14(3) 103-110, Autumn 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The Effect of Crocin on Cognition and Necrosis Cell Death in the Hippocampus Area in the Model of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in Male Rats

Lida Farhadi [1], ***Vida Hojati*** [1*], ***Mehdi Khaksari*** [2*], ***Gholamhassan Vaezi*** [1]

[1] *Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran*
[2] *Department of Physiology, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran*

Key Words
Crocin
Alcohol
Memory
Apoptosis
Necrosis

Abstract

Introduction: Experimental and clinical studies have shown that postpartum alcohol exposure causes inflammation in the hippocampus among other areas of the brain. On the other hand, alcohol consumption during pregnancy will cause inflammatory oxidative activation along with extensive apoptotic neurodegenerative disease in brain areas. Different areas of the brain are like the hippocampus. Crocin is the main active ingredient and dye in saffron, which has antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects and can protect the nerves. The aim of this study was to evaluate the effect of Crocin administration on memory disorders and cell death of necrosis of the hippocampus in the model of alcoholic fetal syndrome.

Materials & Methods: 72 male neonates of male rats on the second day after birth, randomly divided into six groups (12 in each group) including control, sham group, ethanol group and ethanol + Crocin treatment groups) doses of 15, 30 and 45 mg/kg). From the second to the tenth day of birth, ethanol was received at a dose of 5.25 g/kg of milk powder solution, which was divided into two doses of 2.62 g/kg, twice a day for two hours by gavage. Using the novel object recognition test, hippocampal-dependent memory and distance learning were assessed at 36 days after birth. Nissel staining was also used to evaluate cell death.

Results: The results of the present study showed that Crocin administration significantly reduced ethanol-induced cognitive deficits ($p<0.01$). Ethanol-induced necrotic cell death was also significantly reduced by Crocin administration ($p<0.01$).

Conclusion: Protective effects of Crocin against ethanol-induced neurotoxicity in the model of alcoholic fetal syndrome, this substance can be considered as a potential treatment for ethanol-induced complications during development.

* Corresponding Author's email: v.hojati@damghaniau.ac.ir, khaksari417@yahoo.com
Received: 28 June 2021; Reviewed: 1 August 2021; Revised: 3 October 2021; Accepted: 4 November 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.303322.2629

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تجویز کروسین بر اختلالات حافظه شناختی و مرگ سلولی در ناحیه هیپوکامپ مدل سندرم جنین الکلی

لیدا فرهادی[۱]، ویدا حجتی[۱]، مهدی خاکساری[۲*]، غلامحسن واعظی[۱]*

[۱] گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

[۲] گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

کلمات کلیدی

کروسین
الکل
حافظه
آپوپتوز
نکروز

چکیده

مقدمه: پژوهش‌های آزمایشی و بالینی نشان داده که قرارگرفتن در معرض الکل پس از تولد باعث التهاب در هیپوکامپ در بین سایر مناطق مغزی می‌شود. ازطرفی دیگر مصرف الکل در طول‌بارداری موجب فعال‌سازی اکسیداتیو التهابی به‌همراه آپوپتیک وسیع‌بیماری نورودژنراتیو در نواحی مغزی خواهد شد به‌علاوه نقص عصبی ناشی از الکل در فرزندان با فعال شدن آبشار اکسیداتیو التهابی همراه با نیتروژن‌دهی گسترده و آپوپتوز در مناطق مغزی مختلف مانند هیپوکامپ می‌باشد. کروسین عمده‌ترین ماده موثره و عامل ایجاد رنگ در زعفران است که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتیک است و می‌تواند از اعصاب محافظت کند. این تحقیق با هدف بررسی اثر تجویز کروسین بر اختلالات حافظه و مرگ سلولی نکروز ناحیه هیپوکامپ مدل سندرم جنین الکلی انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۷۲ سر نوزاد نر موش صحرایی نر روز دوم پس از تولد، به شکل تصادفی به شش گروه (۱۲ سر در هر گروه) شامل کنترل، گروه شم، گروه اتانول و گروه‌های اتانول+تیمار با کروسین (دوزهای ۱۵، ۳۰ و ٤۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. از روز دوم تا دهم تولد، اتانول را با دوز ۵/۲۵ گرم بر کیلوگرم محلول در شیرخشک که به دو دوز ۲/٦۲ گرم بر کیلوگرم تقسیم شده بود، دو بار در روز و به فاصله دو ساعت با روش گاواژ دریافت نمودند. با استفاده از روش آزمون شیئی جدی، حافظه وابسته به هیپوکامپ و یادگیری فاصله‌ای در ۳٦ روز پس از تولد ارزیابی گردید. هم‌چنین از رنگ‌آمیزی نیسل برای ارزیابی مرگ سلولی استفاده شد.

نتایج: نتایج مطالعه حاضر بیان نمود که تجویز کروسین به‌شکل معنی‌داری نقص شناختی ناشی از اتانول را کاهش داد ($p<۰/۰۱$). هم‌چنین با تجویز کروسین مرگ سلولی نکروتیک القاء شده به‌واسطه اتانول به شکل معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۱$).

