

# اثر عصاره آبی زعفران بر کاهش حافظه ناشی از تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین در موش صحرائی نر

\*دکتر محسن خلیلی (Ph D) - دکتر زهرا کیاسالاری (Ph D) - دکتر بتول رحمتی (Ph D) - مجید اخلاصی (St)<sup>۱</sup> -

یاسر عزیزی (St)<sup>۲</sup> - حمید حیدری (St)<sup>۳</sup>

\*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه شاهد تهران، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

پست الکترونیک: najafabady@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۳/۵ تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۱۵

## چکیده

مقدمه: با توجه به شیوع و اهمیت درمان بیماری‌های دستگاه عصبی مرکزی از جمله زوال مغز مثل آلزایمر و نبودن درمان قطعی برای این بیماری و نیز توصیه طب سنتی بخصوص گیاه درمانی در درمان این‌گونه بیماری‌ها، در مطالعه اخیر به بررسی یکی از گیاهان سنتی مؤثر بر حافظه و یادگیری در درمان این بیماری پرداخته شده است.

هدف: بررسی اثر عصاره آبی زعفران بر کاهش درک حافظه و یادگیری ناشی از تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرائی نر.

مواد و روش‌ها: برای ایجاد آلزایمر از مدل تزریق استرپتوزوتوسین ( $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) طی یک عمل جراحی استریوتاکسی در روزهای اول و سوم به شکل دوطرفه در داخل بطن‌های مغز موش‌های صحرائی نر و میزان حافظه و یادگیری از طریق مدل آزمون احترازی غیرفعال و تشخیص حافظه فضایی با استفاده از مدل ماز Y شکل ارزیابی شد. ۶۰ موش نر به گروه‌های ۱- کنترل ۲- شم (دریافت کننده ACSF) ۳- کنترل ۴- درمان با زعفران ۵- STZ ۶- درمان با زعفران تقسیم شدند. گروه درمان‌شونده، از یک روز پیش از جراحی به مدت ۳ هفته عصاره زعفران را ( $30 \text{ mg}/\text{kg}$ ) به شکل داخل صفاقی دریافت کرده، سپس وارد آزمون‌های یادگیری می‌شدند. در آزمون ماز Y شکل درصد حرکت در بازوی‌های غیر تکراری به‌عنوان میزان هوش حیوان در حافظه فضایی ارزیابی می‌شد. در آزمون احترازی هم مدت تأخیر در عبور از اتاق روشن به تاریک پس از پروسه تطبیق به‌عنوان داده در نظر گرفته می‌شد. داده‌های آزمون احترازی با آزمون غیر پارامتری کروسکال-والیس بررسی و در صورت معنی‌دار بودن آزمون من-ویتنی برای مقایسه گروه‌ها استفاده می‌شد. داده‌های آزمون ماز Y شکل هم توسط آزمون ویلکاکسون ارزیابی شد.

نتایج: موش‌های استرپتوزوتوسینی درمان‌شده با عصاره زعفران نسبت به موش‌های استرپتوزوتوسینی درمان شده با حلال دارو، انتخاب‌های صحیح بیشتر و خطای کمتر در ماز Y شکل نشان دادند. به‌علاوه عصاره زعفران به‌طور معنی‌دار میزان آسیب حافظه و یادگیری در گروه استرپتوزوتوسین را در مدل آزمون احترازی غیر فعال کاهش داد.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی عصاره زعفران اثر مفیدی در جلوگیری از کاهش حافظه ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین داخل بطن مغزی ایجاد می‌کند و عامل بالقوه در درمان بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی مثل بیماری آلزایمر (AD) است.

**کلید واژه‌ها:** استرپتوزوتوسین / حافظه / زعفران / موش‌های صحرائی / یادگیری

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره هجدهم شماره ۷۲، صفحات: ۹۲-۸۴

## مقدمه

بیماری آلزایمر یک بیماری تحلیل برنده و پیش‌رونده دستگاه عصبی مرکزی است که باعث زوال قوای عقلانی می‌شود. منشأ این بیماری دقیقاً مشخص نیست ولی تغییر متعدد مثل کوچک شدن مغز، از بین رفتن سلول‌های مغزی، ایجاد پلاک‌های پیری و کلافه‌های ظریف در سلول‌های مغزی از مهم‌ترین علائم بیماری هستند (۱). تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرائی با نقص بلند مدت و پیش‌رونده در یادگیری و حافظه و فعالیت‌های فضایی در موش‌های صحرائی همراه است (۲). این مدل شبیه نوعی از بیماری آلزایمر

(Sporadic alzheimer's disease, SAD) است که کمتر و گهگاه بروز می‌کند. این نوع بیماری آلزایمر (SAD) با ضعف دائم، تخریب حافظه ناشی از تخریب نورون‌های درگیر در حافظه پیش‌رونده و اضطراب‌های رفتاری شناخته می‌شود (۳) و بیشترین عامل دمانس در بیماران مسن را شامل می‌شود (۴). دیده شده ایجاد رادیکال‌های آزاد با آسیب حافظه در تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در مدل آلزایمری در موش‌های صحرائی مرتبط است (۲ و ۵). نقش تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین در ایجاد آسیب دستگاه نوروترانسمیتر

از سوپر مارکت محلی تهیه و سپس مطابق با اصول علمی بخش گیاه‌شناسی دانشگاه شهید، تایید علمی شد و با جداسازی ناخالصی‌های احتمالی کالاه خالص خشک بدست آمد.

**حیوانات:** موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (تهران، انستیتو پاستور)، به وزن ۳۱۰ تا ۳۵۰ گرم در شروع آزمایش در ۳ تا ۴ قفسه در دمای کنترل شده اتاق تحت دوره تاریک و روشنایی قرار گرفتند. حیوانات در طی آزمایش آزادانه آب و غذا دریافت می‌کردند. همه آزمایش‌های رفتاری بین ساعت ۱۱ صبح تا ۴ بعد از ظهر انجام شد. این تحقیق مطابق با اصل چهارم نگهداری و استفاده حیوانات آزمایشگاهی (NIH) و انجمن تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شاهد انجام گرفت.

**تهیه عصاره طبیعی:** برای تهیه عصاره گیاه، ده گرم از کالاه زعفران تمیز و خرد شده را با ۵۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط کردیم. این ترکیب به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد، سپس سه بار از صافی‌هایی با درجه‌های تخلخل بزرگ به کوچک‌تر عبور داده شد. سپس، محلول فیلتره شده در حمام آب ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا آب آن کاملاً تبخیر شود. نهایتاً ۵-۶ گرم ماده خشک در ته ظرف باقی ماند که از آن برای تهیه دوز مورد نظر عصاره استفاده می‌شد. برای این منظور عصاره خشک شده در سالین با دوز ۳۰ mg/kg تهیه شد (۱۳ و ۱۴).

**روش آزمایش:** ۶۰ موش به صورت تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل

۲- گروه sham (SH + CSF) که حلال استرپتوزوتوسین را به صورت دوطرفه (۱۰ میلی‌لیتر در هر طرف مغز) با تزریق داخل بطن مغزی دریافت کرد

۳- گروه کنترل تحت درمان با عصاره زعفران (Con + CSE)

۴- گروه استرپتوزوتوسینی (STZ) که استرپتوزوتوسین را به صورت تزریق داخل بطن مغزی دریافت کرد

۵- گروه استرپتوزوتوسین تحت درمان با عصاره زعفران

کولی‌نرژمی کاملاً شناخته شده است (۶). به این ترتیب فعلاً با توجه به نداشتن علاج قطعی برای بیماری مذکور و اهمیت افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش عملکرد دستگاه کولی‌نرژمی در این بیماری، شاید کاربرد ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان و تقویت‌کننده دستگاه کولی‌نرژمی در بهبود بیماری کارآمد باشد.

زعفران یکی از گیاهان زراعی در قسمت‌های مهم جهان مثل ایران، چین، اسپانیا، ایتالیا و یونان است. در آنالیزهای شیمیایی این گیاه وجود کارتنوئیدهای محلول در آب، مونوترپن آلدئید، گلوکوزیدهای سافرانال، پیکروکروسین، فلاونوئیدهای کورستین و کامپفرول نشان داده شده است (۷). قسمت مادگی زعفران در طب سنتی به عنوان داروی ضد اسپاسم، سم‌زدای عصبی و انوپیتیک بکار رفته است. همچنین، عصاره خام و تصفیه شده آن در جلوگیری از تشکیل تومور (۹ و ۸)، اترواسکلروز (۱۰) و آسیب کبد نقش بسزایی دارد (۱۱). گزارش‌های موجود نقش زعفران و ترکیب‌های آن را در تقویت حافظه و یادگیری نشان می‌دهد. مثلاً مشخص شده استفاده از عصاره‌های زعفران یا کروسین می‌تواند آسیب حافظه ناشی از اتانول را در مدل آزمون احترازی غیر فعال در موش کاهش دهد (۱۲ و ۱۳). همچنین، اخیراً ثابت شده که عصاره زعفران قادر است صدمه حافظه شناختی را بی‌اثر کرده و تأثیر آسیب ناشی از اسکوپالامین را در مدل احترازی غیر فعال در موش صحرایی آنتاگونیزه کند (۱۴). به این ترتیب و با توجه به اهمیت طب سنتی بخصوص گیاه درمانی، وجود ترکیب‌های غنی آنتی‌اکسیدان در گیاه زعفران و همچنین وجود گزارش متعدد از تأثیر مفید این گیاه در روند یادگیری و حافظه، این مطالعه به بررسی عصاره زعفران بر بیماری آلزایمر با مدل تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین پرداخته است.

