

## اثرات حفاظتی عصاره زعفران «Crocus Sativus» بر کاهش استرس اکسیداتیو طی بیماری پارکینسون در رت های نر

حمیرا حاتمی<sup>۱\*</sup>، غلامرضا دهقان<sup>۱</sup>، فرشته علوی<sup>۱</sup>

(۱) گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۰

### چکیده

**مقدمه:** بیماری پارکینسون از شایع ترین بیماری های نورودژنراتیو مغز می باشد. با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی قوی عصاره زعفران در حذف رادیکال های آزاد، این مطالعه به منظور بررسی اثرات محافظتی عصاره زعفران بر کاهش استرس اکسیداتیو در رت های پارکینسونی پیش تیمار با عصاره زعفران انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۵ سر رت نر با وزن تقریبی  $250 \pm 50$  گرم به صورت تصادفی در ۵ گروه شامل: کنترل، شاهد (دریافت کننده سالین + اسید آسکوربیک)، پارکینسونی (تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین) و ۲ گروه پارکینسونی + پیش تیمار عصاره زعفران (۵ میکروگرم/رت و ۱۰ میکروگرم/رت، به مدت ۵ روز) مورد مطالعه قرار گرفتند. ایجاد مدل پارکینسونی با تزریق داخل مغزی ۶-هیدروکسی دوپامین ۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر) صورت گرفت. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل (FRAP)، سطوح مالون دی آلدئید (MDA)، میزان فعالیت آنزیم سوپرکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پروکسیداز (GPX) در مغز میانی با استفاده از کیت مخصوص اندازه گیری شد.

**یافته های پژوهشی:** میزان FRAP بین گروه کنترل، گروه های دریافت کننده زعفران و گروه پارکینسونی تفاوت معنی داری را نشان داد ( $P < 0.01$ ). عصاره زعفران به طور معنی داری تولید مالون دی آلدئید را کاهش داد ( $P < 0.01$ ) و میزان فعالیت آنزیم سوپرکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پروکسیداز را در مغز میانی به طور معنی داری افزایش داد ( $P < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** به نظر می رسد بخشی از اثر حفاظتی عصاره زعفران در برابر سم ۶-هیدروکسی دوپامین از طریق افزایش ظرفیت آنزیم های آنتی اکسیدان و کاهش تولید رادیکال های آزاد انجام می گیرد.

واژه های کلیدی: پارکینسون، عصاره زعفران، استرس اکسیداتیو

\* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email: h.hatami@tabrizu.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

پارکینسون از گروه بیماری های تحلیل برنده دستگاه خارج هرمی است که یاخته های جسم سیاه واقع در مغز میانی به تدریج از بین می رود و دوپامین که توسط آن ها ساخته می شود کاهش می یابد (۱). در خصوص مرگ سلول های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه فرضیات متعددی از قبیل نقص کمپلکس I میتوکندریایی مربوط به زنجیره انتقال الکترون، تجمع آهن، تجمع پروتئین، پاسخ های ایمنی التهابی به همراه عوامل محیطی مانند تروماهای فیزیکی و عفونت، اختلال عملکرد سیتوکروم کبدی p ۴۵۰ و افزایش تشکیل رادیکال های آزاد مطرح است (۲). از دست رفتن پیشرونده نورون های دوپامینرژیک در عقده های قاعده ای مهم ترین یافته پاتولوژیکی در مغز بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون است. نبود شدن این نورون ها منجر به کاهش نوروترانسمیتر دوپامین در این ناحیه می شود (۳). تا زمانی که حدود ۶۰-۵۰ درصد نورون های دوپامینرژیک از بین نرفته باشند و در حدود ۸۵-۸۰ درصد میزان دوپامین در استریاتوم کاهش نیافته باشد، علائم بیماری بروز نمی کنند (۴). مکانیسم مولکولی دقیق نبود شدن نورون های دوپامینرژیک و بروز عوارض بیماری پارکینسون ناشناخته است، اگر چه که مطالعات نشان داده اند که احتمالاً استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری نقش کلیدی در پاتوژنز PD بازی می کنند (۵). سیستم اعصاب مرکزی به علت میزان بالای مصرف اکسیژن، غلظت نسبتاً پایینی آنتی اکسیدان های کلاسیک و محتوای بالای لیپیدهای غیر اشباع (که بیشتر از همه مستعد اکسیداسیون هستند)، نسبت به حملات اکسیداتیو آسیب پذیر می باشد (۶). شواهد زیادی بر نقش محوری استرس اکسیداتیو و عملکرد نامناسب میتوکندریایی در پاتوفیزیولوژی بیماری های تحلیل برنده عصبی وجود دارد (۷). عدم تعادل مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی که به وسیله تولید بیش از اندازه رادیکال های آزاد یا ورود آن ها از محیط به سیستم زنده ایجاد می گردد، منجر به آسیب و متعاقباً تحلیل عصبی می گردد (۸). در واقع استرس اکسیداتیو، عامل اصلی دژنراسیون در تعدادی از بیماری های نورودژنراتیو مانند پارکینسون و MS

می باشد (۹). استرس اکسیداتیو نه تنها نورون های دوپامینرژیکی را تخریب می کند بلکه با ایجاد اختلال در فرآیند فسفریلاسیون اکسیداتیو و کاهش تولید انرژی منجر به مرگ سلول ها می شود (۱۰). زعفران (Crocus sativus L.) گیاهی چند ساله از تیره زنبق Iridaceae به ارتفاع ۱۵ تا ۵۵ سانتی متر و دارای پیازی سخت و مدور و گوشت دار و پوشیده از غشاهای نازک و قهوه ای رنگ است (۱۱). چهار ترکیب عمده فعال زیستی در زعفران، کروسین، کروسستین، پیکروکروسین و سافرانال می باشند که نه تنها در مشخصات حسی زعفران (به ترتیب رنگ، طعم و عطر) بلکه در خواص بهبود دهنده سلامت نیز دخالت دارند (۱۲). مطالعات زیادی نشان داده اند که کروسین و کروسستین (که ترکیبات فعال زعفران هستند)، قادر می باشند اثرات حفاظتی دارویی متنوعی را اعمال کنند که به ظرفیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات نسبت داده می شود (۱۳). زعفران، کروسین، کروسستین و سافرانال اثرات از بین برنده رادیکال های آزاد و آنتی اکسیدانی دارند (۱۴). با توجه به این که فعالیت از بین بردگی رادیکال شدیداً با اثر ضدپیری ارتباط دارد، پیشنهاد شده که از عصاره زعفران به عنوان یک مکمل در غذاها استفاده شود (۱۵). کروسین و کروسستین به علت داشتن اثر آنتی اکسیدانی برای نگهداری اسپرم در درجه حرارت های بسیار پایین به کار می روند (۱۶). کروسستین در مدل ۶-هیدروکسی دوپامین پارکینسونیسم موش صحرایی از کاهش دوپامین در جسم مخطط و از کاهش گلوکاتایون در ماده سیاه مغز جلوگیری کرده، در حالی که مقدار ماده واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک را در ماده سیاه کاهش داده است. فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در مغز حیوانات گروهی که برای آن ها تزریق یک طرفه ۶-هیدروکسی دوپامین داخل جسم مخطط انجام شده کاهش یافته ولی در گروهی که به آن ها کروسستین برای ۷ روز تجویز شده تغییر نکرده است. یافته های هیستوپاتولوژیک در ماده سیاه نشان داد کروسستین، نورون ها را در برابر اثرات مخرب ۶-هیدروکسی دوپامین محافظت می کند. بنا بر این کروسستین برای پیشگیری و درمان پارکینسونیسم مفید می باشد (۱۷). کروسستین به علت اثر

با توجه به این که عصاره زعفران حاوی ترکیبات فعال و مواد موثر می باشد اثرات حفاظتی و آنتی اکسیدانی آن بر بیماری پارکینسون مورد تحقیق قرار گرفت. در واقع مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر زعفران بر سطح فعالیت آنزیم های دخیل در استرس اکسیداتیو (آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پروکسید) و غلظت مالون دی آلدئید در مغز میانی در مدل تجربی PD طراحی شد.

### مواد و روش ها

**حیوانات:** در این مطالعه تجربی از ۳۵ سررت نر با محدوده وزنی  $250 \pm 50$  گرم با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی (با کد اخلاق ۵۲/۱۳۲۶۷) استفاده شد که به طور تصادفی در پنج گروه هفت تایی قرار داده شدند. همه رت ها دارای شرایط یکسان دمایی  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد و دوره ۱۰ ساعت تاریکی و ۱۰ ساعت روشنایی بودند.

#### گروه های آزمایشی:

۱- گروه کنترل که هیچ تیماری روی آن ها صورت نگرفت.

۲- گروه شاهد (به دنبال جراحی، تزریق نرمال سالین ۰/۹ درصد حاوی اسید اسکوربیک ۰/۲ درون مغز میانی انجام گرفت).

۳- گروه پارکینسونی (به دنبال جراحی، جهت القای پارکینسون ۶-هیدروکسی دوپامین، ۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر) داخل مغز میانی تزریق گردید.

۴- گروه پیش تیمار رت های پارکینسونی با عصاره زعفران (با دوز ۵ میکروگرم/رت به روش درون مغزی) به مدت ۵ روز.

۵- گروه پیش تیمار رت های پارکینسونی با عصاره زعفران (با دوز ۱۰ میکروگرم/رت به روش درون مغزی) به مدت ۵ روز (۲۴).

**تهیه عصاره الکلی زعفران:** زعفران مورد استفاده از شرکت نوین زعفران (مشهد-ایران) تهیه گردید. ابتدا کلاله زعفران پودرگشت. سپس با استفاده از حلال اتانولی اقدام به عصاره گیری به روش سوکسله گردید. در این روش عصاره گیری ۱۰ گرم پودر کلاله زعفران در ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت سه

آنتی اکسیدانی، سلول های کبدی موش صحرایی را در برابر اثر مخرب آفلاتوکسین ها محافظت نموده است (۱۸). زعفران و کروستین می توانند از آسیب اکسیداتیو کلیه به علت ایسکمی در موش صحرایی پیشگیری نمایند (۱۹). این نتایج نشان می دهد که کروستین یک آنتی اکسیدان قوی است که می تواند با تنش اکسیداتیو در نورون ها مبارزه نماید. پژوهش های بیشتر درباره اثرات کروستین بر نورون ها ممکن است برای پیشگیری و یا درمان بیماری پارکینسون مفید باشد (۲۰). آنزیم های آنتی اکسیدانی به عنوان اولین خط دفاعی علیه گونه های بازفعال اکسیژن در تمامی بخش های سلولی و نیز خارج سلولی عمل می کنند (۲۱). نکته مهم این است که تغییرات فعالیت این آنزیم ها به موزی یکدیگر و به صورت تعدیل شده می باشد. این تغییرات موزی به ویژه در فعالیت آنزیم های گلوکاتایون پروکسیداز (GPx) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بسیار حائز اهمیت می باشد. در مطالعه انجام گرفته توسط قدردوست و همکاران در سال ۲۰۱۱ در رابطه با اثر حفاظتی عصاره زعفران بر روی مارکهای استرس اکسیداتیو حاکی از آن است که پیش تیمار عصاره زعفران به مدت ۱۲ روز، یک ساعت قبل از اعمال استرس مزمن، از کاهش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی ناشی از استرس مزمن جلوگیری کرده و منجر به افزایش فعالیت کل آنتی اکسیدانی در گروه های تحت تیمار با این عصاره می گردد (۲۲). در مطالعه دیگری که استرس اکسیداتیو با استفاده از ژینوتوکسین ها القاء شده بود و تجویز خوراکی عصاره آبی زعفران به مدت ۶ روز متوالی به عنوان پیش تیمار انتخاب شده بود، نیز کاهش معنی داری در سطح محصولات پروکسیداسیون لیپیدی مشاهده شد (۲۳). پروکسیداسیون لیپیدی یکی از بهترین پارامترهای اندوژن با کاربرد وسیع برای نشان دادن میزان فعالیت ROS در محیط in-vivo می باشد. یکی از محصولات پروکسیداسیون لیپیدی، مالون دی آلدئید (MDA) می باشد که به عنوان نشانگری حساس و قابل اطمینان برای استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شده است.

روز خیسانده شد. پس از صاف کردن محلول به دست آمده با صافی، خلال توسط دستگاه اوپورتور تحت خلاء و در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد حذف شد. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال و در دمای زیر صفر درجه نگهداری شد (۲۵).

**روش القاء پارکینسون به شیوه جراحی:** حیوانات با استفاده از کتامین ۱۰۰ mg/kg و زایلازین ۵ mg/kg به شیوه درون صفاقی بیهوش شدند (۲۶). سپس سر آن‌ها در دستگاه استریوتاکسیک جراحی مغز ثابت شد و با ایجاد شکاف طولی در بخش خلفی سر، جمجمه نمایان گردید. بعد از مشخص کردن مختصات استریوتاکس طبق اطلس پاکینوس (AP=-4.8, DV=-8.3, ML=1.6) با کمک دریل دو سوراخ در جمجمه ایجاد گردید و کانول مخصوص تزریق به آرامی وارد مغز میانی شد (۲۷). تزریق 6-OHDA در گروه‌های پارکینسونی با استفاده از سرنگ همیلتون با حجم ۳ میکرولیتر در هر جایگاه انجام شد. گروه شاهد نیز به همین روش تحت جراحی قرار گرفتند ولی به جای 6-OHDA حجم مساوی از سالین اسکوربات دریافت کردند.

**تایید القاء پارکینسون:** برای این کار از آزمایش ریرینگ استفاده شد. این آزمایش به منظور سنجش مهارت‌های حرکتی در موش‌ها اجرا شد. به طور طبیعی هنگامی که موش در یک محیط جدید و بسته قرار می‌گیرد بر اساس رفتار جستجوگرانه‌ای که دارد، روی دو پا بلند می‌شود و با اندام‌های جلویی دیوارهای محیط را لمس می‌کند. عملکرد موش‌های مبتلا به پارکینسون در این آزمایش دچار افت می‌شود. برای انجام این آزمایش، هر یک از موش‌ها جداگانه به مدت ۵ دقیقه در یک استوانه شیشه‌ای شفاف (به قطر ۲۰ سانتی متر و ارتفاع ۴۰ سانتی متر) قرار گرفتند و برای هر موش، تعداد دفعاتی را که روی دو پا بلند شد و یک یا هر دو دست را بالاتر از سطح شانه‌هایش قرار داد و دیواره‌ها را لمس نمود شمارش شد. عملکرد موش‌ها در یک محیط آرام با یک دوربین ویدیویی فیلم برداری شد و بررسی و امتیازدهی آن به انجام رسید (۲۸).

تهیه هموژن: پس از بیهوش کردن حیوان با کتامین مغز از سر خارج شده و یک سوم قدامی مغز میانی سمت چپ بعد از وزن کردن در محلول سالین ۰/۹ درصد سرد هموژنیزه گردید. بعد از سانتریفوژ کردن در دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، محلول رویی شفاف از رسوب زیرین جدا گردید تا برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد (۲۹).

**سنجش فعالیت کل آنتی اکسیدانی:** برای اندازه‌گیری فعالیت کل آنتی اکسیدانی از روش FRAP استفاده شد. اساس این روش، توانایی ماده مورد نظر در احیای یون‌های فریک به فرو با استفاده از معرفی به نام TPTZ می‌باشد. در حضور آنتی اکسیدان یون‌های فریک به فرو احیا می‌شود و در حضور معرف TPTZ محلول FRAP به رنگ بنفش می‌آید. ۱/۵ میلی لیتر از محلول FRAP با ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت مخلوط گردید و پس از حرارت دیدن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد جذب نوری آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر تعیین شد. مقادیر FRAP بر حسب mM Fe<sup>2+</sup>/mg پروتئین بیان شده است (۲۱).

**سنجش پروکسیداسیون لیپیدی:** مالون دی آلدئید حاصل تجزیه پلی اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد. تولید این ماده به عنوان بیومارکری برای سنجش میزان پروکسیداسیون لیپیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس روش اندازه‌گیری MDA بر پایه واکنش با تیوباربتوریک اسید می‌باشد. ماده حاصله TBARS می‌باشد که در طول موج ۳۵۰ نانومتر دارای جذب نوری است. به محلول شفاف به دست آمده از سانتریفوژ، اسید تری کلرواستیک و TBARS اضافه شد و در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۸۰ دقیقه قرار گرفت. مخلوط حاصل پس از سرد شدن، به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰ g سانتریفوژ شده و جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. غلظت‌های TBARS با استفاده از منحنی استاندارد MDA محاسبه شد که بر حسب nmol/mg پروتئین بیان شده است (۲۹).

**تعیین فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون پروکسیداز**

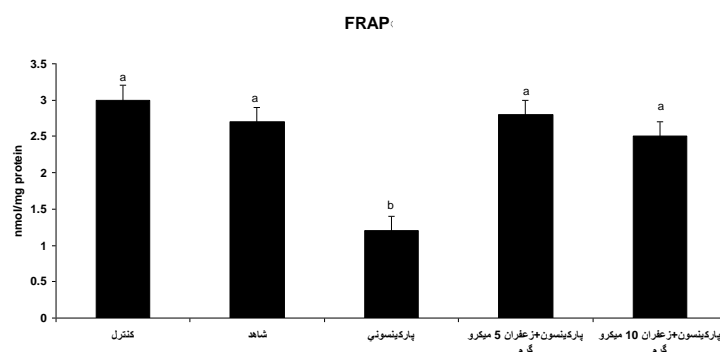
روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها: جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.  $P < 0.05$  از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد.

### یافته های پژوهش

القای مدل تجربی پارکینسون با استفاده از تزریق درون مغزی ۶-هیدروکسی دوپامین باعث کاهش FRAP در موش های مورد مطالعه شد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده های فعالیت کل آنتی اکسیدانی، مقادیر FRAP بین گروه پارکینسونی (PD) و گروه های کنترل و شاهد تفاوت معنی داری را نشان داد ( $P < 0.01$ ).

هم چنین مقادیر FRAP بین گروه PD و گروه های تحت تیمار با زعفران  $5 \mu\text{g}/\text{rat}$  و  $10 \mu\text{g}/\text{rat}$  نیز تفاوت معنی داری را نشان داد ( $P < 0.01$ ). از طرفی، در مقادیر FRAP بین گروه های کنترل، شاهد و تحت تیمار با زعفران  $5 \mu\text{g}/\text{rat}$  و  $10 \mu\text{g}/\text{rat}$  تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار شماره ۱).

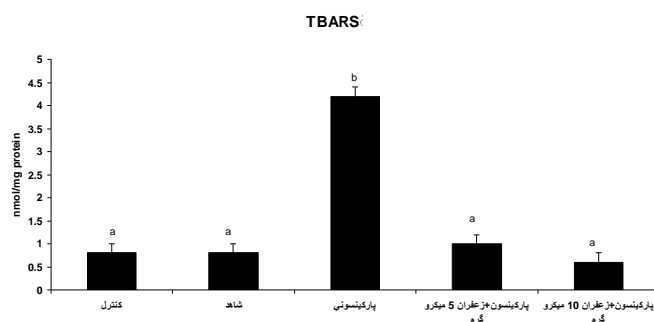
(GPx) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مغز میانی: فعالیت آنزیم گلوکوتایون پروکسیداز (GPx) با استفاده از روش Paglia & Valentine و توسط کیت Ransel اندازه گیری شد. گلوکوتایون پراکسیداز اکسیداسیون گلوکوتایون توسط کومن هیدروپروکسید را کاتالیز می کند. فعالیت GPx در سوپرناتانت در طول موج  $340 \text{ nm}$  و در  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شده و با استفاده از واحد (GPx U/L of Sample) تعیین گردید. مقادیر GPx بر حسب  $\text{U}/\text{mg}$  پروتئین بیان شده است (۲۱). برای تعیین فعالیت آنزیم SOD در مغز میانی، محلول شفاف به دست آمده از سانتریفوژ، به مدت  $40 \text{ min}$  دقیقه با محلول زانتین و زانتین اکسیداز در  $0.1 \text{ M}$  بافر فسفات پتاسیم ( $37^\circ\text{C}$  درجه،  $\text{PH}=7.8$ ) انکوبه شد. سپس به آن NBT (نیتروبلوتترازولیموم) افزوده و جذب نوری فورمازان آبی در طول موج  $550 \text{ nm}$  نانومتر در دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز از روی شدت و درجه مهار این واکنش سنجیده می شود. میزان فعالیت SOD بر حسب  $\text{U}/\text{mg}$  پروتئین ثبت شد (۲۹).



نمودار شماره ۱. نتایج سنجش میزان FRAP برای ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در مدل های تجربی PD تحت تیمار با زعفران. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی با حروف a و b نشان داده شده است ( $P < 0.01$ ).

ملاحظه ای میزان MDA را در گروه های تحت تیمار کاهش داد ( $P < 0.01$ ) و موجب افزایش معنی دار در میزان فعالیت SOD و GPx گردید ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۳، ۲).

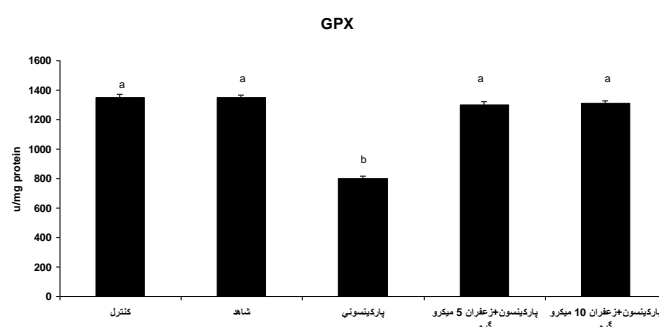
تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین باعث افزایش قابل ملاحظه ای در میزان مالون دی الدیید (MDA) و کاهش فعالیت گلوکوتایون پروکسیداز (GPx) شد ( $P < 0.01$ ). تجویز عصاره الکلی زعفران به طور قابل



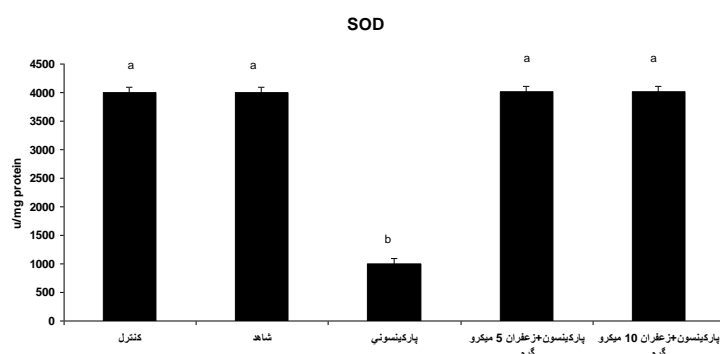
نمودار شماره ۲. نتایج سنجش میزان TBARS برای ارزیابی میزان پروکسیداسیون لیپیدی در مدل های تجربی PD تحت تیمار با زعفران. نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی با حروف a و b نشان داده شده است ( $P<0.01$ ).

معنی دار بین این گروه ها بود ( $P<0.01$ ). از طرف دیگر، تجویز عصاره زعفران، میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را تا سطح معنی داری بالا برد ( $P<0.05$ ) (نمودار شماره ۳، ۴).

مقایسه میانگین میزان MDA در دو گروه تحت تیمار با دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم بر رت تفاوت معنی داری را نشان نداد ولی این مقایسه در دو گروه تحت تیمار با گروه پارکیتسونی نشان دهنده تفاوت



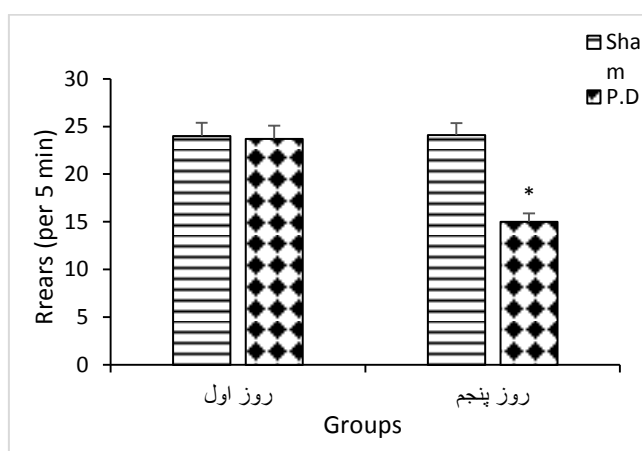
نمودار شماره ۳. نتایج سنجش میزان GPX برای ارزیابی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی این آنزیم در مغز میانی مدل های تجربی تحت تیمار با زعفران. نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی با حروف a و b نشان داده شده است ( $P<0.05$ ).



نمودار شماره ۴. نتایج سنجش میزان SOD برای ارزیابی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی این آنزیم در مدل های تجربی PD تحت تیمار با زعفران. نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی با حروف a و b نشان داده شده است ( $P<0.05$ ).

دو گروه شاهد و پارکینسونی (PD) و در روز پنجم بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ( $P < 0.05$ ) بین گروه شاهد و گروه پارکینسونی می باشد.

در نمودار شماره ۵ تایید القاء بیماری پارکینسون در رت های نر به کمک آزمایش ریرینگ نشان داده شده است. مقایسه میانگین میزان ریرینگ طی ۵ دقیقه در



نمودار شماره ۵. آزمایش ریرینگ: مقایسه عملکرد گروه شاهد و گروه دریافت کننده ۶-هیدروکسی دوپامین (PD) با دوز ۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر. \*بیانگر اختلاف معنی دار گروه شاهد و گروه دریافت کننده ۶-هیدروکسی دوپامین می باشد ( $P < 0.05$ ).

## بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل آماری داده های پارامترهای استرس اکسیداتیو نشان می دهد که طی القاء بیماری پارکینسون میزان MDA که شاخص پراکسیداسیون لیپیدی است در ناحیه استریاتوم مغز افزایش یافت. به علاوه تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین و القاء بیماری پارکینسون، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را کاهش داد. در واقع به نظر می رسد بیماری پارکینسون منجر به افزایش بار اکسیداتیو در استریاتوم رت های صحرایی نر بالغ می گردد. گزارش شده است که تزریق درون مغزی 6-OHDA سبب افزایش MDA و کاهش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در قشر مغز و استریاتوم می شود (۲۹).

در تحقیق دیگری Dani و همکاران نشان دادند که تزریق داخل مغزی 6-OHDA سبب افزایش استرس اکسیداتیو در استریاتوم ۲ روز پس از تزریق گردیده است. به طوری که 6-OHDA، MDA را افزایش داده و فعالیت GPx را کاهش داده است (۳۰). پروتئین ها و DNA میتوکندریایی به شدت نسبت به آسیب اکسیداتیو حساس می باشند (۳۱). لذا به نظر می رسد تغییرات میتوکندریایی ناشی از آسیب اکسیداتیو منجر به

افزایش تولید اندوژن گونه های باز فعال اکسیژن (ROS) می شود که این روند خود-تقویتی ممکن است به پیشبرد فرآیند نورودژنراسیون در بیماری پارکینسون (PD) کمک کند. ROS نقش فیزیولوژیک مهمی را در بیشتر فرآیندهای تنظیمی سلولی ایفا می کند. با این حال زمانی که سرعت تولید رادیکال های آزاد از ظرفیت آنتی اکسیدانی سلولی تجاوز می کند، استرس اکسیداتیو اتفاق می افتد که متعاقباً منجر به آسیب ماکرومولکول هایی نظیر لیپیدهای غشایی، پروتئین های ضروری و نوکلئوتیدها می شود. مطالعات اخیر به روشنی نشان می دهند که بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی در استریاتوم آسیب دیده، به شدت کاهش پیدا می کند. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش عصاره زعفران با دوزهای ۵  $\mu\text{g}/\text{rat}$  و ۱۰  $\mu\text{g}/\text{rat}$  مقادیر MDA را کاهش و فعالیت آنزیم های GPx و SOD را در استریاتوم افزایش داد. در واقع پیش تیمار زعفران با هر دو دوز دارای اثرات مشابه بوده و پراکسیداسیون لیپیدی و هم چنین کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی GPx و SOD ناشی از تزریق 6-OHDA را بهبود بخشید که نشان دهنده اثرات آنتی اکسیدانی عصاره زعفران در این مدل تجربی PD می باشد. از طرفی، عصاره زعفران با دو دوز

SOD در نورون ها از آپوپتوز القاء شده توسط ROS جلوگیری می کند. یافته های ما نشان داد که تیمار عصاره زعفران فعالیت این آنزیم ها را افزایش می دهد. این نتایج می تواند ناشی از این حقیقت باشد که عصاره زعفران و ترکیبات فعال آنتی اکسیدانی درون آن با کاهش گونه های باز فعال اکسیژن می تواند سنتز این آنزیم ها را تعدیل کند (۲۱). از دیگر نتایج این تحقیق می توان به افزایش معنی دار ظرفیت کل آنتی اکسیدانی و کاهش معنی دار مقادیر TBARS در گروه های تحت تیمار با زعفران به حد طبیعی این پارامترها، آن چنان که در گروه های کنترل و شاهد مشاهده می شود، اشاره نمود. به نظر می رسد اثرات حفاظتی عصاره زعفران در این مطالعه، تا حد زیادی به توانایی آن در به دام انداختن گونه های بازفعال اکسیژن مربوط باشد. هر چند مکانیسم هایی که عصاره زعفران از طریق آن ها اثرات حفاظتی خود را اعمال می کند چندان روشن نمی باشند، چنین پیشنهاد می شود که این اثرات حفاظتی ممکن است با محتوای عصاره زعفران که شامل چندین ترکیب آنتی اکسیدانی از قبیل کروسین، کروسستین، سافرانال و سایر کاروتنوئیدها می باشد، در ارتباط باشد؛ که هر یک به نوبه خود قادر به حفظ وضعیت ردوکس سلولی و متابولیسم انرژی می باشند. لذا از مشاهدات قبلی و نتایج ما آشکار است که ترکیبات عصاره زعفران مهم ترین عامل مهار پروکسیداسیون لیپیدی و حفظ وضعیت آنتی اکسیدانی و متابولیکی در سلول های تحت شرایط پاتوژنیک می باشد.

### سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد و بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز قدردانی می گردد.

### References

1. Lopezreal A, Rey P, Otero R, Mendez E, Labandeira JL. Angiotensin converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. *J Neurosci Res* 2005; 81: 865-73. doi: 10.1002/jnr.20598.

متفاوت، فعالیت کل آنتی اکسیدانی در استریاتوم مدل های تجربی PD را به طور معنی داری افزایش داد.

مطالعه انجام گرفته توسط قدردوست و همکاران در سال ۲۰۱۱ در رابطه با اثر حفاظتی عصاره ی زعفران بر روی مارکهای استرس اکسیداتیو حاکی از آن است که پیش تیمار عصاره زعفران به مدت ۱۲ روز، یک ساعت قبل از اعمال استرس مزمن، از کاهش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی ناشی از استرس مزمن جلوگیری کرده و منجر به افزایش فعالیت کل آنتی اکسیدانی در گروه های تحت تیمار با این عصاره می گردد (۲۱). یافته های پژوهش حاضر حاکی از کاهش معنی دار محصولات پروکسیداسیون لیپیدی در گروه های تحت تیمار با عصاره زعفران با دو دوز متفاوت می باشد. پروکسیداسیون لیپیدی یکی از بهترین پارامترهای اندوژن با کاربرد وسیع برای نشان دادن میزان فعالیت ROS در محیط in-vivo می باشد.

آنالیز داده های مربوط به سنجش میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در مغز میانی حیوانات تحت تیمار با عصاره زعفران نشان داد که میزان آنزیم GPx که به دنبال تزریق 6-OHDA کاهش پیدا کرده بود، افزایش یافته و تا حدودی به مقادیر طبیعی این آنزیم در گروه های کنترل و شاهد سالم نزدیک می گردد. تزریق عصاره زعفران با دو دوز متفاوت میزان فعالیت آنزیم SOD را به طور معنی داری افزایش می دهد. SOD آنیون های اضافی سوپروکسید را متابولیزه کرده و به پروکسید هیدروژن H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تبدیل می کند که در ادامه توسط GPx به آب تبدیل می شود (۲۱). گفته می شود GPx یک آنزیم حاوی سلنیم می باشد که با روبیدن هیدروپروکسیدازها و پروکسیدهای لیپیدی نیز سلول ها را در برابر ROS حفاظت می کند. هم چنین فعالیت

2. Kumarverma A, Raj J, Sharma V, BaliSingh T, Epidemiology and associated risk factors of Parkinson's disease among the north Indian population. *Clin Epidemiol Glob Health* 2017; 5, 8-13. doi.org/10.1016/j.cegh.2016.07.003.

3. Gang Hu, Bidel S, Jousilahti P, Antikainen R, Tuomilehto J. Coffee and



- Tea consumption and the risk of Parkinsons disease. *Move Disord* 2007; 22: 2242-8. doi: 10.1002/mds.21706.
4. Marsden CD. *Movement disorders*. 1<sup>th</sup> ed. New York Oxford Uni Publication.1996; P. 3998-4022.
  5. Obeso JA, Rodriguezoroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M. Missing pieces in the Parkinsons disease puzzle. *Nat Med* 2010; 16: 653-61. doi: 10.1038/nm.2165.
  6. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 172-88. doi: 10.1021/tx700210j.
  7. Plotegher N, Duchen MR. Crosstalk between Lysosomes and Mitochondria in Parkinsons disease. *Front Cell Dev Biol* 2017; 12: 1-8. doi: 10.3389/fcell.
  8. Gilgunsherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 2004; 251: 261-268. doi: 10.1007/s00415-004-0348-9.
  9. Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox y sensitive transcription factors. *Cell Signall* 2002; 14, 879-97.
  10. Panchanan M, Jayeeta M, Gary L. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinsons disease targets for potential treatments. *Trans Neuro* 2017; 6: 1-35. doi: 10.1186/s40035-017-0099-z.
  11. Samarghandianand S, Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron *Crocus sativus L.* and its ingredients. *Pharmacogn Res* 2014; 6: 99-107. doi:10.4103/0974-8490.128963.
  12. Melnyk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice Saffron. *Food Res Int* 2010; 43: 1981-9. doi: 10.1016/j.foodres.2010.07.033.
  13. 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* 2011; 175: 66-74. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.043.
  14. Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmirriahi HA and Polissiou MG. Crocetin, dimethylcrocetin and safranal bind human serum albumin stability and antioxidative properties. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 970-7. doi: 10.1021/jf0626381.
  15. Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou. Radical scavenging activity of *Crocus sativus L.* extract and its bioactive constituents. *Phytother Res* 2005; 19: 997 - 1000. doi:10.1002/ptr.1749
  16. Paramonova LI, Revina AA and Lizunkov AF. Interaction of carotenoids with the superoxide anion radical in relation to their stabilizing effect during cryoconservation of sperm. *Lenina* 1989; 11: 30-32.
  17. Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, et al. Neuroprotection by crocetin in a hemiparkinsonian Rat model. *Pharmacol. Biochem. Behav* 2005; 81: 805-13. doi: 10.1016/j.pbb.2005.06.007.
  18. Wang CJ, Shiow SJ, Lin JK. Effects of crocetin on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in Rats. *Carcinogenesis* 1991; 12: 459-62. doi: 10.1093/carcin/12.3.459
  19. Mahmoudzadeh L, Najafi H, Ashtiyani SC, Yarijani ZM. Anti-inflammatory and effects of saffron extract *Crocus sativus L.* in ischaemia reperfusion induced acute kidney injury. *Nephrol Carlt* 2017; 22: 748-754. doi: 10.1111/nep.12849.
  20. Samarghandian S, Aziminezhad M, Farkhondeh T. Crocin attenuate tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in Streptozotocin induced diabetic Rat aorta. *Cytokin* 2016; 88: 20-8. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.002.
  21. Ghadrdoost B, Vafaei AA, Rashidypour A, Hajisoltani R, Bandegi AR et al. 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. *European J Pharmacol* 2011; 667: 222-229. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.012
  22. Elbeshbishy HA, Hassan MH, Aly HAA, 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 Environmenta Saf* 2012; 83: 47-54. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.06.003.
  23. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Inhibitory effects of aqueous crude extract of saffron *Crocus sativus L.* on chemicalinduced genotoxicity

- in mice. *Asia Pacif Clin Nut* 2003; 12: 474-6.
24. Bajbouj K, Schulze J, Diermeier S, Amin A, Schneider R. The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic colorectal cancer cell lines. *BMC Comple Altern Med* 2012; 28: 12:69-doi.org/10.1186/1472-6882-12-69.
25. Ramadan A, Soliman G, Mahmoud SS, Nofal SM, Abdelrahman RF. Evaluation of the safety and antioxidant activities of *Crocus sativus* and Propolis ethanolic extracts. *J Saudi ChemSoc* 2012; 16: 13-21. doi.org/10.1016/j.jscs.2010.10.012.
26. Khalili M, Hamzeh, F. Effects of active constituents of *Crocus sativus* L. crocin on Streptozocin induced model of sporadic Alzheimers disease in male Rats. *Iranian Biomed J*2010; 14: 59-65.
27. Paxinos G, Watson C. The Rat brain in stereotaxic coordinates. 6<sup>th</sup> ed. New York NY USA Acad Publication.2006;P.232-9.
28. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinsons disease. *Neurobiol Dis* 2009; 34: 279-90. doi: 10.1016/j.nbd.2009.01.016.
29. Roghani M, Baluchnejadmojard T. Chronic epigallocatechin-gallate improves aortic reactivity of diabetic rats: Underlying mechanisms. *Vascular Pharmacol* 2009; 51:84-9. doi: 10.1016/j.vph.2009.04.003.
30. Dani C, Pasquali MA, Oliveira MR, Umezu FM, Salvador M, Henriques JA, et al. Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachlorideinduced oxidative stress in brains of adult Wistar Rats. *J Med Food* 2008; 11: 55-61. doi: 10.1089/jmf.2007.505.

# The Protective Effects of Saffron Extract "Crocus sativus" on Oxidative Stress Reduction in Male Rats with Parkinson's Disease

Hatami H<sup>1\*</sup>, Dehghan G<sup>1</sup>, Alavi F<sup>1</sup>

(Received: November 5, 2017

Accepted: July 1, 2018)

## Abstract

**Introduction:** Parkinson's disease (PD) is among the most common neurodegenerative disorders. Given the powerful antioxidant effects of the saffron extract on the removal of free radicals, this study aimed to investigate the protective effects of the saffron extract on reducing oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease pretreated with saffron.

**Materials & Methods:** In this experimental study, 35 male rats weighing approximately 250±50 g were assigned randomly into five groups, namely control, sham (ascorbate-saline), Parkinsonian rats induced by 6-hydroxydopamine, Parkinsonian rats pretreated with saffron extract (5 µg/rat for 5 days), and Parkinsonian rats pretreated with saffron extract (10 µg/rat for 5 days). The rat models were subjected to intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine (2.5µg/µl). Moreover, Total Antioxidant Activity (TAC), Malondialdehyde (MDA) level, the enzyme activity of superoxide dismutase (SOD),

and Glutathione Peroxidase (GPX) were measured in the midbrain using a special kit.

**Ethics code:** 52.13267

**Findings:** According to the results, there were differences between the control group, the groups pretreated with saffron and Parkinsonian rats regarding the level of TAC (P<0.01). In addition, saffron extract significantly reduced the level of MDA production (P<0.01). Moreover, there was an increase in the activity levels of SOD and GPX in the midbrain (P<0.05).

**Discussion & Conclusions:** It seems that a part of the protective effect of the saffron extract against 6-hydroxydopamine can be attributed to the property that increases the capacity of antioxidant enzymes and decreases the production of free radicals.

**Keywords:** Oxidative stress, Parkinson's disease, Saffron extract

1. Dept of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

\*Corresponding author Email: h.hatami@tabrizu.ac.ir