



تأثیر عصاره زعفران بر اختلالات یادگیری ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی

علی باقریان^۱، مطهره میرزائی^۲، حامد میرزائی^۳، مجید رحمتی^{۴*}

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان- دانشکده علوم پایه- گروه زیست‌شناسی- کارشناس ارشد.

۲- دانشگاه گلستان- دانشکده زیست‌شناسی- گروه زیست‌شناسی- کارشناس ارشد.

۳- دانشگاه علوم پزشکی مشهد- دانشکده پزشکی- گروه بیوتکنولوژی پزشکی- کارشناس ارشد.

۴- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه علوم پایه- کارشناس ارشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۹

چکیده

مقدمه: گیاه زعفران گیاهی دارویی حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشد. مطالعه حاضر به‌علت استفاده از این خاصیت گیاه و همچنین نیاز جامعه به درمان و پیشگیری ضایعات شناختی که به‌دلیل افزایش استرس اکسیداتیو متعاقب ضایعات ایسکمیک مغز و بیماری‌های قلبی-عروقی رخ می‌دهد، انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موش‌های صحرایی نر سفید به دو گروه آزمون و کنترل تقسیم شده و در گروه آزمون تجویز روزانه‌ی عصاره‌ی زعفران به مدت هفت روز صورت گرفت. گروه دیگر در همین مدت زمان سالین نرمال دریافت کرد. سپس با انجام عمل جراحی دو رگ (بستن عروق کاروتید مشترک) بر روی نیمی از نمونه‌های هر گروه، ضایعه‌کاهش جریان خون مغزی (هایپوپرفیوژن) در آنها ایجاد شد. سپس مجدداً به مدت ۴ روز پیاپی بعد از عمل جراحی تمامی موش‌های گروه آزمون عصاره زعفران را دریافت نموده، در پایان همه موش‌ها با آزمون رفتاری ماز آبی موریس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: آنالیز آزمون رفتاری ماز آبی موریس تفاوت معنی‌داری را میان گروه جراحی شده که دارو دریافت کرده بودند و گروه کنترل (جراحی شده بدون دریافت دارو) نشان داد. به عبارت دیگر عصاره زعفران اختلالات یادگیری ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه حاکی از آن است که عصاره زعفران می‌تواند اختلالات یادگیری ناشی از کاهش خون‌رسانی مغزی، که متعاقب ایجاد استرس اکسیداتیو و تخریب هیپوکمپ در موش‌های صحرایی رخ می‌دهد را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: عصاره زعفران، هایپوپرفیوژن، هیپوکمپ، یادگیری، رادیکال آزاد.

*نویسنده مسئول: شاهرود- میدان هفت تیر- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی، شماره: ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۵۴، Email: rahmatima@hotmail.com

ارجاع: باقریان علی، میرزائی مطهره، میرزائی حامد، رحمتی مجید. تأثیر عصاره زعفران بر اختلالات یادگیری ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛ ۱۰(۲): ۴۷-۵۵.

مقدمه

تولید رادیکال‌های آزاد، مسأله‌ای طبیعی است و در طی عمل تنفس سلولی به وجود می‌آید. رادیکال‌های آزاد تعدادی اتم تک الکترونی هستند و در حین واکنش اکسیژن با برخی مولکول‌ها تولید می‌شوند. اگر به طور ناگهانی تعداد زیادی از آنها در بدن تولید شود، با بعضی قسمت‌های سلول مانند DNA و غشای سلولی واکنش نشان داده و باعث تغییر عملکرد سلول و یا حتی مرگ آن می‌شود (۱ و ۲). در حالت عادی، سیستم دفاعی بدن این رادیکال‌های آزاد را خنثی و بی‌ضرر می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، مشخصاً دوره اکسیداسیون کند را افزایش می‌دهند. این مواد ممکن است به طور طبیعی وجود داشته باشند (مثل آنتوسیانین در گلبرگ زعفران) و یا اینکه به صورت مصنوعی به ماده غذایی اضافه شوند. باتوجه به شیوع گسترده اختلالات عصبی حاد و یا مزمن (همانند: فعالیت‌های تشنجی مغز، پارکینسون، آلزایمر، مالتیپل اسکلروز و غیره) که در آسیب‌شناسی آنها رادیکال‌های آزاد به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم نقشی کلیدی ایفا می‌کنند و نیز محدود بودن راه‌های درمانی موجود، هزینه‌های زیاد و عدم موفقیت بعضی از این روش‌ها در درمان کامل این اختلالات، لازم است تا راهکارهای جدید و مؤثرتری برای پیشگیری و درمان این بیماری‌ها اتخاذ شود. در این میان کاهش خون‌رسانی مغزی از مهمترین دلایل رخداد ناهنجاری‌های مغزی است. به دنبال کاهش جریان خون مغزی صدمات غیرقابل برگشت و پایداری به نواحی خاصی از مغز وارد می‌شود و این صدمات در افزایش سن، بیماری‌های قلبی-عروقی و ناهنجاری‌های روانی همچون بیماری آلزایمر و مواردی مشابه رخ خواهد داد.

هایپوپرفیوژن مغزی که از دیدگاه بالینی با علایمی نظیر ناهنجاری‌های حسی و حرکتی، اختلال در تکلم و بینایی، مشکلات روانی، کاهش ادراک، آپراکسی (ناتوانی در انجام تکالیفی که فرد قبلاً داشته)، اختلالات شناختی، فراموشی آنتروگرید (ناتوانی در ایجاد خاطرات جدید به علت صدمه به مغز) و اختلال در یادگیری فضایی و حافظه مشخص می‌شود، در واقع بروزی از مرگ نورونی (نکروز یا آپوپتوز) در نواحی مختلف مغز است. مشخص شده است که نواحی خاصی از مغز و انواعی از نورون‌ها نسبت به کاهش خون‌رسانی مغزی حساس‌ترند، از جمله نورون‌های پیرامیدال ناحیه CA₁ هیپوکمپ (۳-۵). در این میان رادیکال‌های آزاد از جمله آنیون‌های هیدروکسیل، سوپر اکسید، نیتریک اکساید و خصوصاً رادیکال‌های آزاد گونه‌های فعال اکسیژن نقشی کلیدی در پاتوژنز فرآیندهای متعاقب ایسکمی/رپرفیوژن ایفا می‌کنند. زمانی که سطح تولید رادیکال‌های آزاد بیشتر از توانایی پاک‌سازی آنها به وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدان بافتی/

