Physiology and Pharmacology, 17 (3), 315-327
Autumn 2013 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Protective Effect of Short-term Administration of Ethanolic Saffron Extract on Improvement of Cognitive Deficits and Decrement of Lipid Peroxidation Induced by Ethidium Bromide in Experimental Models of MS

Shabnam Ghaffari[1], Homeira Hatami Nemati[1*], Gholamreza Dehghan[2]

1. Dept. of Animal Biology, Faculty of Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Dept. of Plant Biology, Faculty of Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 10 June 2013 **Accepted: 30 Aug 2013**

Abstract

Introduction: Cognitive dysfunction is recognized as a significant feature of multiple sclerosis (MS). Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of MS. Toxic demyelination by ethidium bromide (EB) is one of the common methods for induction of MS, which leads to neuronal death by production of free radicals and enhancement of oxidative stress burden. According to previous pharmacological studies, saffron extract acts as a free radical scavenger. Accordingly, in the present study the effect of short-term microinjection of saffron extract on the process of spatial memory and lipid peroxidation in the hippocampus was assessed in an experimental model of MS.

Methods: One week after MS induction by EB (0.01 %), animals of the experimental group were treated by saffron extract (5 and 10 µg/rat) for 3 consecutive days. Following the treatment period, Morris Water Maze test was carried out and hippocampi of both sides were dissected and used for measurement of a lipid peroxidation marker (MDA) in the end.

Results: Based on the results of the present study, short-term treatment by saffron extract significantly ameliorated spatial memory in experimental models of MS ($P<0.05$). MDA in the saffron treated group showed a significant reduction compared to the control MS animals ($P<0.01$).

Conclusion: It seems that treatment with saffron extract is able to prevent memory and learning reduction, through inhibition of lipid peroxidation in an experimental model of MS. However, evaluation of beneficial effects of saffron on the spatial memory and its role in preventing or treating cognitive deficits in MS patients, requires much more extensive molecular studies.

Key words: Multiple sclerosis, Saffron extract, Cognitive deficits, Lipid peroxidation

[*] Corresponding author e-mail: homeirahatami@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۳)، ۳۱۵ - ۳۲۷
پاییز ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثر حفاظتی تزریق کوتاه مدت عصارهٔ الکلی زعفران بر بهبود نقایص شناختی و کاهش پروکسیداسیون لیپیدی القاء شده توسط اتیدیوم بروماید در مدل‌های تجربی MS

شبنم غفاری[۱]، حمیرا حاتمی نعمتی[۱*]، غلامرضا دهقان[۲]
۱. گروه علوم جانوری، دانشکدهٔ علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز
۲. گروه علوم گیاهی، دانشکدهٔ علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

دریافت: ۲۰ خرداد ۹۲ پذیرش: ۸ شهریور ۹۲

چکیده

مقدمه: نقایص شناختی از علائم قابل توجه بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) است. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز MS ایفا می‌کند. دمیلیناسیون سمی توسط اتیدیوم بروماید (EB) روشی معمول برای القای MS است که با تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش بار اکسیداتیو منجر به مرگ نورون ها می‌گردد. طبق مطالعات فارماکولوژیکی، زعفران به عنوان گیرنده‌ی رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند. در بررسی حاضر اثر ریز تزریق کوتاه مدت عصاره‌ی الکلی زعفران با دو دوز متفاوت بر روی حافظه فضایی و پروکسیداسیون لیپیدی در هیپوکامپ مدل‌های تجربی MS مورد مطالعه قرار گرفت.

روش ها: موش‌های گروه تیمار یک هفته پس از القای MS با EB (۰/۰۱٪)، عصاره‌ی زعفران را به مدت ۳ روز و با دوزهای ۵μg/rat و ۱۰ μg/rat دریافت نمودند. پس از اتمام دوره تیمار، آزمون ماز آبی موریس و در خاتمه، نمونه برداری از هیپوکامپ انجام گردید و شاخصه پروکسیداسیون لیپیدی (MDA) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که تیمار کوتاه مدت عصاره‌ی زعفران، حافظه فضایی را در مدل‌های تجربی MS به طور معنی داری بهبود بخشید ($P< ۰/۰۵$). میزان MDA در مدل‌های تجربی MS تحت تیمار با عصاره الکلی زعفران کاهش معنی داری را نسبت به گروه شاهد MS نشان داد ($P< ۰/۰۱$).

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد تیمار عصاره‌ی زعفران با کاهش میزان محصولات پروکسیداسیون لیپیدی قادر به ممانعت از کاهش روند یادگیری و حافظه در مدل‌های تجربی MS است. با این حال، بررسی اثرات زعفران بر بهبود حافظه فضایی و نقش آن در پیشگیری و یا درمان اختلالات شناختی بیماران مبتلا به MS، نیازمند مطالعات مولکولی گسترده‌تری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماری مالتیپل اسکلروزیس، عصاره‌ی زعفران، نقایص شناختی، پروکسیداسیون لیپیدی

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری پیچیده با چندین فرآیند پاتوفیزیولوژیکی شامل التهاب، دمیلیناسیون، استرس اکسیداتیو، آسیب آکسونی و مکانیسم‌های ترمیمی است. این فرآیندها به طور یکسانی در جمعیت‌های بیماران نمایان نمی‌شوند اما می‌توانند به طور انتخابی در فرد فرد بیماران غالبیت پیدا کنند [۲۹]. میلیناسیون آکسون‌ها در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) هدایت جهشی و سریع پیام‌های الکتریکی را فراهم می‌آورد. ارتباط سلولی بین آکسون‌ها و اولیگودندروسیت‌هایی که غلاف میلین را تولید می‌کنند، عامل

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: homeirahatami@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

پشتیبانی مکانیکی و عملکردی از این رشته‌های عصبی می‌باشد [۴۲]. صدمات آکسونی، در تمام ضایعات تازه تشکیل شده‌ی MS مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد تجمع آسیب‌های آکسونی، علت اصلی ناتوانی عصبی پیشرونده‌ی برگشت ناپذیر در MS باشد [۱۱].

نقایص شناختی به طور معمول به عنوان یکی از عوارض بالینی ناتوان کننده‌ی بیماری MS شناسایی شده است. شایع‌ترین نقایص شناختی در میان بیماران مبتلا به MS شامل کاهش سرعت پردازش اطلاعات، کاهش حافظه و اختلال در درک فضایی می‌باشند [۱۶، ۱۸]. اطلاعات به دست آمده از مطالعات تصویربرداری مغناطیسی رزونانس (MRI) در شرایط in-vivo نشان می‌دهند که علاوه بر ماده‌ی سفید، بخش‌های خاکستری مغز به ویژه هیپوکامپ نیز دچار دمیلیناسیون و تغییرات ساختاری می‌گردند که این تغییرات ساختاری با اختلال عملکرد در آزمون‌های حافظه تصویری-فضایی همراه می‌شود. وقوع آپوپتوز در نورون های هرمی و آستروسیت‌های ناحیه CA_1 هیپوکامپ موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمنی تجربی (EAE) شناسایی شده است [۱۷، ۴۳، ۴۴].