## مواد و روش‌ها

استرپتوزوتوسین از شرکت شیمیایی سیگما و تامین (۱۰٪) و زیلازین (۲٪) از شرکت آلفاسان هلند و مواد شیمیایی برای تهیه ACSF از شرکت مرک آلمان تهیه شد. زعفران

خودبخودی، که به عنوان معیاری برای اندازه‌گیری حافظه فضایی تلقی می‌گردد، به شکل ورود به هر ۳ بازو به صورت انتخاب‌های متوالی در سری‌های ۳ تایی مشخص می‌شد (مثلاً: ACB, ABA, CAC, BCA, CAC) (۱۷). درصد رفتار تناوبی خودبخودی به صورت نسبت تناوب‌های واقعی به تناوبهای ممکن اندازه‌گیری شد.

تناوب واقعی (مثلاً: ACB, BCA=6)

درصد تناوب =  $\frac{6}{100} \times 100$

ماکزیمم تناوب (مثلاً: ACBACACBCACAC=15-2=13)

$\frac{6}{13} \times 100 = 46.15\%$

هر آزمون برای هر حیوان فقط یک بار انجام شد.

**آزمون احترازی غیرفعال:** دستگاه از یک اتاقک روشن تشکیل شده توسط دربی گیوتینی به یک اتاقک تاریک متصل می‌شود. شوک‌های الکتریکی با یک محرک به میله‌های کف اتاقک منتقل می‌شود. در روزهای اول و دوم آزمایش، موش‌ها بمدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار داده می‌شدند تا به دستگاه عادت کنند و در روز سوم یک آزمایش اکتسابی انجام می‌شد. موش‌ها به صورت انفرادی در اتاقک روشن قرار می‌گرفتند. پس از ۲ دقیقه و عادت کردن آنها به محیط، درب گیوتینی باز شده و پس از ورود موش به اتاقک تاریک، در بسته شده و یک شوک الکتریکی به دست و پای حیوان وارد می‌شد (۱ میلی‌آمپر، ۱ ثانیه). در اینجا تاخیر اولیه (Initial latency, IL) ورود به اتاقک تاریک ثبت شده و موش‌های با تاخیر اولیه بیش از ۶۰ ثانیه از مطالعه خارج می‌شدند. یک روز بعد (روز چهارم)، موش‌های آزمون شده و دارای ثبت زمان تاخیر اولیه، دومرتبه در اتاقک روشن قرار داده می‌شدند. فاصله زمانی بین قرارگیری در اتاقک روشن و ورود به اتاقک تاریک را، زمان تاخیر حین عبور (Step through latency, STL) می‌نامند. پارامترهای زمانی IL و STL به ترتیب میزان اکتساب (Acquisition) و یادآوری (Retention) اطلاعات را می‌سنجند. لازم به یادآوری است آزمون‌های حافظه و یادگیری سه هفته بعد از عمل جراحی استریوتاکسی

(STZ + CSE) که میزان ۳۰ mg/kg عصاره زعفران را به مدت ۲۰ روز دریافت کردند

برای جراحی، موش‌ها با مخلوطی از کتامین ۱۰۰ mg/kg (داخل صفاقی) و زایلازین ۵ mg/kg (داخل صفاقی) بیهوش شده (۱۵) و داخل دستگاه استریوتکس قرار گرفتند (میله نگهدارنده دندان پیش ۳/۳ mm و میله نگهدارنده گوش به شکل متقارن قرار گرفت). پوست سر با محلول یددار پاک شد، مجموعه مطابق با اطلس استریوتکس با مته در ۸mm، عقب برگما، ۱/۴mm از کنار شکاف ساژیتال و ۳/۴ میلی‌متر در عمق سوراخ شد (۱۶). هر دو گروه استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین تحت درمان با عصاره زعفران، استرپتوزوتوسین را به صورت تزریق دوطرفه داخل بطن مغز دریافت کردند (۳mg/kg). استرپتوزوتوسین به شکل تازه در CSF مصنوعی سرد حل شده و با حجم ۱۰ میکرولیتر در هر طرف تزریق می‌شد. تزریق در روز سوم هم تکرار شد. در گروه شم، فقط ACSF ساخته شده (120mM NaCl; 3 mM KCl; 1.15 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>; 27 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; PH= 7.2) به صورت داخل بطن مغزی تزریق شد. پس از عمل، مراقبت‌های ویژه انجام شد تا تغذیه حیوان به صورت خود به خودی برگردد.

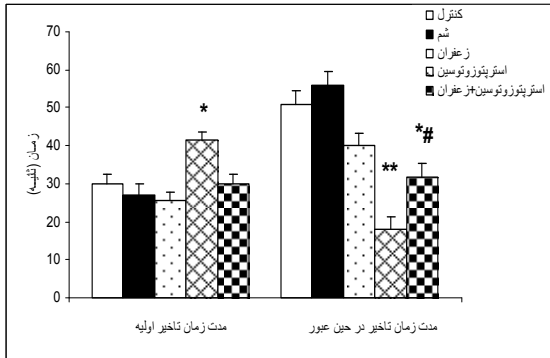
### آزمون‌های رفتاری

#### حافظه فضایی ماز Y شکل:

دستگاه آزمایش ماز Y شکل از ماز سیاه رنگ متشکل از پلکسی گلاس ساخته شده است. هر بازو ماز Y شکل، ۴۰cm طول، ۳۰cm ارتفاع و ۱۵cm پهنا دارد (۱۷ و ۱۵) و به صورت زاویه دار به شکل متساوی‌الاضلاع قرار می‌گیرد (که با حروف A, B, C نشانه‌گذاری می‌شود) و طول‌ترین محور آن ۱۵cm است. هر موش در انتهای یکی از بازوها قرار گرفته و اجازه داده می‌شد تا به مدت ۸ دقیقه آزادانه در طول ماز حرکت کند. ورود موش به هر یک از بازوها به صورت دستی ثبت می‌شد (مثلاً: ACBACACBCACAC, ...). یک رفتار تناوبی

انجام می‌شد.