بحث و نتیجه‌گیری: براساس اثرات حفاظتی کروسین در مقابل سمیت نورونی ناشی از اتانول در مدل سندرم جنین الکلی، این ماده می‌تواند به‌عنوان یک درمان بالقوه برای عوارض ناشی از اتانول در دوران تکوین مطرح باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: v.hojati@damghaniau.ac.ir, khaksari417@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۷ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۰ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۱ مهر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳ آبان ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.303322.2629

مقدمه

اتانول به‌عنوان یک تراتوژن خطرناک شناخته‌شده است که سوء مصرف آن در دوران بارداری فرایندهای طبیعی سیناپتوژنز و ارگانوژنز جنینی را دچار اختلال می‌نماید. نوشیدن الکل در دوران بارداری خطراتی چون زایمان زودرس، سقط شدن جنین، یا تولد نوزاد مرده را به‌دنبال خواهد داشت. چنان‌چه نوزاد زنده متولد شود، با طیف وسیعی از عوارض جانبی که به مجموعه آن‌ها سندرم جنین الکلی اطلاق می‌گردد تا پایان زندگی دست به گریبان خواهد بود (۱). قرار گرفتن در معرض الکل پیش از تولد سبب از دست رفتن سلول‌های هیپوکمپ، تغییر در مورفولوژی عصبی و اجرای ضعیف وظایف مربوط به حافظه و یادگیری وابسته به هیپوکمپ در جوندگان می‌شود (۲، ۳). ناحیه DG هیپوکمپ یکی از مهم‌ترین نواحی مغزی است که در آن نورون‌زایی تا بزرگسالی ادامه می‌یابد، این فرایند از این نظر مهم می‌باشد که این نورون‌های تازه تولید شده نقش مهمی در فرایندهای حافظه و یادگیری ایفا می‌کنند (۴، ۵، ۶). الکل دارای اثرات توکسیک بر تکوین سیستم عصبی مرکزی می‌باشد و مصرف آن در طی دوران بارداری می‌تواند طیف وسیعی از اختلالات شناختی و رفتاری و هم‌چنین تغییرات غیرطبیعی فیزیکی را برای جنین ایجاد نماید (۱). آثار مخرب الکل بر رشد داخل رحمی، طیف وسیعی از آنومالی‌ها و اختلالات رفتاری و عصبی شناختی ایجاد می‌کند که به‌عنوان اختلالات طیف جنین الکلی (FASD) یا سندرم جنین الکلی شناخته می‌شوند. اتانول (C_2H_5OH) دارویی روانگردان و از نظر ساختاری مولکولی ساده است که به شکل آشامیدنی در سراسر جهان مورد سوء مصرف قرار می‌گیرد. اتانول توانایی عبور از سد خونی مغزی، جفت و سایر غشاهای زیستی را دارد. اگرچه مصرف بیش از حد اتانول توسط افراد بالغ علاوه بر سیستم عصبی مرکزی، سیستم عصبی محیطی این افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهد اما مغز مهم‌ترین هدف برای عملکرد اتانول می‌باشد (۴ ، ۷، ۸). مصرف بیش از حد اتانول به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر مغز درحال تکوین و مغز تکوین یافته اثر می‌گذارد و عوارض حاد و مزمن ایجاد می‌کند. مصرف اتانول در دوران بارداری آسیب مغز در حال تکوین جنین را در پی دارد (۹، ۳، ۱۰). محدوده و شدت اثرات وابسته به الکل در هر جنین پیش از تولد، بسیار متفاوت است و فاکتورهای محیطی و بیولوژیکی مختلف می‌توانند روی مغز درحال تکوین اثرگذار باشند. مهم‌ترین این فاکتورها دوز مصرفی، الگوی درمعرض الکل قرارگرفتن جنین، مرحله تکوینی، پیشینه ژنتیکی مادر و جنین از نظر توانایی آنزیمی و... می‌باشد. نواحی مختلف مغز مانند پری فرونتال کورتکس، مخچه، ماده سفید، سلول‌های گلیا و خصوصاً هیپوکمپ به اثرات الکل حساس می‌باشند. الکل سبب تخریب حافظه و دیگر اثرات شناختی به‌خصوص در سنین پایین می‌شود که ایجاد بخشی از این اثرات به‌واسطه اختلال پلاستیسیتی در پری‌فرونتال کورتکس و هیپوکمپ می‌باشد. در افراد بالغ این تغییرات ساختاری همراه با تغییرات سیستم‌های نوروترانسمیتری و مدارهای نورونی است که خصوصاً در مدارهای نورونی برخی مناطق مغزی مانند پری‌فرونتال کورتکس، نواحی زیر قشری و هیپوکمپ اتفاق می‌افتد (۲). نورون‌زایی هیپوکمپ در بزرگسالی در مدل‌های حیوانی FASD به‌خطر می‌افتد، مصرف الکل در دوران بارداری ممکن است سبب ایجاد تکوین غیرطبیعی جنین و تخریب عملکردهای مغزی در انسان و حیوانات آزمایشگاهی شود. براساس الگوی مصرف، دوز و دوره تکوینی در معرض الکل بودن، اختلالات متفاوتی در ساختارهای مختلف و نیز نقص‌های عملکردی متفاوت ایجاد می‌گردد. به‌طور مثال چنانچه جنین در سه ماهه ابتدایی در معرض الکل قرار گیرد به‌طور قابل ملاحظه‌ای پراکسیداسیون لیپیدی در برخی زیرناحیه‌های هیپوکمپ مانند CA و DG افزایش می‌یابد. این شواهد حاکی از این است که مواجهه با الکل پیش از تولد و در دوران بحرانی تکوین مغزی، سبب ایجاد اثرات طولانی مدت در مغز بالغ می‌شود (۱۱). اثرات الکل در مدل حیوانی FASD در دوره جهش رشدی مغز یعنی سه ماهه سوم در انسان که معادل با دو هفته ابتدایی پس از تولد در جوندگان است بررسی شده و نتایج حاکی از این است که شکنج دندانه‌ای (هیپوکمپ)، مخچه و پری‌فرونتال کورتکس به اثرات در معرض الکل قرار گرفتن در دوره جهش رشدی بسیار حساس می‌باشند که از این اثرات می‌توان از کاهش ارتباطات نورونی و کاهش تراکم خارهای دندریتی نورون‌های هرمی لایه II/ III نام برد که مجموعه این اثرات در ایجاد نقص‌های رفتاری FASD دخیل می‌باشد. علاوه بر تغییرات مورفولوژی نورون‌های هرمی شکل، سطح متوسط تا زیاد در معرض الکل بودن در نوزاد جوندگان، اندازه برخی قسمت‌های مغز را نیز کاهش می‌دهد که این کاهش با کاهش توانایی ذهنی همراه است (۱۲، ۹، ۱۳). پری فرونتال کورتکس و هیپوکمپ مناطقی هستند که مسئول ایجاد مدار عصبی حافظه فضایی می‌باشند و مصرف اتانول با تحت تاثیر قرار دادن این مدار منجر به ایجاد نقص در حافظه فضایی می‌شود. اتانول دو تاثیر عمده در تکوین جنین دارد: تغییر در روند تکثیر نورونی و مرگ نورون‌ها. مصرف اتانول موجب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌گردد به‌طوری‌که مصرف حاد اتانول پراکسیداسیون لیپیدی که شاخصی از استرس اکسیداتیو است را در مغز افزایش داده و موجب اختلال عملکرد در ماز آبی به‌دلیل تخریب حافظه فضایی می‌شود (۸، ۱). عارضه مهمی که کودکان و بزرگسالان مبتلا به سندرم جنین الکلی با آن مواجه هستند نقص در جنبه‌های شناختی است (۱، ۱۴). مطالعات متعددی روی حافظه و شناخت انجام

