab., 2012).
10. **Analiza statistică a rezultatelor.**

- **Artenie, V.G. și colab.** (2008): *Metode de investigare a metabolismului glucidic și lipidic: manual de lucrări practice*, Editura Pim, Iași, 1-82
- **Ausubel, F.M. și colab.** (2002): *Short Protocols in Molecular Biology* (5<sup>th</sup> edition), Wiley, 1, 2-3
- **Luo, S. și Wehr, N.B.** (2009): *Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay*, Redox Rep., 14(4), 159-166
- **Mihășan, M. și colab.** (2012): *Biologie Moleculară. Metode experimentale*, Editura Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, 231-232
- **Oliver, C.N. și colab.** (1987): *Age-related changes in oxidized proteins*, J. Biol. Chem., 262(12), 5488-5491



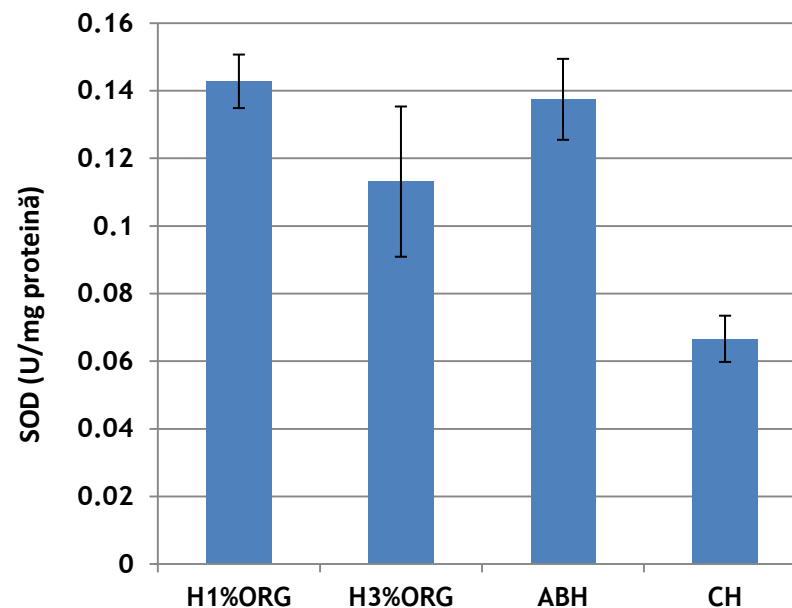


## Efectul inhalării uleiului esențial de *Origanum vulgare* asupra activităților specifice ale SOD și GPX

### SOD

Determinarea activității SOD din fiecare omogenat și a unor parametri statistici: media aritmetică, deviația standard și eroarea standard

Probă	USOD/mg proteină	Deviația standard	Eroarea standard
	Media		
H1%ORG	0.142	0.011	0.007
H3%ORG	0.113	0.038	0.022
ABH	0.091	0.016	0.011
CH	0.066	0.009	0.006

