

بررسی اثر کروسین متعاقب ایجاد مدل صرعی با هیپوکسی بر حافظه احترازی و فعالیت حرکتی در موش صحرایی جوان

احمد اسکندریان^۱، زهره قطب‌الدین^{۲*}، سیدرضا فاطمی طباطبایی^۳، جواد جمشیدیان^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۹/۱۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۱۱/۲۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: هیپوکسی شایع‌ترین علت تشنج در نوزادان است. تشنجهای ناشی از هیپوکسی باعث افزایش دائمی تحریک‌پذیری نورون‌ها می‌شود و با تغییر فعالیت و انعطاف‌پذیری سیناپسی منجر به اختلال حافظه می‌شود. کروسین (*Crocus sativus* L.) یک کاروتنوئید محلول در آب و از مهم‌ترین اجزای فعال زعفران است و بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که در بهبود یادگیری، حافظه و فعالیت حرکتی نقش مهمی دارد. در این کار اثر کروسین متعاقب ایجاد مدل صرعی با هیپوکسی بر حافظه احترازی و فعالیت حرکتی در موش صحرایی جوان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار: در این آزمایش ۴۰ سر موش صحرایی جوان (نژاد ویستار) با محدوده سنی (۱۰-۱۲) روزه، وزن تقریبی (۱۸-۲۲) گرم در دمای اتاق (۲۳±۲) نگهداری شدند. موش‌ها به ۴ گروه آزمایشی تقسیم شدند: شاهد، کروسین، هیپوکسی تنها و گروه هیپوکسی تیمار شده با کروسین. به‌منظور ایجاد هیپوکسی موش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در جعبه هیپوکسی با ۷ درصد اکسیژن و ۹۳ درصد نیتروژن قرار گرفتند. موش‌های دریافت‌کننده کروسین پس از طی دوران شیردهی، کروسین را به میزان ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و به مدت ۲۱ روز به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند. در پایان، حافظه احترازی غیرفعال، تعادل و فعالیت حرکتی به ترتیب با دستگاه‌های شاتل باکس، روتارود و جعبه باز سنجیده شدند.

یافته‌ها: نتایج یک کاهش تأخیر در زمان ورود به اتاق تاریک و افزایش زمان سپری‌شده در اتاق تاریک را در آزمون اجتنابی غیرفعال پس از هیپوکسی نشان داد ($p < 0.05$) که با پس درمانی کروسین مهار شد. هیپوکسی همچنین باعث اختلال تعادل و فعالیت حرکت در آزمون‌های روتارود و میدان باز شد ($p < 0.05$) که با تیمار کروسین مهار شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که هیپوکسی باعث اختلال یادگیری اجتنابی غیرفعال، تعادل و فعالیت حرکتی می‌شود و تیمار با کروسین باعث بهبود این تغییرات می‌شود.

کلیدواژه‌ها: کروسین، هیپوکسی، حافظه احترازی غیرفعال، فعالیت حرکتی، موش صحرایی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره دوازدهم، ص ۸۳۶-۸۲۶، اسفند ۱۳۹۶

آدرس مکاتبه: اهواز، بلوار گلستان، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، تلفن: ۰۹۱۶۶۰۰۳۶۵۵

Email: z.ghotbeddin@scu.ac.ir

مقدمه

از این مدل برای ایجاد تشنج در یک دوره حساس از رشد سیناپسی (روز ۱۰-۱۲ پس از تولد) در جوندگان استفاده می‌شود (۳). هیپوکسی موجب بروز تشنجهای خود به خودی در مراحل بعدی زندگی نیز می‌شود (۴). اختلال در جریان خون مغز و متابولیسم آن به دنبال هیپوکسی می‌تواند منجر به تغییرات نورو پاتولوژی در درازمدت و اختلال شناخت و یادگیری شود (۵). تشنجهای ناشی از

هیپوکسی یک بیماری شایع است که به دلیل نرسیدن جریان خون و اکسیژن کافی به مغز باعث بروز تشنج در نوزادان می‌شود و عامل اصلی برای بروز ۲/۳ از تشنجهای دوران نوزادی است (۱). هیپوکسی باعث تشنجهای خود به خودی، حرکت سر و اندام، پرش‌های میوکلونیک و درنهایت تشنج تونیک-کلونیک می‌شود (۲).

^۱ دانشجویآموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

هیپوکسی باعث افزایش تحریک‌پذیری نورون‌ها و طولانی شدن مدت‌زمان امواج تخلیه متعاقب می‌شود. این افزایش تحریک‌پذیری دائمی است و در هیپوکمپ موش‌های بالغ نیز دیده می‌شود و می‌تواند منجر به تغییر فعالیت و انعطاف‌پذیری سیناپسی شود. انعطاف‌پذیری سیناپسی پدیده فیزیولوژیک مهمی است که در پردازش اطلاعات و ذخیره آن در مغز نقش مهمی دارد و تغییر فعالیت و انعطاف‌پذیری سیناپسی به دنبال هیپوکسی یا سایر مدل‌های ایجادکننده تشنج می‌تواند منجر به اختلال حافظه شود (۶). تحقیقات نشان می‌دهند که هیپوکسی با افزایش تجمع بتا آمیلوئید، افزایش فسفوریلاسیون پروتئین Tau، اختلال در عملکرد سد خونی-مغزی و دژنره شدن نورون در پاتوژنز بیماری آلزایمر نقش دارد (۷).

