

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*}، تکتم ضیایی^۲

۱- استاد، گروه فارماکودینامی و سمناسی 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: ۰۵۱۱ (۸۸۲۳۳۲۵۵)، نمبر: ۰۵۱۱ (۸۲۳۳۲۵۱)

پست الکترونیک: hosseinzadehh@mums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۱۹/۱/۸۵

تاریخ دریافت: ۱۷/۳/۸۳

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 (۰/۲ دقیقه) یک ساعت قبل از شروع آزمایش به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز پنجم فعالیت حرکتی به روش جعبه باز بر روی حیوانات انجام شد.

یافته‌ها: عصاره آبی زعفران در محدوده دوزهای ۰/۵۶-۰/۰۰۵۰-۰/۰۰۲۵ گرم بر کیلوگرم در مجموع در یافتن سکو تاثیری نداشت. فقط دوز ۰/۰۰۵ 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 هدف نداشت. سافرانال در محدوده دوزهای ۰/۷۵-۰/۰۲ 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 جعبه 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 تاثیری بر روی حافظه سالم نداشته ولی باعث کاهش اثرات تخریبی حافظه ناشی از هیوسین می‌شود. عصاره زعفران و کروسین می‌توانند در آینده نوید بخش داروهایی در کاهش اختلالات حافظه و یادگیری ناشی از زوال مغزی در بیماری‌هایی چون آلزایمر باشند.

گل واژگان: زعفران، کروسین، سافرانال، حافظه، یادگیری، ماز آبی موریس



کارتنوییدهای کروستین و فرم‌های گلیکوزیدی دی‌جتیوبیوزید (کروسین)، جتیوبیوزید، گلوکوزید، جتیوگلوکوزید و دی‌گلوکوزید بتا - کروستین (منومتیل استر)، گاماکروستین (دی‌متیل استر)، آلفا - کاروتون، بتا- کاروتون، لیکوپین و زیرانتین^۱ هستند [۹]. به طور کلی از زعفران، عصاره‌ها و تستورهای آن در طب سنتی به عنوان ضدآسیاسم، کمک به هضم طبیعی غذا، تسکین‌دهنده ناراحتی‌های لثه، ضد آبریزش، آرامبخش، ضدنفخ، افزاینده تعریق، خلط آور، محرك، مقوی معده، محرك 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 پتیلن ترازوول و الکتروشوک را در موش مهار کرد [۱۳]. عصاره‌های کلاله 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 آتناگونیزه می‌کند [۱۶،۱۷،۱۸،۱۹]. در این مطالعه اثر عصاره آبی کلاله زعفران و مواد موثره آن کروستین و سافرانال بر روی حافظه فضایی موش‌های صحراوی با حافظه سالم و تخریب شده با هیوسین در مدل حافظه و یادگیری ماز آبی موریس^۲ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوان

موش‌های صحراوی^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

مقدمه

زوال مغزی^۱ ممکن است با علل مختلف از جمله بیماری Lewy bodg «آلزایمر»، «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 توجیه‌گر ۵۰-۶۰ 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 غیراستروییدی 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، (Salvia officinalis) مریم گلی^۴، (Melissa officinalis) S. lavandulaefolia^۵، Bacopa officinalis^۶، (Panax ginseng^۷) و monnieria^۸ وغیره 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 کاروتوئید کروستین مشتق می‌شوند. از مواد تلخ، مهمترین آنها پیکروکروستین است. تجزیه پیکروکروستین^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 Dementia

² Alzheimer

³ Pick

⁴ Rivastigmine

⁵ Galantamine

⁶ Picrocrocin

¹ Zeaxanthin
³ Rat

² Morris Water Maze



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 می‌یافتدند 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 جعبه باز^۱ بر روی حیوانات انجام می‌شد.

تعیین فعالیت حرکتی

(Open field activity)

آزمون جعبه باز (Open field activity) پس از تزریق ماده مورد بررسی این تست در اتفاقی که شرایط اتفاق 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 ± خطای معیار گزارش شده است. پس از انجام ANOVA و در صورت معنی دار بودن آن از تست Tukey – Kramer استفاده شد. نتایج با $p < 0.05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

¹ Open field

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. رعفران، کروسین و هیوسین در نرمال سالین حل شد. سافرانال به شکل مایع تهیه شده بود.

عصاره‌گیری

الف: عصاره آبی

از روش خسیاندن 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 محتويات ظرف سانتریفوژ و رسوبات جدا گردید. با کمک دستگاه حذف حلال در خلا در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد آب حذف شد و عصاره تغليظ 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 هفتۀ 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 20 ± 1 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 اتفاق نسبتاً تاریکی انجام گرفت که عالیم قابل روئیتی در چهار طرف آن نصب شده بود و حیوان می‌توانست با استفاده از این عالیم 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.

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

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<۰/۰۰۱). این اثر زعفران با افزایش دوز کاهش و به نحوی که در دوز بالا (۰/۰۴-۰/۰۵ 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

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<۰/۰۰۱, p<۰/۰۱). (جداول شماره ۱ و ۲).

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

روز پنجم	روز چهارم	روز سوم	روز دوم	روز اول	
۱۶/۲۱ ± ۰/۸	۲۱/۱۷ ± ۰/۸۹	۳۵/۲ ± ۲/۳	۳۶/۹۲ ± ۱/۷۹	۵۷/۸۸ ± ۲/۳۳	نرمال سالین ۱۰ ml/kg
۵۷/۸۳ ± ۲/۹۳	۴۷/۷۹ ± ۲/۶۸	۴۳/۴۲ ± ۲/۹۹	۵۶/۱ ± ۳/۰۴	۸۲/۰۸ ± ۵/۰۲	هیوسین ۱ mg/kg
+++	+++		++	++	عصاره آبی زعفران ۰/۰۰۲۵ g/kg
۲۲/۶۲ ± ۲/۰۸	۲۰/۸۷ ± ۱/۹۲	۲۵/۵ ± ۱/۶۶	۴۰/۲۵ ± ۲/۹۴	۶۱/۲۶ ± ۴/۲	هیوسین ۱ + عصاره آبی زعفران ۰/۰۰۲۵ g/kg
۴۰/۱۲۵ ± ۳/۵۷	۴۱/۹۲ ± ۲/۲	۴۳/۰۴ ± ۴/۱۶	۵۵/۴۶ ± ۱۱/۰۲	۸۲/۵۸ ± ۳/۲	عصاره آبی زعفران ۰/۰۰۲۵ g/kg
+++ ***	+++			++	هیوسین ۱ + عصاره آبی زعفران ۰/۰۰۲۵ g/kg
۱۸/۰۴ ± ۰/۶۴	۲۲/۱۷ ± ۱/۴۴	۳۱/۲۵ ± ۱/۵۴	۵۵/۹۲ ± ۲/۴۶	۷۹/۴۲ ± ۱۰/۵۸	عصاره آبی زعفران ۰/۰۱ g/kg
۴۳/۷۹ ± ۲/۲۱	۴۰/۱۷ ± ۱/۶۳	۵۶/۵ ± ۳/۲۴	۷۹/۳۸ ± ۱۰/۶	۵۰/۸۸ ± ۳/۲۳	هیوسین ۱ + عصاره آبی زعفران ۰/۰۱ g/kg
+++ ***	+++ *	+++ **	+++ *	**	عصاره آبی زعفران ۰/۰۴ g/kg
۲۶ ± ۱/۷	۲۲/۵۴ ± ۲/۳۳	۲۹/۲۵ ± ۲/۳۶	۳۸/۵۸ ± ۲/۳۳	۵۶/۷۷ ± ۳/۱۴ ***	هیوسین ۱ + عصاره آبی زعفران ۰/۰۴ g/kg
۷۴/۱۷ ± ۷/۲۳	۷۴/۷۹ ± ۴/۹۵	۸۷/۳ ± ۱/۷۲	۸۴/۰۴ ± ۴/۵۵	۹۰ ± ۰	آبی زعفران ۰/۰۴ g/kg
+++ *	+++ ***	+++ ***	+++ ***	+++	

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

(*) p<۰/۰۱, (**): p<۰/۰۵, (***) p<۰/۰۱, (++): p<۰/۰۱, (+++): p<۰/۰۱, (++++) p<۰/۰۱, (++++) p<۰/۰۱, (++++) p<۰/۰۱.

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

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

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

(*: p < ۰/۰۵, **: p < ۰/۰۱, ***: p < ۰/۰۰۱, +++: p < ۰/۰۰۱, ++: p < ۰/۰۰۱) و (+): آزمون توکی کرامر: (۰/۰۰۱ < p < ۰/۰۱)

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

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

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ۶ آزمایش است.

(*: p < ۰/۰۵, **: p < ۰/۰۱, ***: p < ۰/۰۰۱, +++: p < ۰/۰۰۱, ++: p < ۰/۰۰۱, +: p < ۰/۰۰۱) و (+): آزمون توکی کرامر: (۰/۰۰۱ < p < ۰/۰۱)

جدول شماره ۴- بررسی اثر کروسین به تنهایی و همراه با هیوسین (0.5 g/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز پنجم	روز چهارم	روز سوم	روز دوم	روز اول	
$20/04 \pm 0/38$	$24/29 \pm 1/56$	$28/7 \pm 1/8$	$49/12 \pm 3/8$	$55/29 \pm 2/48$	نرمال سالین 10 ml/kg
$88/5 \pm 0/96$	$88/17 \pm 1/64$	$89/17 \pm 0/8$	$89 \pm 0/8$	$87/8 \pm 1/79$	هیوسین 0.5 g/kg
+++	+++	+++	+++	+++	
$12/12 \pm 0/89$	$30/12 \pm 1/99$	$20/37 \pm 1/44$	$40/38 \pm 2/50$	$74/5 \pm 2/56$	کروسین 200 mg/kg
*** +++	*** +	*** ++	***	* ++	
$34/8 \pm 1/96$	$52/9 \pm 3/22$	$68/1 \pm 3/89$	$79/2 \pm 6/9$	$82/9 \pm 4/48$	هیوسین 0.5 g/kg + کروسین
*** +++	*** +++	*** +++	+++	+++	200 mg/kg

نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+)، آزمون توکی کرامر: (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ++ p<0.01, +++ p<0.001, + p<0.05, +++)

جدول شماره ۵- بررسی اثر سافرانال به تنهایی و همراه با هیوسین (1 mg/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز پنجم	روز چهارم	روز سوم	روز دوم	روز اول	
$16/21 \pm 0/8$	$21/17 \pm 0/89$	$35/2 \pm 2/3$	$36/92 \pm 1/79$	$57/88 \pm 2/23$	نرمال سالین 10 ml/kg
$57/83 \pm 2/93$	$47/79 \pm 2/68$	$43/43 \pm 2/99$	$56/1 \pm 3/04$	$82/08 \pm 5/02$	هیوسین 1 mg/kg
+++	+++		++	++	
$17 \pm 1/34$	$32/75 \pm 1/93$	$40/45 \pm 1/43$	$37/58 \pm 2/85$	$86/96 \pm 3/04$	سافرانال $0/2 \text{ ml/kg}$
	++			+++	
$27/96 \pm 0/99$	$40/5 \pm 2/51$	$44/71 \pm 3/14$	$71/75 \pm 5/81$	$83/71 \pm 4/19$	هیوسین 1 mg/kg + سافرانال
+++ ***	+++		+++ *	+++	$0/2 \text{ ml/kg}$
$47/54 \pm 3/38$	$54/48 \pm 1/41$	$56 \pm 3/21$	$54/04 \pm 3/32$	$73/29 \pm 7/74$	سافرانال $0/5 \text{ ml/kg}$
+++	+++	+++			
$60/6 \pm 3/36$	$59/25 \pm 3/005$	$52/42 \pm 3/32$	$67/46 \pm 10/26$	$81/29 \pm 8/71$	هیوسین 1 mg/kg + سافرانال
+++	+++ **	++			$0/5 \text{ ml/kg}$

نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+)، آزمون توکی کرامر: (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ++ p<0.01, +++ p<0.001, + p<0.05, +++)

جدول شماره ۶- بررسی اثر سافرانال به تنهایی و همراه با هیوسین (0.5 g/kg) بر حافظه و یادگیری رت به روش ماز آبی موریس

روز پنجم	روز چهارم	روز سوم	روز دوم	روز اول	
$20/04 \pm 0/38$	$24/29 \pm 1/56$	$28/7 \pm 1/8$	$49/12 \pm 3/8$	$55/29 \pm 2/48$	نرمال سالین 10 ml/kg
$88/5 \pm 0/96$	$88/17 \pm 1/64$	$89/17 \pm 0/8$	$89 \pm 0/8$	$87/8 \pm 1/79$	هیوسین 0.5 g/kg
+++	+++	+++	+++	+++	
$28/45 \pm 1/01$	$23/42 \pm 2/07$	$37/04 \pm 1/95$	$55/75 \pm 2/61$	$45/7 \pm 2/36$	سافرانال $0/2 \text{ ml/kg}$
***	***	***	**	*** +	
87 ± 3	$77/56 \pm 12/44$	$73/65 \pm 17/35$	$77/7 \pm 12/3$	$82/69 \pm 7/36$	هیوسین $0/5 \text{ g/kg}$ + سافرانال
+++	+++	++	+	+++	$0/2 \text{ ml/kg}$

نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار ۶ آزمایش است.

مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+)، آزمون توکی کرامر: (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ++ p<0.01, +++ p<0.001, + p<0.05, +++)



د- هیوسین

هیوسین با دوز پایین (1 mg/kg) علماً اثری بر روی فعالیت حرکتی نداشت ولی با دوز بالا (5 g/kg) به طور بارزی فعالیت حرکتی را کاهش داد ($p < 0.001$) (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

ه- عصاره آبی زعفران و هیوسین

صرف توان زعفران با هیوسین باعث افزایش فعالیت حرکتی در اکثر موارد نسبت به گروه هیوسین شد. اگرچه به حد گروه نرمال سالین نرسید ($p < 0.001$) (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

و- کروسین و هیوسین

کروسین تاثیری بر روی فعالیت حرکتی هیوسین با دوز بالا نداشت. ولی همراه با هیوسین 1 mg/kg با دوز بالا کروسین فعالیت حرکتی کاهش یافت ($p < 0.001$) (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

ز- سافرانال و هیوسین

سافرانال با دوز 2 mg/liter بر کیلوگرم تاثیر بر فعالیت حرکتی هیوسین 5 g/kg بر کیلوگرم نداشت. سافرانال با دوز مذکور فعالیت حرکتی هیوسین 1 mg/kg بر کیلوگرم را کاهش داد ($p < 0.001$) (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

بحث

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

اخیراً مشخص شده است که عصاره الكلی زعفران، فرایند یادگیری و حافظه را در موش تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲۲]. نتایج این مطالعه نشان داد که دوزهای $125-500\text{ mg/kg}$ بر کیلوگرم عصاره مذکور به صورت خوراکی، به خودی خود بر رفتار یادگیری موش‌ها در آزمون‌های احترازی غیرفعال^۱ بی‌تأثیر است ولی قادر است اختلالات حافظه ناشی از اتانل را

ب- عصاره زعفران و هیوسین

عصاره زعفران با دوزهای پایین (0.01 mg/kg و 0.025 g/kg بر کیلوگرم) در روزهای چهارم و پنجم باعث یافتن زمان سکو در گروه هیوسین و عصاره شد ($p < 0.001$). همچنین زعفران با دوز 0.005 g/kg بر کیلوگرم در تمامی روزها به طور معنی‌داری اثرات هیوسین با دوز بالا را مهار کرد ($p < 0.001$) (جدول شماره ۱ و ۲).

ج- کروسین و هیوسین

کروسین با دوز $50-200\text{ mg/kg}$ بر کیلوگرم اثرات هیوسین با دوز 1 mg/kg بر کیلوگرم را در روزهای چهارم و پنجم ($p < 0.001$) و با دوز 200 mg/kg بر کیلوگرم اثرات هیوسین 5 g/kg بر کیلوگرم را در روزهای سوم الی پنجم مهار کرد ($p < 0.001$) (جدوال 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 2 mg/liter بر کیلوگرم در روز پنجم باعث کاهش اثرات هیوسین (1 mg/kg بر کیلوگرم) شد ($p < 0.001$) (جدوال شماره ۵ و ۶).

آزمون جعبه باز (Open field activity)**الف- عصاره آبی زعفران**

عصاره آبی زعفران در اکثر دوزها و به خصوص با دوز بالا 56 mg/kg بر کیلوگرم، نتایج نشان داده نشده است، ($p < 0.001$) باعث کاهش فعالیت حرکتی شد (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

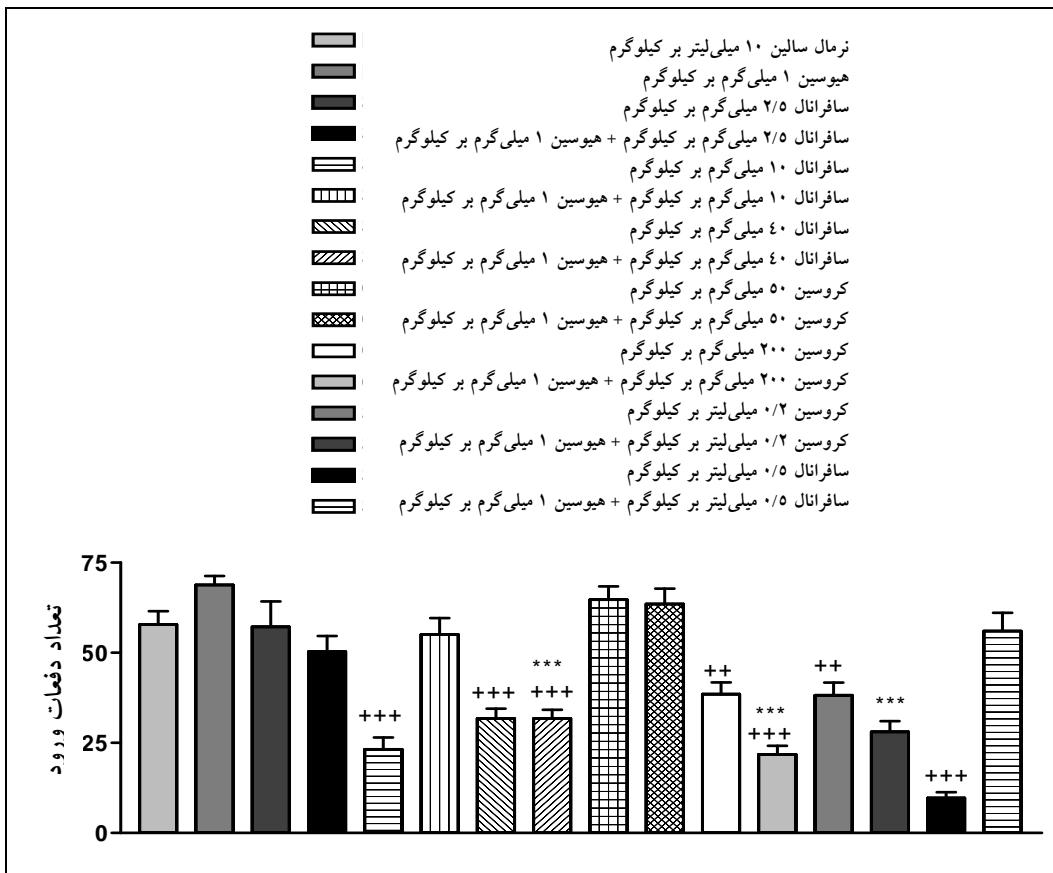
ب- کروسین

کروسین با دوز 50 mg/kg بر کیلوگرم علماً تاثیری بر روی فاکتورهای حرکتی نداشت. دوز بالای آن (200 mg/kg بر کیلوگرم) باعث کاهش فعالیت حرکتی شد ($p < 0.001$) (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

ج- سافرانال

سافرانال وابسته به دوز به طور بارزی فعالیت حرکتی را کاهش داد ($p < 0.001$) (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

¹ Passive avoidance tests



شکل شماره ۱ - بررسی اثر عصاره آبی زعفران، کروسین و سافرانا 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 میان میانگین + انحراف معیار برای نتایج ۶ موس صحرایی است. آزمون توکی کرامر: مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+) ($p < 0.001$) و ($p < 0.01$) و ($p < 0.05$) و ($p < 0.01$). (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

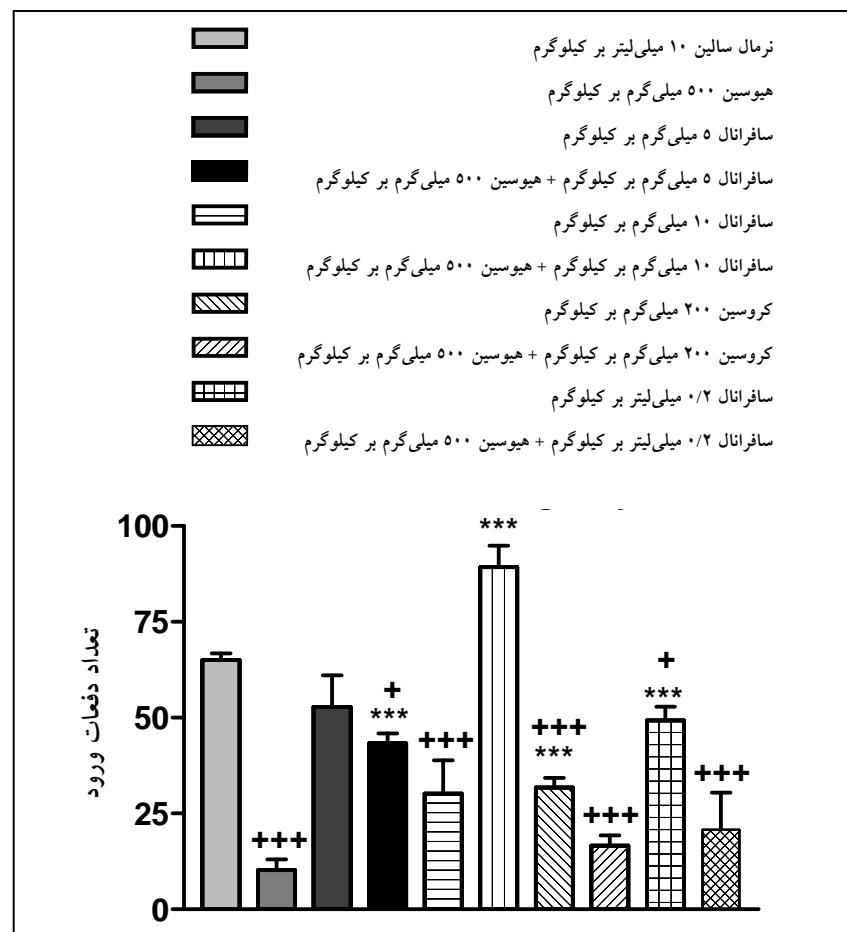
است. زعفران فقط در دوز نسبتاً پایین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست باعث تقویت یافتن سکو توسط موش صحرایی در روزهای آخر شود. در دوزهای بالاتر به علت اثرات سداتیو زعفران این اثر کاهش یافته است به نحوی که آزمایش‌های جعبه باز نشان‌دهنده کاهش بارز فعالیت حرکتی است.

عدم اثر بر روی حافظه سالم در مورد گیاهانی چون *Panax*، *Ginko biloba* و *ginseng* 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 آزاییمر [۲۵، ۲۶] ولی در داوطلبان سالم طبق بعضی گزارش‌ها فاقد اثر بر روی حافظه بوده‌اند.

به مقدار قابل توجهی بهبود بخشد. 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 ۵۰-۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به خوبی قادر است اختلالات حافظه ناشی از تجویز اتانول 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 فقد 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 تنها یی و همراه با هیوسین (500 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 میان میانگین + انحراف معیار برای نتایج ۶ موش صحرایی می‌باشد. آزمون توکی کرامر: مقایسه با هیوسین (*) و نرمال سالین (+). $p < 0.001$, $p < 0.005$, $p < 0.05$ و $p < 0.01$. (***)

شواهد متعددی در دست است که نشان می‌دهند بیماری‌های استحالة عصبی سیستم اعصاب مرکزی شامل آلزایمر، پارکینسون و Amyotrophic Lateral Sclerosis در اثر آسیب سلولی ناشی از فعالیت رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شوند. عصاره زعفران حاوی کاروتونوئیدهای فراوانی است که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی قوی هستند و می‌توانند سلول‌های عصبی سیستم اعصاب مرکزی را در برابر آسیب‌های 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 تقویت‌کننده نداشتند ولی کروسین اثرات هیوسین بر روی حافظه را در هر دوز مهار کرد. این اثر با گزارش‌های 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 بنزو دیازپین‌ها که اثرات آرامبخش و خواب آور دارند نیز باعث کاهش حافظه و یادگیری و موجب فراموشی می‌شوند [۲۷].

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از شرکت محترم نوین زعفران و شرکت محترم شهرک های صنعتی خراسان که در تامین بودجه این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می شود.

انواع خاصی از اختلالات حافظه و یادگیری را با مکانیسم های مختلف بهبود بخشدند.

بر این اساس، زعفران و یا کروسوین می توانند در درمان بیماری های استحاله ای 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, Máñez 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. Irn. 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. *Irn. 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.