شده است (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸). شناخت، اصطلاحی است که به یک سری فرایندهای ذهنی اشاره می‌کند. این فرایندها در کسب دانش و فهم درگیر هستند و شامل حافظه و یادگیری، تفکر، دانستن، یادآوری، قضاوت، تصمیم‌گیری و حل مسئله می‌شوند. در واقع این اعمال عملکردهای سطح بالای مغز هستند و دربردارندهٔ زبان، تخیل، ادراک، برنامه‌ریزی و اجرا نیز هستند. گرچه بیش‌تر این مفاهیم انتزاعی به نظر می‌رسند اما دانشمندان علوم اعصاب با روش‌های علمی قادر به سنجش و اندازه‌گیری این مفاهیم در انسان و حتی حیوانات آزمایشگاهی هستند (۱۹). یکی از این مفاهیم حافظه شناختی است. براساس این یافته که موش‌های صحرایی تمایل دارند زمان بیش‌تری را به بررسی و اکتشاف اشیاء جدید اختصاص دهند تا بررسی شیئی که قبلاً با آن آشنایی داشته‌اند، آزمونی طراحی شده است که این جنبه از شناخت را مورد بررسی قرار می‌دهد. در واقع چنان‌چه حیوان از نظر پارامتر شناخت آسیب‌ندیده باشد، زمانی که پس از وقفه‌ای مجدداً درون جعبه آزمون با یک شیء جدید علاوه بر شیء قدیمی قرار بگیرد زمان بیش‌تری را برای جستجو و اکتشاف شیء جدید و ناآشنا نسبت به شیء قدیمی و آشنا اختصاص خواهد داد (۲۰، ۲۱). فرآیند آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول به‌عنوان روشی حفاظت شده، تحت کنترل ژن‌هاست که به‌منظور حذف سلول‌های ناخواسته یا غیرضروری در موجودات زنده به‌کار می‌رود و در بسیاری از مکانیسم‌های دستگاه ایمنی یا بیماری‌ها مداخله می‌کند. اصلی‌ترین تفاوت این مسیر با نکروز سلولی به‌عنوان مسیر اصلی حذف سلول‌های ناخواسته، در عدم ایجاد التهاب و اثر محدود به سلول‌های هدف است. آپوپتوز در فرآیندهای مهم زیست‌شناختی مانند تکامل طبیعی، هومئوستاز بافتی، حذف سلول‌های تخریب شده یا آلوده به ویروس و حذف سلول‌های ایمنی فعال شده علیه آنتی‌ژن‌های خودی نقش بسیار حیاتی را بر عهده دارد. این فرآیند در تنظیم میزان رشد، تکثیر سلول‌ها، تکامل و سلامت بدن بسیار مهم بوده و بروز بسیاری از بیماری‌های خود ایمن، سرطان‌ها و عفونت‌های ویروسی نتیجه عملکرد ضعیف یا مهار شدن پدیده آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. کروسین عمده‌ترین ماده موثره و عامل ایجاد رنگ در زعفران است که یکی از چند کاروتنوئید محدود موجود در طبیعت می‌باشد که به آسانی در آب حل می‌شود. این حلالیت یکی از دلایل کاربرد وسیع آن به‌عنوان رنگ‌دهنده در مواد غذایی و دارویی نسبت به سایر کاروتنوئیدها هستند. کروسین زعفران دارای اثرات داروئی گوناگونی بوده و برای درمان‌های کلینیکی قابل استفاده است. کروسین به‌دلیل ساختمان ویژه کاروتنوئیدی خود، رادیکال‌های آزاد را به دام انداخته و بنابراین یک آنتی‌اکسیدان بالقوه به‌شمار می‌رود. براساس همین ویژگی آنتی‌اکسیدانی تستی به‌نام CBA برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی طراحی شده است. کروسین در فرم احیا، دارای باند جذبی در ۴۴۰ نانومتر است. در اثر واکنش با رادیکال‌های آزاد، کروسین اکسید شده و این باند جذبی ناپدید می‌شود. از این واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف استفاده می‌شود (۴). هدف از این مطالعه، بررسی اثر تجویز کروسین بر اختلالات حافظه شناختی و مرگ سلولی در ناحیه هیپوکامپ مدل سندرم جنین الکلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