در مطالعه انجام‌شده اعمال هیپوکسی در اواخر دوران بارداری و نزدیک تولد در خرگوش باعث اختلال در کنترل حرکت و هاپیر تونیا نوزادان آن‌ها می‌شود و نتایج بافت‌شناسی نیز تأییدکننده اختلال حاد در مسیر حرکتی زیر قشری یعنی تالاموس و عقده‌های قاعده‌ای است (۸). استریاتوم از نواحی مغزی است که در ارتباط با کنترل حرکت است و به شدت تحت تأثیر هیپوکسی قرار می‌گیرد. هیپوکسی با اختلال در این ساختار و قشر حسی-حرکتی باعث عدم کنترل حرکت و تعادل می‌شود (۹).

کاربرد ترکیبات مؤثره گیاهی در سال‌های اخیر به‌منظور پیشگیری یا کاهش عوارض بیماری‌های نورودژنراتیو موردتوجه قرار گرفته است. یکی از این ترکیبات گیاهی که از نظر بالینی در بیماری آلزایمر موردتوجه قرار گرفته، کروسین است. زعفران غنی از کروسین است.

کروسین (*Crocus sativus* L.) یک کاروتنوئید محلول در آب و از مهم‌ترین اجزای فعال زعفران است. مطالعات نشان می‌دهند که عصاره زعفران دارای خواص ضد تشنج، ضدافسردگی، ضدالتهاب، ضد تومور، خواص آنتی‌اکسیدانی فراوانی است و همچنین در یادگیری، بهبود حافظه و انتشار اکسیژن در بافت‌های مختلف نقش به‌سزایی دارد (۱۰).

کروسین با مهار باز جذب دوپامین و نوراپی نفرین فعالیت حرکتی را کاهش می‌دهد و با اثرات آنتی‌اکسیدانی خود باعث افزایش شناخت و حافظه مختل شده در موش‌هایی می‌شود که تحت اثر استرس مزمن قرار گرفته‌اند (۱۱). همچنین با جلوگیری از مهار گیرنده NMDA در نورون‌های هیپوکامپ از مهار LTP و اختلال حافظه ایجادشده به دنبال مصرف اتانول در موش‌های صحرایی جلوگیری می‌کند (۱۲).

کروسین به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان و تقویت‌کننده سیستم کولینرژیک نقش بسزایی در تقویت حافظه فضایی بازی می‌کند (۱۳) و مطالعات Pitsikas و همکاران نشان داده است که کروسین می‌تواند در ذخیره و بازیابی اطلاعات نقش مفیدی داشته باشد (۱۴).

مطالعات جدید نشان می‌دهد که کروسین با جلوگیری از تشکیل بتا آمیلوئید و انهدام بتا آمیلوئیدهای تجمع یافته خاصیت ضد آمیلوئیدوزنیک دارد (۱۵). همچنین باعث آنتاگونیزه کردن اختلال حافظه ایجادشده به دنبال تزریق STZ در مدل آلزایمر اسپورادیک می‌شود (۱۶).

با توجه به اینکه یکی از عوارض طولانی‌مدت مدل تشنجی هیپوکسی اختلال حافظه است و مطالعات زیادی به اهمیت نقش کروسین بر سیستم عصبی مرکزی و حافظه و یادگیری اشاره دارند، تحقیق حاضر باهدف بررسی اثر کروسین متعاقب ایجاد مدل صرعی با هیپوکسی بر حافظه احترازی و فعالیت حرکتی در موش صحرایی جوان طراحی گردید.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار استفاده شد. تمام مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز طراحی و اجرا شد. برای انجام این مطالعه ۴۰ موش صحرایی جوان با وزن تقریبی (۲۲-۱۸) گرم انتخاب شدند. حیوانات در طول مطالعه در شرایط استاندارد، ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ثابت (55 ± 5 درصد) نگهداری شدند. تمام حیوانات به‌طور آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. یک هفته پس از سازش با شرایط محیطی، حیوانات به‌طور تصادفی در ۴ گروه شاهد، کروسین، هیپوکسی و هیپوکسی+کروسین قرار گرفتند.

موش‌های گروه هیپوکسی به مدت ۱۵ دقیقه در جعبه هیپوکسی با شدت ۷ درصد اکسیژن و ۹۳ درصد نیتروژن قرار گرفتند و پس از طی دوران شیردهی، به مدت ۲۱ روز سالیان دریافت کردند (۱۷). موش‌های دریافت‌کننده کروسین پس از طی دوران شیردهی، کروسین را به میزان ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با مدت‌زمان مشابه گروه هیپوکسی دریافت کردند (۱۸). گروه شاهد نیز به مدت ۲۱ روز نرمال سالیان دریافت کردند. گروه دریافت‌کننده هیپوکسی+کروسین پس از اعمال هیپوکسی، کروسین را به میزان

این دستگاه از دو محفظه تاریک و روشن تشکیل شده است که در محفظه تاریک حیوان شوک دریافت می‌کند. روش کار با این دستگاه شامل ۳ مرحله آموزش، آزمون و مرحله اکتساب (به خاطر آوری) است.

