

بررسی اثر زعفران و مواد موثره آن، سافرانال و کروسین، بر روی حافظه سالم و تخریب شده با هیوسین بر یادگیری فضایی در موش صحرایی

حسین حسین‌زاده^{۱*}، تکتیم ضیایی^۲

۱- استاد، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی مرکز تحقیقات علوم دارویی و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
 ۲- داروساز، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
 *آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵-۱۳۶۵
 تلفن: ۸۸۲۳۲۵۵ (۰۵۱۱)، نمابر: ۸۲۳۳۲۵۱ (۰۵۱۱)
 پست الکترونیک: hosseinzadehh@mums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۵/۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۸۳/۳/۱۷

چکیده

مقدمه: بررسی‌های رفتاری و الکتروفیزیولوژی نشان می‌دهند که عصاره زعفران اختلالات حافظه ناشی از تجویز اتانل را بهبود می‌بخشد. هدف: در این تحقیق اثرات تزریق داخل صفاقی عصاره آبی زعفران و دو ماده موثره آن یعنی کروسین و سافرانال بر روی حافظه سالم و حافظه تخریب شده با هیوسین به روش ماز آبی موریس در موش صحرایی بررسی شد. روش بررسی: هر موش به مدت ۵ روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) از ۴ ربع حوضچه ماز به طور تصادفی تحت آزمایش قرار گرفت. مواد و عصاره‌ها به جز هیوسین (۲۰ دقیقه) یک ساعت قبل از شروع آزمایش به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز پنجم فعالیت حرکتی به روش جمعه باز بر روی حیوانات انجام شد. یافته‌ها: عصاره آبی زعفران در محدوده دوزهای ۰/۵۶-۰/۲۵ گرم بر کیلوگرم در مجموع در یافتن سکو تأثیری نداشت. فقط دوز ۰/۰۵ گرم بر کیلوگرم عصاره آبی زعفران با گذشت زمان باعث کاهش زمان یافتن سکو شد. کروسین با دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مجموع به خصوص در روزهای ۴ و ۵ اثری بر روی مدت زمان یافتن سکو نداشت. سافرانال در محدوده دوزهای ۰/۷۵ - ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم با افزایش دوز زمان یافتن سکو افزایش یافت. اثر عصاره آبی و دو ماده موثره آن بر روی حافظه تخریب شده توسط دوزهای پایین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و بالای (۰/۵ گرم بر کیلوگرم) هیوسین نیز بررسی شد. عصاره آبی زعفران با دوزهای پایین باعث کاهش اثرات تخریبی هیوسین (در هر دو دوز) بر روی حافظه شد. کروسین با دوزهای متفاوت اثرات گروه هیوسین را در یافتن سکو کاهش داد. سافرانال در دوز ۰/۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم اثرات تخریبی دوز پایین هیوسین را کاهش داد. اثرات این مواد و زعفران بر روی فعالیت حرکتی موش صحرایی به روش جمعه باز بررسی شد. عصاره زعفران و مواد موثره آن تقریباً وابسته به دوز باعث کاهش فعالیت حرکتی در حیوانات شد. مصرف توام این ترکیبات همراه با هیوسین نیز در مجموع باعث کاهش فعالیت حرکتی شد. نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره آبی زعفران، کروسین و سافرانال تأثیری بر روی حافظه سالم نداشته ولی باعث کاهش اثرات تخریبی حافظه ناشی از هیوسین می‌شود. عصاره زعفران و کروسین می‌توانند در آینده نوید بخش داروهای در کاهش اختلالات حافظه و یادگیری ناشی از زوال مغزی در بیماری‌هایی چون آلزایمر باشند. گل‌واژگان: زعفران، کروسین، سافرانال، حافظه، یادگیری، ماز آبی موریس



مقدمه

کارتونویدهای کروسستین و فرم‌های گلیکوزیدی دی‌جنتیوبیوزید (کروسین)، جنتیوبیوزید، گلوکوزید، جنتیوگلوکوزید و دی‌گلوکوزید بتا - کروسستین (منومیل استر)، گاما‌کروسستین (دی متیل استر)، آلفا - کاروتن، بتا- کاروتن، لیکوپن و زیرانتین^۱ هستند [۹]. به طور کلی از زعفران، عصاره‌ها و تنتورهای آن در طب سنتی به عنوان ضداسپاسم، کمک به هضم طبیعی غذا، تسکین‌دهنده ناراحتی‌های لثه، ضد آبریزش، آرام‌بخش، ضدنفخ، افزاینده تعریق، خلط آور، محرک، مقوی معده، محرک تمایلات جنسی و ایجاد قاعدگی زودرس استفاده می‌شده است [۹]. امروزه مطالعات وسیعی در مورد اثرات مختلف زعفران صورت گرفته است. این تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره زعفران علیه طیف وسیعی از تومورهای موشی و سلول‌های لوسمی انسانی و دیگر مدل‌های سرطانی عملکرد خوبی داشته است [۱۰، ۱۱، ۱۲]. عصاره آبی و الکلی زعفران همچنین تشنج ناشی از پنتیلن ترازول و الکتروشوک را در موش مهار کرد [۱۳]. عصاره‌های کلالة و گلبرگ زعفران همچنین اثرات ضد التهابی، ضد دردی و ضد افسردگی در مدل‌های حیوانی از خود نشان دادند [۱۴، ۱۵].

بررسی‌های رفتاری و الکترو فیزیولوژی نشان می‌دهند که عصاره زعفران اختلالات حافظه ناشی از تجویز اتانل را بهبود بخشیده و اثرات اتانل را در هیپوکامپ آنتاگونیست می‌کند [۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹]. در این مطالعه اثر عصاره آبی کلالة زعفران و مواد موثره آن کروسین و سافرانال بر روی حافظه فضایی موش‌های صحرایی با حافظه سالم و تخریب شده با هیوسین در مدل حافظه و یادگیری ماز آبی موریس^۲ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوان

موش‌های صحرایی^۳ نر بالغ از نژاد Wistar با محدوده وزنی ۱۸۰-۲۵۰ گرم از مرکز نگهداری و تکثیر حیوانات دانشکده داروسازی تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات

زوال مغزی^۱ ممکن است با علل مختلف از جمله بیماری Lewy bodg، «آلزایمر»^۲، «پیک»^۳ و اختلالات مغزی و عروقی به وجود آید. به دنبال زوال مغزی اختلالات شناختی و به طور عمده از دست رفتن حافظه رخ می‌دهد. بیماری آلزایمر شایع‌ترین نوع زوال مغزی است که توجه‌گر ۶۰-۵۰ درصد علت زوال مغزی در سنین بالای ۶۵ سال می‌باشد. تاکنون درمان موفقی جهت درمان زوال مغزی و به طور عمده بیماری آلزایمر معرفی نشده است. طی ده گذشته تعدادی مهارکننده AChE مانند ریواستیگمین^۴ و گالانتایمین^۵، استروژن‌ها و داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی جهت درمان یا پیشگیری بیماری آلزایمر استفاده شده‌اند [۱]. علی‌رغم استفاده وسیع مهارکننده‌های AChE، مطالعات جدید نشان می‌دهد این ترکیبات اثر چندانی در درمان زوال مغزی با علل غیر از بیماری آلزایمر ندارند [۲].

علاوه بر داروهای شیمیایی از گیاهان نیز جهت درمان اختلالات شناختی استفاده یا به طور تجربی مورد تحقیق قرار گرفته‌اند. از این گونه گیاهان می‌توان به *Ginkgo biloba* [۳]، مریم گلی (*Salvia officinalis*) [۴]، *S. lavandulaefolia* [۵]، بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) [۶]، *Panax ginseng* [۷]، *Bacopa monniera* [۸] و غیره اشاره کرد.

گیاه زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. از خانواده Iridaceae گیاهی علفی، بدون ساقه و پایا است. ترکیباتی از زعفران که واجد اثرات فارماکولوژیکی هستند مواد تلخی هستند که از سافرانال و پیگمان‌های مربوط به کارتونیوید کروسستین مشتق می‌شوند. از مواد تلخ، مهمترین آنها پیکروکروسین است. تجزیه پیکروکروسین^۶ (که یک گلوکوزید است) به روش هیدرولیز اسیدی، موجب تولید گلوکز، آگلیکون فرار، و سافرانال (دهیدرو- بتا- سیکلوسیترال) می‌شود. از ترکیبات رنگی، مهمترین آنها شامل انواع

¹ Zeaxanthin

² Morris Water Maze

³ Rat

¹ Dementia

² Alzheimer

³ Pick

⁴ Rivastigmine

⁵ Galantamine

⁶ Picrocrocin



هر موش به مدت ۵ روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) از ۴ ربع حوضچه به طور تصادفی تحت آزمایش قرار گرفت. در هر تجربه حیوان به طوری که صورتش به طرف دیواره استوانه باشد از یکی از چهار نقطه شروع (شمال، جنوب، شرق یا غرب) در آب رها می‌شد. هر یک از چهار نقطه شروع در هر نوبت یک بار استفاده می‌شد. یک تجربه زمانی به اتمام می‌رسید هرگاه موش بر روی سکو رفته و یا ۹۰ ثانیه گذشته باشد. سپس ۳۰ ثانیه به حیوان فرصت داده می‌شد و پس از آن، تجربه بعدی شروع می‌گردید. موش‌هایی که محل سکو را پیدا نمی‌کردند توسط آزمایشگر به روی سکو منتقل شده و اجازه می‌یافتند ۳۰ ثانیه در آنجا بمانند. پس از اتمام تجربه چهارم موش‌ها از حوضچه خارج می‌شدند. مواد و عصاره‌ها به جز هیوسین (۲۰ دقیقه) یک ساعت قبل از شروع آزمایش به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۲۰].

در روز پنجم یک سری آزمون‌های حرکتی به صورت جمعی باز بر روی حیوانات انجام می‌شد.

تعیین فعالیت حرکتی

آزمون جمعی باز (Open field activity)

پس از تزریق ماده مورد بررسی این تست در اتاقی که شرایط اتاق نگهداری حیوانات را داشت در محفظه‌ای چوبی به طول‌های ۱۰۰ × ۱۰۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر که با رنگ سفید پوشیده شده بود انجام شد. داخل محفظه چوبی با خط‌های قرمز رنگ به ۲۵ خانه تقسیم شده بود که هر خانه ۲۰ × ۲۰ سانتی‌متری بود. حیوانات در زمان مقرر در خانه مرکزی قرار داده شدند و اعمال آنها به مدت ۵ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. تعداد دفعاتی که حیوان وارد خانه‌های جدول می‌شد شمارش صورت می‌گرفت [۲۱].

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار گزارش شده است. پس از انجام ANOVA و در صورت معنی‌دار بودن آن از تست Tukey - Kramer استفاده شد. نتایج با $p < 0/05$ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

به گروه‌های ۶ تایی تقسیم شدند و در قفس‌های مخصوص با شرایط دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هیچ‌گونه محدودیت غذا یا آب برای حیوانات وجود نداشت.

مواد

مواد مورد بررسی شامل زعفران، کروسین، سافرانال و هیوسین بودند. زعفران، کروسین و هیوسین در نرمال سالین حل شد. سافرانال به شکل مایع تهیه شده بود.

عصاره‌گیری

الف: عصاره آبی

از روش خسیانیدن برای تهیه عصاره آبی استفاده شد. ۴ گرم از کلاله زعفران پودر شد، سپس داخل ظرف شیشه‌ای تیره ریخته و به آن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت محتویات ظرف سانتریفوژ و رسوبات جدا گردید. با کمک دستگاه حذف حلال در خلا در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد آب حذف شد و عصاره تغلیظ شده برای خشک شدن کامل به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، پس از خشک شدن کامل در یخچال نگهداری و در طی یک هفته مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون حافظه و یادگیری

جهت ارزیابی اثر مواد بر روی حافظه و یادگیری فضایی روش ماز آبی موریس استفاده شد. دستگاه ماز آبی موریس مورد استفاده از یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ با قطر ۱۳۶ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر تشکیل شده بود که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر آن با آب 1 ± 20 درجه سانتی‌گراد شده بود. یک سکوی کوچک از جنس فلز تیره رنگ شده با قطر ۱۰ سانتی‌متر، یک سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز ربع دایره جنوب غربی قرار داشت. آزمایش‌ها در اتاق نسبتاً تاریکی انجام گرفت که علائم قابل رؤیتی در چهار طرف آن نصب شده بود و حیوان می‌توانست با استفاده از این علائم موقعیت سکوی پنهان را پیدا کند.

موش به طور تصادفی از یکی از ربع‌های حوضچه آزاد می‌شد و زمان پیدا کردن سکو توسط آزمایشگر ثبت می‌گردید.

¹ Open field



مجموع به خصوص در روزهای ۴ و ۵ اثری بر روی مدت زمان یافتن حافظه نداشت (جداول شماره ۳ و ۴).

ج- سافرانال

سافرانال وابسته به دوز زمان یافتن سکو را افزایش داد ($p < 0/001$, $p < 0/01$) (جداول شماره ۵ و ۶).

II- حافظه تخریب شده با هیوسین

الف- هیوسین

هیوسین با دوز پایین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و بسیار بالا (۰/۵ گرم بر کیلوگرم) باعث افزایش زمان یافتن سکو شد. این اثر به خصوص با دوز بالا بارزتر بود ($p < 0/001$, $p < 0/01$) (جداول شماره ۱ و ۲).

نتایج

آزمون ماز آبی موریس

I- حافظه سالم

الف- عصاره آبی زعفران

عصاره آبی زعفران در دوز پایین (۰/۰۰۲۵ گرم بر کیلوگرم) فاقد اثر بر روی مدت زمان یافتن سکو بود. با افزایش دوز به ۰/۰۰۵ گرم بر کیلوگرم طی مدت ۵ روز باعث کاهش زمان یافتن سکو در حیوانات شد ($p < 0/001$). این اثر زعفران با افزایش دوز کاهش و به نحوی که در دوز بالا (۰/۰۵۶-۰/۰۴ گرم بر کیلوگرم) زمان یافتن سکو افزایش یافت (جداول شماره ۱ و ۲).

ب- کروسین

کروسین با دوزهای ۲۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در

جدول شماره ۱- بررسی اثر عصاره آبی زعفران به تنهایی و همراه با هیوسین (۱ mg/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	
۵۷/۸۸ ± ۲/۳۳	۳۶/۹۲ ± ۱/۷۹	۳۵/۲ ± ۲/۳	۲۱/۱۷ ± ۰/۸۹	۱۶/۲۱ ± ۰/۸	نرمال سالین ۱۰ ml/kg
۸۲/۰۸ ± ۵/۰۲	۵۶/۱ ± ۳/۰۴	۴۳/۴۲ ± ۲/۹۹	۴۷/۷۹ ± ۲/۶۸	۵۷/۸۳ ± ۲/۹۳	هیوسین ۱ mg/kg
++	++		+++	+++	
۶۱/۲۶ ± ۴/۲	۴۰/۲۵ ± ۲/۹۴	۲۵/۵ ± ۱/۶۶	۲۰/۸۷ ± ۱/۹۲	۲۲/۶۲ ± ۲/۰۸	عصاره آبی زعفران ۰/۰۰۲۵ g/kg
۸۲/۵۸ ± ۳/۲	۵۵/۴۶ ± ۱۱/۰۲	۴۳/۰۴ ± ۴/۱۶	۴۱/۹۲ ± ۲/۲	۴۰/۱۲۵ ± ۳/۵۷	هیوسین ۱ mg/kg + عصاره آبی زعفران ۰/۰۰۲۵ g/kg
++			+++	+++ ***	
۷۹/۴۲ ± ۱۰/۵۸	۵۵/۹۲ ± ۲/۴۶	۳۱/۲۵ ± ۱/۵۴	۲۲/۱۷ ± ۱/۴۴	۱۸/۰۴ ± ۰/۶۴	عصاره آبی زعفران ۰/۰۱ g/kg
۵۰/۸۸ ± ۳/۲۳	۷۹/۳۸ ± ۱۰/۶	۵۶/۵ ± ۳/۲۴	۴۰/۱۷ ± ۱/۶۳	۴۳/۷۹ ± ۲/۲۱	هیوسین ۱ mg/kg + عصاره آبی زعفران ۰/۰۱ g/kg
**	+++ *	+++ **	+++ *	+++ ***	
۵۶/۷۷ ± ۳/۱۴	۳۸/۵۸ ± ۲/۳۳	۲۹/۲۵ ± ۲/۳۶	۲۲/۵۴ ± ۲/۳۳	۲۶ ± ۱/۷	عصاره آبی زعفران ۰/۰۴ g/kg

۹۰ ± ۰	۸۴/۰۴ ± ۴/۵۵	۸۷/۳ ± ۱/۷۲	۷۴/۷۹ ± ۴/۹۵	۷۴/۱۷ ± ۷/۲۳	هیوسین ۱ mg/kg + عصاره آبی زعفران ۰/۰۴ g/kg
+++	+++ ***	+++ ***	+++ ***	+++ *	

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (* و نرمال سالین (+)، آزمون توکی کرامر: ($p < 0/001$), ($p < 0/01$), ($p < 0/01$) و (***) ($p < 0/001$), (***) ($p < 0/001$), (*) ($p < 0/05$).



جدول شماره ۲- بررسی اثر عصاره آبی زعفران به تنهایی و همراه با هیوسین (۰/۵ g/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	
۵۵/۲۹ ± ۲/۴۸	۴۹/۱۲ ± ۳/۸	۲۸/۷ ± ۱/۸	۲۴/۲۹ ± ۱/۵۶	۲۰/۰۴ ± ۰/۳۸	نرمال سالیین ۱۰ ml/kg
۸۷/۸ ± ۱/۷۹	۸۹ ± ۰/۸	۸۹/۱۷ ± ۰/۸	۸۸/۱۷ ± ۱/۶۴	۸۸/۵ ± ۰/۹۶	هیوسین ۰/۵ g/kg
+++	+++	+++	+++	+++	
۷۴/۰۴ ± ۳/۱	۲۲/۵ ± ۳/۵	۲۹/۳ ± ۱/۲	۸/۷۵ ± ۱/۱	۹/۷۹ ± ۰/۹۴	عصاره آبی زعفران g/kg
** ++	*** +++	***	*** +++	*** +++	۰/۰۰۵
۵۷/۹۶ ± ۲/۴	۶۸/۲۵ ± ۳/۶۲	۶۸/۲۹ ± ۲/۴۸	۶۳/۹۸ ± ۳/۵۶	۵۶ ± ۲/۷۲	هیوسین ۰/۵ g/kg + عصاره
***	*** ++	*** +++	*** +++	*** +++	آبی زعفران ۰/۰۰۵ g/kg
۷۴/۶ ± ۴/۴۸	۳۹/۲ ± ۲/۱	۲۱/۷۵ ± ۱/۵	۱۴/۸ ± ۱/۲۸	۱۸/۸۷ ± ۱/۹۲	عصاره آبی زعفران g/kg
* ++	***	***	*** +++	***	۰/۰۱
۸۳/۸۹ ± ۳/۶	۸۷/۵ ± ۲/۵	۹۰ ± ۰	۹۰ ± ۰	۹۰ ± ۰	هیوسین ۰/۵ g/kg + عصاره
+++	+++	+++	+++	+++	آبی زعفران ۰/۰۱ g/kg

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (*): و نرمال سالیین (+)، آزمون توکی کرامر: (p < ۰/۰۰۱، +++ p < ۰/۰۱، ++ p < ۰/۰۱) و (p < ۰/۰۰۱، *** p < ۰/۰۱، ** p < ۰/۰۵، * p < ۰/۰۱)

جدول شماره ۳- بررسی اثر کروسین به تنهایی و همراه با هیوسین (۱ mg/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	
۵۷/۸۸ ± ۲/۳۳	۳۶/۹۲ ± ۱/۷۹	۳۵/۲ ± ۲/۳	۲۱/۱۷ ± ۰/۸۹	۱۶/۲۱ ± ۰/۸	نرمال سالیین ۱۰ ml/kg
۸۲/۰۸ ± ۵/۰۲	۵۶/۱ ± ۳/۰۴	۴۳/۴۲ ± ۲/۹۹	۴۷/۷۹ ± ۲/۶۸	۵۷/۸۳ ± ۲/۹۳	هیوسین ۱ mg/kg
+++	++		+++	+++	
۳۵/۵ ± ۲/۰۱	۲۹/۳۳ ± ۲/۵۵	۲۴ ± ۱/۴۴	۳۰/۵۸ ± ۱/۳۱	۱۳/۹۲ ± ۱/۱۴	کروسین ۵۰ mg/kg
++		++	++		
۸۴/۱۷ ± ۵/۸۳	۷۶/۴ ± ۸/۶	۳۶/۵ ± ۱/۳۲	۲۸/۵۸ ± ۱/۷۳	۱۳/۲ ± ۱/۲۱	هیوسین ۱ mg/kg + کروسین
++	+++ *		+ ***	***	۵۰ mg/kg
۷۵/۷۱ ± ۳/۴۶	۵۸/۳۴ ± ۳/۲۶	۴۰/۹۶ ± ۳/۵	۱۹/۲۵ ± ۱/۴۸	۱۸/۰۴ ± ۰/۷۷	کروسین ۲۰۰ mg/kg
+	+++				
۸۴/۱۷ ± ۵/۸۳	۷۶/۴ ± ۸/۶	۳۶/۵ ± ۱/۳۲	۲۸/۵۸ ± ۱/۷۳	۱۳/۲ ± ۱/۲۱	هیوسین ۱ mg/kg + کروسین
++	+++ *		+ ***	***	۲۰۰ mg/kg

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (*): و نرمال سالیین (+)، آزمون توکی کرامر: (p < ۰/۰۰۱، +++ p < ۰/۰۱، ++ p < ۰/۰۵، + p < ۰/۰۵) و (p < ۰/۰۰۱، *** p < ۰/۰۱، ** p < ۰/۰۵، * p < ۰/۰۵)



جدول شماره ۴- بررسی اثر کروسین به تنهایی و همراه با هیوسین (۰/۵ g/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	
۵۵/۲۹ ± ۲/۴۸	۴۹/۱۲ ± ۳/۸	۲۸/۷ ± ۱/۸	۲۴/۲۹ ± ۱/۵۶	۲۰/۰۴ ± ۰/۳۸	نرمال سالین ۱۰ ml/kg
۸۷/۸ ± ۱/۷۹	۸۹ ± ۰/۸	۸۹/۱۷ ± ۰/۸	۸۸/۱۷ ± ۱/۶۴	۸۸/۵ ± ۰/۹۶	هیوسین ۰/۵ g/kg
+++	+++	+++	+++	+++	
۷۴/۵ ± ۳/۵۶	۴۰/۳۸ ± ۲/۵۵	۲۰/۶۷ ± ۱/۴۴	۳۰/۱۲ ± ۱/۹۹	۱۲/۱۲ ± ۰/۸۹	کروسین ۲۰۰ mg/kg
* ++	***	*** ++	*** +	*** +++	
۸۲/۹ ± ۴/۴۸	۷۹/۲ ± ۶/۹	۶۸/۱ ± ۳/۸۹	۵۲/۹ ± ۳/۲۲	۳۴/۸ ± ۱/۹۶	هیوسین ۰/۵ g/kg + کروسین
+++	+++	+++	+++	+++	۲۰۰ mg/kg

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+)، آزمون توکی کرامر: (p < ۰/۰۰۱، +++، p < ۰/۰۱، ++، p < ۰/۰۵، +) و (p < ۰/۰۰۱، ***، p < ۰/۰۱، **، p < ۰/۰۵، *)

جدول شماره ۵- بررسی اثر سافرانال به تنهایی و همراه با هیوسین (۱ mg/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	
۵۷/۸۸ ± ۲/۳۳	۳۶/۹۲ ± ۱/۷۹	۳۵/۲ ± ۲/۳	۲۱/۱۷ ± ۰/۸۹	۱۶/۲۱ ± ۰/۸	نرمال سالین ۱۰ ml/kg
۸۲/۰۸ ± ۵/۰۲	۵۶/۱ ± ۳/۰۴	۴۳/۴۳ ± ۲/۹۹	۴۷/۷۹ ± ۲/۶۸	۵۷/۸۳ ± ۲/۹۳	هیوسین ۱ mg/kg
++	++		+++	+++	
۸۶/۹۶ ± ۳/۰۴	۳۷/۵۸ ± ۲/۸۵	۴۰/۴۵ ± ۱/۴۳	۳۲/۷۵ ± ۱/۹۳	۱۷ ± ۱/۳۴	سافرانال ۰/۲ ml/kg
+++			++		
۸۳/۷۱ ± ۴/۱۹	۷۱/۷۵ ± ۵/۸۱	۴۴/۷۱ ± ۳/۱۴	۴۰/۵ ± ۲/۵۱	۲۷/۹۶ ± ۰/۹۹	هیوسین ۱ mg/kg + سافرانال
+++	+++ *		+++	+++ ***	۰/۲ ml/kg
۷۳/۲۹ ± ۷/۷۴	۵۴/۰۴ ± ۳/۳۲	۵۶ ± ۳/۲۱	۵۴/۴۸ ± ۱/۴۱	۴۷/۵۴ ± ۳/۳۸	سافرانال ۰/۵ ml/kg
		+++	+++	+++	
۸۱/۲۹ ± ۸/۷۱	۶۷/۴۶ ± ۱۰/۲۶	۵۲/۴۲ ± ۳/۳۲	۵۹/۲۵ ± ۳/۰۰۵	۶۰/۶ ± ۳/۳۶	هیوسین ۱ mg/kg + سافرانال
		++	***	+++	۰/۵ ml/kg

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+)، آزمون توکی کرامر: (p < ۰/۰۰۱، +++، p < ۰/۰۱، ++، p < ۰/۰۵، +) و (p < ۰/۰۰۱، ***، p < ۰/۰۱، **، p < ۰/۰۵، *)

جدول شماره ۶- بررسی اثر سافرانال به تنهایی و همراه با هیوسین (۰/۵ g/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	
۵۵/۲۹ ± ۲/۴۸	۴۹/۱۲ ± ۳/۸	۲۸/۷ ± ۱/۸	۲۴/۲۹ ± ۱/۵۶	۲۰/۰۴ ± ۰/۳۸	نرمال سالین ۱۰ ml/kg
۸۷/۸ ± ۱/۷۹	۸۹ ± ۰/۸	۸۹/۱۷ ± ۰/۸	۸۸/۱۷ ± ۱/۶۴	۸۸/۵ ± ۰/۹۶	هیوسین ۰/۵ g/kg
+++	+++	+++	+++	+++	
۴۵/۷ ± ۲/۳۶	۵۵/۷۵ ± ۲/۶۱	۳۷/۰۴ ± ۱/۹۵	۲۳/۴۲ ± ۲/۰۷	۲۸/۴۵ ± ۱/۰۱	سافرانال ۰/۲ ml/kg
+++ +	**	***	***	***	
۸۲/۶۹ ± ۷/۳۶	۷۷/۷ ± ۱۲/۳	۷۳/۶۵ ± ۱۶/۳۵	۷۷/۵۶ ± ۱۲/۴۴	۸۷ ± ۳	هیوسین ۰/۵ g/kg + سافرانال
+++	+	++	+++	+++	۰/۲ ml/kg

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+)، آزمون توکی کرامر: (p < ۰/۰۰۱، +++، p < ۰/۰۱، ++، p < ۰/۰۵، +) و (p < ۰/۰۰۱، ***، p < ۰/۰۱، **، p < ۰/۰۵، *)



ب- عصاره زعفران و هیوسین

عصاره زعفران با دوزهای پایین (۰/۰۱ و ۰/۰۲۵ گرم بر کیلوگرم) در روزهای چهارم و پنجم باعث یافتن زمان سکو در گروه هیوسین و عصاره شد ($p < ۰/۰۰۱$, $p < ۰/۰۰۵$). همچنین زعفران با دوز ۰/۰۰۵ گرم بر کیلوگرم در تمامی روزها به طور معنی داری اثرات هیوسین با دوز بالا را مهار کرد ($p < ۰/۰۰۱$, $p < ۰/۰۰۱$) (جدول شماره ۱ و ۲).

ج- کروسین و هیوسین

کروسین با دوز ۲۰۰-۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثرات هیوسین با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم را در روزهای چهارم و پنجم ($p < ۰/۰۰۱$) و با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثرات هیوسین ۰/۵ گرم بر کیلوگرم را در روزهای سوم الی پنجم مهار کرد ($p < ۰/۰۰۱$) (جدول شماره ۳ و ۴).

د- سافرانال و هیوسین

سافرانال اثری در کاهش اثرات تخریبی هیوسین بر روی حافظه در هر دو دوز آن نداشت. فقط سافرانال دوز ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم در روز پنجم باعث کاهش اثرات هیوسین (۱ میلی گرم بر کیلوگرم) شد ($p < ۰/۰۰۱$) (جدول شماره ۵ و ۶).

آزمون جمعیه باز (Open field activity)

الف- عصاره آبی زعفران

عصاره آبی زعفران در اکثر دوزها و به خصوص با دوز بالا (۰/۵۶ گرم بر کیلوگرم، نتایج نشان داده نشده است، $p < ۰/۰۰۱$) باعث کاهش فعالیت حرکتی شد (شکل های شماره ۱ و ۲).

ب- کروسین

کروسین با دوز کم ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عملاً تاثیری بر روی فاکتورهای حرکتی نداشت. دوز بالای آن (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش فعالیت حرکتی شد ($p < ۰/۰۰۱$), ($p < ۰/۰۰۱$) (شکل های شماره ۱ و ۲).

ج- سافرانال

سافرانال وابسته به دوز به طور بارزی فعالیت حرکتی را کاهش داد ($p < ۰/۰۰۱$, $p < ۰/۰۰۱$, $p < ۰/۰۰۵$) (شکل های شماره ۱ و ۲).

د- هیوسین

هیوسین با دوز پایین (۱ mg/kg) عملاً اثری بر روی فعالیت حرکتی نداشت ولی با دوز بالا (۰/۵ g/kg) به طور بارزی فعالیت حرکتی را کاهش داد ($p < ۰/۰۰۱$) (شکل های شماره ۱ و ۲).

ه- عصاره آبی زعفران و هیوسین

مصرف توام زعفران با هیوسین باعث افزایش فعالیت حرکتی در اکثر موارد نسبت به گروه هیوسین شد. اگرچه به حد گروه نرمال سالین نرسید ($p < ۰/۰۰۱$) (شکل های شماره ۱ و ۲).

و- کروسین و هیوسین

کروسین تاثیری بر روی فعالیت حرکتی هیوسین با دوز بالا نداشت. ولی همراه با هیوسین ۱ mg/kg با دوز بالا کروسین فعالیت حرکتی کاهش یافت ($p < ۰/۰۰۱$) (شکل های شماره ۱ و ۲).

ز- سافرانال و هیوسین

سافرانال با دوز ۰/۲ میلی لیتر بر کیلوگرم تاثیر بر فعالیت حرکتی هیوسین ۰/۵ گرم بر کیلوگرم نداشت. سافرانال با دوز مذکور فعالیت حرکتی هیوسین ۱ میلی گرم بر کیلوگرم را کاهش داد ($p < ۰/۰۰۱$) (شکل های شماره ۱ و ۲).

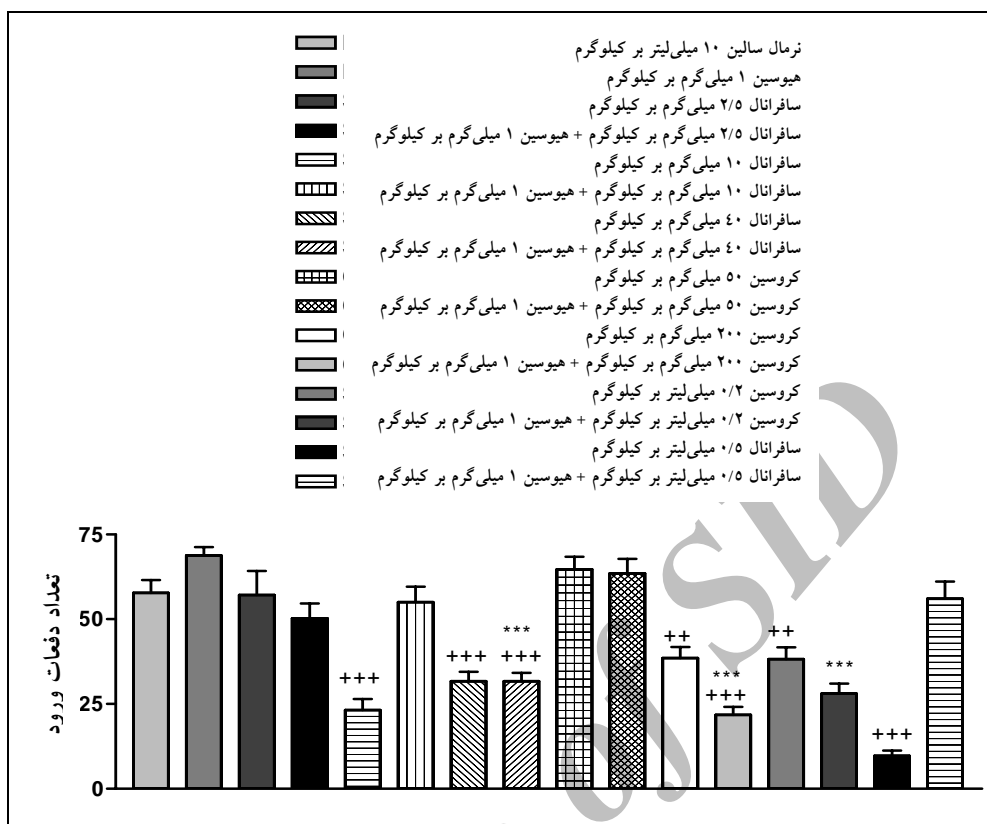
بحث

نتایج این تحقیق نشان می دهد که در مجموع زعفران و مواد موثره آن، کروسین و سافرانال بر روی حیوانات با حافظه سالم اثری در تقویت حافظه ندارند ولی می توانند باعث کاهش اثرات تخریبی هیوسین بر روی حافظه شوند.

اخیراً مشخص شده است که عصاره الکلی زعفران، فرایند یادگیری و حافظه را در موش تحت تاثیر قرار می دهد [۲۲]. نتایج این مطالعه نشان داد که دوزهای ۵۰۰-۱۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره مذکور به صورت خوراکی، به خودی خود بر رفتار یادگیری موش ها در آزمون های احترازی غیرفعال^۱ بی تاثیر است ولی قادر است اختلالات حافظه ناشی از اتانل را

^۱ Passive avoidance tests





شکل شماره ۱ - بررسی اثر عصاره آبی زعفران، کروسین و سافراناال به تنهایی و همراه با هیوسین (۱ mg/kg) بر فعالیت حرکتی در آزمون جعبه باز (Open-field test) تعداد دفعات ورود به هر خانه جعبه در مدت ۵ دقیقه ارزیابی شد. هر بار مابین میانگین + انحراف معیار برای نتایج ۶ موش صحرایی است. آزمون توکی کرامر: مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+) و $p < 0/001$ (+++) و $p < 0/001$ (***)، $p < 0/01$ (**).

است. زعفران فقط در دوز نسبتاً پایین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست باعث تقویت یافتن سکو توسط موش صحرایی در روزهای آخر شود. در دوزهای بالاتر به علت اثرات سداتیو زعفران این اثر کاهش یافته است به نحوی که آزمایش‌های جعبه باز نشان‌دهنده کاهش بارز فعالیت حرکتی است.

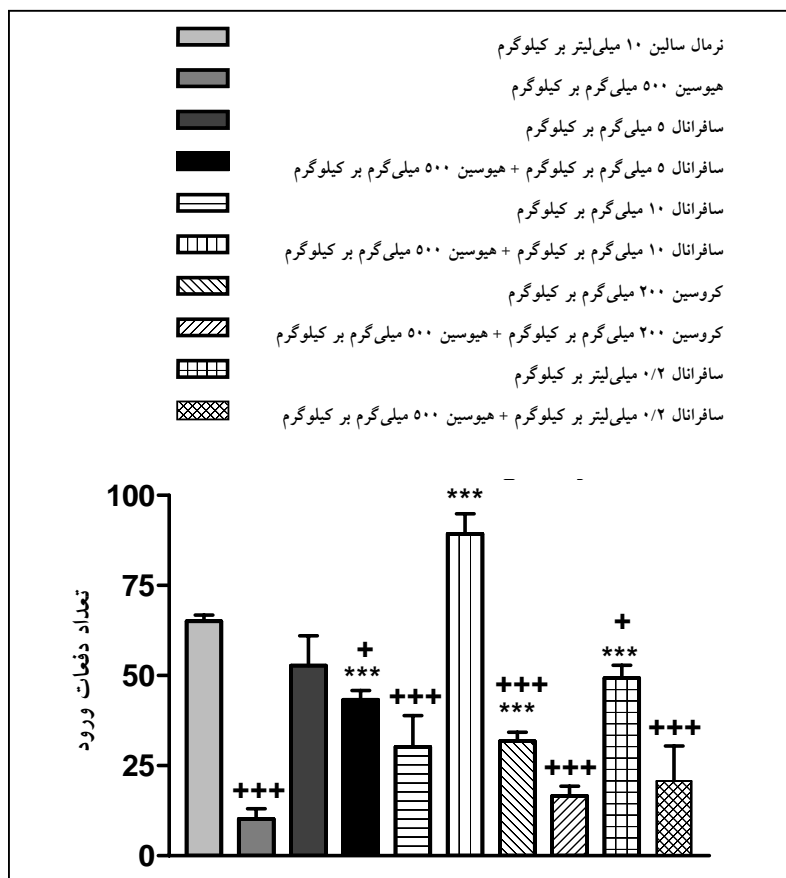
عدم اثر بر روی حافظه سالم در مورد گیاهانی چون *Panax ginseng* و *Ginkgo biloba* نیز گزارش شده است [۲۳، ۲۴]. این دو گیاه علی‌رغم موثر بودن در افزایش حافظه و یادگیری افراد مبتلا به بیماری‌های زوال مغزی همانند بیماری آلزایمر [۲۵، ۲۶] ولی در داوطلبان سالم طبق بعضی گزارش‌ها فاقد اثر بر روی حافظه بوده‌اند.

به مقدار قابل توجهی بهبود بخشید. بررسی‌های بیشتر نشان داد که این اثرات زعفران توسط مهمترین ترکیب آن کروسین اعمال شده است.

به عنوان مثال Sugiura و همکارانش [۱۹] مشخص کردند که کروسین با دوزهای ۲۰۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به خوبی قادر است اختلالات حافظه ناشی از تجویز اتانل در موش‌ها را برطرف سازد. این در حالی بود که کروسین به تنهایی چنین تاثیری بر فرایند حافظه نداشت. ضمن اینکه در این آزمایش، ماده موثره دیگر زعفران به نام پیکروکروسین به کلی فاقد چنین اثراتی بوده است.

یافته بررسی ما مبنی بر عدم تاثیر زعفران و مواد موثره آن بر روی حافظه سالم مطابق با مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژیکی





شکل شماره ۲- بررسی اثر عصاره آبی زعفران، کروسین و سافرانال به تنهایی و همراه با هیوسین (۵۰۰ mg/kg) بر فعالیت حرکتی در آزمون جعبه باز؛ (Open-field test) تعداد دفعات ورود به هر خانه جعبه در مدت ۵ دقیقه ارزیابی شد. هر بار مبین میانگین + انحراف معیار برای نتایج ۶ موش صحرایی می باشد. آزمون توکی کرامر: مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+). (*** $p < 0/001$) و (++) $p < 0/05$ و (+) $p < 0/01$).

شواهد متعددی در دست است که نشان می دهند بیماری های استحال عصبی سیستم اعصاب مرکزی شامل آلزایمر، پارکینسون و Amyotrophic Lateral Sclerosis در اثر آسیب سلولی ناشی از فعالیت رادیکال های آزاد ایجاد می شوند. عصاره زعفران حاوی کاروتنوئیدهای فراوانی است که دارای اثرات آنتی اکسیدانتی قوی هستند و می توانند سلول های عصبی سیستم اعصاب مرکزی را در برابر آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کنند [۱] در نتیجه عصاره زعفران یا مواد موثره آن، به خصوص کروسین، قادر هستند

کروسین و سافرانال بر روی حافظه سالم اثر تقویت کننده نداشتند ولی کروسین اثرات هیوسین بر روی حافظه را در هر دوز مهار کرد. این اثر با گزارش های قبلی که کروسین اثرات تخریبی اتانول را بر روی حافظه کاهش داده است هماهنگی دارد [۱۸، ۱۹]. سافرانال در مجموع بر روی حافظه سالم و تخریب شده اثری نداشت. احتمالاً اثرات سداتیو بیشتر سافرانال در این امر دخیل است، ترکیبات مانند بنزودیازپین ها که اثرات آرامبخش و خواب آور دارند نیز باعث کاهش حافظه و یادگیری و موجب فراموشی می شوند [۲۷].



تشکر و قدردانی

بدین وسیله از شرکت محترم نوین زعفران و شرکت محترم شهرک‌های صنعتی خراسان که در تامین بودجه این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

انواع خاصی از اختلالات حافظه و یادگیری را با مکانیسم‌های مختلف بهبود بخشند.

بر این اساس، زعفران و یا کروسین می‌توانند در درمان بیماری‌های استحال‌های عصبی سیستم اعصاب مرکزی که همراه با زوال حافظه و یادگیری هستند موثر واقع شوند.

منابع

1. Howes M-J R, Perry NSL, Houghton PJ. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother. Res.* 2003; 17: 1-18.
2. Fajemisin B. Acetylcholinesterase inhibitors: donepezil, rivastigmine, tacrine or galantamine for non-Alzheimer's dementia. In Foxcroft DR, Muthu V (Eds) *STEER: Succinct and Timely Evaluated Evidence Reviews*. 2002; 2 (2).
3. Gajewski A, Hensch SA. *Ginkgo biloba* and memory for a maze. *Psychol. Rep.* 1999; 84:481-484.
4. Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2003; 28: 53-59.
5. Perry NSL, Houghton PJ, Jenner P, Keith A, Perry EK. *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase in vivo. *Phytomedicine*. 2002; 9: 48-51.
6. Perry EK, Pickering AT, Wang WW, Houghton PJ, Perry NSL. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999; 51: 527-534.
7. Nitta H, Matsumoto K, Shimizu M, Ni XH, Watanabe H. *Panax ginseng* extract improves the scopolamine-induced disruption of 8-arm radial maze performance in rats. *Biol. Pharmac. Bull.* 1995; 18: 1439 - 1442.
8. Singh HK, Dhawan BN. Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on avoidance responses in rat. *J. Ethnopharmacol.* 1982; 5: 205-14.
9. Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Mániz S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother. Res.* 1996; 10: 189-93.
10. Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. *Cancer Biother.* 1995; 10: 257 - 64.
11. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp. Biol. Med.* 2002; 227: 20 - 25.
12. Tarantilis PA, Morjani H, Polissiou M, Manfait M. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Res.* 1994; 14: 1913-18.
13. Hosseinzadeh H, Khosravan V. Anticonvulsant effects aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. *Arch. Irr. Med.* 2002; 5, 44-47.
14. Hosseinzadeh H, Younesi H. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *BMC Pharmacol.* 2002; 2, 7.
15. Karimi G, Hosseinzadeh H, Khaleghpanah P. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extract of *Crocus sativus* in mice. *Irr. J. Basic Med. Sci.* 2001; 4: 11-15.
16. Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother. Res.* 2000; 14: 149-152.



17. Sugiura M, Shoyama Y, Saito H and 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. Ther.* 1994; 271: 703-707.
18. Sugiura M, Shoyama Y, Saito H and Abe K. Ethanol extract of *Crocus sativus* L. antagonizes the inhibitory action of ethanol on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Phytother. Res.* 1995; 9: 100-104.
19. Sugiura M, Shoyama Y, Saito H and Nishiyama N. Crocin improves the ethanol-induced impairment of learning behaviors of mice in passive avoidance tasks. *Proc. Japan Acad.* 1995; 71: 319-24.
20. Nakagawa Y, Takashima T. The GABAB receptor antagonist CGP36742 attenuates the baclofen-an scopolamine-induced deficit in Morris water maze task in rats. *Brain Res.* 1997; 766: 101-106.
21. Pardon MC, Perez-Diaz F, Joubert C, Cohen-Salmon C. Age- dependent effects of a chronic ultramild stress procedure on open-field behaviour in B6D2F1 female mice. *Physiol Behav.* 2000; 70: 7-13.
22. Zhang Y, Shoyama Y, Sugiura M, Saito H. Effects of *Crocus sativus* L. on the ethanol-induced impairment of passive avoidance performances in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 1994; 17: 217-221.
23. Persson J, Bringlöv E, Nilsson LG, Nyberg L. The memory-enhancing effects of Ginseng and *Ginkgo biloba* in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003; 25, In press.
24. Sorensen H, Sonne J. A double-masked study of the effects of ginseng on cognitive functions. *Curr. Ther. Res.* 1996; 57: 959-968.
25. Søholm B. Clinical improvement of memory and other cognitive functions by *Ginkgo biloba*: review of relevant literature. *Adv. Ther.* 1998; 15: 54-65.
26. Zhong YM, Nishijo H, Uwano T, Tamura R, Kawanishi K, Ono T. Red ginseng ameliorated place navigation deficits in young rats with hippocampal lesions and aged rats. *Physiol. Behav.* 2000; 69: 511-525.
27. Tohyama K, Nabeshima T, Ichihara K, Kameyama T. Involvement of gabaergic systems in benzodiazepine-induced impairment of passive avoidance learning in mice. *Psychopharmacology.* 1991; 105: 22-26.