سلولی باشد و یا اصطلاحاً استرس اکسیداتیو رخ دهد، رادیکال‌های آزاد می‌توانند به صورت مستقیم باعث آسیب‌های جدی به اجزای حیاتی سلول شوند. در عین حال وجود شرایط اکسیداتیو در بافت باعث افزایش واسطه‌های التهابی شده، به صورت غیرمستقیم مرگ مضاعف سلولی را به دنبال خواهد داشت. از آن جایی که میزان تولید رادیکال‌های آزاد نیز در شرایط التهابی بافتی افزایش می‌یابد، این فرآیندها در نهایت منجر به راه‌اندازی چرخه‌ای پاتوژنیک می‌شود که در آن استرس اکسیداتیو نقشی مرکزی ایفا می‌کند. این نکته لزوم استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان و جاروب‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد را در تحقیقات دارویی بر روی اختلالات نورودژنراتیو همراه با آسیب اکسیداتیو نمایان می‌سازد. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری بر روی گونه‌های گیاهی به منظور یافتن منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها و تأثیر آنها بر مدل‌های مختلف استرس اکسیداتیو انجام گرفته است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که گیاه زعفران آثار محافظتی و آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد. مطالعات پیشین نیز حاکی از آثار محافظتی این گیاه بر روی استرس اکسیداتیو ناشی از محرومیت سرم گلوکز در سلول‌های PC12 است. براساس مطالعات آزمایشگاهی انجام گرفته، زعفران به طور معناداری خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی نسبت به دیگر نمونه‌ها نشان داده است (۱۲-۱۴). در مطالعات آزمایشگاهی میزان محتوای فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه زعفران به روش‌های مختلف آزمایشگاهی اندازه‌گیری شده است (۱۵-۱۸). در این مطالعه تلاش می‌شود تا آثار عصاره الکلی گیاه بر روی ضایعات اکسیداتیو ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی در موش صحرایی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از بیست و چهار سر موش نر صحرایی سفید بالغ در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۱۸۰ گرم و سن دوازده هفته استفاده شد. موش‌ها در شرایط مناسب با درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و سیکل روشنایی تاریکی دوازده ساعته نگهداری شده، به طور آزادانه دسترسی به آب و غذا داشتند و برای تغذیه آنها از غذای فشرده استفاده می‌شد. موش‌ها به طور تصادفی به دو گروه دوازده تایی درمان و کنترل تقسیم شدند. به گروه درمان روزانه دو میلی‌لیتر دارو به ازای هر ۲۵۰ گرم وزن بدن تجویز شد و گروه کنترل با همین دوز آب مقطر دریافت کرد. از هر کدام از این دو گروه تعداد شش موش تحت عمل جراحی هایپوپرفیوژن قرار گرفتند و شش موش دیگر تنها برای ایجاد استرس جراحی، تحت عمل جراحی بدون ایجاد ضایعه هایپوپرفیوژن قرار گرفتند.

گیاه زعفران از منطقه ابوزید آباد شهرستان کاشان، طی آبان ماه سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری و توسط بخش هرباریوم گروه فارماکولوژی

آرامی از بافت‌های اطراف با پنس‌های ریز به صورت کندکاری جدا شد. شریان‌های کاروتید مشترک به همراه عصب واگ تشکیل تنه‌ای را می‌دهند که تحت عنوان غلاف کاروتید نامیده می‌شود. با پنس ریز به آهستگی به طوری که به عصب آسیبی وارد نشود این دو ساختار را از هم جدا کرده و شریان‌های کاروتید مشترک به طور همزمان به وسیله لیگاتور با نخ سیلک ۴/۰ مسدود شد. پس از زدن لیگاتور بررسی لازم برای کامل بودن انسداد با مشاهده مستقیم انجام شد. سپس عضله استرونهاویوئیدوس با نخ سیلک نمره ۴/۰ و در نهایت پوست با نخ نایلون نمره ۴/۰ بخیه شد. درجه حرارت حیوانات با استفاده از تشک برقی و گرمای لامپ در زمان جراحی و در طول بیهوشی حفظ گردید.

به هر حیوان به علت احتمال عفونت ۱۰۰۰۰۰-۲۰۰۰۰۰ واحد پنی سیلین ۳-۳ به صورت عضلانی تزریق گردید. پس از به هوش آمدن حیوانات درون قفس خشک قرار داده شدند و به محل اتاق نگهداری حیوانات آزمایشگاهی که دارای دمای مناسب بود منتقل شدند.

ماز آبی موریس شامل یک حوضچه استوانه‌ای شکل به رنگ سیاه با قطر ۱۴۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر بوده که کمی بیشتر از نصف ارتفاع آن، با آب 20 ± 2 درجه پر می‌گردید. یک سکوی سیاه رنگ از جنس فلز با قطر ۱۵ سانتی‌متر در مرکز یکی از ربع‌های دایره و در عمق ۱ سانتی‌متری زیر آب قرار داده می‌شد. این سکو که فقط برای فرار حیوان از آب می‌باشد، روی یک پایه در کف حوضچه قرار گرفته بود.

اتاقی که ماز در آن قرار داشت دارای اجسام و علامت‌های اضافی تعبیه شده از قبیل پوستر، قفسه، پنجره و غیره بود. اتاق کاملاً تاریک می‌شد و تنها نور کمی برای تسهیل ردیابی ویدئویی و دید محدود برای دیدن علائم توسط موش، فضا را روشن می‌ساخت.

در آزمایشات سکوی پنهان (ماز آبی موریس) هر موش در هر روز توسط چهار کارآزمایی، تحت بررسی رفتاری قرار گرفت. به منظور ارزیابی وضعیت یادگیری متعاقب هاپیوپرفیوژن مداوم تجربی مغز در موش‌ها، آزمون ماز آبی موریس در روز چهارم پس از جراحی به مدت هفت روز پیایی انجام شد (۴). در هر کارآزمایی حیوان چهار بار (یک بار از هر یک از جهات شمال، جنوب، شرق و غرب) که به طور تصادفی توسط کامپیوتر تعیین می‌گردید، رها می‌شد. رها شدن حیوان به نحوی بود که صورتش به سمت دیواره حوضچه باشد. در هر بار ۶۰ ثانیه به موش فرصت داده می‌شد تا محل سکو را پیدا کند، در غیر این صورت به روی سکو راهنمایی می‌شد. پس از هر بار که حیوان سکو را پیدا می‌کرد (بعد از هر بار کارآزمایی) ۲۰ ثانیه به حیوان فرصت داده می‌شد تا بر روی سکو بماند و محیط اطراف را بررسی نماید. سپس کارآزمایی

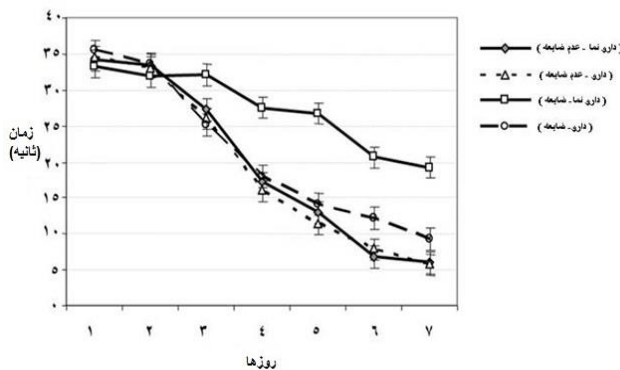
دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اصفهان شناسایی شد. گل‌ها از ساقه و برگ جدا شده، در هوای آزمایشگاه خشک گردید و تا زمان استفاده در ظرف‌های درب بسته و دور از نور نگهداری شد.

ده گرم نمونه خشک شده را در دویست میلی‌لیتر متانول ریخته و به خوبی مخلوط کردیم تا گلبرگ‌ها به درستی در آن غوطه‌ور گردند. پس از بیست و چهار ساعت مخلوط کردن، عصاره صاف شده و در زیر هود، بدون بستن درب جهت تبخیر متانول، به مدت دوازده ساعت نگهداری شد و جهت حذف حلال، در آون با دمای چهل درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به تدریج با حذف حلال، رنگ محلول باقیمانده، از رنگ زرد به بنفش تغییر رنگ داد.

متعاقب قرار دادن موش‌ها در قفس‌های جداگانه و پس از گذشت یک روز و کاهش استرس مربوط به محیط جدید، داروی تهیه شده به صورت زیر مورد مصرف قرار گرفت. روزانه حدود یک گرم دارو در سی و دو میلی‌لیتر آب مقطر توسط همزن برقی و هیتر به صورت محلول تهیه می‌شد. به ازای هر ۲۵۰ گرم وزن موش، دو میلی‌لیتر دارو به هر موش خورنده می‌شد (۲۵۰ میلی‌گرم دارو به ازای هر کیلوگرم وزن بدن). برای خوراندن دارو به موش‌ها از سوند گاواژ گیج شانزده با طول ده سانتی‌متر استفاده شد. دارو با استفاده از سرنگ ۵ سی‌سی و باتوجه به وزن حیوان در اختیار گروه درمان قرار گرفت. دارو به مدت هفت روز و در ساعت معین به حیوانات خورنده می‌شد. در گروه کنترل نیز این عمل صورت گرفت و آب مقطر به عنوان دارونما خورنده می‌شد. حیوانات در روز هشتم تحت عمل جراحی هاپیوپرفیوژن مغزی قرار گرفتند و مجدداً دارو در روز دوم پس از جراحی به مدت دو روز به حیوانات گروه درمان خورنده شد. از روز چهارم پس از جراحی (روز ۱۲ دارو) حیوانات برای انجام آزمون رفتاری به محل آزمایشگاه فیزیولوژی رفتار دانشکده پزشکی منتقل شدند.

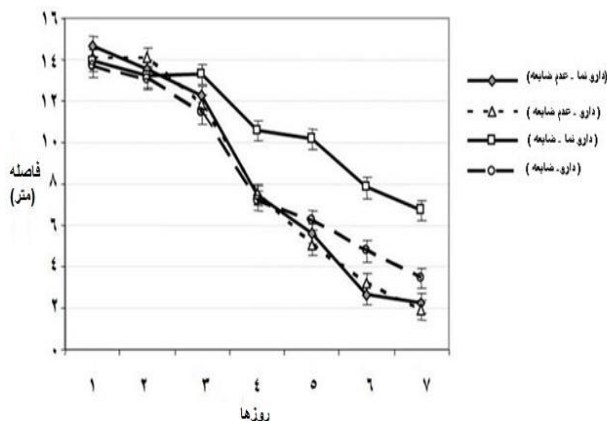
هایپوپرفیوژن مغزی به روش بستن دو رگ در موش‌ها ایجاد شد. جهت بیهوشی حیوانات از داروی ایزوفلوران به صورت استنشاقی استفاده شد. ابتدا حیوان را داخل ظرف درب بسته‌ای که ایزوفلوران توسط لوله‌ی دستگاه بیهوشی به آن وارد می‌شد قرار داده و پس از بیهوش شدن ماسک بیهوشی روی بینی و دهان حیوان قرار داده می‌شد. پس از تراشیدن موهای قسمت میانی گردن و ضد عفونی کردن محل با استفاده از بتادین ده درصد، در شرایط استریل با تیغه شماره ده برش طولی در قسمت میانی گردن حیوان ایجاد شد. بعد از باز کردن پوست ابتدا غده‌ی تیروئید از روی عضلات کنار زده شد و عضله روی نای، استرونهاویوئیدوس، به روش کندکاری برش داده شده و از موضع کنار زده شد. سپس شریان‌های کاروتید مشترک که در دو طرف نای و قسمت پشتی جانبی آن واقع شده بود را پیدا کرده و به

هایپوپرفیوژن مداوم مغزی شد ($P < 0.05$ ، $n=6$) داده‌ها به صورت مجموع زمان \pm خطای معیار استاندارد نمایش داده شده‌اند.