مرحله آموزش: حیوان فقط با دستگاه آشنا می‌شد (بدون اعمال شوک)

مرحله آزمون: ۲۴ ساعت بعد از آموزش، شوک با شدت جریان مشخص (فرکانس ۵۰ هرتز، شدت ۰/۵ میلی‌آمپر و به مدت ۲ ثانیه) به پای حیوان در محفظه تاریک اعمال می‌شد.

مرحله اکتساب: به منظور تست به خاطر آوری و حافظه درازمدت، ۲۴ ساعت بعد از آموزش، موش در قسمت روشن قرار داده می‌شد و مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک و زمان سپری شده در محفظه تاریک به عنوان شاخص‌های حافظه اجتنابی درازمدت اندازه‌گیری می‌شدند (۲۰).

روش آنالیز آماری:

کلیه داده‌های حاصل از این مطالعه به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (Mean $\pm$ SEM) ارائه و تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از برنامه آماری SPSS version 21 با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری $p < 0.05$ انجام شد. تفاوت آماری پارامترهای مختلف در بین گروه‌های مختلف در صورت نرمال و همگن بودن داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون متعاقب Tukey انجام شد و در صورت عدم نرمال بودن یک پارامتر در گروه‌های آزمایشی از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد.

یافته‌ها

میانگین تعداد دفعات شوک در گروه شاهد، کروسین و هیپوکسی+کروسین، ۱ به دست آمد. این میانگین در گروه هیپوکسی 0.26 ± 1.62 بود. مقایسه میانگین تعداد دفعات دریافت شوک نشان داد که تعداد دفعات دریافت شوک در گروه هیپوکسی نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0.01$) (شکل ۱).

۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و به مدت ۲۱ روز دریافت کردند. تمام تزریق‌ها به روش درون صفاقی انجام شد.

کلیه آزمایش‌ها در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و در زمان روشنایی، بین ساعت ۸ صبح الی ۴ بعدازظهر به منظور جلوگیری از تأثیر ریتم شبانه‌روزی حیوان بر آزمایش‌ها انجام گرفت. حیوانات یک ساعت قبل از شروع آزمون به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا با شرایط آزمایشگاه عادت کنند.

در تمامی گروه‌ها پس از اتمام دوره تزریق، به منظور ارزیابی نقص حرکتی احتمالی، تعادل، رفتار جستجوگرانه و حافظه احترازی حیوانات از آزمون‌های جعبه باز^۱، روتارود^۲ و شاتل باکس^۳ استفاده شد.

سنجش تعادل از طریق دستگاه روتارود:

برای بررسی فعالیت‌های تعادلی و قدرت هماهنگی حرکتی بین اندام‌ها از دستگاه روتارود استفاده شد. برای ارزیابی فعالیت تعادلی توسط این دستگاه حیوان روی میله افقی چرخنده در حال چرخش که سرعت آن از ۵ به ۴۵ دور در دقیقه در مدت ۳۰۰ ثانیه افزایش داده می‌شد، قرار می‌گرفت و زمان حفظ تعادل و باقی ماندن روی میله برای هر حیوان ثبت می‌شد. ابتدا به هر حیوان دو بار فرصت برای عادت کردن و تطابق با دستگاه داده می‌شد و سپس سه بار دیگر حیوان روی دستگاه قرار می‌گرفت و میانگین زمان به دست آمده محاسبه می‌شد (۱۹).

سنجش فعالیت حرکتی از طریق دستگاه میدان باز:

تجهیزات این آزمایش شامل یک صفحه چهارگوش ساخته شده از چوب سیاه است و کف آن با خطوطی به ۲۵ مربع تقسیم شده است. در ابتدا هر موش در مرکز صفحه قرار داده می‌شد و فعالیت آن برای ۵ دقیقه ثبت می‌شد و سپس پارامترهای رفتاری شامل: کل مسافت جابه‌جاشده و فرکانس بلند شدن روی دو پا، ثبت و مورد بررسی قرار می‌گرفت (۱۹).

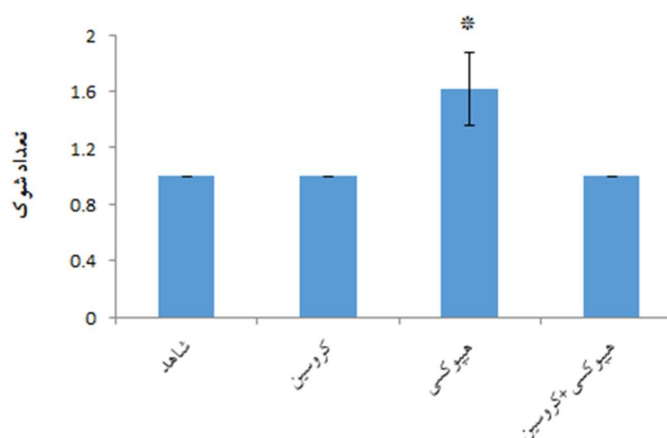
سنجش حافظه احترازی غیرفعال از طریق دستگاه شاتل

باکس:

³ Shuttle Box

¹ Open filed

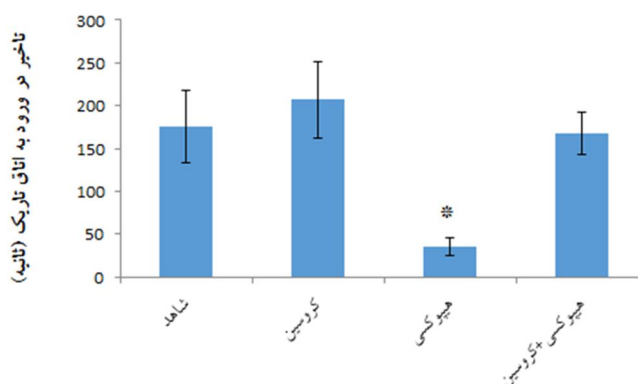
² Rotarod



شکل (۱): مقایسه میانگین تعداد دفعات شوک دریافتی در گروه‌های مورد مطالعه. × نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی با گروه شاهد ($p=0/003$)، گروه کروسین ($p=0/006$) و گروه هیپوکسی + کروسین ($p=0/003$) است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده‌اند ($n=10$).

کاهش معنی‌دار مدت‌زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک در گروه هیپوکسی نسبت به گروه‌های کنترل و هیپوکسی + کروسین بود ($p<0/05$). این کاهش در گروه هیپوکسی نسبت به گروه کروسین نیز معنی‌دار بود ($p<0/01$) (شکل ۲).

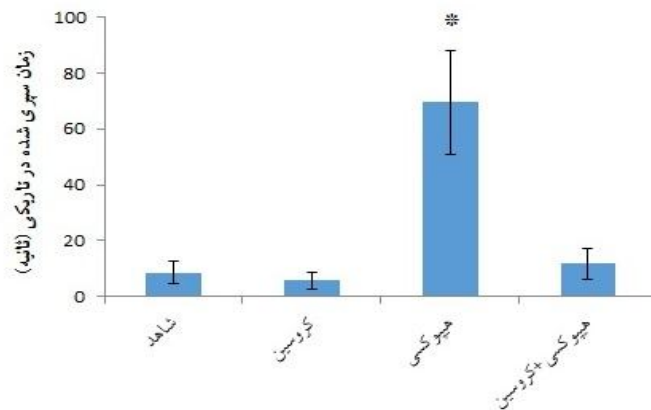
میانگین مدت‌زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک در گروه شاهد 176 ± 42 ثانیه و در گروه‌های کروسین، هیپوکسی و گروه هیپوکسی + کروسین به ترتیب 207 ± 50 ، 36 ± 11 و 168 ± 26 ثانیه به دست آمد. نتایج بیانگر



شکل (۲): مقایسه میانگین مدت‌زمان تأخیر در ورود به اتاق تاریک ۲۴ ساعت پس از اعمال شوک (مرحله به خاطر آوری) در گروه‌های مورد مطالعه. × نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی با گروه شاهد ($p=0/002$)، گروه کروسین ($p=0/008$) و گروه هیپوکسی + کروسین ($p=0/003$) است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده‌اند ($n=10$).

معنی‌دار مدت‌زمان سپری‌شده در اتاق تاریک در گروه هیپوکسی نسبت به گروه‌های شاهد، کروسین و گروه هیپوکسی + کروسین بود ($p<0/01$). در بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۳).

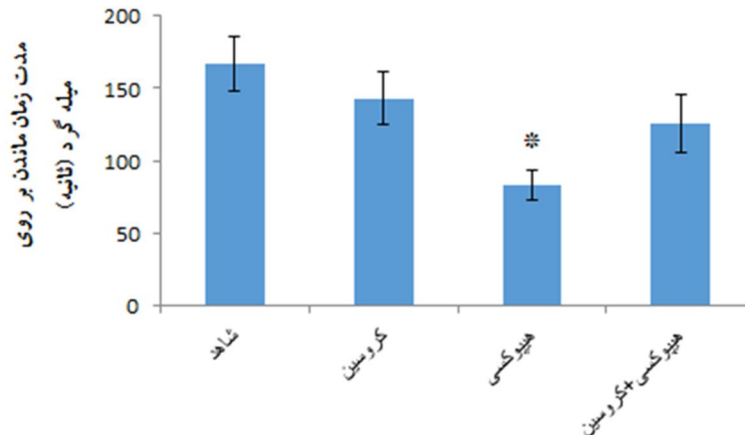
میانگین مدت‌زمان سپری‌شده در جعبه تاریک ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک در گروه شاهد 9 ± 4 ثانیه و در گروه‌های کروسین، هیپوکسی و گروه دریافت‌کننده هیپوکسی + کروسین به ترتیب ۳، 6 ± 19 و 12 ± 6 به دست آمد. نتایج حاصل بیانگر افزایش



شکل (۳): مقایسه میانگین مدت زمان سپری در اتاقک تاریک ۲۴ ساعت پس از اعمال شوک (مرحله به خاطر آوری) در گروه‌های مورد مطالعه. × نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی با شاهد ($p=0/007$) کروسین ($p=0/008$) و گروه هیپوکسی + کروسین ($p=0/009$) است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده‌اند ($n=10$).

