

The Effect of Ethanolic Extract of Saffron (*Crocus sativus* L.) on Oxidative Stress Markers in the Hippocampus of Experimental Models of MS

Shabnam Ghaffari¹, Homeira Hatami^{2*}, Gholamreza Dehghan²

¹School of Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

²Department of Biology, School of Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received: 13 Jul, 2013

Accepted: 22 Sep, 2013

Abstract

Background and Objectives: The aim of this study was to evaluate the effects of ethanolic extract of saffron on oxidative stress markers in the hippocampus of experimental models of MS.

Materials and Methods: Induction of Multiple Sclerosis (MS) was carried out by direct single injection of 0.01 % ethidium bromide (EB) into the Cornu ammonis (CA₁) of hippocampal formation. One week after MS induction, animals received intrahippocampal (5 µg/rat and 10 µg/rat) injection of the saffron. At the end, the bilateral hippocampi were dissected to measure oxidative stress parameters. one-way ANOVA followed by Tukey test were used for Statistical analyses activity.

Results: Hippocampal injection of EB had no effect on catalase (CAT) activity, but it induced significant increment of antioxidant enzymes GPx and SOD (P<0.05). Short-term local injection of saffron extract significantly reduced the activity of GPx and SOD enzymes (P<0.05). But the activity of CAT was significantly increased following microinjection of saffron extract (P<0.05).

Conclusion: The results of the present study show that the local injection of EB may cause increased production of free radicals. Antioxidant capacity and activity are increased. Saffron extract as a potent antioxidant modulates oxidative stress markers, probably through scavenging of ROS and clearing of cells milieu from free radicals.

Keywords: Oxidative stress, Multiple sclerosis, Saffron, Hippocampus

***Corresponding author:**

E-mail: homeirahatami@yahoo.com

مقاله پژوهشی

اثر عصاره الکلی زعفران (*Crocus sativus* L.) بر تغییرات شاخص‌های استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مدل‌های تجربی مالتیپل اسکلروزیس

شبیم غفاری^۱، حمیرا حاتمی^{۲*}، غلامرضا دهقان^۲

دانشکده علوم، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۲/۴/۲۲ پذیرش: ۹۲/۶/۳۱

چکیده

زمینه و اهداف: هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات عصاره الکلی زعفران بر تعدیل شاخص‌های استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مدل‌های تجربی MS می‌باشد.

مواد و روش‌ها: القای MS با تزریق مستقیم سم اتیدیوم بروماید (۰/۰۱٪) به ناحیه CA₁ تشکیلات هیپوکامپی انجام گرفت. گروه‌های تیمار یک هفته پس از القای MS عصاره الکلی زعفران را به صورت ریزتزریق و به مدت ۳ روز و با دو دوز ۵ µg/rat و ۱۰ µg/rat دریافت نمودند. در خاتمه، نمونه برداری از هیپوکامپ انجام گردید و شاخص‌های استرس اکسیداتیو مورد سنجش قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با روش آنالیز واریانس یک طرفه و با آزمون تعقیبی Tukey انجام شد.

یافته‌ها: تزریق داخل هیپوکامپی سم اتیدیوم بروماید تأثیری بر فعالیت آنزیم CAT نداشت؛ ولی به طور معنی‌داری موجب افزایش ظرفیت تام آنتی-اکسیدانی (P < ۰/۰۱) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx و SOD (P < ۰/۰۵) گردید. تزریق موضعی کوتاه مدت عصاره الکلی زعفران موجب تعدیل و کاهش قابل توجه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (P < ۰/۰۱) و فعالیت آنزیم‌های GPx و SOD (P < ۰/۰۵) به میزان نرمال گردید. فعالیت آنزیم CAT به دنبال ریزتزریق زعفران افزایش معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق موضعی سم اتیدیوم بروماید موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان‌دهنده فعال شدن سیستم دفاعی است. عصاره الکلی زعفران به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی احتمالاً از طریق روییدن گونه‌های بازفعال اکسیژن و پاکسازی محیط سلول‌ها از رادیکال‌های آزاد، سبب تعدیل شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌شود.

کلید واژه‌ها: استرس اکسیداتیو، مالتیپل اسکلروزیس، زعفران، هیپوکامپ

* ایمیل نویسنده رابط: homeirahatami@yahoo.com

مقدمه

پاتوفیزیولوژیکی این بیماری می‌باشد (۲). سلول‌های میکروگلیا، ماکروفاژهای مستقر در CNS می‌باشند که نقش مهمی را در پاسخ‌های ایمنی و التهابی ایفا می‌کنند. آن‌ها در طی شرایط نوروپاتولوژیک به منظور حفظ هومئوستاز سیستم اعصاب مرکزی فعال می‌شوند. میکروگلیاهای فعال شده با آزادسازی فاکتورهای

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یکی از بیماری‌های التهابی مزمن دستگاه اعصاب مرکزی (CNS) است که منجر به پلاک‌های کانونی دمیلینه شده با میزان متغیری از تحلیل آکسونی و نورونی می‌گردد (۱). التهاب، دمیلیناسیون، استرس اکسیداتیو، آسیب آکسونی و مکانیسم‌های ترمیمی از جمله فرآیندهای

نشان داد که این گیاه دارویی دارای تعداد زیادی از ترکیبات زیستی فعال و قوی می‌باشد. کروسین و کروستین از مهم‌ترین اجزای فعال زعفران هستند. کروسین با رفع رادیکال‌های آزاد به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده، سلول‌ها و بافت‌ها را در برابر اکسیداسیون حفاظت می‌کند (۱۳). تجویز خوراکی زعفران، کارسینومای پوستی القاء شده با دی‌متیل بنزانتراسنین (Dimethylbenzanthracene DMBA) را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx، SOD و CAT مهار می‌کند (۱۴). براساس مطالعه‌ی حسین‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۵، عصاره‌ی آبی زعفران آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون کلیوی (Renal ischemia-reperfusion) را در موش‌های صحرانی بهبود می‌بخشد (۱۵). از مجموع تحقیقات فوق چنین برمی‌آید که زعفران به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی از طریق تعدیل شاخص‌های استرس اکسیداتیو، آسیب‌های ناشی از بار اکسیداتیو افزایش یافته را بهبود می‌بخشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر ریزتریزیک کوتاه‌مدت عصاره‌ی الکلی زعفران بر شاخص ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل GPx، SOD و CAT در هیپوکامپ مدل‌های تجربی MS می‌باشد.

مواد و روش‌ها

زعفران مورد استفاده در تحقیق حاضر از شرکت نوین زعفران (مشهد، ایران) تهیه گردید. برای تهیه عصاره ابتدا کلالة زعفران با استفاده از آسیاب مکانیکی پودر گردید. سپس با استفاده از حلال اتانولی زعفران اقدام به عصاره‌گیری به روش سوکسله گردید. در این روش عصاره‌گیری ۱۰ گرم پودر کلالة زعفران در ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ به مدت سه روز خیس‌اندازه شد. پس از صاف کردن محلول به دست آمده با صافی، حلال توسط دستگاه اواپراتور تحت خلأ و در دمای ۵۰-۶۰ °C حذف شد. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال و در دمای ۴ °C نگه‌داری شد (۱۶).

در این تحقیق از ۳۵ سر موش صحرانی نر بالغ نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی (۲۵۰±۵۰) گرم، استفاده گردید. حیوانات تحت شرایط سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته (۷ صبح تا ۷ شب) و درجه حرارت کنترل شده‌ی ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات دسترسی مداوم به آب و غذا داشتند و کلیه آزمایشات با رعایت اصول اخلاقی و ثبت شده بین‌المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه هفت‌تایی ذیل تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل سالم، ۲- گروه سالین، ۳- گروه اتیدیوم بروماید + سالین، ۴- گروه اتیدیوم بروماید بعلاوه عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵ μg/rat، و ۵- گروه اتیدیوم بروماید بعلاوه عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰ μg/rat.

به منظور القای مدل تجربی MS، موش‌ها به صورت عمیق با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زیلازین (۵mg/kg) بیهوش شده (۱۷) و در دستگاه استرئوتاکس

پیش‌التهابی و سیتوتوکسیک نظیر فاکتور نکروز دهنده تومور-آلفا (TNF-α)، ایترولوکین ۱-بتا (IL-1β)، ایترولوکین ۶ (IL-6)، نیتریک اکساید (NO) و گونه‌های بازفعال اکسیژن (ROS) منجر به آسیب نورون‌ها می‌شوند (۳). مشخص شده است که افزایش سایتوکاین‌های التهابی همچون TNF-α، موجب افزایش ROS شده و شرایط ایجاد استرس اکسیداتیو را فراهم می‌آورد (۴). بیماری MS نه تنها توسط واکنش‌های التهابی با واسطه‌ی سیستم ایمنی، بلکه توسط فرآیندهای تحلیل‌برنده‌ی عصبی نیز مشخص می‌شود. داده‌های به دست آمده نشان می‌دهند که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در این فرآیندها ایفا می‌کند (۲).

استرس اکسیداتیو ناشی از اختلال در تعادل بین تولید گونه‌های بازفعال اکسیژن و مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی اندوژن (درون-زا) است که در نهایت منجر به آسیب ماکرومولکول‌ها شامل لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها با واسطه‌ی ROS می‌گردد (۵-۷). مغز به علت دارا بودن میزان بالای مصرف اکسیژن، سطوح پایین آنتی‌اکسیدان‌ها و سطوح بالای فسفولیپیدها به طور مشخص در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر می‌باشد. پروکسیداسیون لیپیدهای غشاء منجر به تولید فسفولیپیدهای اکسیدشده (Ox-PL) و آلدئیدهای بازفعال می‌گردد که نفوذپذیری سد خونی-مغزی را افزایش می‌دهند (۸). استرس اکسیداتیو و ROS در تشکیل و ماندگاری ضایعات MS مشارکت دارند. تغییرات عمیق پروتئین‌های زنجیره‌ی تنفسی میتوکندریایی و حذف DNA میتوکندریایی در نورون‌های ضایعات فعال MS در مراحل پیشرفته‌ی بیماری مشاهده می‌شود (۹، ۱۰).

نخستین خط دفاعی سلول‌های بدن در برابر استرس اکسیداتیو، شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوکاتایون پروکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)؛ و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی همانند گلوکاتایون، توکوفرول، اسیدآسکوربیک، اسیداوریک، بتاکاروتن و بیلی‌روبین می‌باشند (۹). بر اساس مطالعه‌ای که اخیراً صورت گرفته است، افزایش ایمونوریکتیویته‌ی شاخص‌های آسیب اکسیداتیو با بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همزمان می‌شود که نشان می‌دهد ماکروفاژهای مترشحه و آستروسیت‌ها قادر هستند با تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اندوژن از خود حفاظت کنند (۷). مطالعات اخیر پیشنهاد کرده‌اند که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوکاتایون پروکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) از طریق حفاظت متغیر در برابر گونه‌های بازفعال اکسیژن، نقشی کلیدی در پاتوژنز MS ایفا می‌کنند (۱۰).

