

## **The effect of hydroalcoholic extract of *Satureja hortensis* on outcomes of stroke in rat**

**Rahnema M\*, Foroozandeh M, Ghasemloo E**

Department of Physiology, Biology Research Center, Zanjan-Branch, Islamic Azad University, Zanjan, I. R. Iran.

Received August 4, 2015; Accepted October 19, 2015

### **Abstract:**

**Background:** Antioxidants can prevent oxidative stress produced by free radicals. Since *Satureja hortensis* contains various antioxidant compounds, this study was conducted to examine the effect of *S. hortensis* extract on blood-brain barrier permeability, brain edema and neurological deficits.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 70 male Wistar rats were randomly allocated into 5 groups (n=14). The control group received distilled water plus induction of ischemia, three experimental groups received the hydroalcoholic extract of *S. hortensis* with different doses of 50, 75 and 100mg/kg, respectively, plus induction of ischemia and the sham group received no treatment and induction of ischemia. Pretreatment with *S. hortensis* extract was performed for 30 days, orally through gavage. Each group was subdivided into two subgroups (n=7) in order to assess the blood-brain barrier permeability (concentration of Evans Blue) and brain edema (brain water content). Moreover, neurological deficit scores were evaluated in the two mentioned subgroups.

**Results:** Results of the current study showed that *S. hortensis* extract reduced the concentrations of Evans Blue (8.93±0.75, 7.69±0.74, 6.68±0.56, respectively) and brain water content (82.21±0.71, 81.88±0.69, 80.50±0.89, respectively) in three groups received the extract compared to the control group (84.46±0.81), and reduced neurological deficit scores in the two groups received 75 and 100mg/kg doses of the extract (1.43±0.27 and 1±0.21, respectively) compared to the control group (3.36±0.32).

**Conclusion:** It seems that *S. hortensis* extract can exert the neuroprotective effect against stroke damage by increasing the strength of blood-brain barrier and preventing brain edema.

**Keywords:** *Satureja hortensis*, Stroke, Blood-brain barrier permeability, Brain edema, Neurological deficits

\* **Corresponding Author.**

**Email:** meh\_rahnema@yahoo.com

**Tel:** 0098 912 141 3969

**Fax:** 0098 243 345 5890

**Conflict of Interests:** *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2016; Vol. 19, No 6, Pages 511-519*

# بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه مرزه بر پیامدهای ناشی از سکنه مغزی در موش صحرایی

مهدی رهنما<sup>۱\*</sup>، میثم فروزنده<sup>۲</sup>، الهام قاسملو<sup>۲</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند از بار اکسیداتیو ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند. از آنجایی که مرزه دارای ترکیب‌های آنتی اکسیدانی است، در این مطالعه به بررسی اثر عصاره مرزه بر میزان ادم مغزی، نفوذپذیری سدخونی-مغزی و امتیاز نقص‌های نورولوژیک پرداختیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۷۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۵ گروه (n=۱۴) تقسیم شدند: گروه کنترل (تیمار با آب مقطر+القای ایسکمی)، سه گروه آزمایشی (تیمار با عصاره مرزه با دوزهای ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ mg/kg ایسکمی) و گروه شم (عدم تیمار و القای ایسکمی). تیمار به مدت ۳۰ روز به صورت خوراکی و از طریق گاواژ صورت گرفت. هر کدام از گروه‌ها به دو زیرگروه (n=۷) تقسیم شده و به ترتیب نفوذپذیری سدخونی-مغزی (غلظت اونس بلو) و میزان ادم (درصد آب مغزی) در آنها بررسی شد. هم‌چنین، در هر دو زیرگروه نقص‌های نورولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که هر سه دوز مرزه سبب کاهش غلظت اونس بلو (به ترتیب: ۸/۹۳±۰/۷۵، ۷/۶۹±۰/۷۴ و ۶/۶۸±۰/۵۶ نسبت به گروه کنترل ۱۱/۲۷±۰/۵۲) و درصد آب مغزی (۸۲/۲۱±۰/۷۱، ۸۱/۸۸±۰/۶۹ و ۸۰/۵۰±۰/۸۹ نسبت به گروه کنترل ۸۴/۶۸±۰/۸۱) شده و دو دوز ۱۰۰ mg/kg و ۷۵ سبب کاهش امتیاز نقص‌های نورولوژیک (به ترتیب ۱/۴۳±۰/۲۷ و ۱±۰/۲۱ نسبت به گروه کنترل ۳/۳۶±۰/۳۲) می‌گردد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد مرزه بتواند به واسطه افزایش استحکام سد خونی-مغزی و جلوگیری از ایجاد ادم، اثر حفاظتی در برابر آسیب‌های ناشی از سکنه مغزی اعمال کند.

واژگان کلیدی: مرزه، سکنه مغزی، نفوذپذیری سدخونی-مغزی، ادم مغزی، نقص‌های نورولوژیک

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۴، صفحات ۵۱۹-۵۱۱

## مقدمه

اگر تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یابد، مکانیسم‌های دفاعی بدن ناتوان شده و ماکرومولکول‌ها (پروتئین‌ها، لیپیدها، اسید نوکلئیک) در معرض اکسیداسیون قرار گرفته و تخریب می‌شوند [۴]. آسیب به ماکرومولکول‌ها سبب اختلال در عملکرد سلول و حتی مرگ سلولی می‌شوند و بدین ترتیب در عملکرد حرکتی بدن نیز اختلال ایجاد می‌شود که براساس شدت و محل ضایعه متفاوت خواهد بود [۵]. برخی آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند از اکسیداسیون ناشی از رادیکال‌های آزاد و بروز بیماری‌هایی مانند سرطان و روند پیری جلوگیری کنند. این مواد می‌توانند از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد، شلاته کردن فلزات، هم‌چنین با جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن از روند اکسیداسیون جلوگیری کنند [۴]. مطالعات قبلی نشان داده است که تولید رادیکال‌های آزاد متعدد نقش مهمی در وارد شدن آسیب به سدخونی-مغزی و ایجاد ادم مغزی به دنبال ایسکمی مغزی ایفاء می‌کند [۶]. مرزه با نام علمی *Satureja hortensis* گیاهی است علفی از خانواده نعناعیان که در نواحی مختلف ایران، مانند آذربایجان، کرمانشاه، نواحی شمال شرقی و گیلان به صورت وحشی می‌روید. در جنس مرزه کرک‌ها تمام سطح ساقه و شاخه را به طور یکنواخت می‌پوشانند. کرک‌ها ساده و به طور گسترده و یا خوابیده هستند و یا ممکن است زگیل مانند

سکنه مغزی عمده‌ترین علت مرگ‌ومیر و ناتوانی‌های طولانی مدت در بزرگسالان است [۱] و بعد از سرطان و سکنه قلبی یکی از دلایل عمده مرگ‌ومیر در جهان و اولین عامل از کار افتادگی افراد بالای ۶۵ سال است [۲]. به دنبال کاهش اکسیژن رسانی به بافت مغزی، تغییراتی در مکانیسم‌های تولید انرژی رخ می‌دهد که سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد [۳]. گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن به طور طبیعی و مداوم در بدن تولید شده و توسط آنزیم‌های داخلی (سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز)، حذف و کنترل می‌شوند.

<sup>۱</sup> دانشیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

<sup>۲</sup> کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

## \* نشانی نویسنده مسئول:

گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

تلفن: ۰۹۱۲ ۱۴۱۳۹۶۹ | دورنویس: ۰۲۴۳۳۴۵۵۸۹۰

پست الکترونیک: meh\_rahnema@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۱۳ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۱۰/۱۹

غده‌دار باشند [۷]. در مطالعه‌ای که توسط فاضل و همکاران بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی مرزه انجام شد، مشخص گردید که این گیاه دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند: تیمول (۱۶/۲۲ درصد)، کارواکرول (۲۱/۵۹ درصد)، گاماترپین (۲۱/۱۲ درصد)، آلفاسیمن (۱۰/۳۰ درصد)، آلفاترپین (۲/۹۳ درصد) و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمول، کارواکرول و گاماترپین به اثبات رسیده است [۸]. مشخص شده است که کارواکرول دارای اثرات ضد میکروبی، ضد دردی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [۹]. هم‌چنین، محققین نشان داده‌اند که کارواکرول دارای اثرات حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد پراکسیل و هم‌چنین اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خوبی می‌باشد [۱۰]. مرزه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر در کاهش اثرات پراکسیداسیون لیپیدی موثر بوده و استفاده از آن در بیماران مبتلا به پرکاری تیروئید سودمند می‌باشد [۱۱]. در یک بررسی مشخص گردید که اسانس مرزه می‌تواند در هیپرگلیسمی اثر حفاظت عصبی اعمال کند. پیشنهاد شده که مکانیسم این اثر احتمالاً به‌دلیل جلوگیری از آپوپتوز می‌باشد که اثرات جانبی دیابت از جمله نوروپاتی را کاهش می‌دهد [۱۲]. از این‌رو، در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی مرزه بر نفوذپذیری سد خونی-مغزی، ادم مغزی و امتیاز نقص‌های نورولوژیک به‌دنبال القای ایسکمی در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

#### تهیه گیاه و عصاره گیری

گیاه مرزه در مزرعه‌ای در استان زنجان، شهرستان خدابنده (36.1°N, 48.5°E) کشت گردید. سرشاخه‌های جوان گیاه در خردادماه جمع‌آوری شده و از نظر تاکسونومیک توسط هرباریوم (۲۹۹۱۲۵) دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان به تائید رسید. گیاه جمع‌آوری شده در سایه خشک شده و به پودر تبدیل شد. عصاره گیری به روش خیساندن انجام گرفت [۱۴]. بدین ترتیب که ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در بشر ریخته شد و الکل ۷۰ درصد به آن اضافه گردید، به‌طوری‌که تا دو سانتیمتر بالای پودر را بپوشاند. سپس، به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر قرار گرفت. پس از این مدت توسط کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) محلول صاف شد و جهت حذف حلال در دستگاه روتاری با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. عصاره پس از غلیظ شدن در آن با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا به عصاره خشک (۲۲ درصد) تبدیل شود. با استفاده از آب مقطر غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم تهیه شد.

#### ایجاد مدل سگته مغزی

موش‌های صحرایی بعد از توزین شدن، با داروی کلرال هیدرات به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. جراحی مدل سازی انسداد شریان میانی مغزی یا MCAO مطابق دستورالعمل Longa و همکارانش انجام گرفت [۱۵]. به‌طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون ۳-۰ از طریق تنه شریان کاروتیدی خارجی (ECA) وارد رگ شریانی راست شده و تا رسیدن به شریان مغزی قدامی (ACA) از میان شریان کاروتیدی داخلی (ICA) با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به شریان مغزی میانی (MCA) بسته می‌شود. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی‌متر طول نخ از تنه

و غده‌دار باشند [۷]. در مطالعه‌ای که توسط فاضل و همکاران بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی مرزه انجام شد، مشخص گردید که این گیاه دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند: تیمول (۱۶/۲۲ درصد)، کارواکرول (۲۱/۵۹ درصد)، گاماترپین (۲۱/۱۲ درصد)، آلفاسیمن (۱۰/۳۰ درصد)، آلفاترپین (۲/۹۳ درصد) و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمول، کارواکرول و گاماترپین به اثبات رسیده است [۸]. مشخص شده است که کارواکرول دارای اثرات ضد میکروبی، ضد دردی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [۹]. هم‌چنین، محققین نشان داده‌اند که کارواکرول دارای اثرات حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد پراکسیل و هم‌چنین اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خوبی می‌باشد [۱۰]. مرزه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر در کاهش اثرات پراکسیداسیون لیپیدی موثر بوده و استفاده از آن در بیماران مبتلا به پرکاری تیروئید سودمند می‌باشد [۱۱]. در یک بررسی مشخص گردید که اسانس مرزه می‌تواند در هیپرگلیسمی اثر حفاظت عصبی اعمال کند. پیشنهاد شده که مکانیسم این اثر احتمالاً به‌دلیل جلوگیری از آپوپتوز می‌باشد که اثرات جانبی دیابت از جمله نوروپاتی را کاهش می‌دهد [۱۲]. از این‌رو، در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی مرزه بر نفوذپذیری سد خونی-مغزی، ادم مغزی و امتیاز نقص‌های نورولوژیک به‌دنبال القای ایسکمی در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در بهار سال ۱۳۹۴ در مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد زنجان انجام گرفت. موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از موسسه انستیتو پاستور کرج خریداری شدند و در حیوانخانه مرکز تحقیقات بیولوژی در قفس‌های مناسب و در محدوده دمایی  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و به‌صورت نامحدود به آب و غذا دسترسی داشتند. حیوانات به‌صورت تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند که عبارت بودند از: گروه کنترل، سه گروه آزمایشی و گروه شم؛ هر گروه شامل ۱۴ سر موش صحرایی بود. گروه کنترل آب مقطر و سه گروه آزمایشی، عصاره مرزه را به‌ترتیب با دوزهای ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم [۱۳] به‌صورت خوراکی و از طریق گاواژ به-مدت یک ماه دریافت کردند. گاواژ حیوانات هر روز ساعت ۱۱-۱۰ صبح انجام گرفت. ۲ ساعت بعد از آخرین گاواژ حیوانات دریافت‌کننده عصاره مرزه و گروه کنترل به‌مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی میکروسکوپی انسداد شریان مغزی میانی (Middle

مایع پرفیوژ بی‌رنگ از دهلیز راست خارج شود و اوانس بلو داخل رگی پاک گردد. سپس، مغز خارج شده و نیمکره‌ها از هم جدا شدند و برای اندازه‌گیری میزان خروج EB، بافت مغز در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات هموژن شده، برای رسوب پروتئین نیز به آن ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۶۰ درصد اضافه گردید. سپس، ۳ دقیقه با ورتکس هم‌زده و ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی-گراد خنک گردید. آنگاه به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ ( $g=17888$ ) شده و در نهایت، جذب نوری اوانس بلوی محلول رویی توسط اسپکتروفوتومتر (Genova, Jenway) در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و مطابق منحنی استاندارد، غلظت آن محاسبه شد [۱۷].

#### سنجش میزان ادم

شکستن سد خونی-مغزی سبب تجمع مایع در پارانشیم مغز می‌گردد؛ به همین دلیل ارزیابی میزان ادم از طریق اندازه‌گیری محتوی آب مغزی صورت گرفت. بعد از جداسازی سر حیوان، مغز خارج شد. منخچه، پل مغزی، و پیازهای بویایی جدا گردید و وزن خالص نیمکره‌های مغز (Wet Weight; WW) اندازه‌گیری شد. سپس وزن خشک (Dry Weight; DW) بعد از قرار گرفتن ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۲۰ درجه اندازه‌گیری شده و در نهایت، محتوی آب مغز با فرمول  $[(WW-DW)/WW] \times 100$  محاسبه گردید [۱۷].

#### آنالیزهای آماری

باتوجه به اینکه داده‌ها کمی بوده و با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف فرض نرمال بودن داده‌ها برقرار گردید، از آزمون ANOVA برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. تمام آنالیز-ها به کمک نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ انجام شد. بررسی نفوذ پذیری سد خونی-مغزی و میزان ادم و ارتباط بین نیمکره‌ها با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه توسط مقایسه میانگین‌ها به روش LSD انجام شد و نقص‌های نورولوژیک با استفاده از آزمون مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت.  $P < 0.05$  از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد و نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SD$  بیان گردید.

#### نتایج

پیش‌تغذیه‌ای با عصاره سبب کاهش غلظت اوانس بلو (نفوذ پذیری سد خونی-مغزی) و درصد آب مغزی (میزان ادم) در هر سه دوز ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم نسبت به گروه کنترل گردید. هم‌چنین، امتیاز نقص‌های نورولوژیک را در دوزهای

ECA مشخص می‌شود. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم با کمک دماسنج دیجیتالی اندازه‌گیری شده و حدود ۳۷ درجه نگهداری شد [۱۶]. جهت اطمینان از القای ایسکمی مغزی در حیوانات، برشی از مغز آنها تهیه شده و توسط محلول تترازولیوم کلراید رنگ آمیزی گردید (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- برش کروئال از مغز موش صحرایی توسط دستگاه ماتریکس. برش توسط محلول ۲ درصد تترازولیوم کلراید (TTC) رنگ آمیزی شده است. ناحیه سفید رنگ (نیمکره راست) دچار ایسکمی مغزی شده و ناحیه قرمز رنگ (نیمکره چپ) سالم می‌باشد.

#### ارزیابی اختلال حرکتی ناشی از سکته مغزی

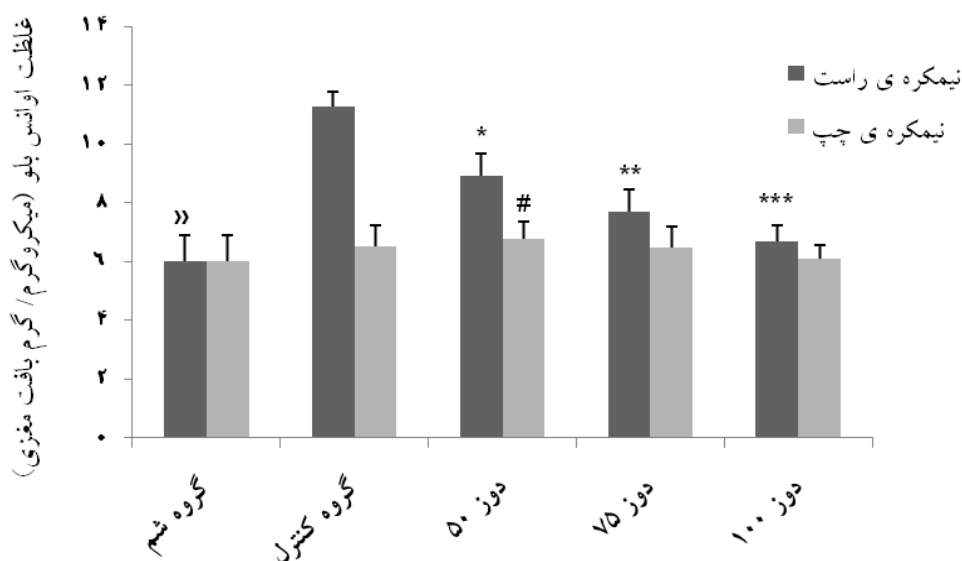
معاینه‌های نورولوژیک ۲۴ ساعت بعد از القای ایسکمی انجام گرفت. یافته‌های نورولوژیک در ۵ مقیاس دسته بندی شدند: مقیاس صفر: هیچ‌گونه عارضه نورولوژیک وجود نداشت؛ مقیاس یک: نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی، یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته شد؛ مقیاس دو (به چپ چرخیدن): نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ و مقیاس سه (افتادن به سمت چپ): نقص کانونی شدید در نظر گرفته شد. موش‌های مقیاس چهار نمی‌توانستند به‌طور خودبه‌خودی راه روند و سطح هوشیاری پایین داشتند و به موش‌هایی که طی ۲۴ ساعت بعد از جراحی می‌مردند، در صورتی که بعد از رنگ آمیزی بخش وسیعی از مغزشان آسیب دیده و مرگ منحصر به سکته مغزی بود، مقیاس پنج داده شد [۱۶].

#### سنجش نفوذپذیری سد خونی-مغزی

استحکام سد خونی-مغزی توسط اندازه‌گیری میزان خروج اوانس بلو (EB) ارزیابی شد؛ زیرا اختلال در عملکرد سد خونی-مغزی سبب ورود اوانس بلو به بافت مغزی می‌گردد. ابتدا، موش‌های صحرایی از طریق ورید دم محلول اوانس بلوی ۲ درصد را به اندازه ۴ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن، بعد از ۳۰ دقیقه ایسکمی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از جریان مجدد خون، حیوانات بیهوش شده و ناحیه قفسه سینه آنها باز شد. ۲۵۰ میلی-لیتر سالین از طریق بطن چپ به حیوان تزریق گردید تا زمانی که

۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، کاهش داد ( $P < 0/05$ ). ایسکمی مغزی سبب افزایش غلظت اوانس بلو در نیمکره آسیب دیده (راست) ( $11/27 \pm 0/52$ ) گروه کنترل نسبت به نیمکره سالم (چپ) ( $6/52 \pm 0/70$ ) شد ( $P < 0/001$ ). پیش‌تغذیه با عصاره هیدروآلکلی مرزه سبب کاهش غلظت اوانس بلو در نیمکره آسیب دیده (راست) حیوانات دریافت کننده دوزهای ۵۰ ( $8/93 \pm 0/75$ )، ۷۵ ( $7/69 \pm 0/74$ ) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $6/09 \pm 0/48$ ) شد. اما بین نیمکره راست و نیمکره راست ( $P = 0/223$ ) و چپ ( $6/09 \pm 0/48$ ) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار شماره ۱).

۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، کاهش داد ( $P < 0/05$ ). ایسکمی مغزی سبب افزایش غلظت اوانس بلو در نیمکره آسیب دیده (راست) ( $11/27 \pm 0/52$ ) گروه کنترل نسبت به نیمکره سالم (چپ) ( $6/52 \pm 0/70$ ) شد ( $P < 0/001$ ). پیش‌تغذیه با عصاره هیدروآلکلی مرزه سبب کاهش غلظت اوانس بلو در نیمکره آسیب دیده (راست) حیوانات دریافت کننده دوزهای ۵۰ ( $8/93 \pm 0/75$ )، ۷۵ ( $7/69 \pm 0/74$ ) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $6/09 \pm 0/48$ ) شد. اما بین نیمکره راست و نیمکره راست ( $P = 0/223$ ) و چپ ( $6/09 \pm 0/48$ ) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار شماره ۱).



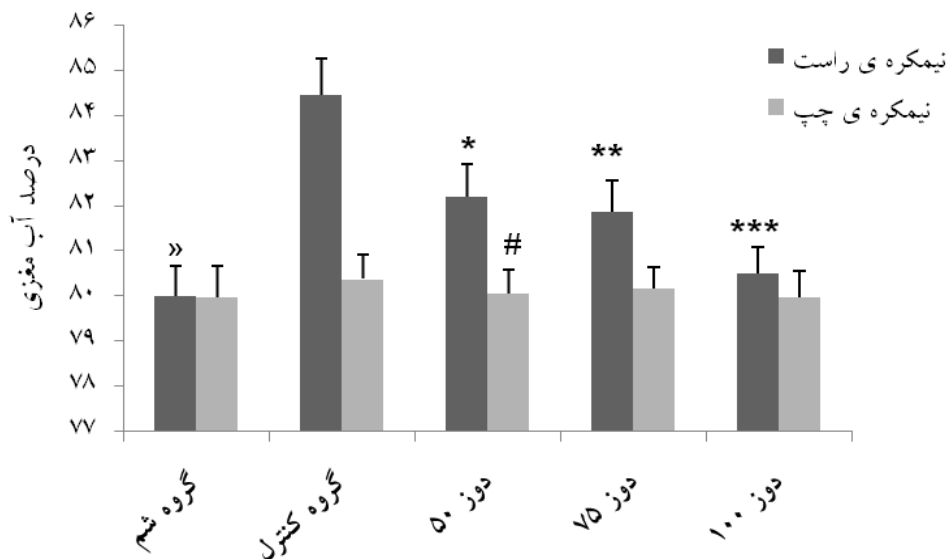
نمودار شماره ۱- مقایسه غلظت اوانس بلو در گروه‌های دریافت کننده عصاره مرزه و گروه کنترل.

\* اختلاف معنی‌دار در سطح  $P = 0/020$  نسبت به گروه کنترل و در سطح  $P = 0/010$  نسبت به #; \*\* اختلاف معنی‌دار در سطح  $P = 0/001$  نسبت به گروه کنترل;

\*\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0/001$  نسبت به گروه کنترل؛ « اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0/001$  نسبت به گروه کنترل

سکنه مغزی سبب افزایش درصد آب مغزی (ادم مغزی) در نیمکره آسیب دیده گروه کنترل ( $84/46 \pm 0/81$ ) نسبت به گروه شم ( $79/99 \pm 0/69$ ) گردید ( $P < 0/001$ ). پیش‌تغذیه با عصاره سبب کاهش میزان ادم نیمکره آسیب دیده در حیوانات دریافت کننده هر سه دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $82/21 \pm 0/71$ )، ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $81/88 \pm 0/69$ ) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $80/50 \pm 0/89$ ) شد. نسبت به گروه کنترل (به ترتیب  $P = 0/021$ ،  $P = 0/009$  و  $P < 0/001$ )، بین نیمکره‌های راست ( $84/46 \pm 0/81$ ) و چپ

سکنه مغزی سبب افزایش درصد آب مغزی (ادم مغزی) در نیمکره آسیب دیده گروه کنترل ( $84/46 \pm 0/81$ ) نسبت به گروه شم ( $79/99 \pm 0/69$ ) گردید ( $P < 0/001$ ). پیش‌تغذیه با عصاره سبب کاهش میزان ادم نیمکره آسیب دیده در حیوانات دریافت کننده هر سه دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $82/21 \pm 0/71$ )، ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $81/88 \pm 0/69$ ) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $80/50 \pm 0/89$ ) شد. نسبت به گروه کنترل (به ترتیب  $P = 0/021$ ،  $P = 0/009$  و  $P < 0/001$ )، بین نیمکره‌های راست ( $84/46 \pm 0/81$ ) و چپ



نمودار شماره ۲- مقایسه درصد آب مغزی (میزان ادم) در گروه‌های دریافت کننده مرزه و گروه کنترل. محتوی آب مغزی که نشان دهنده میزان ادم مغزی می‌باشد، توسط فرمول  $[(WW-DW)/WW] \times 100$  محاسبه شده است.

\* اختلاف معنی دار در سطح  $P=0/021$  نسبت به گروه کنترل و در سطح  $P=0/010$  نسبت به #؛ \*\* اختلاف معنی دار در سطح  $P=0/009$  نسبت به گروه کنترل؛ \*\*\* اختلاف معنی دار در سطح  $P<0/001$  نسبت به گروه کنترل؛ «اختلاف معنی دار در سطح  $P<0/001$  نسبت به گروه کنترل

پیش‌تغذیه با عصاره هیدروالکلی مرزه در دوزهای ۷۵  $(\pm 0/27)$  و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۱/۴۳) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۱  $\pm 0/21$ ) سبب کاهش امتیاز نقص‌های نورولوژیک نسبت به گروه کنترل (۳/۳۶  $\pm 0/32$ ) گردید در حالی که دریافت دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P<0/001$ )، تأثیر معنی‌داری ( $P=0/077$ ) بر امتیاز نقص‌های نورولوژیک نداشت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- مقایسه امتیاز نقص‌های نورولوژیک

شماره گروه	گروه آزمایشی	تعداد کل	نقص‌های نورولوژیک					میانگین	میانگین
			۰	۱	۲	۳	۴		
۱	کنترل	۱۴	۰	۱	۲	۵	۳	۳	۳/۷۱
۲	دوز ۵۰ kg/mg	۱۴	۰	۳	۵	۳	۲	۱	۲/۸۶
۳	دوز ۷۵ mg/kg*	۱۴	۳	۴	۵	۲	۰	۰	۱/۵۷
۴	دوز ۱۰۰ mg/kg**	۱۴	۴	۶	۴	۰	۰	۰	۰/۸۶

در ستون سوم تعداد موش‌هایی که هرکدام از مقیاس‌های نورولوژیک را داشته‌اند، آورده شده است.

\*\*و\*\*\* اختلاف معنی دار در سطح  $P=0/001$  نسبت به گروه کنترل

## بحث

مغزی در هر سه دوز ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گردید و این اثر در دوزهای بالاتر قابل توجه بود؛ زیرا در دوزهای ۷۵ و ۱۰۰ تفاوت معنی‌داری بین غلظت اوانس بلو و هم‌چنین درصد آب مغزی نیمکره‌های راست و چپ مشاهده نشد. هم‌چنین، در این دو دوز، امتیاز نقص‌های نورولوژیک به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، در حالی که در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. تولید رادیکال‌های آزاد به‌دنبال

داده‌های حاصل از این بررسی نشان داد که پیش‌تغذیه با عصاره مرزه سبب افزایش استحکام سد خونی-مغزی و کاهش میزان ادم مغزی و نقص‌های نورولوژیک می‌گردد. از آنجایی که نفوذپذیری سد خونی-مغزی با استفاده از غلظت اوانس بلو و میزان ادم توسط درصد آب مغزی سنجیده شد، مشخص گردید که پیش‌تغذیه با عصاره سبب کاهش غلظت اوانس بلو و درصد آب

ایسکمی مغزی افزایش می‌یابد [۵،۴] و رادیکال‌های آزاد می‌توانند از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند [۴]. بررسی‌های متعدد نشان می‌دهد که مرزه نیز سرشار از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی است. به‌عنوان مثال با بررسی روی چند گیاه دارویی مشخص شد که گیاه مرزه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به سایر گیاهان دارویی است و این خاصیت را به‌حضور کارواکرول و تیمول در عصاره نسبت داده‌اند [۱۸]. هم‌چنین، مرزه علاوه بر مواد آنتی‌اکسیدان حاوی ترکیب‌های ضد التهابی نیز می‌باشد. مطالعات ثابت کرده‌اند که عصاره هیدروالکلی مرزه اثرات ضد دردی و ضد التهابی خوبی داشته که این اثرات ناشی از ترکیبات مهم موجود در آن از جمله کارواکرول و فلاونوئیدها است [۱۹]. وفایی و همکاران ثابت کردند که عصاره مرزه به‌دلیل داشتن فلاونوئیدها، سبب کاهش علائم ناشی از قطع مورفین می‌گردد [۱۲]. مشخص شده است که مرزه باعث کاهش پراکسید-اسیون لیپیدی در موش‌های سوری دچار التهاب روده می‌شود [۲۰]. مرزه به‌دلیل داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سبب کاهش مشکلات قلبی عروقی شود [۲۱]. در مطالعات قبلی ثابت شده است که مرزه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و باعث مهار اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها با چگالی کم در محیط برون‌تنی می‌شود [۲۲]. ثابت شده است کارواکرول با کاهش بیان اینتر-لوکین‌ها سبب کاهش التهاب و میزان ادم می‌گردد [۲۳]. پیامدهای ناشی از ایسکمی مغزی مغزی به‌طور عمده از آسیب سد خونی-مغزی و افزایش نفوذپذیری آن ناشی می‌شود و محافظت از ساختار عملکرد سد خونی-مغزی در برابر آسیب ایسکمیک می‌تواند در کاهش ادم ایجاد شده و تقلیل آسیب نورونی نقش داشته باشد [۲۴]. در مطالعات مختلف مشخص شده است که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهان می‌توانند با افزایش استحکام سد خونی-مغزی سبب کاهش ادم مغزی و اختلالات حرکتی گردند. در این راستا، ربیعی و همکاران اثر عصاره برگ زیتون (*Olea europaea*) بر میزان نفوذ پذیری سد خونی-مغزی را مورد بررسی قرار دادند؛ آنها بیان کردند که عصاره برگ زیتون به‌دلیل غنی بودن از ترکیبات فنولی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی از طریق مهار فاکتور رونویسی  $\text{NF}\kappa\beta$  از فعال شدن متالوپروتیناز ماتریکسی و در نتیجه تخریب سد خونی-مغزی جلوگیری می‌کند [۲۵]. هم‌چنین، عصاره برگ زیتون باعث سرکوب التهاب و کاهش آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو شده و به‌دلیل وجود ترکیبات زیاد پلی‌فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، باعث کاهش ادم مغزی می‌گردد [۲۶]. ثابت شده است که عصاره اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*) به‌دلیل داشتن ترکیبات آنتی-

اکسیدانی، سبب کاهش ادم و امتیاز نقص‌های نورولوژیک می‌گردد [۲۷]. در این مطالعه نیز عصاره مرزه سبب افزایش استحکام سد خونی-مغزی و کاهش ادم مغزی گردید که با نتایج مطالعات مشابه اشاره شده هم‌سو می‌باشد؛ در ضمن این اثر حفاظتی در دوزهای بالا (۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیشتر بود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با کاهش مرگ سلولی اختلالات حرکتی ناشی از آسیب مغزی را کاهش دهند. به‌عنوان مثال ثابت شده است که کروسین (ماده موثره زعفران) آسیب قشری و اختلالات نورولوژیک ناشی از سگته مغزی را کاهش می‌دهد؛ در واقع این اثر را به خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد دردی و ضد التهابی این ماده نسبت داده‌اند [۲۸]. در مطالعه Bozkurt و همکاران، فعالیت ضد آپوپتوزی Daidzin که یک ترکیب پلی-فنولی از گروه ایزوفلاون است مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این ماده به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی از آپوپتوز و مرگ سلولی پیشگیری کرده و سبب کاهش آسیب بافتی می‌گردد [۲۹]. ایمانی و همکاران نشان داده‌اند که عصاره بو-مادران (*Achillea millefolium*) به‌دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی نقص‌های نورولوژیک را کاهش می‌دهد [۳۰]. توکلی و همکاران بیان کرده‌اند که ویتامین C اختلالات نورولوژیک را کاهش می‌دهد؛ در واقع ویتامین C دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و جزء آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی محسوب می‌شود [۳۱]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که عصاره مرزه سبب کاهش امتیاز نقص‌های نورولوژیک می‌گردد. اسطو-خودوس به‌دلیل دارا بودن فلاونوئیدهای فراوان با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی از مرگ برنامه ریزی شده جلوگیری کرده و اثر حفاظتی بر مغز اعمال می‌کند [۳۲]. بررسی‌های اشاره شده نشان می‌دهد که گیاهان و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند عوارض ناشی از سگته مغزی را کاهش دهند. در واقع بیان شده است که گیاهان نیز به‌واسطه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خود که سبب کاهش رادیکال‌های آزاد تولید شده حین ایسکمی می‌گردند اثرات حفاظتی اعمال می‌کنند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌سو است.

#### نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت مرزه از طریق افزایش استحکام سد خونی-مغزی و کاهش میزان ادم مغزی و نقص‌های نورولوژیک اثر حفاظتی در برابر ایسکمی مغزی اعمال کرده و سبب ایجاد پدیده تحمل ایسکمی گردد. احتمالاً این اثر حفاظتی به‌واسطه حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره مرزه

باشد که سبب کاهش رادیکال‌های آزاد تولید شده حین ایسکمی مغزی می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

هزینه این مطالعه توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تامین گردیده است.

### References:

- [1] Chinwatanakul S, Boonyapisit K, Pornsriniyom D, Proyoonwiwat N, Senanarong V, Chaisevikul R, et al. Siriraj Acute Stroke Unit: 10 years experience. *J Med Assoc Thai* 2012; 95(2): 235-44.
- [2] Huang L, Chen N, Ge M, Zhu Y, Guan S, Wang JH. Ca<sup>2+</sup> and acidosis synergistically lead to the dysfunction of cortical GABAergic neurons during ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 709-14.
- [3] Woodruff TM, Thundiyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *J Mol Neurodegener* 2011; 6(1): 11.
- [4] Oke F, Aslim B, Ozturk S, Altundag S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *J Food Chem* 2009; 112: 874-9.
- [5] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4(8): 118-26.
- [6] Gu Y, Dee CM, Shen J. Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; 3: 1216-31.
- [7] Samsam-Shariat H. Collection of medicinal plants. Mani Pub. Esfahan; 2007; p. 19. [in Persian]
- [8] Fazel M, Omodbeygi M, Barzegar M, Naghdibadi H. The effect of temperature on antioxidant activity of essential oils *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis* and *Carnation* by DPPH. *J Med Plants* 2007; 6(2): 54-63. [in Persian]
- [9] Quintans-Junior LJ, Guimaraes AG, Santana MT, Araujo BE, Moreira FV, Bonjardim LR, et al. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2011; 21(3): 497-502.
- [10] Omar EA, Kam A, Alqahtani A, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Nammi S, et al. Herbal medicines and nutraceuticals for diabetic vascular complications: mechanisms of action and bioactive phytochemicals. *Curr Pharm Des* 2010; 16(34): 3776-807.
- [11] Assaie R, Mostafavi-pour Z, Pajouhi N, Ranjbar-Omrani GH, Sepehrimanesh M, Zal F. Effects of essential oil of *Satureja khuzestanica* on the oxidative stress in experimental hyperthyroid male rat. *Vet Res Forum* 2015; 6(3): 233-8.
- [12] Kaeidi A, Esmaeili-Mahani S, Abbasnejad M, Sheibani V, Rasoulia B, Hajializadeh Z, et al. *Satureja khuzestanica* attenuates apoptosis in hyperglycemic PC12 cells and spinal cord of diabetic rats. *J Nat Med* 2013; 67(1): 61-9.
- [13] Vafaei AA, Milad-Gorji H, Taherian AA, Bagherian M. Effects of *Valeriana officinalis*, *Satureja hortensis*, and *Mentha piperita* extracts on the withdrawal syndrome signs in mice. *Koomesh* 2011; 12(3): 342-7. [in Persian]
- [14] Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J Med plants Res* 2010; 4(2): 104-11.
- [15] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20(1): 84-91.
- [16] Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Rasulian B, Heidarianpour A, Khoshbaten A. Prolonged and intermittent normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in rat brain tissue. *Brain Res* 2007; 115: 228-33.
- [17] Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Heidarianpour A, Rasoulia B, Asgari AR, et al. Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-alpha level. *Exp Neurol* 2008; 212(2): 298-306.
- [18] Kamkar A, Tooryan F, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Shariatifar N. Chemical composition of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and comparison of antioxidant activity with aqueous and alcoholic extracts. *J Veterinary Res* 2013; 68: 183-90. [in Persian]
- [19] Hajhashemi V, Ghannadi A, Pezeshkian SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *J Ethnopharmacol* 2002; 82(2-3): 83-7. [in Persian]
- [20] Ghazanfari G, Minaie B, Yasa N, Nakhai LA, Mohammadirad A, Nikfar S, et al. Biochemical and histopathological evidences for beneficial effects of *Satureja khuzestanica* jamzad essential oil on the mouse model of inhibitory bowel diseases. *Toxicol Mech Methods* 2006; 16(7): 365-372.
- [21] Ahmadvand H, Tavafi M, Khosrowbeygi A. Effects of *Satureja Khuzestanica* essential oil on hemoglobin A1C, serum urea and creatinine in alloxan-induced Type 1 diabetic adult rats. *J Jahraom Univ Med Sci* 2013; 11(1): 57-62. [in Persian]
- [22] Omar EA, Kam A, Alqahtani A, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Nammi S, et al. Herbal medicines and nutraceuticals for diabetic vascular complications: mechanisms of action and bioactive



- phytochemicals. *Curr Pharm Des* 2010; 16(34): 3776-807.
- [23] Keloushadi M, Heidarian E, Ghatreh-Samani K, Rafieian-Kopaei M. The effect of carvacrol on the interleukin-6 gene expression and cell signaling proteins in prostatic cancer cell line DU-145. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2015; 17(2): 105-18. [in Persian]
- [24] Zhou F, Xiang Z, Feng WX, Zhen LX. Neuronal free Ca<sup>2+</sup> and BBB permeability and ultrastructure in head injury with secondary insult. *J Clin Neurosci* 2001; 8(6): 561-3.
- [25] Rabiei Z, Bigdeli MR, Mohagheghi F. Relationship between dietary virgin Olive oil on brain Cholesterol, Cholesteryl ester and Triglyceride levels and Blood Brain Barrier (BBB) permeability in a rat stroke model. *J Physiol Pharmacol* 2012; 16(3): 245-54. [in Persian]
- [26] Rabiei Z, Bigdeli M, Asadi M. The Effect of Dietary Virgin Olive Oil on Brain Lipid Levels and Brain Edema in Rat Stroke Models. *J Zanjan Univ Med Sci* 2013; 21 (86): 56-64. [in Persian]
- [27] Rabiei Z, Heidarian E, Rafieian-Kopaei M. The Neuroprotective Effect of Pretreatment with *Lavandula officinalis* Ethanolic Extract on Brain Edema in Rat Stroke Model. *J Zanjan Univ Med Sci* 2014; 23(98 and 3): 41-52. [in Persian]
- [28] Sarshoori Sarshoori J, Asadi MH, Mohammadi MT. Neuroprotective effects of crocin on the histopathological alterations following brain ischemia-reperfusion injury in rat. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17: 895-902. [in Persian]
- [29] Bozkurt A, Guven M, Akman T, Ozkan A, Murat SH, Duz U, et al. Neuroprotective effects of daidzein on focal cerebral ischemia injury in rats. *Neural Regen Res* 2015; 10(1): 146-52.
- [30] Imani E, Esmaili A, Alimohammadi R, Ehsani V, Shamsizadeh A, Mobini M, et al. Effects of *Achillea millefolium* on the Consequences of Stroke in Ovariectomized Rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2015; 22(6): 1725-36. [in Persian]
- [31] Allahtavakoli M, Rezaee H, Kamrany N, Shamsizade A, Moloudi R, Amin F, et al. Effect of Ascorbic Acid on Infarct Volume and Neurological Deficits after the Embolic Model of Stroke in Rat. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2009; 8(1): 49-58. [in Persian]
- [32] Azizzadeh Delshad AR, Farzan AR. The Prophylactic Capacity of *Nepeta Menthoides* (*Ostokhodus*) in Prevention of Spinal Motoneuron Injury. *J Kerman Univ Med Sci* 2013; 20(1): 20-30. [in Persian]