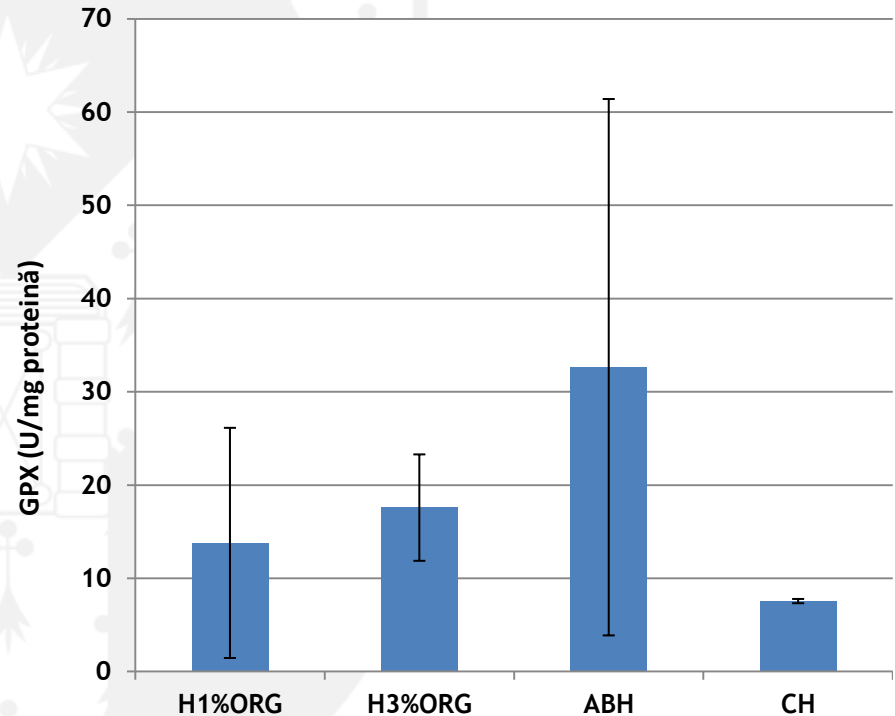


Variațiile activității specifice a SOD în urma inhalării uleiului esențial de *O. vulgare* (1% și 3%) la loturile tratate cu amiloid beta (1-42). Valorile sunt medii  $\pm$  ESM, n=10 animale/lot, \*\*\*( $p < 0,0001$ ) vs. amiloid beta (1-42).

# GPX

Determinarea activității GPX din fiecare omogenat și a unor parametri statistici: media aritmetică, deviația standard și eroarea standard.

Probă	UGPX/mg proteină	Deviația standard	Eroarea standard
	Media		
H1%ORG	13.792	17.455	12.342
H3%ORG	17.581	9.885	5.707
ABH	32.638	40.681	28.765
CH	7.554	0.324	0.229



Variațiile activității specifice a GPX în urma inhalării uleiului esențial de *O. vulgare* (1% și 3%) la loturile tratate cu amiloid beta (1-42). Valorile sunt medii  $\pm$  ESM, n=10 animale/lot, \*\*p<0,001 vs. amiloid beta (1-42).



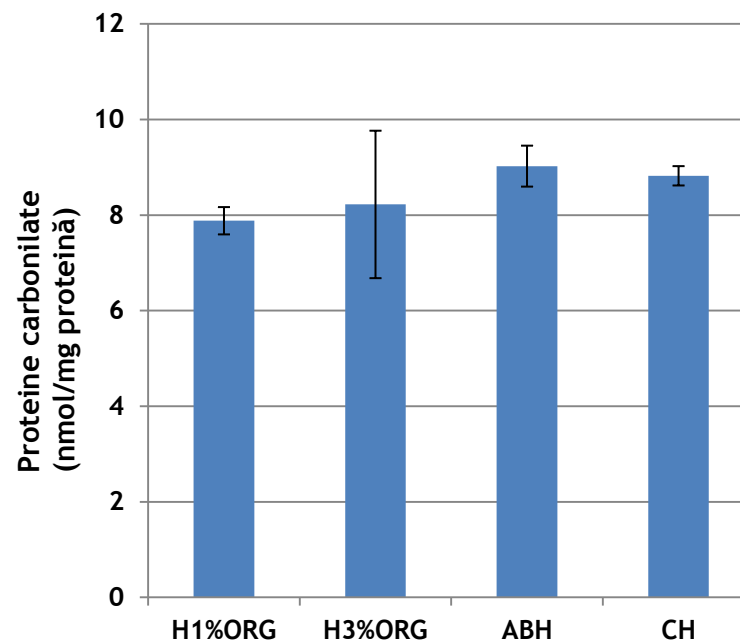


## Efectul inhalării uleiului esențial de *Origanum vulgare* asupra nivelului proteinelor carbonilate și al MDA

### Proteine carbonilate

Determinarea nivelului de proteine carbonilate din fiecare omogenat și a unor parametri statistici: media aritmetică, deviația standard și eroarea standard.

Probă	nanomoli DNPH/mg proteină	Deviația standard	Eroarea standard
	Media		
H1%ORG	7.880	0.404	0.285
H3%ORG	8.222	2.672	1.542
ABH	9.023	0.606	0.428
CH	8.821	0.286	0.202

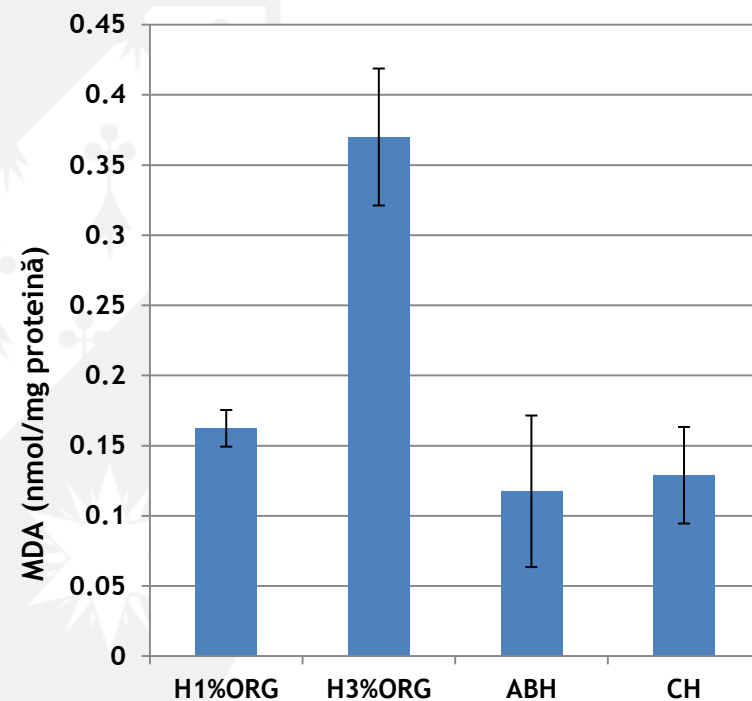


Variațiile nivelului de proteine carbonilate în urma inhalării uleiului esențial de *O. vulgare* (1% și 3%) la loturile tratate cu amiloid beta (1-42). Valorile sunt medii  $\pm$  ESM, n=10 animale/lot, \*\*\*p<0,01 vs. amiloid beta (1-42).

# MDA

Determinarea cantității de MDA din fiecare omogenat și a unor parametri statistici: media aritmetică, deviația standard și eroarea standard.

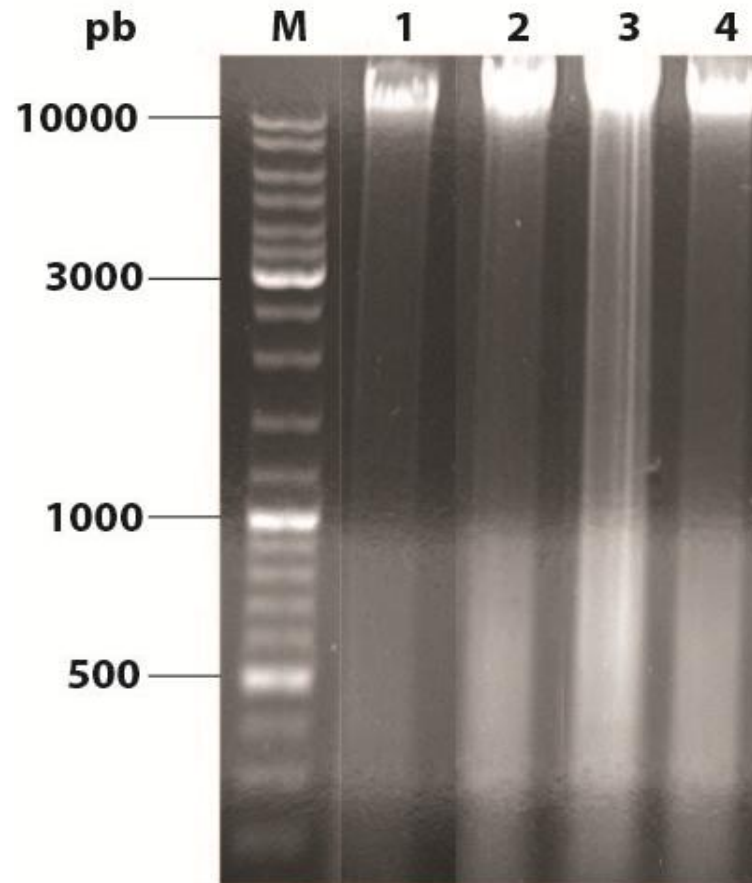
Probă	nanomoli MDA/mg proteină	Deviația standard	Eroarea standard
	Media		
H1%ORG	0.162	0.018	0.013
H3%ORG	0.370	0.084	0.048
ABH	0.117	0.076	0.054
CH	0.128	0.048	0.034



Variațiile nivelului de malondialdehidă în urma inhalării uleiului esențial de *O. vulgare* (1% și 3%) la loturile tratate cu amiloid beta (1-42). Valorile sunt medii  $\pm$  ESM,  $n=10$  animale/lot, \*\*\* $p<0,0001$  vs. amiloid beta (1-42).




## Efectul inhalării uleiului esențial de *O. vulgare* asupra gradului de fragmentare a ADN-ului



Evaluarea fragmentării ADN-ului genomic din țesutul nervos, utilizând electroforeza pe geluri de agaroză. **M** - marker de masă moleculară (Gene Ruler DNA ladder mix, Fermentas); **1** - Control; **2** - ADN genomic total din hipocampus șobolanilor tratați doar cu amiloid beta (1-42); **3** - ADN genomic total din hipocampus șobolanilor tratați cu amiloid beta (1-42) și ulei volatil de *Origanum vulgare* 1%; **4** - ADN genomic total din hipocampus șobolanilor tratați cu amiloid beta (1-42) și ulei volatil de *Origanum vulgare* 3%.



1. Inhalarea uleiului volatil de *Origanum vulgare* de concentrație 1% de către animalele tratate cu amiloidul beta (1-42) a determinat creșterea semnificativă a activității specifice a SOD din omogenatele de hipocamp.
2. Inhalarea uleiului volatil de *Origanum vulgare* de concentrație 3% de către animalele tratate cu amiloidul beta (1-42) a determinat scăderea semnificativă a activității specifice a SOD din omogenatele de hipocamp.
3. Inhalarea uleiului volatil de *Origanum vulgare* de către animalele tratate cu amiloidul beta (1-42) a determinat scăderea semnificativă a activității specifice a GPX din omogenatele de hipocamp.
4. Inhalarea uleiului volatil de *Origanum vulgare* de către animalele tratate cu amiloidul beta (1-42) a determinat scăderea semnificativă a nivelului proteinelor carbonilate din omogenatele de hipocamp.
5. Inhalarea uleiului volatil de *Origanum vulgare* de către animalele tratate cu amiloidul beta (1-42) a determinat creșterea nivelului de MDA din omogenatele de hipocamp.

 Inhalarea uleiului volatil de *Origanum vulgare* (în special, a celui de concentrație 3%) poate reface statusul antioxidant al creierului și poate induce efecte neuroprotective, prin diminuarea stresului oxidativ indus de administrarea amiloidului beta (1-42). De aceea, uleiul volatil de *Origanum vulgare* poate fi utilizat pentru ameliorarea stresului oxidativ din creier, asociat cu boala Alzheimer.