مدت زمان ماندن بر روی دستگاه روتارود بیانگر کاهش معنی‌دار این مدت زمان در گروه هیپوکسی نسبت به گروه‌های شاهد ($p<0/01$) و گروه کروسین ($p<0/05$) است. در بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت (شکل ۴).

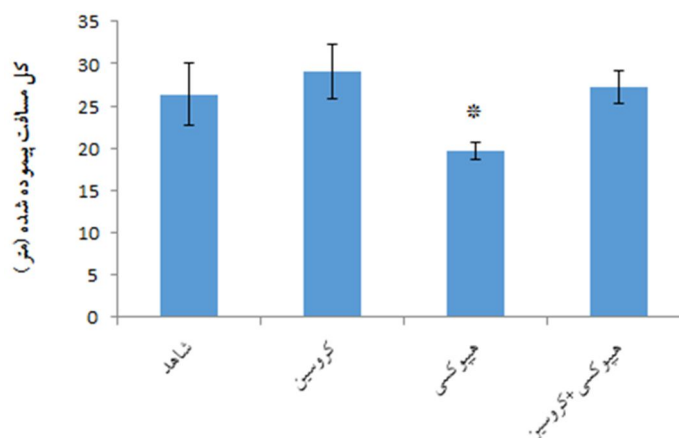
جهت اندازه‌گیری تعادل حرکتی از دستگاه روتارود استفاده شد. میانگین مدت زمان ماندن بر روی دستگاه در گروه شاهد 167 ± 19 ثانیه و در گروه کروسین، هیپوکسی و هیپوکسی + کروسین به ترتیب 144 ± 18 ، 84 ± 10 و 126 ± 21 ثانیه به دست آمد. مقایسه میانگین



شکل (۴): مقایسه میانگین مدت زمان ماندن بر روی میله گرد پس از سه بار آزمایش با استفاده از آزمون روتارود در گروه‌های مورد مطالعه. × نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی با گروه شاهد ($p=0/003$) و گروه کروسین ($p=0/002$) است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده‌اند ($n=10$).

معنی‌داری بین گروه هیپوکسی با کروسین وجود دارد ($p<0/05$). و میانگین کل مسافت پیموده شده در گروه هیپوکسی نسبت به گروه کروسین کاهش معنی‌داری را نشان داد. در بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۵).

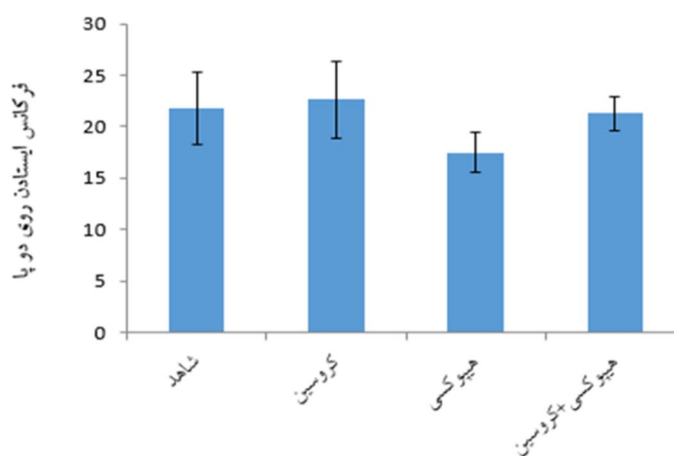
میانگین کل مسافت طی شده با استفاده از آزمون جعبه باز در گروه شاهد 27 ± 4 متر و در گروه کروسین، هیپوکسی و هیپوکسی + کروسین به ترتیب 29 ± 3 ، 20 ± 2 و 27 ± 2 متر به دست آمد. مقایسه میانگین کل مسافت طی شده نشان داد که اختلاف



شکل (۵): مقایسه میانگین مسافت طی شده در آزمون جعبه باز بین گروه‌های مورد مطالعه. * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی با کروسین ($p=0/03$) است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده‌اند ($n=10$).

در مقایسه میانگین تعداد بلند شدن روی دو پا بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت (شکل ۶).

میانگین کل تعداد بلند شدن روی دو پا با استفاده از آزمون جعبه باز در گروه شاهد 22 ± 4 و در گروه کروسین، هیپوکسی و هیپوکسی+کروسین به ترتیب 23 ± 4 ، 18 ± 2 و 21 ± 2 به دست آمد.



شکل (۶): مقایسه میانگین تعداد بلند شدن روی دو پا با استفاده از آزمون جعبه باز بین گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده‌اند ($n=10$).

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که اشاره شد یکی از عوارض هیپوکسی که در درازمدت بروز می‌کند، اختلال حافظه و یادگیری است. کاربرد ترکیبات مؤثره گیاهی در سال‌های اخیر به‌منظور پیشگیری یا کاهش عوارض بیماری‌های نورودژنراتیو مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این ترکیبات گیاهی که از نظر بالینی در بیماری‌های نورودژنراتیو مورد توجه قرار گرفته، کروسین است.

یافته‌های حاصل از آزمون شاتل باکس بیانگر این مطلب است که در مرحله به‌خطرآوری پس از اعمال شوک، گروه دریافت‌کننده هیپوکسی در مقایسه با سایر گروه‌ها، تأخیر کم‌تری برای ورود به محفظه تاریک شاتل باکس داشتند، درحالی‌که مدت‌زمان بیشتری در اتاقک تاریک سپری کردند، که این مسئله نشان‌دهنده اختلال حافظه احترازی در گروه دریافت‌کننده هیپوکسی است. در راستای این نتایج مطالعات پیشین نشان داده‌اند که یکی از عوارض مهم

تشنج ناشی از هیپوکسی در بدو تولد، اختلال حافظه است که در درازمدت خود را نشان می‌دهد. مطالعات Jensen و همکاران نشان داده است که تشنجهای ناشی از هیپوکسی باعث افزایش تحریک‌پذیری نورون‌ها و طولانی شدن مدت‌زمان امواج تخلیه متعاقب می‌شود. این افزایش تحریک‌پذیری دائمی است و در هیپوکمپ موش‌های بالغ نیز دیده می‌شود و می‌تواند منجر به تغییر فعالیت و انعطاف‌پذیری سیناپسی شود (۳).

نتایج مطالعه Ikeda و همکاران در سال ۲۰۰۱ بیانگر افزایش خطای حافظه مرجع در ماز شعاعی ۸ بازویی در موش‌هایی است که در روز هفتم پس از تولد در معرض ایسکمی-هیپوکسی قرار گرفتند. به نظر می‌رسد اختلال در مسیر کولینرژیک که از مغز جلویی به سمت کورتکس می‌رود، می‌تواند به‌عنوان مکانیسم احتمالی اختلال حافظه بلندمدت مطرح باشد (۲۱).

تحقیقات Zhang و Le در سال ۲۰۱۰ نیز نشان می‌دهد که افزایش تجمع بتا آمیلوئید، افزایش فسفوریلاسیون پروتئین Tau، اختلال در عملکرد سد خونی-مغزی و دژنره شدن نورون در پاتوژنز بیماری آلزایمر و اختلال شناخت متعاقب اعمال هیپوکسی نقش دارد (۷).

در تحقیقی جدید Arteaga و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که هیپوکسی-ایسکمی در ابتدای تولد باعث مرگ یا اختلال نورولوژیک حاد نظیر فلج مغزی، اختلال حرکت یا کاهش شناخت در نوزادان می‌شود. به دنبال هیپوکسی-ایسکمی آبخاری از وقایع سیگنالینگ اتفاق می‌افتد که منجر به مرگ سلولی می‌شود. کاهش اکسیژن خون باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که در نهایت منجر به افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود. افزایش تولید رادیکال‌های آزاد با تغییر عملکرد پمپ‌های غشایی باعث آزاد شدن گلوتامات بیشتر و فعال شدن بیشتر گیرنده‌های NMDA، سمیت تحریکی، فعال شدن مسیرهای آپوپتوز، تخریب DNA و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۲۲).

با توجه به اینکه افزایش استرس اکسیداتیو به‌عنوان مکانیسم جدیدی برای اختلال شناخت ناشی از هیپوکسی مطرح است، کاربرد ترکیبات آنتی‌اکسیدان نظیر کروسین می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی درمانی جدید مطرح باشد.

یافته‌های حاصل از آزمون شاتل باکس بیانگر بهبود حافظه احترازی در گروه دریافت‌کننده کروسین در مقایسه با گروه هیپوکسی بود. خاصیت آنتی‌اکسیدانی زعفران و کروسین می‌تواند به‌عنوان یک مکانیسم احتمالی برای محافظت نورون‌های سیستم عصبی مرکزی در مقابل آسیب اکسیداتیو ایجادشده در اختلال حافظه ناشی از هیپوکسی مطرح باشد. در این راستا مطالعات Ghadrdoost و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان می‌دهد که عصاره

زعفران دارای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود باعث کاهش استرس اکسیداتیو ایجادشده در هیپوکمپ به دنبال استرس مزمن می‌شود (۱۱). کروسین به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان قوی نقش مهمی در تقویت سیستم کولینرژیک دارد. این ترکیب باعث مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) و افزایش فعالیت استیل کولین در محل سیناپس می‌شود. از آنجایی که پروچکشن‌های سیستم کولینرژیک از ناحیه مغز جلویی به نئوکورتکس نقش بسزایی در حافظه فضایی ایفا می‌کند، بنابراین کروسین با تقویت این سیستم می‌تواند در بهبود یادگیری و حافظه نقش داشته باشد (۲۳).

مطالعات دیگر نشان می‌دهد که کروسین با جلوگیری از تشکیل بتا آمیلوئید و انهدام بتا آمیلوئیدهای تجمع یافته خاصیت ضد آمیلوئیدوژنیک دارد (۲۴).

تعادل، میزان کل جابه‌جایی و تعداد بلند شدن روی دو پا در گروه هیپوکسی نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری را نشان داد. در راستای این نتایج مطالعه جدیدی که در سال ۲۰۱۷ انجام‌شده، نشان می‌دهد که هیپوکسی در موش‌های تازه متولدشده باعث اختلال عملکرد حرکتی و تغییر مورفولوژی عضله می‌شود. جسم مخطط از ساختارهای مهم مغزی است که در ارتباط با کنترل حرکت است و به شدت تحت تأثیر هیپوکسی قرار می‌گیرد. مطالعات نشان می‌دهند که حجم جسم مخطط بعد از هیپوکسی تا ۵۰٪ کاهش می‌یابد. این ساختار مهم مغزی باعث تعدیل پاسخ به نواحی حرکتی دیگر مغز نظیر کورتکس می‌شود (۲۵).

همچنین قرار گرفتن در معرض هیپوکسی در دوران پس از تولد باعث کاهش حجم نیمکره‌های مغزی، هیپوکمپ و کورتکس و ماده سفید می‌شود. علاوه بر این اختلال تعادل نیز در حیوانات آزمایشگاهی مشاهده می‌شود (۲۶).

شواهد کلینیکی نیز به نقص سیستم حسی-حرکتی در درازمدت بعد از هیپوکسی اشاره دارند (۲۷).

در مطالعه دیگر اعمال هیپوکسی در اواخر دوران بارداری و نزدیک تولد در خرگوش باعث اختلال در کنترل حرکت و هاپیر تونیا نوزادان آن‌ها می‌شود و نتایج بافت‌شناسی نیز تأییدکننده اختلال حاد در مسیر حرکتی زیر قشری یعنی تالاموس و عقده‌های قاعده‌ای است (۸).

مکانیسم احتمالی برای کاهش حجم نواحی مهم مرتبط با کنترل حرکت به دنبال هیپوکسی، افزایش رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو است (۲۲).

تعادل، میزان کل جابه‌جایی و تعداد بلند شدن روی دو پا در گروه دریافت‌کننده کروسین نسبت به گروه هیپوکسی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. در این راستا مطالعه Hosseini و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان می‌دهد که تجویز کروسین با دوز

پارکینسون و سایر بیماری‌های نورودژنراتیو که با افزایش استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شوند، پیشنهاد می‌شود (۳۰).
بر اساس یافته‌های این مطالعه یادگیری احترازی غیرفعال و فعالیت حرکتی به دنبال ایجاد مدل صرعی با هیپوکسی کاهش یافت و درمان با کروسین باعث بهبود حافظه احترازی غیرفعال و افزایش تعادل و فعالیت حرکتی شد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از کلیه عزیزانی که در انجام این مقاله همکاری نموده‌اند بخصوص کارکنان بخش فیزیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، کمال قدردانی و تشکر را دارند.

۶۰ mg/kg به مدت ۶ هفته در مدل پارکینسون با 6-OHDA باعث جلوگیری از آسیب جسم مخطط و اختلال حرکت می‌شود. از آنجایی که استرس اکسیداتیو مهم‌ترین عامل در پاتوژنز بیماری پارکینسون و سایر بیماری‌های نورودژنراتیو است، کروسین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود نقش حفاظتی در بیماری پارکینسون دارد (۲۸).

یافته‌های اتحادی و همکاران نشان داد که تزریق عصاره آبی زعفران به روش وابسته به دوز باعث افزایش غلظت دوپامین در مغز می‌شود. بیشتر مطالعات در مدل‌های حیوانی حاکی از نقش آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از اختلال در عملکرد میتوکندری و محافظت از نورون‌های مسیر دوپامینرژیک است (۲۹).
کروسین و زعفران با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود اثر محافظتی در بیماری پارکینسون دارند و به‌عنوان عامل درمانی برای بیماری

References:

- Shetty J. Neonatal seizures in hypoxic-ischaemic encephalopathy—risks and benefits of anticonvulsant therapy. *Dev Med Child Neurol* 2015; 57(3): 40-3.
- Koh S, Tibayan FD, Simpson JN, Jensen FE. NBQX or topiramate treatment after perinatal hypoxia-induced seizures prevents later increases in seizure-induced neuronal injury. *Epilepsia* 2004;45(6):569–75.
- Jensen F.E. Neonatal seizures: an update on mechanisms and management. *Clin Perinatol* 2009. 36(4): 881-900.
- Rakhade SN, Klein PM, Huynh T, Hilario-Gomez C, Kosaras B, Rotenberg A, et al. Development of later life spontaneous seizures in a rodent model of hypoxia-induced neonatal seizures. *Epilepsia* 2011;52(4):753–65.
- Sanchez RM, Jensen FE. Maturation aspects of epilepsy mechanisms and consequences for the immature brain. *Epilepsia* 2001. 42(5): 577-85.
- Jensen FE, Wang C, Stafstrom CE, Liu Z, Geary C, Stevens MC. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia In vivo. *J Neurophysiol* 1998;79(1):73–81.
- Zhang X, Le W. Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Experimen Neurol* 2010. 223(2): 299-303.
- Derrick M, Luo NL, Bregman JC, Jilling T, Ji X, Fisher K, et al. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? *J Neurosci* 2004;24(1):24–34.
- Volpe JJ. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Semin Pediatr Neurol* 2009;16(4):167–78.
- Naghizadeh B, Mansouri SMT, Mashhadian NV. Crocin attenuates cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2010;48(10):2650–5.
- Ghadroost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, et al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;667(1–3):222–9.

