

اثر عصاره هیدروالکلی گیاه پنج انگشت (*vitex agnus custes*) بر پیامد سکنه مغزی در موش های سوری اوارکتومی شده

راحله علی محمدی (MSc)، سودابه نادری (MSc)، اسماعیل ایمانی (MSc)، علی شمسی زاده (PhD)، مسعود مبینی (MSc)، حسین رضازاده (MSc)، فاطمه امین (MSc)، محمد الله توکلی (PhD)*

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دریافت: ۹۳/۴/۲، اصلاح: ۹۳/۷/۲، پذیرش: ۹۳/۹/۵

خلاصه

سابقه و هدف: شیوع سکنه مغزی در زنان قبل از یائسگی کمتر از مردان است که استروژن به عنوان یک عامل محافظ نورونی قوی در ایسکمی مغزی در سال های پیش از یائسگی شناخته شده است. فیتواستروژن ها خطرات کمتری نسبت به استروژن های شیمیایی دارند. از آنجائیکه گیاه پنج انگشت (*vitex agnus custes*) دارای خاصیت فیتواستروژنی می باشد در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر پیامد سکنه مغزی در مدل انسداد دائم شریان مغزی میانی در موش های سوری اوارکتومی شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش سوری ماده در محدوده وزنی ۲۵ تا ۳۵ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه (۸ تایی) شم، کنترل (اوارکتومی، یک ماه گاوژ سالین بادوز ۱ ml/kg و سپس القاء سکنه)، عصاره گیاه (اوارکتومی، گاوژ عصاره گیاه پنج انگشت با دوز ۸۰ mg/kg (در یک میلی لیتر سالین) به مدت یک ماه هر روز) و گروه استروژن (اوارکتومی، گاوژ استرادیول والرات ۴۰ μg/kg (در یک میلی لیتر سالین) به مدت یک ماه هر روز) تقسیم شدند. حیوانات اوارکتومی شده و بعد از گذشت یک ماه سکنه مغزی به وسیله سوزاندن شریان مغزی میانی القاء شد. حجم انفارکتوس و اختلالات نورولوژیک یک هفته بعد از القاء سکنه مغزی اندازه گیری شد. **یافته ها:** حجم سکنه در گروه کنترل، استروژن و عصاره گیاه پنج انگشت در یک هفته پس از ایجاد سکنه مغزی به ترتیب ۱۱/۹۸±۲/۳۳، ۱۱/۰۱±۳/۴۱ و ۵±۱/۱۰ درصد بود. هر دو عصاره گیاه پنج انگشت و استروژن، حجم سکنه مغزی را نسبت به گروه کنترل کاهش دادند ($p<0/05$). همچنین عصاره گیاه و استروژن اختلالات نورولوژیک را نسبت به گروه کنترل کاهش دادند ($p<0/001$). اختلالات حسی حرکتی در گروه های کنترل، استروژن و عصاره گیاه پنج انگشت در یک هفته بعد از سکنه مغزی به ترتیب برابر با ۵۰±۷، ۱۵±۲ و ۲۱±۴/۰۹ بود و یک اختلاف معنی داری را بین گروه کنترل و دیگر گروه ها نشان داد ($p<0/001$). **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که عصاره گیاه پنج انگشت مشابه با استروژن اثرات محافظت نورونی را به دنبال انسداد دائم شریان مغزی میانی در موش های سوری اوارکتومی شده دارد.

واژه های کلیدی: گیاه پنج انگشت، اوارکتومی، شریان مغزی میانی، سکنه مغزی مدل دائم، عصاره گیری.

مقدمه

مکانیسم سکنه و پاسخ به درمان آن تاثیر بسزایی داشته باشد (۳). به طوریکه خطر سکنه مغزی در زنان پیش از یائسگی نسبت به مردان هم سن خود کمتر است (۴). اما بروز حوادث عروق مغزی در زنان بعد از یائسگی، به سرعت افزایش می یابد (۵). مطالعات نشان داده اند که کاهش استروژن توسط عوامل مختلف مانند مداخله جراحی (اوارکتومی)، عوامل فارماکولوژیکی (آنتاگونیست های گیرنده های استروژن) یا پیری (پیری باروری) باعث حذف این اثر محافظتی در زنان می شود (۶ و ۷). علاوه بر این استروژن در دو دهه اخیر به عنوان یک عامل

سکنه مغزی سومین علت مرگ و میر و اولین عامل ناتوانی بزرگسالان در جهان می باشد (۱). سکنه یک انسداد جریان خون در عروق مغزی بزرگ است که می تواند آسیب های نورولوژیک دائم ایجاد کند، که اگر به سرعت مدیریت نشود اختلالات عملکردی شدید و مرگ ایجاد می کند (۲). سکنه مغزی در انسان ها در نتیجه عواملی از قبیل دیابت، فشار خون، سن بالا، بیماری های قلبی (مثل فیبریلاسیون دهلیزی) و استفاده مداوم برخی از داروها بوجود می آید. علاوه بر عوامل ذکر شده، اختلاف جنسیت (مونث و مذکر بودن) هم ممکن است بر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹/۲۳۳۰ دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمد الله توکلی

آدرس: رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی. تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۳۴۰۰۳

مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام و تلاش در جهت کاهش سطح درد و استرس و نیز تعداد جانوران مطالعه انجام شد.

گروه بندی حیوانات:

- ۱- گروه کنترل: اوارکتومی + گاواژ سالیان با دوز ۱ ml/kg به مدت ۴ هفته + سکنه (به روش دائمی)
 - ۲- اوارکتومی + گاواژ عصاره گیاه پنج انگشت (vitex) با دوز ۸۰ mg/kg (در یک میلی لیتر سالیان) به مدت ۴ هفته + سکنه (به روش دائمی)
 - ۳- اوارکتومی + گاواژ آگونیست استروژن (استرادیول والترات) با دوز ۴۰ μg/kg (در یک میلی لیتر سالیان) به مدت ۴ هفته + سکنه (به روش دائمی) (۱۴).
 - ۴- گروه شم: در این گروه موش ها اوارکتومی شدند و پس از ۴ هفته تمام مراحل جراحی سکنه مغزی انجام شد. ولی شریان مغزی میانی سوزانده نشد و در نتیجه سکنه مغزی القاء نشد و فقط موش ها تحت استرس جراحی قرار گرفتند. لازم به یاد آوری است که در گروه شم، موش ها هیچ یک از عوارض ناشی از القاء سکنه مغزی از قبیل انفارکتوس، اختلالات نورولوژیک و اختلالات حسی حرکتی را نشان ندادند و به عبارت دیگر سالم بودند.
- داروها:** داروهای مورد استفاده شامل عصاره آبی الکلی گیاه پنج انگشت (مورد تایید کارشناسان هرباریوم اصفهان)، استرادیول والرات (تولید شده شرکت داروسازی ابوریحان ایران) و تاموکسیفن (تولید شده شرکت داروسازی ایران آلفا) بودند.

روش تهیه عصاره گیری: این گیاه در اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ در استان اصفهان شهرستان خورو بیابانک، روستای بازیاب، در ارتفاع ۱۳۵۰ متری از سطح دریا جمع آوری و توسط کارشناسان هرباریوم مرکزی اصفهان مورد تأیید قرار گرفت (شماره ثبت ۹۲۵۲). میوه خشک گیاه آسیاب شد، ۵۰۰ گرم از آن با اتانول ۵۰ درصد در دستگاه سوکسله عصاره گیری شد و سپس با دستگاه روتاری تبخیر حلال انجام گرفت و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در آن خشک شد. در پایان، از پودر حاصله دوز های مورد نظر در نرمال سالیان تهیه گردید (۱۴).

روش ایجاد اوارکتومی (القاء یائسگی): ابتدا موش را وزن کرده و ۹۰ mg/kg داروی بیهوشی کتامین سولفات به همراه ۴/۵ mg/kg دارو زایلازین به صورت داخل صفاقی تزریق کرده و بعد از بیهوشی کامل، ناحیه شکمی حیوان تراشیده شد. سپس محل جراحی با بتادین استریل و طرفین بخش شکمی بین پستان های ۲ و ۳ کنار عضله ران موش شکاف داده شد. بعد از مشاهده تخمدانها، با دستگاه کوتر لوله رحمی را سوزانده و تخمدان (بافت فولیکولی و قرمز رنگ متصل به لوله اویداکت) به آهستگی جدا کرده و خارج شد. بعد از آن لایه های داخلی و خارجی پوست جداگانه بخیه و در آخر ۲۲۰۰۰ μ.i/kg پنی سیلین به عضله ران موش تزریق گردید و حیوان به قفس بر گردانده شد تا به هوش آید (۱۹ و ۱۸).

روش ارزیابی صحت انجام اوارکتومی: بعد از گذشت ۳ روز از جراحی به مدت ۶ روز اسمیر واژن حیوان را گرفته (بوسیله بالب چند قطره نرمال سالیان به واژن موش اضافه کرده و آن را خارج نموده و بر روی لام قرار داده به حالت اسمیر آن را پخش و بوسیله میکروسکوپ را مشاهده شد) در صورت مشاهده نشدن طرح سرخسی جراحی اوارکتومی صحیح انجام شد (۸).

روش ایجاد سکنه مغزی: برای ایجاد سکنه مغزی، پس از بیهوش کردن حیوان با تزریق داخل صفاقی داروی کتامین سولفات (۹۰ mg/kg) به همراه ۴/۵ mg/kg دارو زایلازین، حیوان به پهلو قرار داده شد و یک برش مورب عمودی ۱

محافظ نورونی در مغز شناخته شده است (۸). هر چند که درمان با هورمون استروژن برای سلامتی در مرکز توجه قرار گرفته است و زنان یائسه از استروژن استفاده می کنند، اما استفاده طولانی مدت از استروژن در زنان یائسه خطر آندومتریوز و سرطان سینه را افزایش می دهد (۹).