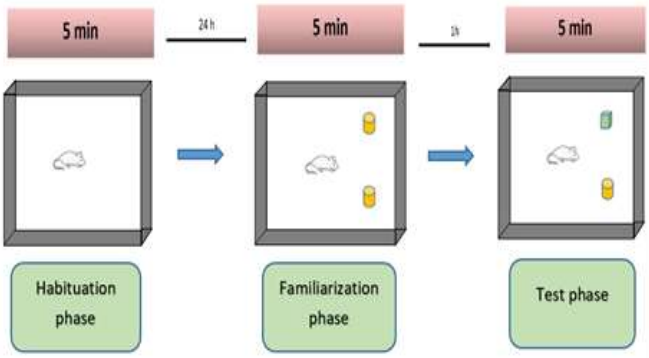
گروه‌های مورد مطالعه: تعداد ۷۲ سر نوزاد موش صحرایی نر روز دوم پس از تولد، به شکل تصادفی به شش گروه تقسیم شدند. تیمار از روز دوم تولد (۲PD) تا روز دهم تولد (۱۰PD) انجام شد. گروه‌بندی به شکل زیر انجام شد: گروه اول یا شاهد: در نوزادان این گروه هیچ‌گونه مداخله‌ای انجام نگرفت. گروه دوم یا شم: (شیر مادر +شیر خشک با تزریق نرمال سالین) نوزادان این گروه محلول نرمال سالین استریل را سه مرتبه با فاصله زمانی دو ساعته در روز و هم‌چنین یک دوز نرمال سالین استریل را روزانه به شکل تزریق زیرجلدی از روز دوم تولد تا روز دهم تولد دریافت کردند. گروه سوم یا اتانول: نوزادان این گروه از روز دوم تولد تا روز دهم تولد اتانول را با دوز ۵/۲۵ گرم بر کیلوگرم محلول در شیرخشک مخصوص نوزادان نارس به‌نام سیمیلاک (Similac) که به دو دوز ۲/۶۲ گرم بر کیلوگرم تقسیم شده بود، دو بار در روز به فاصله دو ساعت با روش گاواژ دریافت کردند. دو ساعت بعد نیز محلول شیر فاقد اتانول به‌منظور به‌حداقل رساندن تفاوت رشد بین گروه شاهد و گروه تیمار شده با اتانول به روش گاواژ به نوزادان این گروه داده شد. هم‌چنین یک دوز نرمال سالین استریل به شکل تزریق زیرجلدی از روز دوم تولد تا روز دهم تولد دریافت نمودند (۲۲، ۲۳). گروه چهارم، پنجم و ششم (اتانول + کروسین): نوزادان این گروه از روز دوم تولد تا روز دهم تولد اتانول را با دوز ۵/۲۵ گرم بر کیلوگرم محلول در شیرخشک سیمیلاک، که به دو دوز ۲/۶۲ گرم بر کیلوگرم تقسیم شده‌بود، دو بار در روز به فاصله دو ساعت با روش گاواژ دریافت کردند. دو ساعت بعد نیز محلول شیر فاقد اتانول به‌منظور به‌حداقل رساندن تفاوت رشد بین گروه شاهد و گروه تیمار شده با اتانول به‌روش گاواژ به نوزادان این گروه‌داده شد. هم‌چنین کروسین را با دوزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به شکل تزریقی از روز دوم تولد تا روز دهم تولد دریافت کردند. لازم به‌ذکر است که نوزاد پس از هر بار جدا کردن از موش مادر و انجام مداخلات، بلافاصله به قفس مادر برگردانده می‌شد. تمامی حیوانات تا روز بیست و سوم در قفس مادر و بدون انجام هیچ‌گونه تیماری گذاشته شدند. در ابتدای روز بیست و سوم که دوران

شیردهی به پایان رسید موش مادر از قفس موش‌ها به قفس دیگر انتقال داده شد تا روند طبیعی رشد تا دوران بزرگسالی که آغاز این دوره درست در روز سی و پنجم در موش ویستار است، طی گردد. در دوران بزرگسالی آزمون رفتاری تشخیص شیء جدید روز ۳۶ انجام شد.

آزمون تشخیص شیء جدید: این آزمون یک ارزیابی ساده حافظه است که در آن نیازی به هیچ انگیزه خارجی، پاداش یا تنبیه نمی‌باشد و تنها بر رفتار ذاتی جستجوگری جوندگان تکیه دارد. هر چند این آزمون مدل پرکاربردی برای بررسی تغییرات حافظهٔ شناختی می‌باشد، اما کاربرد آن به این زمینهٔ تحقیقی محدود نمی‌شود و در مطالعات مربوط به ارزیابی حافظهٔ کاری، تأثیر نواحی مختلف مغز در پردازش فرایند شناخت، افسردگی و فرایند توجه کردن نیز کاربرد دارد و برای ارزیابی اثرات درمان‌های مختلف فارماکولوژیکی و آسیب‌های مغزی نیز استفاده می‌شود (۲۴). این تست رفتاری شامل دو مرحله می‌باشد: مرحله اول مرحله آشنایی است و مرحله دوم که تست به خاطرآوری است با فاصله ۲۴ ساعته انجام می‌شود. در جلسه آشنایی، به موش اجازه کشف دو اشیاء یکسان برای ۵ دقیقه داده می‌شود و کل زمان صرف شده برای کاوش هریک از دو اشیاء ثبت می‌شود. در جلسه به خاطرآوری، یک شیء جدید با یکی از دو شیء قدیمی جایگزین می‌گردد. سپس موش به‌مدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار گرفته و زمان صرف شده برای کاوش هر جسم و نیز کل زمان صرف شده برای کاوش هر دو جسم ثبت می‌شود. شاخص ارزیابی عملکرد حافظه شناختی با به‌دست آوردن تفاوت زمان کاوش برای شیء جدید در مقابل شیء قدیمی و آشنا تقسیم به کل زمان صرف شده برای مجموع زمان کاوش هر دو شیء محاسبه می‌شود.

روش ارزیابی میزان مرگ سلولی نکروزیس با رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل): رنگ‌آمیزی نیسل معمولاً برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های سالم به‌صورت سلول‌های یوکروماتین دیده شدند. برای رنگ‌آمیزی نیسل، برش‌های ۷ میکرومتری (سه برش در هر حیوان) بر روی لام‌های سیلانه شده انتقال داده شدند. سپس با استفاده از محلول کرزیل ویوله استات ۰/۱ درصد (سیگما، USA) رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها سپس خشک شده و با انتالن پوشانده شدند.

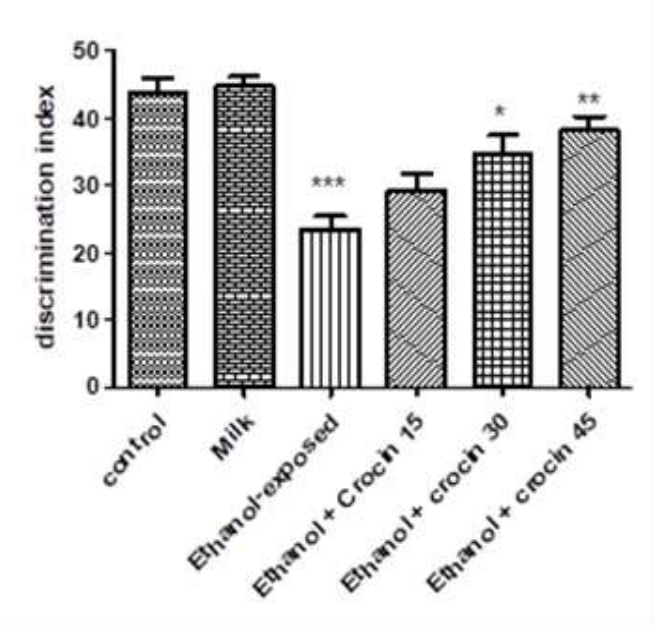
تجزیه و تحلیل آماری: برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. هنگامی‌که تفاوت معنی‌داری وجود داشته باشد، آزمون تعقیبی دانت تی-۳ یا آزمون تعقیبی شفه برای تعیین این‌که تفاوت در کدام گروه‌ها رخ داده است مورد استفاده قرار گرفت. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ درنظر گرفته شد. همه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.



شکل ۱: تصویر شماتیک از آزمون شیء جدید

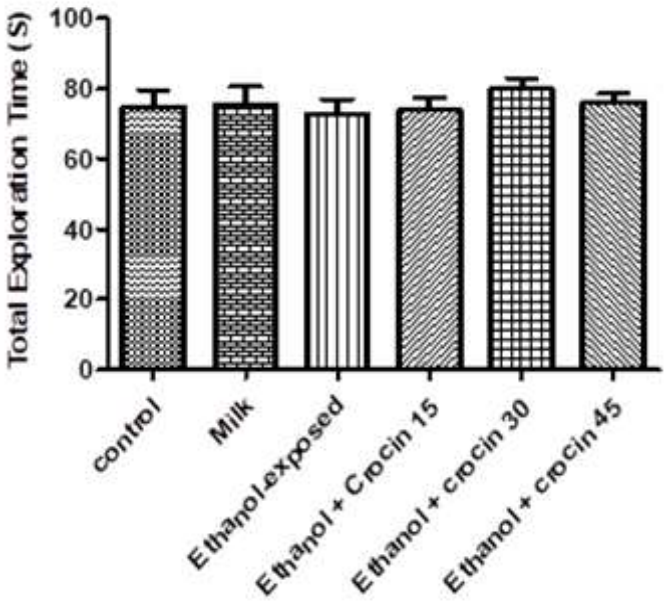
نتایج

به‌منظور بررسی حافظه شناختی از آزمون شیء جدید استفاده شد. براساس نتایج حاصل از آنالیز آماری شاخص عملکرد حافظه شناختی (DI) در گروه موش‌های در معرض اتانول در مقایسه با گروه شاهد پایین‌تر است ($p<۰/۰۰۱$). هم‌چنین شاخص مذکور در گروه درمان با ۴۵ میلی‌گرم کروسین ($p<۰/۰۱$) در مقایسه با گروه اتانول افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد(شکل ۲). علاوه براین، با توجه به نتایج نشان داده شده در نمودار، با مقایسه مدت زمان کل جستجو در گروه اتانول با گروه شاهد و نیز مقایسه گروه اتانول با گروه‌های تحت درمان با کروسین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. از آن‌جایی که تیمار با کروسین سبب افزایش کاوش شیء جدید شد و به عبارتی افزایش در شاخص عملکرد حافظه شناختی را به‌دنبال داشت لذا می‌توان گفت این ماده دارای اثرات درمانی بر تخریب حافظه شناختی ناشی از اتانول است. نتایج رنگ‌آمیزی نیسل نشان داد که مرگ سلولی نکروز در ناحیه CA۱ هیپوکمپ در گروه دریافت کننده کروسین افزایش معنی‌دار نسبت به گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۰۱$). تعداد سلول‌های نیکروتیک در گروه الکلی از گروه شاهد بیش‌تر بود ($p<۰/۰۰۱$). نتایج مطالعات بافتی نشان داد، در گروه کروسین، درصد سلول‌ها کم‌تر از گروه الکلی می‌باشد ($p<۰/۰۱$). (شکل ۵).



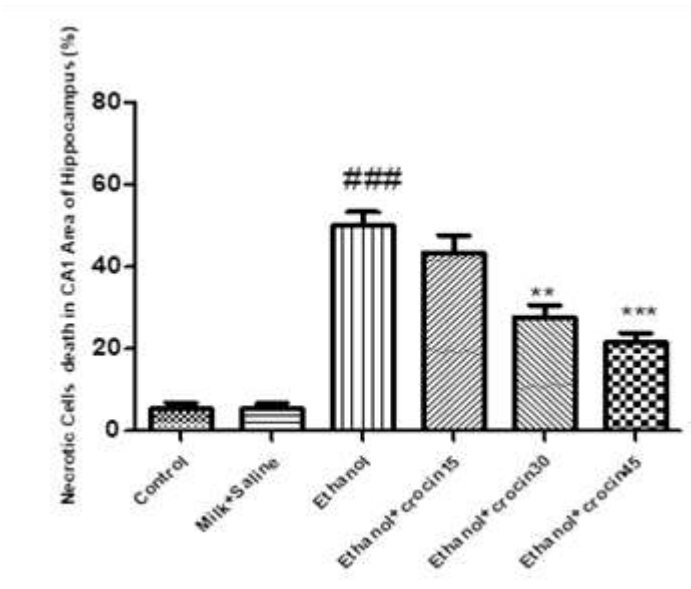
شکل ۲: نمودار زمان کل کاوش (تصویر بالا)، شاخص عملکرد حافظه شناختی در گروه‌های آزمایشی