استرس اکسیداتیو نقشی کلیدی در پاتوفیزیولوژی MS ایفا می‌کند [۱۴]. استرس اکسیداتیو ناشی از یک عدم تعادل بین تولید گونه های باز فعال اکسیژن (ROS) و توانایی سیستم زیستی برای سم زدایی این واسطه های فعال می‌باشد [۳۹]. مطالعات مختلفی بیان می‌کنند که تولید ROS در محیط in-vivo با اختلال تثبیت حافظه در MS و مدل‌های تجربی MS در ارتباط می‌باشد [۲۴]. استرس اکسیداتیو سبب القای آسیب اکسیداتیو در هیپوکامپ و سلول‌های هرمی می‌گردد. سلول‌های فعال مغزی در ریسک مشخصی از خطر آسیب‌دیدگی توسط رادیکال‌های آزاد قرار دارند چرا که سلول‌های مغزی مصرف اکسیژن بالایی دارند و غشاهای نورونی سیستم اعصاب مرکزی غنی از پلیمرهای اسید چرب غیراشباع[1] (PUFA) می‌باشند که هدف‌های بالقوه برای پروکسیداسیون لیپیدی می‌باشند. تجمع محصولات نهایی پروکسیداسیون لیپیدی نیز می‌تواند در نقایص شناختی دخیل باشد [۱۳، ۴۱].

اتیدیوم بروماید (EB) به عنوان یک داروی درج کننده‌ی DNA به طور گسترده به منظور القای دمیلیناسیون سمی در جوندگان مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱، ۲۶]. تزریق موضعی EB به سیستم اعصاب مرکزی (CNS)، اولیگودندروسیت ها و آستروسیت‌ها را به طور انتخابی از بین می‌برد و دمیلیناسیون کانونی در CNS را القاء می‌کند [۱۷، ۲۷]. همچنین مطالعات مختلفی بیان می‌کنند که تزریق مستقیم EB به مغز حیوانات آزمایشگاهی منجر به دمیلیناسیون می‌گردد که با افزایش بار اکسیداتیو همراه می‌باشد [۲].

بعضی از ترکیبات طبیعی همانند عصاره‌ی زعفران در فرآیندهای سم‌زدایی گونه‌های باز فعال اکسیژن مشارکت می‌کنند. *Crocus sativus L.* که عموماً به عنوان زعفران شناخته می‌شود، گیاهی است که در سراسر کره‌ی زمین پراکنده شده است [۳۴، ۳۸]. کلاله گل زعفران دارای مواد شیمیایی متنوعی است. کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی، موسیلاژ، ویتامین‌ها (به ویژه ریبوفلاوین و تیامین) و رنگدانه هایی شامل کروسین، آنتوسیانین، کاروتن و لیکوپن در زعفران شناسایی شده‌اند [۳]. زعفران در طب سنتی به عنوان یک گیاه دارویی کاربردهای فراوانی داشت و به عنوان مسکن، ضد افسردگی، ضد اسپاسم، کاهنده احتقان تنفسی، افزایش دهنده میل جنسی، افزایش دهنده تعریق، درمان اختلالات قاعدگی، خلط آور و آرام بخش استفاده می‌شد [۱۲]. چهار ترکیب عمده فعال زیستی در زعفران عبارتند از: کروسین، کروستین، پیکروکروسین و سافرانال که نه تنها عامل رنگ، طعم و عطر خاص این گیاه هستند بلکه در خواص دارویی و آنتی‌اکسیدانی آن نیز مشارکت دارند [۲۸]. مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که کروسین و کروستین به عنوان ترکیبات فعال زعفران قادر هستند اثرات حفاظتی دارویی متنوعی از قبیل حفاظت در برابر بیماری‌های قلبی-عروقی، مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، حفاظت در برابر بیماری‌های گوارشی، حفاظت عصبی، حفاظت سلول‌های کبدی و اثرات ضد التهابی و ضد درد را اعمال کنند که به ظرفیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات نسبت داده می‌شود [۶، ۲۸، ۳۸]. مطالعات اخیر گزارش کرده‌اند که عصاره زعفران، حافظه و مهارت‌های یادگیری را در موش‌هایی که رفتار یادگیری آن‌ها با القای اتانول دچار اختلال شده است،

1. Poly unsaturated fatty acids (PUFA)

بهبود می‌بخشد [۴]. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که تیمار عصاره‌ی زعفران می‌تواند در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو و اختلالات حافظه مربوط به آن مفید باشد [۳]. زعفران به عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد عمل کرده و باعث بهبود شاخصه های یادگیری و حافظه می‌شود [۱۲].

از این رو در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا اثر ریز تزریق سم EB به عنوان القاء کننده‌ی مدل تجربی MS و اثر ریز تزریق کوتاه مدت عصاره زعفران با دو دوز متفاوت را به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی بر عملکرد حافظه فضایی و وضعیت اکسیداتیو هیپوکامپ مدل‌های تجربی MS با استفاده از آزمون ماز آبی موریس و سنجش یکی از مهم‌ترین پارامترهای استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

زعفران مورد استفاده در این مطالعه از شرکت نوین زعفران (مشهد، ایران) تهیه گردید. برای تهیه عصاره، ابتدا کلاله زعفران با استفاده از آسیاب مکانیکی پودر شد. سپس با استفاده از حلال اتانولی زعفران اقدام به عصاره گیری به روش سوکسله گردید. در این روش عصاره گیری ۱۰ گرم پودر کلاله زعفران در ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ٪۸۰ به مدت سه روز خیسانده شد. پس از صاف کردن محلول به دست آمده با صافی، حلال توسط دستگاه اواپوراتور[1] تحت خلاء و در دمای ۶۰-۵۰ °C حذف شد. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال و در دمای ۰ الی ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه داری شد [۳۰].

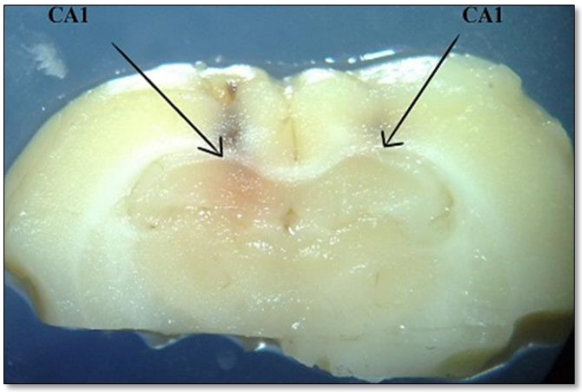
در مطالعه‌ی حاضر تعداد ۴۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی (۵۰±۲۵۰) گرم، از حیوان خانه دانشگاه شهید بهشتی تهران خریداری شد و به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده‌ی علوم دانشگاه تبریز انتقال یافت. موش‌ها به مدت دو هفته برای رسیدن به حالت پایه و رفع استرس در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش، دمای محل نگهداری موش‌ها برابر با ۲±۲۲ درجه سانتیگراد بود و همچنین موش‌ها در شرایط سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته (۷ صبح تا ۷ شب) در حالی که دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند، نگهداری می‌شدند. کلیه آزمایشات روی حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و ثبت شده بین المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه هشت تائی ذیل تقسیم شدند: I- گروه کنترل سالم، II- گروه شاهد (سالین)، III- گروه اتیدیوم بروماید (٪۰/۰۱) + سالین، IV- گروه اتیدیوم بروماید (٪۰/۰۱) + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵ μg/rat، و V- گروه اتیدیوم بروماید (٪۰/۰۱) + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰μg/rat.

موش‌ها به صورت عمیق با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۵mg/kg) بیهوش شده [۲۳] و در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting, USA) در موقعیت جمجمه مسطح مستقر گردیدند [۱۷]. پوست ناحیه سر به حداقل میزان برش داده شده، پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و بر اساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس، ناحیه مربوط به CA_1 هیپوکامپ در سطح جمجمه به صورت دوطرفه مشخص گردید (AP= -۳/۸; ML = ±۲/۲; DV= +۲/۷) [۳۶] و کانول-گذاری انجام شد.

موش‌های صحرائی در گروه‌های II، III، IV و V تحت جراحی قرار گرفتند و به مدت ۷-۵ روز دوره بهبودی را طی نمودند. ریز تزریق داروها با استفاده از سرنگ همیلتون ۱۰ μl انجام گرفت. برای القای مدل تجربی MS، سم اتیدیوم بروماید به صورت تک دوز (محلول ٪۰/۰۱ اتیدیوم بروماید در سالین ٪۰/۹ استریل) و در حجم ۳ میکرولیتر و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه به صورت دو طرفه به تشکیلات هیپوکامپ (ناحیه CA_1) تزریق شد [۱۷]. موش‌های صحرائی گروه های تیمار با زعفران، یک هفته بعد از القای مدل تجربی MS، عصاره الکلی زعفران را در دو دوز ۵μg/rat و ۱۰μg/rat به مدت ۳ روز و به صورت ریزتزریق دریافت نمودند. عصاره زعفران به صورت محلول در سالین ٪۰/۹ استریل و در حجم ۳ میکرولیتر و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه به صورت دو طرفه به تشکیلات هیپوکامپ (ناحیه CA_1) تزریق شد (تمامی تزریق‌ها در فاصله قبل از ظهر انجام می‌گرفت) [۹، ۱۷، ۲۰].

1. Evaporator



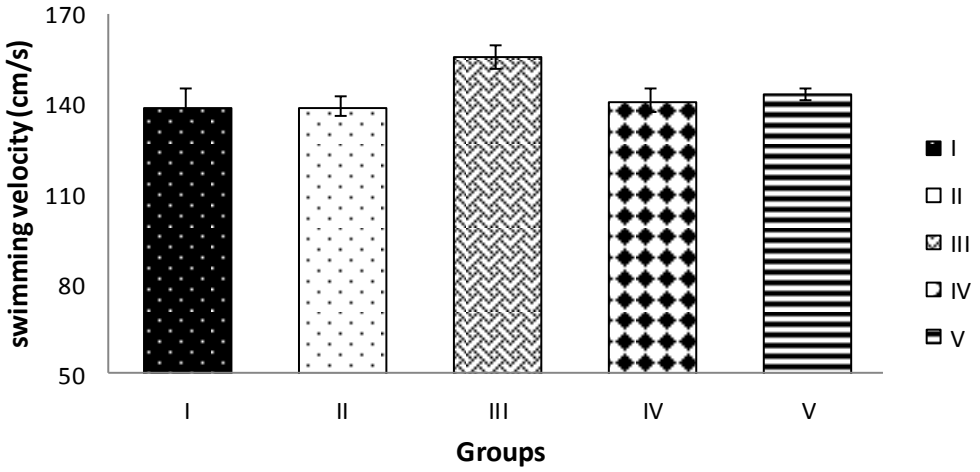
شکل ۱- تأیید بافت‌شناسی ماکروسکوپی به منظور تعیین محل دقیق کانول-گذاری. ناحیه‌ی CA_1 هیپوکامپ پس از ریز تزریق دوطرفه‌ی رنگ قرمز خنثی در تصویر مشخص است.

پس از اتمام دوره‌ی تیمار، از هر یک از گروه‌های آزمایشی یک رت به صورت تصادفی انتخاب گردید. حیوانات رنگ قرمز خنثی را به منظور تعیین محل دقیق کانول‌گذاری به صورت ریز تزریق دریافت نمودند و پس از بیهوشی، سر آن‌ها با استفاده از گیوتین جدا شد و بافت مغز آن‌ها پس از شست‌وشو با سالین نرمال در محلول فرمالین ٪۲۰ قرار گرفت و برای تأیید بافت‌شناسی ماکروسکوپیک به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل گردید (شکل ۱). جهت ارزیابی اثرات تخریبی ریز تزریق سم اتیدیوم بروماید و نیز اثرات حفاظتی عصاره الکلی زعفران بر حافظه و یادگیری فضایی، روش ماز آبی موریس مورد استفاده قرار گرفت. این دستگاه از یک حوضچه استوانه-ای شکل سیاه رنگ (به قطر ۱۳۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر) با یک سکوی پنهان به قطر ۱۰ سانتی متر تشکیل شده است. ۲۴ ساعت پس از اتمام دوره تیمار، هر موش به مدت ۶ روز و هر روز یک نوبت (هر نوبت شامل ۴ تجربه) از ۴ ربع حوضچه به طور تصادفی تحت آزمایش قرار گرفت. فضای اطراف حوضچه با ۴ جهت اصلی شمال، جنوب، شرق و غرب مشخص شد تا ۴ موقعیت آلترناتیو برای شروع سنجش ماز آبی موریس فراهم شود. به هر موش ۶۰ ثانیه اجازه شنا برای یافتن سکو داده شد. اگر موش در پایان ۶۰ ثانیه موفق به یافتن سکو نمی‌شد از آب خارج می‌گردید و بر روی سکو قرار داده می‌شد. در پایان هر تجربه موش‌ها به مدت ۱۵ ثانیه بر روی سکو استراحت کردند. زمان سپری شده برای یافتن سکو و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو، به عنوان پارامترهای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی ثبت گردید. لازم به ذکر است که سرعت شنای حیوانات نیز به عنوان شاخصه-ای از توانایی حرکتی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت (سنجش ماز آبی موریس همیشه در فاصله قبل از ظهر انجام می‌گرفت) [۱۵].

۲۴ ساعت بعد از آخرین روز سنجش ماز آبی موریس، تمامی موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۵mg/kg) بیهوش شدند [۲۳]. سپس سر توسط گیوتین جدا شد و بلافاصله مغز خارج گردید و بر روی تخته‌ی برش یخ بسته (Ice-cooled) قرار گرفت و بخش هیپوکامپ به دقت تشریح و جدا شد و توسط سالین ٪۰/۹ استریل سرد شست‌وشو داده شد. هیپوکامپ جدا شده بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گردید و تا زمان تهیه‌ی هموژن در فریزر ۷۰- °C نگهداری شد [۱۳، ۲۲]. به منظور تهیه هموژن روی هر یک از نمونه‌ها محلول سرد KCL ٪۱/۱۵ با نسبت (۱:۱۰ w/v) اضافه گردید. سپس با استفاده از هموژنایزر مکانیکی هموژن بافت‌های هیپوکامپ تهیه گردید و بعد از سانتریفوژ کردن در دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C، محلول رویی استخراج شد تا برای آنالیز بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد [۱۳].

مالون دی آلدئید (MDA) حاصل تجزیه پلی اسیدهای چرب غیر اشباع است. تولید این ماده به عنوان بیومارکری برای سنجش میزان پروکسیداسیون لیپیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ۳ میلی لیتر اسید فسفریک ٪۱ و ۱ میلی لیتر محلول آبی تیوباربیتوریک اسید ٪۰/۶ (w/v) به ۰/۵ میلی لیتر محلول رویی اضافه گردیده و به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب جوش حرارت دید. پس از سرد شدن، ۴ میلی لیتر n-بوتانول به مخلوط اضافه شد و پس از به هم زدن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر توسط دستگاه اتوآنالیزور (Alcyon, USA) اندازه گیری شد. غلظت‌های ماده‌ی حاصله از واکنش MDA با تیوباربیتوریک اسید (TBARS) با استفاده از منحنی استاندارد MDA محاسبه شد که بر حسب nmol/mg پروتئین بیان شده است [۱۳].

داده های مربوط به سرعت شنا، مدت زمان یافتن سکو، مسافت شنا و میزان محصولات پروکسیداسیون لیپیدی (TBARS)، به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین



شکل ۲- مقایسه‌ی میانگین سرعت شنای حیوانات طی روزهای آموزش بین موش‌های صحرائی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران قرار گرفته‌اند. گروه‌ها: I (کنترل سالم)، II (سالین)، III (اتیدیوم بروماید + سالین)، IV (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵ µg/rat) و V (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰µg/rat). نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده است (در هر گروه، n=۷).

(Mean±S.E.M) ارائه گردید و اختلاف معنی دار توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، با آزمون تعقیبی Tukey مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت‌ها در سطح (P< ۰/۰۵) و (P< ۰/۰۱) معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

نتایج حافظه‌ی فضایی:

برای بررسی فرآیند یادگیری و حافظه فضایی در طی روزهای آزمایش، نتایج آماری حاصل از میانگین سرعت شنا، میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو و میانگین مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در حیوانات گروه های مختلف طی روزهای آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، سرعت شنای حیوانات تفاوت معنی داری را بین گروه‌های آزمایشی در طی آزمون ماز آبی موریس نشان نداد. سرعت شنای هر حیوان به منظور کنترل تفاوت در عملکرد ماز آبی موریس مورد بررسی قرار گرفت. شاخصه‌ی زمان سپری شده برای رسیدن به سکو (escape latency) و مسافت طی شده برای یافتن سکو طی شش روز آزمون ماز آبی موریس در شکل ۳ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که میانگین مدت زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان طی روزهای آموزش در تمامی گروه‌ها کاهش پیدا کرده است. بر اساس نتایج حاصل از بررسی آماری، زمان سپری شده برای رسیدن به سکو در روز سوم آموزش، بین گروه‌های III (اتیدیوم بروماید + سالین) و V (اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰µg/rat) تفاوت معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۳-A). همچنین تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که در روزهای پنجم و ششم آموزش، گروه III در مقایسه با سایر گروه‌ها زمان بیشتری را برای پیدا نمودن سکو سپری کرده است اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد (شکل ۳-A). نتایج تقریباً مشابهی در شاخصه‌ی مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در طی روزهای آموزش دیده می‌شود (شکل ۳-B).

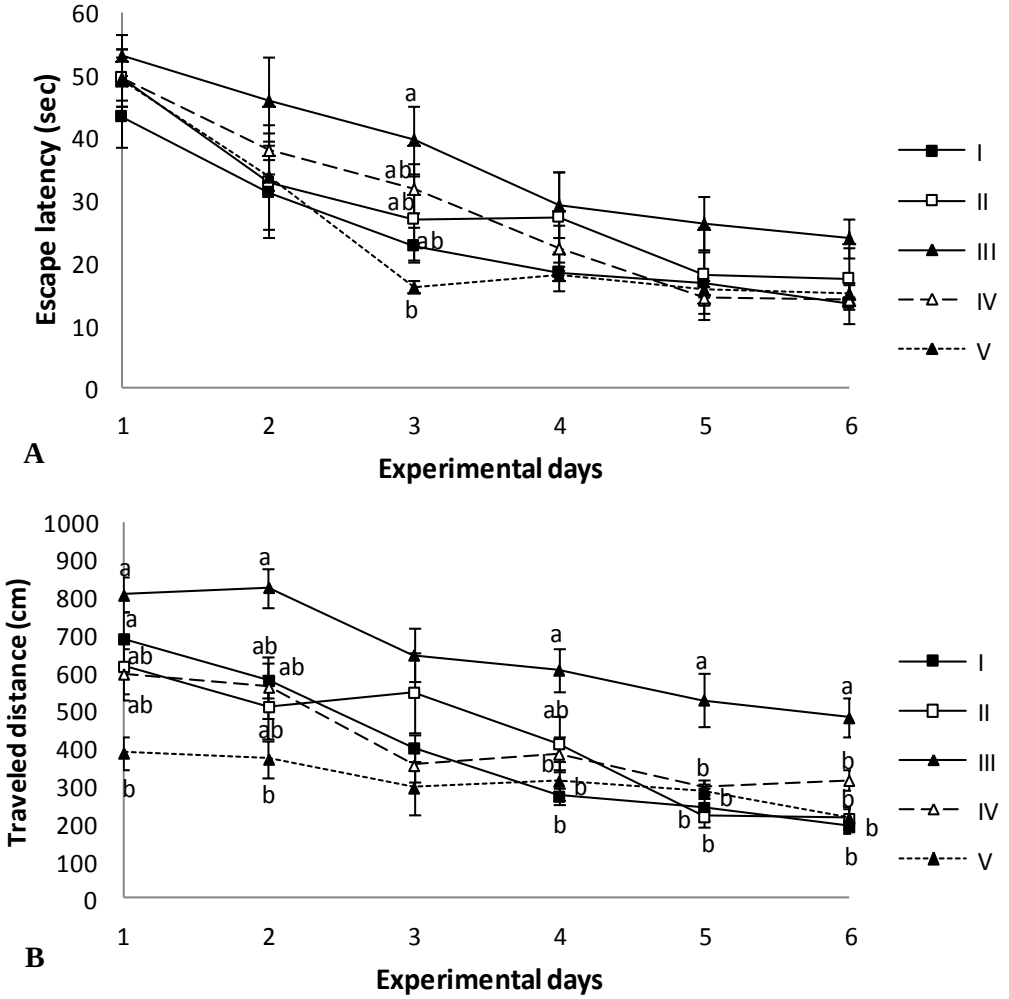
نتایج به دست آمده از بررسی آماری نشان داد که شاخصه‌ی مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان نیز در طی روزهای آموزش در تمامی گروه‌های آزمایشی کاهش یافته است (P<۰/۰۵)؛ با این حال، در روزهای پنجم و ششم،گروه‌های کنترل سالم (I و II) و گروه‌های تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران (IV و V) مسافت کوتاه‌تری را در مقایسه با گروه III (اتیدیوم بروماید + سالین) برای رسیدن به سکوی پنهان طی نموده‌اند (شکل ۳-B). همچنین بررسی آماری شاخصه‌های مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان طی روزهای آموزش بین گروه‌های تیمار با زعفران، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو شاخصه از یک الگوی وابسته به دوز پیروی کرده‌اند و حیوانات گروه V (اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰µg/rat) در مقایسه با گروه IV (اتیدیوم بروماید + عصارهٔ

الکلی زعفران با دوز ۵μg/rat) زمان و مسافت کمتری را برای یافتن سکوی پنهان سپری نموده‌اند؛ با این حال تفاوت آماری معنی‌دار بین دو گروه وجود ندارد (شکل ۳).

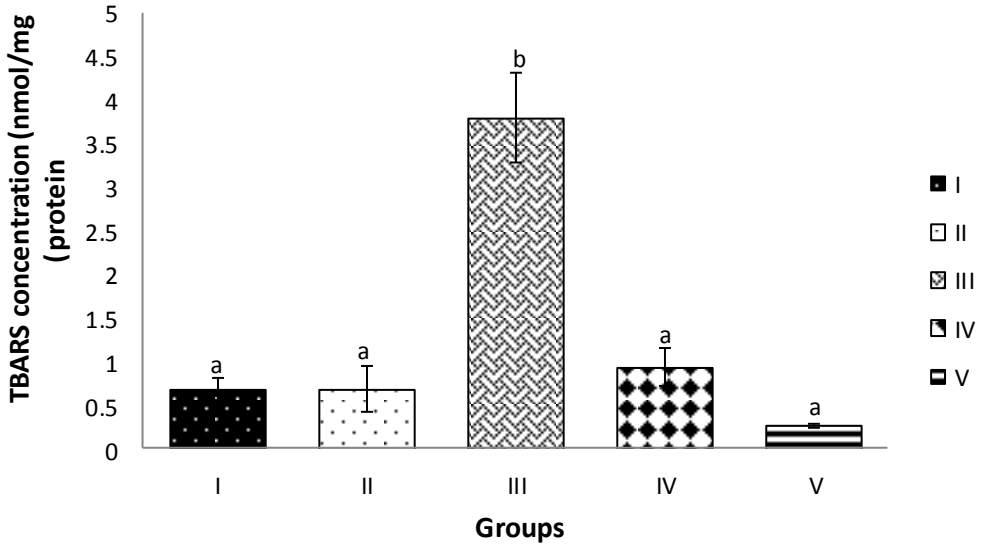
در رابطه با مقایسه‌ی عملکرد گروه‌های کنترل سالم (I و II) و گروه‌های تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران (IV و V)، بررسی آماری نتایج نشان داد که در کلیه‌ی روزهای آموزش تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مذکور مشاهده نشد (شکل ۳). این یافته‌ها نشان می‌دهند که اختلال عملکرد حافظه و یادگیری فضایی که با ریزتزریق سم اتیدیوم بروماید ایجاد شده است، توسط تیمار با عصاره‌ی زعفران و به صورت وابسته به دوز بهبود یافته است.

نتایج سنجش پروکسیداسیون لیپیدی:

القای دمیلیناسیون تجربی توسط سم اتیدیوم بروماید یکی از شاخصه‌های مهم استرس اکسیداتیو (پارامتر محصولات پروکسیداسیون لیپیدی) را تحت تأثیر قرار داد. با توجه به آنالیز داده های پروکسیداسیون لیپیدی، مقادیر TBARS در گروه III (اتیدیوم بروماید + سالین) در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم (I و II) افزایش معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۱) (شکل ۴). تیمار عصاره‌ی الکلی زعفران با دو دوز ۵μg/rat و ۱۰μg/rat میزان محصولات پروکسیداسیون لیپیدی را به صورت وابسته به دوز و به طور معنی‌داری به میزان طبیعی آن‌ها نزدیک کرد (گروه‌های IV و V) (P<۰/۰۱). پارامتر



شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین مدت زمان سپری شده (A) و مسافت طی شده (B) برای رسیدن به سکو طی روزهای آموزش بین موش‌های صحرائی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران قرار گرفته‌اند. گروه‌ها: I (کنترل سالم)، II (سالین)، III (اتیدیوم بروماید + سالین)، IV (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵ μg/rat) و V (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰μg/rat). نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی در هر روز با حروف متفاوت a و b نشان داده شده است. گروه‌هایی که با حروف a و b مشخص شده‌اند، در هر روز نسبت به هم اختلاف آماری معنی‌دار دارند؛ ولی گروه‌هایی که با حروف ab مشخص گردیده‌اند، در هر روز نه نسبت به هم و نه نسبت به گروه‌هایی که با a و b نشان داده شده‌اند، اختلاف آماری معنی‌داری ندارند (P<۰/۰۵) (در هر گروه، n=۷).



شکل ٤- نتایج سنجش میزان TBARS برای ارزیابی میزان پروکسیداسیون لیپیدی در هیپوکامپ موش‌های صحرائی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار کوتاه مدت عصاره‌ی زعفران قرار گرفته‌اند. گروه‌ها: I (کنترل سالم)، II (سالین)، III (اتیدیوم بروماید + سالین)، IV (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵μg/rat) و V (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰μg/rat). نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی با حروف a و b نشان داده شده است (P<۰/۰۱) (در هر گروه، n=۶).

TBARS در گروه V (اتیدیوم بروماید+عصارهٔ الکلی زعفران با دوز ۱۰μg/rat) کاهش بیشتری را نسبت به گروه IV (اتیدیوم بروماید+عصارهٔ الکلی زعفران با دوز ۵μg/rat) نشان داد اما به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مذکور مشاهده نشد (شکل ۴). همچنین آزمون آماری نشان داد که در مقادیر محصولات پروکسیداسیون لیپیدی، بین گروه‌های کنترل سالم (I و II) و گروه‌های تحت تیمار با عصارهٔ زعفران (IV و V) تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۴). این نتایج بیان می‌کنند که ریزتزریق عصاره‌ی زعفران به مدت سه روز، آسیب اکسیداتیو القاء شده توسط سم اتیدیوم بروماید را بهبود بخشید و پارامتر بیوشیمیایی TBARS را به طور معنی‌داری به مقادیر طبیعی آن نزدیک کرد.

بحث

در بررسی حاضر تأثیر تزریق داخل هیپوکامپی گلیوتوکسین اتیدیوم بروماید و نیز تأثیر ریز تزریق کوتاه مدت عصاره الکلی زعفران با دو دوز متفاوت، بر روی تغییرات حافظه فضایی و وضعیت اکسیداتیو نمونه‌های تجربی مالتیپل اسکلروزیس مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق موضعی سم اتیدیوم بروماید به تشکیلات هیپوکامپی (CA_1)، باعث تخریب روند یادگیری، حافظه فضایی و القای استرس اکسیداتیو در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم می‌شود. همچنین ریزتزریق عصاره‌ی زعفران به صورت کوتاه مدت، اختلالات یادگیری و حافظه و نیز افزایش بار اکسیداتیو ناشی از تزریق موضعی اتیدیوم بروماید را بهبود می‌بخشد. اتیدیوم بروماید ترکیبی است که به عنوان یک ماده‌ی سمی برای شبیه سازی پروسه‌ی پاتوفیزیولوژیک بیماری‌های نورودژنراتیو نظیر MS کاربرد دارد [۳۲]. مطالعات فراوانی گزارش کرده‌اند که تشکیلات ساختاری هیپوکامپ به عنوان یکی از مهم‌ترین بخش‌های خاکستری سیستم اعصاب مرکزی (CNS)، در بیماری MS تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۱۷]. لذا، بیماری MS شایع‌ترین اختلال دمیلینه‌کننده‌ی سیستم اعصاب مرکزی است که نقایص شناختی یکی از مهم‌ترین تعیین کننده‌های کیفیت زندگی مبتلایان به این بیماری محسوب می‌شود [۲۷، ۴۳]. با استفاده از این مدل، تحقیق حاضر نشان داد که تزریق تک دوز محلول ٪۰/۰۱ اتیدیوم بروماید به صورت مستقیم به تشکیلات هیپوکامپ (ناحیه CA_1)، عملکرد یادگیری و حافظه‌ی فضایی وابسته به هیپوکامپ را دچار اختلال می‌کند (شکل ۳). نتایج مطالعه حاضر مبنی بر اختلال حافظه فضایی در مدل‌های تجربی MS، با نتایج به دست آمده از مطالعات انجام گرفته توسط Kim و همکاران [۲۴]، Ziehn و همکاران [۴۴] و Nizri و همکاران [۳۳] هم راستاست. در

مطالعات مذکور به منظور القای MS، گلیکوپروتئین میلین اولیگودندروسیتی حل شده در اجوانت کامل فروند[1] مورد استفاده قرار گرفته بود؛ لذا مدل تجربی آن‌ها از نوع القایی توسط خود ایمنی یا همان انسفالومیلیت خود ایمنی تجربی (EAE) بود. بررسی آماری نتایج میانگین سرعت شنا برای رسیدن به سکوی پنهان نشان داد که بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۲)، که بیانگر عدم تأثیر ریزتزریق اتیدیوم بروماید بر فعالیت‌های حرکتی حیوانات می‌باشد. به نظر می‌رسد اثرات منفی ریزتزریق اتیدیوم بروماید بر یادگیری و حافظه از طریق افزایش بار اکسیداتیو واسطه-گری می‌گردد، که صدمات جبران‌ناپذیری را به مغز و سلول‌های عصبی وارد می‌آورد [۱۹]. همانطور که در بخش مقدمه اشاره گردید، هنگامی‌که تولید گونه‌های باز فعال اکسیژن (ROS) از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی تجاوز می-کند، استرس اکسیداتیو روی می‌دهد که در نهایت منجر به آسیب به ماکرومولکول‌هایی نظیر لیپیدهای غشایی، پروتئین-های ضروری و نوکلئوتیدها می‌گردد. استرس اکسیداتیو با افزایش تولید ROS و یا با کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تشدید می‌شود. سلول‌های CNS مصرف اکسیژن بالایی دارند و غنی از پلی اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند؛ بنابراین، نورون‌ها به طور مشخص نسبت به پروکسیداسیون لیپیدی حساس می‌باشند [۱۳]. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تزریق موضعی سم اتیدیوم بروماید به داخل تشکیلات هیپوکامپی (ناحیه CA_1)، منجر به افزایش معنی‌دار محصولات پروکسیداسیون لیپیدی در مدل‌های تجربی MS می‌گردد (شکل ۴، گروه III). مطالعات دیگری هم نشان داده‌اند که تزریق مستقیم گلیوتوکسین اتیدیوم بروماید، سبب القای استرس اکسیداتیو و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) شاخص پروکسیداسیون لیپیدی می‌گردد که نشان‌دهنده‌ی افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در سیستم اعصاب مرکزی است [۱، ۲، ۴۰]. این یافته‌ها، شواهد و مدارک مهمی هستند که نشان می‌دهند استرس اکسیداتیو در اختلالات دمیلینه-کننده نظیر MS نقش دارد. افزایش استرس اکسیداتیو اثرات مضری را بر عملکرد سیستم عصبی اعمال می‌کند که با بیماری‌های تحلیل برنده‌ی سیستم اعصاب مرکزی و نقایص شناختی ایجاد شده در آن‌ها، ارتباط دارد [۲].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ریزتزریق عصارهٔ الکلی زعفران اختلالات به وجود آمده در عملکرد یادگیری و حافظه فضایی را به صورت وابسته به دوز بهبود می‌بخشد. عصاره‌ی زعفران با دوز ۱۰ μg/rat مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان را به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۳، گروه‌های IV و V). تفاوت معنی‌داری در میانگین سرعت شنا در طی روزهای آموزش بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد (شکل ۲)؛ بدین معنی که کاهش زمان سپری شده و مسافت طی شده برای یافتن سکو به دلیل اثر عصارهٔ زعفران بر روی سرعت شنا نمی‌باشد. بنابراین نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهند که عصارهٔ زعفران تأثیری بر توانایی حرکتی حیوانات ندارد. یافته های این بررسی تا حدود زیادی در توافق با نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته توسط دشتی و همکاران مبنی بر اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی زعفران در پیشگیری و درمان اختلالات یادگیری و نقایص حافظه القاء شده توسط D-گالاکتوز و نیتریت سدیم، در آزمون‌های اجتنابی فعال و غیر فعال می‌باشد [۷]. همچنین، نتایج مطالعه حاضر با بررسی دیگری که در آن عصاره زعفران و جزء فعال آن کروسین به عنوان تیمار انتخاب گردیده و منجر به بهبودی نقایص شناختی القاء شده توسط هیپوپرفیوژن مزمن مغزی در موش‌های صحرائی شده بود، همخوانی دارد [۲۱]. از بررسی‌های دیگر که با یافته‌ی این مطالعه هم سو می‌باشد می‌توان به مطالعه‌ای اشاره نمود که در آن موش‌های صحرائی تحت استرس مزمن بی حرکتی، عصاره‌ی زعفران و جزء فعال آن کروسین را به عنوان پیش تیمار و به مدت ۲۱ روز، روزانه یک ساعت قبل از اعمال استرس دریافت می‌کردند [۱۳]. مطالعه انسانی انجام گرفته توسط آخوندزاده و همکاران، در رابطه با ارتباط زعفران و بهبود عملکرد حافظه در بیماری‌های تحلیل برنده‌ی عصبی نشان می‌دهد که تیمار بلندمدت با استفاده از کپسول‌های حاوی عصاره هیدروالکلی زعفران در درمان بیماران مبتلا به آلزایمر خفیف و متوسط مفید می‌باشد و به طور معنی داری عملکرد شناختی در این بیماران را در مقایسه با گروه کنترل که کپسول‌های دارونما دریافت نموده‌اند، بهبود می‌بخشد [۵]. مطالعه ای که اخیراً

1. Complete Freund's adjuvant

انجام گرفته است نیز به روشنی بیان می‌کند که عصاره‌ی آبی زعفران اختلالات حافظه القاء شده با مورفین را بهبود می‌بخشد [۳۱]. مطالعات فوق بیانگر تأثیر عصاره‌ی زعفران و ترکیبات فعال آن کروسین‌ها، بر مکانیسم‌های زیربنایی حافظه‌ی تشخیصی و فضایی می‌باشد. اخیراً پیشنهاد گردیده است که اثر مثبت زعفران بر فرآیندهای یادگیری و حافظه، به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فعال آن است [۳۵]. زعفران و جزء فعال آن کروسین، آنتی‌اکسیدان‌های بسیار قوی هستند. عصاره زعفران و کروسین به عنوان گیرنده‌ی رادیکال‌های آزاد، به ویژه آنیون‌های سوپروکسید، عمل می‌کنند و لذا سلول‌ها را از استرس اکسیداتیو حفاظت می‌کنند. از طرفی شواهد بیان می‌کنند که استرس سلولی القاء شده توسط رادیکال‌های آزاد، عامل انواعی از اختلالات تحلیل برنده‌ی سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد [۴].

قسمت دیگری از نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره‌ی الکلی زعفران بیومارکر پروکسیداسیون لیپیدی در هیپوکامپ مدل‌های تجربی MS را به طور معنی‌داری تعدیل می‌کند (شکل ۴، گروه‌های IV و V). این یافته با بررسی دیگری که در آن تزریق داخل صفاقی عصاره زعفران به مدت ۵ روز متوالی به عنوان تیمار انتخاب شده بود مطابقت دارد [۸]. در مطالعه دیگری که استرس اکسیداتیو با استفاده از ژینوتوکسین ها القاء شده بود و تجویز خوراکی عصاره آبی زعفران به مدت ۵ روز متوالی به عنوان پیش تیمار انتخاب گردیده بود، نیز کاهش معنی داری در سطح محصولات پروکسیداسیون لیپیدی مشاهده شد که با نتایج بررسی حاضر همسو می‌باشد [۳۷]. در مطالعات دیگر [۱۰، ۱۳، ۳۵، ۳۸] نیز نشان داده شده است که استفاده از عصارهٔ زعفران به عنوان تیمار در کاهش معنی دار محصولات پروکسیداسیون لیپیدی تأثیرگذار است. پروکسیداسیون لیپیدی یکی از دقیق‌ترین پارامترهای اندوژن با کاربرد وسیع برای نشان دادن میزان فعالیت گونه‌های بازفعال اکسیژن (ROS) در محیط in-vivo می‌باشد. یکی از محصولات پروکسیداسیون لیپیدی، مالون دی آلدئید (MDA) است که به عنوان نشانگری حساس و قابل اطمینان برای استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شده است.

در بررسی دیگری که مشابه تحقیق حاضر می‌باشد [۴۰] نشان داده شده است که تزریق داخل صفاقی ویتامین آنتی اکسیدانی E به مدت یک هفته، مانع از افزایش محصولات پروکسیداسیون لیپیدی در نمونه های سرم رت‌های دمیلینه شده با سم اتیدیوم بروماید می‌گردد. همچنین، مطالعه انجام گرفته توسط Liu و همکارانش، در رابطه با ارتباط بین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و پارامترهای استرس اکسیداتیو در مدل‌های تجربی MS نشان می‌دهد که استفاده از بیلی روبین به عنوان تیمار به مدت ۵ روز در موش‌های صحرائی که با تزریق زیر جلدی پروتئین پایه میلین[1] محلول در اجوانت کامل فروند، بیماری MS در آنها القا شده بود؛ به طور قابل توجهی منجر به بهبود علائم EAE از طریق کاهش تجمع محصولات پروکسیداسیون لیپیدی در پلاک‌های نخاعی می‌شود [۲۵]. به طور خلاصه می‌توان عنوان کرد که ریزتزریق کوتاه مدت عصاره‌ی الکلی زعفران می‌تواند به صورت وابسته به دوز، نقایص شناختی القاء شده توسط سم اتیدیوم بروماید در هیپوکامپ مدل‌های تجربی MS را بهبود بخشد. همچنین یافته‌های مطالعه‌ی حاضر پیشنهاد می‌کنند که عصاره‌ی زعفران به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی استرس اکسیداتیو در نورون‌ها را مهار می‌کند و می‌تواند در درمان اختلالات تحلیل برنده‌ی مغزی نظیر MS مفید باشد. با این حال، از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر، عدم بررسی وسعت و شدت دمیلیناسیون القاء شده توسط گلیوتوکسین اتیدیوم بروماید و همین‌طور عدم بررسی وسعت و شدت رمیلیناسیون احتمالی القاء شده توسط تزریق موضعی عصارهٔ الکلی زعفران می‌باشد. شایان ذکر است که مطالعه‌ی حاضر هیچ ادعایی مبنی بر بهبود روند رمیلیناسیون توسط عصاره‌ی زعفران ندارد. لذا پیشنهاد می‌گردد بررسی‌های تکمیلی به منظور تعیین مکانیسم‌های دقیق و اثبات اثرات تقویتی زعفران بر بهبود نقایص شناختی به وجود آمده طی بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی از جمله MS مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

مقاله‌ی حاضر مستخرج از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد بوده و بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی محترم دانشگاه تبریز در تأمین اعتبار لازم قدردانی می‌گردد.

1. Myelin basic protein (MBP)

References

[1] Abdel-Salam OME, Khadrawy YA, Mohammed NA, Youness ER, The effect of gabapentin on oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain. ***J Basic Clin Physiol Pharmacol*** 23 (2012) 61-68.

[2] Abdel-Salam OME, Khadrawy YA, Salem NA, Sleem AA, Oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain: the effect of piracetam and vinpocetine. ***Neurochem Res*** 36 (2011) 1062-1072.

[3] Abdullaev F, Espinosa-Aguirre J, Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. ***Cancer Detect Prev*** 28 (2004) 426-432.

[4] Abe K, Saito H, Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. ***Phytother Res*** 14 (2000) 149-152.

[5] Akhondzadeh S, Sabet MS, Harirchian M, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SS, Yousefi M, Alimardani R, Jamshidi A, Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial. ***J Clin Pharm Ther*** 35 (2010) 581-588.

[6] Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, Jia L, Yin HX, Chen C, Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. ***Food Chem*** 109 (2008) 484-492.

[7] Dashti-ra MH, Anvari M, Hosseini SM, Zeinalib F, Saffron (*Crocus sativus* L.) extract prevents and improves D-galactose and $NaNO_2$ induced memory impairment in mice. ***EXCLI J*** 11 (2012) 328-337.

[8] Del-Angel D, Martinez N, Cruz M, Urrutia E, Negrete L, Abdullaev F, Cruz V, Silva-Adaya D, González-Cortés C, SantamariaA, Saffron extract ameliorates oxidative damage and mitochondrial dysfunction in the rat brain. ***ACTA Hort*** 739 (2007) 359-368.

[9] DiCarlo G, Wilcock D, Henderson D, Gordon M, Morgan D, Intrahippocampal LPS injections reduce Aβ load in APP+ PS1 transgenic mice. ***Neurobiol Aging*** 22 (2001) 1007-1012.

[10] El-Beshbishy HA, Hassan MH, Aly HA, Doghish AS, Alghaithy AA., Crocin "saffron" protects against beryllium chloride toxicity in rats through diminution of oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. ***Ecotoxicol Environ Saf*** 83 (2012) 47-54.

[11] Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. ***Harrison's Principles of Internal Medicine***. New York: McGraw-Hill, 2008.

[12] Fukui H, Toyoshima K, Komaki R, Psychological and neuroendocrinological effects of odor of saffron (*Crocus sativus*). ***Phytomedicine*** 18 (2011) 726-730.

[13] Ghadrdoost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, Haghighi S, Sameni HR, Pahlvan S, Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. ***Eur J Pharmacol*** 667 (2011) 222-229.

[14] Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D, The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. ***J Neurol*** 251 (2004) 261-268.

[15] Giralt A, Saavedra A, Carretón O, Xifró X, Alberch J, Pérez-Navarro E, Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: role in Huntington's disease. ***Hum Mol Gen*** 20 (2011) 4232-4247.

[16] Glanz BI, Healy BC, Hviid LE, Chitnis T, Weiner HL, Cognitive deterioration in patients with early multiple sclerosis: a5-year study. ***J Neurol Neurosurg Psychiatry*** 83 (2012) 38-43.

[17] Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-ZadehJ, Mozafari S, Tiraihi T, Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. ***Cell Mol Neurobiol*** 30 (2010) 289-299.

[18] Guimarães J, Sá MJ, Cognitive dysfunction in Multiple Sclerosis. ***Front Neurol*** 3 (2012) 1-8.

[19] Haider L, FischerMT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H, Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. ***Brain*** 134 (2011) 1914-1924.

[20] Hooshmandi Z, Rohani AH, Eidi A, Fatahi Z, Golmanesh L, Sahraei H, Reduction of metabolic and behavioral signs of acute stress in male Wistar rats by saffron water extract and its constituent safranal. ***Pharm Biol*** 49 (2011) 947-954.

[21] Hosseinzadeh H, Sadegnia HR, Motamedshariaty V,

Ghaeni FA, Mohajeri S, Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. ***Phytother Res*** 26 (2012) 381-386.

[22] Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour Sh, Haghir H, Bonakdaran Sh, Varasteh A, The study of effects of insulin and ascorbic acid on Bcl-2 family expression in hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. ***ZUMS J*** 15 (2007) 1-15.

[23] Khalili M, Hamzeh F,Effects of Active Constituents of *Crocus sativus* L., Crocin on Streptozocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Male Rats. ***Iran Biomed J*** 14 (2010) 59-65.

[24] Kim D, Hao J, Liu R, Turner G, Shi FD, Rho JM, Inflammation-Mediated Memory Dysfunction and Effects of a Ketogenic Diet in a Murine Model of Multiple Sclerosis. ***PLoS ONE*** 7 (2012) 35476.

[25] Liu Y, Zhu B, Wang X, Luo L, Li P, Paty DW, Cynader MS, Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis. ***J Neuroimmunol*** 139 (2003) 27-35.

[26] Mazzanti CM, Spanevello R, Ahmed M, Pereira LB, Gonçalves JF, Corrêa M, Schmatz R, Stefanello N, Leal DBR, Mazzanti A, Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. ***Int J Dev Neurosci*** 27 (2009) 73-80.

[27] Mazzanti CM, Spanevello R, Ahmed M, Schmatz R, Mazzanti A, Salbego FZ, Graça DL, Sallis ESV, Morsch VM, Schetinger MRC, Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. ***Int J Dev Neurosci*** 25 (2007) 259-264.

[28] Melnyk JP, Wang S, Marcone MF, Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. ***Food Res Int*** 43 (2010) 1981-1989.

[29] Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M, The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. ***Neurochem Res*** 36 (2011) 1012-1016.

[30] Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I, Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. ***Food Chem Toxicol*** 47 (2009) 1909-1913.

[31] Naghibi SM, Hosseini M, Khani F, Rahimi M, Vafaee F, Rakhshandeh H, Aghaie A, Effect of Aqueous Extract of *Crocus sativus* L. on Morphine-Induced Memory Impairment. ***Adv Pharmacol Sci*** 2012 (2012) 1-7.

[32] Nassar CCS, Bondan EF, Alouche SR, Effects of aquatic exercises in a rat model of brainstem demyelination with ethidium bromide on the beam walking test. ***Arq Neuropsiquiatria*** 67 (2009) 652-656.

[33] Nizri E, Irony-Tur-Sinai M, Faranesh N, Lavon I, Lavi E, Weinstock M, Brenner T, Suppression of neuroinflammation and immunomodulation by the acetylcholinesterase inhibitor rivastigmine. ***J Neuroimmunol*** 203 (2008) 12-22.

[34] Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, Shoyama Y, Toda A, Eyanagi R, Soeda S, Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. ***Biochim Biophys Acta*** 1770 (2007) 578-584.

[35] Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, CordopatisP, Lamari FN, Margarity M, Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. ***Behav Brain Res*** 219 (2011) 197-204.

[36] Paxinos G, Watson C. ***The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates***. New York: Academic press, 2007.

[37] Premkumar K, AbrahamSK, Santhiya S, Ramesh A, Protective effects of saffron (*Crocus sativus* L.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. ***Phytother Res*** 17 (2003) 614-617.

[38] Shati A, Elsaid F, Hafez E, Biochemical and molecular aspects of aluminium chloride-induced neurotoxicity in mice and the protective role of *Crocus sativus* L.extraction and honey syrup. ***Neuroscience*** 175 (2011) 66-74.

[39] Shukla V, Mishra SK, Pant HC, Oxidative stress in neurodegeneration. ***Adv Pharmacol Sci*** 2011 (2011) 1-13.

[40] Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R, Bagatini M, Stefanello N, Correa M, Kaizer R, Maldonado P, Mazzanti A, Graça DL, Effect of vitamin E on ectonucleotidaseactivities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally

demyelinated. ***Brain Res Bull*** 80 (2009) 45-51.

[41] Van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra C, Van der Valk P, De Vries H,Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. ***Free Radic Biol Med*** 45 (2008) 1729-1737.

[42] Zhang H, Jarjour AA, Boyd A, Williams A, Central nervous system remyelination in culture-A tool for multiple sclerosis research. ***Exp Neurol*** 230 (2011) 138-148.

[43] Ziehn MO, Avedisian AA, Dervin SM, Umeda EA, O'Dell TJ,& ,.Oskuhl RR, Therapeutic Testosterone Administration Preserves Excitatory Synaptic Transmission in the Hippocampus during Autoimmune Demyelinating Disease. ***J Neurosci*** 32 (2012) 12312-12324.

[44] Ziehn MO, Avedisian AA, Tiwari-Woodruff S, Voskuhl RR, Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. ***Lab Invest*** 90 (2010) 774-786.