

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۵، اردیبهشت ۱۳۹۵، ۱۵۰-۱۳۹

اثر عصاره هیدروالکلی گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis*) بر میزان نفوذپذیری سد خونی-مغزی و اختلالات عصبی-حرکتی در مدل ایسکمی مغزی گذرا در موش صحرایی نر

الهام قاسملو^۱، مهدی رهنما^۲، محمدرضا بیگدلی^۳

دریافت مقاله: ۹۴/۶/۲۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۴/۸/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۴/۱۲/۲۲ پذیرش مقاله: ۹۵/۱/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: تولید رادیکال‌های آزاد در مراحل اولیه ایسکمی مغزی افزایش می‌یابد. مریم‌گلی حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. از این رو در این مطالعه، اثر عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی بر میزان نفوذپذیری سد خونی-مغزی و اختلالات عصبی-حرکتی در مدل ایسکمی مغزی گذرا در موش‌های صحرایی نر بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل آب مقطر؛ سه گروه دیگر عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی را به ترتیب با مقادیر ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به صورت داخل صفاقی به مدت ۳ هفته دریافت کردند؛ گروه ششم که تیمار و القای ایسکمی در آنها صورت نگرفت. ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق در ۴ گروه اول، شریان مغزی میانی بسته شد و در آنها مدل‌سازی سکته مغزی کانونی انجام گرفت، سپس میزان نفوذپذیری سد خونی-مغزی و اختلالات عصبی-حرکتی بررسی شد. داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی سبب کاهش نفوذپذیری سد خونی-مغزی در هر سه دوز ۵۰ ($10/68 \pm 0/54$)، ۷۵ ($5/87 \pm 0/41$) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($5/19 \pm 0/49$) نسبت به گروه کنترل گردید (به ترتیب $p=0/018$ ، $p<0/001$ و $p<0/001$). اختلالات عصبی در مقادیر ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری نشان داد (به ترتیب $p=0/017$ و $p=0/002$).

نتیجه‌گیری: بر طبق نتایج این مطالعه احتمال دارد مریم‌گلی بتواند به واسطه کاهش نفوذپذیری سد خونی-مغزی و اختلالات عصبی، اثر حفاظتی در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی اعمال کند.

واژه‌های کلیدی: مریم‌گلی، ایسکمی مغزی گذرا، نفوذپذیری سد خونی-مغزی، اختلالات عصبی-حرکتی

۱- (نویسنده مسئول) مرکز تحقیقات بیولوژی، گروه فیزیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

تلفن: ۰۲۴-۳۳۴۵۵۸۹۰، دورنگار: ۰۲۴-۳۳۴۵۵۸۹۰، پست الکترونیکی: ghasemloo_e@yahoo.com

۲- دانشیار و متخصص فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی، گروه فیزیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۳- دانشیار و متخصص فیزیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

مقدمه

سکته مغزی به عنوان یک بیماری مهم، با عواقب ناتوان کننده شناخته شده است و علائم آن با توجه به محل آسیب مغزی، متفاوت و شامل اختلالات شناختی، حسی و حرکتی است [۱]. سکته مغزی عمده ترین علت مرگ و میر و ناتوانی های طولانی مدت در بزرگسالان است [۲]. میزان مرگ و میر ناشی از سکته مغزی ناگهانی حدود ۲۰٪ و میزان ناتوانی ناشی از آن حدود ۵۰٪ می باشد [۳]. تولید رادیکال های آزاد در مراحل اولیه ایسکمی مغزی افزایش می یابد و نقش اصلی را در آسیب های ناشی از سکته مغزی بر عهده دارد. همچنین افزایش رادیکال های آزاد نقش اصلی را در آسیب های ناشی از خون رسانی مجدد به دنبال ایسکمی گذرا، ایفا می کند [۴]. مطالعات قبلی نشان داده است که تولید رادیکال های آزاد متعدد نقش مهمی در آسیب به سد خونی- مغزی و ایجاد ادم مغزی به دنبال ایسکمی مغزی دارد [۵]. آنتی اکسیدان ها یکی از مهم ترین موادی هستند که می توانند اثرات جانبی سکته مغزی و پیامدهای ناشی از سکته ایسکمیک را کاهش دهند. به طور طبیعی بین تولید رادیکال های آزاد و فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی بدن یک تعادل برقرار است. هرگونه تغییر در این تعادل سبب استرس اکسیداتیو بافتی می گردد [۶].

امروزه گیاهان دارویی به علت دارا بودن اثرات جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته اند. برخی از این گیاهان به عنوان منابع غنی از آنتی اکسیدان های طبیعی، در طب سنتی برای کنترل و درمان بیماری به کار می روند. مواد اولیه مؤثر در گیاهان

که به صورت ذخیره ای موجود می باشند، به دلیل همراه بودن با ترکیبات دیگر، از حالت تعادل زیستی برخوردارند، به نحوی که در بدن انباشته نمی شوند، لذا اثرات جانبی کمتری بر جای می گذارند. این نکته دلیل خوبی برای انجام تحقیقات جدید بر اطلاعات حاصل از طب سنتی را فراهم می آورد [۷].

مریم گلی با نام علمی *Salvia officinalis*، گیاهی است گلدار، نهان دانه، دولپه ای، پیوسته گلبرگ، از راسته توبی فلورال، راسته فرعی شاه پسند، تیره نعنائیان و جنس سالویا [۸]. مریم گلی گیاهی است بوته ای به ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی متر با ریشه چوبی و پایا، ساقه ای افراشته، انشعابات متعدد، پوشیده از کرک های کوتاه پیچیده، برگ های ساده، دارای پهنک، مستطیلی شکل و دم برگ دار [۹]. این گیاه با ارزش ترین نوع دارویی تیره نعنائیان است [۱۰]. در ایران این گیاه در آذربایجان شرقی و بعضی مناطق آن در باغچه ها کشت می شود [۸].

مریم گلی آلزایمر را بهبود می بخشد [۱۱] قندخون را کاهش می دهد [۱۲] و دارای اثرات ضد التهابی [۱۳] و ضد توموری [۱۴] است. این گیاه دارای چندین ترکیب فعال نظیر توپون، سینئول، بورنئول، پنین، فلاونوئیدها، ساپونین، گلیکوزید، رزین، ویتامین های E و C، تانن، مواد صمغی و دی ترپن ها می باشد [۱۵]. طبق تحقیقات انجام شده مریم گلی حاوی مواد تلخ، تانن های گروه کاتشین (سالویا تانن)، فلاونوئیدها (اپی ژنین، لوتئولین)، اسانس های فرار (سینئول، کامفور، آلفا و بتا توجون)، مواد گلیکوزیدی، توکوفرول، اسیدرزمارینیک و اسید آسکوربیک می باشد [۱۶].

همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، افزایش رادیکال‌های آزاد به دنبال ایسکمی [۴]، نقش زیادی در آسیب‌های ناشی از ایسکمی بر عهده دارد [۵]، بنابراین، افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌تواند در کاهش استرس اکسیداتیو ایجاد شده به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد به دنبال ایسکمی، نقش مؤثری داشته باشد. به نظر می‌رسد مریم‌گلی (به عنوان عضوی از جنس سالویا) به دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر مانند ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی [۱۷-۱۸] بتواند سبب پاکسازی رادیکال‌های آزاد شده و اثر حفاظتی بر مغز اعمال کند. بر اساس جست و جوی نویسندگان این مقاله، مطالعه‌ای در زمینه اثر حفاظتی عصاره مریم‌گلی بر سد خونی- مغزی و اختلالات عصبی- حرکتی در داخل و خارج از کشور یافت نشد. در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) بر میزان نفوذپذیری سد خونی- مغزی و اختلالات عصبی- حرکتی در مدل ایسکمی مغزی گذرا در موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در بهار سال ۱۳۹۴ در مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان صورت گرفت. موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از مؤسسه انستیتو پاستور کرج خریداری و در محدوده دمایی 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و به صورت نامحدود به آب و غذا دسترسی داشتند. موضوع مطالعه در

جلسه کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد زنجان مطرح گردید و طی شماره iauz.REC.1393.45 به تصویب رسید. در این مطالعه ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل آب مقطر و سه گروه دیگر عصاره هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی را به ترتیب با مقادیر ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. مقدار [۱۹-۲۰] و طول مدت تزریق عصاره [۲۰] بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شد. تزریق عصاره و آب مقطر هر روز ساعت ۱۲-۱۱ صبح انجام گرفت و به مدت ۲۱ روز (تا دو ساعت قبل از جراحی) ادامه یافت. در گروه پنجم (گروه شم) تیمار و القای ایسکمی صورت نگرفت. در این گروه فقط استرس جراحی به حیوانات القاء گردید (ناحیه جلوی گردن باز شده و شریان کاروتید از عصب واگ جدا گردید). دو ساعت بعد از آخرین تزریق، گروه کنترل و گروه‌های دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی تحت جراحی شریان مغزی میانی (Middle cerebral artery occlusion; MCAO) قرار گرفتند.

بخش‌های هوایی گیاه مریم‌گلی در اواخر خرداد ماه و اوایل تیرماه سال ۱۳۹۳ از مزرعه‌ای در یکی از روستاهای شهرستان خدابنده (آبی‌سفلی) جمع‌آوری شد. گیاه مریم‌گلی به صورت خودرو در مزرعه یونجه رشد کرده بود. سپس از نظر تاکسونومیکی به تأیید هرباریوم دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی زنجان رسید. گیاه جمع‌آوری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سایه خشک شده و سپس توسط آسیاب (دستی) پودر گردید. عصاره‌گیری به روش خیساندن انجام گرفت [۲۰]. مقدار ۵۰ گرم از پودر گیاه با اتانل ۷۰٪ در ارلن ریخته شد،

طوری که حلال ۲ سانتی متر بالای پودر قرار گیرد. روی ارلن با فویل آلومینیومی پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. هر دو ساعت یکبار با همزن شیشه‌ای مواد مخلوط می‌شد. پس از این مدت، محلول توسط کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) صاف شد و جهت حذف حلال در دستگاه روتاری (مدل Heidolph ساخت آلمان) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. عصاره پس از غلیظ شدن در آون (مدل SB1100 ساخت ژاپن) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک شود. عصاره خالص به دست آمده ۲۰ گرم بود که با استفاده از تناسب، مقدار ماده خشک لازم برای تهیه هر دوز محاسبه گردید و با استفاده از آب مقطر غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تهیه شد [۲۰].

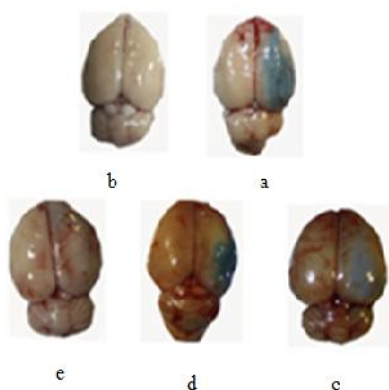
حیوانات بعد از توزین، با داروی کلرال هیدرات (Merck ساخت آلمان) به میزان ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بی‌هوش شدند. جراحی مدل‌سازی انسداد شریان میانی مغز یا همان (Middle cerebral artery occlusion; MCAO) Longa مطابق دستورالعمل و همکاران انجام شد [۲۱]. به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون ۳-۰ از طریق تنه شریان کاروتیدی خارجی (External Carotid Artery; ECA) وارد رگ شریانی راست شده و تا رسیدن به شریان مغزی قدامی (Anterior Cerebral Artery; ACA) از میان شریان کاروتیدی داخلی (Internal Carotid Artery; ICA) با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به شریان میانی (Middle Carotid Artery; MCA) بسته می‌شود. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت در پیش‌روی نخ

و ورود حدود ۲۰ میلی متر طول نخ از تنه ECA مشخص گردید. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت.

استحکام سد خونی- مغزی توسط اندازه‌گیری میزان خروج آبی ایوانز (Evans Blue) ارزیابی شد. نخست، حیوانات از طریق ورید دم محلول آبی ایوانز (Merck ساخت آلمان) ۲٪ را به اندازه ۴ میلی لیتر 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. مقدار ۲۵۰ میلی لیتر سالین از طریق بطن چپ به حیوان تزریق گردید تا زمانی که مایع پرفیوژ بی‌رنگ از دهلیز راست خارج شود و آبی ایوانز داخل رگی پاک گردد. سپس مغز خارج شده، نیم‌کره‌ها از هم جدا و برای اندازه‌گیری میزان خروج آبی ایوانز، بافت مغز در ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات هموزن گردید. برای رسوب پروتئین نیز به آن ۲/۵ میلی لیتر اسید تری کلرواستیک (مرک ساخت آلمان) ۶۰٪ اضافه گردید. سپس ۳ دقیقه با ورتکس (مدل IKA-VORTEX3 ساخت آلمان) هم‌زده و ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خنک شود. آنگاه به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل boeco- c28 ساخت کشور آلمان) گردید. در نهایت، جذب نوری آبی ایوانز بخش رویی توسط اسپکتوفتومتر (مدل Genesis5 ساخت کشور آمریکا) در جذب ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و مطابق منحنی استاندارد، غلظت آن محاسبه شد [۲۲].

معاینه اختلالات عصبی- حرکتی، ۲۴ ساعت بعد از القای ایسکمی توسط روش Plesnila و همکاران انجام گرفت. یافته‌های عصبی- حرکتی در ۶ مقیاس دسته‌بندی

عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی سبب کاهش غلظت آبی ایوانز در مغز حیوانات هر سه گروه دریافت‌کننده عصاره گردید (شکل ۱).



تصویر ۱- نمونه مغز موش‌های صحرایی نر که در آنها ایسکمی مغزی اعمال شده است. نواحی آبی رنگ به دلیل ایسکمی آبی ایوانز را به خود جذب کرده‌اند. x گروه کنترل، b گروه شم، x دوز ۵۰، d دوز ۷۵ و e دوز ۱۰۰.

ایسکمی مغزی سبب افزایش نفوذپذیری سد خونی-مغزی و در نتیجه غلظت آبی ایوانز در نیم‌کره آسیب‌دیده (راست) گروه کنترل ($12/50 \pm 0/59$) نسبت به نیم‌کره راست گروه شم ($4/79 \pm 0/66$) گردید ($p < 0/001$). پیش تغذیه با عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی سبب کاهش غلظت آبی ایوانز در نیم‌کره آسیب‌دیده (راست) در دوزهای ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($10/68 \pm 0/54$)، ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($5/87 \pm 0/41$) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($5/19 \pm 0/49$) نسبت به گروه کنترل گردید (به ترتیب $p = 0/018$ ، $p < 0/001$ و $p < 0/001$). بین نیم‌کره راست گروه دریافت‌کننده ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و نیم‌کره راست گروه شم تفاوت معنی‌داری ($p < 0/001$) مشاهده شد. غلظت آبی ایوانز در نیم‌کره چپ گروه‌های دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی با مقادیر ۵۰،

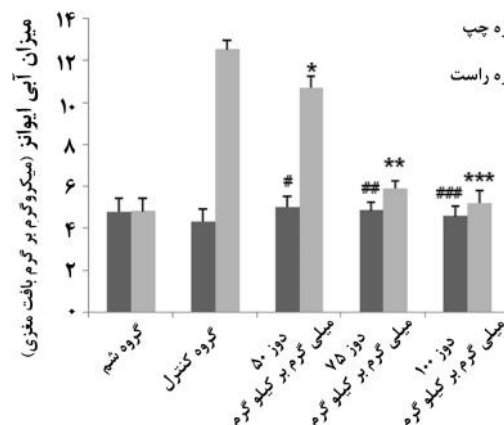
شدند: حیوانات مقیاس صفر (۰) هیچ گونه عارضه عصبی-حرکتی نشان ندادند؛ مقیاس یک، نارسایی کامل در انتهای پنجه جلویی سمت مقابل ضایعه که یک اختلال عصبی-حرکتی خفیف در نظر گرفته می‌شود. مقیاس دو، به چپ چرخیدن، اختلال عصبی-حرکتی متوسط و مقیاس ۳، افتادن سمت چپ، اختلال عصبی-حرکتی شدید در نظر گرفته شدند. حیوانات مقیاس چهار نمی‌توانستند به طور خودبه‌خودی راه روند و سطح هوشیاری پایین داشتند. به حیواناتی که طی ۲۴ ساعت بعد جراحی می‌مردند، در صورتی که بعد از رنگ‌آمیزی، بخش وسیعی از مغزشان آسیب دیده و مرگ منحصر به سکنه مغزی بود، مقیاس پنج داده می‌شد [۲۳].

تمام آنالیزها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. بررسی میزان نفوذپذیری سد خونی-مغزی و ارتباط بین نیم‌کره‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD (least-significant-difference) انجام گرفت. $p \leq 0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان گردید. نمره اختلافات عصبی-حرکتی ابتدا با استفاده از آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis مورد بررسی قرار گرفت و پس از اثبات معنی‌داری داده‌ها، از تحلیل من‌ویتنی برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد و $p \leq 0/017$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

افزایش غلظت آبی ایوانز در بافت مغزی، نشان‌دهنده افزایش نفوذپذیری سد خونی-مغزی است. پیش درمان با

۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، تفاوت معنی داری با نیم کره چپ گروه کنترل و شم، نشان نداد (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه غلظت آبی ایوانز در نیم کره راست و چپ مغز در گروه های مختلف موش های صحرایی نر نژاد ویستار. * اختلاف معنی دار در سطح $p=0.018$ نسبت به گروه کنترل و در سطح $p<0.001$ نسبت به #؛ ** اختلاف معنی دار در سطح $p<0.001$ نسبت به گروه کنترل و نسبت به *؛ *** اختلاف معنی دار در سطح $p<0.001$ نسبت به گروه کنترل و نسبت به *

ابتدا نمره اختلالات عصبی- حرکتی توسط آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید که بین داده ها اختلاف معنی دار ($p=0.005$) وجود دارد. سپس مقایسات دو گروهی توسط آزمون ناپارامتری Mann-Whitney U انجام شد. نمره اختلالات عصبی- حرکتی در دو دوز ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت (به ترتیب $p=0.017$ و $p=0.002$)، اما دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم تأثیر معنی داری بر نمره اختلالات عصبی- حرکتی نداشت (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانه نمره اختلالات عصبی- حرکتی در گروه های مختلف موش های صحرایی نر نژاد ویستار ($n=7$)

گروه آزمایشی	میان (چارک سوم- چارک اول)	نقص های نورولوژیک					
		۵	۴	۳	۲	۱	۰
۱ کنترل	۴ (۳-۵)	۲	۳	۱	۱	۰	۰
۲ شم	۰ (۰-۰)	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲ دوز میلی گرم بر کیلوگرم ۵۰ *	۳ (۲-۴)	۱	۱	۳	۲	۰	۰
۳ دوز میلی گرم بر کیلوگرم ۷۵ **	۲ (۱-۳)	۰	۱	۲	۲	۱	۰
۴ دوز میلی گرم بر کیلوگرم ۱۰۰ ***	۱ (۱-۲)	۰	۰	۱	۲	۳	۱
کل	-	۳	۵	۶	۷	۵	۲

* اختلاف معنی دار در سطح $p<0.001$ نسبت به گروه شم
 ** اختلاف معنی دار در سطح $p=0.017$ نسبت به گروه کنترل، در سطح $p<0.001$ نسبت به گروه شم
 *** اختلاف معنی دار در سطح $p=0.002$ نسبت به گروه کنترل، در سطح $p<0.001$ نسبت به گروه شم
 ابتدا داده ها توسط آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis ارزیابی شد ($p=0.005$) و سپس با استفاده از آزمون ناپارامتری Mann-Whitney U مقایسات دو گروهی صورت گرفت.

بحث

این مطالعه نشان داد که پیش‌درمانی با عصاره هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی در مقادیر ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب کاهش نفوذپذیری سد خونی- مغزی در ایسکمی مغزی می‌شود. این کاهش وابسته به دوز بوده و در دوزهای بالاتر یعنی ۷۵ و ۱۰۰ اثر بهتری داشت. همچنین، پیش‌درمانی با عصاره، نمره اختلالات عصبی- حرکتی را در مقادیر ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش داد.

تشکیل ادم مغزی بعد از ایسکمی و خون‌رسانی مجدد با ناتوانی سد خونی- مغزی در حفظ گرادیان غلظتی یون‌ها همراه است. سد خونی- مغزی با حضور اتصالات محکم شناخته می‌شود و اتصالات محکم مناطقی از غشاء هستند که کلاسترول بیشترین غلظت را در آنجا دارد [۲۴].

Rabiei و همکاران در یک مطالعه اثر روغن زیتون بر میزان ادم مغزی را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ممکن است افزایش سطح کلاسترول و کلاسترول استر مغزی در اثر مصرف روغن زیتون باعث ایجاد اثرات حفاظتی بر مغز شده و از این طریق باعث افزایش استحکام سد خونی- مغزی گردد که این اثرات به حضور ترکیبات فنولی و اسیدهای چرب اشباع نشده در روغن زیتون نسبت داده شد [۲۵]. شکسته شدن سد خونی- مغزی می‌تواند نتیجه فعال شدن متالوپروتئینازهای ماتریکسی باشد. مشخص شده است که متالوپروتئینازهای ماتریکسی می‌توانند سبب مهاجرت نوتروفیل‌ها به بافت‌ها شده و در نتیجه سبب ایجاد چرخه

معیوب و افزایش التهاب گردند. همچنین می‌تواند سبب تخریب پروتئین‌های مسئول برقراری اتصالات محکم مانند کلودین و اکلودین شوند [۲۶]. Rabiei و همکاران نشان دادند که ترکیبات فنولی موجود در برگ زیتون می‌تواند با مهار فعالیت فاکتور رونویسی NFkB از فعال شدن متالوپروتئینازهای ماتریکسی و در نتیجه از تخریب سد خونی- مغزی جلوگیری کند [۲۷]. از آنجایی که مریم‌گلی نیز دارای ترکیبات فنولی می‌باشد، شاید بتواند با مکانیسمی مشابه اثرات حفاظتی خود را اعمال کند [۱۶-۱۵]. Sarshoori و همکاران بیان کردند تزریق داخل صفاقی روغن زیتون قبل از القای ایسکمی سبب افزایش جامعیت سد خونی- مغزی و کاهش نمره اختلالات عصبی- حرکتی می‌گردد. در واقع ترکیبات فنولی روغن زیتون، به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی، از افزایش رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و در نتیجه سبب حفظ سلامت سیستم سد خونی- مغزی می‌گردد [۲۸]. Allahtavakoli و همکاران بیان کردند ویتامین C، اختلالات عصبی- حرکتی را کاهش می‌دهد و ویتامین C دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و جزء آنتی‌اکسیدان‌های غیرآزمیمی محسوب می‌شود [۲۹]. می‌توان بیان کرد، چون مریم‌گلی نیز دارای اسید آسکوربیک می‌باشد، می‌تواند سبب کاهش اختلالات عصبی- حرکتی گردد. Imani و همکاران نشان دادند عصاره بومادران به دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهاب نمره اختلالات عصبی- حرکتی را کاهش می‌دهد [۳۰].

آنتی‌اکسیدان و ویتامین E بعد از جذب از دستگاه گوارش وارد خون می‌شوند و مقداری از آن بعد از این که

به مغز رسید، به علت خاصیت محلول بودن در چربی از سد خونی- مغزی گذشته و وارد قسمت‌های مختلف مغز می‌شود. در این محل، پلی‌فنول و اثرات هم‌افزایی این ترکیبات با ویتامین E باعث اثرات قوی آنتی‌اکسیدانی روی رادیکال‌های آزاد و اسیدها می‌شوند که به دنبال کاهش خون‌رسانی در این محل تجمع پیدا کرده‌اند و با آنها واکنش داده و آنها را خنثی می‌کنند و به این ترتیب از واکنش این رادیکال‌ها با لیپیدهای موجود در غشای نورون‌ها جلوگیری می‌کنند [۳۱]. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که گونه‌های مختلف سالویا با داشتن مقادیر بالای ترکیبات فنولی، همواره یکی از مهم‌ترین منابع آنتی‌اکسیدانی طبیعی مورد توجه برای مطالعه بوده است [۳۱-۳۲]. Tadjalli و Haghjoo نشان دادند عصاره مریم گلی لاله‌زاری با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی مشابه سیلیمارین، مغز قدامی را از آسیب‌های ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن محافظت می‌کند که این اثر حفاظتی به واسطه حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است [۳۳]. Razavi و همکاران نشان دادند عصاره مریم گلی به دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌آپوپتوزی و ضدالتهابی به عنوان یک ماده نوروپروتکتیو در ضایعات عصبی عمل می‌کند [۱۹] که نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر هم‌سو می‌باشد.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه، عدم اندازه‌گیری غلظت آنتی‌اکسیدان‌های خون و پارامترهای استرس اکسیداتیو مانند غلظت مالون دی آلدئید بود. بررسی پروتئین‌های مؤثر در اتصالات محکم موجود در سدخونی-

مغزی نیز می‌توانست در بیان علت تأثیر عصاره مؤثر باشد. برای حل این مشکل، حیواناتی که در هر گروه قرار گرفتند بیشتر از نمونه‌های مورد نیاز بود تا در صورت مرگ و میر جایگزین گردند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی اثرات درمانی عصاره مریم گلی بعد از القای ایسکمی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین به نظر می‌رسد که اندازه‌گیری هم‌زمان مارکرهای استرس اکسیداتیو نیز در مطالعات بعدی سودمند واقع گردد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد عصاره مریم گلی به واسطه کاهش نفوذپذیری سد خونی- مغزی و اختلالات عصبی- حرکتی به دنبال ایسکمی مغزی، بتواند اثر حفاظتی بر مغز اعمال کرده و سبب کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی گردد. شاید بتوان گفت این اثرات حفاظتی احتمالاً به دلیل حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی موجود در این گیاه باشد که با کاهش رادیکال‌های آزاد سبب کاهش آسیب بافتی می‌گردند. البته برای تأیید این موضوع به مطالعات گسترده‌تری نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای میثم فروزنده برای همکاری در نگه‌داری و تیمار حیوانات و مدل‌سازی ایسکمی، دکتر حسین مصطفوی متخصص علوم اعصاب برای راهنمایی در امر تحقیق و مطالعه، دکتر جواد ناصریان متخصص آمار زیستی، خانم معصومه اسلامی و ندا قمری به دلیل مساعدت و بردباری در ارائه امکانات آزمایشگاهی نهایت تشکر را داریم.

References

- [1] Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G. Stroke rehabilitation. *The Lancet* 2011; 377 (9778): 1693-702.
- [2] Chinwatanakul S, Boonyapisit K, Pornsriyom D. Siriraj Acute Stroke Unit: 10 years experience. *J Med Assoc Thailand* 2012; 95 (2): 235-44.
- [3] Barnett HJM, Mohr JP, Bennett MS, editors. Stroke, pathophysiology, diagnosis and management. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2004; p: 342-3.
- [4] Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(8): 1505-17.
- [5] Gu Y, Dee CM, Shen J. Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Front Biosci* 2011; 3: 1216-31.
- [6] 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.
- [7] Ehsani P, Nazayer H, Memari A. The Efficiency of Herbal Medicine (Anthemis, Salvia and Zataria) on Menstrual Cycle Blood Discharging. *J of Azad Univ of Ahvaz* 2013; 5(18): 127-40. [Farsi]
- [8] Mossi AJ, Cansian RL, Paroul N, Toniazzo G, Oliveira JV, Pierozan MK, et al. Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of salvia. *J of Biology* 2011; 71: 121-9.
- [9] Ghasemi Pirbalouti A. The third list plants, traditional medicine and ethnoveterinary. 1st ed. Shahrekord: Saman-Danesh Publication; 2009; p: 158-90. [Farsi]
- [10] Zargari A. Gyahan Darooie. 4ed ,Tehran, Daneshgahe Tehran. 1990;p: 59-64. [Farsi]
- [11] Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J of Clin Pharm Ther* 2003; 28(1): 53-9.
- [12] Lima CF, Azevedo MF, Araujo R, Fernandes-Ferreira MF, Pereira-Wilson C. 6T Metformin-like effect of Salvia officinalis (common sage): is it useful in diabetes prevention. *Br J Nutr* 2006; 96(2): 326-33.
- [13] Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, et al. Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J of Ethnopharmacol* 2001; 75(2): 125-32.
- [14] Bidmeshkipour A, Keshavarz M, Mostafaie A. Anti tumor activity of Salvia officinalis is due to its

- anti-antigenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *J of Yakhteh* 2011; 4: 477-82.
- [15] Lu Y, Foo LY. Polyphenolics of Salvia-a review. *J of Phytochemistry* 2002; 59(2): 117-40.
- [16] Glisic SB, Ristic M, Skala D, Ivanovic J. Extraction of sage (*salvia officinalis* L.) by supercritical Co₂: kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *J Superitica Fluids* 2010; 52(1): 62-70.
- [17] Farhat MB, Landoulsi A, Chaouch-Hamada R, Sotomayor JA, Jordán MJ. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of Salvia species growing in different habitats. *J Indust Crops Products* 2013; 49: 904-14.
- [18] Bors W, Michel C, Stettmair K. Antioxidant mechanisms of polyphenolic caffeic acid oligomers, constituents of *Salvia officinalis*. *J of Biol Res* 2004; 37(2): 301-11.
- [19] Razavi M, Tehranipour M, Khayatzaheh J. Effects of aqueous extract of *Salvia chloroleuca* leaves on degeneration of alpha motoneurons in spinal cord after sciatic nerve compression in rat. *J of Sharkord Med Sci* 2014; 16(2): 22-30. [Farsi]
- [20] Shahmohammadi SH, Khosravi M, Hajizadeh A. The effect of of *Salvia officinalis* on malondialdehyde concentration, in the face of oxidative stress induced by injection of streptozotocin (ICV) in male rats. *J of Azad Tehran Med Sci* 2014; 23(4): 225-9. [Farsi]
- [21] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *J of Stroke* 1989; 20: 84-91.
- [22] Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Heidarianpour A, Rasoulilian B, Asgari AR, et al. Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-alpha level. *J of Exp Neurol* 2008; 212(2): 298-306.
- [23] Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, et al. BID mediates neuronal cell death after oxygen/glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J of Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(26): 15318-23.
- [24] Dietschy JM, Turley SD. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *J of Trends Neurosci* 2001; 24(12): 719-25.
- [25] 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 of Zanjan Univ Med Sci* 2013; 21(86): 56-64. [Farsi]
- [26] Wang L, Geng C, Jiang L, Gong D, Liu D, Yoshimura H, et al. The anti atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis. *J of Eur Nutr* 2008; 47(5): 235-43.
- [27] Rabiei Z, Bigdeli MR, Mohagheghi F. The effect of various doses of olive leaf extract on brain lipid levels and blood brain barrier permeability in rat

- stroke model. *J of Pejouhandeh* 2012; 17(2): 67-72. [Farsi]
- [28] Sarshoori JR, Asadi MH, Mohammadi MT. Effect of olive oil on the cerebral reperfusion following ischemia injuries in rats. *J of Birjand Univ of Med Sci* 2014; 21(1): 56-67. [Farsi]
- [29] Allahtavakoli M, Rezaee H, Kamrany N, Shamsizadeh 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 of Rafsanjan Univ Med Sci* 2009; 8(1): 49-58. [Farsi]
- [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 of Shahid Sadoughi Univ of Med Sci* 2015; 22(6): 1725-36. [Farsi]
- [31] Zupko I, Hohmann J, Redei D, Falkay G, Janicsak G, Mathe I. Antioxidant activity of leaves of Salvia species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *J of Planta medica* 2001; 67(4): 366-8.
- [32] Al-Qudah MA, Al-Jaber HI, Abu Zarga MH, Abu Orabi ST. Flavonoid and phenolic compounds from Salvia palaestina L. growing wild in Jordan and their antioxidant activities. *J of Phytochemistry* 2014; 99: 115-20.
- [33] Haghjoo R, Tadjalli M. The Effect of the Oral Administration of Salvia Rhytidia Extract on Neural Cell Numbers of Cerebral Cortex and Hippocampus Following Ischemia-Reperfusion in Rat. *J of Armaghane-danesh* 2015; 20(2): 138-48. [Farsi]

The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Salvia Officinalis* on Blood- Brain Barrier Permeability and Neuromotor Deficits in Male Rat Transient Ischemic Model

E. Ghasemloo¹, M. Rahnema², M.R. Bigdeli³

Received: 15/09/2015

Sent for Revision: 16/11/2015

Received Revised Manuscript: 12/03/2-016

Accepted: 13/04/2016

Background and Objectives: In the early stages of brain ischemia, the production of free radicals increases. *Salvia officinalis* is a rich source of antioxidant compounds. Therefore, in this study the effects of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* on blood -brain barrier permeability and neurological deficits have been studied.

Materials and Methods: In this experimental study 35 male Wistar rats were randomly divided into 5 groups of 7 rats. The control group received distilled water; three groups received hydroalcoholic extracts of *Salvia officinalis*, respectively with doses of 50, 75 and 100 mg/kg for, 3 weeks intraperitoneally; The sham group was not treated and was not induced by brain ischemia. Thereafter, the first four groups underwent middle cerebral artery occlusion 2 hours after the last injection and were induced by focal cerebral ischemia model, then blood-brain barrier permeability, and neurologic deficits were investigated.. Data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The hydroalcoholic extract of salvia could reduce permeability of the blood-brain barrier in three doses of 50 (10.68 ± 0.54), 75 (5.87 ± 0.41), and 100 mg/kg (5.19 ± 0.49) compared with the control group ($p=0.018$, $p<0.001$ and $p<0.001$, respectively). Neurologic deficits reduced in the experimental groups of 75 and 100 mg/kg ($p=0.017$, $p=0.002$, respectively) compared with the control group.

Conclusion: These results indicate that *Salvia officinalis* can make a guardianship in front of brain ischemia because it reduces blood- brain barrier permeability and neurologic deficits.

Key words: *Salvia officinalis*, Transient ischemia, Blood brain barrier permeability, Neurologic deficits

Funding: This research was funded by Islamic Azad University of Zanjan.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University of Zanjan approved the study.

How to cite this article: Ghasemloo E, Rahnema M, Bigdeli MR. The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Salvia Officinalis* on Blood- Brain Barrier Permeability and Neuromotor Deficits in Male Rat Transient Ischemic Model. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2016; 15(2): 129-38. [Farsi]

1- Biology Research Center, Dept. of Physiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
(Corresponding Author) Tel: (024) 33455890, Fax: (024) 33455890, Email: ghasemloo_e@yahoo.com

2- Associate Prof., Specialist of Physiology, Biology Research Center, Department of physiology, Zanjan-Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

3- Associate Prof., Specialist of Physiology, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran