



بررسی اثر عصاره گیاه بومادران بر پیامدهای ناشی از سکتة مغزی در موش‌های صحرایی ماده بعد از برداشتن تخمدان‌ها

اسماعیل ایمانی^۱، علی اسماعیلی^۲، راحله علی‌محمدی^۳، وحید احسانی^۴، علی شمس‌زاده^۵، مسعود مبینی^۶، حسین رضازاده^۷، سودابه نادری^۸، محمد اله توکلی^{۹*}

چکیده:

مقدمه: در بررسی‌های گذشته مشخص شده که استروژن یک عامل محافظت‌کننده در برابر سلول‌های مغزی است. در مطالعه حاضر اثر عصاره گیاه بومادران (*Achillea Millefolium*) که دارای استروژن گیاهی است بر پیامدهای ناشی از سکتة مغزی در مدل انسداد دائم شریان مغزی میانی در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده، بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی ماده در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند که شامل: شام، کنترل (اوارکتومی، القاء سکتة)، بومادران (اوارکتومی، گاواژ عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg و ۵۰۰ mg/kg به مدت یک ماه) می‌باشد و بعد از مراحل جراحی، حجم انفارکتوس یک هفته پس از سکتة مغزی، اختلالات حسی حرکتی با آزمون برچسب کاغذی (Sticky test) و اختلالات نورولوژیک با آزمون بدرسون در ۲۴، ۴۸ و یک هفته بعد از القاء سکتة مغزی اندازه‌گیری شد و مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج: عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg حجم انفارکتوس را یک هفته پس از سکتة مغزی نسبت به کنترل کاهش داده است که از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/01$)، همچنین اختلالات حسی حرکتی (Sticky) و نورولوژیک در ۲۴، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از سکتة مغزی کاهش داشت که از نظر آماری معنی‌دار بود. از طرفی عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg حجم انفارکتوس، اختلالات حسی حرکتی و اختلالات نورولوژیک را کاهش داده است اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. نتیجه‌گیری: مصرف خوراکی عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده باعث کاهش معنی‌داری در حجم انفارکتوس، اختلالات حسی حرکتی و اختلالات نورولوژیک بعد از سکتة مغزی در مدل انسداد دائم شریان مغزی میانی داشته است.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی مغزی، گیاه بومادران، اوارکتومی، استروژن، موش

۱،۲،۳،۶،۸ - دانشجوی کارشناس ارشد فیزیولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی-فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۷،۴ - کارشناس ارشد مرکز تحقیقات فیزیولوژی-فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۹،۵ - دانشیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی-فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان، رفسنجان، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۴۸۸۳۴۸۶، پست الکترونیکی: allahtavakoli@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۱

مقدمه

ایسکمی مغزی عبارت است از کاهش میزان متابولیت‌های مغزی در اثر کاهش جریان خون که به کاهش ذخیره اکسیژن و در نتیجه مرگ بافت مغزی یا سکته مغزی منجر می‌شود (۱). امروزه سکته مغزی سومین علت مرگ و میر بعد از بیماری‌های قلبی و سرطان به حساب می‌آید و سالانه میلیون‌ها نفر در سراسر دنیا به این بیماری مبتلا می‌شوند (۲). همچنین انسداد جریان خون در عروق مغزی بزرگ می‌تواند آسیب‌های نورولوژیک دائمی ایجاد کند که اگر به سرعت مدیریت نشود منجر به اختلالات عملکردی شدید و مرگ می‌شوند. در حال حاضر گزینه‌های رایج درمانی برای سکته مغزی محدود است و بسیاری از داروهای امیدبخش در آزمایشات پزشکی به دلیل عوارض جانبی شدید یا محدودیت‌های درمانی شکست خورده است. بنابراین یک استراتژی درمانی ایمن و موثر که بتواند بسیاری از اثرات مضر ایسکمی مغزی شامل: التهاب، آپوپتوز، استرس اکسیداتیو، نکرز و اسیدوز را فوراً کاهش دهد یا حذف کند، مورد نیاز است (۳). برخی عواملی که باعث ایجاد ایسکمی می‌شود عبارتند از: آترواسکلروز، لخته خون، انقباض عروق، آمبولیسم، ضربه به سر، فشارخون پایین، کم خونی داسی شکل، خفگی، تاکی کاردی و برخی از تومورها (۴). علاوه بر این عوامل، جنسیت (مونث و مذکر بودن) هم ممکن است بر مکانیسم سکته مغزی و پاسخ به درمان آن تاثیر به سزایی داشته باشد. خطر سکته مغزی به طور طبیعی با افزایش سن زیاد می‌شود و این امر احتمال ابتلاء زنان به سکته مغزی را افزایش می‌دهد (۵). اگر چه مردان در معرض خطر سکته مغزی قرار دارند، زنان بعد از یائسگی نسبت به مردان هم سن خود در معرض خطر بالاتری در برابر سکته مغزی قرار دارند (۶). بعد از یائسگی، وقوع سکته در زنان در مقایسه با پیش از یائسگی به دلیل پایین بودن سطح هورمون‌های استروئیدی افزایش می‌یابد (۷). نتایج تحقیقات دو دهه اخیر نشان می‌دهد که استروژن آسیب‌های نوروئی را در هر دو جنس کاهش می‌دهد (۸). استروژن با واسطه‌ی مهار مکانیسم‌هایی که منجر به القای آپوپتوز در نورون‌ها می‌شود، دارای اثر محافظت نوروئی

در مغز می‌باشد (۹). استروژن با کاهش عوامل استرس اکسیداتیو مانند اکسیژن فعال (ROS) و تنظیم فعالیت کاسپاز پیش آپوپتوزی باعث حفظ سلول‌های عصبی می‌شود (۱۰، ۱۱). استروژن می‌تواند به طور مستقیم با مسیر MAPK واکنش دهد که این واکنش باعث فعال شدن طیف گسترده‌ای از عوامل دخیل در رونویسی بقای سلول‌های عصبی می‌گردد. همچنین گیرنده استروژن با مسیر سیگنالینگ PI3K نیز می‌تواند واکنش دهد که در نتیجه منجر به فعال شدن پروتئین کیناز AKT می‌شود که AKT نیز به نوبه خود می‌تواند بیان مهار آپوپتوز را تنظیم کند (۱۲). هر چند که درمان با هورمون استروژن برای سلامتی در مرکز توجه قرار گرفته است و زنان یائسه از استروژن استفاده می‌کنند اما استفاده طولانی مدت از استروژن در زنان یائسه خطر آندومتریوز و سرطان سینه را افزایش می‌دهد (۱۳، ۱۴). از طرفی زنان ناچارند حدود یک سوم از زندگی خود را با کاهش یا فقدان استروژن سپری کنند (۱۵، ۱۶). به همین دلیل محققان به دنبال یافتن درمان جایگزین مناسبی برای استروژن در زنان یائسه هستند تا ضمن بهره‌مندی از فواید استروژن از عوارض آن جلوگیری کنند. در این میان، استروژن‌های گیاهی (فیتواستروژن‌ها) کانون توجه مطالعات قرار گرفته است.

فیتواستروژن‌ها غیراستروئیدهای گیاهی می‌باشند که ساختار و عملکرد مشابه استروژن دارند که به گیرنده استروژن در شرایط داخلی و خارجی باند می‌شوند (۱۷، ۱۸). گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) گیاهی با خاصیت فیتواستروژنی می‌باشد (۱۹). بومادران گیاهی از خانواده آستراسه می‌باشد که بوته گسترده است و غالباً به عنوان یک گیاه دارویی در سراسر جهان استفاده می‌شود. گیاه بومادران در درمان بسیاری از بیماری‌ها از قبیل بیماری‌های عفونی، بیماری‌های دستگاه گوارش و همچنین کاهش درد استفاده می‌گردد (۲۰). همچنین این گیاه علف هرز مزارع بوده و به صورت خودرو در دشت‌ها و کنار جاده‌ها و نواحی کوهستانی اروپا و در مناطقی از شمال ایران و ارتفاعات البرز می‌روید. زمان گلدهی گیاه از اواخر اردیبهشت تا

۳- گروه اوارکتومی + بومادران با دوز 50 mg/kg ($n=8$): گروهی که عمل جراحی اوارکتومی روی آن صورت پذیرفت و بعد از گذشت یک هفته به مدت یک ماه با عصاره گیاهی بومادران با دوز 50 mg/kg گاوژ شدند و سپس سکتة مغزی روی آنها القاء گردید و بعد از سکتة تا زمان کشته شدن حیوان (یک هفته پس از سکتة مغزی) تجویز خوراکی دارو ادامه داشت.

۴- گروه اوارکتومی + بومادران 50 mg/kg ($n=8$): در این گروه یک هفته بعد از عمل جراحی اوارکتومی به مدت یک ماه عصاره گیاهی بومادران با دوز 50 mg/kg به حیوانات به صورت گاوژ داده شد و سپس سکتة مغزی روی آنها القاء گردید و بعد از سکتة تا زمان کشته شدن حیوان (یک هفته پس از سکتة مغزی) تجویز خوراکی دارو ادامه داشت.

گیاه بومادران در اواخر خردادماه (فصل گلدهی) از هر بارיום گیاهی اصفهان تهیه شد. سپس سرشاخه‌های گلدار و برگ‌های آن جدا گردید و پس از اینکه کاملاً شسته شد، آنها را در محیط مناسب و در دمای اتاق (25 درجه سانتی‌گراد) خشک گردید، بعد از آسیاب شدن، 200 گرم از پودر گیاه و حلال 250 میلی‌لیتر آب مقطر در دستگاه سوکسله قرار داده و عصاره آبی آن جدا گردید. سپس از عصاره به دست آمده، دوزهای مورد نظر (50 mg/kg و 500 mg/kg) تهیه شد ($20, 22$).

حیوانات با تزریق داخل صفاقی 60 mg/kg کتامین و $7/5 \text{ mg/kg}$ زایلازین (شرکت ایمان و صبا-ایران)، بیهوش و سپس ناحیه شکمی حیوان تراشیده شد. سپس محل جراحی استریل و ناحیه میانی شکم بین دو پستان 2 و 3 شکافته شد و با دستگاه کوتر لوله رحمی سوزانده و تخمدان (بافت فولیکولی قرمز رنگ متصل به لوله اویداکت) به آهستگی جدا و خارج شد، بعد از آن لایه داخلی و خارجی جداگانه بخیه شدند و در آخر 25000 U.i/Kg پنی‌سیلین به عضله ران موش تزریق و حیوان به قفس برگردانده شد (23).

3 روز بعد از اینکه حیوانات اوارکتومی شدند به مدت 6 روز اسمیر واژن از آنها تهیه گردید (به وسیله بالب چند قطره نرمال سالین به واژن موش اضافه شده و آن را خارج نموده و بر روی لام

پایان تیرماه و بهترین زمان برداشت نیمه اول تیرماه است و سرشاخه‌های گلدار گیاه و عصاره روغنی حاصل از گل بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (21). با توجه به اینکه سکتة مغزی در دوران یائسگی بالا بوده و این زنان آسیب‌های مغزی بیشتری نسبت به مردان هم سن خود و زنان قبل از یائسگی متحمل می‌شوند و با توجه به اینکه استفاده طولانی مدت استروژن‌های شیمیایی در زمان یائسگی خطرناکتر بوده و بیماری‌هایی از قبیل سرطان سینه را ایجاد می‌کند، بنابراین راهکاری برای جایگزین کردن استروژن در زمان یائسگی مورد نیاز است. همچنین با توجه به مطالعات گذشته، استروژن‌های گیاهی می‌توانند اثراتی مشابه با استروژن شیمیایی ولی بدون عوارض ناشی از مصرف استروژن داشته باشند، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره گیاه بومادران بر درمان ایسکمی مغزی در مدل انسداد دایم شریان مغزی میانی در موش صحرایی ماده اوارکتومی شده، می‌باشد.

روش بررسی

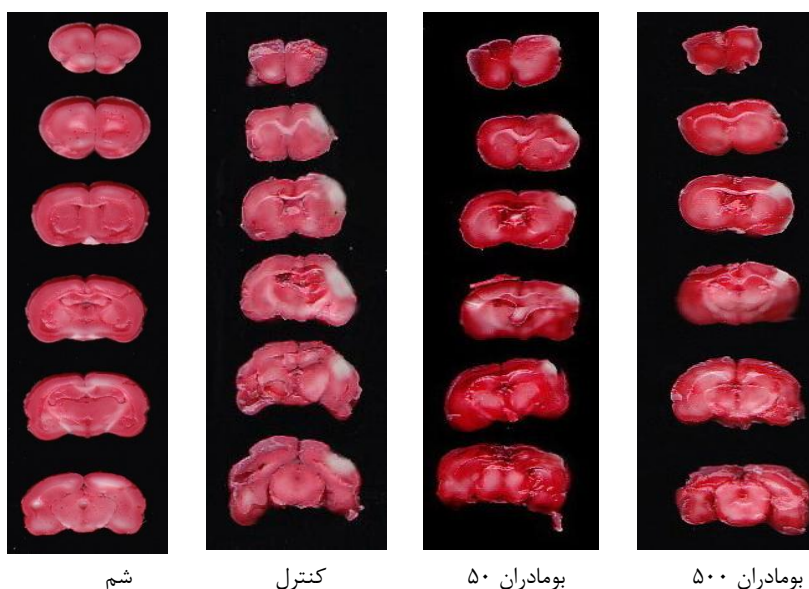
در این مطالعه از 32 سر موش صحرایی ماده در محدوده وزنی 200 تا 250 گرم استفاده شد که حیوانات به طور تصادفی در 4 گروه قرار گرفتند که در هر گروه 8 راس حیوان در نظر گرفته شد و در قفس‌های جدا و در اتاقی تحت شرایطی آرام با حداقل استرس در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی و در دمای 21 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. دسترسی به آب و غذا آزاد بود، کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام مطالعه مذکور را تأیید نمود. گروه‌ها به ترتیب شامل:

۱- گروه شم ($n=8$): تمام مراحل جراحی بدون آسیب به تخمدان‌ها (عدم جراحی اوارکتومی)، عدم گاوژ دارو یا سالین و آسیب نرساندن به شریان مغزی میانی (عدم القاء سکتة مغزی) انجام شد.

۲- گروه کنترل ($n=8$): در این گروه ابتدا موش‌ها اوارکتومی شده و بعد از یک هفته به مدت یک ماه با سالین گاوژ شدند سپس بعد از یک ماه، سکتة مغزی القاء گردید و پس از سکتة تا زمان کشتن حیوان (یک هفته پس از سکتة مغزی) گاوژ سالین ادامه داشت.

جای خود برگردانده شدند و سپس پوست بخیه زده شد (۲۴). حجم انفارکتوس، یک هفته بعد از سکته مغزی تعیین گردید. برای تعیین حجم انفارکتوس پس از خارج کردن مغز، مغز برش داده شد (برش‌های ۲ میلی‌متری کرونال) و با TTC رنگ‌آمیزی گردید. برای این منظور پس از تهیه محلول ۲ درصد تری فنیل تترازولیوم کلراید برش‌های مغز هر حیوان در محلول فوق قرار گرفت و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، TTC با آنزیم‌های دهیدروژناز داخل سلول‌های زنده واکنش نشان داده و به رنگ قرمز درآمده، اما نوروهای مرده تغییر رنگ ندادند (به دلیل نبودن دهیدروژنازها) پس از اینکه برش‌ها با فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند، از آنها توسط اسکنر تصویربرداری گردید و با یک نرم افزار پردازشگر تصویر اندازه‌گیری شد (شکل ۱). سطوح به دست آمده از هر برش در ضخامت آن ضرب شد و از مجموع ۶ برش حجم نیمکره چپ و راست، حجم انفارکتوس با فرمول [حجم نیمکره راست - (حجم نیمکره چپ - حجم انفارکتوس اندازه‌گیری شده با TTC)] × ۱۰۰ / حجم نیمکره راست محاسبه شد (۲۵، ۲۶).

قرار داده و آن را به حالت اسمیر پخش نموده و زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد) در این مشاهده طرح سرخسی ظاهر نشد و عدم وجود آن صحت جراحی اوارکتومی را تعیین کرد (۲۳). برای ایجاد سکته مغزی، پس از بیهوش کردن حیوان با کتامین، حیوان به پهلو قرار داده شد و یک برش مورب عمودی ۲ سانتی‌متری در پوست ناحیه وسط اوربیت چپ و کانال شنوایی خارجی زده شد. مراحل بعدی با تکنیک‌های جراحی انجام گرفته شد، بدین ترتیب که پوست اطراف شکاف کنار زده شد و غده پاروتید در یک چهارم پشتی-تحتانی میدان دید نمایان شد، منبع عروقی سوزانده شد و در قطب قدامی-فوقانی خود تقسیم شده و غده را به جهت پشتی حرکت داده شد، سپس یک برش در اطراف لبه‌های فوقانی و پشتی عضله تمپورالیس زده شد و با یک بالا برنده عضله از سمت کناری مجموعه کنار زده شد و به سمت جلو برگردانده شد. بخش اصلی عضله سپس با یک برش عمودی رو به لبه قدامی آن و از ناحیه اتصال آن به نوک زائده کورونوئیدی بریده شد. این استخوان نیمه پشتی استخوان گونه برداشته شد و شریان مغزی میانی اکسیپوز کرده و سوزانده شد و بافت‌های نرم به سمت عقب به



شکل ۱: رنگ آمیزی مغز با تترازولیوم کلراید (TTC)

قرار گردید و نمره داده شد که شامل، عدم هرگونه اختلالی (نمره ۰)، اگر اندام جلویی حیوان خم شود (نمره ۱)، اگر اندام

اختلالات نورولوژیک با سیستم رتبه‌بندی بدرسون در ساعات ۲۴، ۴۸ و یک هفته بعد از سکته مغزی مورد بررسی

حرکتی با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه و پس آزمون Tukey مقایسه شدند و به صورت Mean±SEM گزارش شدند و همچنین اختلالات نورولوژیک با آزمون نان پارامتریک Kruskal-Wallis مقایسه گردیده و به صورت میانه و صدک‌های ۲۵th و ۷۵th گزارش شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شدند.

نتایج

میانگین حجم انفارکتوس در گروه کنترل و گروه بومادران با دوز ۵۰۰mg/kg و ۵۰mg/kg به ترتیب ۱۲/۰۰±۲/۰۷۵ و ۹/۰۳۴±۱/۰۰ و ۵/۰۰±۱/۰۸۷ بود که حجم انفارکتوس در گروه بومادران با دوز ۰/۱۴mg/kg یک کاهش تقریباً ۵۸/۳۳٪ ایجاد کرد، به عبارت دیگر بومادران با دوز ۵۰۰mg/kg حجم انفارکتوس را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد (p<۰/۰۱)، و نسبت به گروه بومادران با دوز ۵۰mg/kg کاهش داشت اما از نظر آماری معنی‌دار نبود. عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰mg/kg حجم انفارکتوس را در مقایسه با گروه کنترل به میزان ۲۴/۷۱٪ کاهش داده است اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. چون گروه شم سالم می‌باشد پس هیچ گونه حجم انفارکتوسی در آن‌ها مشاهده نشد (جدول ۱).

جلویی حیوان خم شود به اضافه این‌که در هل دادن جانبی مقاومت آن کاهش پیدا کند (نمره ۲)، اگر به یک طرف بچرخد (نمره ۳) اگر به یک طرف بچرخد به اضافه این‌که سطح هوشیاری حیوان کاهش پیدا کند (نمره ۴) اگر حیوان هوشیاری و تحرک نداشته باشد و یا بمیرد (نمره ۵) (۲۷). با آزمون رفتاری شامل چسباندن برچسب کاغذی (به شعاع ۰/۵ میلی‌متر) به دست حیوان (دستی که مخالف ناحیه‌ای است که ایسکمی رخ داده) در ساعات ۲۴، ۴۸ و یک هفته بعد از سکتة مغزی اختلالات حسی- حرکتی اندازه‌گیری گردید. برای این منظور طی ۳ روز قبل از القای سکتة مغزی به مدت ۲ بار در روز به حیوانات آموزش داده شد و ۲۴ و ۴۸ ساعت و یک هفته پس از ایجاد سکتة مغزی مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون برچسب کاغذی چسبانده شد به کف دست راست (طرف مقابل نیمکره‌ای که آسیب دیده) و مدت زمانی که طول کشید تا حیوان برچسب را لمس نموده و جدا نماید، به عنوان میزان فعالیت حسی- حرکتی در نظر گرفته شد که هر چه مدت زمان لازم برای جدا کردن برچسب بیشتر باشد اختلال حسی حرکتی بیشتر است (۲۵، ۲۶). داده‌ها از با استفاده از نرم‌افزار Excell و SPSS نسخه ۱۲ تجزیه و تحلیل و اختلافات حجم انفارکتوس و اختلال حسی

جدول ۱: بررسی اثر عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰mg/kg و ۵۰mg/kg بر حجم انفارکتوس پس از ایجاد سکتة مغزی.

انحراف معیار (SEM)	میانگین حجم انفارکتوس (درصد)	
۰	۰	گروه شم
۲/۰۷۵	۱۲	کنترل
۱	۹/۰۳۴	بومادران ۵۰
۱/۰۸۷	** ۵	بومادران ۵۰۰

** (P<۰/۰۱)

معنی‌دار نبود.

در گروه درمان با عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰mg/kg نیز در ۲۴ و ۴۸ و یک هفته پس از ایجاد سکتة مغزی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نشان نداد (جدول ۲).

عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰mg/kg اختلالات نورولوژیک را در ۲۴ و ۴۸ ساعت (p<۰/۰۰۱) و یک هفته (p<۰/۰۱) بعد از القاء سکتة مغزی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش داد و نسبت به گروه بومادران با دوز ۵۰ mg/kg کاهش داشت اما این کاهش از لحاظ آماری

جدول ۲: اختلالات نورولوژیک توسط سیستم نمره‌دهی بدرسون در ۲۴ و ۴۸ ساعت و یک هفته بعد از القاء سکته مغزی

شماره	بومادران ۷۵	بومادران ۵۰	بومادران ۲۵	شماره
میان‌بند (صدک ۷۵-۲۵)	میان‌بند (صدک ۷۵-۲۵)	میان‌بند (صدک ۷۵-۲۵)	میان‌بند (صدک ۷۵-۲۵)	
۲۴ ساعت	۰-۰	۱/۵-۲	۲-۳	۰-۰
۴۸ ساعت	۰-۰	۱-۲	۲-۲	۰-۰
یک هفته	۰-۰	۱/۲۵-۲/۷۵	۳-۴	۰-۰

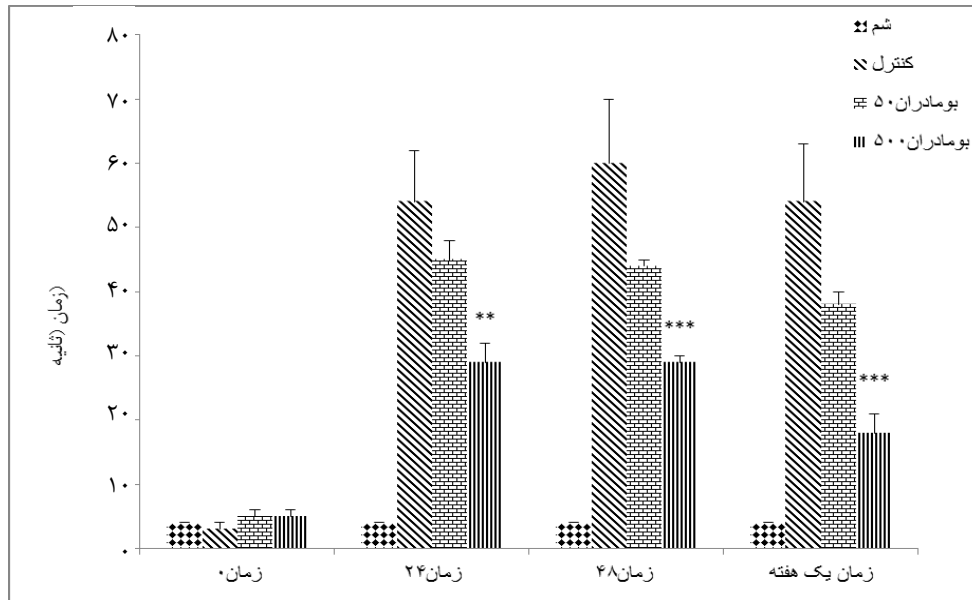
** (P<۰/۰۱), *** (P<۰/۰۰۱)

۱۸/۰۰±۳/۰۰ ثانیه بود.

در گروه درمان با عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg در ۲۴، ۴۸ ساعت و یک هفته بعد از سکته مغزی اختلالات حسی حرکتی کمتر از گروه کنترل بود (p<۰/۰۱)، (p<۰/۰۰۱) و (p<۰/۰۱) که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود، ولی نسبت به گروه بومادران با دوز ۵۰ mg/kg کاهش معنی‌داری از لحاظ آماری وجود نداشت.

در گروه درمان با عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد (نمودار ۱).

اثر عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg، ۵۰ mg/kg بر اختلالات حسی حرکتی: مدت زمان لمس و جدا کردن برچسب کاغذی در گروه کنترل در ۲۴، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از ایجاد سکته مغزی به ترتیب: ۵۴/۰۰±۸/۰۰، ۶۰/۰۰±۱۰/۰۰ و ۵۴/۰۰±۹/۰۰ ثانیه بود. در گروه درمان با عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰ mg/kg در ۲۴، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از سکته مغزی به ترتیب: ۴۵/۰۰±۳/۱۲، ۴۴/۰۰±۱/۰۰ و ۳۸/۰۰±۲/۰۰ ثانیه بود. و در گروه درمان با عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg در ۲۴، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از سکته مغزی به ترتیب: ۲۹/۰۰±۳/۰۰ و ۲۹/۰۰±۱/۰۰ و



نمودار ۱: اثر عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg بر آزمون رفتاری برچسب کاغذی بعد از سکته مغزی

** اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۱)

*** اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)

بحث و نتیجه گیری

بیماری‌های ایسکمیک مغزی از جمله بیماری‌هایی هستند که تقریباً در تمامی کشورهای جهان، به ویژه در افراد مسن از شیوع بالایی برخوردارند (۲۸) و در مطالعاتی که در گذشته انجام شده، مشخص شده که خطر سکته مغزی در زنان بعد از یائسگی نسبت به مردان هم سن خود بیشتر می‌باشد (۲۹) در این میان استروژن می‌تواند به عنوان یکی از عوامل محافظت کننده از نوروژن‌ها عمل کند (۳۰) اما استفاده از رژیم درمانی مرسوم (استروژن صناعی) بعد از دوران یائسگی، حوادث قلبی عروقی، سرطان سینه و آندومتر، تهوع و سر درد را افزایش می‌دهد (۳۱،۳۲).

فیتواستروژن‌ها ترکیباتی هستند که در بسیاری از گیاهان وجود دارند و از خود خواص استروژنی نشان می‌دهند (۳۳) فیتواستروژن‌ها بر روی گیرنده‌های آلفا و بتا استروژنی تأثیرگذارند (۳۴). عملکرد این مواد شیمیایی گیاهی در پیوند با گیرنده‌های استروژن در سلول‌های بدن انسان آن‌چنان شبیه هورمون‌های طبیعی است که باید آن را یکی از ترفندهای تکامل بشر در بهره‌گیری از طبیعت دانست (۳۵،۳۶).

Burguete و همکاران دریافتند که رژیم غذایی حاوی ایزوفلاوون بالا در ایسکمی مغزی مدل فوکال دارای اهمیت است که باعث کاهش حجم انفارکتوس و وضعیت بهتر عصبی می‌شود (۳۷) بعد از آن Ma و همکاران نشان دادند که رژیم غذایی سویا اثر محافظت نوروژنی در ایسکمی مغزی فوکال در رت‌های نر و ماده اوارکتومی شده دارد و نیز مشخص کردند که این ایزوفلاون‌ها برای مغز در برابر افزایش مکانیسم آنتی‌اکسیدان نقش محافظت نوروژنی داشته و فشار استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد (۳۸). در مطالعه Castillo_Ruiz و همکاران مشخص شد، رژیم غذایی سویا حجم سکته مغزی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (۳۴). در مطالعه‌ای که Candan و همکاران انجام دادند، دریافتند که عصاره گیاه بومادران دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی است (۳۹) و بعد از آن در مطالعاتی که توسط Benedek و همکارش انجام شد، نشان داده شد که عصاره گیاه بومادران در

محیط آزمایشگاه باعث کاهش بیان دو آنزیم Matrix Metalloproteinase 2 و Matrix Metalloproteinase 9 می‌شود (۴۰) و Innocenti و همکاران در مطالعه‌ای دریافتند که گیاه بومادران دارای ترکیبات apigenin و luteolin است که apigenin می‌تواند مسیرهای وابسته به گیرنده استروژن را تحریک کند، apigenin سبب تحریک هر دو گیرنده آلفا و بتای استروژن شده ولی luteolin اثر کمتری روی گیرنده بتا داشته و هیچ اثری روی گیرنده آلفا ندارد (۱۹).

در مطالعه حاضر به بررسی اثر عصاره گیاه بومادران بر درمان ایسکمی مغزی در مدل سکته مغزی ایجاد شده با بستن دایم شریان مغزی میانی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده به منظور کاهش عوارض سکته مغزی و بهبود اختلالات نورولوژیک و اختلالات حسی حرکتی بعد از سکته مغزی پرداخته شد.

مطالعاتی که در گذشته انجام شده، اثرات محافظت نوروژنی استروژن و فیتواستروژن بر انواع سکته مغزی دایم و گذرا را مشخص کرده است (۴۱،۴۲) ولی اثرات عصاره گیاه بومادران که دارای خاصیت شبه استروژنی است بر روی موش‌های صحرایی اوارکتومی شده، مورد بررسی قرار نگرفته است.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که موش‌های صحرایی اوارکتومی شده‌ای که به مدت ۴ هفته عصاره گیاه بومادران با دوز ۵۰۰ mg/kg به صورت گاواژ دریافت کرده بودند و بعد از آن سکته مغزی روی آن‌ها القاء شده بود، حجم انفارکتوس‌شان در یک هفته بعد از سکته مغزی به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که استفاده از رژیم غذایی سویا که دارای ترکیبات شبه استروژنی است اثر محافظت نوروژنی در ایسکمی مغزی دارد و حجم سکته مغزی را کاهش می‌دهد (۳۴،۳۸،۴۳) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

یکی دیگر از کارهایی که در این تحقیق انجام شد، بررسی اثر عصاره گیاه بومادران بر اختلالات نورولوژیک بوجود آمده متعاقب سکته مغزی بود، که در این تحقیق اختلالات

در مطالعه حاضر مشخص شد، عصاره گیاه بومادران توانایی کاهش حجم انفارکتوس اختلالات حسی حرکتی و نورولوژیک را در سکته مغزی مدل انسداد دائم شریان مغزی میانی دارد. بنابراین با توجه به وجود ترکیبات فیتواستروژنی گیاه بومادران که احتمالاً به گیرنده‌های استروژنی وصل می‌شوند و نیز خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی آن، عصاره‌ی این گیاه باعث کاهش حجم انفارکتوس شده و در نتیجه باعث کاهش اختلالات حسی حرکتی و اختلالات نورولوژیک بعد از سکته مغزی می‌شود.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل کار تحقیقاتی مصوب به تاریخ ۱۳۹۳/۴/۳ معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان می‌باشد. بدین وسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به جهت تأمین هزینه‌های مالی این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

نورولوژیک توسط سیستم رتبه بندی بدرسون در ساعات ۲۴، ۴۸ و یک هفته بعد از ایسکمی سنجیده شد که میزان اختلالات نورولوژیک در گروه درمان (بومادران با دوز ۵۰۰mg/kg) نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود. در بررسی‌های گذشته، مشخص شده که بعد از ایسکمی مغزی اختلالات نورولوژیک ایجاد می‌شود در نتیجه این بررسی‌ها نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند (۴۴،۴۵).

مدت زمان لمس و برداشتن برچسب کاغذی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. حیواناتی که در گروه درمان (بومادران با دوز ۵۰۰mg/kg) قرار داشتند، زمان کمتری برای لمس و برداشتن برچسب کاغذی از کف دستشان صرف کردند. بررسی‌های زیادی در رابطه با این موضوع که زمان لمس و جدا کردن برچسب کاغذی پس از سکته مغزی افزایش می‌یابد، انجام شده است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۴۶،۴۷).

References:

- 1- Johansson BB. *Current trends in stroke rehabilitation. a review with focus on brain plasticity*. Acta Neurol Scand 2011;123(3):147-59.
- 2- Selvamani A, Sohrabji F. *The neurotoxic effects of estrogen on ischemic stroke in older female rats is associated with age-dependent loss of insulin-like growth factor-1*. J Neurosci 2010;30(20):6852-61.
- 3- Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Stein DG. *Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats*. Brain Res 2009;1257:94-101.
- 4- Hadjinikolaou L, Kotidis K, Galiñanes M. *Relationship between reduced elasticity of extracardiac vessels and left main stem coronary artery disease*. Eur Heart J 2004; 25(6): 508-13.
- 5- Chinwatanakul S, Boonyapisit K, Pornsriniyom D, Proyoonwivat N, Senanarong V, Chaisevikul R, et al. *Siriraj Acute Stroke Unit: 10 years experience*. J Med Assoc Thai 2012; 95(Suppl 2): S235-44.
- 6- Bushnell CD. *Stroke in women: risk and prevention throughout the lifespan*. Neurol Clin 2008;26(4):1161-76.
- 7- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. *Neuroprotection by estradiol*. Prog Neurobiol 2001; 63(1): 29-60.
- 8- Wise PM. *Estrogens and neuroprotection*. Trends Endocrinol Metab 2002; 13(6): 229-30.
- 9- Luine V. *Sex steroids and cognitive function*. J Neuroendocrinol 2008; 20(6): 866-72.
- 10- Bao YJ, Li LZ, Li XG, Wang YJ. *17 Beta-estradiol differentially protects cortical pericontusional zone from*

- programmed cell death after traumatic cerebral contusion at distinct stages via non-genomic and genomic pathways.* Mol Cell Neurosci 2011; 48(3): 185-94.
- 11- Numakawa T, Matsumoto T, Numakawa Y, Richards M, Yamawaki S, Kunugi H. *Protective action of neurotrophic factors and estrogen against oxidative stress-mediated neurodegeneration.* J Toxicol 2011; 2011.
- 12- Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, et al. *Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain.* J Steroid Biochem Mol Biol 2008; 108(3-5): 327-38.
- 13- Barnabei VM, Cochrane BB, Aragaki AK, Nygaard I, Williams RS, McGovern PG, et al. *Menopausal symptoms and treatment-related effects of estrogen and progesterin in the women's health initiative.* Obstetrics & Gynecology 2005; 105(5, Part 1): 1063-73.
- 14- Hammond C. *Women's concerns with hormone replacement therapy--compliance issues.* Fertility and sterility 1994; 62(6 Suppl 2): 157S-60S.
- 15- Blümel JEM, Castelo-Branco C, Cancelo MaJ, Córdova AT, Binfa LE, Bonilla HG, et al. *Relationship between psychological complaints and vasomotor symptoms during climacteric.* Maturitas 2004; 49(3): 205-10.
- 16- Emerton K, Hu B, Woo A, Sinofsky A, Hernandez C, Majeska R, et al. *Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice.* Bone 2010; 46(3): 577-83.
- 17- Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. *Phyto-oestrogens.* Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2003; 17(2): 253-71.
- 18- Welshons WV, Rottinghaus GE, Nonneman DJ, Dolan-Timpe M, Ross PF. *A sensitive bioassay for detection of dietary estrogens in animal feeds.* J Vet Diagn Invest 1990; 2(4): 268-73.
- 19- Innocenti G, Vegeto E, Dall'Acqua S, Ciana P, Giorgetti M, Agradi E, et al. *In vitro estrogenic activity of Achillea millefolium L.* Phytomedicine 2007; 14(2-3): 147-52.
- 20- Vazirinejad R, Ayoobi F, Arababadi M, Eftekharian M, Darekordi A, Goudarzvand M, et al. *Effect of aqueous extract of Achillea millefolium on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice.* Indian J Pharmacol 2014; 46(3): 303.
- 21- Guo YP, Saukel J, Mittermayr R, Ehrendorfer F. *AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of Achillea (Asteraceae-Anthemidae).* New Phytologist 2005; 166(1): 273-89.
- 22- Ayoobi F, Roohbakhsh A, Allahtavakoli M, Vazirinejad R, Rajabi S, Shamsizadeh A. *Achillea millefolium Aqueous Extract does not Impair Recognition Memory in Mice.* Tropic J Pharmaceutical Res 2013; 12(2): 209-13.
- 23- Li H, Li SL, Wu ZH, Gong L, Wang JL, Li YZ. *Effect of traditional Chinese herbal Bu-Wang-San on synaptic plasticity in ovariectomised rats.* J Pharm Pharmacol 2009; 61(1): 95-101.

- 24- Bogaert-Buchmann A, Poittevin M, Po C, Dupont D, Sebricé C, Tomita Y, et al. *Spatial and Temporal MRI Profile of Ischemic Tissue after the Acute Stages of a Permanent Mouse Model of Stroke*. Open Neuroimag J 2013;7: 4-14.
- 25- Ren C, Gao X, Niu G, Yan Z, Chen X, Zhao H. *Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats*. PloS One 2008; 3(12): e3851.
- 26- Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Liu X, et al. *Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat*. Stroke 2008; 39(8): 2362-9.
- 27- Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. *Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats*. J Cereb Blood Flow Metab 2006; 26(9): 1114-21.
- 28- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. *Potential markers of oxidative stress in stroke*. Free Radic Biol Med 2005; 39(7): 841-52.
- 29- Alkayed NJ, Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD, Miller VM. *Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats*. Stroke 2000; 31(1): 161-8.
- 30- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell 1997; 91(2): 231-41.
- 31- Lipovac M, Chedraui P, Gruenhut C, Gocan A, Stammmler M, Imhof M. *Improvement of postmenopausal depressive and anxiety symptoms after treatment with isoflavones derived from red clover extracts*. Maturitas. 2010; 65(3): 258-61.
- 32- Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D. *The effect of dietary soy supplementation on hot flushes*. Obstet Gynecol 1998; 91(1): 6-11.
- 33- Breinholt V, Hossaini A, Svendsen GW, Brouwer C, Nielsen E. *Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution, metabolism and bioavailability*. Food Chem Toxicol 2000; 38(7): 555-64.
- 34- Castelló-Ruiz M, Torregrosa G, Burguete M, Salom J, Gil J, Miranda F, et al. *Soy-derived phytoestrogens as preventive and acute neuroprotectors in experimental ischemic stroke: influence of rat strain*. Phytomedicine. 2011; 18(6): 513-15.
- 35- Tamaya T. *Phytoestrogens and reproductive biology*. Reprodu Med Biol 2005; 4: 225-9.
- 36- Crouse JR, Morgan T, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL. *A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins*. Arch Intern Med 1999; 159(17): 2070-6.
- 37- Burguete MC, Torregrosa G, Pérez-Asensio FJ, Castelló-Ruiz M, Salom Gil JB, Juan B, et al. *Dietary phytoestrogens improve stroke outcome after transient focal cerebral ischemia in rats*. Eur J Neurosci 2006; 23(3): 703-10.

- 38- Ma Y, Sullivan JC, Schreihof DA. *Dietary genistein and equol (4', 7 isoflavandiol) reduce oxidative stress and protect rats against focal cerebral ischemia.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2010; 299(3): R871-R7.
- 39- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, et al. *Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp millefolium Afan.(Asteraceae).* J Ethnopharmacol 2003; 87(2-3): 215-20.
- 40- Benedek B, Kopp B. *Achillea millefolium L. sl revisited: recent findings confirm the traditional use.* Wien Med Wochenschr 2007; 157(13-14): 312-4.
- 41- Lovekamp-Swan T, Glendenning ML, Schreihof DA. *A high soy diet reduces programmed cell death and enhances bcl-x sub L sub expression in experimental stroke.* Neuroscience 2007; 148(3): 644-52.
- 42- Selvamani A, Sohrabji F. *Reproductive age modulates the impact of focal ischemia on the forebrain as well as the effects of estrogen treatment in female rats.* Neurobiol Aging 2010; 31(9): 1618-28.
- 43- Qian Y, Guan T, Huang M, Cao L, Li Y, Cheng H, et al. *Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF-κB activation in a cerebral ischemia mouse model.* Neurochem Int 2012; 60(8): 759-67.
- 44- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. *Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats.* Stroke 1986; 17(6): 1304-8.
- 45- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. *Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats.* Stroke 1989; 20(1): 84-91.
- 46- Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, et al. *Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin.* Neuroscience 2004; 124(3): 583-91.
- 47- Sicard KM, Henninger N, Fisher M, Duong TQ, Ferris CF. *Long-term changes of functional mri-based brain function, behavioral status, and histopathology after transient focal cerebral ischemia in rats.* Stroke 2006; 37(10): 2593-600.

Effects of Achillea.millefolium on the Consequences of Stroke in Ovariectomized Rats

*Imani E(MSc Student)¹, Esmaili A(MSc Student)², Alimohammadi R(MSc Student)³, Ehsani V(MSc)⁴, Shamsizadeh A(PhD)⁵, Mobini M(MSc Student)⁶, Rezazadeh H(MSc)⁷, Naderi S(MSc Student)⁸, Tavakoli M(PhD)*⁹*

¹⁻⁹Department of Physiology-Pharmacology, Physiology-Pharmacology Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Received: 17 Jun 2014

Accepted: 13 Nov 2014

Abstract

Introduction: Previous studies indicated estrogen as a protective factor in brain cells. In this study, effect of Yarrow extract (*Achillea millefolium*), containing a phytoestrogen, were examined on the consequences of stroke in the middle cerebral artery occlusion model in ovariectomized female rats.

Methods: In the present study, 32 female Wistar rats weighing 200 to 250 g were randomly divided into 4 groups which included: sham, control(ovariectomized- stroke induced), yarrow(ovariectomized, gavage *Achillea millefolium* extract dose 500mg/kg and 50mg/kg for a month was given orally to animals). After surgery, infarction volume was measured a week after stroke. Moreover, sensorimotor disorder using paper labels(Sticky test) and neurological disorder via Bederson test at 24, 48 h, and a week after induction of stroke were tested and compared.

Results: The results of the current study demonstrated that *Achillea millefolium* extract with 500 mg/kg dose significantly reduced infarction volume a week after stroke ($p<0/01$), and sensorimotor disorder (sticky) at 24, 48 hours and a week after stroke, respectively. Furthermore, neurological disorders reduced at 24 and 48 hours ($p<0/001$) and week ($p<0/01$) after stroke compared to the control groups. On the other hand, *Achillea millefolium* extract with 500 mg/kg dose reduced infarct volume, neurological and sensorimotor disorders, though this reduction was not statistically significant.

Conclusion: The study findings revealed that oral administration of *Achillea millefolium* extract with dose of 500mg/kg in ovariectomized female rats caused a significant reduction in infarct volume, neurological disorders and sensorimotor disorder after middle cerebral artery occlusion.

Keywords: *Achillea millefolium*; Cerebral ischemia; Estrogen; Ovariectomy; Rat

This paper should be cited as:

Imani E, Esmaili A, Alimohammadi R, Ehsani V, Shamsizadeh A, Mobini M, Rezazadeh H, Naderi S, Tavakoli M. *Effects of achillea.millefolium on the consequences of stroke in ovariectomized rats*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 22(6): 1725-36.

***Corresponding author: Tel: +98 9134883486, Email: allahtavakoli@gmail.com**