

اثرات عصاره متانولی زرین گیاه در پیشگیری از آسیب‌های حاصل از ایسکمی مغزی در موش بزرگ آزمایشگاهی

سپیده خاکسار^{۱*}، عذرا صبورا^۱، زهرا جهانبخشی^۱، سمیرا وحیدی^۲ و زهرا چکیده خون^۱

^۱ ایران، تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی و فناوری‌های نوین، گروه علوم جانوری



تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۱

چکیده

سکته مغزی به عنوان مهمترین عامل ناتوانی جسمی در جهان، هزینه‌های مالی و روانی بسیاری به بیمار، خانواده و جامعه تحمیل می‌کند. اخیراً توجه بسیاری از محققان به استفاده از ترکیبات موثرتر و با عوارض کمتر مانند گیاهان دارویی جلب شده است. زرین گیاه به واسطه داشتن خواص نوروپروتکتیو می‌تواند کاندید مناسبی برای مطالعه حاضر باشد. ۳۵ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر Wistar به پنج گروه اصلی کنترل، دریافت‌کننده عصاره متانولی زرین گیاه، شم، ایسکمی و ایسکمی + دریافت‌کننده عصاره تقسیم بندی شدند. فاکتورهای بیوشیمیایی در سرم خون در گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده عصاره سنجیده شدند. در گروه ایسکمی، بدون دریافت هیچ تیماری تحت عمل جراحی القاء ایسکمی مغزی قرار گرفتند. موش‌های گروه ایسکمی + عصاره، عصاره را به صورت پیش‌درمان با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت پنج روز دریافت کردند. سپس جراحی ایسکمی مغزی بر روی آنها انجام شد. در نهایت در گروه‌های تحت عمل جراحی ایسکمی، ارزیابی تست‌های رفتاری، حجم انفارکتوس و ادم مغزی صورت گرفت. نتایج نشان داد که عصاره اثر زیانباری بر فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون نداشت. در ضمن، عصاره موجب کاهش نقایص نورولوژیکی، حجم انفارکتوس و ادم مغزی در ناحیه کورتکس گردید. با استناد به نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت که استفاده از عصاره متانولی زرین گیاه موجب کاهش برخی از آسیب‌های حاصل از ایسکمی مغزی شده است. بنابراین می‌توان به این ترکیب طبیعی گیاهی به عنوان کاندید مناسبی در صنعت داروسازی امید بست.

واژه‌های کلیدی: عصاره متانولی زرین گیاه، ایسکمی مغزی، فاکتورهای بیوشیمیایی، انفارکتوس، ادم مغزی.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: s.khaksar@alzahra.ac.ir

مقدمه

اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، رزمارینیک اسید و سایر متابولیت‌های ثانویه یک گیاه بومی با ارزش است (۲۹). این گیاه تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، ضد میکروبی (۱۳)، ضد دردی (۱۴)، ضد اسهال (۳۵)، ضد اسپاسم (۳۶) و ضد سرطان (۱۷ و ۴۲) است و در درمان سردرد، احتقان و اختلالات کبدی موثر است. خواص درمانی این گیاه را به وجود ترکیبات موثر متعددی از جمله ترکیبات فنولی،

زرین گیاه یا بادرنجبویه دنیایی (*Dracocephalum kotschyi* Boiss) از خانواده نعنائیان (Lamiaceae)، از گیاهان دارویی با ارزش و انحصاری کشور ایران است که متاسفانه در سال‌های اخیر، به دلایل مختلفی از جمله خشکسالی و بهره‌برداری بیش از اندازه توسط دام و انسان، در خطر انقراض قرار گرفته است (۱۱). این گیاه با محتوای بالای اسانس، فلاونوئید، مونوترپن، تانن، فنولیک

یکی از گزینه‌های پیشنهادی برای القاء تحمل به ایسکمی، استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات محافظت‌کننده عصبی آنها است (۴۱ و ۴۵). تاکنون تعداد بسیاری از عصاره گیاهان دارویی و ترکیبات موثر آنها در پیشگیری و درمان مدل حیوانی سکته مغزی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که اکثر آنها اثرات نوروپروتکتیو خود را به دلیل خاصیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی نشان داده‌اند (۳۱). در میان انواع گیاهان دارویی، زین گیاه نیز دارای خصوصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی قوی است که می‌تواند کانال‌های خوبی برای محافظت نوروئی به حساب بیاید. بطوریکه اثرات نوروپروتکتیو عصاره زین گیاه در در تومور مغزی در شرایط برون تنی (In vitro) گزارش کردند (۴۲). همچنین اثر یک فلاونوئید طبیعی با نقش محافظت عصبی و استخراج شده از زین گیاه به نام کالیکوپترین (Calycopterin)، بر اختلال ناشی از H_2O_2 مورد بررسی قرار گرفت که به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی توانست میزان استرس اکسیداتیو (۳۹) و میزان آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو را نیز کاهش دهد (۹). تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی عصاره زین گیاه بر مدل سکته مغزی منتشر نشده است. با توجه به اهمیت دارویی زین گیاه و متابولیت‌های ارزشمند آن، این تحقیق طراحی شده است که اثرات این گیاه با خاصیت درمانی بالا در مدل حیوانی ایسکمی مغزی مورد مطالعه قرار گیرد. در ضمن، از اهداف دیگر این مطالعه بررسی مصرف عصاره زین گیاه بر روی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون و وزن حیوان سالم بمنظور بررسی اثرات جانبی این عصاره بوده است.

مواد و روشها

حیوانات و شرایط نگهداری: موش‌های بزرگ آزمایشگاهی Wistar بالغ نر و در محدوده وزنی بین ۲۵۰ الی ۳۵۰ گرم به تعداد ۳۵ سر از مجتمع تولیدی انسیتیتو پاستور ایران خریداری شده و در شرایط استاندارد (دمای $22 \pm 2^\circ C$ و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی) برای

فلاونوئیدهای و سایر متابولیت‌های ثانویه موجود در برگ‌های این گیاه نسبت می‌دهند (۱۶). گزارش شده است که لوتولین (Luteolin) به عنوان یک ترکیب فلاونوئیدی در زین گیاه، خاصیت ضد اضطرابی بدون اثر آرام بخشی برای بیماری‌هایی دارد که همراه با التهاب محیطی، درد، تغییر خلق و خو و اختلالات مربوط به اضطراب هستند (۱۲). در ضمن، اثر عصاره هیدروالکلی زین گیاه، ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی در کنترل چربی خون مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفت و اعلام کردند که این ترکیبات، موجب کاهش قابل توجهی در کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL شده است (۷ و ۴۶). لیمونن، یک مونوترپن مهم در اسانس زین گیاه، به عنوان یک مهارکننده تومور و سرطان معرفی شده است (۳۰).

مغز برای زنده ماندن و فعالیت داشتن به اکسیژن و گلوکز ثابت (ATP) نیاز دارد. هنگامی که به دنبال ایسکمی مغزی، خون رسانی مختل می‌شود، مجموعه‌ای از رویدادهای به هم پیوسته آسیب رسانی رخ می‌دهد که همگی به دلیل کمبود ATP هستند (۱۸). سکته مغزی به عنوان دومین علت مرگ و میر در جهان، سالانه بار مالی و روانی بسیاری به بیماران، خانواده‌ها و جامعه تحمیل می‌کند. متأسفانه بروز این بیماری در کشورهای در حال توسعه به میزان قابل توجهی رو به افزایش هست (۶). در میان پیامدهای پاتوفیزیولوژیک ایسکمی مغزی، استرس اکسیداتیو، تحریک پذیری بالای نورون‌ها، التهاب و پراکسیداسیون لیپیدی به عنوان مهم‌ترین محرک‌های مرگ سلولی آپوپتوز در نورون‌ها در نظر گرفته می‌شوند (۱۸). صدمات ناشی از ایسکمی مغزی نه تنها به سکته مغزی محدود نمی‌شود، بلکه در بیماران با سابقه آنوریسم، کم‌خونی داسی شکل و حمله قلبی نیز رخ می‌دهد. بنابراین یکی از اهداف محققین علاوه بر درمان این بیماری، القای تحمل به ایسکمی بمنظور پیشگیری یا کم کردن عوارض ناشی از بیماری است (۲۳).

آزمایش نگهداری شدند. حیوانات در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. در این تحقیق سعی شده است که از حداقل موش‌های بزرگ آزمایشگاهی استفاده گردد. تمامی مراحل آزمایش نیز بر اساس پروتکل تأیید شده کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس با کد اخلاق IR.MODARES.AEC.1402.014 اجرا شد.

گروه‌های آزمایشی: ۳۵ سر موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر به صورت تصادفی به پنج گروه اصلی کنترل، دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه، شم (Sham-operated)، ایسکمی و ایسکمی + دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه دسته بندی شدند.

در این مطالعه، روند آزمایش به دو بخش تقسیم گردید. در مرحله اول، هدف بررسی اثر عصاره متانولی زرین گیاه بر فاکتورهای بیوشیمیایی حیوان، تغییرات وزن حیوان و یافتن اثرات جانبی مصرف این عصاره بود. به همین منظور، دو گروه کنترل و دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه طراحی شده است. گروه کنترل، گروهی از حیوانات سالم بودند که بدون هیچ گونه مداخله جراحی و درمانی تنها سرم خون آنها بمنظور ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار گرفت (n=۵). گروه دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه، گروهی از حیوانات سالم بدون مداخله جراحی ایسکمی بودند که تنها عصاره متانولی زرین گیاه را با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت پنج روز دریافت کردند. در این گروه فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون و وزن حیوان مورد ارزیابی قرار گرفت (n=۵).

در بخش دوم از آزمایش، اثرات عصاره متانولی بر آسیب‌های ایسکمی شامل نقایص نورولوژیکی، انفارکتوس و ادم مغزی (میزان محتوای آب مغزی) در مدل حیوانی ایسکمی مغزی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور، سه گروه شم (Sham-operated)، ایسکمی و ایسکمی + دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه طراحی شده است. در گروه شم،

موش‌های بزرگ آزمایشگاهی با دریافت سالیین به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت پنج روز، تنها متحمل استرس جراحی ایسکمی شدند؛ بدین‌صورت که مراحل جراحی ایسکمی بر روی آنها انجام شد بدون اینکه فیلامنتی شریان مغزی آنها را مسدود کند. در گروه شم، ارزیابی نقایص نورولوژیکی و میزان محتوای آب مغزی صورت گرفت (n=۵). موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه ایسکمی، بدون دریافت هیچ مداخله درمانی تحت عمل جراحی ایسکمی قرار گرفتند. موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه ایسکمی، برای ارزیابی نقایص نورولوژیکی، حجم انفارکتوس (n=۵) و محتوای آب مغزی (n=۵) مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه ایسکمی + دریافت کننده عصاره زرین گیاه، عصاره متانولی را به صورت پیش‌درمان با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت پنج روز دریافت کردند. در گروه ایسکمی + دریافت کننده عصاره زرین گیاه، نقایص نورولوژیکی، حجم انفارکتوس (n=۵) و محتوای آب مغزی (n=۵) مورد ارزیابی قرار گرفت. علت انتخاب دوز عصاره متانولی زرین گیاه، بر اساس دوز موثر این عصاره بر مدل حیوانی کولیت بود که توسط کشاورزی و همکاران در سال ۲۰۲۲ اعلام شد (۲۱). مدت زمان دریافت عصاره متانولی زرین گیاه نیز بر اساس مطالعه صدرایی و همکاران در سال ۲۰۱۷ انتخاب شد (۳۴). در روز پنجم دریافت درمان، دو ساعت بعد از دریافت آخرین گاواژ عصاره، جراحی ایسکمی مغزی بر روی آنها اعمال شد.

عصاره‌گیری از گیاه خشک شده زرین گیاه: گیاه خشک شده زرین گیاه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ابتدا گیاه خشک شده زرین گیاه پودر شد و سپس ۵۰ گرم از پودر خشک گیاه را در ۵۰۰ میلی لیتر متانول ۹۶٪ ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق شیک گردید. بعد از آن، گیاه را از کاغذ صافی عبور داده و باقی مانده آن را مجدداً با ۵۰۰ میلی لیتر متانول ۹۶٪ به مدت ۷۲ ساعت شیک

است و غلظت کراتینین بر حسب mg/dl گزارش شد. همچنین در این آزمایش، اوره در حضور اوره آز هیدرولیز شده و به آمونیاک و دی‌اکسید کربن تبدیل شد. آمونیاک تولید شده با ۲-گازوگلو تارات و NADH در حضور گلو تارات دهیدروژناز واکنش داده و NAD و گلو تارات تولید می‌کند. کاهش جذب محلول‌ها، به دلیل کاهش غلظت NADH در واحد زمان نسبت به غلظت اوره است. غلظت اوره بر حسب mg/dl گزارش شد (۴۰).

برای اندازه‌گیری کلسیم از روش رنگ‌سنجی (Colorimetric) و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری صورت گرفت. کیت مورد استفاده در این مطالعه، از نوع زیست‌شیمی ایران بود و غلظت کلسیم بر حسب mg/dl گزارش شد. برای اندازه‌گیری منیزیم نیز از روش Atomic absorption استفاده شد (۱۰). اندازه‌گیری آهن و روی موجود در سرم خون نیز با استفاده از کیت زیست‌شیمی به روش اسپکتوفتومتری صورت گرفت.

ارزیابی وزن موش بزرگ آزمایشگاهی: وزن موش بزرگ آزمایشگاهی نیز به عنوان پارامتر فیزیولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. وزن حیوان در گروه دریافت‌کننده عصاره متانولی زرین گیاه اندازه‌گیری شد. وزن حیوانات در گروه دریافت‌کننده عصاره متانولی قبل از شروع و پایان تیمار با عصاره متانولی زرین گیاه (روز پنجم) مورد سنجش قرار گرفت.

روش ایجاد مدل سکته مغزی MCAO: در گروه‌های ایسکمی و ایسکمی + دریافت‌کننده عصاره زرین گیاه، موش‌های بزرگ آزمایشگاهی تحت عمل جراحی MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) (انسداد شریان مغزی میانی) قرار گرفتند. بیهوشی بر روی حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) انجام شد (۳۲). همانطوریکه Longa و همکاران توضیح دادند (۲۸)، در این جراحی، MCA با استفاده از تکنیک «ورود فیلامنت به

شد. مجدداً عصاره توسط کاغذ صافی صاف گردید. نکته قابل توجه این بود که عصاره باید به طور سریع تغلیظ شود. برای تغلیظ از دستگاه روتاری استفاده شد و در نهایت تا حدود ۵۰ میلی‌لیتر، تغلیظ عصاره صورت گرفت. سپس عصاره متانولی خشک گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۵). قبل از خوراندن عصاره به حیوان، بسته به دوز مصرفی عصاره خشک شده در سالیین حل گردید.

ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی در سرم خون: موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ۲۴ ساعت بعد از آخرین روز دریافت عصاره متانولی زرین گیاه در گروه دریافت‌کننده عصاره آخرین روز دریافت سالیین در گروه کنترل، با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از ماده بیهوشی کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. خون آنها جمع‌آوری گردید و خون حیوان در داخل لوله آزمایش نمونه‌ها جهت انعقاد به مدت نیم ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه‌های خونی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی (سرم) جداسازی شد (۳۸) و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد تا زمانی که برای سنجش پارامترهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرند. میانگین غلظت سرمی تری‌گلیسیرید، کلسترول (۲)، گلوکز (۳۸)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) (۳)، کراتینین و اوره با استفاده از کیت‌های بیوشیمی شرکت پارس‌آزمون ایران ویژه هر یک از ترکیبات مذکور (طبق دستورالعمل‌های شرکت سازنده) و دستگاه تمام اتوماتیک اتوانالایزر آلفا کلاسیک اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی و گلوکز از روش فوتومتریک استفاده شد. اندازه‌گیری کراتینین در سرم نمونه خونی با روش فوتومتریک صورت گرفت. در این آزمایش، کراتینین با آلکالن پیکرات تشکیل یک کمپلکس رنگی می‌دهد. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار کراتینین در نمونه

می‌دهد؛ زیرا این نوع از ناهماهنگی، متداول‌ترین ناتوانی در مبتلایان به سکتة مغزی است و کیفیت زندگی را در این افراد تحت تأثیر قرار می‌دهد. در ضمن، تست "عملکرد حسی (Sensory Function)"، پاسخ عکس‌العمل حسی حیوان را در برابر محرک‌های لمسی و دردزای خارجی به نمایش می‌گذارد. این عدم قدرت حسی در اندام‌های فلج شده مبتلایان به سکتة مغزی به وضوح دیده می‌شود. بنابراین با ابزارهایی نیز میزان توانایی حسی حیوان در اندام‌های جلویی و عقبی سنجیده شد. امتیاز نواقص نورولوژیک با مراجعه به مقیاس‌های درجه بندی گزارش شده توسط Reglodi و همکاران انجام شد (جدول ۱). مجموعه امتیازهای به دست آمده از هر تست به عنوان امتیاز کل نورولوژیکی محاسبه گردید که با حداکثر امتیاز ۲۸ و با حداقل امتیاز صفر در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نرمال اعلام گردید (۳۳).

ارزیابی حجم انفارکتوس: ۲۴ ساعت پس از القای ایسکمی، مغز موش‌های بزرگ آزمایشگاهی خارج شد و به مدت ۱۵ دقیقه در سرم فیزیولوژی خنک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برش‌گیری از مغز موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در مقطع کرونال به اندازه دو میلی‌متر تهیه شد (ماتریکس مغز، ایران). برش‌ها در معرض محلول ۲٪، ۳٪، ۵٪ تری فنیل تترازولیوم کلرید (TTC) (Merck، آلمان) قرار گرفتند. سپس برش‌ها را در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادند (۱). برای عکس برداری جداگانه از این برش‌ها از دوربین دیجیتال (Canon EOS 500D) استفاده شده است. تصاویر به کامپیوتر منتقل شدند. برای محاسبه حجم انفارکتوس از نرم افزار آنالیز تصویر (Image J; نسخه 1.46r) استفاده شد. ناحیه بدون رنگ به عنوان ناحیه انفارکتوس شده تعریف شد. بر اساس روشی که قبلاً توضیح داده شد، مساحت حاصل در ضخامت دو میلی‌متر ضرب و اعداد همه برش‌ها جمع شده و به عنوان حجم کل انفارکتوس هر مغز در نظر گرفته شد (۴۹).

شریان» مسدود شد و شریان‌های کاروتید راست از طریق ایجاد یک شکاف در خط وسط گردن ظاهر شد. شریان‌های کاروتید مشترک و خارجی با بخیه بسته شدند و برشی در کاروتید مشترک راست ایجاد شد. فیلامنتی با گرد کردن (با حرارت دادن) و ایجاد پوششی توسط پلی-ال-لیزین (سیگما، ایالات متحده آمریکا) یک نخ نایلونی ۰-۳ ساخته شد و فیلامنت وارد شریان کاروتید داخلی شد تا جایی که مقاومت در برابر عبور نخ ایجاد گردد. بنابراین، با این روش فیلامنت، منشاء جریان خون را به MCA می‌بندد. پس از ۶۰ دقیقه ایسکمی، خون رسانی مجدد با خارج کردن فیلامنت رخ داد. دمای رکتوم نیز کنترل شد (Citizen-513w) و در طول جراحی دما در ۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ شد (۲۷).

بررسی نواقص نورولوژیکی: ۲۴ ساعت بعد از خون‌رسانی مجدد، ارزیابی نورولوژیکی انجام گرفت. در این بخش، توانایی حسی و حرکتی حیوان در هشت تست سنجیده شد. در بخش ارزیابی حرکتی، با انجام تست «بالا رفتن (Climbing)» توانایی حیوان برای بالا رفتن از سطح شیب دار و قدرت عضلات مورد ارزیابی قرار گرفت. سنجش توانایی تعادل وضعی اندام‌های حیوان و اختلالات راه رفتن نیز با اجرای تست «حرکات تعمدی (Biased Movement)» صورت گرفت. تست «تقارن تونوس عضلانی (Symmetry of Muscle Tone)» نیز تا حدودی بیانگر میزان انقباض طبیعی در ماهیچه اسکلتی و قدرت عضلانی است که از اختلالات رایج در مبتلایان به سکتة مغزی است. همچنین میزان تحرک حیوان، تقارن اندام‌ها در هنگام راه رفتن و موقعیت قرارگیری اندام‌ها بر روی سطح صاف به ترتیب با انجام تست‌های «تحرک (Motility)»، «اختلال در راه رفتن (Gait Disturbance)» و «طرز قرار گرفتن اندام‌ها (Limb Placing)» به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن، تست‌های "طرز قرارگیری اندام‌ها" و «نشانه‌های وضعی (Postural Signs)»، ادغام حسی- حرکتی حیوان را تا حدودی مورد سنجش قرار

جدول ۱- امتیاز بندی ارزیابی نقایص نورولوژیکی برای موش های بزرگ آزمایشگاهی ۲۴ ساعت بعد از جراحی ایسکمی

امتیاز بندی	توضیحات	تست ها
۲-۰	۱. درجه‌ای از خم شدن اندام در هنگام بلند کردن حیوان با دم	نشانه‌های وضعی (Postural signs)
۲-۰	۲. درجه‌ای از چرخش بدن در هنگام بلند کردن حیوان با دم	۱. خم شدن اندام جلویی (Forelimb flexion) ۲. چرخش قفسه سینه (Thorax rotation)
۰	راه رفتن مستقیم	اختلال در راه رفتن (Gait disturbance)
۱	راه رفتن به سمت جهت مخالف	
۲	راه رفتن مستقیم و چرخش به صورت متناوب	
۳	راه رفتن به سمت جهت مخالف و چرخش به صورت متناوب	
۴	چرخش و یا سایر اختلالات مانند به پشت افتادن و خزیدن	
۵	چرخش مداوم به سمت جهت مخالف	
۱-۰	بالا رفتن از یک سطح شیب دار با زاویه ۴۵ درجه	بالا رفتن (Climbing)
۰	۰-۱ بار جابه‌جایی به سمت جهت مخالف	حرکات تعمدی (Biased movement)
۲-۱	۲-۳ بار جابه‌جایی به سمت جهت مخالف	۱. کشیدن دم حیوان سه بار (Pull tail)
۰	۰-۱ بار جابه‌جایی به سمت جهت مخالف	۲. هل دادن پشت حیوان سه بار (Push back)
۲-۱	۲-۳ بار جابه‌جایی به سمت جهت مخالف	
۲-۰	طبیعی، ضعیف، بدون حرکت	طرز قرار گرفتن اندام‌ها (Limb placing)
۲-۰	طبیعی، ضعیف، بدون حرکت	۱. اندام‌های جلویی ۲. اندام‌های عقبی
۲-۰	۱. درجه‌ای از مقاومت در هنگام فشار جانبی	تقارن تونوس عضلانی (Symmetry of muscle tone)
۱-۰	۲. تقارن قدرت چنگ زدن بر روی قفس سیمی	۱. مقاومت جانبی (lateral resistance) ۲. قدرت چنگ زدن (Grasping Strength)
۱-۰	چنگ زدن یک لوله زمانی که به آرامی لمس می‌کند	عملکرد حسی (Sensory function)
۱-۰	عقب کشیدن اندام جلویی در هنگام تماس با سوزن	۱. رفلکس چنگ زدن پنجه پای جلویی (Grasping reflex) ۲. رفلکس لمس کردن (Touching reflex)
۱-۰	طبیعی یا رفتار جستجوگرانه کاهش یافته به میزان خیلی کم	تحرک (Motility)
۲	جابه‌جا کردن اندام‌ها بدون اقدام خاصی	مشاهده حیوان برای یک دقیقه
۳	جابه‌جا شدن در پاسخ به محرک	
۴	عدم پاسخ‌گویی به محرک با تونوس عضلانی طبیعی	
۵	انقباض شدیداً کاهش یافته، نشانه‌های پیش از مرگ	

حجم تصحیح شده ناحیه آسیب‌دیده = حجم نیمکره چپ
- (حجم نیمکره راست - حجم ناحیه آسیب‌دیده)

روش سنجش محتوی آب مغزی: جهت اندازه‌گیری ادم مغزی، پس از کشتن حیوان و خارج کردن مغز پیاز بویایی، منخچه و بصل النخاع از مغز جدا گردید. سپس با استفاده از تیغ، نیمکره راست و چپ از روی شیار پاریتال از هم جدا گردید. نواحی مغزی کورتکس، کورتکس پری فرم-

در واقع با محاسبه حجم تصحیح شده ناحیه آسیب‌دیده در واقع با محاسبه حجم تصحیح شده ناحیه آسیب‌دیده (Corrected Infarct Volume) (CIV)، دخالت ادم مغزی در اندازه‌گیری حجم سکنه تصحیح گردید. به این روش حجم کلی آسیب مغزی محاسبه گردید. همانطوریکه در مطالعه قبلی ما توضیح داده شد، حجم انفارکتوس در کورتکس، کورتکس پری فرم- آمیگدال (Pir-Amy) و استریاتوم مغز موش بزرگ آزمایشگاهی به صورت جداگانه ارزیابی شد (۲۴).

داده است که میزان تری گلیسیرید در گروه دریافت کننده عصاره متانولی ($52/7 \pm 4$) در مقایسه با گروه کنترل ($81/9 \pm 14$) کاهش معناداری نشان داده است ($P=0/04$). درحالیکه مقایسه بین دو گروه کنترل (53 ± 6) و دریافت کننده عصاره متانولی (51 ± 4) تفاوت معناداری در کلسترول خون نشان نداده است. گلوکز در گروه دریافت کننده عصاره متانولی (95 ± 29) در مقایسه با گروه کنترل (88 ± 20) تفاوت معناداری نشان نداده است. آنالیز آماری بین دو گروه کنترل و دریافت کننده عصاره متانولی نشان داده است که عصاره متانولی زرین گیاه موجب تغییر معناداری در آنزیم‌های کبدی (ALT, AST, ALP) نشده است. در ضمن، عصاره متانولی زرین گیاه ($0/58 \pm 0/1$) موجب افزایش کراتینین در مقایسه با گروه کنترل ($0/52 \pm 0/01$) شد ($P=0/03$). در حالیکه دریافت عصاره توسط موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه موجب تغییری در میزان میانگین اوره موجود در سرم خون ($42/52 \pm 5$) در مقایسه با گروه کنترل ($41/66 \pm 7$) نشد. در بررسی اثر عصاره متانولی بر مینرال‌های موجود در سرم خون، نتایج نشان داده است که کلسیم در گروه دریافت کننده عصاره متانولی ($9/98 \pm 0/44$) در مقایسه با گروه کنترل ($9/11 \pm 0/5$) تفاوت معناداری دیده نشده است. آنالیز میزان منیزیم خون نیز بین دو گروه دریافت کننده عصاره متانولی ($2/24 \pm 0/3$) و شم ($2/35 \pm 0/5$) تفاوت معناداری نشان نداد. همچنین میزان آهن سرم خون در گروه دریافت کننده عصاره متانولی ($238/2 \pm 42$) در مقایسه با گروه کنترل ($244/2 \pm 22/1$) تغییر معناداری نکرده است. در نهایت، مقایسه آماری بین روی موجود در سرم خون بین دو گروه دریافت کننده عصاره متانولی ($159/2 \pm 34/8$) و کنترل ($138 \pm 19/5$) تفاوت معناداری ملاحظه نگردید (جدول ۲).

آمیگدال و استریاتوم نیمکره راست و چپ از هم جدا گردید. بر روی فویل‌ها با برچسب به صورت اختصار، نواحی جدا شده مغز مشخص شد. کاغذ فویل‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین شدند و وزن هر کدام یادداشت گردید. سپس نمونه‌ها بر روی فویل قرار داده شد و وزن مغز تر (WW) همراه با فویل یادداشت شد. سپس بافت‌ها در داخل انکوباتور با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا مغز خشک شود. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها مجدداً توزین شدند و وزن خشک (DW) یادداشت شد. در نهایت، محتوی آب مغز بر اساس فرمول $[(WW-DW)/WW] \times 100$ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism (version 8) انجام گرفت. داده‌های حاصل از نواقص نورولوژیک با استفاده از آزمون نان پارامتریک-Kruskal Wallis و تست تعقیبی Dunn مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفت. داده‌های فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون و وزن حیوان به ترتیب با استفاده از آزمون‌های t-test و Paired t آنالیز گردید و حجم انفارکتوس و مقایسه بین محتوای آب مغزی (ادم مغزی) دو نیمکره در هر گروه با استفاده از آزمون Unpaired t-test مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز حاصل از مقایسه ادم مغزی بین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون One-way ANOVA و روش مقایسه میانگین Tukey صورت گرفت. نتایج به صورت $Mean \pm SEM$ گزارش شد. معیار معناداری برای هر گروه $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

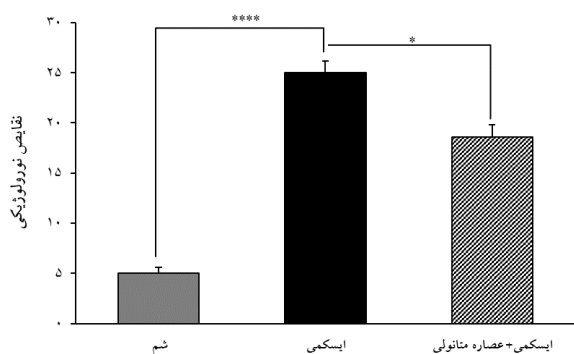
نتایج

اثر عصاره متانولی زرین گیاه بر فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون حیوان: آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی بین گروه‌های کنترل و دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه نشان

جدول ۲- اثر عصاره متانولی زرين گیاه بر فاکتورهای بیوشیمیایی در گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده عصاره متانولی زرين گیاه. $P < 0.05$ * (t-test). ALP: آنزیم کبدی آلکالین فسفاتاز؛ AST: آسپاراتات آمینوترانسفراز؛ ALT: آلانین آمینوترانسفراز.

گروه‌های آزمایشی	تری‌گلیسرید (mg/dl)	کلسترول (mg/dl)	گلوکز (mg/dl)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	کراتینین (mg/dl)	اوره (mg/dl)	کلسیم (mg/dl)	منیزیم (mg/dl)	آهن (mg/dl)	روی (mg/dl)
کنترل	۸۱/۱۴±۹	۵۳±۶	۸۸±۲۰	۶۱۲±۵۱	۳۸۷±۸۸	۱۰۳±۲۹	۰/۵۲±۰/۰۱	۴۱/۶۶±۷	۹/۱۱±۰/۵	۲/۳۵±۰/۵	۲۴۴/۲±۲۲/۱	۱۳۸±۱۹/۵
دریافت‌کننده عصاره متانولی زرين گیاه	۵۲/۷±۴*	۵۱±۴	۹۵±۲۹	۵۶۶±۷۷	۴۴۲±۱۱۳	۱۰۰±۳۱	۰/۵۸±۰/۱*	۴۲/۵۲±۵	۹/۹۸±۰/۴	۲/۲۴±۰/۳	۲۳۸/۲±۴۲	۱۵۹/۲±۳۴/۸

توجهی بهبود پیدا کرد ($P = 0.01$) (18.6 ± 2.08) در ضمن، میانگین امتیاز موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه شم (5 ± 1) تفاوت معناداری با حیوانات گروه ایسکمی در همه نشانه‌ها داشت ($P < 0.0001$) (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر عصاره متانولی زرين گیاه بر امتیاز کل نواقص نورولوژیک در گروه‌های شم، ایسکمی و ایسکمی + دریافت‌کننده عصاره متانولی زرين گیاه ۲۴ ساعت پس از جراحی MCAO. هر ستون نشانگر Mean ± SEM است. $P < 0.0001$ و $P < 0.05$ * (Kruskal-Wallis).

اثر عصاره متانولی زرين گیاه بر حجم انفارکتوس: بیست و چهار ساعت پس از خون‌رسانی مجدد، سنجش حجم انفارکتوس صورت گرفت. نواحی قرمز در برش‌های مغزی نشان‌دهنده نواحی سالم و نواحی سفید نشان‌دهنده نواحی انفارکتوس است. با استفاده از نرم‌افزار Image J حجم سکت (آسیب دیده) در نواحی کورتکس، کورتکس پری فرم-آمیگدال و استریاتوم محاسبه شد. نتایج آنالیز آماری نشان داده است که پیش‌درمان عصاره متانولی زرين گیاه

اثر عصاره متانولی زرين گیاه بر وزن حیوان: بمنظور بررسی اثر عصاره متانولی زرين گیاه بر تغییرات وزن حیوان، اندازه‌گیری وزن حیوانات قبل تیمار (وزن اولیه) و بعد تیمار (وزن نهایی) صورت گرفت. میانگین وزن حیوانات در گروه دریافت‌کننده عصاره متانولی، بعد از تیمار (216 ± 18) در مقایسه با قبل تیمار (213 ± 15) تفاوت معناداری نشان نداد. این نشان‌دهنده عدم اثرگذاری منفی عصاره متانولی زرين گیاه بر وزن حیوان است (جدول ۳).

جدول ۳- اثر دریافت عصاره متانولی زرين گیاه بر تغییرات وزن حیوان. میانگین وزن حیوانات در روز اول دریافت عصاره به عنوان وزن اولیه و پس از اتمام دریافت عصاره در روز پنجم به عنوان وزن نهایی در نظر گرفته شد.

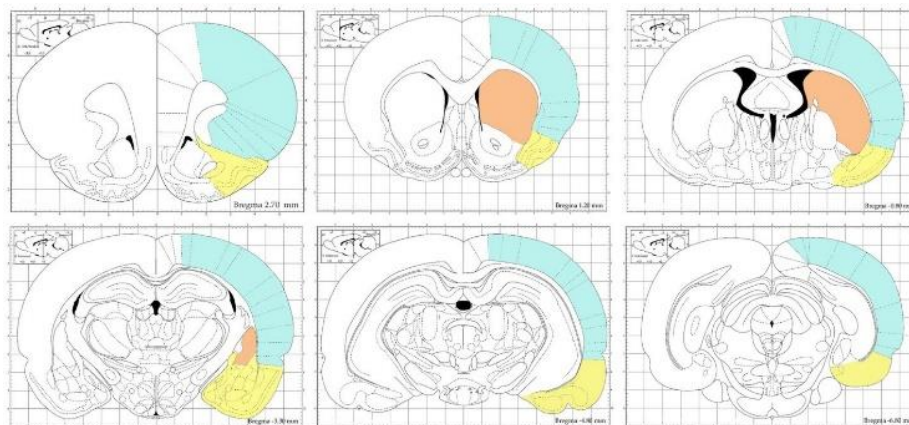
تغییرات وزنی در حیوانات	
میانگین وزن اولیه	میانگین وزن نهایی
۲۱۳±۱۵ (gr)	۲۱۶±۱۸ (gr)

اثر عصاره متانولی زرين گیاه بر نقایص نورولوژیکی: در مطالعات سکنه مغزی، تأثیر عوامل محافظت‌کننده عصبی بر توانایی حسی-حرکتی به طور فزاینده‌ای اهمیت پیدا کرده است. ۲۴ ساعت پس از القاء ایسکمی مغزی، نمره کل نقایص نورولوژیکی در گروه ایسکمی 25 ± 2 محاسبه شد. رفتارهای نورولوژیکی در گروه ایسکمی + عصاره متانولی زرين گیاه در مقایسه با گروه ایسکمی به طور قابل

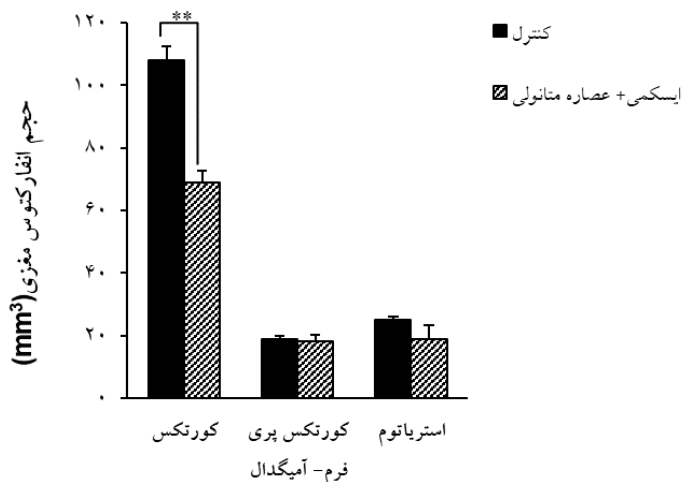
در مقایسه با ناحیه استریاتوم گروه ایسکمی ($25/67 \pm 1/89$ میلی متر مکعب) کاهش معناداری نشان نداده است. همچنین بین گروه های آزمایشی، تفاوت معناداری در ناحیه کورتکس پری فرم- آمیگدال مشاهده نشده است (نمودار ۲).

گیاه به طور معناداری موجب کاهش حجم انفارکتوس ناحیه کورتکس ($69/12 \pm 6/2$ میلی متر مکعب) در مقایسه با ناحیه کورتکس گروه ایسکمی ($108/7 \pm 39/7$ میلی متر مکعب) شده است ($P=0/002$). در ضمن، حجم انفارکتوس استریاتوم در گروه ایسکمی + دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه ($19/92 \pm 7/24$ میلی متر مکعب)

الف



ب



ج



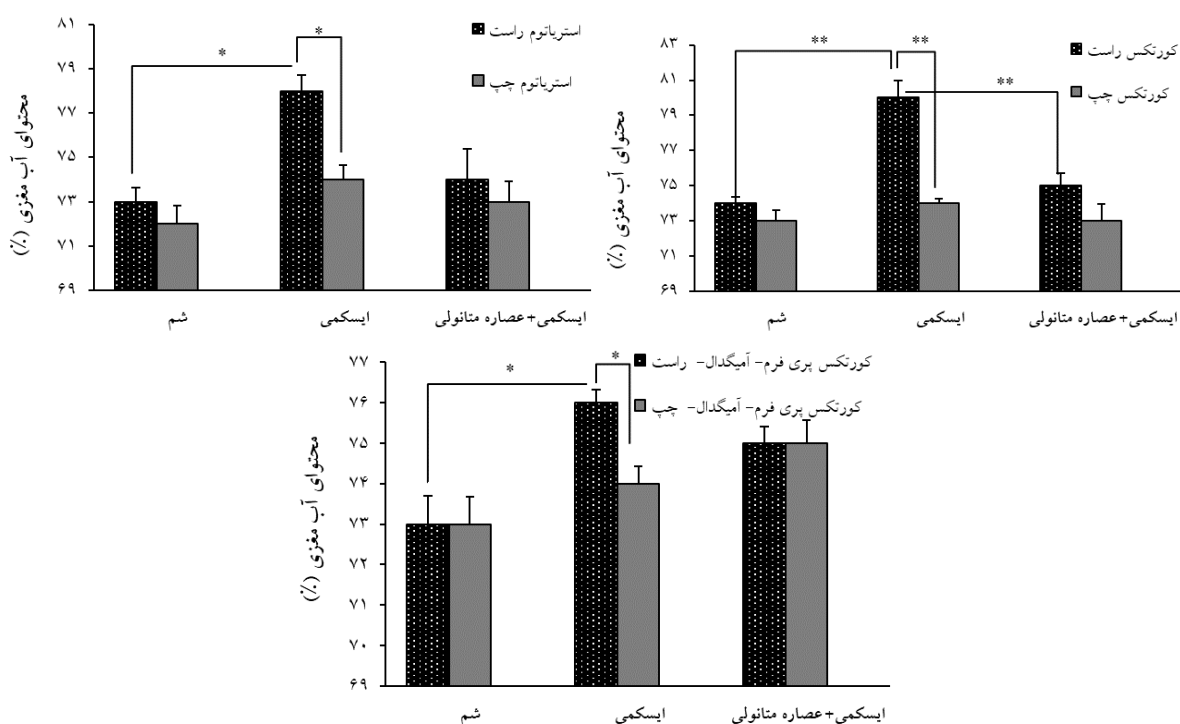
نمودار ۲- اثر عصاره متانولی زرین گیاه بر حجم انفارکتوس (سکته مغزی) در نواحی کورتکس، استریاتوم و کورتکس پری فرم- آمیگدال ۲۴ ساعت پس از جراحی MCAO. الف) تصویر نماینده مناطق مختلف مورد ارزیابی است. رنگ آبی: کورتکس، رنگ زرد: کورتکس پری فرم- آمیگدال و زنگ نارنجی: استریاتوم (۲۴). ب) حجم انفارکتوس اندازه گیری شده توسط نرم افزار Image j که به صورت کمی در مناطق ذکر شده گزارش شده است. هر ستون نشانگر Mean \pm SEM است. $P < 0/01$. $** P < 0/01$. (ج) تصویری از نمونه ای از برش های مغزی در دو گروه ایسکمی و ایسکمی + عصاره متانولی زرین گیاه. نواحی قرمز نشاندهنده بافت سالم و نواحی سفید نشاندهنده بافت آسیب دیده در برش های مغزی است.

ادم مغزی را در گروه های تحت عمل جراحی MCAO در نیمکره ایسکمی (نیمکره راست) در مقایسه با نیمکره طرف مقابل (نیمکره چپ) افزایش داده است. اختلاف بین

اثر عصاره متانولی زرین گیاه بر ادم مغزی: محتوای آب مغزی نشانگر ادم مغزی است. ادم مغزی به عنوان یک آسیب ایسکمی جدی محسوب می شود. ایسکمی مغزی،

راست، کاهش ادم مغزی در گروه ایسکمی + دریافت کننده عصاره زرین گیاه ($74/46 \pm 2/38$) نیز در مقایسه با گروه ایسکمی ($78/5 \pm 1/25$) دیده شد ولی اختلاف آن معنادار نبود. از نتایج دیگر آنالیز آماری بین استریاتوم راست گروه های آزمایشی حاکی از افزایش معنادار در محتوای آب مغزی در گروه ایسکمی ($78/5 \pm 1/25$) در مقایسه با گروه شم ($73/5 \pm 1/11$) بوده است ($P=0/01$). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داده است که ادم مغزی در ناحیه کورتکس پری فرم - آمیگدال گروه ایسکمی ($76/34 \pm 0/56$) در مقایسه با گروه ایسکمی ($73/05 \pm 1/23$) تفاوت معناداری داشته است ($P=0/01$). درحالیکه عصاره زرین گیاه تأثیری بر محتوای آب مغزی در ناحیه کورتکس پری فرم - آمیگدال ($75/79 \pm 0/98$) در مقایسه با گروه ایسکمی ($76/34 \pm 0/56$) نداشته است (نمودار ۳).

محتوای آب مغزی بین دو نیمکره در گروه ایسکمی در نواحی کورتکس، استریاتوم و کورتکس پری فرم - آمیگدال معنادار بوده است (به ترتیب $P=0/003$ ، $P=0/01$ و $P=0/01$). درحالیکه، تفاوت بین دو نیمکره در گروه‌های شم و ایسکمی + دریافت کننده عصاره زرین گیاه معنادار نبوده است. در ضمن، مقایسه بین محتوای آب مغزی بین کورتکس راست گروه های آزمایشی نشان داده است که گروه ایسکمی ($80/88 \pm 1/71$) موجب افزایش معناداری در ادم مغزی در مقایسه با گروه شم ($74/37 \pm 0/61$) شده است که نشان‌دهنده آسیب حاصل از القاء مدل ایسکمی مغزی در موش صحرائی است ($P=0/001$) و استفاده از عصاره زرین گیاه در موش های بزرگ آزمایشگاهی ایسکمی مغزی ($75/9 \pm 1/20$) به طور قابل توجهی ادم مغزی را در ناحیه کورتکس در مقایسه با گروه ایسکمی ($80/88 \pm 1/71$) کاهش داده است ($P=0/006$). لازم به ذکر است که در ناحیه استریاتوم نیمکره



نمودار ۳- اثر عصاره متانولی زرین گیاه بر محتوای آب مغزی در نواحی کورتکس، استریاتوم و کورتکس پری فرم - آمیگدال در نیمکره راست (نیمکره ایسکمی) و نیمکره چپ (نیمکره سالم) ۲۴ ساعت پس از جراحی MCAO. هر ستون نشانگر $Mean \pm SEM$ است.

$P < 0/05$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/001$. * آنالیز مقایسه بین دو نیمکره در هر گروه با استفاده از آزمون t-test و آنالیز حاصل از مقایسه ادم مغزی بین گروه های مختلف با One-way ANOVA test صورت گرفت.

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داده است که پیش درمان عصاره متانولی زرین گیاه با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت پنج روز نتوانسته است تغییرات معناداری در فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون حیوان از جمله کلاسترول، گلوکز، آنزیم های کبدی، اوره، الکترولیت های موجود در خون (از جمله کلسیم، آهن، منیزیم و روی) ایجاد کند. همچنین، استفاده از عصاره موجب تغییری در وزن حیوان نیز نگردیده است، حتی افزایش وزنی که معمولاً پس از گذشت چند روز در گروه کنترل دیده شده است در گروه دریافت کننده عصاره نیز مشاهده شده است. می توان از این نتایج این طور تفسیر کرد که عصاره زرین گیاه اثرات جانبی ناخواسته و زیانباری بر وضعیت عمومی حیوان، شاخص های بیوشیمیایی سرم خون (که تا حدودی نمایانگر وضعیت سلامت جسمی حیوان است) و توازن الکترولیت های بدن (که بازتابی از وضعیت متابولیسم بدن می باشد) نداشته است. در گزارش مشابه ای نیز اعلام کردند که مصرف خوراکی عصاره هیدروالکلی زرین گیاه نیز تغییر قابل ملاحظه ای در پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژیک نداشته است (۳۷). البته این نکته قابل ذکر است که استفاده از عصاره متانولی زرین گیاه در مطالعه حاضر توانسته است میانگین غلظت سرمی تری گلیسیرید را به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد. مشابه نتایج مطالعه حاضر، استفاده از عصاره هیدروالکلی زرین گیاه موجب کاهش معناداری در تری گلیسیرید در مدل حیوانی با چربی خون بالا گردید و این اثرات در تیمار با ترکیبات پلی فنول این گیاه نیز مشاهده شد (۷). استفاده از آپی ژنین (Apigenin) و لوتئولین به عنوان ترکیبات مهم فلاونوئیدی در زرین گیاه، به ترتیب موجب کاهش سنتز کلاسترول و تشدید حذف کلاسترول از بدن در مدل حیوانی با چربی خون بالا شده است (۴۶). همچنین گزارشی منتشر شده است که اعلام کردند که استفاده از

عصاره هیدروالکلی زرین گیاه با دوز ۱۲۰ میلی گرم/کیلوگرم به مدت ۲۱ روز تاثیری در کلاسترول، تری گلیسیرید و گلوکز در مقایسه با گروه کنترل نداشته است در حالیکه استفاده از همین دوز در موش های دیابتی موجب کاهش میانگین تری گلیسیرید در سرم خون در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شده است (۸). مشابه نتایج ذکر شده، کاهش کلاسترول و تری گلیسیرید در مدل حیوانی دیابتی تیمار شده با عصاره اتانولی زرین گیاه گزارش شده است و این اثرات را به نقش این عصاره بر متابولیسم لیپید در بافت چربی نسبت داده اند (۴). از دیگر نتایج مطالعه حاضر، افزایش کراتینین در گروه دریافت کننده عصاره متانولی زرین گیاه نسبت به گروه کنترل بوده است. در راستای نتایج حاضر، استفاده از دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم به مدت ۳۰ روز موجب افزایش کراتینین شده است (۳۷). کراتینین به عنوان یک پارامتری از نحوه عملکرد کلیوی شناخته می شود که افزایش آن می تواند حاکی از نارسایی در عملکرد کلیوی باشد. همچنین کراتینین از متابولیت های حاصل از متابولیسم در عضلات است که افزایش معنادار این پارامتر می تواند از اثراتی که این عصاره بر متابولیسم عضلات و عملکرد کلیه می گذارد به حساب بیاید. بنابراین مطالعات بیشتر در این زمینه پیشنهاد می شود و دقت شود که استفاده از این گیاه در افراد با نارسایی کلیوی با احتیاط مصرف شود.

از دیگر نتایج مطالعه حاضر این است که عصاره متانولی زرین گیاه با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت پنج روز نتوانسته است امتیاز کل نقایص نورولوژیک را به طور معناداری کاهش دهد. یافته های تجربی در مدل حیوانی تایید کرده است که درمان با آپی ژنین، یک فلاونوئید مهم از زرین گیاه، از نقص شناختی جلوگیری و نقایص رفتاری را در حیوان برطرف کرده است (۴۳). همچنین ترکیب گیاهی فلاونوئیدی مانند آپی ژنین بر فعالیت گیرنده های بنزودیازپین در مغز تأثیر گذاشته و عملکردهای شناختی را بهبود داده است (۱۹).

نهایت افزایش نفوذپذیری سد خونی - مغزی و ادم مغزی تعریف می‌گردد (۲۰). در نهایت، این فرآیندها سلول‌های مغزی را به سمت مرگ نورونی و آسیب بافت مغزی (یا انفارکتوس) پیش می‌برند (۴۸). در گزارشی اعلام کردند که عصاره هیدروالکلی زرین گیاه و ماده موثره آن با عنوان آپی ژنین خاصیت ضد التهابی بالایی را نشان داده اند (۳۴). بنابراین تا حدودی می‌توان کاهش حجم انفارکتوس را به دنبال تجویز عصاره متانولی زرین گیاه به خاصیت ضد التهابی این عصاره یا ترکیبات موثر آن نسبت داد. در ضمن، از دیگر فرآیندهای پاتوفیزیولوژیکی بسیار مخرب و آسیب رسان در سکتة مغزی می‌توان به فرآیند استرس اکسیداتیو اشاره کرد. در حالت فیزیولوژیک، رادیکال‌های آزاد به صورت طبیعی توسط تمام سلول‌های بدن ساخته می‌شوند؛ اما سرعت تولید و حذف آن‌ها برابر است. بنابراین در شرایط طبیعی و فیزیولوژیک، به دلیل توازن تولید و حذف آنها آسیب‌های جدی را به دنبال ندارد. در حالیکه صدمات نورونی به ویژه ایسکمی مغزی، منجر به ساخت بی‌رویه رادیکال‌های آزاد مانند انواع نیتروژن‌ها و اکسیژن‌های برانگیخته و ناکارآمدی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درون‌زا می‌شوند (۴۷). در نهایت فرآیند استرس اکسیداتیو موجب راه‌اندازی سایر پیامدهای پاتوفیزیولوژیک ایسکمی مانند التهاب، افزایش نفوذپذیری سد خونی مغزی (۲۵) و ادم مغزی (۴۴) می‌گردد. علاوه بر این، از ویژگی‌های خاص این ترکیبات، واکنش‌پذیری اکسیداتیو بالای آنها است که می‌تواند به لیپیدهای سلولی (پراکسیداسیون لیپیدی)، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب برساند و مسیر آپوپتوز وابسته به میتوکندری را آغاز کند (۲۶). در مطالعه‌ای، عصاره متانولی زرین گیاه به واسطه کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش مارکرهای آنتی‌اکسیدانی توانسته است خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را بروز دهد (۲۲). بنابراین این احتمال وجود دارد که عصاره متانولی زرین گیاه در این مطالعه به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی و متوازن کردن میزان رادیکال‌های آزاد،

بنابراین این احتمال داده می‌شود که زرین گیاه به واسطه حضور متابولیت‌های ثانویه ممکن است نقایص نورولوژیکی را در حیوان بهبود بخشیده است. در ضمن، عصاره متانولی زرین گیاه با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم موجب کاهش حجم آسیب بافتی (انفارکتوس) و محتوی آب مغزی (ادم مغزی) در ناحیه کورتکس گردیده است. این مطالعه برای اولین بار، اثر عصاره زرین گیاه را بر روی مدل حیوانی ایسکمی مغزی مورد ارزیابی قرار داده است. به دنبال مدل جراحی MCAO، ناحیه کورتکس به عنوان یکی از کانونی‌ترین مراکز آسیب ایسکمی معرفی شده است که آسیب نورونی در این ناحیه، نقایص نورولوژیکی را به دنبال خواهد داشت. بنابراین بهبود نقایص نورولوژیکی به دنبال استفاده از عصاره متانولی زرین گیاه را می‌توان به کاهش ادم مغزی و انفارکتوس به ویژه در ناحیه کورتکس حسی - حرکتی ذکر کرد. انفارکتوس به عنوان شاخص خیلی مهمی برای نشان دادن میزان مرگ نورونی یا آسیب بافت مغزی در سکتة مغزی به حساب می‌آید. همچنین ادم مغزی (افزایش غیرطبیعی در محتوای آب مغزی)، یک عارضه بالینی جدی و خطرناک است که در طیف وسیعی از آسیب‌های مغزی از قبیل ایسکمی، تروما، تومورها و اختلالات متابولیک توسعه می‌یابد. پوشش سخت جمجمه، نسبت به تورم پیشرونده بافت مغزی مقاومت نشان می‌دهد که منجر به افزایش فشار درون جمجمه‌ای، کاهش در جریان خون مغزی، نقایص نورولوژیکی و در نهایت مرگ می‌شود. افزایش فاکتورهای التهابی و تجمع افزایشی رادیکال‌های آزاد از عوامل اصلی ایجاد ادم مغزی به حساب می‌آیند (۵). مسجل شده است که به دنبال آسیب مغزی ایسکمی، پاسخ‌های التهابی در هر دو فاز اولیه و تأخیری راه‌اندازی می‌شوند. فرآیندهای مرتبط با التهاب با بیان بالای سیتوکین‌ها، کموکین‌ها، رادیکال‌های آزاد و فعال‌شدن میکروگلیاها در فاز اولیه و چرخش لوکوسیت‌ها، چسبندگی آن‌ها به دیواره رگی، مهاجرت‌شان به پارانشیم مغزی در فاز تأخیری التهاب و در

احتمالا این گیاه به واسطه داشتن خاصیت ضد التهابی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش آسیب‌های حاصل از سکنه مغزی در مدل حیوانی شود که برای اثبات این ادعا نیاز به تحقیقات بیشتری وجود دارد.

سیاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند تشکر ویژه خود را از جناب آقای دکتر محمدرضا بیگدلی بابت در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی در دانشگاه شهید بهشتی اعلام دارند.

۲- نوروزی، م.، ولی پور چهارده چریک، س.، ۱۴۰۰. اثر عصاره هیدرو الکلی گیاه بوقناق (*Eryngium campestre*) بر میزان شاخص‌های لیپیدی سرم در موش‌های صحرایی نر بالغ دیابتی. مجله پژوهش‌های جانوری دوره ۳۴، شماره ۳، صفحات ۲۱۴-۲۰۴.

موجب کاهش آسیب بافتی مغز، ادم مغزی و مرگ نورونی شده باشد.

به طور کلی، نقایص نورولوژیکی، انفارکتوس و ادم مغزی به عنوان شاخص‌های اصلی ایسکمی مغزی شناخته شده است. با استناد به نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که عصاره متانولی زرین گیاه به واسطه بهبود نقایص نورولوژیکی، کاهش حجم انفارکتوس و تعدیل ادم مغزی بتواند به عنوان یک عامل نوروپروتکتیو در ایسکمی مغزی معرفی شود و موجب ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی گردد.

منابع

- ۱- حاجی زاده مقدم، ا.، امینی، س.، ابراهیمی، س.، و نظیفی، ا.، ۱۴۰۰. اثرات ضد افسردگی و آنتی‌اکسیدانی عصاره سیانو باکتری *Nostoc commune* در یک مدل ایسکمی/ریپرفیوژن مغز موش صحرایی. مجله پژوهش‌های جانوری دوره ۳۴، شماره ۴، صفحات ۲۳۴-۲۲۵.
- ۲- Afkhami-Ardakani M. Shirband A. Golzade J. Asadi-Samani M. Latifi E. Kheylypour M. Jafari N (2013). The effect of iron oxide nanoparticles on liver enzymes (ALT, AST and ALP), thyroid hormones (T3 and T4) and TSH in rats [Research]. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences 14:82-88. <http://78.39.35.44/article-1-1141-fa.html>
- ۳- Aslian S. Yazdanparast R (2018). Hypolipidemic activity of *Dracocephalum kotschy* involves FOXO1 mediated modulation of PPARgamma expression in adipocytes. Lipids in Health and Disease 17:245. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0893-3>
- ۴- Chen S. Shao L. Ma L (2021). Cerebral Edema Formation After Stroke: Emphasis on Blood-Brain Barrier and the Lymphatic Drainage System of the Brain. Frontiers in Cellular Neuroscience 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.716825>
- ۵- Donkor ES (2018). Stroke in the 21(st) Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. Stroke Research and Treatment 2018:3238165. <https://doi.org/10.1155/2018/3238165>
- ۶- Ebrahim Sajjadi S. Movahedian Atar AM. Yektaian A (1998). Antihyperlipidemic effect of hydroalcoholic extract, and polyphenolic fraction from *Dracocephalum kotschy* Boiss. Pharmacologia Acta Helvetiae 73:167-170. [https://doi.org/10.1016/s0031-6865\(98\)00016-8](https://doi.org/10.1016/s0031-6865(98)00016-8)
- ۷- Eskandari M MJ, Delaviz H, Hosseini E (2016). The Effects of Hydroalcoholic Extract of *Dracocephalum Kotschy* on Blood Glucose and Lipid Profile in Diabetic Rats. Journal of Advanced Biomedical Sciences 5:526-533.
- ۸- Farimani MM. Sarvestani NN. Ansari N. Khodaghali F (2011). Calycopterin promotes survival and outgrowth of neuron-like PC12 cells by attenuation of oxidative- and ER-stress-induced apoptosis along with inflammatory response. Chemical Research in Toxicology. 24:2280-2292. <https://doi.org/10.1021/tx200420a>
- ۹- Fonseca FAH. Paiva TB. Silva EG. Ihara SSM. Kasinski N. Martinez TLR. Filho EEM (1998). Dietary magnesium improves endothelial dependent relaxation of balloon injured arteries in rats. Atherosclerosis 139:237-242. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(98\)00069-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(98)00069-0)
- ۱۰- Foroozandeh E. Asadi Gharooneh HA (2021). *Dracocephalum kotschy* Boiss.: An Iranian endemic medicinal plant; A review. Journal of Medicinal Herbs, Journal of Medicinal Herbs (Formerly known as Journal of Herbal Drugs or J. Herb Drug) 12:9-17. <https://doi.org/10.30495/medherb.2021.679008>

- 12- Gadotti VM, Zamponi GW (2019). Anxiolytic effects of the flavonoid luteolin in a mouse model of acute colitis. *Molecular Brain* 12:114. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0539-z>
- 13- Ghavam M, Manconi M, Manca ML, Bacchetta G (2021). Extraction of essential oil from *Dracocephalum kotschy* Boiss. (Lamiaceae), identification of two active compounds and evaluation of the antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacol* 267:113513. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113513>
- 14- Golshani S, Karamkhani F, Monsef-Esfahani HR, Abdollahi M (2004). Antinociceptive effects of the essential oil of *Dracocephalum kotschy* in the mouse writhing test. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 7:76-79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144738>
- 15- Hassanshahiyan M, Saadatfar A, Masoumi F (2018). Antimicrobial properties of *Hyssopus officinalis* extract against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm form. *Biological Journal of Microorganism* 7:91-101. <https://doi.org/10.22108/bjm.2017.105971.1080>
- 16- Heydari P, Yavari M, Adibi P, Asghari G, Ghanadian SM, Dida GO, Khamesipour F (2019). Medicinal Properties and Active Constituents of *Dracocephalum kotschy* and Its Significance in Iran: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019:9465309. <https://doi.org/10.1155/2019/9465309>
- 17- Jahaniani F, Ebrahimi SA, Rahbar-Roshandel N, Mahmoudian M (2005). Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschy* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry* 66:1581-1592. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.035>
- 18- Kanekar SG, Zacharia T, Roller R (2012). Imaging of stroke: Part 2, Pathophysiology at the molecular and cellular levels and corresponding imaging changes. *American Journal of Roentgenology* 198:63-74. <https://doi.org/10.2214/AJR.10.7312>
- 19- Kavvadias D, Monschein V, Sand P, Riederer P, Schreier P (2003). Constituents of sage (*Salvia officinalis*) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor. *Planta Medica* 69:113-117. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37712>
- 20- Kawabori M, Yenari MA (2015). Inflammatory responses in brain ischemia. *Current Medicinal Chemistry*. 22:1258-1277. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150209154036>
- 21- Keshavarzi Z, Safari F, Alipour B, Khoshniat A, Azizi R, Vatanchian M, Maghool F (2022). Antioxidant Effects of *Dracocephalum kotschy* Extract in the Experimental Colitis Model Induced by Acetic Acid. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research* 30:1-8. <https://doi.org/10.30699/jambs.30.e56821>
- 22- Keshavarzi Z, Safari F, Alipour B, Khoshniat A, Azizi R, Vatanchian M, Maghool F (2022). Antioxidant Effects of Methanol Extract of *Dracocephalum kotschy* in Acetic Acid Induced Rat Colitis Model [Original Article]. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research* 30:39-46. <https://doi.org/10.30699/jambs.30.e56821>
- 23- Khaksar S, Bigdeli M, Samiee A, Shirazi-Zand Z (2022). Antioxidant and anti-apoptotic effects of cannabidiol in model of ischemic stroke in rats. *Brain Research Bulletin*. 180:118-130. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.001>
- 24- Khaksar S, Bigdeli MR (2017). Anti-excitotoxic effects of cannabidiol are partly mediated by enhancement of NCX2 and NCX3 expression in animal model of cerebral ischemia. *European Journal of Pharmacology* 794:270-279. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.011>
- 25- Lee HS, Namkoong K, Kim DH, Kim KJ, Cheong YH, Kim SS, Lee WB, et al. (2004). Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvascular Research*. 68:231-238. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2004.07.005>
- 26- Li W, Yang S (2016). Targeting oxidative stress for the treatment of ischemic stroke: Upstream and downstream therapeutic strategies. *Brain Circulation*. 2:153-163. <https://doi.org/10.4103/2394-8108.195279>
- 27- Ling L, Alattar A, Tan Z, Shah FA, Ali T, Alshaman R, Koh PO, et al. (2020). A Potent Antioxidant Endogenous Neurohormone Melatonin, Rescued MCAO by Attenuating Oxidative Stress-Associated Neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology*. 11:1220. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01220>
- 28- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91. <https://doi.org/10.1161/01.str.20.1.84>
- 29- Monsef-Esfahani HR, Karamkhani F, Nickavar B, Abdi K, Faramarzi MA (2007). The volatile constituents of *Dracocephalum kotschy* oils.

- Chemistry of Natural Compounds 43:40-43. <https://doi.org/10.1007/s10600-007-0027-z>
- 30- Mukhtar YM. Adu-Frimpong M. Xu X.Yu J (2018). Biochemical significance of limonene and its metabolites: future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. Bioscience Reports. 38. <https://doi.org/10.1042/BSR20181253>
- 31- Rabiei Z. Bigdeli M. Lorigooini Z (2015). A Review of Medicinal Herbs with Antioxidant Properties in the Treatment of Cerebral Ischemia and Reperfusion [Review]. Journal of Babol University of Medical Sciences 17:47-56. <https://doi.org/10.22088/jbums.17.12.47>
- 32- Ramirez-Sanchez J. Pires ENS. Meneghetti A. Hansel G. Nunez-Figueroa Y. Pardo-Andreu GL. Ochoa-Rodriguez E, et al. (2019). JM-20 Treatment After MCAO Reduced Astrocyte Reactivity and Neuronal Death on Peri-infarct Regions of the Rat Brain. Molecular Neurobiology. 56:502-512. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1087-8>
- 33- Reglodi D. Tamas A. Lengvari I (2003). Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. Brain Research Bulletin. 59:459-466. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(02\)00962-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(02)00962-0)
- 34- Sadraei H. Asghari G. Khanabadi M. Minaiyan M (2017). Anti-inflammatory effect of apigenin and hydroalcoholic extract of *Dracocephalum kotschyi* on acetic acid-induced colitis in rats. Research in Pharmaceutical Sciences. 12:322-329. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.212050>
- 35- Sadraei H. Asghari G. Shahverdi F (2016). Antidiarrhoeal assessment of hydroalcoholic and hexane extracts of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. and apigenin in mice. Research in Pharmaceutical Sciences. 11:200-209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27499789>
- 36- Sadraei H. Ghanadian SM. Moazeni S (2019). Inhibitory effect of hydroalcoholic and flavonoids extracts of *Dracocephalum kotschyi*, and its components luteolin, apigenin and apigenin-4'-galactoside on intestinal transit in mice. Journal of Herbmed Pharmacology 8:8-13. <https://doi.org/10.15171/jhp.2019.02>
- 37- Safary A. Zadhoush F. Yegdaneh A. Hosseini-Sharifabad A. Talebi A. Sadraei H (2022). The Effect of *Dracocephalum Kotschyi* Hydroalcoholic Extract on Biochemical and Hematological Parameters in Rat. Journal of Isfahan Medical School 40:278-287. <https://doi.org/10.48305/jims.v40.i669.0278>
- 38- Sameni H. Ramhormozi P. Bandegi A. Taherian A. Safari M. Tabriziamjad M (2014). Effects of hydroalcoholic extract of Iranian Propolis on blood serum biochemical factors in streptozotocin-induced diabetic rats [Research]. Koomesh journal 15:388-395. <http://koomeshjournal.semums.ac.ir/article-1-2096-fa.html>
- 39- Sarvestani NN. Khodaghali F. Ansari N. Farimani MM (2013). Involvement of p-CREB and phase II detoxifying enzyme system in neuroprotection mediated by the flavonoid calycopterin isolated from *Dracocephalum kotschyi*. Phytomedicine 20:939-946. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.03.013>
- 40- Seyedalipour B. Anoosha F. Taravati A. Hosseini S (2017). An Evaluation of Biochemical and Hematological Parameters of Blood in Male Rats after Exposure to Nickel and Nickel Chloride Nanoparticles [Research]. Journal of Babol University of Medical Sciences. 19:58-66. <https://doi.org/10.18869/acadpub.jbums.19.11.58>
- 41- Seyedemadi P. Rahnema M. Bigdeli MR. Oryan S. Rafati H (2016). The Neuroprotective Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Hydroalcoholic Extract on Cerebral Ischemic Tolerance in Experimental Stroke. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 15:875-883. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243285>
- 42- Shaabani M. Mousavi SH. Azizi M. Ashraf Jafari A (2020). Cytotoxic and apoptogenic effects of *Dracocephalum kotschyi* Boiss., extracts against human glioblastoma U87 cells. Avicenna Journal of Phytomedicine. 10:594-603. <https://doi.org/10.22038/ajp.2020.15623>
- 43- Sharma P. Sharma S. Singh D (2020). Apigenin reverses behavioural impairments and cognitive decline in kindled mice via CREB-BDNF upregulation in the hippocampus. Nutritional Neuroscience. 23:118-127. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1478653>
- 44- Sun MS. Jin H. Sun X. Huang S. Zhang FL. Guo ZN. Yang Y (2018). Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018:3804979. <https://doi.org/10.1155/2018/3804979>
- 45- Tellone E. Galtieri A. Russo A. Giardina B. Ficarra S (2015). Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases. Oxidative

- Medicine and Cellular Longevity. 2015:392169. <https://doi.org/10.1155/2015/392169>
- 46- Wong TY. Tan YQ. Lin SM. Leung LK (2017). Apigenin and luteolin display differential hypocholesterolemic mechanisms in mice fed a high-fat diet. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 96:1000-1007. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.131>
- 47- Wu L. Xiong X. Wu X. Ye Y. Jian Z. Zhi Z. Gu L (2020). Targeting Oxidative Stress and Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 13:28. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00028>
- 48- Zhuang L. Kong Y. Yang S. Lu F. Gong Z. Zhan S. Liu M (2021). Dynamic changes of inflammation and apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury in mice investigated by ferumoxytol-enhanced magnetic resonance imaging. *Molecular Medicine Reports*. 23. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11921>
- 49- Zulfiqar Z. Shah FA. Shafique S. Alattar A. Ali T. Alvi AM. Rashid S, et al. (2020). Repurposing FDA Approved Drugs as JNK3 Inhibitor for Prevention of Neuroinflammation Induced by MCAO in Rats. *Journal of Inflammation Research*. 13:1185-1205. <https://doi.org/10.2147/JIR.S284471>

The effects of the methanolic extract of *Dracocephalum Kotschy* Boiss on the prevention of brain ischemia-induced damage in rats

Khaksar S.^{1*}, Saboora A.¹, Jahanbakhshi Z.¹, Vahidi S.² and Chekidehkhon Z.¹

¹ Dept. of Plant Sciences, Faculty of biological Sciences, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Physiology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Stroke, as the most important cause of physical disability in the world, imposes many financial and psychological costs on the patient, family, and society. Recently, the attention of many researchers has been attracted to the use of more effective components with less side effects such as medicinal plants. *Dracocephalum Kotschy* Boiss can be a suitable candidate for the present study due to its neuroprotective properties. 35 male rats were divided into five main groups: control, the methanolic extract of *Dracocephalum Kotschy* Boiss-received group, ischemia, and ischemia + extract - received group. Biochemical parameters of blood serum and animal weight were measured in the control and extract-received group. In the ischemia group, the rats underwent cerebral ischemia induction surgery without receiving any treatment. The extract, as a pretreatment, was administered in the ischemia + extract-received group with a dose of 50 mg/kg orally for five days. Then, brain ischemia surgery was performed. Eventually, the groups undergoing ischemia surgery were evaluated using behavioral tests, infarct volume, and cerebral edema. The results showed that the extract had no harmful effect on the biochemical factors of blood serum. In addition, the extract reduced neurological defects, infarct volume and cerebral edema in the cortex area. Based on the results of the present study, it can be stated that the administration of the extract of *Dracocephalum Kotschy* Boiss attenuated some of the damages caused by cerebral ischemia. Therefore, we can hope for this natural plant compound as a suitable candidate in the pharmaceutical industry.

Key words: Methanolic Extract of *Dracocephalum Kotschy* Boiss, Cerebral Ischemia, Biochemical Parameters, Infarction, Brain Edema.