ارزیابی اثر نوروپروتکتیو عصاره گیاه پونه بر ایسکمی و خونرسانی مجدد مغزی در رت‌های نر نژاد ویستار

فرهاد فتحی[1*]، شهربانو عریان[2]، محمود رفیعیان[3]، اکرم عیدی[4]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲- استاد نورواندوکرینولوژی، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران
۳- استاد فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
٤- دانشیار فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
* آدرس مکاتبه: تهران، انتهای بزرگراه شهید ستاری، میدان دانشگاه، بلوار شهدای حصارک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی
کدپستی: ۱٤۷۷۸۹۳۸۵۵، تلفن: ٤٤۸٤٥۱٤۷ (۰۲۱)، نمابر: ٤٤۸٦۷۱٤۱
پست الکترونیک: farhadfathi.370@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۲ **تاریخ تصویب:** ۹٤/۲/۲۰

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که عصاره پونه (***Mentha longifolia* L. Extract: ME**) اثرات آنتی‌اکسیدانی دارد.

هدف: در این مطالعه سعی شده تا اثر عصاره پونه بر روی ایسکمی کانونی مغز در رت مشخص شود.

روش بررسی: پنج گروه (n=۱٤) مطالعه شدند: گروه کنترل و شم آب مقطر را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. سه گروه دیگر، **ME** را در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای مدت ۲۱ روز دریافت کردند. هر گروه اصلی به دو زیر گروه، یکی برای عمل جراحی جهت ارزیابی حجم آسیب بافتی و دیگری به صورت سالم جهت ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید در مغز و سرم تقسیم شد.

نتایج: پیش تیمار با **ME** منجر به کاهش معنی‌داری در حجم کلی آسیب مغزی شد. **ME** ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در ناحیه پنومبرا و کانون مغز نسبت به کنترل به طور معنی‌داری افزایش داد. قدرت آنتی‌اکسیدانی سرم در گروه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. سطح مالون دی آلدئید در ناحیه پنومبرا به طور معنی‌داری در گروه کنترل نسبت به دیگر گروه‌های تیمار شده افزایش یافته بود. **ME** در گروه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری سطح مالون دی آلدئید در ناحیه کانون را نسبت به گروه کنترل کاهش داد. به علاوه **ME** با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سطح مالون دی آلدئید سرم را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: **ME** منجر به حفاظت در برابر سکته مغزی بوسیله افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش پراکسیداسیون لیپید و کاهش در حجم آسیب مغزی می‌شود.

گل‌واژگان: ایسکمی مغزی، پراکسیداسیون لیپید، خونرسانی مجدد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره ***Mentha longifolia* L.**

www.SID.ir

مقدمه

طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO) سکته فقدان سریع عملکرد مغزی در جریان اختلال در خونرسانی مغز می‌باشد [۱]. سکته مغزی سومین عامل مرگ و میر و ناتوانی در کشورهای صنعتی است و در صورت زنده ماندن، عوارضی چون فلج ناحیه‌ای از بدن و مشکلاتی در حافظه، فکر کردن، حرف زدن و حرکت کردن به وجود می‌آورد. ۱۵ درصد سکته‌ها به علت هموراژی و ۸۵ درصد توسط ایسکمی به وقوع می‌پیوندد. ایسکمی در اثر عواملی چون ترومبوز، امبولی و کاهش خونرسانی سیستمیک به وجود می‌آید [۲]. ایسکمی کانونی بخش‌های محدود و مشخصی از مغز یعنی کپسول داخلی، هسته دمدار یا کورتکس را به طور عادی از طریق انسداد شریان میانی مغز MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) تحت تأثیر قرار می‌دهد. ایسکمی کانونی در پاسخ به انسداد شریانی میانی مغز به طور گذرا یا دائمی رخ می‌دهد. مشخصه ایسکمی کانونی یک مرگ غیرقابل اجتناب در طی چند دقیقه اول سکته در ناحیه‌ای است که هیچ‌گونه جریان خون و در نتیجه هیچ ATP ای وجود ندارد، این ناحیه به نام «کانون ایسکمی» شناخته می‌شود. اما در اطراف این ناحیه دچار نکروز شده، منطقه‌ای وجود دارد که در آنجا جریان خون هنوز به مقدار کمی وجود دارد، بافتی که از لحاظ الکتریکی خاموش است و به سختی مقدار کافی جریان خون به منظور زنده ماندن می‌گیرد، ناحیه‌ای که به آن «پنومبرای ایسکمی» می‌گویند. در مدل ایسکمی MCAO کانون معادل ناحیه زیر قشری و پنومبرا معادل ناحیه قشری مغز می‌باشد [۳].

ایسکمی مغزی گذرا بوسیله هیپوکسی در یک دوره زمانی کوتاه مشخص می‌شود که بوسیله یک دوره طولانی ادامه می‌یابد که در این مرحله بافت با یک جریان خون که به خوبی اکسیژن‌دار می‌باشد، مشروب می‌شود. خونرسانی مجدد مقدار زیادی از رادیکال‌های آزاد را در بافت تولید می‌کند که به طور خاص عامل تخریب ماکرو مولکول‌هایی نظیر: پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غشاهای سلولی هستند. نتیجه نهایی پاتوفیزیولوژیک متغیر است که به اندامک‌های درون سلولی یا ماکرومولکول‌های تحت تأثیر واقع شده بستگی دارد [٤]. در طول ایسکمی افزایش غلظت کلسیم، موجب فعال شدن نیتریک اکسید سنتازهای (NOS) وابسته به کالمودولین می‌شود. غلظت‌های غیر فیزیولوژیکی نیتریک اکسید (NO) سبب آسیب‌های نیتروساتیو (Nitrosative) می‌شود. همچنین هنگامی که NO با سوپراکسید ترکیب می‌شود، پراکسی نیتریت را به وجود می‌آورد که در نهایت تمام این اکسیدان‌ها سبب آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شوند [٥]. هنگامی که خونرسانی مجدد رخ می‌دهد اکسیژن‌رسانی باز می‌شود که می‌تواند به خاطر تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS) حتی منجر به تخریب بیشتری نیز شود. این ترکیبات شامل سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پروکسید هیدروژن هستند که به عنوان محصولات جانبی سنتز ATP در میتوکندری تولید می‌شوند. هنگامی که اکسیژن‌رسانی مجدداً برقرار می‌شود، گونه‌های واکنشی اکسیژن تجمع می‌یابند و می‌توانند منجر به تخریب ماکرو مولکول‌های مهم در سلول شوند [٦]. مطالعات برای توسعه عوامل نوروپروتکتیو به منظور درمان سکته بر آنتی‌اکسیدان‌ها متمرکز شده‌اند. آنتی‌اکسیدان‌ها در بسیاری از آزمایش‌ها در محیط‌های آزمایشگاهی و محیط‌های زنده به کار گرفته شده‌اند و برخی از آنها نیز در مطالعات بالینی بررسی شده‌اند [۷].