عبور تأخیری (STL) معکوسی نشان داد که نشان‌دهنده اکتساب یا نگهداری بهتر حافظه در گروه درمان است (شکل ۱).



شکل ۱: اثر درمان عصاره زعفران (۳۰ mg/kg) روی آزمون احترازی غیر فعال پس از تزریق استرپتوزوتوسین به شکل داخل بطن مغزی در موش صحرایی با مدت زمان تأخیر اولیه (IL) و تأخیر حین عبور (STL) که پس از ۳ هفته اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از میانگین بیان شده است.

\* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (در مقایسه با گروه کنترل)؛ #  $p < 0.05$  (استرپتوزوتوسین + زعفران و استرپتوزوتوسین)

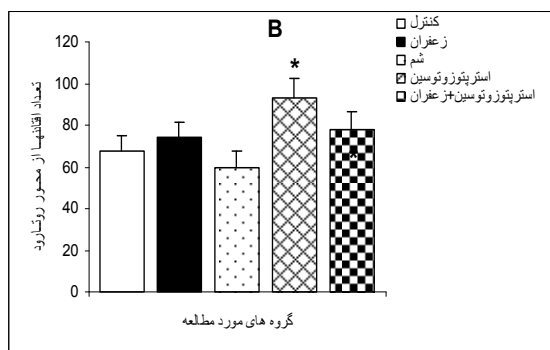
اثر عصاره زعفران روی کاهش حافظه فضایی در آزمون ماز Y شکل: همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده میانگین خط‌های رفتار تناوبی برای گروه کنترل، شم، عصاره زعفران، استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین + زعفران، به ترتیب ۶۹/۹، ۸۹/۹، ۵۹/۹، ۳۲/۲ و ۵۱/۶ درصد است. البته میانگین خطوط تناوبی بین تمام گروه‌ها تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد ( $p < 0.001$ ) و این پارامتر در گروه زعفران افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.005$ ). البته مقایسه خطوط تناوبی در گروه استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین + زعفران نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری در میزان بروز درصد رفتار تناوبی نشان دارد هر چند که عصاره توانسته است در گروه استرپتوزوتوسین + زعفران تغییر معنی‌داری در تخریب ایجاد شده در حافظه بوسیله استرپتوزوتوسین ایجاد کند.

اندکس تطابق روانی - حرکتی (PMC): پس از آزمون ماز Y شکل، این آزمایش توسط دستگاه تردمیل (Treadmill) روتارود همراه با دستگاه تحریک‌کننده انجام شد. ابتدا موش‌ها روی میله چرخان قرار می‌گرفتند تا راه رفتن را بر روی آن تمرین کنند. سپس به مدت ۵ دقیقه در جعبه‌ای با مشخصات زیر قرار گرفتند: سرعت اولیه = 4rpm، سرعت نهایی = 30 rpm، مدت زمان سرعت اولیه تا نهایی = ۴ دقیقه، شدت شوک = ۱/۱ میلی‌آمپر، مدت زمان شوک = ۲-۸٪. ثانیه، مدت زمان آزمایش = ۵ دقیقه، فاصله بین آزمایش‌ها = ۲ دقیقه. میانگین زمان ایستادن روی میله به عنوان اندکس PMC ارزیابی می‌شود (۱۷). میانگین تعداد افتادن هر حیوان نیز ثبت می‌شود. در این آزمون هر حیوان فقط یک بار آزمایش شد.

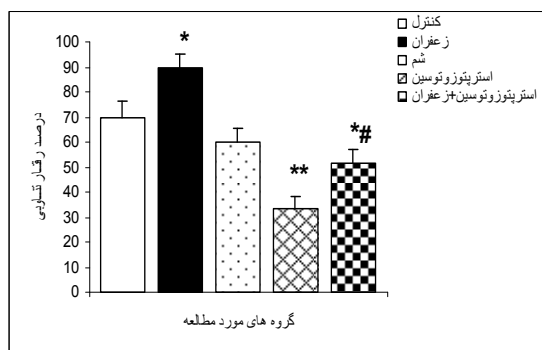
آنالیز آماری: تمام نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از میانگین نشان داده شده است. برای آزمون احترازی غیرفعال از آزمون غیرپارامتری کروسکال-والیس استفاده شد و در صورت معنی‌دار بودن از آزمون من-ویتنی برای مقایسه انجام شد. داده‌های آزمون ماز Y شکل توسط آزمون ویلکاکسون ارزیابی و در پایان  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

اثر عصاره زعفران بر جلوگیری از آسیب حافظه در آزمون احترازی غیرفعال: تأخیر اولیه (IL) در گروه کنترل، شم، عصاره زعفران، استرپتوزوتوسین، استرپتوزوتوسین + زعفران به ترتیب ۲۹/۹، ۲۷/۱، ۲۵/۴، ۴۱/۵ و ۲۹/۹ بدست آمد. میانگین تأخیر اولیه در گروه استرپتوزوتوسین، متفاوت از گروه کنترل بود ( $p < 0.05$ ). مدت زمان عبور تأخیری (STL) در گروه‌های استرپتوزوتوسین (۱۷/۹۸) و زعفران + استرپتوزوتوسین (۳۱/۹) به طور آشکار نسبت به گروه کنترل (۵۰/۹) کاهش یافته بود. به بیان دیگر گروه استرپتوزوتوسین + زعفران در مقایسه با گروه استرپتوزوتوسین تحت درمان با حلال دارو، مدت زمان



شکل ۳: A. تطابق روانی- حرکتی توسط دستگاه روتارود (میانگین  $\pm$  انحراف معیار از میانگین) B. تعداد افتادن حیوان از میله چرخان روتارود (میانگین  $\pm$  انحراف معیار از میانگین) در مقایسه با گروه کنترل \* $p < 0.001$

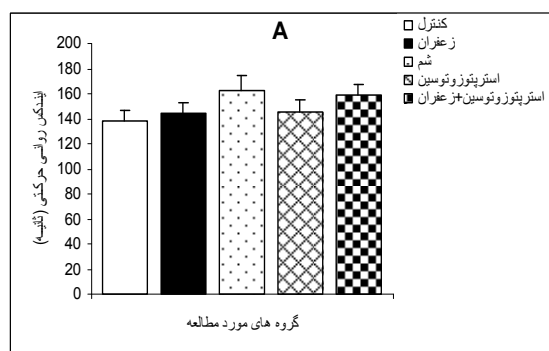


شکل ۲: درصد رفتار تنابویی در آزمون مآز Y شکل، ۳ هفته پس از درمان ( میانگین  $\pm$  انحراف معیار از میانگین). \* و #  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل و گروه استرپتوزوتوسین

### اندکس (PMC) تطابق روانی- حرکتی

وضعیت یا تعادل حرکتی- روانی حیوانات می تواند در نحوه حرکت آنها در جعبه شاتل یا مآز Y مورد آزمایش مؤثر باشد. لذا برای نشان دادن اینکه تغییر الگوی حرکت حیوان در دو وسیله ارزیابی کننده رفتاری حافظه ناشی از تغییر فیزیولوژی در حیوان بوده نه تغییر ناشی از حرکت و نداشتن تعادل، آزمون تطابق روانی- حرکتی انجام شد. شکل ۳ نتایج آزمون تطابق روانی- حرکتی را توسط دستگاه روتارود نشان می دهد. این پارامتر تفاوت معنی داری را در بین گروه ها نشان نمی دهد (A).

میانگین اندکس های PMC در تمام ۵ زمان آزمایش برای گروه های کنترل، شم، زعفران، استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین + زعفران به ترتیب  $138 \pm 8/78$ ،  $163 \pm 11/21$ ،  $145 \pm 9/56$ ،  $144 \pm 9/25$  و  $159 \pm 7/82$  بدست آمد. همچنین، تعداد افتادن حیوان (شکل B) در گروه استرپتوزوتوسین ( $93 \pm 9/81$ ) به طور معنی دار بیش از گروه کنترل بود ( $68 \pm 6/75$ ).



### بحث و نتیجه گیری

تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین در مدل احترازی غیرفعال در موش های صحرایی کاهش معنی داری در حافظه و یادگیری نشان داد و نقص حافظه فضایی در مدل مآز Y شکل ایجاد کرد و درمان موش های صحرایی با عصاره زعفران ( $30 \text{ mg/kg}$ ) به مدت سه هفته می تواند این وضع غیر طبیعی را کاهش معنی دار دهد.

در حقیقت تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین با اختلال پیش رونده در حافظه و یادگیری، گلوکز مغزی و متابولیسم انرژی مشخص می شود. این روش، الگوی آزمایشی مناسبی برای بیماری آلزایمر است (۴ و ۱۸). در این تحقیق که استرپتوزوتوسین با دوز  $3 \text{ mg/kg}$  بکار رفت، نشان داده شد که این دوز تغییری در میزان گلوکز خون محیطی ایجاد نمی کند ولی نقص معنی داری در حافظه همه حیوانات ایجاد می کند (۴). در این تحقیق احتمال افزایش فشار CSF در تزریق داخل بطن مغزی وجود نداشت زیرا تغییر رفتاری به دنبال افزایش فشار داخل مغزی یا برآمدگی چشم ها بروز نکرد. نتایج آزمون احترازی غیرفعال نشان داد که عبور تأخیری (STL) موش های صحرایی استرپتوزوتوسینی به طور معنی دار کاهش یافت که به نظر می رسد نشانگر آسیب پروسه های حافظه و یادگیری باشد. نتایج آزمون احترازی غیرفعال هم نشان داد که در موش های استرپتوزوتوسینی میزان خطای بیشتر و انتخاب

صحیح کمتری وجود دارد که نشانگر حالتی غیرطبیعی در پروسه‌های حافظه فضایی است. بر اساس نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که نقص در رفتار احترازی غیرفعال، منعکس‌کننده اکتساب یا حفظ حافظه ضعیف‌تر پس از تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین باشد. نتایج آزمون احترازی غیرفعال در موش‌های استرپتوزوتوسینی نیز نشانگر نقص در حافظه فضایی است.

در این مطالعه درمان موش‌های صحرایی استرپتوزوتوسینی با عصاره زعفران (30 mg/kg) از یک روز قبل از جراحی به مدت سه هفته، بهبود معنی‌داری در حافظه، یادگیری و مهارت‌های حافظه فضایی ایجاد کرد. اثر مفید عصاره زعفران در این تحقیق می‌تواند به این مکانیسم‌ها نسبت داده شود: اول، مشخص شده است که آسیب مغزی ناشی از فشار اکسیداسیون موجب نقص در توانایی‌های حافظه، یادگیری و افزایش اختلال در فعالیت‌های حافظه فضایی می‌شود که با ماز آبی و الگوهای RAM بررسی شد (۱۹).

بنابراین، خواص عصاره زعفران به‌عنوان محافظ عصبی (۲۰)، آنتی‌اکسیدان (۲۱) و پاک‌کننده رادیکال آزاد (۲۲) می‌تواند نقش آنتاگونیست‌کنندگی زعفران در کاهش فعالیت شناختی حافظه‌ای را توجیه کند. دوم این‌که بیماری آلزایمر توسط میزان نوروترانسمیترهای مختلف، گیرنده‌ها و مارکرهای مربوطه مشخص می‌شود. جدا از این به‌شدت تحت تاثیر دستگاه کولی‌نرژیک است (۲۳). دستگاه کولی‌نرژیک مسئول ذخیره و بازیابی موضوع‌ها در حافظه است و کاهش آن با افزایش آسیب حافظه مرتبط است، بنابراین، به نظر می‌رسد که افزایش سطح استیل‌کولین در بهبود علائم نقص حافظه در آلزایمر مفید باشد (۲۴).

گزارش‌ها مبنی بر تأثیر آنتاگونیست‌کننده زعفران بر کاهش آثار نقص حافظه ناشی از اسکوپالامی به صورت مستقیم یا غیرمستقیم، فرضیه فعالیت کولی‌نرژیک عصاره زعفران را تقویت می‌کند. سوم، گزارش‌هایی قوی در تأیید این واقعیت وجود دارد که پروسه‌های التهابی با شناخت فیزیولوژی بیماری آلزایمر مرتبط و درمان با NSAIDs و ترکیب‌های فنلی طبیعی می‌تواند خطر بروز بیماری آلزایمر

را کاهش دهد (۲۵ و ۲۶). به‌علاوه اخیراً نشان داده شده که استرپتوزوتوسین داخل بطن مغزی در موش‌های صحرایی توانسته بیان بتا‌آمیلوئید را در مغز حیوان افزایش دهد که خود ممکن است بتواند پروسه‌های التهابی در دستگاه عصبی مرکزی را تقویت کند (۲۷) تأثیر رادیکال‌های آزاد به‌عنوان واسطه مسمومیت عصبی ناشی از پروتئین بتا‌آمیلوئید فرضیه مهمی در ایجاد بیماری آلزایمر شناخته شده است. طبق گزارش‌های موجود، بتا‌آمیلوئید تولید رادیکال آزاد و اکسیداسیون لیپیدها را در سلول‌های عصبی PC12 افزایش داده، منجر به مرگ سلول می‌شود و درمان با عصاره زعفران مانع واکنش‌های اکسیداسیون ناشی از بتا‌آمیلوئید می‌شود (۲۸). چهارم، شواهد ناچیزی مبنی بر وجود دیگر آثار رفتاری عصاره زعفران (مهم‌ترین ترکیب آن کروسین) وجود دارد. در مورد مکانیسم واکنش‌های کروسین روی حافظه هنوز بررسی می‌شود. از مکانیسم‌ها، پیشرفت LTP هیپوکامپ، نوعی فعالیت وابسته به تغییر شکل سیناپسی است که احتمالاً متأثر از حافظه و یادگیری است (۲۹). در نهایت آزمایش‌های ما نشان داد که هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در تعداد کلی ورود حیوانات به بازوها و اندکس روانی - حرکتی بین موش‌های گروه تزریق استرپتوزوتوسین داخل بطن مغزی (شم) و گروه استرپتوزوتوسین درمان شده با عصاره زعفران وجود ندارد. این داده‌ها تأییدی بر این نکته است که بهبود وضعیت حافظه و یادگیری به‌دنبال تزریق استرپتوزوتوسین با مصرف عصاره گیاه زعفران نتیجه مکانیسم‌های مرکزی حافظه شناختی است و با الگوی روانی - حرکتی حیوانات ارتباطی ندارد.

سرانجام تحقیق ما نشان داد که درمان با عصاره زعفران توانسته به‌طور معنی‌دار مانع آسیب حافظه ایجاد شده ناشی از تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین شود. این نتیجه نشان‌دهنده توانایی احتمالی عصاره زعفران در جلوگیری از فراموشی پیری و اختلال تخریب عصبی وابسته به سن و اختلال شناختی است. به هر حال برای بررسی دیگر آثار رفتاری تجویز عصاره زعفران و مکانیسم‌های احتمالی آن،

خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد به خاطر تهیه عصاره آبی زعفران تشکر می‌نماید.

بررسی کلینیک و استفاده از الگوهای واقعی اختلال حافظه (مثلاً موش‌های صحرایی پیر) لازم است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله نویسندگان مقاله از زحمات

## منابع

1. Haroutunian V, Hoffman LB, Beeri MS. Is There A Neuropathology Difference Between Mild Cognitive Impairment And Dementia. *Dialogues Clin Neurosci.* (2009) 11: 171-9.
2. Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Effect Of Centella Asiatica On Cognition And Oxidative Stress In An Intracerebroventricular Streptozotocin Model Of Alzheimer's Disease In Rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:336-342.
3. Standridge JB: Pharmacotherapeutic Approaches To The Prevention Of Alzheimer's Disease. *Am J Geriatr Pharmacother* 2004; 2:119-132.
4. Grunblatt E, Hoyer S, Riederer P: Gene Expression Profile In Streptozotocin Rat Model For Sporadic Alzheimer's Disease. *J Neural Transm* 2004; 111:367-386.
5. Sharma M, Gupta YK: Chronic Treatment With Trans Resveratrol Prevents Intracerebroventricular Streptozotocin Induced Cognitive Impairment And Oxidative Stress In Rats. *Life Sci.* (2002) 71:2489-2498.
6. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P: Effect Of Donepezil And Lercanidipine On Memory Impairment Induced By Intracerebroventricular Streptozotocin In Rats. *Life Sci* 2005; 77:1-14.
7. Tarantilis PA, Tsoupras G, Polissiou M. Determination Of Saffron (*Crocus Sativus L.*) Components In Crude Plant Extract Using High-Performance Liquid Chromatography-UV/Visible Photodiode-Array Detection-Mass Spectrometry. *J Chromatogr* 1995; 699:107-118.
8. Nair SC, Panikkar B, Panikkar KR. Antitumor Activity Of Saffron. *Cancer Lett* 1991; 57:109-114.
9. Tarantilis PA, Morjani H, Manfait M, Polissiou M. Inhibition Of Growth And Induction Of Differentiation Of Promyelocytic Leukemia (HL-60) By Carotenoids From *Crocus Sativus L.* *Anticancer Res* 1994; 14:1913-1918.
10. Gainer JL, Jones JR. The Use Of Crocetin In Experimental Atherosclerosis. *Experientia* 1975; 31: 548-549.
11. Wang CJ, Shiow SJ, Lin JK. Effects Of Crocetin On The Hepatotoxicity And Hepatic DNA Binding Of Aflatoxin B1 In Rats. *Carcinogenesis* 1991; 12:459-462.
12. Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Nishiyama N. Crocin Improves The Ethanol-Induced Impairment Of Learning Behaviors Of Mice In Passive Avoidance Tasks. *Proc Jpn Acad* 1995; 71:319-324.
13. Zhang Y, Shoyama Y, Sugiura M, Saito H. Effects Of *Crocus Sativus L.* On The Ethanol-Induced Impairment Of Passive Avoidance Performance In Mice. *Biol Pharm Bull* 1994; 17:217-221.
14. Pitsikas N, Sakellaris N. *Crocus Sativus L.* Extracts Antagonize Memory Impairments In Different Behavioural Tasks In The Rat. *Behav Brain Res* 2006; 173:111-115.
15. Roghani, M., Joghataie, M.T., Jalali, M.R. And Baluchnejadmojarad T. Time Course Of Changes In Passive Avoidance And Y-Maze Performance In Male Diabetic Rats. *Iran.Biomed. J* 2006; 2: 99-104.
16. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates.* 2nd ed. Sandiego; Academic Press, 1986.
17. Monique V, Willy M, Muriel D, Colette C, Jacques Y, Muriel K, Michel LM, Etienne-Emile B, Paul R, Herve S. Neurosteroids Deficient Cognitive Performance In Aged Rats Depends On Low Pregnenolone Sulfate Levels In The Hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1997; 94: 14865-14870.
18. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular Administration Of Streptozotocin Causes Long-Term Diminutions In Learning And Memory Abilities And In Cerebral Energy Metabolism In Adult Rats. *Behav Neurosci* 1998; 112:1199-1208.
19. Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S: Cognitive Impairment Of Rats Caused By Oxidative Stress And Aging, And Its Prevention By Vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 959:275-284.
20. 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; 9:246-53.
21. Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M,

- Lamari FN. Inhibitory Activity On Amyloid-Beta Aggregation And Antioxidant Properties Of Crocus Sativus Stigmas Extract And Its Crocin Constituents. *J Agric Food Chem* 2006; 15:8762-8.
22. Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical Scavenging Activity Of Crocus Sativus L. Extract And Its Bioactive Constituents. *Phytother Res* 2005; 19:997-1000.
23. Carr DB, Goate A, Morris JC. Current Concepts In The Pathogenesis Of Alzheimer's Disease. *Am J Med* 1997; 103:3-10.
24. Gasparin L, Rasshi M, Binetti G, Trabucchi M, Solerte SB, Alkon D, Etcheberrigary R, Gibson G, Blass J, Paletti R, Govoin S. Peripheral Markers In Testing Pathophysiological Hypothesis And Diagnosing. *Alzheimer's Disease* 1998) 12:17-34.
25. Tariot PN, Federoff HJ: Current Treatment For Alzheimer Disease And Future Prospects. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2003; 17:105-113.
26. Jiang F, Dusting G. Natural Phenolic Compounds As Cardiovascular Therapeutics: Potential Role Of Their Anti-Inflammatory Effects. *Curr Vasc Pharm* 2003; 1:135-56.
27. Chu WZ, Qian CY. Expressions Of Abeta1-40, Abeta1-42, Tau202, Tau396 And Tau404 After Intracerebroventricular Injection Of Streptozotocin In Rats. *Di Yi Jun* 2005; 25:168-170.
28. Heo HJ, Kim DO, Shin SC, Kim MJ, Kim BG, Shin DH. Effect Of Antioxidant Flavanone, Naringenin, From Citrus Junoson Neuroprotection. *J Agric Food Chem* 2004; 52:1520-5.
29. Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Abe K. Crocin (Crocetin Digentiobiose Ester) Prevents The Inhibitory Effect Of Ethanol On Long-Term Potentiation In The Dentate Gyrus In Vivo. *J Pharmacol Exp* 1994; 271:703-707.



## The Effect of Aqueous Crocus Sativus L. Extract on Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Cognitive Deficits in Male Rat

\*Khalili M.(Ph D)<sup>1</sup>- Kiasalari Z.(Ph D)<sup>1</sup>- Rahmati B.(Ph D)<sup>1</sup>- Ekhlesi M.(St)<sup>2</sup>- Azizi Y.(St)<sup>2</sup>- Heydari H.(St)<sup>2</sup>

\*Corresponding Address: Nerves Research Center and Herbal Drug Research Center, Shahed University, Tehran, IRAN

E-mail: najafabady@yahoo.com

Received: 26/May/2009 Accepted: 7/Oct/2009

### Abstract

**Introduction:** Alzheimer as a prevalent central nervous system disease has no definitive treatment yet. So, regarding to herbal medicine recommendation, an important candidate herb, Crocus sativus L. extract (CSE) was investigated on ICV STZ-induced learning, memory, and cognitive impairment in male rats.

**Objective:** The Effect of aqueous crocus sativus L. extract on intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in male rat.

**Materials and Methods:** We use STZ injection as a model for Alzheimer's disease. For this purpose due to an animal stereotaxic surgery, the rats were injected with STZ-icv bilaterally, on 1st and 3<sup>rd</sup> days (3 mg/kg). The learning and memory performance was assessed using passive avoidance paradigm, and for spatial cognition evaluation, Y maze task was used. Sixty male rats were divided to following groups: 1- Control, 2- Sham (which received only ACSF), 3-Control + CSE, 4-STZ, 5-STZ+CSE. The STZ-injected rats received CSE (30 mg/kg; i.p.). These rats were treatment one day before surgery for three weeks and then were subjected to learning and memory tests. In Y maze test the non repetitive percentage of arm entrance were considered as alternation behavior (intelligence quotient). Data in Passive avoidance task was the latent period (s) for passing from light to dark room due to adaptation periods. However, for the passive avoidance test nonparametric Kruskal-Wallis test was used, which if significant, was followed by Mann-Whitney U-test for pair-wise comparisons. Data for the Y maze task were evaluated by Wilcoxon's rank sum test

**Results:** It was found that CSE-treated STZ-injected rats showed higher correct choices and lower errors in Y maze than vehicle-treated STZ-injected rats. In addition, CSE administration significantly attenuated learning and memory impairment in treated STZ-injected group in passive avoidance test.

**Conclusion:** These results demonstrated the effectiveness of CSE in preventing the cognitive deficits caused by STZ-icv in rats and its potential in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.

**Key words:** Crocus/ Learning/ Memory/ Rats/ Streptozotocin

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 72, Pages: 85-93

1. Nerve Research Center and Herbal Drug Research center, Faculty of Medicine, Shahed University,

Tehran, IRAN

2. Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, IRAN