Archive of SID

Original Paper

Effect of crocin on histological changes of hippocampus and memory impairment induced by scopolamine in male rats

Hamidreza Sameni (Ph.D), Associate Professor, Nervous System Stem Cells Research Center, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2669-6697

Afsaneh Talebian (M.Sc), M.Sc in Anatomical Sciences, Nervous System Stem Cells Research Center and Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8840-7275

Abbas Ali Vafaei (Ph.D), Professor, Research Center and Department of Physiology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1178-3787

Sam Zarbakhsh (Ph.D), Associate Professor, Nervous System Stem Cells Research Center and Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4643-7489

Zahra Yaghoubi (M.D), General Physician, Research Center and Department of Physiology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9371-9054

***Mohammadreza Aldaghi (Ph.D)**, **Corresponding Author**, Assistant Professor, Nervous System Stem Cells Research Center and Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.
E-mail: aldaghimr861@semums.ac.ir ORCID ID: 0000-0001-7587-0172

Downloaded from goums.ac.ir at 12:43 +0430 on Monday July 6th 2020

Abstract

Background and Objective: Alzheimer is the most common form of dementia in elderly persons. Oxidative stress is one of the main pathological factors in Alzheimer's disease. This study was done to investigate the effect of crosin on histological changes of hippocampus and memory impairment which induced by scopolamine in the male rats.

Methods: In this experimental study, 30 male rats were randomly allocated into 3 groups including: control, scopolamine and scopolamine with crosin treated groups. Scopolamine with dose of 3 mg/kg/bw for one week and crocin with dose of 30mg/kg for two weeks were administered, intraperitoneally. The learning and spatial memory parameters were evaluated by Morris water maze test. Then the animals were sacrificed and their hippocampi were removed immediately for histological evaluation.

Results: Scopolamine injection causes significantly increased the number of dark cells in CA1 region of hippocampus in compared to control group ($P<0.05$). Treatment with crocin decreased dark cells and increased light cells number in CA1 region of hippocampus ($P<0.05$). Also treatment with crocin decreased memory impairment that induced by scopolamine in rats ($P<0.05$).

Conclusion: It seems that treatment with crocin has protective effects against neuronal damage of CA1 region of hippocampus and memory impairment that induced by scopolamine.

Keywords: Alzheimer disease, Scopolamine hydrobromide, Spatial memory, Crocin, Rat

Received 26 Nov 2018 **Revised** 12 May 2019 **Accepted** 19 May 2019

Cite this article as: Sameni H, Talebian A, Vafaei AA, Zarbakhsh S, Yaghoubi Z, Aldaghi M. [Effect of crocin on histological changes of hippocampus and memory impairment induced by scopolamine in male rats]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Spring; 22(1): 35-42. [Article in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیقی

اثر کروسین بر تغییرات بافتی هیپوکامپ و اختلال حافظه القا شده به وسیله اسکوپولامین در موش‌های صحرایی نر

دکتر حمیدرضا ثامنی، دانشیار، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.
ORCID ID: 0000-0002-2669-6697
افسانه طالبیان، کارشناس ارشد رشته علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.
ORCID ID: 0000-0001-8840-7275
دکتر عباسعلی وفایی، استاد، مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. ORCID ID: 0000-0003-1178-3787
دکتر سام زربخش، دانشیار، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.
ORCID ID: 0000-0003-4643-7489
دکتر زهرا یعقوبی، پزشک عمومی، مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. ORCID ID: 0000-0001-9371-9054
*** دکتر محمدرضا الداغی**، استادیار، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.
ORCID ID: 0000-0001-7587-0172

Downloaded from goums.ac.ir at 12:43 +0430 on Monday July 6th 2020

چکیده

زمینه و هدف: *آلزایمر شایع‌ترین شکل فراموشی در افراد مسن است. استرس اکسیداتیو یکی از عوامل پاتولوژیک مهم در بیماری آلزایمر است. این مطالعه به منظور تعیین اثر کروسین بر تغییرات بافتی هیپوکامپ و اختلال حافظه القا شده به وسیله اسکوپولامین در موش‌های صحرایی نر انجام گردید.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش صحرایی نر به‌صورت تصادفی به ۳ گروه ۱۰ تایی کنترل، دریافت کننده اسکوپولامین و دریافت کننده اسکوپولامین همراه با کروسین تقسیم شدند. اسکوپولامین با دوز ۳mg/kg/bw به مدت یک هفته و کروسین با دوز ۳۰mg/kg/bw به مدت دو هفته به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. پس از آن شاخصه‌های یادگیری و حافظه فضایی با استفاده از ماز آبی موریس ارزیابی گردید. سپس موش‌ها قربانی شده و بلافاصله هیپوکمپ آنها خارج و ارزیابی بافت‌شناسی انجام شد.*

یافته‌ها: *تزریق اسکوپولامین سبب افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های تیره در ناحیه CA1 هیپوکمپ نسبت به گروه کنترل گردید. (P<۰/۰۵). درمان با کروسین منجر به کاهش تعداد سلول‌های تیره و افزایش سلول‌های روشن در ناحیه CA1 هیپوکمپ گردید (P<۰/۰۵). همچنین درمان با کروسین اختلال حافظه القا شده به‌وسیله اسکوپولامین را در موش‌های صحرایی کاهش داد (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری: *به‌نظر می‌رسد درمان با کروسین می‌تواند اثر محافظتی در برابر آسیب نورونی ناحیه CA1 هیپوکمپ و اختلال حافظه القا شده توسط اسکوپولامین داشته باشد.*

کلید واژه‌ها: *بیماری آلزایمر ، اسکوپولامین هیدروبروماید ، حافظه فضایی ، کروسین ، موش صحرایی*

* نویسنده مسؤول : دکتر محمدرضا الداغی ، پست الکترونیکی aldaghimr861@semums.ac.ir
نشانی: سمنان، کیلومتر پنج جاده دامغان، مجتمع دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی و گروه علوم تشریحی
تلفن ۳۳۶۵۴۱۷۰-۰۲۳، نمابر ۳۳۶۵۴۲۱۸

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۹/۵ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۸/۲/۲۲ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۲/۲۹

مقدمه

تعداد زیادی از مردم دنیا از اشکال مختلف اختلالات حافظه از جمله آلزایمر رنج می‌برند. در جهان ۳۶ میلیون نفر مبتلا به آلزایمر وجود دارد که این آمار تا سال ۲۰۵۰ به ۱۱۵ میلیون نفر می‌رسد. بارزترین تظاهر آلزایمر زوال عقل و اختلال حافظه است. علل اولیه آلزایمر دقیقاً مشخص نشده؛ اما تئوری‌های مختلفی در این مورد ارایه شده است. تجمع غیرطبیعی بتاآمیلوئید، دژنراسیون نورون‌های کولینرژیک، مکانیسم‌های التهابی و افزایش استرس اکسیداتیو از جمله این تئوری‌ها است (۳-۱). آلزایمر از لحاظ بالینی توسط تخریب پیشرونده شناختی شامل حافظه و استدلال مشخص می‌گردد که با از دست رفتن سیناپس‌های نورون‌ها در برخی مناطق مغز، نکروزه شدن سلول‌های مغزی و ایجاد ساختارهای پروتئینی کروی شکل در خارج نورون‌های برخی مناطق مغزی همراه است (۶-۴). داروهایی مانند ریواستیگمین، استروژن‌ها و داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی برای درمان یا پیشگیری بیماری آلزایمر معرفی شده‌اند (۷)؛ اما تاکنون درمان کاملاً موفقی برای آلزایمر معرفی نشده است. اسکوپولامین یک عامل کولینرژیک است که می‌تواند سبب القای وضعیتی شبیه آلزایمر مانند اختلال حافظه و آپوپتوز هیپوکامپ در حیوانات آزمایشگاهی گردد (۱و۱۰-۸). در بعضی مطالعات علاوه بر داروهای شیمیایی از گیاهان دارویی نیز برای

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 12:43 +0430 on Monday July 6th 2020

درمان این اختلالات استفاده شده است. در مطالعاتی گزارش شده که دونپزیل هیدروکلراید (۱۱) و ممانتین (۱۲) باعث افزایش حافظه موش‌های صحرایی با آلزایمر القاء شده می‌گردد. همچنین مطالعه فربود و همکاران نشان داد که عصاره دانه انگور باعث بهبود اختلالات حافظه ناشی از آلزایمر القایی در موش‌های صحرایی می‌شود (۱۳). زعفران (*Crocus sativus*) یکی از گیاهان دارویی است که خواص دارویی مختلفی دارد. ترکیبات عمده در زعفران شامل کروستین، کروسین و سافرانال است که در مشخصات زعفران مانند رنگ، عطر و طعم و همچنین در اثرات بهبود دهنده سلامت آن دخالت دارند (۱۴). برای زعفران و کروسین خواص دارویی مختلفی مانند اثرات آنتی تومورال (۱۵)، حفاظت کننده سیستم عصبی (۱۸-۱۶) تنظیم کننده چربی و ضدآترواسکلروز (۱۹و۲۰) ذکر شده است. همچنین از کروسین به عنوان یک آنتی اکسیدان و یک عامل ضدالتهاب در حیوانات آزمایشگاهی یاد شده است (۲۱). بررسی‌های رفتاری و الکتروفیزیولوژیک نشان داده‌اند که عصاره زعفران اختلالات حافظه ناشی از تجویز اتانول را بهبود می‌بخشد. همچنین اثرات منفی اتانول را در هیپوکامپ آنتاگونیزه می‌نماید (۲۲و۲۳). Ghotbeddin و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که تزریق داخل صفاقی کروسین اثر حفاظتی در برابر اختلال عملکرد شناختی در موش‌های دریافت کننده سیس پلاتین دارد. همچنین کروسین می‌تواند سبب بهبود اختلال حافظه ناشی از این دارو گردد (۲۴). Finley و Gao در سال ۲۰۱۷ اثر آنتی‌اکسیدانی کروسین را در بیماری آلزایمر بررسی و نتیجه گرفتند که کروسین اثرات حفاظتی چندگانه‌ای بر مغز دارد و توصیه به تجویز کروسین به عنوان پیشگیری یا درمان در بیماری آلزایمر نمودند (۲۵). با توجه به این که در جریان بیماری آلزایمر استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد و از طرفی کروسین نیز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی اثبات شده‌ای است؛ لذا در این مطالعه اثرات مثبت کروسین بر حافظه و یادگیری و مقابله با آسیب‌های بافتی هیپوکمپ در بیماری آلزایمر بررسی گردید. مطالعات قبلی در این زمینه عمدتاً به‌صورت بررسی اختلالات حافظه (و با دوزهای دیگری) بوده؛ اما در مطالعه حاضر علاوه بر بررسی اختلالات حافظه، تغییرات هیستوپاتولوژیک هیپوکامپ نیز مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن تقریبی ۱۰-۸ هفته و وزن تقریبی حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که به‌طور تصادفی انتخاب شدند؛ در مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان طی سال ۱۳۹۶ استفاده شد. حیوانات در طول مدت آزمایش در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی سمنان و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. نکات اخلاقی مصوب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سمنان (کد ۱۳۹۵۸۸) کاملاً رعایت گردید.

در اتمام آزمایش نیز موش‌ها تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و سپس قربانی شدند. در این آزمایش از اسکوپولامین و کروسین استفاده گردید که هر دو از شرکت سیگما (آلمان) خریداری و هر دو دارو ابتدا در نرمال سالین حل و سپس به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. دوز اسکوپولامین براساس مقالات مشابه قبلی انتخاب شد (۱۰-۸). دوزهای کروسین نیز بر اساس مطالعات مشابه قبلی (۲۸-۲۴) و مطالعه پایلوت ابتدایی مشخص گردید.

حیوانات با روش تصادفی ساده در سه گروه ۱۰ تایی به‌شرح زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل (سالین - سالین): در این گروه حیوانات نرمال سالین را به مدت ۲هفته به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه اسکوپولامین - سالین: این گروه حیوانات اسکوپولامین را به میزان ۳mg/kg/bw به‌صورت داخل صفاقی روزانه به مدت یک هفته دریافت کرده و سپس به مدت دو هفته محلول سالین نرمال را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه اسکوپولامین - کروسین: این گروه حیوانات اسکوپولامین را به میزان ۳mg/kg/bw به‌صورت داخل صفاقی روزانه و به مدت یک هفته دریافت نمودند. سپس به مدت دو هفته روزانه ۳۰ mg/kg/bw عصاره کروسین را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

سپس آزمون یادگیری و حافظه فضایی و ارزیابی هیستوپاتولوژیک برای هر گروه انجام شد.

آزمون یادگیری و حافظه فضایی: در آزمون یادگیری و حافظه فضایی، موش‌های مورد آزمایش پس از تیمار توسط داروها تحت آزمون قرارگرفتند. در این مطالعه برای ارزیابی حافظه فضایی از ماز آبی موریس به‌عنوان یک روش کلاسیک و شناخته شده استفاده شد (۲۹). به طوری که طی ۴ روز آزمایش، هر موش ۵ بار مورد آزمایش قرار گرفت. در حالی که موقعیت سکو و مختصات آن در طول مدت آزمایش برای تمامی گروه‌های مورد آزمایش ثابت بود؛ اما نقطه شروع در هر بار آزمایش در داخل حوضچه می‌تواند از یکی از چهار جهت مختلف باشد. تمام حرکات و مسیرهای پیموده شده توسط دوربین ثبت شد. هر موش در هر بار آزمایش در بازه زمانی ۶۰ ثانیه در داخل حوضچه به جستجوی سکو پرداخت و با یافتن سکو در این مدت زمان و یا کمتر از آن آزمایش پایان یافت. در صورتی که موش نتوانست در این مدت زمان سکو را پیدا کند؛ توسط شخص آزمایش کننده به طرف سکو هدایت و هر موش در پایان هر بار آزمایش به مدت ۲۰ ثانیه در روی سکو باقی ماند. حال

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 12:43 +0430 on Monday July 6th 2020

چه سکو را خود پیدا کرده باشد و چه این که با کمک شخص آزمایش کننده موفق به یافتن سکو شده باشد؛ تا وضعیت فضایی سکوی که حدود ۱/۵ سانتی‌متر زیر آب قرار گرفته و قابل رویت نیست را ارزیابی کند. در روزپنجم به منظور سنجش به‌خاطرآوری محل سکو، تست پروب برای همه گروه‌ها انجام شد. در این مرحله از آزمایش سکو برداشته شده و هر موش از هر چهار جهت و به صورت اتفاقی داخل ماز رها شدند و در بازه زمانی ۶۰ ثانیه در داخل حوضچه به جستجوی سکو پرداختند. در این مرحله مدت زمان سپری شده در ربع Q1 (ربع هدف)، ربع دوم Q2، ربع سوم Q3 و Q4 (ربع‌های غیرهدف) مورد ارزیابی قرار گرفت.

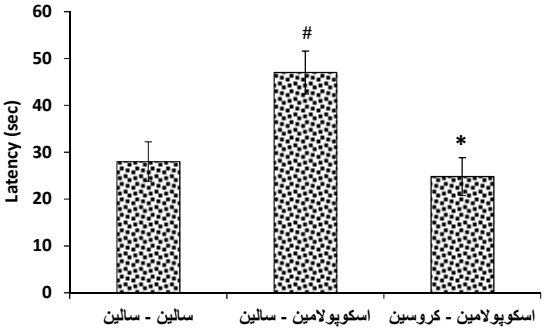
ارزیابی هیستوپاتولوژیک: حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و مغز آنها خارج شد و به منظور فیکساسیون در فرمالین ۱۰درصد به‌مدت ۷ روز قرار داده شد. سپس مراحل مختلف پروسسینگ (پردازش) نمونه‌ها انجام شد. ابتدا نمونه‌ها در سبدهای ویژه‌ای چیده شد. سپس با استفاده از دستگاه اتو تکنیکون مراحل مختلف پردازش نمونه‌ها انجام شد. پس از اتمام مراحل پاساژ بافتی، نمونه‌ها توسط پارافین قالب‌گیری شده و برش‌های سریالی با ضخامت حدود ۵ میکرون در سطح دورسال هیپوکمپ و در حدود ۴-۳ میلی‌متر در خلف برگما (۶ برش از هر موش با فواصل ۱۵۰µm) انجام شد (۳۰). سپس بر روی لام منتقل گردید و در ادامه رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله برای ارزیابی بافتی انجام شد. در انتها نیز لام‌های تهیه شده از هیپوکمپ مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. برای بررسی هیستومورفومتریک از میکروسکوپ Nikon مجهز به صفحه شطرنجی مدرج استفاده شد. ناحیه هیپوکمپ علاوه بر سلول‌های گلیال، دارای ۶-۵ لایه فشرده از سلول‌های پیرامیدال با هسته وزیکولار است. نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی (هسته‌های بزرگ‌تر در دو شکل کروی و هرمی، میزان رنگ‌پذیری و طرح کروماتین) از سلول‌های نوروگلیا قابل تشخیص هستند (۳۱). در این مطالعه نورون‌های پیرامیدال مورد بررسی قرار گرفتند. منظور از سلول‌های تیره (Dark cells) سلول‌های نکروز شده، چروکیده و تیره رنگ گرفته (Darkly stained) و منظور از سلول‌های روشن (Light cells) نورون‌های سالم و دست نخورده هرمی شکل با هسته و هستک واضح بود (۱۰-۸و۳۴-۳۱). نورون‌هایی با ظاهر تیره و متراکم، هستک نامشخص و با محدوده هسته‌ای و سیتوپلاسمی نامنظم به‌عنوان سلول‌های تیره (دژنره و نکروزه) (۳۴-۳۱) و سلول‌های طبیعی به عنوان سلول‌های روشن در نظر گرفته شدند. شمارش نورونی با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصاویر بافتی Motic images plus انجام شد.

داده ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. چون توزیع داده‌ها نرمال بود؛ از آنالیز واریانس (ANOVA) و در ادامه از آزمون Tukey استفاده گردید. در تمام آزمون‌ها سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

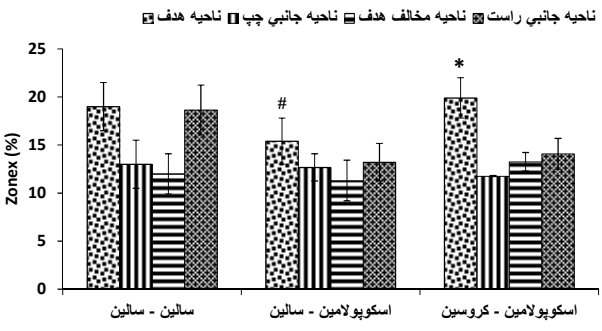
یافته‌ها

نتایج مربوط به اختلال حافظه

زمان طی شده برای یافتن سکو طی تست پروب در گروه‌های مختلف در نمودار یک آمده است. زمان رسیدن به محل سکو در گروه دریافت کننده اسکوپولامین نسبت به گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵) که نشان‌دهنده آسیب ناشی از اسکوپولامین بر حافظه فضایی است. در گروه‌های دریافت کننده اسکوپولامین و کروسین، زمان طی شده به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دریافت کننده اسکوپولامین کاهش یافت (P<۰/۰۵) که نشان‌دهنده مهار اثرات اسکوپولامین است (نمودار یک).



نمودار ۱: اثر کروسین بر آسیب به خاطرآوری یادگیری ناشی از اسکوپولامین موش‌های صحرایی مرتبط به زمان طی شده برای یافتن سکو در تست پروب در ماز آبی
 # P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل
** P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه اسکوپولامین – سالین*



نمودار ۲: اثر کروسین بر آسیب به‌خاطرآوری یادگیری ناشی از اسکوپولامین موش‌های صحرایی مرتبط به زمان طی شده در ربع هدف در تست پروب ماز آبی
 # P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل
** P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه اسکوپولامین – سالین*

زمان گذرانده شده در ربع هدف و ناحیه مخالف آن در نمودار ۲ آمده است. زمان گذرانده شده در ربع هدف در گروه دریافت

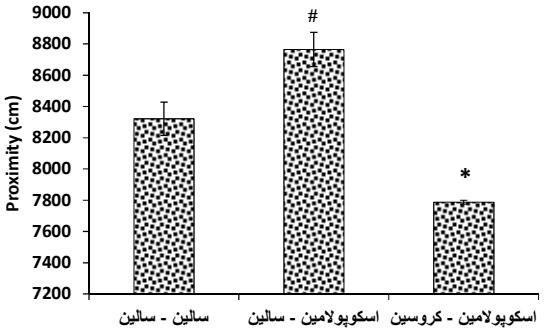
www.SID.ir

Archive of SID

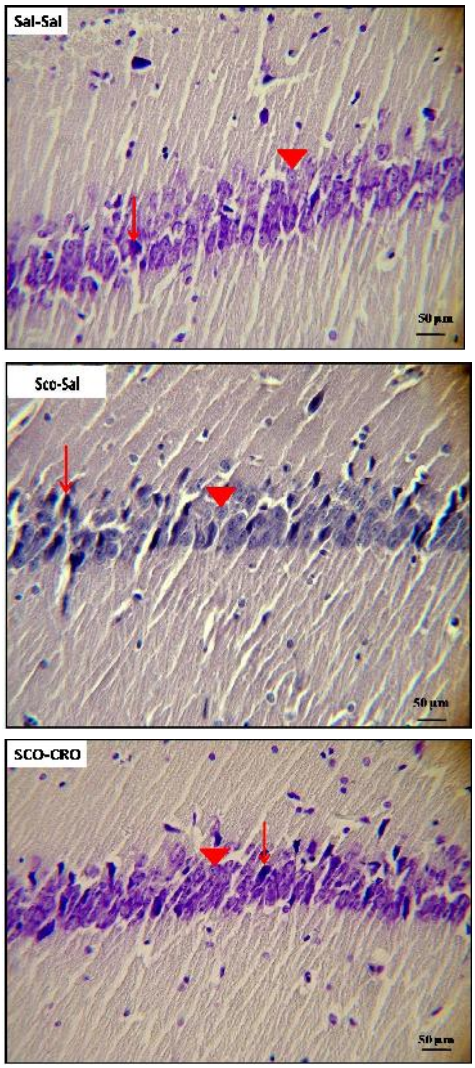
Downloaded from goums.ac.ir at 12:43 +0430 on Monday July 6th 2020

کننده اسکوپولامین نسبت به گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P<۰/۰۵) که نشان‌دهنده آسیب ناشی از اسکوپولامین بر حافظه فضایی است. در گروه‌های دریافت کننده اسکوپولامین و کروسین این زمان به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دریافت کننده اسکوپولامین افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۵) (نمودار ۲).

تمایل حیوان برای یافتن سکو طی تست پروپ در نمودار ۳ آمده است. میانگین فاصله حیوان تا مرکز سکو در گروه دریافت کننده اسکوپولامین نسبت به گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵) که نشان‌دهنده آسیب ناشی از اسکوپولامین بر حافظه فضایی است. در گروه‌های دریافت کننده اسکوپولامین و کروسین، این زمان به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دریافت کننده اسکوپولامین کاهش یافت (P<۰/۰۵) که نشان می‌دهد استفاده از کروسین به همراه اسکوپولامین موجب مهار اثرات اسکوپولامین می‌گردد (نمودار ۳).



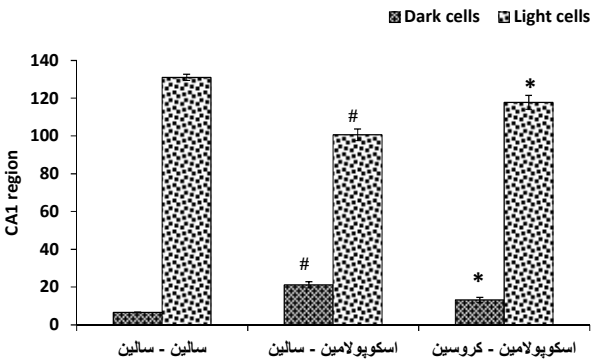
نمودار ۳: اثر کروسین بر آسیب به‌خاطرآوری یادگیری ناشی از اسکوپولامین موش‌های صحرایی مرتبط به تمایل حیوان برای یافتن سکو در تست پروب ماز آبی
 # P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل
** P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه اسکوپولامین – سالین*



شکل ۱ : نمایی از ناحیه CA1 هیپوکمپ در سه گروه کنترل (سالین – سالین)، اسکوپولامین - سالین و اسکوپولامین – کروسین
رنگ آمیزی کرزیل ویوله با بزرگ نمایی ۴۰۰ ×
پیکان‌ها نشان‌دهنده سلول‌های تیره و نوک پیکان‌ها نشان‌دهنده سلول‌های روشن است.

نتایج مربوط به تغییرات هیستولوژیک

تعداد نورون‌های تیره در موش‌های صحرایی که اسکوپولامین دریافت کردند؛ نسبت به گروه کنترل بیشتر بود و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۴ و شکل یک). دریافت کروسین در موش‌های صحرایی گروه اسکوپولامین - کروسین، تعداد سلول‌های تیره در ناحیه CA1 هیپوکمپ را نسبت به گروه اسکوپولامین به‌طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵) (نمودار ۴ و شکل یک). از طرف دیگر تعداد نورون‌های روشن در گروه اسکوپولامین نسبت به گروه کنترل کمتر بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۴ و (شکل یک). همچنین تعداد سلول‌های روشن در گروه اسکوپولامین نسبت به گروه اسکوپولامین – کروسین کمتر بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۴). این نتایج نشان‌دهنده اثرات نوروپروتکتیو



نمودار ٤ : سلول‌های تیره و روشن در ناحیه CA1 هیپوکامپ گروه‌های مورد آزمایش
 # P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل
** P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار با گروه اسکوپولامین – سالین*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 12:43 +0430 on Monday July 6th 2020

کروسین ناشی از کاهش تعداد سلول‌های آسیب‌دیده (سلول‌های تیره) در هیپوکامپ است.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه دریافت اسکوپولامین توسط موش‌های صحرایی سبب افزایش معنی‌دار سلول‌های تیره و چروکیده ناحیه CA1 هیپوکمپ گردید. سلول‌های تیره و چروکیده نشان‌دهنده تغییرات دژنراتیو در این ناحیه است (۳۴-۳۱). اگرچه مکانیسم دقیق این دژنراسیون باید مورد تحقیق بیشتری قرار گیرد؛ اما مکانیسم احتمالی از طریق Reactive oxygen species سبب آسیب اکسیداتیو در سلول‌های این ناحیه شده است (۳۲). از طرفی دریافت کروسین در این موش های صحرایی سبب کاهش تعداد نورون‌های تیره در ناحیه CA1 هیپوکمپ گروه دریافت کننده اسکوپولامین گردید. این تغییر احتمالاً ناشی از اثرات نوروپروتکتیو کروسین بوده است. کروسین یکی از اجزای اصلی زعفران بوده و به عنوان آنتی اکسیدان با رادیکال‌های آزاد مقابله نموده و فعالیت‌های یادگیری و حافظه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۸-۲۵). مطالعات قبلی نشان داده که اسکوپولامین استرس اکسیداتیو را در بدن القا می‌کند (۲۳). استرس اکسیداتیو به صورت عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های اکسیژن و توانایی بیولوژیک سیستم در خنثی کردن آنها یا ترمیم کردن صدمات ناشی از آنها تعریف می‌شود. شواهد متعددی نشان می‌دهد که بیماری‌هایی نظیر آلزایمر و پارکینسون در اثر آسیب سلولی و استرس اکسیداتیو ایجاد و یا تشدید می‌شوند (۳۸-۳۵). استرس اکسیداتیو ایجاد شده، در پاتوژنز بیماری‌های توام با زوال عقلی از جمله آلزایمر دخیل است (۳-۲و۷-۵). کروسین به‌عنوان یکی از اجزای اصلی زعفران دارای اثرات فارماکولوژیکی چندگانه‌ای است که از آن میان می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی و اثرات ضدالتهابی کروسین اشاره نمود (۴۴-۳۸). در میان نواحی مختلف مغزی قشر مغز و هیپوکامپ بالاترین حساسیت را به استرس اکسیداتیو نشان می‌دهند (۴۵).

در مطالعه ما اسکوپولامین باعث تخریب حافظه فضایی موش‌های صحرایی شد و کروسین اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از اسکوپولامین را به‌طور معنی‌داری برطرف نمود. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه با نتایج سایر مطالعات در این زمینه مطابقت دارد (۲۵-۲۲و۴۱-۳۷).

در مطالعه حاضر تزریق اسکوپولامین باعث اختلال یادگیری فضایی وابسته به هیپوکامپ طی مرحله آموزش گردید. این یافته با نتایج به دست آمده از دیگر مطالعات همخوانی دارد (۲۳). نتایج این مطالعه نشان داد که کروسین اثرات اختلال حافظه ناشی از اسکوپولامین را به‌طور معنی‌داری برطرف می‌کند. این نتایج، همسو با نتایج به دست آمده از مطالعات گذشته است که در آنها نشان داده شد زعفران و کروسین تخریب حافظه و یادگیری ناشی از عوامل آسیب‌رسان مانند فرمالدئید و اتانول را بهبود می‌بخشند و از اختلال حافظه شناختی جلوگیری نموده و مانع مهار LTP در هیپوکمپ می‌شوند (۴۳-۳۷). بنابر این از میان مکانیسم‌های مهم احتمالی باید به القای تقویت طولانی (LTP) هیپوکمپی که نوعی از شکل‌پذیری سیناپسی وابسته به فعالیت است؛ اشاره نمود که ممکن است اساس یادگیری باشد. مکانیسم احتمالی دیگر کروسین برای مهار تخریب حافظه و یادگیری فضایی، دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی است. احتمالاً کروسین از طریق دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند نورون‌های دستگاه عصب مرکزی را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کند (۴۳-۳۷) و از این طریق سبب کاهش یا مهار اختلالات حافظه ناشی از اسکوپولامین گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اثرات نوروتوکسیک اسکوپولامین می‌تواند سبب القا شکل‌گیری سلول‌های تیره در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش صحرایی گردد. از طرف دیگر دریافت کروسین سبب کاهش تعداد نورون‌های تیره در این ناحیه گردید که می‌تواند ناشی از اثرات نوروپروتکتیو کروسین بر هیپوکمپ باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۰۸۷) خانم افسانه طالبیان برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریحی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سمنان بود. همچنین نتیجه طرح مصوب (شماره ۱۱۳۱) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سمنان بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم به انجام رسید که در اینجا از آن معاونت محترم به‌خاطر تصویب طرح و حمایت مالی تشکر می‌نماییم.

References

1. El-Khadragy MF, Al-Olayan EM, Abdel Moneim AE. Neuroprotective effects of Citrus reticulata in scopolamine-induced dementia oxidative stress in rats. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2014;13(4): 684-90.

2. Granic I, Dolga AM, Nijholt IM, van Dijk G, Eisel UL. Inflammation and NF-kappaB in Alzheimer's disease and diabetes. J Alzheimers Dis. 2009; 16(4): 809-21. doi: 10.3233/JAD-2009-0976

3. Mandrekar-Colucci S, Landreth GE. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2010 Apr; 9(2): 156-67.

4. Müller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. Prog Neurobiol. 2008 Aug; 85(4): 393-406. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.002

5. Šalković-Petrišić M. Amyloid cascade hypothesis: is it true for sporadic Alzheimer's disease. Periodicum Biologorum. 2008; 110(1): 17-25.

6. Weerateerangkull P, Praputpittaya C, Banjerdpongchai R.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 12:43 +0430 on Monday July 6th 2020

Effects of Ascorbic acid on streptozotocin-induced oxidative stress and memory impairment in rats. Thai Journal of Physiological Sciences. 2008; 20(2): 54-61.

7. Howes MJ, Perry NS, Houghton PJ. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. Phytother Res. 2003 Jan; 17(1): 1-18. doi: 10.1002/ptr.1280

8. HOU XQ, WU DW, ZHANG CX, YAN R, YANG C, RONG CP, et al. Bushen Yizhi formula ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress related neuronal apoptosis in scopolamine - induced senescence in mice. Int J Mol Med. 2014 Aug; 34(2): 429-39. doi: 10.3892/ijmm.2014.1801

9. Azami N, piri M, Jahanshahi M, oryan S, Babapour V, zarrindast M R. The role of CA1 α-adrenoceptor on scopolamine induced memory impairment in male rats. Physiol Pharmacol. 2010; 14(1): 66-77.

10. Jahanshahi M, Nickmahzar EG, Babakordi F. Effect of Gingko biloba extract on scopolamine-induced apoptosis in the hippocampus of rats. Anat Sci Int. 2013 Sep; 88(4): 217-22. doi: 10.1007/s12565-013-0188-8

11. Eskandary A, Moazedi AA, Najaphzadevarzi H, Akhond MR. [Effect of donepezil hydrochloride on reference and working memory impairment after bilateral electrical lesion of nucleus basalis magnocellularis in rats model of Alzheimer disease]. J Gorgan Univ Med Sci. 2018; 20(1): 36-42. [Article in Persian]

12. Zamani N, Moazedi AA, Afarinesh Khaki MR, Pourmehdi Boroujeni M. [Effect of memantine on spatial learning and memory in electrical leisions model of nucleus basalis magnocellularis: animal model of Alzheimer's disease]. J Gorgan Univ Med Sci. 2018; 20(1): 43-50. [Article in Persian]

13. Farbood Y, Sarkaki AR, Shahrani Korrani M, Saadatfard M. [Effect of grape seed extract on improving memory and learning impairment induced by streptozotocin in male rat]. J Gorgan Uni Med Sci. 2016; 18(2): 27-34. [Article in Persian]

14. Christodoulou E, Kadoglou NP, Kostomitsopoulos N, Valsami G. Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. J Pharm Pharmacol. 2015 Dec; 67(12): 1634-49. doi: 10.1111/jphp.12456

15. Samarghandian S, Shoshtari ME, Sargolzaei J, Hossinimoghadam H, Farahzad JA. Anti-tumor activity of safranal against neuroblastoma cells. Pharmacogn Mag. 2014 Apr; 10(Suppl 2): S419-24. doi: 10.4103/0973-1296.133296

16. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L.). Exp Biol Med (Maywood). 2002 Jan; 227(1): 20-25.

17. Abdullaev FI, Riverón-Negrete L, Caballero-Ortega H, Manuel Hernández J, Pérez-López I, Pereda-Miranda R, et al. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (Crocus sativus L.). Toxicol In Vitro. 2003 Oct-Dec; 17(5-6): 731-36.

18. Khazdair MR, Boskabady MH, Hosseini M, Rezaee R, Tsatsakis AM. The effects of Crocus sativus (saffron) and its constituents on nervous system: A review. Avicenna J Phytomed. 2015 Sep-Oct; 5(5): 376-91.

19. He SY, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu GL, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. Life Sci. 2005 Jul; 77(8): 907-21. doi: 10.1016/j.lfs.2005.02.006

20. Lee IA, Lee JH, Baek NI, Kim DH. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of Gardenia jasminoides and its metabolite Crocetin. Biol Pharm Bull. 2005 Nov; 28(11): 2106-10.

21. Martin G, Goh E, Neff AW. Evaluation of the developmental toxicity of crocetin on Xenopus. Food Chem Toxicol. 2002 Jul; 40(7): 959-64.

22. Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. Phytother Res. 2000 May; 14(3): 149-52.

23. Ghadami M R, Pourmotabbed A. The effect of Crocin on scopolamine induced spatial learning and memory deficits in rats. Physiol Pharmacol. 2009; 12(4): 287-95.

24. Ghotbeddin Z, Fatemi-Tabatabaei SR, Tabandeh MR, Mirzabeigi M, Badripour N, Amiri R. [Effect of crocin on inhibitory avoidance memory, balance and explorative behaviours following cisplatin administration in rat]. Feyz. 2017; 21(2): 118-25. [Article in Persian]

25. Finley JW, Gao S. A Perspective on Crocus sativus L. (Saffron) Constituent Crocin: A Potent Water-Soluble Antioxidant and Potential Therapy for Alzheimer's Disease. J Agric Food Chem. 2017 Feb; 65(5): 1005-20. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04398

26. Tamaddonfard E, Farshid AA, Asri-Rezaee S, Javadi S, Khosravi V, Mirfakhraee Z. Crocin Improved Learning and Memory Impairments in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Iran J Basic Med Sci. 2013 Jan; 16(1): 91-100.

27. Ghadrdoost 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 Sep; 667(1-3): 222-29. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.012

28. 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 Jan-Apr; 14(1-2): 59-65.

29. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Brain Res Rev. 2001 Aug; 36(1): 60-90.

30. Bagheri-Abassi F, Alavi H, Mohammadipour A, Motejaded F, Ebrahimzadeh-Bideskan A. The effect of silver nanoparticles on apoptosis and dark neuron production in rat hippocampus. Iran J Basic Med Sci. 2015 Jul; 18(7): 644-48.

31. Ling EA, Paterson JA, Privat A, Mori S, Leblond CP. Investigation of glial cells in semithin sections. I. Identification of glial cells in the brain of young rats. J Comp Neurol. 1973 May; 149(1): 43-71. doi: 10.1002/cne.901490104

32. Narayanan SN, Kumar RS, Potu BK, Nayak S, Bhat PG, Mailankot M. Effect of radio-frequency electromagnetic radiations (RF-EMR) on passive avoidance behaviour and hippocampal morphology in Wistar rats. Ups J Med Sci. 2010 May; 115(2): 91-6. doi: 10.3109/03009730903552661

33. KAFA IM, ARI I, KURT, MA. Morphometric Investigation of Neurons in the Hippocampal CA1, CA3 Areas and Dentate Gyrus in a Rat Model of Sepsis. Int J Morphol. 2010; 28(1): 183-92. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000100026

34. Alizamir T, Akbari M, Mokhtari T, khaksarian M, Hassanzadeh G. Associated functional motor recovery induced by Intracerebroventricular (ICV) microinjection of Wharton's jelly mesenchymal stem cells following brain ischemia/reperfusion injury in rat: Decreased dark neurons and Bax gene expression in the cerebral cortex. J Contemp Med Sci. 2017; 3(12): 319-25.

35. Futatsugi A, Kato K, Ogura H, Li ST, Nagata E, Kuwajima G, et al. Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. Neuron. 1999 Nov; 24(3): 701-13.

36. Doyère V, Burette F, Negro CR, Laroche S. Long-term potentiation of hippocampal afferents and efferents to prefrontal cortex: implications for associative learning. Neuropsychologia. 1993 Oct; 31(10): 1031-53.

37. Pitsikas N, Sakellaridis N. Crocus sativus L. extracts

www.SID.ir

Archive of SID

antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. Behav Brain Res. 2006 Oct; 173(1): 112-15. doi: 10.1016/j.bbr.2006.06.005

38. Pitsikas N, Zisopoulou S, Tarantilis PA, Kanakis CD, Polissiou MG, Sakellaridis N. Effects of the active constituents of Crocus sativus L., crocins on recognition and spatial rats' memory. Behav Brain Res. 2007 Nov; 183(2): 141-46. doi: 10.1016/j.bbr.2007.06.001

39. Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. Brain Res. 2007 Mar; 1138: 86-94. doi: 10.1016/j.brainres.2006.12.064

40. Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. Biochim Biophys Acta. 2007 Apr; 1770(4): 578-84. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.11.012

41. Shahabadi MM, Mousavi SZ, Mousavi SE, Ezzati HM. Crocin Affects Passive Avoidance Memory Following Formaldehyde-Induced Neurotoxicity in a Rat Model. Adv J Toxicol Curr Res. 2017; 1(1): 15-22.

42. Rajaei Z, Hosseini M, Alaei H. Effects of crocin on brain oxidative damage and aversive memory in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. Arq Neuropsiquiatr. 2016 Sep; 74(9): 723-29. doi: 10.1590/0004-282X20160131

43. Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y et al. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of Gardenia jasminoides Ellis and Crocus sativus L.:a relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. Food Chemistry. 2008; 109(3): 484-92. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.080

44. Nam KN, Park YM, Jung HJ, Lee JY, Min BD, Park SU, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. Eur J Pharmacol. 2010 Dec; 648(1-3): 110-16. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.003

45. Zhang GF, Zhang Y, Zhao G. Crocin protects PC12 cells against MPP(+)-induced injury through inhibition of mitochondrial dysfunction and ER stress. Neurochem Int. 2015 Oct; 89: 101-10. doi: 10.1016/j.neuint.2015.07.011

Downloaded from goums.ac.ir at 12:43 +0430 on Monday July 6th 2020

www.SID.ir