پلی‌فنول‌ها به فلاوونوئیدها و اسیدهای فنولیک تقسیم می‌شوند [۸]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاوونوئیدها بسیار مهم‌تر به نظر می‌رسد. به علاوه فلاوندوئیدها به عنوان عامل مهمی جهت مهار پراکسیداسیون لیپیدها، تجمیع پلاکت‌ها، کنترل شکنندگی و نفوذپذیری مویرگ‌ها، فعالیت‌های آنزیمی سیکلوکسیژناز و لیپوکسیژناز شناخته شده‌اند. آنها این اعمال را به خاطر اثرات آنتی‌اکسیدانی و قدرت حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد انجام می‌دهند [۱۱، ۱۰، ۹].

فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی فلاوونوئیدها بر ضدرادیکال‌های آزاد به توانایی هیدروژن‌دهندگی آنها نسبت داده می‌شود [۱۲]. پیشنهاد شده است که آنتی‌اکسیدانت‌های گیاهی ممکن است از آسیب‌های مغزی پیشگیری کنند یا صدمات مغزی ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد را درمان

Archive of SID
www.SID.ir

کنند. بنابراین، آن موضوع جالبی است که اثرات آنتی‌اکسیدانت‌ها و حذف‌کنندگان یا عوامل به دام‌انداز رادیکال‌های آزاد برای استفاده به عنوان عوامل بنیادی حفاظتی مغز در برابر آسیب‌های متنوع مغزی نظیر آسیب مغزی ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد مطالعه شوند [۱۳].

گیاهان متعددی وجود دارند که جهت تعدیل کردن اثرات زیان‌بار هیپوکسی یا ایسکمی شناسایی شده‌اند. گیاه *Mentha longifolia* L. در ایران عموماً به اسم پونه شناخته می‌شود به جنس *Mentha*، خانواده Lamiaceae تعلق دارد و با گیاهان معطر و دارویی همبستگی دارد [۱٤]. بخش‌های هوایی *M. longifolia* خصوصیت دارویی دارند. گزارش شده که عصاره گونه‌های *Mentha* اثرات قارچ‌کشی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی دارد [۱٦، ۱۵]. آزمایش‌های فیتوشیمیایی نشان می‌دهند که ترکیبات اصلی بخش‌های هوایی *M. longifolia* شامل تانین‌ها، ساپونین‌ها و فلاوونوئیدها است [۱۷].

به هرحال، تاکنون هیچ مطالعه‌ای انجام نگرفته که اثرات نوروپروتکتیو عصاره *M. longifolia* (ME) را روی آسیب‌های مغزی ناشی از ایسکمی و خونرسانی مجدد بررسی کند. بنابراین این مطالعه به گونه‌ای طراحی شده تا اثر تیمار عصاره *M. longifolia* L. با دوزهای متنوع که به صورت درون صفاقی در رت تزریق شده است روی حجم آسیب مغزی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و نیز پراکسیداسیون لیپید در مغز و سرم رت جهت حفاظت در برابر ایسکمی کانونی مغز مشخص شود.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره

گیاه پونه (ساقه و برگ) از دشت‌های اطراف شهرستان شهرکرد تهیه شده و نمونه‌های موردنظر توسط گیاه‌شناس مورد تأیید قرار گرفت و سپس به مدت ده روز در سایه خشک شدند. نمونه هرباریومی گیاه مورد نظر در واحد هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به شماره ۳٦۵ نگهداری می‌شود. مقدار ۵۰ گرم پودر گیاه خشک شده به ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول (۹٦ درصد) اضافه شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق نگه داشته شد تا عمل خیساندن کامل و ترکیبات گیاه از آن استخراج شود. سپس توسط کاغذ صافی آن را صاف کرده و در فشار پایین تقطیر شد تا حلال خارج شده و عصاره تغلیظ شده به دست آمد. عصاره‌گیری یک مرتبه با رعایت نسبت‌های ذکر شده انجام گرفت. در نهایت با خشک کردن کامل عصاره در آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد میزان عصاره‌دهی آن ۷/۵٦ درصد w/w تعیین شد.

حیوانات آزمایشگاهی

مطالعه بر روی رت‌های نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۳۵۰ – ۳۰۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، انجام گرفت. حیوانات در قفس‌های استاندارد در دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی – تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. در طی مطالعه آب و غذای کافی در دسترس حیوانات قرار داشت. تمام مطالعات انجام شده بر روی حیوانات منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود.

روش انجام آزمایش‌ها

گروه‌بندی و مراحل اجرای آزمایش‌ها آنها به صورت ذیل انجام شد:

گروه کنترل: حیوانات این گروه جراحی نشده و روزانه آب مقطر دریافت کردند. **گروه شم:** جراحی شده ولی ایسکمی نشدند و آب مقطر دریافت کردند. **گروه‌های تجربی:** حیوانات این گروه جراحی شده و ایسکمی شدند و عصاره را با دوز ۲۰۰ و ۱۰۰ ،۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۲۱ روز از طریق تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

دو ساعت پس از آخرین تیمار، هر گروه اصلی (n= ۱٤) به دو زیر گروه تقسیم شد. یک زیر گروه (n= ۷) تحت عمل جراحی به روش انسداد شریان میانی مغز (MCAO) جهت ارزیابی حجم آسیب بافتی ناشی از سکته قرار گرفت. زیر گروه دوم (n= ۷) به صورت سالم و دست نخورده جهت ارزیابی