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چند ساله از تیره‌ی زنبق Iridaceae به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و دارای پیازی سخت و مدور و گوشت‌دار و پوشیده از غشاهای نازک و قهوه‌ای رنگ است (۱۱). زعفران به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی کاربرد فراوانی داشت و از آن به عنوان مسکن، ضد افسردگی، ضد اسپاسم، آرام‌بخش و برای درمان تب مخملک، آبله مرغان، سرماخوردگی، آسم، بیماری‌های چشم و قلب، تومور و سرطان استفاده می‌شد (۱۲). تجزیه و تحلیل ترکیب شیمیایی زعفران

اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شده و با استفاده از واحد (GPx U/L of Sample) تعیین گردید. مقادیر GPx بر حسب U/mg پروتئین بیان شده است (۵).

برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از روش اوتواکسیداسیون پیروگالول استفاده شد. بدین منظور، از بافر تریس-هیدروکلرید ۴۵ میلی مولار با pH=۸/۲ و EDTA ۱ میلی مولار و پیروگالول ۰/۲ میلی مولار استفاده گردید. ۱ میلی لیتر از بافر تریس-هیدروکلرید حاوی EDTA با ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت مخلوط شده و در داخل دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار گرفت و جذب دستگاه در طول موج ۴۲۰ نانومتر صفر گردید، سپس ۵۰ میکرولیتر پیروگالول به محلول فوق اضافه شده و سریعاً جذب تا دو دقیقه هر ۱۵ ثانیه در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. برای اندازه گیری اوتواکسیداسیون پیروگالول به تنهایی، به جای سوپرناتانت، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردیده و به ترتیب فوق، جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از اعداد به دست آمده درصد فعالیت آنزیم محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیم SOD به صورت درصد مهارکنندگی آنزیم بیان شده است (۲۲).

فعالیت کاتالاز بر اساس توانایی آن در تجزیه ی H_2O_2 به روش Obinger و همکاران (۱۹۹۷) تعیین گردید. تجزیه ی H_2O_2 با کاهش جذب در طیف جذبی ۲۴۰ نانومتر قابل بررسی است. محلول سنجش محتوی ۳ میلی لیتر بافر سیترات-فسفات-بورات (pH=۷)، ۲۶ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (۱۱/۸ mM) و ۵۰ میکرولیتر از عصاره (محلول هموزنات هیپوکامپ) بود. هر واحد از فعالیت کاتالاز نشان دهنده ی یک میکرومول از هیدروژن پراکسید تجزیه شده در هر دقیقه می باشد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب $\mu\text{mol/mg protein/min}$ بیان شده است (۲۳).

در بررسی حاضر، داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (Mean $\pm$ S.E.M) ارائه شده اند. جهت مقایسه ی گروه ها با یکدیگر و تشخیص معنی دار بودن تفاوت بین گروه های مورد آزمایش، از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. مقادیر $P < ۰/۰۵$ و $P < ۰/۰۱$ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن تفاوت میانگین ها مورد استفاده قرار گرفت. تمامی آنالیزهای آماری، توسط نرم افزار آماری SPSS-16.0 صورت پذیرفت.

یافته ها

القای مدل تجربی MS با استفاده از گلیوتوکسین اتیدیوم بروماید (EB) شاخص های استرس اکسیداتیو از جمله ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گلوتاتیون پروکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را تحت تأثیر قرار داد. اثر تزریق داخل هیپوکامپی سم اتیدیوم بر ظرفیت تام آنتی-اکسیدانی در نمودار ۱ آمده است. همنانگونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است. ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در مدل های تجربی MS (گروه ۳) در مقایسه با گروه های کنترل سالم (گروه های ۱ و ۲) به طور معنی داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۱$). ریزتزریق عصاره ی

(Stoelting, USA) در موقعیت مجسمه مسطح مستقر گردیدند. دمیلیناسیون، با تک تزریق دو طرفه ی سم اتیدیوم بروماید (محلول ۰/۰۱٪ در سالین ۰/۹٪ استریل) در حجم ۳ μl و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه (۱۸)، به داخل ناحیه ی CA_1 تشکیلات هیپوکامپی، بر اساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس القاء شد ($AP = -3/8$; $ML = \pm 2/2$; $DV = +2/7$) (۱۹).

موش های صحرایی گروه های تیمار با زعفران (گروه های ۴ و ۵) یک هفته بعد از القای مدل تجربی MS، عصاره الکلی زعفران را در دو دوز $5 \mu\text{g/rat}$ و $10 \mu\text{g/rat}$ 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 تزریق ها در فاصله قبل از ظهر انجام گرفت) (۱۸، ۲۰).

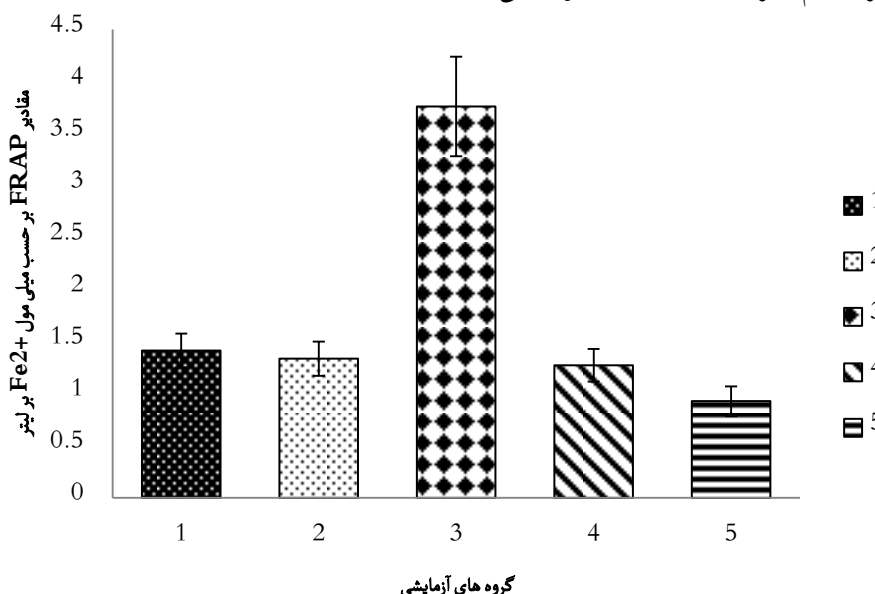
یک هفته پس از اتمام دوره ی تیمار، تمامی موش ها با تزریق داخل صفاقی کانامین (100 mg/kg) و زایلازین (5 mg/kg) بیهوش شدند (۱۷). سپس سر توسط گیوتین جدا شد و بلافاصله مغز و هیپوکامپ خارج گردیده و توسط سالین ۰/۹٪ استریل سرد شست و شو داده شد. هیپوکامپ جدا شده بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گردید. تمامی نمونه ها تا زمان تهیه هموزن در فریزر -80°C نگهداری شدند (۵). به منظور تهیه هموزن روی هر یک از نمونه ها محلول سرد $1/15\% \text{ KCL}$ با نسبت (۱:۱۰ w/v) اضافه گردید. سپس با استفاده از هموزنایزر مکانیکی هموزن بافت های هیپوکامپ تهیه گردید و بعد از سانتریفوژ کردن در دور 20000 g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C ، محلول رویی استخراج شد تا برای آنالیز بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد. میزان پروتئین کل در محلول های رویی توسط روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه گیری شد (۵).

اندازه گیری فعالیت کل آنتی اکسیدانی با استفاده از روش FRAP، بر اساس متد Benzie & Strain (1999) و با کمی تغییرات انجام گرفت. اساس این روش، توانایی ماده مورد نظر در احیای یون های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) با استفاده از معرفی به نام TPTZ می باشد. در حضور آنتی اکسیدان یون های فریک به فرو احیا می شود و در حضور معرف TPTZ محلول FRAP به رنگ بنفش در می آید. محلول FRAP از بافر سدیم استات $0/3$ مولار با $\text{pH} = 3/6$ محلول TPTZ $0/1$ مولار در اسید کلریدریک $0/4$ مولار و کلرید آهن $0/2$ مولار با نسبت های حجمی ۱:۱:۱۰ تشکیل شده است. ۱/۵ میلی لیتر از محلول FRAP با ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت مخلوط گردید و جذب نوری آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر تعیین شد. مقادیر FRAP بر حسب $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{L}$ بیان شده است (۲۱).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پروکسیداز (GPx) با استفاده از روش Paglia & Valentine و توسط کیت Ransel اندازه گیری شد. گلوتاتیون پروکسیداز اکسیداسیون گلوتاتیون توسط کومن هیدروپروکسید را کاتالیز می کند. فعالیت GPx در سوپرناتانت در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در 37°C توسط دستگاه

داری افزایش یافت ($P < 0.05$). میزان فعالیت آنزیم GPx، در مدل‌های تجربی MS دریافت کننده‌ی عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵ $\mu\text{g}/\text{rat}$ در مقایسه با گروه ۳ (اتیدیوم بروماید + سالین) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). فعالیت آنزیم GPx در گروه ۵ (اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰ $\mu\text{g}/\text{rat}$) نیز در مقایسه با گروه ۳ (اتیدیوم بروماید + سالین) کاهش یافته است؛ هر چند بررسی آماری نشان داد که این کاهش معنی‌دار نیست. تزریق داخل هیپوکامپی عصاره‌ی زعفران تغییر معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم SOD در مدل‌های تجربی MS (گروه‌های ۴ و ۵) در مقایسه با گروه ۳ ایجاد نکرد. همچنین بررسی آماری نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx و SOD در مدل‌های تجربی MS دریافت کننده‌ی عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵ $\mu\text{g}/\text{rat}$ (گروه ۴)، تفاوت معنی‌داری با گروه‌های کنترل سالم (۱ و ۲) ندارد.

الکلی زعفران با دو دوز ۵ $\mu\text{g}/\text{rat}$ و ۱۰ $\mu\text{g}/\text{rat}$ ظرفیت تام آنتی-اکسیدانی را به صورت وابسته به دوز و به‌طور معنی‌داری به میزان طبیعی آن نزدیک کرد (گروه‌های ۴ و ۵) ($P < 0.01$). پارامتر FRAP در گروه ۵ (اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰ $\mu\text{g}/\text{rat}$) کاهش بیشتری را نسبت به گروه ۴ (اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵ $\mu\text{g}/\text{rat}$) نشان داد اما به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مذکور مشاهده نشد. همچنین آزمون آماری نشان داد که در مقادیر FRAP، بین گروه‌های کنترل سالم (۱ و ۲) و گروه‌های تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران (۴ و ۵) تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (نمودار ۱).
میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون پروکسیداز (GPx) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در هیپوکامپ حیوانات گروه‌های آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx و SOD در مدل‌های تجربی MS (گروه ۳) در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم (گروه‌های ۱ و ۲) به طور معنی-

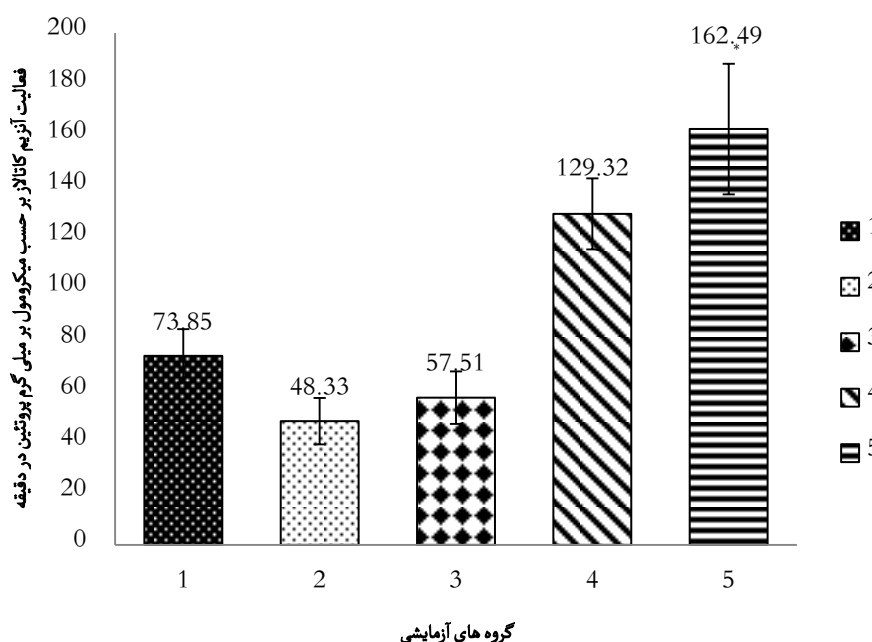


نمودار ۱: نتایج سنجش میزان FRAP برای ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در هیپوکامپ موش‌های صحرانی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار کوتاه‌مدت عصاره‌ی زعفران قرار گرفته‌اند. گروه‌ها: ۱ (کنترل سالم)، ۲ (سالین)، ۳ (اتیدیوم بروماید+سالین)، ۴ (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۵ $\mu\text{g}/\text{rat}$) و ۵ (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره‌ی الکلی زعفران با دوز ۱۰ $\mu\text{g}/\text{rat}$). نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی با علامت * نشان داده شده است ($P < 0.01$) (در هر گروه، $n=6$) (محور عمودی، X و محور افقی، Y).

جدول ۱: میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوکاتایون پروکسیداز (GPx) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در هیپوکامپ موش‌های صحرانی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران قرار گرفته‌اند.

نام گروه	مقادیر گلوکاتایون پروکسیداز بر حسب U/mg پروتئین	میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بر حسب قدرت مهارکنندگی
۱- گروه کنترل سالم	۱۴۳۱/۵۴ $\pm$ ۱۱/۷ _a	۳۷۲/۳۹ $\pm$ ۸۹/۵۴ _a
۲- گروه سالین	۱۴۶۳/۶۸ $\pm$ ۲۴/۱۶ _{ab}	۳۵۸/۳۴ $\pm$ ۱۲۵/۲۰ _a
۳- گروه EB + سالین	۱۵۸۵/۱۷ $\pm$ ۳۳/۴۷ _c	۴۲۰/۹۷ $\pm$ ۹۳۳/۷۴ _b
۴- گروه EB + زعفران ۵ $\mu\text{g}/\text{rat}$	۱۴۷۶/۲۲ $\pm$ ۲۵/۵۰ _{ab}	۲۰۶۰/۶۰ $\pm$ ۳۰۵/۱۰ _{ab}
۵- گروه EB + زعفران ۱۰ $\mu\text{g}/\text{rat}$	۱۵۲۹/۵۵ $\pm$ ۲۳/۳۵ _{bc}	۲۷۷۸/۴۰ $\pm$ ۶۴۲/۷۱ _b

نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در هر ستون با حروف a، b و c نشان داده شده است ($P < 0.05$) (در هر گروه، $n=6$).



نمودار ۲: نتایج سنجش فعالیت کاتالاز برای ارزیابی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی این آنزیم در هیپوکامپ موش های صحرانی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش های دمیلینه شده ای که تحت تیمار کوتاه مدت عصاره ی زعفران قرار گرفته اند. گروه ها: ۱ (کنترل سالم)، ۲ (سالین)، ۳ (اتیدیوم بروماید+سالین)، ۴ (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره ی الکلی زعفران با دوز ۵ $\mu\text{g}/\text{rat}$) و ۵ (گروه اتیدیوم بروماید + عصاره ی الکلی زعفران با دوز ۱۰ $\mu\text{g}/\text{rat}$). نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی با علامت * نشان داده شده است ($P < 0.05$) (در هر گروه، $n=6$) (محور عمودی، X و محور افقی، Y).

الکلی زعفران شاخص های افزایش یافته ی استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق موضعی اتیدیوم بروماید را تعدیل نمود. همچنین تیمار زعفران موجب افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی کاتالاز در هیپوکامپ مدل های تجربی MS گردید.

عبدالسلام و همکاران نشان دادند که تزریق موضعی سم اتیدیوم بروماید موجب کاهش معنی دار ظرفیت کل آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گردید (۲۴). کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در پلاسمای موش های صحرانی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید نیز گزارش شده است. یافته های مطالعات فوق با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در تضاد می باشد. تفاوت در جنس و گونه حیوانات مورد بررسی، حجم و دوز اتیدیوم بروماید تزریقی و مدت زمان آزمایش از جمله علل احتمالی تناقض موجود بین نتایج مطالعه حاضر با یافته های بررسی های فوق می باشد. تزریق داخل مغزی و یا داخل نخاعی سم اتیدیوم بروماید به طور گسترده ای به منظور القای دمیلیناسیون سمی در جوندگان مورد استفاده قرار می گیرد؛ که می توان از آن برای مطالعه مکانیسم های پاتوژنیک دخیل در تخریب میلین و نیز ارزیابی مداخلات درمانی احتمالی بهره برد (۲۵). با اینکه مکانیسم های متفاوتی در دمیلیناسیون و نورودژنراسیونی که در MS رخ می دهند دخالت دارند؛ اخیراً مشخص شده است که آسیب میتوکندریایی و کمبود انرژی متعاقب، یکی از فاکتور های مهم زمینه ساز آسیب بافتی است (۱). همانطور که در بخش مقدمه اشاره گردید؛ مطالعاتی که بر روی لیژن های فعال MS انجام گرفته است، حاکی از تغییرات اساسی پروتئین های زنجیره تنفسی میتوکندریایی و حذف DNA

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در هیپوکامپ مدل های تجربی MS در مقایسه با گروه های کنترل سالم (۱ و ۲) تغییر معنی داری نداشته است و ریز تزریق کوتاه مدت عصاره ی الکلی زعفران (گروه های ۴ و ۵) میزان فعالیت این آنزیم را به صورت وابسته به دوز و به طور معنی داری در مقایسه با گروه های کنترل سالم و گروه شاهد MS افزایش داد ($P < 0.05$) (نمودار ۲). این نتایج بیان می کنند که ریز تزریق عصاره ی زعفران به مدت سه روز، از طریق تعدیل شاخص های بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو، آسیب اکسیداتیو القاء شده توسط سم اتیدیوم بروماید را در مدل های تجربی MS بهبود بخشید.

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 شاخص های استرس اکسیداتیو در نمونه های تجربی مالتیپل اسکلروزیس مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی حاضر نشان داد که تزریق موضعی سم اتیدیوم بروماید به تشکیلات هیپوکامپی (CA_1)، موجب افزایش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گلوکوتایون پروکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در مدل های تجربی MS گردید (شکل ۱ و جدول ۱، گروه ۳). تزریق مستقیم سم اتیدیوم بروماید به تشکیلات هیپوکامپی تغییر معنی داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ایجاد نکرد (شکل ۲، گروه ۳). بر اساس یافته های تحقیق حاضر تزریق داخل هیپوکامپی عصاره ی

قدردوست و همکاران نشان دادند که پیش تیمار عصاره زعفران به مدت ۲۱ روز، یک ساعت قبل از اعمال استرس مزمن، از کاهش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی ناشی از استرس مزمن جلوگیری کرد و منجر به افزایش فعالیت کل آنتی اکسیدانی در گروه های تحت پیش تیمار با این عصاره گردید؛ که با نتایج بررسی حاضر در تضاد می باشد. ولی نتایج به دست آمده توسط قدردوست و همکاران، در رابطه با اثر زعفران بر روی میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در هیپوکامپ با نتایج تحقیق حاضر هم سو می باشد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه عصاره زعفران فعالیت آنزیم های SOD و GPx را در موش های صحرانی تحت استرس مزمن به طور معنی داری کاهش داد (۵). Shati و همکاران با مطالعه اثر عصاره آبی زعفران (تجویز داخل صفاقی به مدت ۴۵ روز) بر مغز موش کوچک آزمایشگاهی، افزایش ظرفیت تام آنتی-اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گلوکاتایون پروکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را گزارش نمودند (۲۶). Papandreou و همکاران نیز بیان کردند که تزریق داخل صفاقی عصاره زعفران به مدت ۷ روز فعالیت کل آنتی اکسیدانی مغز را در موش های بالغ و سالخورده به طور معنی داری افزایش داد (۲۷). یافته های سایر مطالعات (۱۴، ۲۸-۳۰) نیز حاکی از افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گلوکاتایون پروکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در اثر تیمار با عصاره زعفران است، که با نتایج تحقیق حاضر در تضاد می باشد. به نظر می رسد تفاوت در جنس و گونه ی حیوانات مورد بررسی، نحوه ی تیمار (تزریق سیستمیک و تجویز خوراکی)، مدت زمان اعمال تیمار، دوز عصاره زعفران، بررسی پارامترهای مذکور در بافت هایی متفاوت از بافت هیپوکامپ و مکان نمونه برداری از جمله علل احتمالی تفاوت نتایج مطالعات ذکر شده با تحقیق حاضر می باشند.

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 (۲۸). نکته ی مهم این است که تغییرات فعالیت این آنزیم ها به موازی یکدیگر و به صورت تعدیل شده می باشد. این تغییرات موازی به ویژه در فعالیت آنزیم های گلوکاتایون پروکسیداز (GPx) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بسیار حائز اهمیت می باشد، چرا که SOD آنیون های اضافی سوپراکسید را متابولیزه کرده و به پروکسید هیدروژن (H_2O_2) تبدیل می کند که در ادامه توسط GPx به آب تبدیل می شود (۵). یافته های ما نشان داد که تزریق موضعی کوتاه مدت عصاره زعفران قادر به کاهش فعالیت این آنزیم ها می باشد. این نتایج می تواند ناشی از این حقیقت باشد که عصاره زعفران و ترکیبات فعال آنتی اکسیدانی درون آن، منجر به کاهش گونه های باز فعال اکسیژن می شود که آن نیز به نوبه ی خود نیاز به فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را کاهش می دهد. احتمال دیگر این است که زعفران می تواند به طور مستقیم سستز این آنزیم ها را تعدیل کند (۵).

از سوی دیگر یافته های تحقیق حاضر نشان داد که تیمار کوتاه مدت عصاره الکلی زعفران فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی کاتالاز را به شکل قابل توجهی افزایش داد (شکل ۲). Shati و

میتوکندریایی در نورون ها، به ویژه در مراحل پیشرفته ی بیماری می باشد. پروتئین ها و DNA میتوکندریایی به شدت نسبت به آسیب اکسیداتیو حساس می باشند (۱، ۶). لذا به نظر می رسد تغییرات میتوکندریایی ناشی از آسیب اکسیداتیو منجر به افزایش تولید اندوژن گونه های بازفعال اکسیژن (ROS) می شود که این روند خود-تقویتی ممکن است به پیشبرد فرآیند نورودژنراسیون در MS کمک بکند (۷). 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 القایی با ROS به ماکرومولکول ها نظیر لیپیدهای غشایی، پروتئین های ضروری و نوکلئوتیدها می شود (۶، ۷).

استرس اکسیداتیو منجر به فعال شدن نوعی مکانیسم سازشی می گردد که به حفاظت سلول ها در برابر سمیت با واسطه ی ROS به حفظ تعادل اکسایشی-کاهشی بافت کمک می کند. این پاسخ به استرس شامل افزایش بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی اندوژن می باشد. در واقع، مطالعات اخیر به روشنی نشان می دهند که بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی در لیژن های التهابی و دمیلیه ی MS، به شدت افزایش پیدا می کند (۶، ۷).

رونویسی از ژن اکثر آنزیم های آنتی اکسیدانی از طریق یک فاکتور رونویسی موسوم به فاکتور هسته ای وابسته به E_2 (Nrf_2) و عناصر پاسخگر آنتی اکسیدانی (ARE)، در ژن های کد کننده ی این آنزیم ها تنظیم می شود. تحت شرایط فیزیولوژیک، Nrf_2 به صورت چسبیده به پروتئینی موسوم به $Keap1$ که خود به اکین متصل است، در سیتوپلاسم جای دارد؛ ولی در شرایط استرس اکسیداتیو Nrf_2 از $Keap1$ جدا شده و به هسته انتقال می یابد و در آنجا رونویسی هماهنگ ژن ها با واسطه ی ARE را فعال می کند. تاکنون بیش از ۲۰۰ ژن تحت کنترل Nrf_2 - ARE شناسایی شده است که در سم زدایی و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی مشارکت دارند که از آن جمله می توان به ژن های کد کننده ی سوپراکسید دیسموتاز، همواکسیژناز، گلوکاتایون پروکسیداز و کاتالاز اشاره نمود (۶). در مطالعه حاضر نیز به نظر می رسد تزریق مستقیم گلیوتوکسین اتیدیوم بروماید به هیپوکامپ، با القای استرس اکسیداتیو و از طریق مکانیسم هایی که در بالا به آن اشاره شد منجر به افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گلوکاتایون پروکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و در نتیجه افزایش فعالیت کل آنتی اکسیدانی می شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ریزتزریق عصاره الکلی زعفران اختلالات به وجود آمده در شاخص های استرس اکسیداتیو را بهبود بخشید. تزریق کوتاه مدت عصاره زعفران به تشکیلات هیپوکامپی، ظرفیت تام آنتی اکسیدانی را به مقادیر طبیعی آن کاهش داد (شکل ۱). عصاره زعفران با دوز $5 \mu g/rat$ میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی GPx و SOD را نیز به طور معنی داری کاهش داد (جدول ۱). در مطالعات انجام شده در مورد تأثیر عصاره زعفران بر ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی GPx و SOD نتایج متفاوتی ارائه گردیده است.

نتیجه‌گیری

نقش استرس اکسیداتیو و اختلال در فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی در تشکیل ضایعات و پلاک‌های دمیینه شده در بیماری MS شناخته شده است. در مطالعه‌ی حاضر استرس اکسیداتیو القاء شده با اتیدیوم بروماید با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی منعکس گردید که نشان‌دهنده‌ی درگیری مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی با گونه‌های بازفعال اکسیژن می‌باشد. همچنین تزریق داخل هیپوکامپی و کوتاه‌مدت عصاره‌ی زعفران موجب تعدیل و کاهش شاخص‌های فوق به مقادیر طبیعی گردید و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز را نیز افزایش داد. بنابراین، عصاره‌ی زعفران به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با اصلاح شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌تواند از بروز عوارض MS جلوگیری نماید. با توجه به نتایج حاصل، بررسی تأثیر این آنتی‌اکسیدان در نمونه‌های انسانی پیشنهاد می‌گردد.

همکاران نشان دادند که تیمار عصاره‌ی آبی زعفران به مدت ۴۵ روز متوالی موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز مغزی گردید (۲۶). در مطالعات دیگر (۱۴، ۳۰) نیز نشان داده شده است که استفاده از عصاره‌ی زعفران به عنوان تیمار فعالیت آنزیم آنتی-اکسیدانی کاتالاز را افزایش داد. در بررسی دیگری که مشابه تحقیق حاضر می‌باشد (۳۱) نشان داده شده است که تزریق داخل صفاقی ویتامین آنتی‌اکسیدانی E به مدت یک هفته، مانع از کاهش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز در نمونه‌های سرم رت‌های دمیینه شده با سم اتیدیوم بروماید گردید. نکته‌ی مهمی که باید بدان اشاره نمود این است که در مطالعه‌ی حاضر، زمانی که مدل‌های تجربی MS تحت تیمار با عصاره‌ی زعفران قرار گرفتند، تغییرات به وجود آمده در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خشی گردید و به مقادیر طبیعی آن‌ها که در گروه‌های کنترل سالم رؤیت می‌گردید، نزدیک شد. همچنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد که مؤید نقش مهم زعفران به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در کاهش آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد در رخدادهای دمیینه‌کننده نظیر بیماری MS است.

References

- Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, et.al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011; **134**(7): 1914-1924.
- 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* 2011; **36**(6): 1012-1016.
- Nam KN, Park Y-M, Jung H-J, Lee JY, Min BD, Park S-U, et.al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *Eur J Pharmacol* 2010; **648**(1): 110-116.
- Kim D-Y, Hao J, Liu R, Turner G, Shi F-D, Rho J-M. Inflammation-mediated memory dysfunction and effects of a ketogenic diet in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One* 2012; **7**(5): e35476.
- Ghadroost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, 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. *Eur J Pharmacol* 2011; **667**(1): 222-229.
- Schreibelt G, van Horssen J, van Rossum S, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res Rev* 2007; **56**(2): 322-330.
- Van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra C, Van der Valk P, et.al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med* 2008; **45**(12): 1729-1737.
- Tasset I, Agüera E, Sánchez-López F, Feijóo M, Giraldo AI, Cruz AH, et.al. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem* 2012; **45**(6): 440-444.
- Scandalios J. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005; **38**(7): 995-1014.
- Choi I, Lee S, Denney D, Lynch S. Lower levels of glutathione in the brains of secondary progressive

- multiple sclerosis patients measured by 1H magnetic resonance chemical shift imaging at 3 T. *Mult Scler J* 2011; **17**(3): 289-296.
11. Haghighizad H, Pourmotabbed A, Sahraei H, Ghadami MR, Ghadami S, Kamalinejad M. Protective effect of Saffron extract on morphine-induced inhibition of spatial learning and memory in rat. *Physiol Pharmacol* 2008; **12**(3): 170-179 (Persian).
 12. Abdullaev F, Espinosa-Aguirre J. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev* 2004; **28**(6): 426-432.
 13. Melnyk JP, Wang S, Marccone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Res Int* 2010; **43**(8): 1981-1989.
 14. Das I, Das S, Saha T. Saffron suppresses oxidative stress in DMBA-induced skin carcinoma: a histopathological study. *Acta histochem* 2010; **112**(4): 317-327.
 15. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharm Sci* 2005; **8**(3): 387-393.
 16. 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* 2009; **47**(8): 1909-1913.
 17. 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* 2010; **14**(1): 59-65.
 18. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, 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* 2010; **30**(2): 289-299.
 19. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition: Academic press; 2006.
 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* 2011; **49**(9): 947-954.
 21. Dehghan G, Khoshkam Z. Tin (II)-quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. *Food Chem* 2012; **131**(2): 422-426.
 22. Gao R, Yuan Z, Zhao Z, Gao X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem Bioenerg* 1998; **45**(1): 41-45.
 23. Obinger C, Maj M, Nicholls P, Loewen P. Activity, Peroxide Compound Formation, and Heme d Synthesis in *Escherichia coli* HP11 Catalase. *Arch Biochem Biophys* 1997; **342**(1): 58-67.
 24. Abdel-Salam OM, 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* 2011; **36**(6): 1062-1072.
 25. Abdel-Salam OM, 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* 2012; **23**(2): 61-68.
 26. 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.
 27. Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, Margarity M. Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behav Brain Res* 2011; **219**(2): 197-204.
 28. 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 Safety* 2012; **83**: 47-54.
 29. Naghizadeh B, Mansouri SMT, Mashhadian NV. Crocin attenuates cisplatin-induced renal oxidative

- stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; **48**(10): 2650-2655.
30. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya S, Ramesh A. Protective effects of saffron (*Crocus sativus* L.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Phytotherapy Res* 2003; **17**(6): 614-617.
31. Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R, Bagatini M, Stefanello N, Correa M, et.al. Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. *Brain Res Bull* 2009; **80**(1): 45-51.