بنابراین باید به دنبال راهکاری بود که زنان بعد از یائسگی علاوه بر استفاده از اثرات محافظتی استروژن های خوراکی، از عوارض آن در امان باشند. یکی از این راهکارها استفاده از استروژن های گیاهی (فیتواستروژن ها) است. فیتواستروژن ها غیراستروئیدهای گیاهی می باشند که ساختار و عملکرد مشابه استروژن دارند، به طوریکه ساختار شیمیایی آن ها از دو فنیل فتالین تشکیل شده که به رسپتور استروژن در شرایط داخلی و خارجی باند می شوند (۱۱ و ۱۰).

در یک مطالعه گزارش شده که عصاره سویا به عنوان یک فیتواستروژن دارای نقش محافظت نورونی به دنبال رپرفیوژن بعد از ایسکمی مغزی می باشد (۱۲). همچنین Castillo-Ruiz و همکارانش، در مطالعه خود دریافتند که فیتواستروژن ها باعث کاهش حجم سکنه مغزی در مدل سکنه مغزی فوکال گذرا در موش های صحرایی می شوند (۱۳). Vitex agnus Verbenaceae گیاهی با خاصیت فیتواستروژنی می باشد (۱۴). گیاهی بوته گسترده است که بومی اروپا می باشد اما در بسیاری از نقاط دنیا به خصوص جنوب آمریکا نیز می روید (۱۵).

این گیاه در ایران نیز می روید که با نام پنج انگشت یا فلفل بیابانی شناخته شده است و از آن به عنوان یک گیاه دارویی استفاده می شود. ترکیبات مختلف این گیاه شامل: آلکالوئیدی به نام ویتی سین، مشتقاتی از ایزوفلاون ها (ماده عمده آن کاستی سین) سایر فلاونوئیدها مانند پندولتین و کریزو فانول می باشند. میوه رسیده و خشک آن شامل دو گلیکوزید ایریدوئید آگنوساید و آکوبین می باشد که حاوی فلاونوئیدها و برخی روغن های ضروری است. فلاونوئید این گیاه خاصیت فیتواستروژنی گیاه را اثبات می کند (۱۵).

همچنین ترکیبات شیمیایی متفاوتی در عصاره این گیاه وجود دارد همانند آپینگین و پندولتین که بیشتر اثر روی زیر واحد بتای گیرنده استروژن دارد (۱۶) و نیز لینولئیک اسید که روی هر دو زیر واحد α و β گیرنده استروژن اثر دارد (۱۷).

با توجه به اینکه سکنه مغزی در زنان یائسه شایع و پیامدهای وخیم تری نسبت به مردان هم سن خود دارند و با توجه به اینکه استفاده از هورمون های استروژنی عوارض جبران ناپذیری را برای این زنان به دنبال دارد، بنابراین باید به دنبال جایگزینی مناسب برای هورمون های استروژنی باشیم که فیتواستروژن ها احتمالاً بتوانند جایگزین مناسبی در این زمینه باشند.

لذا در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی گیاه پنج انگشت (vitex agnus custes) بر پیامدهای ناشی از سکنه مغزی در موشهای سوری اوارکتومی شده، انجام شد.

مواد و روش ها

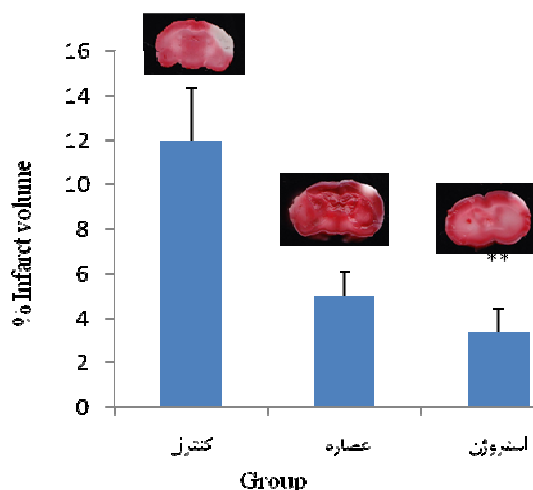
حیوانات: در این مطالعه تجربی از ۳۲ سر موش سوری ماده در محدوده وزنی ۲۵ تا ۳۵ گرم استفاده گردید. نمونه ها به طور تصادفی به ۴ گروه آزمایشی ۸ تایی تقسیم شدند. موشها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و حرارت ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شده و دسترسی به آب و غذا داشتند. پس از کسب

آزمون ANOVA یک طرفه و پس-آزمون Tukey مقایسه شد. اختلافات نورولوژیک با آزمون نان پارامتریک Kruskal-Wallis مقایسه شد و به صورت میانه و صدک‌های ۲۵th و ۷۵th گزارش شدند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر عصاره گیاه پنج انگشت بر حجم انفارکتوس در یک هفته بعد از سکنه مغزی مورد بررسی قرار گرفت. میانگین حجم سکنه در گروه کنترل و عصاره گیاه پنج انگشت در یک هفته پس از ایجاد سکنه مغزی به ترتیب $11/98 \pm 2/33$ و $5 \pm 1/10$ بوده که یک کاهش معنی داری در حجم سکنه در گروه عصاره گیاه پنج انگشت ایجاد کرد، به عبارت دیگر عصاره گیاه پنج انگشت در ۱ هفته پس از ایجاد سکنه مغزی، حجم سکنه را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش داده است ($p < 0.05$) (نمودار ۱).

همچنین استروژن حجم انفارکتوس را در یک هفته بعد از سکنه مغزی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش داد. میانگین حجم انفارکتوس در گروه استروژن در یک هفته بعد از سکنه مغزی $3/41 \pm 1/01$ بود که یک کاهش معنی داری در حجم سکنه ایجاد کرده است ($p < 0.01$) (نمودار ۱). در مجموع استروژن به میزان ۸۰ درصد و گیاه پنج انگشت به میزان ۶۰ درصد حجم انفارکتوس را در مقایسه با گروه کنترل در یک هفته بعد از سکنه مغزی کاهش دادند. بین گروه استروژن و گیاه پنج انگشت اختلاف معنی داری مشاهده نشد.



نمودار ۱. اثر عصاره گیاه پنج انگشت و استروژن بر حجم انفارکتوس بعد از سکنه مغزی

* اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ($p < 0.05$)

** اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ($p < 0.01$)

زمان تاخیر لمس و برداشتن چسب از کف دست سمت مقابل ناحیه سکنه مغزی در ۲۴ ساعت بعد از سکنه در گروه تحت درمان با گیاه پنج انگشت کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0.05$). این ارقام در گروه های کنترل و عصاره گیاه پنج انگشت در ۲۴ ساعت بعد از سکنه مغزی به ترتیب برابر با $17 \pm 3/024$ و 49 ± 13 بود. زمان تاخیر لمس و برداشتن چسب از کف دست سمت مقابل ناحیه سکنه

سانتی متری در پوست ناحیه وسط، بین اوربیت چپ و کانال شنوایی خارجی، زده شد. مراحل بعدی با تکنیک های جراحی انجام گرفت. بدین ترتیب که پوست اطراف شکاف کنار زده شد و غده پاروتید در یک چهارم پستی-تحتانی میدان دید مشاهده شد. منبع عروقی آن را با کوتر سوزاندیم و در قطب قدامی-فوقانی خود تقسیم شده و غده را به جهت پستی حرکت دادیم. سپس یک برش در اطراف لبه های فوقانی و پستی عضله تمپورالیس زده شد و با یک بالا برنده، عضله را از سمت کناری جمجمه کنار زدیم و به سمت جلو برگرداندیم. سپس بخش اصلی عضله با یک برش عمودی رو به لبه قدامی آن و از ناحیه اتصال آن به نوک زائده کورونوئیدی بریده شد. این استخوان و نیمه پستی استخوان گونه را برداشتیم و پس از نمایان شدن شریان مغزی میانی آن را سوزاندیم. بافت های نرم به سمت عقب به جای خود برگردانده شدند و سپس پوست بخیه زده شد (۲۰).

تعیین حجم انفارکتوس: حجم انفارکتوس، یک هفته بعد از سکنه مغزی تعیین شدند. برای تعیین حجم انفارکتوس پس از خارج کردن مغز، برش داده شد (برش های ۱ میلی متری کروئال) و با TTC رنگ آمیزی شدند. برای این منظور پس از تهیه محلول ۲ درصد تریفنیل تترازولیوم کلراید برش های مغز هر حیوان در محلول فوق قرار داده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

TTC با آنزیم های دهیدروژناز داخل سلول های زنده واکنش نشان داده و به رنگ قرمز در می آید. لذا، سلول های زنده به رنگ قرمز در آمده اما نورون های مرده تغییر رنگ نمی دهند (به دلیل نبودن دهیدروژنازها). پس از فیکس کردن برش ها با فرمالین ۱۰ درصد، از آن ها توسط اسکنر تصویر برداری شد و با یک نرم افزار پردازشگر تصویر اندازه گیری شدند. سطوح بدست آمده از هر برش در ضخامت آن ضرب شده و از مجموع ۶ برش حجم نیمکره چپ و راست، حجم انفارکتوس با فرمول مربوطه تعیین شدند. حجم انفارکتوس با استفاده از فرمول [حجم نیمکره چپ - (حجم نیمکره راست - حجم انفارکتوس اندازه گیری شده با TTC)] $\times 100$ / حجم نیمکره چپ محاسبه شد (۲۱ و ۲۲).

بررسی اختلافات نورولوژیک: اختلافات نورولوژیک با سیستم رتبه بندی بدرسون در ساعات ۲۴ و ۴۸ و یک هفته پس از القاء سکنه مغزی نمره داده شدند که شامل، عدم هرگونه اختلالی (نمره صفر)، خم شدن اندام جلویی (نمره ۱)، خم شدن اندام جلویی به اضافه کنترل مقاومت در هل دادن جانبی (نمره ۲)، چرخیدن به یک طرف (نمره ۳)، چرخیدن به یک طرف به اضافه کاهش سطح هوشیاری (نمره ۴)، مردن و یا عدم هوشیاری و تحرک (نمره ۵) (۲۳). این داده های کیفی بصورت میانه و صدک های ۲۵ام و ۷۵ام نمایش داده شدند.

بررسی اختلالات حسی-حرکتی: به منظور بررسی عملکرد حسی-حرکتی ناشی از القای سکنه مغزی، موشها روزی دو بار و به مدت سه روز قبل از سکنه، برای انجام آزمون جدا کردن بر چسب کاغذی (Sticky test)، آموزش داده شدند. قبل از جراحی، ۲۴، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از سکنه مغزی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این تست یک تکه چسب به کف دست راست موش چسبانده شد. مدت زمانی که طول می کشد تا حیوان برچسب را لمس نموده و جدا نماید بعنوان میزان فعالیت حسی حرکتی در نظر گرفته می شود که هرچه مدت زمان لازم برای جدا کردن برچسب بیشتر باشد اختلال حسی حرکتی بیشتر است (۲۴).

آنالیز آماری: در مطالعه حاضر از نرم افزار SPSS22 و Excell برای آنالیز داده ها استفاده شد. تفاوت های حجم انفارکتوس، اختلال حسی حرکتی، پارزی، با

۴۸ ساعت ($p < 0.05$) و یک هفته ($p < 0.001$) بعد از سکتة مغزی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش داده است. (جدول ۱).

جدول ۱. اثر عصاره گیاه پنج انگشت و استروژن بر اختلالات نورولوژیک (سیستم رتبه بندی بدرسون)

گروه	شم	کنترل	ویتکس	استروژن
۲۴ ساعت	(۰-۰)۰	۲(۲۵/۱-۲)	۱(۱-۲)	۱(۱-۱/۷۵)
۴۸ ساعت	(۰-۰)۰	۲(۲-۲)	۱(۱-۲)*	۱(۱-۱/۷۵)*
۱ هفته	(۰-۰)۰	۲(۲-۴/۲۵)	۱(۱-۲)**	۱(۱-۱)***

داده ها به صورت میانه و صدک های ۲۵ام و ۷۵ام (صدک ها داخل پرانتز) بیان شده اند

* در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.05$)

** در مقایسه گروه کنترل ($p < 0.01$)

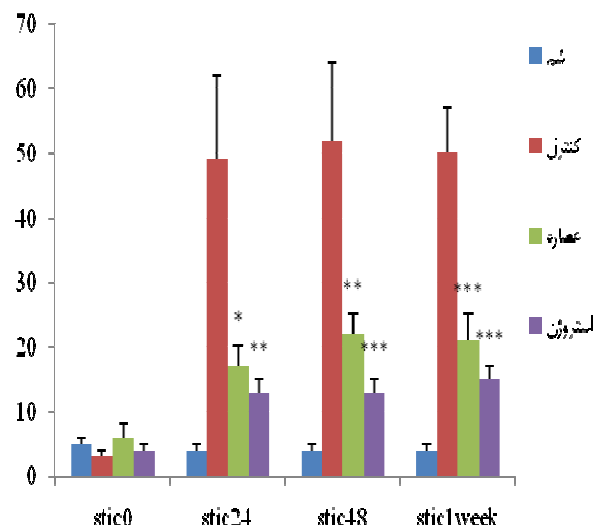
*** در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.001$)

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که گیاه پنج انگشت حجم انفارکتوس، اختلالات نورولوژیک و اختلالات حسی حرکتی را به طور معنی داری کاهش داد. در مطالعه Yang و همکارانش نشان داده شد که استروژن دارای اثر محافظتی بر روی سلولهای مغزی می باشد (۲۵). بعد از آن Fiochetti و همکارانش اثرات محافظت نورونی متعددی را برای استروژن بیان کردند (۲۶). علاوه بر این Hurn و همکارانش اثرات محافظتی استروژن را در ایسکمی مغزی نشان دادند (۲۷). نتایج حاصل از مطالعه ما همچنین نشان داد که استروژن حجم انفارکتوس و اختلالات نورولوژیک ناشی از القاء سکتة مغزی را کاهش داده که این نتایج با نتایج حاصل از این مطالعات همخوانی داشت. در مطالعه ای که Huang و همکارانش انجام دادند، دریافتند که رژیم های حاوی ایزوفلاون ها در موش های صحرایی حجم انفارکتوس و اختلالات نورولوژیک را بعد از ایسکمی مغزی فوکل گذرا بهبود می بخشد. همچنین نشان دادند که ایزوفلاون های سویا می توانند ظرفیت تکثیر سلول های بنیادی نوروژن ها (Neural Stem Cell) را حفظ کرده و در نتیجه حجم سکتة مغزی و اختلالات عملکردی بعد از سکتة را کاهش دهند (۲۸). Schreihofner و همکارانش نشان دادند، حیواناتی که تنها دو هفته از رژیم غذایی پر سویا استفاده کردند در مقایسه با حیواناتی که رژیم غذایی کم سویا مصرف می کردند اندازه انفارکتوس آنها در مدل سکتة مغزی موضعی کاهش چشم گیری پیدا کرد (۲۹).

همچنین Lovekamp-Swan و همکارانش بیان کردند که رژیم غذایی سویا باعث کاهش اندازه انفارکتوس بعد از بستن شریان مغزی میانی (MCAO) در رت های اوارکتومی شده می شود (۳۰). با توجه به مطالعات انجام گرفته پنج انگشت گیاهی با خواص درمانی و فیتواستروژنی بسیار است و با توجه به تحقیقاتی که Wuttke و همکارانش انجام دادند، آپیگنین (apigenin)، یک فلاونوئید، ترکیبی با فعالیت آگونیستی برای گیرنده استروژن در این گیاه می باشد (۱۶). فلاونوئید این گیاه خاصیت فیتواستروژنی گیاه را اثبات می کند (۱۴). بعد از آن Liu و همکارانش نشان دادند که لینولئیک اسید در عصاره گیاه پنج انگشت قادر به اتصال به هر دو نوع گیرنده استروژن (α و β) و اعمال اثرات مشابه

مغزی در ۴۸ ساعت بعد از سکتة در گروه تحت درمان با عصاره گیاه پنج انگشت کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$). این ارقام در گروه های کنترل و عصاره گیاه پنج انگشت در ۴۸ ساعت بعد از سکتة مغزی به ترتیب برابر با 52 ± 12 و 22 ± 3 بود. زمان تاخیر لمس و برداشتن چسب از کف دست سمت مقابل ناحیه سکتة مغزی در یک هفته بعد از سکتة در گروه تحت درمان با عصاره گیاه پنج انگشت کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0.001$). این ارقام در گروه های کنترل و عصاره گیاه پنج انگشت در یک هفته بعد از سکتة مغزی به ترتیب برابر با 50 ± 7 و 21 ± 4 بود (نمودار ۲). زمان تاخیر لمس و برداشتن چسب از کف دست سمت مقابل ناحیه سکتة مغزی در ۲۴ ساعت بعد از سکتة در گروه تحت درمان با استروژن کمتر از گروه کنترل است ($p < 0.01$). این ارقام در گروه های کنترل و استروژن در ۲۴ ساعت بعد از سکتة مغزی به ترتیب برابر با 49 ± 13 و 13 ± 2 بود. زمان تاخیر لمس و برداشتن چسب از کف دست سمت مقابل ناحیه سکتة مغزی در ۴۸ ساعت بعد از سکتة در گروه تحت درمان با استروژن کمتر از گروه کنترل است ($p < 0.01$). این ارقام در گروه های کنترل و استروژن به ترتیب برابر با 52 ± 12 و 13 ± 2 بود. زمان تاخیر لمس و برداشتن چسب از کف دست سمت مقابل ناحیه سکتة مغزی در یک هفته بعد از سکتة در گروه تحت درمان با استروژن کمتر از گروه کنترل است ($p < 0.001$). این ارقام در گروه های کنترل و استروژن در یک هفته بعد از سکتة مغزی به ترتیب برابر با 50 ± 7 و 15 ± 2 بود (نمودار ۲).



نمودار ۲. اثر عصاره گیاه پنج انگشت و استروژن بر اختلالات حسی-حرکتی

در ساعات ۲۴، ۴۸ و یک هفته پس از ایجاد سکتة مغزی

* در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.05$)

** در مقایسه گروه کنترل ($p < 0.01$)

*** در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.001$)

همچنین اثر عصاره گیاه پنج انگشت بر اختلالات نورولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. عصاره گیاه پنج انگشت اختلالات نورولوژیک را در ۴۸ ساعت ($p < 0.05$) و یک هفته ($p < 0.01$) بعد از سکتة مغزی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش داده است (جدول ۱). استروژن اختلالات نورولوژیک را در

می شود که این اثرات با استروژن قابل مقایسه است. نظر به اینکه داروهای گیاهی نیز ممکن است دارای عوارضی باشند و همچنین درمانهای جایگزین با گیاهان فیتواستروژنی در طولانی مدت ممکن است عوارض جانبی به دنبال داشته باشند، لذا لازم است مطالعات بیشتر و در مدت طولانی تری در خصوص بررسی اثرات جانبی این گیاهان انجام شود و بهتر است بررسی تغییرات هیستولوژیک در بافت های هدف استروژن، نظیر رحم و پستان ها باشد تا بتوان این نتایج را در مطالعات کلینیکال بکار برد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به جهت تصویب و تامین هزینه های مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

استروژن می باشد (۱۷). همچنین مطالعه ای که توسط Choudhary و همکارانش انجام شد نیز نشان داد که عصاره این گیاه دارای اثرات ضد التهابی نیز می باشد. علاوه بر این مواد موثره گیاه پنج انگشت را جدا کرده و اثرات ضدالتهابی آنها در تست cell-based contemporary مورد بررسی قرار دادند که مشخص شد از میان آنها p-هیدروکسی بنزوئیک اسید، ۴و۳ دی هیدروکسی بنزوات و ۴و۳ دی هیدروکسی بنزوئیک، فعالیت ضدالتهابی معنی داری دارند (۳۱). همچنین بررسی های ما نیز نشان داد که گیاه پنج انگشت می تواند مشابه با استروژن حجم انفارکتوس را در مدل سگته دائم کاهش دهد و متعاقب آن میزان اختلالات نورولوژیکی و حسی_حرکتی که بعد از سگته ایجاد می شود را نیز کاهش دهد. در مجموع با توجه به خواص شبه استروژنی و ضدالتهابی گیاه پنج انگشت، یافته های این مطالعه نشان داد که عصاره این گیاه باعث کاهش حجم انفارکتوس شده و در نتیجه باعث کاهش نقایص نورولوژیک ناشی از سگته مغزی

The Effects of the Ethanolic Extract of Vitex Agnus Castus on Stroke Outcomes in Ovariectomized Mice

R. Alimohammadi (MSc)¹, S. Naderi (MSc)¹, E. Imani (MSc)¹, A. Shamsizadeh (PhD)¹, M. Mobini (MSc)¹,
M.H. Razazadeh (MSc)¹, F. Amin (MSc)¹, M. Allahtavakoli (PhD)^{*1}

1. Physiology and Pharmacology Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 17(3); Mar 2015; PP:20-7

Received: Jun 23th 2014, Revised: Sep 24th 2014, Accepted: Nov 26th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The prevalence of stroke in premenopausal women is lower than men. In fact, estrogen is known as a potent neuroprotective agent in cerebral ischemia before menopause. Phytoestrogens are considered to be less risky than chemical estrogens. In this study, considering the phytoestrogenic properties of Vitex agnus castus, the effects of the ethanolic extract of this plant on stroke outcomes in a model of middle cerebral artery occlusion were investigated in ovariectomized mice.

METHODS: In this experimental study, 32 mice, weighing 25-35 g, were randomly divided into 4 groups (8 mice per group): 1) sham group, 2) control group (ovariectomized, treated with 1 ml/kg saline for one month, followed by stroke induction), 3) Vitex group (ovariectomized, treated with 80 mg/kg of Vitex extracts in 1 mL saline every day for a month), and 4) estrogen group (ovariectomized, treated with 40 µg/kg of estradiol valerate in 1 mL saline every day for a month). After one month, stroke was induced in ovariectomized mice by cauterizing the middle cerebral artery. Infarct volume and neurological disorders were evaluated one week after stroke induction.

FINDINGS: A week after stroke induction, infarct volume in the control, estrogen, and Vitex groups was 11.98±2.33, 3.41±1.01, and 5±1.10, respectively. Vitex extracts and estrogen could decrease infarct volume, compared to the control group (p<0.05). Also, estrogen and Vitex extracts reduced neurological deficits, compared to the control group (p<0.001). A week after stroke induction, sensorimotor disorders in the control, estrogen, and Vitex groups were 50±7, 15±2, and 21±4.09, respectively. In fact, a significant difference was observed between the control and other groups (p<0.001).

CONCLUSION: The findings of the present study showed that Vitex extracts, similar to estrogen, have neuroprotective effects, following middle cerebral artery occlusion in ovariectomized mice.

KEY WORDS: *Vitex, Ovariectomized, Model of Middle Cerebral Artery Occlusion, Extract.*

Please cite this article as follows:

Alimohammadi R, Naderi S, Imani E, Shamsizadeh A, Mobini M, Razazadeh MH, Amin F, Allahtavakoli M. The Effects of the Ethanolic Extract of Vitex Agnus Castus on Stroke Outcomes in Ovariectomized Mice. J Babol Univ Med Sci. 2015; 17(3):20-7.

* Corresponding Author; M. Allahtavakoli (PhD)

Address: Physiology and Pharmacology Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R. Iran

Tel: +98 391 5234003

E-mail: allahtavakoli@gmail.com

References

1. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391-7.
2. 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.
3. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 2009;40(6):2244-50.
4. Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, Cooper LS, Conwill DE, Clegg L, et al. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Engl J Med.* 1998;339(13):861-7.
5. Wenger NK, Speroff L, Packard B. Cardiovascular health and disease in women. *N Engl J Med.* 1993;329(4):247-56.
6. Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke.* 1998;29(1):159-66.
7. 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.
8. Rezazadeh H, Hosseini Kahnouei MH, Fatemi I, Shamsizadeh A, Hakimzadeh E, Allahtavakoli M. The Effect of Mechanical Control of Brain Blood Flow on the Embolic Model of Stroke after Delayed Tissue Plasminogen Activator Therapy in Ovariectomized Rat. *J Babol Univ Med Sci.* 2014;16(6):43-9. [In Persian]
9. Hammond CB. Women's concerns with hormone replacement therapy--compliance issues. *Fertil Steril.* 1994;62(6 Suppl 2):157S-60S.
10. Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;17(2):253-71.
11. Welshons WV, Murphy CS, Koch R, Calaf G, Jordan VC. Stimulation of breast cancer cells in vitro by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast Cancer Res Treat.* 1987;10(2):169-75.
12. Yaman M, Eser O, Cosar M, Bas O, Sahin O, Mollaoglu H, et al. Oral administration of avocado soybean unsaponifiables (ASU) reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Arch Med Res.* 2007;38(5):489-94.
13. Castelló-Ruiz M, Torregrosa G, Burguete MC, Salom JB, Gil JV, Miranda FJ, et al. Soy-derived phytoestrogens as preventive and acute neuroprotectors in experimental ischemic stroke: influence of rat strain. *Phytomedicine.* 2011;18(6):513-5.
14. Honari N, Pourabolli I, Hakimzadeh E, Roohbakhsh A, Shamsizadeh A, Vazirinejad R, et al. Effect of vitex agnus castus extraction on anxiety-like behaviors in ovariectomized rats. *J Babol Univ Med Sci (JBUMS).* 2012;14(5):29-35.
15. Chen SN, Friesen JB, Webster D, Nikolic D, van Breemen RB, Wang ZJ, et al. Phytoconstituents from Vitex agnus-castus fruits. *Fitoterapia.* 2011;82(4):528-33.
16. Wuttke W, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Seidlova-Wuttke D. Chaste tree (Vitex agnus-castus)–Pharmacology and clinical indications. *Phytomedicine.* 2003;10(4):348-57.
17. Liu J, Burdette JE, Sun Y, Deng S, Schlecht SM, Zheng W, et al. Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of Vitex agnus-castus L.(chaste-berry). *Phytomedicine.* 2004;11(1):18-23.
18. Clouthier S, Wicha M. Ketamine/Xylazine Containing Anesthesia for Mouse Surgery, Preparation. *Univ Michigan Health Sys.* 2012; 2(1):1-2. Available at: <http://www.med.umich.edu/wicha-lab/SOP/SOP%206.3-%20Ketamine%20Xylazine%20Anesthesia.pdf>.
19. Emerton KB, Hu B, Woo AA, Sinofsky A, Hernandez C, Majeska RJ, et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone.* 2010;46(3):577-83.
20. Bogaert-Buchmann A, Poittevin M, Po C, Dupont D, Sebié 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.

21. 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.
22. 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.
23. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura M, Davis R, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472-6.
24. Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(3):330-8.
25. Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wang X, Simpkins JW. Estrogens as protectants of the neurovascular unit against ischemic stroke. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005;4(2):169-77.
26. Fiocchetti M, Ascenzi P, Marino M. Neuroprotective effects of 17 β -estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. *Front Physiol*. 2012;3:73.
27. Hum PD, Macrae IM. Estrogen as a Neuroprotectant in Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(4):631-52.
28. Huang G, Cao X, Zhang X, Chang H, Yang Y, Du W, et al. Effects of soybean isoflavone on the notch signal pathway of the brain in rats with cerebral ischemia. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)*. 2009;55(4):326-31.
29. Schreihöfer DA, Do KD, Schreihöfer AM. High-soy diet decreases infarct size after permanent middle cerebral artery occlusion in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(1):R103-8.
30. Lovekamp-Swan T, Glendenning M, Schreihöfer DA. A high soy diet reduces programmed cell death and enhances bcl-xL expression in experimental stroke. *Neuroscience*. 2007;148(3):644-52.
31. Choudhary MI; Azizuddin, Jalil S, Nawaz SA, Khan KM, Tareen RB, et al. Antiinflammatory and lipoxigenase inhibitory compounds from vitex agnus-castus. *Phytother Res*. 2009;23(9):1336-9.