Archive of SID
www.SID.ir

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و نیز پراکسیداسیون لیپید در مغز و سرم رت به کار گرفته شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بوسیله رادیکال‌های ثابت DPPH (۱ و ۱ دی فنیل، ۲ پیکریل هیدروزیل) با استفاده از روش قاسمی و همکاران [۱۸] اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه محلول mM ۰/۱ از DPPH در اتانول آماده شد و mL ۱ از این محلول به ۳ میلی‌لیتر از نمونه عصاره در غلظت‌های متفاوت اضافه شد. BHT (Butylated hydroxytoluene) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر محاسبه شد. توانایی حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد به عنوان میزانی از آنتی‌اکسیدان‌های لازم تعریف می‌شود که تراکم رادیکال‌های DPPH آغازی را به میزان ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (IC50). IC50 قدرت حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد. درصد اثر حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Inhibition of free radical by DPPH (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

A_0، جذب نوری کنترل و A_1 جذب نوری در حضور نمونه استاندارد و یا عصاره است (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- قدرت حذف رادیکال‌های آزاد DPPH برای غلظت‌های مختلف عصاره *M. longifolia* و BHT

نمونه	غلظت (µg/ml)	فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های DPPH	
		مهار (درصد)	IC50 (µg/ml)
عصاره *M. longifolia*	۲۰	۱۱/۱۷±۰/۷۵	۶۲/۲۷±۰/۷۲
	۳۰	۲۲/۵۵±۰/۶	
	۴۰	۳۴/۷۹±۰/۳۳	
	۵۰	۴۰/۱±۰/۱۵	
	۶۰	۴۸/۲±۰/۵۳	
	۷۰	۵۴/۰۴±۰/۱۳	
	۸۰	۶۰/۵±۰/۴۸	
	۹۰	۶۶/۲۸±۰/۵۳	
	۱۰۰	۷۳/۴۴±۰/۶۶	
BHT	۱۰	۱۳/۶±۰/۳۸	۳۵/۶۴±۰/۵۶
	۱۵	۲۷/۹±۰/۶۷	
	۲۰	۳۱/۲۶±۰/۶۶	
	۲۵	۳۶/۹۲±۰/۶۶	
	۳۰	۴۷/۳۲±۰/۴۷	
	۳۵	۴۹/۶۱±۰/۷۷	
	۴۰	۵۴/۱۲±۰/۶۵	
	۴۵	۶۲/۳±۰/۶۱	
	۵۰	۶۴/۳۷±۰/۶۶	

Archive of SID
www.SID.ir

ایجاد مدل سکته مغزی (انسداد شریان مرکزی مغز)

موش‌های صحرایی بوسیله تزریق داخل صفاقی کتامین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زیلازین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. مدل‌سازی جراحی انسداد شریان میانی مغز یا همان MCAO مطابق دستورالعمل لونگا (Longa) و همکارانش [۱۹] انجام شد. به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون ۰ – ۳ از طریق تنه شریان کاروتیدی خارجی (ECA) وارد شریان کاروتیدی داخلی (ICA) شد و تا رسیدن به شریان مغزی قدامی (ACA) از میان شریان کاروتیدی داخلی (ICA) با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده شد. در اثر تماس نخ بخیه با ACA جریان خون از هر طرف به شریان میانی مغز (MCA) بسته شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی‌متر طول نخ از تنه ECA مشخص شد. بعد از ٦۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم با کمک دماسنج دیجیتالی (Geratherm color, Germany) اندازه‌گیری شده و در حدود ۳۷ درجه سلسیوس حفظ شد.

ارزیابی حجم آسیب بافتی ناشی از سکته مغزی

چون رت‌های مورد آزمایش عموماً بعد از ۷۲ ساعت از شروع انسداد می‌مردند، بعد از ٢٤ ساعت ارزیابی رفتاری انجام شد. پس از اینکه سر حیوان جدا شد، مغز را به سرعت خارج نموده و آن را در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در سالین سرد قرار دادیم. سپس، مغزهای مورد نظر رت‌ها را در ماتریکس مغز قرار دادیم و آن را به طور کرونال به مقاطع ۲ میلی‌متر برش دادیم. این مغزها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۲ درصد ۲ و ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای رنگ‌آمیزی حیاتی انکوبه شدند. سپس از برش‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال (Lumix-Panasonic, Japan) قابل اتصال به کامپیوتر عکس‌برداری شد. آنگاه مساحت ناحیه آسیب بافتی (مناطقی که رنگ نمی‌گرفت) هر برش با استفاده از نرم‌افزار UTHSCSA Tool Image اندازه‌گیری شد و با ضرب کردن مساحت‌های مذکور در ضخامت ۲ میلی‌متر و جمع اعداد حاصل از ۸ برش، حجم ناحیه آسیب بافتی اندازه‌گیری شد و سپس به واسطه معادله زیر حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده محاسبه شد [۲۰].

(حجم ناحیه آسیب دیده – حجم نیمکره راست) – حجم نیمکره چپ = حجم اصلاح شده ناحیه آسیب‌دیده

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مغز و پلاسما

قدرت آنتی‌اکسیدانی مغز و پلاسما بوسیله اندازه‌گیری توانایی آن در احیاء Fe^{3+} به Fe^{2+} با استفاده از روش FRAP (Ferric Reducting Antioxidant Power) تعیین شد. محلول کار FRAP شامل ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات (۱/۵۵ cc استات سدیم ۳ آبه ($CH_3COONa(3H_2O)$) cc+ ۸ اسید استیک غلیظ (CH_3COOH) با آب مقطر به حجم ۵۰۰ cc رسانده شد)، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول (2,4,6 tripyridyl-s- triazine) TPTZ (٤۷mgr تری آزین در ٤۰ cc HCl ٤۰ mM) حل شد) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول $FeCl_3$ (۲۷۰ mgr از $FeCl_3(6H_2O)$ با آب مقطر به حجم ۵۰ cc رسانده شد) می‌باشد.

۵۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از هموژنیزاسیون مغز یا ۵۰ میکرولیتر از سرم به ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول کار تازه آماده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه کمپلکسی بین Fe^{2+} و TPTZ تشکیل شده که ایجاد یک رنگ آبی می‌نماید. جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر محاسبه و $FeSo_4$ به عنوان محلول استاندارد در این روش استفاده شد [۲۱].

ارزیابی پراکسیداسیون لیپید در مغز و پلاسما

شکل‌گیری مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان یک نشانگر برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدها در جریان ایسکمی/خونرسانی مجدد استفاده می‌شود. آنالیز MDA بوسیله روش تیوباربیتوریک اسید (TBA) برای سال‌های زیاد به طور وسیع مورد استفاده قرار گرفته است [۲۲]. این یک روش اسپکتروفوتومتریک بر اساس گرم کردن نمونه تحت

Archive of SID
www.SID.ir

شرایط اسیدی است تا اینکه کمپلکس $MDA-(TBA)_2$ تشکیل شود. دقت این روش ممکن است مورد سوال قرار گیرد، بنابراین HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) برای ارزیابی کمپلکس $MDA-(TBA)_2$ مورد استفاده قرار گرفت تا حساسیت واکنش افزایش یابد [۲۳]. برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپید در مغز، بعد از قربانی کردن حیوان، سر حیوان جدا شده و مغز سریع‌تر ظرف مدت ۳۰ ثانیه از بدن حیوان مرده خارج شد. سپس ناحیه کورتکس و زیرکورتکس از هر نیمکره جدا گشته و به درون نیتروژن مایع غوطه‌ور شده و بعد از وزن کردن، در بافر تریس (۳ گرم از پودر تریس در ٤٥٠ cc آب مقطر حل شده، سپس ۳۸/۵۲ گرم ساکاروز به علاوه ۱۸٦ میلی‌گرم اتیل دی آمین تترا استیک اسید به آن اضافه شده و حجم نهایی با آب مقطر به ۵۰۰ cc رسانده شد، pH= ۷/٤) هموژنیزه شد. ترکیب هموژنیزه شده با سرعت ٤۰۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی جدا شد. روش TBA در مغز از کارهای حیدریان و همکاران گرفته شده است [۲٤]. در این روش به ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی، ۱۰ میکرولیتر BHT (Butylated hydroxytoluene) ۰/۵ مولار اضافه کرده بعد به این مجموع ۲۰۰ میکرولیتر SDS (Sodium dodecyl sulfate) ۸/۱ درصد و ۱/۵ میلی‌لیتر TBA ۰/۸ درصد (۰/۸ گرم TBA به اضافه ۱۹ سی‌سی اسید استیک ۲۰ درصد با آب مقطر به حجم ۱۰۰ cc رسانده شد، pH=۳/۵) اضافه کردیم. سپس نمونه‌ها به مدت ٦۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) حرارت داده شدند. بعد از خنک کردن در ٤ درجه سانتی‌گراد، ۳ میلی‌لیتر بوتانل پیریدین به نمونه‌ها اضافه شد و با سرعت ٤۰۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت ۱۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی مستقیماً به درون دستگاه HPLC تزریق شد.

ارزیابی MDA در سرم بوسیله روش TBA که توسط اسدی و همکاران تعریف شده، تعیین شد [۲۵]. در این روش به ۵۰ میکرولیتر از سرم، ۵۰ میکرولیتر از BHT ۰/۰۵ درصد اضافه شده و به این مجموعه ٤۰۰ میکرولیتر از H_3PO_4 ۰/٤٤ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر TBA ٤۲ مولار اضافه شد. سپس نمونه‌ها خوب مخلوط شده و در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از خنک کردن در ٤ درجه سانتی‌گراد، به هر کدام از نمونه‌ها ۲۵۰ میکرولیتر بوتانل پیریدین اضافه شده و بعد از مخلوط کردن با سرعت ۱۳۰۰۰ گرم به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرانجام ۱۲۰ میکرولیتر از مایع رویی مستقیماً به دستگاه HPLC تزریق شد.

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه (One-way ANOVA) مورد آنالیز قرار گرفتند (روش مقایسه میانگین‌ها LSD). تمام آنالیزها با کمک نرم‌افزار SPSS V.11.0 انجام شد. داده‌ها به صورت Mean ± SEM نمایش داده می‌شود. $p<۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نتایج

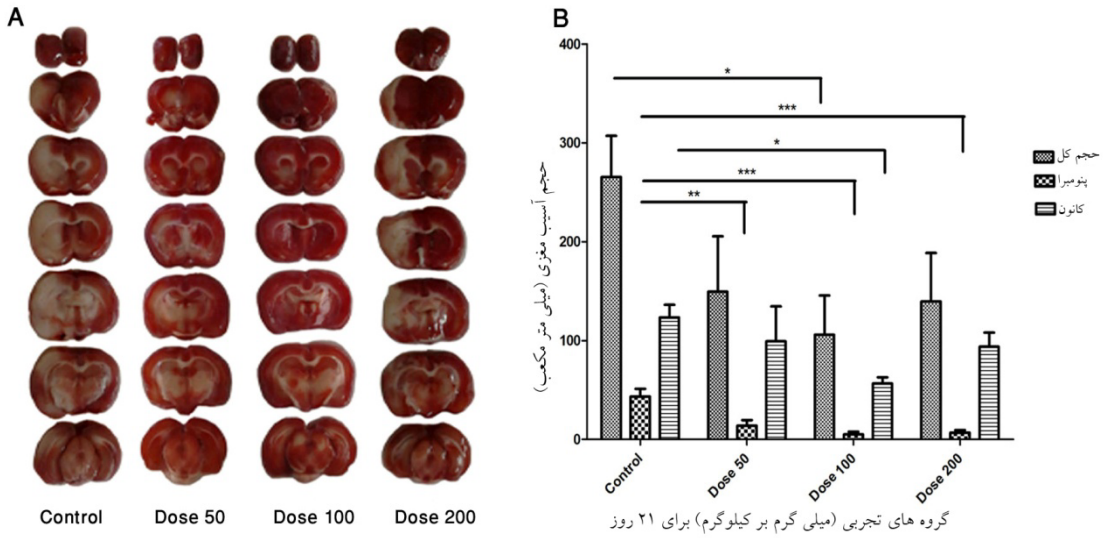
اثر ME روی حجم آسیب ناشی از سکته مغزی

تیمار رت‌ها با عصاره پونه در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۱ روز منجر به یک کاهش معنی‌داری در حجم کلی آسیب بافتی ناشی از سکته مغزی شد ($p<۰/۰۵$). در حالی که دوزهای پایین‌تر و بالاتر، به ترتیب ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز اثری نداشتند (شکل شماره ۱). اثر نوروپروتکتیو ME به طور اصلی در ناحیه پنومبرا (کورتکس) مشاهده شد در حالی که در ناحیه کانون (زیر کورتکس) مغز این اثر به صورت جزئی مشاهده شد. به علاوه تیمار رت‌ها با عصاره پونه در دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز منجر به یک کاهش معنی‌داری در حجم آسیب بافتی ناشی از سکته مغزی در ناحیه پنومبرا شد اما این اثر در ناحیه کانون مشاهده نشد (به ترتیب، $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$).

اثر ME روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مغز و سرم

در مغز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ناحیه پنومبرا (کورتکس) به طور مشابه با کانون (زیر کورتکس) به طور معنی‌داری در گروه کنترل در مقایسه با گروه شم کاهش یافت ($p<۰/۰۰۱$). عصاره *M. longifolia* در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱- (A) شکل‌ها نمایانگر اثر نوروپروتکتیو عصاره پونه بر ایسکمی کانونی مغزی هستند. همه برش‌ها با رنگ TTC، ۲٤ ساعت پس از ٦۰ دقیقه القای ایسکمی رنگ شده‌اند. هر ستون نمایانگر برش‌های کرونال مغزی یک رت هستند. مقاطع به ترتیب، برش‌های مغزی رت‌هایی از گروه کنترل و دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن هستند که با عصاره پونه تیمار شده‌اند. (B) نمودار اثر دوزهای مختلف (کنترل، دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عصاره پونه روی حجم آسیب ناشی از سکته مغزی در گروه‌های آزمایشی مختلف در ناحیه پنومبرا (کورتکس)، کانون (زیر کورتکس) و کل مغز را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵ *، p<۰/۰۱ **، p<۰/۰۰۱ ** و n=۷).

به مدت ۲۱ روز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در ناحیه پنومبرا (به ترتیب، p<۰/۰۱ و p<۰/۰۵) و کانون مغز (p<۰/۰۱)، نسبت به کنترل به طور معنی‌داری افزایش داد. در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، عصاره تغییر معنی‌داری را در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ناحیه پنومبرا و کانون ایجاد نکرد (نمودار شماره ۱).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم خون در گروه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (p<۰/۰۱). گروه‌های شم، ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز نتوانستند به طور معنی‌داری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم خون را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهند (نمودار شماره ۲).

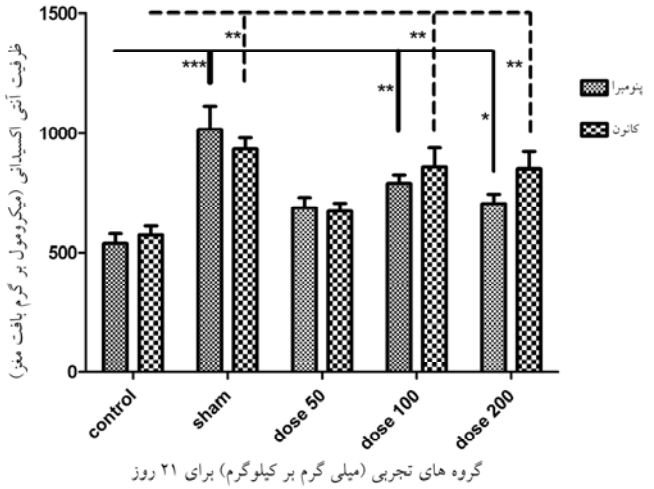
اثر ME روی پراکسیداسیون لیپید در مغز و سرم

میزان پراکسیداسیون لیپید (سطح مالون دی آلدئید) در ناحیه پنومبرا به طور معنی‌داری در گروه کنترل نسبت به دیگر گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز ME افزایش یافته است (p<۰/۰۱). عصاره *M. longifolia* در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز به طور معنی‌داری سطح مالون دی آلدئید در ناحیه کانون را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد (نمودار شماره ۳) (p<۰/۰۵).

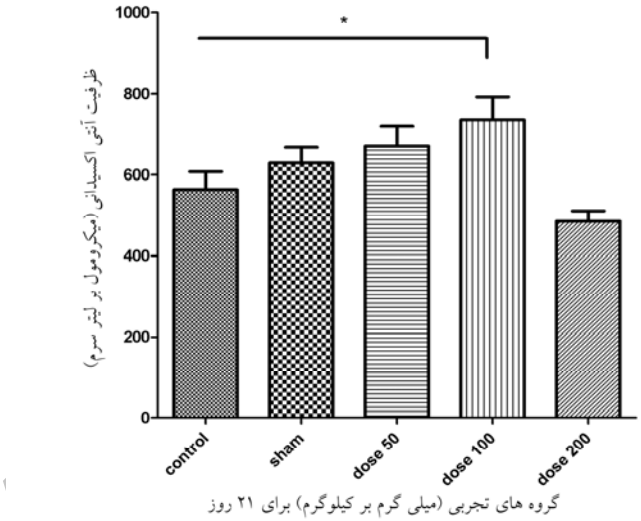
به علاوه عصاره پونه در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز سطح مالون دی آلدئید سرم را به طور معنی‌داری نسبت به کنترل کاهش داده است (p< ۰/۰۱) در حالی که دوز پایین‌تر (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) اثری نداشته است (نمودار شماره ٤). در سرم سطح مالون دی آلدئید به طور معنی‌داری در گروه کنترل در مقایسه با گروه شم افزایش یافته است (p<۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir

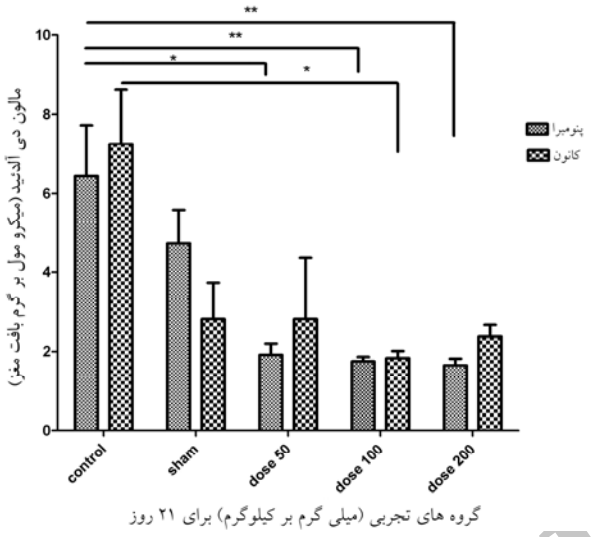


نمودار شماره ۱- اثر عصاره پونه روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ناحیه پنومبرا (کورتکس) و کانون (زیر کورتکس) مغز (p<۰/۰۵ *، p<۰/۰۱ **، p<۰/۰۰۱ * و n= ۵).**

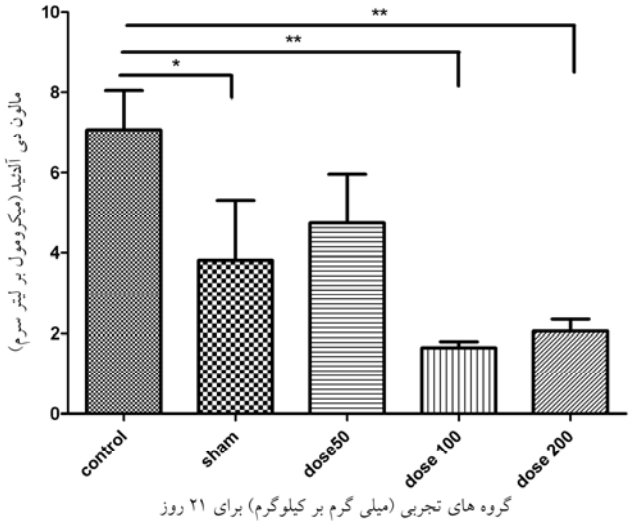


نمودار شماره ۲- اثر عصاره پونه روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم (p<۰/۰۵ * و n=۵)

www.SID.ir



نمودار شماره ۳- اثر عصاره پونه روی سطح مالون دی آلدئید ناحیه پنومبرا (کورتکس) و کانون (زیر کورتکس) مغز (p<۰/۰۵ *، p<۰/۰۱ ** و n=۵)



نمودار شماره ٤- اثر عصاره پونه روی سطح مالون دی آلدئید سرم (p<۰/۰۵ *، p<۰/۰۱ ** و n=۵)

بحث

مدرک قابل توجهی برای نقش مواد غذایی آنتی‌اکسیدانت در حفاظت و نگهداری سلامت وجود دارد به گونه‌ای که به عنوان یک عامل کاهش‌دهنده بیماری‌های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند [۲۷، ۲٦].

مطالعات نشان داده‌اند که ایسکمی مغزی گذرا پراکسیداسیون لیپید را تحریک می‌کند و قدرت آنتی‌اکسیدانی مغز را کاهش می‌دهد [۲۹، ۲۸]. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که ME می‌تواند در درمان سکته مغزی ناشی از ایسکمی گذرا از طریق چند مکانیسم، نظیر اکسیداسیون و متابولیسم لیپید با ارزش باشد [۳۱، ۳۰]. بنابراین، ما فکر کردیم که ME ممکن

www.SID.ir

است یک نقش کلیدی را در درمان اختلالات ایسکمیک سیستم عروقی مغز بازی کند.

این مطالعه اثرات ME روی قدرت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید را مورد توجه قرار داده که در ارزیابی‌های حفاظت نورونی بسیار مهم می‌باشد. اگرچه مکانیسم حفاظت نورونی القاء شده توسط ME به توضیح بیشتری نیاز دارد با این حال این موضوع نشان داده شده است که ترکیبات پلی‌فنولیک در ME فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی خود را به صورت‌های مختلف نظیر دادن اتم هیدروژن و حذف رادیکال‌های آزاد نظیر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن اعمال می‌نمایند. آنتی‌اکسیدان‌ها با دادن اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند، به این ترتیب می‌توان گفت که کارایی و درجه تأثیر یک آنتی‌اکسیدان به سهولت جدا شدن اتم هیدروژن از آن مربوط می‌شود. همچنین این ترکیبات می‌توانند اثرات مهاری بر روی آنزیم‌های دخیل در سنتز لیپید نظیر لیپوژناز داشته باشند و باعث کاهش کلسترول و اکسیداسیون لیپید به دلیل وجود ساختمان پلی فنلی شوند [۱۰، ۹].

تیمار با ME به طور مشخص حجم آسیب ایجاد شده توسط MCAO را کاهش داده و حفاظت معنی‌داری را در برابر آسیب نورونی تولید می‌کند (شکل شماره ۱). این اثر در هماهنگی با دیگر مطالعات است که نشان داده بودند عوامل آنتی‌اکسیدانت صدمات مغزی متنوع تولید شده ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد را کاهش می‌دهند [۳۳، ۳۲]. اثر حفاظتی اعمال شده توسط ME به طور اصلی در ناحیه پنومرا (کورتکس) دیده می‌شود. کاهش اثرات حفاظتی در ناحیه زیر کورتکس می‌تواند منجر به تخریب سختتر و بیشتر در ناحیه زیر کورتکس در مقایسه با کورتکس شود. این نیز نشان داده شده است که تخریب نورونی بعد از MCAO در ناحیه زیر کورتکس در مقایسه با کورتکس سخت‌تر است [۳٤].

نتایج این تحقیق همچنین نشان می‌دهند که تیمار رت‌ها با ME می‌تواند باعث حفاظت مغز در برابر ایسکمی و خونرسانی مجدد شود. داده‌های حاصل از آزمایش نشان دادند که در مغز قدرت آنتی‌اکسیدانی ناحیه پنومبرا به طور مشابه با ناحیه مرکزی به طور معنی‌داری در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین قدرت آنتی‌اکسیدانی سرم در گروه mg/kg/day ۱۰۰ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (نمودارهای شماره ۱ و ۲). مدرک قانع‌کننده‌ای دلالت دارد بر اینکه رادیکال‌های آزاد به عنوان عامل اصلی شرکت‌کننده در ایسکمی و عامل صدمه بافتی در سیستم عصبی مرکزی می‌باشند. مکانیسم‌های تولید رادیکال‌های آزاد وابسته به کلسیم که منجر به صدمات ناشی از اکسیژن‌رسانی مجدد در ایسکمی می‌شوند ممکن است شامل: فعال‌سازی NO یا فسفولیپاز A_2 و واکنش گزانتین/گزانتین اکسیداز باشند. با این حال، تصور می‌شود که میتوکندری منبع اصلی تولید رادیکال‌های آزاد وابسته به کلسیم در نورون‌های قشری کشت شده باشد [۳۵]. آسیب پمپ‌های یونی وابسته به انرژی، سبب دپلاریزه شدن سلولی و رها شدن گلوتامات به فضای خارج سلولی می‌شود. گیرنده‌های N- متیل- D- آسپارتات فعال شده و در نتیجه کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد که خود مسئول تولید ROS و نیتریک اکسید (NO) است. هنگامی که NO با سوپر اکسید ترکیب می‌شود، پراکسی نیتریت به وجود می‌آورد که سبب پراکسیداسیون لیپید می‌شود [٤].

از طرف دیگر نتایج این تحقیق نشان دادند که یک کاهش معنی‌دار در سطح پراکسیداسیون لیپید در مغز و سرم بعد از تیمار با ME وجود دارد (نمودارهای شماره ۳ و ٤). عصاره باعث کاهش میزان MDA به یک سطح قابل قبول شد. این موضوع تصدیق‌کننده اثر آنتی‌اکسیدانی احتمالی ME در جریان ایسکمی است. پراکسیداسیون لیپیدها یک فرایند مرتبط با شکل‌گیری MDA می‌باشد [۳٦]. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید و یک مارکر مناسب برای تخریب ایجاد شده توسط رادیکال آزاد و استرس اکسیداتیو می‌باشد [۳۷]. همچنین آن به عنوان یک بیومارکر مناسب برای پراکسیداسیون لیپید شناسایی شده است [۳۸]. به علاوه در مغزهای تحت ایسکمی یک افزایش ذاتی در پراکسیداسیون لیپید و نیز یک کاهش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی حفاظتی متنوع مشاهده می‌شود که این امر مورد پذیرش مطالعات قبلی نیز می‌باشد [٤۲ - ۳۹]. بنابراین در مقایسه با گروه کنترل، تیمار

Archive of SID
www.SID.ir

با ME منجر به کاهش سطح MDA و افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. این موضوع نشان‌دهنده کاهش شکل‌گیری ROS یا نشان‌دهنده فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد ME می‌باشد.

مطالعات فیتوشیمیایی آشکار ساخته‌اند که ME آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی نظیر فلاوونوئیدها را در اختیار دارد. اخیراً خصوصیات آنتی‌اکسیدانی فلاوونوئیدهای متنوع و ترکیبات فنولیک وابسته به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. به علاوه فعالیت‌های ضدهیپوکسی و ضدایسکمی برای تعدادی از این ترکیبات گزارش شده است [٤٥ – ٤٣]. به علاوه فعالیت آنتی‌اکسیدانی ME بوسیله این مطالعه نیز مشخص شده است.

نتیجه‌گیری

به عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت: ME منجر به حفاظت در برابر صدمات مغزی القاء شده توسط ایسکمی و خونرسانی مجدد بوسیله افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش پراکسیداسیون لیپید و کاهش در حجم آسیب مغزی می‌شود. خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپپتوتیک ME ممکن است در پتانسیل حفاظت نورونی در جریان آسیب ایسکمی مغزی درگیر باشند. بنابراین عصاره پونه می‌تواند یک کاندیدای ایده‌آل قوی برای پیش درمان ایسکمی مغزی به صورت تنها و یا کمک دارویی برای علم پزشکی باشد. با این وجود هنوز سؤالات زیادی در این زمینه بدون پاسخ مانده‌اند. به طور خاص می‌توان مواردی از قبیل: بررسی اثر عصاره پونه بر عوامل مولکولی حفاظتی در سطح سلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جهت مقابله با عوامل آسیب‌رسان، بررسی اثر تحمل به ایسکمی پلی‌فنول‌های عصاره پونه و مقایسه آن با آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد و بررسی اثر مصرف خوراکی عصاره پونه بر میزان فاکتورهای آپپتوزی (مانند کاسپاز و سیتوکروم C) در مدل جانوری MCAO. را برای مطالعات آینده پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

1. Thorvaldsen P, Asplund K, Kuulasmaa K, Rajakangas AM and Schroll M. Stroke incidence, case fatality, and mortality in WHO MONICA project. World health Organization monitoring trends and determinats in cardiovascular disease. *Stroke* 1995; 26: 361 - 7.

2. Shaheen EL, Annette K and Magdalena H. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine* 2009; 7: 97 - 108.

3. Astrup J, Siesjö BK and Symon L. Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12: 723 - 5.

4. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 1620 - 4.

5. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS and Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 6368 - 71.

6. Karolinska S. oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug. Metab. Rev.* 2007; 39: 443 - 55.

7. Margaill I, Plotkine M and Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 4: 429 - 43.

Archive of SID
www.SID.ir

8. Rafieian-Kopaie M and Baradaran A. Plants antioxidants: From laboratory to clinic. *J. Nephropathol.* 2013; 2: 152 - 3.

9. Middleton EJR, Kandaswami C and Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 2000; 52: 673 - 751.

10. Hosseinpour M, Mobini-Dehkordi M, Saffar S and Teymuri T. Antiproliferative effects of Matricaria chamomilla on Saccharomyces cerevisiae. *J. Her.b Med. Pharmacol.* 2013; 2: 49 - 51.

11. Rafieian-Kopaei M and Baradaran A. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *J. Res. Med. Sci.* 2013; 7: 628.

12. Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants and the human needs. *J. Herb. Med. Plarmacol.* 2012; 1: 1 - 2.

13. Baradaran A, Rabiei Z, Rafieian M and Shirzad H. A review study on medicinal plants affecting amnesia through cholinergic system. *J. Herb. Med. Plarmacol.* 2012; 1: 3 - 9.

14. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A and Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. *Food. Chem.* 2007; 103: 1449 - 56.

15. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B and Matavulj M. Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha sp. essential oils. *Planta. Med.* 2003; 69: 413 - 9.

16. Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F and Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and viridis) essential oils. *J. Food. Sci.* 2009; 74: 58 - 63.

17. Bourweig D and Pohl R. Flavonoids from Mentha longifolia. *Planta Medica* 1973; 24: 304 - 14.

18. Ghasemi K, Ghasemi Y and Ebrahimzadeh MA. Antioxidant Activity, Phenol And Flavonoid Contents Of 13 Citrus Species Peels And Tissues, Pak. *J. Pharm. Sci.* 2009; 22: 277 - 81.

19. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S and Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84 - 91.

20. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C and Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 1990; 10: 290 - 3.

21. Heidarian E, Rafieian-Kopaei M and Ashrafi K. The Effect of hydroalcoholic extract of Allium latifolium on the liver phosphatidate phosphatase and serum lipid profile in hyperlipidemic rats. *J. Babol. Univ. Med. Sci.* 2013; 15: 37 - 46.

22. Heidarian E and Rafieian-Kopaei M. Protective effect of artichoke (Cynara scolymus) leaf extract against lead toxicity in rat. *Pharm. Biol.* 2013; 51: 1104 - 9.

23. Bird RP, Hung SSO and Hadley M. Determination of malonaldehyde in biological materials by high pressure liquid chromatography. *Anal. Bio. Chem.* 1983; 128: 240 - 4.

24. Heidarian E, Kashani B, Rafieian-Kopaei M, Hajhosseini R and Ansari-Samani R. The effect of sesame oil on the liver phosphatidate phosphohydrolase and serum lipoproteins in hypercholesterolemic rabbits. *Scientific Journal of Kurdistan Universiy of Medical Sciences (SJKU)* 2013; 18: 26 - 35.

25. Asadi Y, Karimi M, parsaei P, Ezzati S, Khadivi R, Zamiri A and Rafieian M. Effects of Camellia sinensis ethanolic extract on histometric and histopathological healing process of burn wound in rat. *Middle-East Journal of Scientific Research* 2013; 13: 14 - 9.

26. Asadi SY, Parsaei P, Karimi M, Ezzati S, Zamiri A, Mohammadizadeh F and Rafieian-Kopaei M. Effect of green tea (Camellia sinensis) extract on healing process of surgical wounds in

Archive of SID
www.SID.ir

rat. *Int. J. Surg.* 2013; 11: 332 - 7.

27. Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A, Hashemi M and Rafieian-Kopaei. Clinical investigation of the acute effects of pomegranate juice on blood pressure and endothelial function in hypertensive individuals. *ARYA Atheroscler* 2013; 9: 326 - 31.

28. Akbari F, Ansari-Samani R, Karimi A, Mortazaei S, Shahinfard N and Rafieian-Kopaei M. Effect of turnip on glucose and lipid profiles of alloxan-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2013; 14: 1 - 7.

29. Calapai G, Squadrito F, Rizzo A, Crisafulli C, Campo GM, Marciano MC, Mazzaglia G and Caputi AP. A new antioxidant drug limits brain damage induced by transient cerebral ischemia. *Drugs. Exp. Clin. Res.* 1993; 19: 159 - 64.

30. Gulluce M, Orhan F, Adiguzel A, Bal T, Guvenalp Z and Dermirezer LO. Determination of antimutagenic properties of apigenin-7-o-rutinoside, a flavonoid isolated from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. longifulia with yeast DEL assay. *Toxical. Ind. Health.* 2012; 49: 577 - 88.

31. Lopes V, Martin S, Gomez- Serranillos MP, Carretero ME, Jager AK, Calvo MI, Lopes V MS, Gomez- Serranillos MP, Carretero ME, Jager AK and Calvo MI. Neuroprotective and neurochemichal properties of mint extracts. *Phytother. Res.* 2010; 24: 869 - 74.

32. Tanaka Y, Koizumi C, Marumo T, Omura T and Yoshida S. Serum S100B indicates brain edema formation and predicts long-term neurological outcomes in rat transient middle cerebral artery occlusionmodel. *Brain Research* 2007; 1: 140 - 5.

33. Walberer M, Stolz E and Muller C. Experimental stroke: ischemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague Dawley rats using MRI). *Lab. Animal* 2006; 40: 1 - 8.

34. Garcia JH, Liu KF, Ye ZR and Gutierrez JA. Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1997; 28: 2303 - 9.

35. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 1431 - 568.

36. Niedworok E and Bielaszka A. Comparison of the effect of vitamins A and E on aging processes of edible vegetable oils. *J. Environ. Stud.* 2007; 16: 861 - 5.

37. Atip L, Natchai P, Thavatchai P and Charn S. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *J. Med. Associ. Thailand.* 2010; 93: 369 - 78.

38. Adriano S, Bartolomeo D, Cristos X and Andrea M. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant. Sci.* 2004; 166: 293 - 302.

39. Sugawara T and Chan PH. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxidants & Redox Signaling* 2003; 5: 597 - 607.

40. Gupta R, Singh M and Sharma A. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacological Research* 2003; 2: 209 - 15.

41. Reilly P. Clinical application-Medicago sativa extracts. *Journal of Naturopathic Medicine* 1989; 1: 455 - 60.

42. Oleszek W, Price KR, Colquhoun IJ, Jurzysta M, Ploszynski M and Fenwick GR. Isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa*) root saponins: their activity in relation to a fungal bioassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1990; 9: 1810 - 7.

43. Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Marciano MC, Squadrito F, Infereera G, Parisi A, Rizzo A, Crisafulli C, Fiore A and Caputi AP. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci.* 2000; 67: 2673 - 83.

44. Dou DQ, Zhang YW, Zhang L, Chen YJ and

Archive of SID
www.SID.ir

Yao XS. The inhibitory effects of ginsenosides on protein tyrosine kinase activated by hypoxia/reoxygenation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Planta. Med.* 2001; 67: 19 - 23.

45. Nishimura S, Taki M, Takaishi S, Ijima I and Akiyama T. Structures of 4-aryl-coumarin (neoflavone) dimers isolated from Pistacia chinensis BUNGE and their estrogen-like activity. *Chem. Pharm. Bull.* 2000; 48: 505 - 8.

Archive of SID

www.SID.ir