نمودار ۱- اثرات عصاره زعفران بر اختلالات یادگیری ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی در ارزیابی زمان تأخیر در چهار گروه مورد مطالعه

در روزهای سوم به بعد پس از شروع آزمون (یا روز ششم به بعد پس از جراحی)، هایپوپرفیوژن مغزی می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار میزان مسافت طی شده (مجموع طول مسیر شنا شده در چهار ربع استخر) در مقایسه با گروه‌هایی گردد که تحت عمل جراحی بدون ایجاد هایپوپرفیوژن قرار گرفته بودند. این در حالی است که خوراندن عصاره زعفران به مدت ده روز باعث کاهش مسافت شنا شده تا مقادیر مشابه در گروه‌هایی می‌شود که دارو یا دارونما بدون ایجاد هایپوپرفیوژن مداوم دریافت کرده بودند ($P < 0.05$ ، $n=6$) داده‌ها به صورت مجموع مسافت شنا شده \pm خطای معیار استاندارد نمایش داده شده‌اند.



نمودار ۲- اثرات عصاره زعفران بر اختلالات یادگیری ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی در ارزیابی مسافت طی شده تا یافتن سکوی فرار در چهار گروه مورد مطالعه

هایپوپرفیوژن مداوم تجربی مغز تغییری در سرعت شنای موش‌ها ایجاد نمی‌کند. متعاقباً تفاوت معنی‌داری نیز در سرعت شنا بین گروه‌هایی که دارو یا دارونما دریافت کرده بودند مشاهده نشد

بعدی آغاز می‌شد. در فاصله هر کار آزمایشی حیوان به مدت ۳۰ ثانیه به قفس بازگردانده می‌شد.

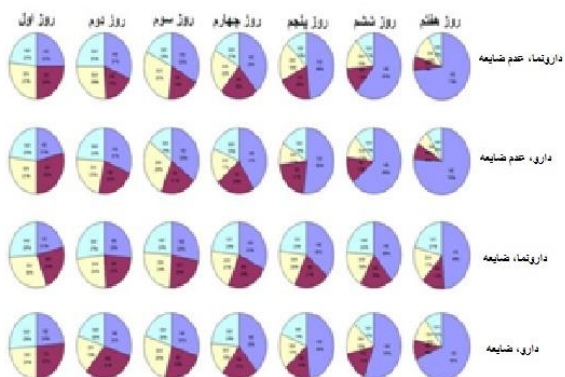
یک دوربین ویدیویی در بالای حوضچه نصب شده بود که در طول مدت آزمون از حیوان تصویربرداری می‌کرد. اطلاعات حاصل به کامپیوتر منتقل شده و توسط سیستم نرم‌افزاری ردیاب مورد تحلیل قرار می‌گرفت. در هر کارآزمایی پارامترهای مختلفی از جمله مدت زمان یافتن سکو بر حسب ثانیه، مسافت طی شده بر حسب سانتی‌متر، سرعت شنا بر حسب سانتی‌متر بر ثانیه و مدت زمان حضور در هر ربع دایره مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هر روز پس از اتمام آزمون رت‌ها به آرامی با حوله خشک شده، مدتی گرم نگه داشته شده و سپس به قفس خود باز گردانده می‌شدند.

به منظور مقایسه شاخص‌های مسافت شنا شده در کل استخر (Path length)، زمان تأخیر تا یافتن سکوی فرار (Latency) و سرعت شنا (Swim speed) در روزهای هفت گانه آزمایش از آزمون آنالیز واریانس مکرر (Repeated measures ANOVA) استفاده شد. همچنین از این آزمون برای مقایسه درصد زمان تأخیر سپری شده (نسبت به کل زمان تأخیر استخر) در ربع شمال شرقی (ربعی که سکوی فرار در آن قرار داشت) در روزهای هفت گانه آزمایش برای گروه‌های چهار گانه استفاده شد. متعاقباً از آزمون تکمیلی Tuckey-Kramer post-hoc test برای آنالیز تفاوت‌های بین گروهی استفاده گردید. مقادیر $P < 0.05$ به عنوان معنی‌دار تلقی شد. به منظور مقایسه درصد زمان تأخیر سپری شده هر گروه در چهار ربع استخر و همین‌طور مقایسه درصد زمان تأخیر سپری شده در ربع شمال شرقی بین گروه‌های چهار گانه آزمایش، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقباً از آزمون تکمیلی Tuckey-Kramer post-hoc test استفاده شده، مقادیر $P < 0.05$ به عنوان معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

عصاره زعفران باعث تخفیف اختلالات یادگیری ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی در ارزیابی زمان تأخیر می‌شود. به منظور ارزیابی وضعیت یادگیری متعاقب هایپوپرفیوژن مداوم تجربی مغز در موش‌های صحرایی، آزمون ماز آبی موریس در روز چهارم پس از جراحی به مدت هفت روز پیاپی انجام گرفت (۴). در روزهای سوم به بعد پس از شروع آزمون (یا روز ششم به بعد پس از جراحی)، نتایج حاصله نشان داد که هایپوپرفیوژن مغزی می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار زمان تأخیر در یافتن سکوی فرار (مجموع زمان تأخیر چهار ربع استخر) نسبت به گروه‌هایی گردد که تحت عمل جراحی بدون ایجاد هایپوپرفیوژن قرار گرفته بودند. این در حالی است که خوراندن عصاره زعفران به مدت ده روز باعث بهبود کارکردهای شناختی و یادگیری متعاقب ایجاد

هایپوپرفیوژن مداوم دریافت کرده بودند ($P < 0/05$ ، $n=6$) داده‌ها به صورت مجموع زمان \pm خطای معیار استاندارد نمایش داده شده‌اند).



نمودار ۵- مدت زمان و درصد حضور موش در ربع شمال شرقی استخر (محل قرارگیری سکوی فرار) در مقایسه با گروه‌هایی که مورد عمل جراحی بدون ایجاد هایپوپرفیوژن قرار گرفته بودند. (سبز: ربع شمال غرب، آبی: ربع شمال شرق، قرمز: ربع جنوب شرق، زرد: ربع جنوب غرب)

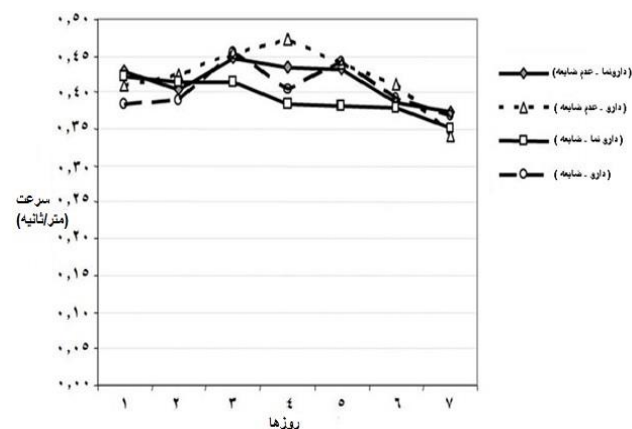
بحث

فراموشی ضایعه‌ای است که در سنین بالا و در نتیجه بیماری آلزایمر در تعداد زیادی از انسان‌ها مشاهده می‌شود. دمانس (زوال عقل) اخیراً یکی از مشکلات بزرگ اجتماعی با افزایش جمعیت مسن می‌باشند. دمانس عروقی که با کاهش پیشرونده استعداد (به‌علت هایپوکسی، ایسکمی و یا ضایعات خونریزی‌دهنده مغزی) تعریف شده است، به‌طور معمول نیمی از موارد دمانس‌ها را شامل می‌شود (۶). با افزایش تعداد جمعیت سالمند بیماری‌های مرتبط با سن مختلفی مانند افزایش فشار خون، آرترواسکلروز و انواع مختلفی از دمانس‌ها نیز افزایش یافته است. بر مبنای مشاهدات کلینیکی بیمارانی که دچار کاهش قدرت تفکر شده‌اند، اغلب از ایسکمی منتشر، هایپوکسی و یا خونریزی‌های مغزی که منجر به ناهنجاری‌های عروقی شده است، رنج می‌برند (۷).

بیماری آلزایمر یک ناهنجاری دژنراتیو نورونی می‌باشد که مسئول ایجاد دمانس در افراد مسن بوده و به‌صورت کلینیکی با کاهش پیشرونده‌ی حافظه و عملیات شناختی همراه است (۸). منبع انرژی مغزی به‌طور طبیعی از متابولیسم هوای گلوکز مشتق می‌شود. دمانس مزمن پیشرونده‌ای مانند بیماری آلزایمر با کاهش متابولیسم گلوکز مغز و متابولیسم اکسیژن مشخص شده است. کاهش جریان خون در مویرگ‌های مغزی باعث کاهش حضور گلوکز و دیگر سوپستراهای متابولیکی می‌گردد و این ایسکمی مزمن ضعیف باعث ایجاد و بقاء علائم نورولوژیکی مسبب بیماری آلزایمر خواهد شد (۴).

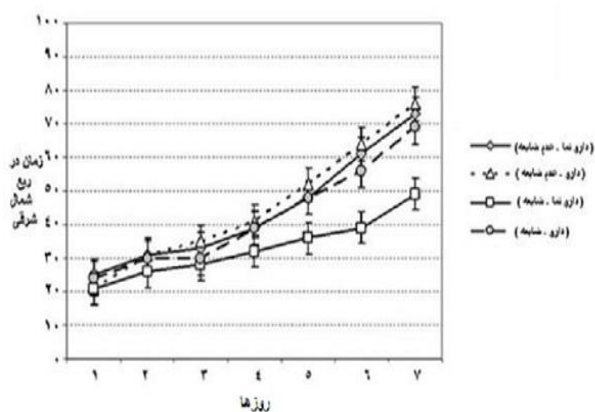
براساس تحقیقات انجام شده ناهنجاری‌های گردش خون مغز دلیل اصلی یا عامل تسهیل‌کننده ایجاد ضایعات نورولوژیکی یا بیماری‌های روانی می‌باشد. قطع ناگهانی خون‌رسانی به یک ناحیه از مغز منجر به

نمایش داده شده‌اند). $n=6$ ، $P < 0/05$ داده‌ها به صورت سرعت شنا \pm خطای معیار استاندارد



نمودار ۳- آثار عصاره زعفران و اختلالات یادگیری ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی بر میزان تحرک موش‌ها و سرعت شنا تا یافتن صفحه فرار در چهار گروه مورد مطالعه

این در حالی است که خوراندن عصاره زعفران به مدت ده روز باعث افزایش حضور در ربع دارای سکوی تا مقادیر مشابه در گروه‌هایی می‌شود که دارو یا دارونما بدون ایجاد هایپوپرفیوژن مداوم دریافت کرده بودند ($P < 0/05$).



نمودار ۴- آثار عصاره زعفران و اختلالات یادگیری ناشی از هایپوپرفیوژن مغزی بر مدت زمان حضور در ربع شمال شرقی استخر (محل قرارگیری سکوی فرار) در چهار گروه مورد مطالعه

در روزهای سوم به بعد پس از شروع آزمون (یا روز ششم به بعد پس از جراحی)، هایپوپرفیوژن می‌تواند باعث افزایش معنی دار مدت زمان حضور موش در ربع شمال شرقی استخر (محل قرارگیری سکوی فرار) نسبت به گروه‌هایی شود که تحت عمل جراحی بدون ایجاد هایپوپرفیوژن قرار گرفته بودند. این در حالی است که خوراندن عصاره زعفران به مدت ده روز باعث افزایش مدت زمان حضور در این ربع تا مقادیر مشابه در گروه‌هایی می‌شود که دارو یا دارونما بدون ایجاد

بسته پایدار به صورت پیشرونده‌ای در ماز آبی موریس در روزهای ۴ تا ۱۱ بعد از جراحی تخریب شده است. این نتیجه در گزارش‌های قبلی هم تأیید شده بود. تجویز طولانی مدت عصاره زعفران نقص عملکردی موش‌های دو رگ بسته را بهبود بخشید، به طوری که خطا در رفتار گروهی که دارو مصرف نکرده‌اند به طور چشمگیری بیشتر از گروه دارو بود. در مطالعه کریمی و همکاران نیز بر قدرت بالای آنتی‌اکسیدانی این گیاه تأکید شده است (۱۹). در مطالعات چن و همکاران عصاره اتیل استاتی گلبرگ این گیاه دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده است و نشان داده شده که عصاره‌ی متانولی آن دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقابل پراکسیداسیون اسید لینولئیک می‌باشد. میزان خواص و فعالیت نسبی عصاره‌های مختلف این گیاه به ترتیب به صورت متانولی < اتیل استاتی < آبی < کلروفرمی ذکر شده است (۲۰). در مطالعات دیگر نیز آثار آنتی‌اکسیدان زعفران به علت داشتن محتوای فنولی تأیید شده است (۲۱-۲۵). این که ارتباط مثبتی بین محتوای فنولی عصاره‌ها و خواص آنتی‌اکسیدانی آنها یافت شود امر بسیار مهمی است. فنول عامل بسیار مهمی در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد به علت داشتن گروه‌های هیدروکسیل است. پس محتوای فنولی گیاه احتمالاً ارتباط مستقیمی با خواص آنتی‌اکسیدانی آن خواهد داشت (۱ و ۱۰). چنانچه گفته شد گیاهان خانواده کروکوس دارای محتوای غنی پلی فنولی می‌باشند. این محتوای عظیم فنولی در عصاره‌ی زعفران فلاونوئیدی، گلیکوزیدی و آنتوسیانین‌ها فراوان است و دارای خواص آنتی‌اکسیدان قوی است. این گروه به فنول امکان برداشت ساده‌تر انتهای هیدروژنی برای فعال کردن رادیکال‌های آزاد برای تخریب زنجیره‌ی فعال‌سازی آنتی‌اکسیدان را می‌دهد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها بیشتر به گروه‌های هیدروکسیل فنولیک آنها مرتبط است و این از راه‌های مختلفی همچون جلوگیری از شروع چرخه‌رادیکالی، کاتالیز باند شدن موقت یون‌های فلزی، تغییر موقعیت پراکسیدها، جلوگیری از تجمع ممتد هیدروژن و جاروب کردن رادیکال‌ها صورت می‌گیرد (۱، ۱۰ و ۲۴). استفاده از چنین مواد و عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند روش مناسبی برای درمان و پیشگیری از ضایعات ناشی از هایپروپرفیوژن و آسیب‌های اکسیداتیو مغزی باشد، چرا که رادیکال‌های آزاد نقش بارزی در کنترل و ایجاد این ضایعات دارند و باعث توسعه و پیشرفت این ضایعات خواهد شد (۲ و ۹). محتوای H^+ می‌تواند برای ساختار مغز مضر بوده و فعالیت‌های پیشرفته‌تری مثل یادگیری و حافظه و شناخت را متأثر کند (۷). مطالعه حاضر نشان داد که گیاه زعفران به علت دارا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی به خوبی اثر درمانی و پیشگیری‌کننده بر روی ضایعات ناشی از هایپروپرفیوژن مداوم مغزی در موش داشته است. در این مطالعه فقط از آزمون‌های رفتاری جهت ارزیابی دارو استفاده شده است با این حال،

سکته می‌گردد در حالی که کاهش متوسط ولی پایدار جریان خون مغزی موضعی، پردازش‌های حافظه را تحت تأثیر قرار داده و توسعه و پیشرفت دمانس را تسهیل می‌کند (۹).

ارتباط کاهش جریان خون مغزی مخصوصاً در لوب‌های گیجگاهی و آهیانه در ایجاد بیماری آلزایمر به طور مشخصی اثبات شده است (۹). گزارش شده ایسکمی مزمن منتشر مغزی، آسیب نورونی را در نواحی آسیب‌پذیر مغز خصوصاً در هیپوکمپ و قشر مغز ایجاد می‌کند. علاوه بر این مجموعه‌ای از متابولیت‌ها مثل استیل کولین استراز، گلوگز، لاکتات، ATP آز، سیتوکروم اکسیداز، نیتروز اکساید سنتتاز و رادیکال‌های آزاد را ایجاد می‌کند که همه به دنبال آسیب نورونی تولید شده‌اند. این محصولات به طور مزمن نواحی عصبی را تخریب کرده و باعث نقص در یادگیری و حافظه خواهند شد. این حوادث نوروپاتولوژیک زمینه‌ساز مشکلات عصبی عروقی خواهند بود (۷).

هایپروپرفیوژن منتشر مغزی در بیماران مبتلابه سکته قلبی و افرادی که تحت عمل جراحی قلب بوده‌اند گزارش شده است. این امر زمینه‌ساز بازده ضعیف نورولوژیکی در این افراد بوده است و همگی باعث کاهش حافظه در افراد تحت تأثیر خواهند شد (۹).

مطالعات گذشته نشان داده که آسیب‌های اکسیداتیو نقش کلیدی در آسیب‌زایی بیماری‌های دژنراتیو عصبی مثل سکته، آلزایمر و بیماری دمانس عروقی ... دارد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون چربی‌ها احتمالاً نقش اتیولوژیکی در توسعه و پیشرفت ضایعات سیستم عصبی مرکزی در بیماران مبتلابه دمانس عروقی دارد. بنابراین به نظر می‌رسد درمان‌های آنتی‌اکسیدانی برای مدیریت دمانس عروقی مهمترین راه است (۱ و ۲). در طول استرس اکسیداتیو میزان زیادی از رادیکال‌های آزاد تولید شده که می‌تواند به خاطر حمله به مولکول‌های ساختاری مانند پروتئین‌ها و چربی‌ها، خطرناک باشند. در حقیقت گزارش شده که میزان بالای گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند باعث پیر شدن سلول‌ها، جهش‌زایی و بیماری‌های قلبی-عروقی شود. این ضایعات را با بسیاری از روش‌ها مانند ایجاد اختلالات غشائی، تخریب DNA و اکسید کردن لیپوپروتئین‌های کم وزن (LDL) ایجاد می‌کنند (۱ و ۱۰). سلول‌ها می‌توانند تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را با سیستم‌های آنزیمی اندوزنی مثل کاتالاز و سوپر اکسید دسموتاز و یا با سیستم‌های خارج سلولی مثل استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله ویتامین C و آلفا-توکوفرول کاهش دهند (۱۰ و ۱۱). در تجمع بسیار بالای گونه‌های فعال اکسیژن به علت کهولت سن و بیماری آلزایمر و به طور کلی کاهش خون‌رسانی مغزی همان‌طور که گفته شد این سیستم‌ها به تنهایی توانایی رفع و کاهش تجمع اکسیدان‌ها را نداشته و استفاده از داروهای آنتی‌اکسیدان ضروری به نظر می‌رسد (۱ و ۱۲). در مطالعه حاضر مشخص شد که عملیات یادگیری در موش‌های دو رگ

انجام می‌دهد و این باتوجه به نتایج آزمایشگاهی این گیاه که نشان‌دهنده‌ی خواص آنتی‌اکسیدانی آن است مطابقت می‌کند (۶). دیگر آزمایشات مشخص می‌کند که از مواد آنتی‌اکسیدان و از بین برنده‌های رادیکال‌های آزاد برای درمان دمانس عروقی در حیوانات در کارآزمایی‌های کلینیکی و درمان استفاده می‌شود (۶ و ۲۶). تحقیقات ما نشان داد که استفاده از عصاره زعفران در پیشگیری از ضایعات و تخریب حافظه و یادگیری فضایی در موش اثر مثبت داشته و این بهبود به موازات خواص آنتی‌اکسیدان این گیاه می‌باشد. با این وجود، احتمال دیگر مکانیسم‌های دخیل در این فعالیت توسط زعفران مشخص نشده و در آینده می‌بایست مورد مطالعه قرار گیرد. به‌عنوان خلاصه، ما مشخص کردیم که گیاه زعفران به‌طور مشخصی نقایص شناختی و تغییرات یادگیری ایجاد شده توسط هایپوپرفیوژن مغزی در موش را بهبود می‌بخشد و این اثر مرتبط با حداقل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد. این اطلاعات هنگامی که در حال درمان موارد کلینیکی ناهنجاری‌های دمانس عروقی هستیم، بسیار مفید خواهد بود.

References

- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ghaeni FA, Motamedshariaty VS, Mohajeri SA. Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Phytotherapy Research* 2012;26:381-6.
 - Zhang GL, Deng JP, Wang BH, Zhao Z-, Li J, Gao L, et al. Gypenosides improve cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats by suppressing oxidative stress and astrocytic activation. *Behavioural Pharmacology* 2011;22:633-44.
 - Bennett SA, Tenniswood M, Chen J-H, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T, et al. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport* 1998;9:161-6.
 - Pappas B, De La Torre J, Davidson C, Keyes M, Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Research* 1996;708: 50-8.
 - Von Euler M, Bendel O, Bueters T, Sandin J, Von Euler G. Profound but transient deficits in learning and memory after global ischemia using a novel water maze test. *Behavioural Brain Research* 2006;166:204-10.
 - Liu C, Wu J, Gu J, Xiong Z, Wang F, Wang J, et al. Baicalein improves cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2007;86:423-30.
 - Shang Y, Cheng J, Qi J, Miao H. Scutellaria flavonoid reduced memory dysfunction and neuronal injury caused by permanent global ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;82:67-73.
 - Vicente É, Degerone D, Bohn L, Scornavaca F, Pimentel A, Leite MC, et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Research* 2009;1251:204-12.
 - Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews* 2007;54:162-80.
- آزمایشات بافت‌شناسی برای تخمین ارتباط بین اثر دارو و آسیب نورونی لازم به نظر می‌رسد. براساس مطالعات قبلی مشخص شده تخریب نورونی با نقص در حافظه و یادگیری فضایی ارتباط دارد. روش بستن دو رگ باعث تخریب سریع‌الاثراثر فراگیری ماز آبی موریس شده و اثر دیر رخدادتری بر کاهش سلول‌های CA₁ می‌گذارد (۵، ۷ و ۹). این که مغز به میزان زیادی به اکسیداسیون توسط گروه‌های فعال اکسیژن حساس است به خوبی شناخته شده و این حساسیت به‌علت وابستگی مغز به متابولیسم هوازی، میزان بالای چربی‌های غیر اشباع در میتوکندری و غشای سلول‌های پلاسما و دفاع پایین نسبت به اکسیدان‌ها در مغز است. ایسکمی منتشر پایدار آسیب نورونی پیشرونده و تغییرات غیرنرمال در رادیکال‌های آزاد مغزی ایجاد می‌کند. رادیکال‌های آزاد در تخریب و مرگ نورون‌ها مشارکت می‌کنند و به‌طور مشخص در آسیب‌زایی بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر و دمانس عروقی نقش دارد. گونه‌های فعال اکسیژن به سلول‌های نورونی به میزان بالایی آسیب می‌رساند و این به‌علت اکسیداسیون محتوای ضروری سلول‌ها مانند چربی‌ها و پروتئین‌ها و DNA صورت می‌گیرد. تولید بالای گونه‌های فعال اکسیژن منجر به پراکسید شدن چربی‌های غشای سلول‌ها شده و آسیب بعدی به‌علت تجمع MDA (یکی از محصولات پراکسیداسیون) می‌باشد (۹). همان‌طور که مشخص است پراکسیداسیون چربی‌ها به‌طور مشخص در هر دو قسمت قشر مغز و هیپوکمپ به‌عنوان یکی از نتایج حضور و تولید رادیکال‌های آزاد به‌دنبال هایپوپرفیوژن مزمن رخ می‌دهد. در این هنگام فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن در این دو ناحیه افزایش پیدا می‌کند (۹ و ۲۶). مشخص است که این افزایش جبرانی در فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در پاسخ به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود. افزایش فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن نشان می‌دهد که سیستم آنتی‌اکسیدانی مغز برای برطرف کردن نتایج حاصل از استرس اکسیداتیو فعال شده است. با این وجود به‌نظر می‌رسد افزایش گونه‌های فعال اکسیژن به‌طور کامل برای مغز حفاظت‌کننده نیست چرا که در تحقیقات انجام شده بر روی موش‌ها توسط گونه‌های فعال اکسیژن خارج سلولی نشان داده شده که این ماده اثر محافظت‌کننده‌ای در آسیب‌های مغزی ناشی از ایسکمی داشته ولی گزارشات نشان می‌دهد میزان گونه‌های فعال اکسیژن داخل سلولی یا فعالیت آن در ایسکمی مغزی پایدار نیست. فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن و غلظت آن در بافت مغزی بعد از ایسکمی و رپرفیوژن حالت افزایش-کاهش نشان می‌دهد. لذا استفاده از یک داروی آنتی‌اکسیدان ضروری به‌نظر می‌رسد. درمان طولانی مدت با عصاره زعفران ناهنجاری‌های رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد و این کار را با تعدیل نمودن تولید بالای رادیکال‌های آزاد و جبران فعالیت‌های اکسیدانی بعد از ایسکمی را در محیط آزمایشگاه

10. Tosun M, Ercisli S, Sengul M, Ozer H, Polat T, Ozturk E. Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biological Research* 2009;42:175-81.
11. Karamian R, Asadbegy M, Pakzad R. Essential oil compositions and in vitro antioxidant and antibacterial activities of the methanol extracts of two *Salvia* species (Lamiaceae) from Iran. *Intl J Agri Crop Sci* 2013;5:1171-82.
12. Motamedshariaty V, Ghaeni FA, Mohajeri S, Hossei H. Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2012;7:S823.
13. Korani MS, Farbood Y, Sarkaki A, Fathi Moghaddam H, Taghi Mansouri M. Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. *European Journal of Pharmacology* 2014;733:62-7.
14. Naghibi SM, Hosseini M, Khani F, Rahimi M, Vafae F, Rakhshandeh H, et al. Effect of aqueous extract of *Crocus sativus* L. on morphine-induced memory impairment. *Advances in Pharmacological Sciences* 2012;2012:1-7.
15. Sá CM, Ramos AA, Azevedo MF, Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Sage tea drinking improves lipid profile and antioxidant defences in humans. *International Journal of Molecular Sciences* 2009;10:3937-50.
16. Cuomo J, Rabovskiy AB. Antioxidant compositions extracted from olives and olive by-products. Google Patents;2002.
17. Cuomo J, Rabovskiy AB. Antioxidant compositions extracted from a wastewater from olive oil production. Google Patents;2002.
18. Kaur C, Kumar K, Anil D, Kapoor H. Variations in antioxidant activity in broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars. *Journal of Food Biochemistry* 2007;31:621-38.
19. Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Jaafar HZ. Evaluation of *crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules* 2010;15:6244-56.
20. Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, et al. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *gardenia jasminoides* ELLIS and *crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chemistry* 2008;109:484-92.
21. Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercisli S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak J Pharm Sci* 2009;22:102-6.
22. Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M, et al. Inhibitory activity on amyloid- β aggregation and antioxidant properties of *crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54:8762-8.
23. Asdaq SMB, Inamdar MN. Potential of *crocus sativus* (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010;162:358-72.
24. Proestos C, Chorianoopoulos N, Nychas G-J, Komaitis M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:1190-5.
25. Ghazavi A, Mosayebi G, Salehi H, Abtahi H. Effect of ethanol extract of saffron (*Crocus sativus* L.) on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57bl/6 mice. *Pak J Biol Sci* 2009;12:690-5.
26. Murakami Y, Ikenoya M, Matsumoto K, Li H, Watanabe H. Ameliorative effect of tacrine on spatial memory deficit in chronic two-vessel occluded rats is reversible and mediated by muscarinic M1 receptor stimulation. *Behavioural Brain Research* 2000;109:83-90.



Saffron Extract Diminishes Learning Deficits in Brain Hypoperfusion

Ali Bagherian (M.Sc.)¹, Motahareh Mirzaei (M.Sc.)², Hamed Mirzaei (M.Sc.)³, Majid Rahmati (M.Sc.)^{4*}

1- Dept. of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University of Damghan, Damghan, Iran.

2- Dept. of Biology, School of Basic Sciences, University of Golestan, Gorgan, Iran.

3- Dept. of Medical Biotechnology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

4- Dept. of Basic Sciences, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 14 May 2014, Accepted: 31 August 2014

Abstract:

Introduction: Current study was conducted because of a social demand to treat and prevent rising cognitive damages following oxidative stress occur due to several reasons including reduced blood supply to the brain following cerebral ischemic lesions and cardiovascular diseases.

Methods: In present study male albino rats were divided into test and control groups. In the test group saffron extract was administered daily for seven days and the other group received normal saline at the same time. Then by performing surgery, in one half of rats in each group, two common carotid arteries were ligated. The ligation reduced blood flow and made lesion in the brain. After surgery, all rats in the test group, were retaken medication for 4 days followed by assessment using behavioral morris water maze task.

Results: Test analysis showed there was a significant difference between treated and control group. Moreover, saffron extract attenuated brain hypoperfusion induced learning disorder.

Conclusion: The results of this study showed that saffron extract treatments decreased rat cognitive defects caused by reduced brain blood flow following appearance of free oxygen radicals and oxidative damage in hippocampus area.

keywords: Saffron extract, Hypoperfusion, Hypocamp, Learning, Free radical.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Rahmati, Email: rahmatima@hotmail.com

Citation: Bagherian A, Mirzaei M, Mirzaei H, Rahmati M. Saffron extract diminishes learning deficits in brain hypoperfusion. Journal of Knowledge & Health 2015;10(2):47-55.