- 12- Abe K, Sugiura M, Shoyama Y, Saito H. Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1998;787(1):132–8.
- 13- Ghadami MR, Pourmotabbed A. The effect of Crocin on scopolamine induced spatial learning and memory deficits in rats. *Physiol Pharmacol* 2009;12(4):287–95.
- 14- Pitsikas N, Sakellaris N. Crocus sativus L. extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. *Behav Brain Res* 2006;173(1):112–5.
- 15- Huang H-C, Jiang Z-F. Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009;16(1):15–27.
- 16- Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005;120(4):545–55.
- 17- Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014;10:1693–705.
- 18- Bandegi AR, Rashidy-Pour A, Vafaei AA, Ghadrdoost B. Protective Effects of Crocus Sativus L. Extract and Crocin against Chronic-Stress Induced Oxidative Damage of Brain, Liver and Kidneys in Rats. *Adv Pharm Bull* 2014;4(Suppl 2):493–9.
- 19- Shabani M, Larizadeh MH, Parsania S, Asadi Shekaari M, Shahrokhi N. Profound destructive effects of adolescent exposure to vincristine accompanied with some sex differences in motor and memory performance. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90(4):379–86.
- 20- Ghotbeddin Z, Moazedi AA, Parham GA. Effect of combined administration of Zinc chloride and Aluminum chloride on memory and motor activity of young rats. *Physiol Pharmacol* 2007;11(2):146–52.
- 21- Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, et al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res* 2001;118(1):17–25.
- 22- Arteaga O, Álvarez A, Revuelta M, Santaolalla F, Urtasun A, Hilario E. Role of Antioxidants in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury: New Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2017;18(2).
- 23- Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, Margarity M. Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behav Brain Res* 2011;219(2):197–204.
- 24- Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M, et al. Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of Crocus sativus stigmas extract and its crocin constituents. *J Agric Food Chem* 2006;54(23):8762–8.
- 25- Hobbs CE, Oorschot DE. Neonatal rat hypoxia-ischemia: long-term rescue of striatal neurons and motor skills by combined antioxidant-hypothermia treatment. *Brain Pathol* 2008;18(3):443–54.
- 26- Sanches EF, Arteni NS, Nicola F, Boisserand L, Willborn S, Netto CA. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience* 2013;237:208–15.
- 27- Durán-Carabali LE, Sanches EF, Marques MR, Aristimunha D, Pagnussat A, Netto CA. Longer hypoxia-ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. *Neuroscience* 2017;340:291–8.
- 28- Hosseini M, Rajaei Z, Alaei H, Tajadini M. The Effects of Crocin on 6-OHDA-Induced Oxidative/Nitrosative Damage and Motor

- Behaviour in Hemiparkinsonian Rats. Malays J Med Sci 2016;23(6):35-43.
- 29- Ettehadi H, Mojabi SN, Ranjbaran M, Shams J, Sahraei H, Hedayati M, et al. Aqueous extract of saffron (*Crocus sativus*) increases brain dopamine and glutamate concentrations in rats. J Behav Brain Sci 2013;3(03):315.

EFFECTS OF CROCIN FOLLOWING INDUCTION OF HYPOXIA MODEL ON AVOIDANCE MEMORY AND MOTOR ACTIVITY IN YOUNG RATS

Ahmad Eskandarian¹, Zohreh Ghotbeddin^{2*}, Seyed Reza Fatemi Tabatabaei³, Javad Jamshidian⁴

Received: 1 Dec, 2017; Accepted: 12 Feb, 2018

Abstract

Background & Aims: Hypoxia is the most common cause of seizures in the neonatal period. Seizure induced by hypoxia cause permanent increases in excitability of neurons and by changing in activity and synaptic plasticity leads to memory impairment. Crocins (*Crocus sativus* L.) is a water-soluble carotenoid and is the most important active components of saffron. Most studies indicate that crocin have important role in improving learning, memory and motor activity. In this work we assessed the effect of crocin following epileptic model by hypoxia on passive avoidance memory and motor activity in young rat.

Materials & Methods: In this study, 40 young rats (Wistar) 10-12 years old (18–22 g) maintained at room temperature 23±2. Rats were divided into four experimental groups: sham, crocin, hypoxia only, submitted to hypoxia followed by crocin treatment. For hypoxia induction rats placed in hypoxia container with 7% O₂ and 93% N₂ for 15 minutes. In crocin group, rats received crocin (30mg/kg for 21 days) after their lactation period. Finally, passive avoidance memory, balance and motor activity were assessed respectively by shuttle box, rotarod and open field instruments.

Results: A decreased step through latency and increased time spent in dark room was observed in passive avoidance test after hypoxia ($p<0/05$), which could be inhibited by posttreatment with crocin. Hypoxia also disrupted balance and motor activity in the rotarod and open field test ($p<0/05$), which could be inhibited by treatment with crocin.

Conclusion: Results of this study indicated that hypoxia impairs passive avoidance learning, balance and motor activity and crocin treatment improve these changes.

Keywords: Crocin, Hypoxia, Passive avoidance memory, Motor activity, Rat

Address: Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Tel: +989166003655

Email: z.ghotbeddin@scu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2018; 28(12): 836 ISSN: 1027-3727

¹ MSc in Physiology, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Assistant Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (Corresponding Author)

³ Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran