

اثر محافظتی زعفران در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو در ایسکمی مغزی موضعی - موقتی در موش صحرائی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۵/۰۳

چکیده

عابدین وکیلی^{*۱}

محمد رضا عینعلی^۱

احمد رضا بندگی^۲

۱- گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات و بخش

فیزیولوژی

۲- گروه بیوشیمی

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

زمینه و هدف: مطالعات متعدد نشان داده‌اند زعفران اثر محافظتی در مقابل آسیب اکسیداتیو در ایسکمی گلوبال مغزی دارد، اما اثر آن بر ادم مغزی و آسیب اکسیداتیو در ایسکمی موضعی مغزی کاملاً مشخص نیست. این مطالعه با هدف بررسی اثر زعفران بر ادم مغزی، حجم ضایعات مغزی و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز و گلوتاتیون پراکسید) و غلظت مالون دی‌آلدید در بافت ایسکمیک مغز در مدل تجربی سکنه مغزی طراحی شد. **روش بررسی:** ایسکمی موضعی با مسدود کردن موقتی شریان میانی مغز برای مدت یک ساعت در موش صحرائی ایجاد شد. زعفران با دوز 100 mg/kg ip در شروع ایسکمی به صورت داخل صفاقی تزریق و ۲۴ ساعت بعد ادم و حجم آسیب مغزی اندازه‌گیری شد. غلظت مالون دی‌آلدید و میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز و گلوتاتیون پراکسید در بافت ایسکمیک مغز با استفاده از کیت مخصوص اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** زعفران حجم ضایعات مغزی را 77% ($P < 0/001$) و ادم مغزی را 60% ($P < 0/001$) در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد. همین‌طور زعفران به‌طور معنی‌داری غلظت بافتی مالون دی‌آلدید را کاهش داده ($P < 0/001$) و میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز ($P < 0/001$) و گلوتاتیون پراکسید ($P < 0/001$) در بافت ایسکمیک کورتکس مغز به‌طور معنی‌داری افزایش داد. **نتیجه‌گیری:** زعفران اثرات محافظتی در مقابل آسیب اکسیداتیو ایسکمیک و ادم مغزی در مدل ایسکمی مغزی موضعی - موقتی در موش صحرائی دارد. این اثر احتمالاً از طریق افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اعمال می‌شود.

کلمات کلیدی: زعفران، آسیب اکسیداتیو، ایسکمی مغزی موضعی، ادم مغزی، موش صحرائی.

* نویسنده مسئول: سمنان، کیلومتر ۵ جاده دامغان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات و بخش فیزیولوژی
تلفن: ۰۲۳۱-۳۳۴۱۶۱
E-mail: Abvakili@yahoo.com

مقدمه

میتوکندری‌ها و آزاد شدن محتویات آن‌ها و تسریع تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود.^۱ کاهش فعالیت و ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و افزایش رادیکال‌های آزاد منجر به وارد شدن آسیب جدی به اجزای تشکیل‌دهنده سلول نظیر لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شده و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌گردد.^۱ شواهد پژوهشی نشان می‌دهند، رادیکال‌های آزاد نقش انکارناپذیری در تشکیل، گسترش ادم و ضایعات ثانویه مغزی پس از سکنه مغزی دارند.^{۵-۷} بنابراین استفاده از مواد و یا داروهای گیاهی که خاصیت آنتی‌اکسیدان قوی داشته باشد، ممکن است بتواند مغز را در مقابل آسیب‌های ناشی از اکسیدانت‌ها در سکنه مغزی تا حدودی محافظت نموده و باعث کاهش مرگ و میر نرونی شود. زعفران با نام عمومی Saffron و نام

امروزه مشخص شده است استرس‌های اکسیداتیو نقش محوری در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراتیو و نورولوژیک نظیر، آلزایمر، پارکینسون، تروما و سکنه مغزی دارند.^{۱،۲} به‌دنبال سکنه مغزی و یا قطع جریان خون به قسمتی از مغز، غلظت اکسیژن و مواد متابولیکی به‌سرعت در نواحی ایسکمیک مغز کاهش یافته و در عرض چند دقیقه به سطوح غیر قابل تشخیص می‌رسند.^۳ کاهش اکسیژن بافتی در ناحیه ایسکمیک مغز، سبب اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود.^۴ از طرفی برقراری مجدد جریان خون بعد از وقوع سکنه مغزی سبب افزایش تولید پرواکسیدانت‌ها، آسیب

ویستار (۳۲۰-۲۸۰ گرم) استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شده و کلیه آزمایشات مطابق آیین‌نامه کمیته اخلاق پژوهشی در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان در سال ۱۳۸۹ انجام گردید.

پروتکل و طرح آزمایش: آزمایشات مرحله اول: جهت ارزیابی اثر زعفران (Sigma-Germany) بر ضایعات مغزی، ۲۱ سر موش صحرایی به سه گروه هفت‌تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند. گروه کنترل کاذب (Sham): در این گروه فقط عمل جراحی صورت گرفته ولی شریان میانی مغز بسته نمی‌شد. گروه کنترل ایسکمیک: در این گروه سالین به‌عنوان حلال دارو بلافاصله بعد از القای ایسکمیک به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه درمان: زعفران با دوز ۱۰۰ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی در شروع ایسکمیک تزریق شد. در همه این گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد ایسکمیک میزان آسیب مغزی بررسی و اندازه‌گیری می‌شد.

آزمایشات مرحله دوم: جهت ارزیابی اثر زعفران بر ادم مغزی ۲۱ سر موش صحرایی به سه گروه هفت‌تایی تقسیم می‌شدند که شامل گروه کنترل کاذب (Sham)، گروه کنترل ایسکمیک و گروه درمان با زعفران بود. این مرحله از آزمایش شبیه مرحله یک بود با این تفاوت که به‌جای ضایعات مغزی، درصد محتوای آب مغز (%water content) که شاخصی از ادم مغزی است، محاسبه و اندازه‌گیری شد.

آزمایشات مرحله سوم: جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدانتی زعفران ۲۱ سر موش صحرایی به سه گروه هفت‌تایی تقسیم شدند که شامل گروه کنترل کاذب (Sham)، گروه کنترل ایسکمیک و گروه درمان با زعفران بود. این مرحله از آزمایش شبیه مرحله یک بود با این تفاوت که غلظت بافتی مالون دی‌آلدیید (MDA) با استفاده از روش تیوباربتوریک اسید و سطح فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیس‌موتاز (SOD) و گلوکاتایون پراکسید (GPX) و در بافت ایسکمیک کورتکس مغز با استفاده از کیت مخصوص (Randox Laboratories, Crumlin, UK) اندازه‌گیری شد.

ایجاد ایسکمیک مغزی موضعی: جهت ایجاد ایسکمیک مغزی موضعی - موقتی، ابتدا موش‌های صحرایی با تزریق کلرال هیدرات (Fluka-Germany) با دوز (۴۰۰ mg/kg ip) بیهوش می‌شدند. بعد از اطمینان از عمیق بودن بیهوشی، جهت ثبت جریان خون موضعی مغز، ابتدا پوست ناحیه گیجگاهی زاویه بین چشم و گوش حیوان برش

علمی *Crocus Sativus L.* از خانواده زنبقیان (Iridaceae) گیاهی علفی، چند ساله، بدون ساقه و پیازدار است و به‌میزان زیاد در مناطقی نظیر سواحل مدیترانه، ایران، هند، تبت، چین، و غیره کشت می‌شود.^۸ زعفران علاوه بر این که یک چاشنی غذایی پرمصرف است، اثرات فارماکولوژیکی متعددی نیز دارد.^۹ پژوهش‌های جدید نشان می‌دهند، زعفران و مواد موثره آن، اثرات ضد توموری، آنتی‌اکسیدان، آنتی‌ژنوتوکسیک، تقویت‌کننده حافظه و یادگیری، ضد درد و ضد التهاب، ضد تشنج، ضد افسردگی، پایین‌آورنده فشار خون، افزایش‌دهنده اکسیژن‌رسانی بافت‌ها، گشاد کننده برونش، ضد سرفه و غیره دارد.^{۹-۱۱} علاوه بر این، یافته آزمایشگاهی جدید نشان داده است، زعفران و یا مواد موثره آن می‌تواند باعث کاهش قابل توجه آسیب‌های اکسیداتیو در بافت ایسکمیک کلیه،^{۱۲} عضله اسکلتی،^{۱۳} قلب^{۱۴} و مغز^{۱۵} می‌شود. مطالعاتی که در رابطه با اثر عصاره تام زعفران در ایسکمیک مغزی انجام شده محدود بوده و عمدتاً تاثیر ترکیبات فعال آن در ایسکمیک مغزی مورد مطالعه قرار گرفته است. یافته‌های جدید نشان می‌دهند، مواد موثره زعفران مثل سافرنال، کروسین، پیکروتوکسین و تری‌کروسین اثرات محافظتی در مقابل آسیب ناشی استرس اکسیداتیو در مدل تجربی ایسکمیک گلوبال^{۱۶} و موضعی و ایسکمیک در شرایط *In vitro*^{۱۵} دارد. تنها یک پژوهش نشان داد، تجویز خوراکی زعفران هفت روز قبل از ایجاد ایسکمیک مغزی موضعی باعث کاهش مرگ نرونی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی مغز در موش صحرایی می‌شود.^{۱۱}

با توجه به این که عصاره زعفران محتوی همه ترکیبات فعال و مواد موثر است، احتمالاً اثر محافظتی و آنتی‌اکسیدانتی آن بیشتر از کاربرد مجزای ترکیبات موثر آن در ایسکمیک مغزی خواهد بود. از طرفی تاکنون تاثیر زعفران و مواد موثر آن بر ادم مغزی مورد تحقیق و پژوهش قرار نگرفته است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر زعفران بر ادم، میزان آسیب مغزی و همین‌طور سطح فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو (آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز و گلوکاتایون پراکسید) و غلظت مالون دی‌آلدیید در بافت ایسکمیک کورتکس مغزی در مدل تجربی سکنه مغزی طراحی شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از تعداد ۶۳ سر موش‌های صحرایی نر نژاد

استفاده از نرم‌افزار NIH Image analyzer اندازه‌گیری شد. برای محاسبه حجم، سطح ضایعه مقاطع در ضخامت برش ضرب شد. حجم کل ضایعه مغزی نیز از حاصل جمع ضایعات در هفت برش مغزی به دست می‌آمد.^{۱۸}

ارزیابی ادم مغزی: حدود ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی حیوان کشته شده و مغز به دقت خارج می‌گردد. سپس پیاز بویای و پل مغزی را جدا نموده و نیم‌کره ایسکمیک و سالم مغز را با کمک Brain matrix و با دقت بسیار زیاد جدا نموده و وزن مرطوب دو نیم‌کره به وسیله ترازوی دقیق به دست می‌آید. در ادامه جهت به دست آوردن وزن خشک هر نیم‌کره آن‌ها را در داخل Oven با درجه حرارت ۱۱۰ °C برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در نهایت در صد محتوای آب مغز که شاخص میزان ادم مغزی است با فرمول زیر به دست آمد.^{۱۹}

$$\text{وزن مرطوب نیم‌کره} \times 100 \times \frac{\text{اختلاف وزن مرطوب و خشک نیم‌کره}}{\text{محتوای آب مغز}} = \%$$

اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیس موتاز و گلوتاتیون پراکسید و تعیین غلظت مالون دی آلدیدید در بافت ایسکمیک مغزی: بیست و چهار ساعت بعد از ایسکمی مغزی، حیوان تحت بیهوشی عمیق کشته و مغز خارج شده و کورتکس از بقیه قسمت‌های مغز با دقت جدا شده و در ظرف مخصوص در دمای ۷۰ °C- تا زمان انجام آزمایش نگه‌داری می‌شد. نمونه‌ها در هنگام آزمایش در بافر مخصوص هموژنیزه و در ۲۰۰۰۰ G سانتریفوژ شدند. سپس از محلول رویی (Supernatant) نمونه جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX، تعیین غلظت MDA و پروتیین استفاده شد.

فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیس موتاز و با استفاده از کیت‌های شرکت راندوکس (Randox Laboratories, Crumlin, UK) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و با کمک دستگاه فتومتر (Stat fax 3300-USA) اندازه‌گیری گردید.^{۲۰} برای تعیین غلظت پروتیین از روش برادفورد استفاده شد. ۲۰ برای این منظور دو میلی‌لیتر از محلول برادفورد به ۴۰ میکرولیتر از محلول هموژنیزه نمونه بافتی اضافه شده و به مدت پنج دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر و در برابر بلانک معرف جذب آن قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از سرم آلبومین گاوی رسم و غلظت پروتیین بافت بر اساس آن اندازه‌گیری گردید.^{۲۰} از روش تیوباریتوریک اسید برای اندازه غلظت بافتی مالون دی آلدیدید استفاده

داده و عضله گیجگاهی در محل چسبندگی به استخوان جدا نموده و سپس با کمک میکرودریل حفره‌ای کوچک در سطح استخوان گیجگاهی ایجاد شد. سپس برای ایجاد ایسکمی موضعی مغز، در زیر میکروسکوپ برشی به طول دو سانتی‌متر در جلو گردن حیوان ایجاد و عضلات این ناحیه کنار زده شده و شریان‌های کاروتید مشترک و شاخه‌های آن کاروتید خارجی و داخلی را از بافت هم‌بند و عصب جدا و ایزوله شد. شاخه‌های شریان کاروتید خارجی با استفاده از دستگاه کوتتری جهت جلوگیری از خون‌ریزی سوزاننده و مسدود شد. در ادامه شریان کاروتید خارجی و شریان کاروتید مشترک به صورت دائمی و شریان کاروتید داخلی به وسیله میکروکلایمپ به طور موقت مسدود می‌شد. سپس نخ نایلون با شماره ۳/۰ که نوک آن جلو شعله کرده شده بود را از طریق برشی کوچک که در شریان کاروتید خارجی ایجاد گردیده وارد شریان کاروتید داخلی می‌شد. بعد از این مرحله پروب جریان‌سنج لیزری در محل خود در استخوان گیجگاهی ثابت شده و جریان خون پایه مغز برای ۱۵ دقیقه ثبت می‌شد، بعد از تثبیت جریان خون، نخ نایلون داخل شریان کاروتید داخلی به آرامی به داخل مغز هدایت می‌شد تا جریان خون موضعی به کمتر از ۱۵٪ تا ۲۰٪ میزان پایه کاهش یابد.^{۱۷} یک ساعت بعد از ایسکمی نخ نایلون به آرامی خارج و جریان خون مجدد برای ۲۳ ساعت در شریان میانی مغز برقرار می‌شد. در طول یک ساعت ایسکمی و تا ۱۵ دقیقه بعد از خارج کردن نخ و برقراری مجدد جریان خون، جریان خون موضعی توسط دستگاه جریان‌سنج لیزری هر پنج دقیقه ثبت و یادداشت می‌شد.^{۱۷} در ضمن درجه حرارت حیوان از طریق رکتال کنترل و در تمام طول مدت جراحی تا به هوش آمدن کامل حیوان در محدوده فیزیولوژیک نگه داشته می‌شد.

تعیین حجم ضایعه مغزی: تحت بیهوشی عمیق حیوان کشته و سرش جدا و مغز خارج شد. برای برش‌گیری، مغز را به مدت پنج دقیقه در محلول سرم فیزیولوژی چهار درجه قرار داده، سپس به کمک Brain matrix هفت برش به قطر دو میلی‌متر از مغز تهیه می‌گردید. جهت رنگ‌آمیزی، برش‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در محلول دو درصد تری‌فنیل تترازولیوم کلراید (Sigma-Germany) قرار داده شد. در این روش رنگ‌آمیزی منطقه ضایعه دیده به رنگ سفید و منطقه نرمال مغز به رنگ قرمز آجری در می‌آید.^{۱۸} در پایان با دوربین دیجیتالی از برش‌ها عکس گرفته و به کامپیوتر منتقل و سطح ناحیه ضایعه دیده با

خلفی مغز را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه سالیین کاهش داد ($P < 0/001$)، نمودار ۳). درصد محتوای آب مغز بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در نیم‌کره‌های چپ (غیر ایسکمیک) در گروه کنترل کاذب $78/2 \pm 0/3$ ، گروه کنترل سالیین $78/4 \pm 0/3$ و در گروه زعفران $78/5 \pm 0/32$ بود که اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$)، نمودار ۳). ایجاد سکتة مغزی موضعی به‌طور معنی‌داری باعث افزایش درصد محتوای آب مغز در نیم‌کره ایسکمیک ($82/4 \pm 0/78$) و چهار درصدی ادم مغزی شد ($P < 0/001$)، نمودار ۴). تجویز زعفران با دوز 100 mg/kg در شروع ایسکمی باعث کاهش معنی‌دار درصد محتوای آب مغز ($80/1 \pm 0/43$) شده و ادم مغزی را به‌میزان 60% در مقایسه با گروه کنترل یا سالیین کاهش داد ($P < 0/001$)، نمودار ۴).

۳- تاثیر زعفران بر غلظت بافتی مالون دی‌آلدیید در کورتکس مغز: غلظت مالون دی‌آلدیید در کورتکس بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در گروه کنترل کاذب $2/2 \pm 0/38 \text{ nmol/mg Protein}$ بود، ایجاد سکتة مغزی موجب افزایش غلظت بافتی مالون دی‌آلدیید ($3/6 \pm 0/27 \text{ nmol/mg Protein}$) به‌میزان معنی‌دار گردید ($P \leq 0/001$). تجویز زعفران در شروع ایسکمی باعث کاهش معنی‌دار غلظت بافتی مالون دی‌آلدیید ($3/1 \pm 0/26 \text{ nmol/mg Protein}$) شد ($P \leq 0/001$).

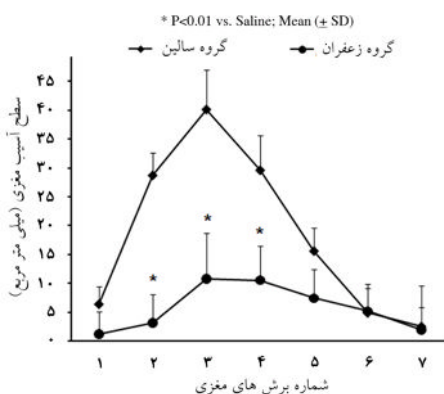
۴- تاثیر زعفران بر فعالیت بافتی آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز و گلوتاتیون پراکسید در کورتکس مغز: فعالیت بافتی آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز در کورتکس مغز، بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در گروه کنترل کاذب $22 \pm 0/33 \text{ U/mg Protein}$ بود، ایجاد سکتة مغزی باعث کاهش معنی‌داری فعالیت بافتی آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز ($15/3 \pm 0/28 \text{ U/mg Protein}$) در کورتکس شد ($P \leq 0/001$)، نمودار ۵). در حالی‌که تزریق زعفران در شروع ایسکمی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت بافتی آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز ($16/2 \pm 0/37 \text{ U/mg Protein}$) در کورتکس مغز شد ($P < 0/001$). فعالیت بافتی آنزیم گلوتاتیون پراکسید در کورتکس مغز بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در گروه کنترل کاذب $0/32 \pm 0/02 \text{ U/mg Protein}$ بود، ایجاد سکتة مغزی باعث کاهش معنی‌داری فعالیت بافتی آنزیم گلوتاتیون پراکسید ($0/26 \pm 0/02 \text{ U/mg Protein}$) در کورتکس شد ($P \leq 0/001$)، نمودار ۶). در حالی‌که تزریق زعفران در شروع ایسکمی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت بافتی آنزیم گلوتاتیون پراکسید ($0/29 \pm 0/01 \text{ U/mg Protein}$) در کورتکس مغز شد ($P < 0/001$).

شد.^{۲۱} برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدیید در بافت ایسکمیک مغز، 250 میکرولیتر از محلول رویی نمونه اولیه را با $1/5$ میلی‌لیتر اسید فسفریک 1% و نیم میلی‌لیتر محلول آبی تیوباریتوریک اسید $0/6$ درصد مخلوط کرده و به‌مدت 45 دقیقه در دستگاه بن ماری قرار داد می‌شد. پس از خنک شدن دو میلی‌لیتر محلول *n-butanol* به محلول فوق افزوده شده و به‌مدت 10 دقیقه در 3000 G سانتریفیوژ گردید. محلول رویی نمونه به یک لوله تازه منتقل گشته و جذب نوری آن در طول موج 535 نانومتر اندازه‌گیری گردید و با منحنی استاندارد که از محلول‌های استاندارد تهیه شده از 1 ، 3 ، 1 ، 3 -ترامیل پروپان به‌دست آمده بود، خوانده شد. غلظت مالون دی‌آلدیید بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتیین بیان شد.^{۲۱} نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) بیان شده است. آزمون آماری نشان داد توزیع داده در مورد درصد آب مغز و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌ها نرمال بود، بنابراین برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون پارمتریک One Way ANOVA و روش *Dennett's* به‌عنوان *Post-hoc analysis* برای آنالیز آماری استفاده گردید. با توجه به این‌که آزمون آماری نشان داد توزیع داده در مورد حجم ضایعات مغزی نرمال نبود، برای مقایسه بین دو گروه از آزمون *Mann-Whitney U-test* برای آنالیز آماری استفاده شد. در صورتی‌که $P < 0/05$ بود اختلاف بین گروه معنی‌دار تلقی می‌گردید. از نرم‌افزار *SigmaStat 3.0*, *Jandel Scientific*, *Erkrath* (Germany) برای آنالیز نتایج استفاده شد.

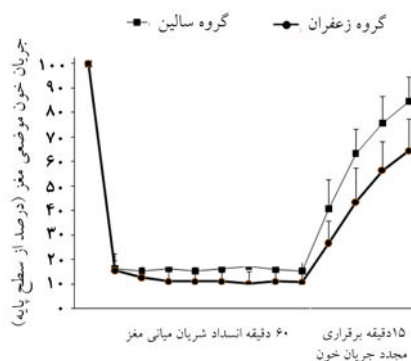
یافته‌ها

۱- جریان خون موضعی: مسدود کردن شریان میانی مغز باعث شده است تا جریان خون موضعی به کمتر از 15 درصد سطح پایه در هر دو گروه سالیین (کنترل ایسکمیک) و زعفران کاهش بیابد. اگرچه جریان خون موضعی در طول 60 دقیقه ایسکمی در گروه زعفران کمتر از گروه سالیین بوده است ولی این اختلاف بین دو گروه معنی‌دار نبود ($P > 0/05$)، نمودار ۱).

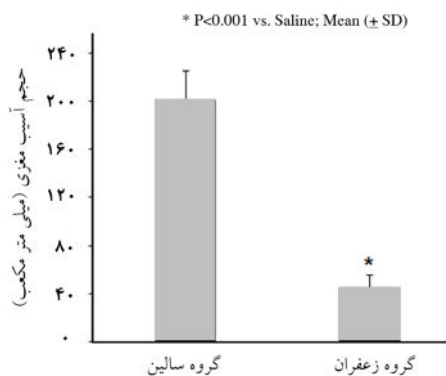
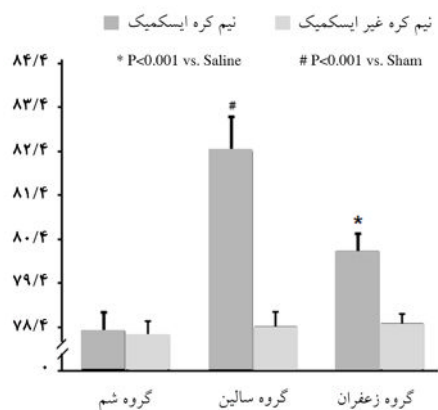
۲- تاثیر زعفران بر میزان آسیب و ادم مغزی: تجویز زعفران در شروع سکتة مغزی باعث کاهش 77 درصدی حجم آسیب مغزی (45 ± 11 میلی‌متر مکعب) در مقایسه با گروه کنترل ایسکمیک یا سالیین ($201 \pm 25 \text{ mm}^3$) شد ($P < 0/001$)، نمودار ۲). علاوه بر این زعفران سطح آسیب مغزی را از برش دو تا پنج سطح قدامی به‌سمت



نمودار-۳: سطح آسیب مغزی (mm²) در هفت برش مغزی از قسمت قدامی به بخش خلفی مغز در گروه‌های سالیین (شاهد) و زعفران بیست و چهار ساعت بعد از ایسکمی مغزی موضعی در موش صحرایی



نمودار-۱: جریان خون موضعی مغز قبل و در طول ۶۰ دقیقه انسداد شریان میانی مغز و ۱۵ دقیقه بعد از برقراری جریان خون در گروه سالیین (شاهد) و زعفران



نمودار-۲: حجم آسیب مغزی (mm³) در گروه‌های سالیین (شاهد) و زعفران بیست و چهار ساعت بعد از ایسکمی مغزی موضعی در موش صحرایی

نمودار-۴: درصد محتوای آب مغز در نیم کره ایسکمیک (راست) و نیم کره غیر ایسکمیک (چپ) در گروه‌های شم (کنترل کاذب) و سالیین (شاهد) و زعفران بیست و چهار ساعت بعد از جراحی یا ایسکمی موضعی در موش

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، زعفران آسیب ناشی از ایسکمی مغزی موضعی را به میزان زیادی در موش صحرایی کاهش می‌دهد. این یافته تا حدودی مشابه مطالعه Saleem است که نشان داد مصرف خوراکی زعفران هفت روز قبل از ایجاد ایسکمی مغزی موضعی می‌تواند از آسیب اکسیداتیو و مرگ نرونی در موش صحرایی پیش‌گیری نماید.^{۱۱} همین‌طور یافته ما تا حدودی با نتایج مطالعات دیگران هم‌خوانی دارد، که در آن نشان داده شد، زعفران اثر محافظتی در مقابل آسیب اکسیداتیو در کلیه^{۱۲} و عضله اسکلتی^{۱۳} ناشی از ایسکمی را در موش صحرایی دارد. Joukar نشان داد، مصرف خوراکی زعفران از طریق تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانتی اثر پیش‌گیری‌کنندگی در مقابل آسیب قلبی القا شده با ایزوپرتانول دارد،

این یافته نیز می‌تواند تاییدی بر نتایج تحقیق حاضر باشد.^{۱۴} به دنبال کاهش یا قطع جریان خون موضعی مغز، سلول‌های عصبی در مرکز قطع جریان سلول عصبی در همان دقایق اولیه سکنه مغزی از بین رفته و آسیب‌های اولیه را ایجاد می‌کنند. ولی سلول‌های عصبی که حاشیه مرکز قطع جریان خون (ناحیه Penumbra) قرار دارند، زنده‌اند ولی فاقد عملکرد طبیعی هستند و به تدریج ممکن است از بین رفته و آسیب ثانویه پس از سکنه مغزی را به وجود آورند.^{۲۲} سلول‌های عصبی مستقر در ناحیه Penumbra قابلیت بازبازی به وسیله داروهای

رادیکال‌های آزاد و شروع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی افزایش می‌یابد، لذا برگرداندن و یا حفظ فعالیت سطح داخل سلولی این آنزیم‌ها به‌وسیله تحریک افزایش سنتز آن ممکن است سلول‌ها را در مقابل آسیب و مرگ محافظت نماید. شواهد پژوهشی نشان می‌دهند، زعفران و مواد موثره آن سیستم آنتی‌اکسیداتی را تقویت نموده و تولید رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد.^{۱۵} نتایج پژوهش حاضر هم نشان داد، زعفران در بافت ایسکمیک کورتکس مغز پراکسیداسیون چربی‌های غشای سلول‌های عصبی را کاهش داده و همین‌طور فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل سوپراکسید دیس‌موتاز، گلوکاتایون پراکسیداز را تقویت می‌نماید. بنابراین به‌نظر می‌آید در مطالعه حاضر زعفران از طریق کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش سطح فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیداتی مرگ نرونی و ادم مغزی را در مدل تجربی ایسکمی مغزی موضعی کاهش داده باشد. همین‌طور پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند، TNF- α (فاکتور نکروزدهنده توموری - آلفا) به‌عنوان یک فاکتور پیش‌التهابی نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی ادم و آسیب مغزی پس از تروما و سکتة مغزی دارد.^{۱۷، ۱۸، ۱۹} اگرچه مطالعه‌ای وجود ندارد که نشان دهد، زعفران سنتز TNF- α در طول ایسکمی مغزی مهار می‌نماید، اما شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد، کروسین از ترکیبات موثر زعفران می‌تواند در محیط *In vitro* مرگ نرونی ناشی از TNF- α را مهار نماید.^{۲۰} بنابراین ممکن است بخشی از اثرات مفید زعفران از طریق مهار سنتز TNF- α اعمال شده باشد. مطالعات بیشتری برای روشن شدن این ادعا و گمان در سطح سلولی و مدل‌های حیوانی سکتة مغزی نیاز است. به‌طور خلاصه نتایج این مطالعه نشان داد، زعفران اثر آنتی‌اکسیداتی قوی دارد و می‌تواند از طریق کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم آنتی‌اکسیداتی سلولی مرگ نرونی و ادم مغزی را در مدل تجربی ایسکمی مغزی موضعی کاهش دهد. *سپاسگزاری:* این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی سمنان (طرح تحقیقاتی شماره ۳۱۲) انجام شد. این مقاله بخشی از پایان‌نامه آقای محمد رضا عینعلی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی است. نویسندگان مقاله از همکاری و مساعدت آقای دکتر عباسعلی وفایی استاد تمام گروه فیزیولوژی و دکتر علی رشیدی پور ریاست محترم مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان قدردانی و تشکر می‌نمایند.

نروپروتکتیو برای آن‌ها متصور است.^{۲۳} کورتکس مغز به‌دلیل وجود جریان خون جانبی زیاد بخش اصلی Penumbra به خود اختصاص می‌دهد.^{۲۳، ۲۴} در همین راستا، نتایج دیگر این مطالعه نشان داد، اثر محافظتی زعفران عمدتاً را در برش دو تا پنج مغزی که بخش اعظم کورتکس مغز و ناحیه Penumbra را تشکیل می‌دهد، مشاهده شده است. همچنین در این تحقیق برای اولین بار ما نشان دادیم، زعفران می‌تواند ادم مغزی را که یکی از علت اصلی ایجاد و گسترش آسیب ثانویه پس از سکتة مغزی است را به‌میزان قابل ملاحظه‌ای در مدل تجربی ایسکمی مغزی موضعی - موقتی کاهش دهد. اگرچه تاکنون مطالعه مشابهی در این زمینه انجام نشده است ولی برخی شواهد غیر مستقیم نشان داده‌اند کروسین از اجزای موثر زعفران اثر محافظتی در مقابل تخریب سد خونی مغزی بعد از ایسکمی مغزی گلوبال در موش سوری دارد.^{۱۶} کاهش نفوذپذیری عروق مغزی در طول ایسکمی می‌تواند شواهدی بر کاهش ادم مغزی باشد که تا حدودی می‌تواند نتایج مطالعه حاضر را تایید نماید.^{۱۷} پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند استرس‌های اکسیداتیو در پاتوژنز مرحله حاد سکتة مغزی نقش محوری دارند.^{۲۲، ۲۳} ایجاد ایسکمی مغزی موضعی - موقتی باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، نیتریک اکساید و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مثل سوپراکسید دیس‌موتاز، گلوکاتایون و کاتالاز می‌شود.^{۱۱} رادیکال‌های آزاد به‌وسیله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داخل سلولی از قبیل آنزیم‌های سوپراکسید دیس‌موتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالازها برداشته و حذف می‌شوند.^{۲۴} کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌ها در طول ایسکمی مغزی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و اکسیدان‌ها مسیرهای سیگنالینگ آسیب‌رسان مختلفی از جمله مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را فعال کرده و باعث افزایش آسیب و در نهایت مرگ سلولی می‌شود.^{۱۱، ۱۶} پژوهش قبلی گزارش کرده‌اند، مهارکننده پراکسیداسیون چربی غشا و یا از بین برنده‌های رادیکال‌های آزاد اثر محافظتی در مقابل سکتة مغزی دارند.^{۲۵، ۲۶} همین‌طور تحریک افزایش بیان آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز باعث مقاومت بیشتر در برابر ایسکمی و برعکس حذف آن باعث افزایش حجم سکتة مغزی در موش سوری می‌شود.^{۲۶، ۲۷} کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیس‌موتاز، گلوکاتایون پراکسیداز در طول ایسکمی مغزی موضعی، احتمالاً حساسیت سلول‌های عصبی را به‌عوامل آسیب‌رسان از قبیل

References

- Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21(1):2-14.
- Tarawneh R, Galvin JE. Potential future neuroprotective therapies for neurodegenerative disorders and stroke. *Clin Geriatr Med* 2010;26(1):125-47.
- Silver IA, Erecińska M. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci* 1994;14(8):5068-76.
- Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75(10-11):1149-63.
- 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.
- Fraser PA. The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med* 2011;51(5):967-77.
- Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 2005;39(1):51-70.
- Rios JL, Recio MC, Giner RM, Manez S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother Res* 1996;10:189-93.
- Kianbakht S. A systematic review on pharmacology of saffron and its active constituents. *J Med Plants* 2009;28(4):1-23. [Persian]
- Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr* 2007;157(13-14):315-9.
- Saleem S, Ahmad M, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T, Islam F. Effect of Saffron (*Crocus sativus*) on neurobehavioral and neurochemical changes in cerebral ischemia in rats. *J Med Food* 2006;9(2):246-53.
- Hossein-zadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharm Sci* 2005;8(3):387-93.
- Hossein-zadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. *Crocus sativus* L. (Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009;6(3):343-50.
- Joukar S, Najafipour H, Khaksari M, Sepehri G, Shahrokhi N, Dabiri S, Gholamhoseinian A, Hasanzadeh S. The effect of saffron consumption on biochemical and histopathological heart indices of rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Toxicol* 2010;10(1):66-71.
- Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, Shoyama Y, Toda A, Eyanagi R, Soeda S. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2007;1770(4):578-84.
- Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitritive injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Res* 2007;1138:86-94.
- Vakili A, Mojarrad S, Akhavan MM, Rashidy-Pour A. Pentoxifylline attenuates TNF- α protein levels and brain edema following temporary focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2011;1377:119-25.
- Vakili A, Zahedi khorasani M. Post-ischemic treatment of pentoxifylline reduces cortical not striatal infarct volume in transient model of focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 2007;1144:186-91.
- Vakili A, Kataoka H, Plesnila N. Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(8):1012-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978;86(1):271-8.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008;55(3):310-8.
- Segura T, Calleja S, Jordan J. Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9(7):1071-85.
- Kakita T, Suzuki M, Takeuchi H, Unno M, Matsuno S. Significance of xanthine oxidase in the production of intracellular oxygen radicals in an in-vitro hypoxia-reoxygenation model. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9(2):249-55.
- Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke* 2001;32:2712-6.
- Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 2002;33(3):809-15.
- Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Murakami K, Carlson E, Chen S, et al. Edema formation exacerbates neurological and histological outcomes after focal cerebral ischemia in CuZn-superoxide dismutase gene knockout mutant mice. *Acta Neurochir Suppl* 1997;70:62-4.
- Hosomi N, Ban CR, Naya T, Takahashi T, Guo P, Song XY, et al. Tumor necrosis factor- α neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(8):959-67.
- Sriram K, O'Callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor- α in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2007;2(2):140-53.
- Soeda S, Ochiai T, Paopong L, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin suppresses tumor necrosis factor- α -induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sci* 2001;69(24):2887-98.

The protective effects of Saffron against the oxidative damage in a transient model of focal cerebral ischemia in rats

Received: July 12, 2011 Accepted: July 25, 2011

Abstract

Abedin Vakili Ph.D.^{1*}
Mohammad Reza Eianali M.Sc.¹
Ahmad Reza Bandegi Ph.D.²

1- Department and Research Center
of Physiology, School of Medicine,
Semnan University of Medical
Sciences, Semnan, Iran.

2- Department of Biochemistry,
School of Medicine, Semnan
University of Medical Sciences,
Semnan, Iran.

Background: Numerous studies have shown the protective effects of saffron against oxidative damage in a global model of cerebral ischemia, but its effects on brain edema and oxidative ischemic injury in focal ischemic stroke are not completely understood. Therefore, this study was designed to investigate the effects of saffron on brain edema, infarct volume, antioxidant enzyme activity (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) and concentration of malondialdehyde (MDA) in ischemic brain tissue in an experimental model of stroke.

Methods: Focal brain ischemia was established with the temporary occlusion of the middle cerebral artery for one hour in rats. Saffron (100 mg/kg) was given intraperitoneally at the onset of ischemia. 24 hours later, brain edema and infarct volume were evaluated and glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities and MDA concentration were measured in the ischemic brain tissue using a specific kit.

Results: The results showed that saffron reduced infarct volume by 77% ($P<0.001$) and brain edema by 60% ($P<0.001$) compared with the control group in 24 hours following ischemia. Moreover, saffron significantly reduced the content of MDA ($P<0.001$) and increased the activity of superoxide dismutase ($P<0.001$) and glutathione peroxidase ($P<0.001$) in the cortex of the ischemic brain tissue.

Conclusion: Saffron has protective effects against oxidative ischemic damage and brain edema in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. This protective effect is probably induced by increasing the capacity of antioxidant enzymes and decreasing the production of free radicals.

Keywords: Brain edema, focal cerebral ischemia, oxidative damage, rat, saffron.

* Corresponding author: Km 5 Road
Damghan, Faculty of Medicine, Dept. and
Research Center of Physiology, Semnan,
Iran.
Tel: +98-231-3354161
E-mail: Abvakili@yahoo.com