***: در مقایسه با شاهد (p<۰/۰۰۱)، **: در مقایسه با اتانول (p<۰/۰۱)، *: در مقایسه با اتانول (p<۰/۰۵).



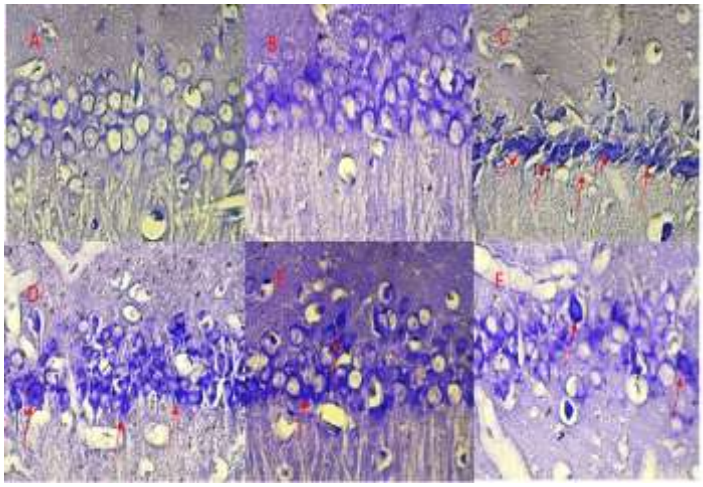
شکل ۳: نمودار شاخص عملکرد حافظه شناختی در گروه‌های آزمایشی

***:در مقایسه با شاهد (p<۰/۰۰۱)، **:در مقایسه با اتانول (p<۰/۰۱)، *: در مقایسه با اتانول (p<۰/۰۵).



شکل ۴: نمودار اثرات درمان با کروسین بر مرگ سلولی نکروتیک ناشی از سمیت اتانول.

***: در مقایسه با شاهد (p<۰/۰۰۱)، **: در مقایسه با اتانول (p<۰/۰۱)، ***: در مقایسه با اتانول (p<۰/۰۰۱).



شکل ۵: فتومیکروگراف از مرگ سلولی نکروز در گروه‌های آزمایشی است. A:شاهد، B:شم، C:اتانول،D:اتانول+کروسین (۱۵میلی‌گرم)، E:اتانول+ کروسین (۳۰ میلی‌گرم)، اتانول+ کروسین (۴۵میلی‌گرم)

بحث

اگرچه کاهش رشد و بدشکلی‌های جمجمه‌ای ویژگی تشخیصی اصلی این سندرم است، اما توجه به اثرات الکل بر تکوین مغز بسیار حائز اهمیت است چراکه منجر به پیامدهای ذهنی و رفتاری طولانی مدت می‌شود. مصرف اتانول در دوران بارداری مسبب ایجاد مشکلات پایدار در دوران بزرگسالی می‌باشد (۲۵). استرس اکسیداتیو القا شده توسط اتانول به‌همراه کلسیم تجمع یافته درون سلول از طریق فعالیت گیرنده‌های NMDA سبب پاسخ استرسی شبکه اندوپلاسمی و تخریب میتوکندری می‌شود. رادیکال‌های آزاد درون سلول باعث آزاد شدن سیتوکروم C میتوکندریایی از طریق انتقال پروتئین پروآپوپتوتیک BAX به میتوکندری می‌شوند. آزادشدن سیتوکروم C موجب فعالیت caspase۳ که سبب قطعه قطعه شدن DNA و راه اندازی مسیر آپوپتوز می‌شود(۲۶). وقتی یک سلول تحت یک استرس مداوم قرار می‌گیرد اگر نتواند با فشار وارده سازگار شود و بیش‌تر از حد توانش با آن مقابله کند آسیب وارده به آن غیرقابل برگشت خواهد بود. در طول زندگی یک سلول محرک‌های فراوانی سلول و اندامک‌های درونی آن را تهدید می‌کنند، که در اکثر موارد با مقابله سریع سلول مشکل برطرف خواهد شد (آسیب برگشت‌پذیر). اما گاهی محرک استرس‌زا آن قدر قوی است که سلول علی‌رغم تلاش شکست می‌خورد و یا گاهی نیز سلول از قبل دچار ضعف ایمنی است و نمی‌تواند عملکرد ایمنی مناسب با آسیب وارده را نشان دهد (۲۷). به‌طورکلی دوران بارداری به سه دوره سه ماهه تقسیم می‌شود. دوره سه ماهه سوم زمانی است که برخی ساختارهای مغزی بیش‌ترین رشد را در طول بارداری خواهند داشت. لذا دانشمندان علوم اعصاب این دوره از تکوین را به‌نام جهش رشد مغزی نام‌گذاری کرده‌اند. مصرف الکل در دوران جهش رشد مغزی موجب تداخل در سیناپتوژنز، نقص در پلاستیسیتی نورونی و مرگ گسترده سلول‌های عصبی می‌شود که در نهایت عواقب جبران‌ناپذیری در بزرگسالی به‌دنبال خواهد داشت (۲۸). مطالعه Ethen و همکاران، حاکی از این موضوع است که بیش‌تر زنان بارداری که در شش ماه ابتدایی بارداری از مصرف اتانول خودداری کرده بودند با این تصور نادرست که در سه ماهه سوم فرایندهای اصلی تکوین کامل شده‌اند و نوشیدن بی‌خطر است، مصرف اتانول را در سه ماهه پایانی بارداری از سرگرفته بودند (۲۹). زمانی‌که مادر اقدام به مصرف الکل می‌نماید الکل مستقیماً وارد جریان خون مادر شده و از آن‌جا به‌واسطه تبادل خونی مادر و جنین توسط جفت به جنین نیز منتقل می‌شود و به این خاطر که سرعت متابولیزه شدن الکل در بدن جنین کم‌تر از سرعت آن در بدن بزرگسالان است؛ بنابراین، غلظت الکل در جریان خون جنین به‌مراتب بیش‌تر از غلظت آن در بدن مادر می‌شود. وجود میزان بالای این ماده در پلاسمای خون مادر سبب مداخلات رشدی و تغذیه‌ای جنین شده و آسیب به سلول‌های درحال تکوین جنین را به‌دنبال دارد مطالعات زیادی نشان دادند که مواجهه با الکل در دوره جنینی مسبب آسیب‌های مغزی مختلف و اختلال در عملکردهای شناختی مانند حافظه و یادگیری در زمان کودکی و بزرگسالی می‌گردد (۲۹). به‌نظر می‌رسد که عصاره زعفران با تاثیر بر گیرنده‌های دخیل در یادگیری و حافظه فضایی در سلول‌های عصبی، موجب بهبود در پردازش اطلاعات فضایی می‌شود (۳۰). نتایج تحقیق Hosseinzadeh و Ziaeei، نشان داد که عصاره آبی زعفران، کروسین و سافرانال تاثیری بر روی حافظه سالم نداشته ولی باعث کاهش اثرات تخریبی حافظه ناشی از هیوسین می‌شود (۳۱). طبق تحقیق Hosseinzadeh و همکاران، کروسین (۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ریواستیگمین و هیوسین به‌مدت پنج روز، مدت زمان حضور حیوان در ربع صحیح ماز در روز هشتم پس از برداشتن سکو را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند. سطح پروتئین CREB، BDNF و P-CREB و نیز سطح ترانسکریپت BDNF و CREB در دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین نسبت به گروه هیوسین افزایش معنی‌داری داشت. کروسین در دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر تقویتی مناسبی بر روی حافظه دارد و می‌تواند سطح پروتئین و ترانسکریپت BDNF و CREB را افزایش دهد (۳۲). تجویز عصاره زعفران می‌تواند تا حدودی اثرات مهاری مورفین در روند یادگیری فضایی موش صحرایی را بهبود بخشد (۳۳). هم‌چنین نشان داده شده مصرف کروسین به‌همراه داروهای ضدسرطان مانند دوکسوروبیسین می‌تواند یک اثر حفاظتی در مقابل اثرات مضر داروهای شیمی‌درمانی بر حافظه و حرکت داشته باشد (۳۴). تجویز کروسین باعث بهبود حافظه، کمبود سطح MDA، افزایش میزان گروه‌های تیول و فعالیت آنزیم GPX در موش‌های دریافت‌کننده استرپتوزوتوسین به‌صورت خوراکی بود (۳۵). در مطالعه دیگری اثر کروسین در پیشگیری از آسیب نورونی در مدل تجربی بیماری پارکینسون بررسی گردید. کروسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم در پیشگیری از آسیب نیتروزاتیو در ناحیه استریاتوم موثر است اما تاثیری در بهبود رفتار چرخشی در مدل بیماری پارکینسون ندارد (۳۶). کروسین باعث جلوگیری از فاکتور نکروزه کننده تومور آلفا (TNF-α) در بافت مردگی تومور که مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های PCL۲ با ایجاد مدل‌های mRNA در پروتئین‌های BCL-۲ می‌شود. این خود باعث حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو که به‌دلیل استرس مزمن در هیپوکامپ است می‌شود هم‌چنین باعث حفاظت در برابر نقص‌های حافظه و یادگیری در موش می‌شود. کروسین هم‌چنین باعث کاهش آسیب هیپوکامپ که درنتیجه استرس اکسیداتیو مرتبط با اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌شود. مطالعات پیشین بیانگر این یافته

است که نسبت زمان کاوش شیء جدید به کل زمان صرف شده برای کاوش هر دو شیء در گروه اتانول در مقایسه با گروه شاهد به شکل معنی‌داری کم‌تر بوده است (۱۴). میزان اختلالات طیف الکلی جنینی، ۱ مورد از ۱۰۰ تولد تخمین زده می‌شود. در مطالعه Allan و همکاران، مصرف الکل، فعالیت حرکتی را در یک میدان باز تغییر نداد اما زمان صرف شده برای بازرسی یک شی جدید وارد شده در میدان باز را افزایش‌داد. موش‌های الکلی هنگام‌تمرین، ترس‌زمینه‌ای نشان دادند(۳۷). نقص‌های انتخابی و پایدار در یادگیری فضایی پس از قرار گرفتن در معرض الکل زیاد نوزادان در موش‌های صحرایی نر توسط Johnson و Goodlett، نیز گزارش شده است (۳۸). این نتایج نشان می‌دهدکه قرارگیری جنین در معرض اتانول در دوران تکوین، سبب‌اختلال شناختی در بزرگسالی خواهد شد. نتایج پژوهش حاضر حاکی از وجود اثرات حفاظتی و درمانی کروسین بر نقص حافظه شناختی ناشی از اتانول که با آزمون شیء جدید ارزیابی شده بود، می‌باشد و بهبود حافظه‌شناختی ناشی از القای استرس در موش‌های صحرایی را نشان می‌دهد. هم‌چنین به شکل معنی‌داری مرگ سلولی نکروتیک القاء شده به‌واسطه اتانول با تجویز کروسین کاهش یافت. بنابراین عصاره زعفران و کروسین‌می‌توانند در آینده نویدبخش تولید داروهایی در کاهش اختلالات حافظه و یادگیری ناشی از زوال مغزی در بیماری‌ها باشند.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگر گرامی شهریار تقی‌پورکوه‌بنه جهت پیشبرد اهداف علمی این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

1. **Wozniak, J.R., Riley, E.P. and Charness, M.E., 2019.** Clinical presentation, diagnosis, and management of fetal alcohol spectrum disorder. The Lancet Neurology. 18: 760-770.
2. **Goodfellow, M.J., Abdulla K.A. and Lindquist D.H., 2016.** Lindquist DH. Neonatal ethanol exposure impairs trace fear conditioning and alters NMDA receptor subunit expression in adult male and female rats. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 40: 309-318.
3. **Li, E., Deng, H., Wang, B., Fu, W., You, Y. and Tian, S., 2016.** Apelin-13 exerts antidepressant like and recognition memory improving activities in stressed rats. European Neuropsychopharmacology. 26: 420-430.
4. **Akhondzadeh, S., Tahmacebi-Pour, N., Noorbala, A.A., Amini, H., Fallah-Pour, H. and Jamshidi, A.H., 2005.** *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized and placebo controlled trial. Phytotherapy Research. 19: 148-158.
5. **Niedzwiedz-Massey, V.M., Douglas J.C., Rafferty T., Wight P.A., Kane C.J.M. and Drew, P.D., 2021.** Ethanol modulation of hippocampal neuroinflammation, myelination, and neurodevelopment in a postnatal mouse model of fetal alcohol spectrum disorders. Neurotoxicology and Teratology. 87: 107-115.
6. **Gustas, K., Li, L., Newville, J. and Cunningham, L.A., 2020.** Functional and structural correlates of impaired enrichment-mediated adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of prenatal alcohol exposure. Brain Plasticity. 6: 67-82.
7. **Barr, A.M., Hofmann, C.E., Phillips, A.G., Weinberg, J. and Honer, W.G., 2005.** Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 29: 1915-1920.
8. **Sebastiani, G., Borrás-Novell, C., Casanova, M.A., Pascual, Tutusaus, M., Ferrero Martínez, S., Gómez Roig, M.D. and García-Algar, O., 2018.** The effects of alcohol and drugs of abuse on maternal nutritional profile during pregnancy. Nutrients. 10: 1008.
9. **Lueptow, L.M., 2017.** Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. Journal of Visualized Experiments. 126: e55718.
10. **Fryer, S.L., Tapert, S.F., Mattson, S.N., Paulus, M.P., Spadoni, A.D. and Riley, E.P., 2007.** Prenatal alcohol exposure affects frontal-striatal BOLD response during inhibitory control. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 31: 1415-1424.
11. **Brocardo, P.S., Gil-Mohapel, J., Wortman, R., Noonan, A., McGinnis, E. and Patten, A.R., 2017.** The effects of ethanol exposure during distinct periods of brain development on oxidative stress in the adult rat brain. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 41: 26-37.
12. **Helfer, J.L., Goodlett, C.R., Greenough, W.T. and Klintsova, A.Y., 2009.** The effects of exercise on adolescent hippocampal neurogenesis in a rat model of binge alcohol exposure during the brain growth spurt. Brain Research. 1294: 1-11.
13. **Hunt, P.S. and Barnet, R.C., 2015.** An animal model of fetal alcohol spectrum disorder: Trace conditioning as a window to inform memory deficits and intervention tactics. Physiology and Behavior. 148: 36-44.
14. **Michaelian, K. and Sutton, J., 2013.** Distributed cognition and memory research: History and current directions. Review of Philosophy and Psychology. 4: 1-24.
15. **Ahmadnezhad, M., Khodadadi, S., Nasiri Khalili, M.A. and Maleksabet, N., 2020.** Evaluation of chronic stress on spatial memory using Morris water maze test in animal model. Journal of Animal Environment. 12: 179-186.
16. **Amiri, B. and Mohammadzadeh M., 2015.** Memory enhancement in induced diabetic rats fed with the organic chromium enriched in unicellular yeasts. Journal of Animal Environment. 7: 59-64.
17. **Toosi, A., Shajiee, H., Khaksari, M., Vaezi, G. and Hojati, V., 2019.** Obestatin improve spatial memory impairment in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders via inhibiting apoptosis and neuroinflammation. Neuropeptides. 74: 88-94.
18. **Jafari, M., Hojati, V., Khaksari, M. and Vaezi, G., 2021.** Simvastatin attenuates spatial memory impairment via inhibiting microgliosis and apoptotic cell death against ethanol induced neurotoxicity in the developing rat hippocampus. Brain Research. 1758: 1-9.
19. **Klintsova, A.Y., Helfer, J.L., Calizo, L.H., Dong, W.K., Goodlett, C.R. and Greenough, W.T., 2007.** Persistent

impairment of hippocampal neurogenesis in young adult rats following early postnatal alcohol exposure. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 31: 2073-2082.

20. **Hamilton, G., Criss, K. and Klintsova, A., 2015.** Voluntary exercise partially reverses neonatal alcohol-induced deficits in mPFC layer II/III dendritic morphology of male adolescent rats. Synapse. 69: 405-415.

21. **Noori-Daloii, M.R. and Yaghoobi M.M., 2000.** Apoptosis and its relation to cancer, Part II. Journal of Razi. 2: 18-36.

22. **Ghotbeddin, Z., Tabandeh, M.R., Borujeni M.P., Truski F.F. and Tabrizian L., 2020.** Study the effect of crocin in three maternal hypoxia protocols with different oxygen intensities on motor activity and balance in rat offspring. Acta Neurologica Belgica. 120: 155-161.

23. **Ghotbeddin, Z., Tabandeh, M.R., Pourmahdi Borujeni, M., Fahimi Truski, F., Zalaki GhorbaniPour, M.R. and Tabrizian, L., 2021.** Crocin mitigated cognitive impairment and brain molecular alterations induced by different intensities of prenatal hypoxia in neonatal rats. Brain Behavior. 11: e02078.

24. **McLachlan, K., Flannigan, K., Temple, V., Unsworth, K. and Cook, J.L., 2020.** Difficulties in daily living experienced by adolescents, transition-aged youth, and adults with fetal alcohol spectrum disorder. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 44: 1609-1624.

25. **Mihalick, S.M., Crandall, J.E., Langlois, J.C., Krienke, J.D. and Dube, W.V., 2001.** Prenatal ethanol exposure, generalized learning impairment, and medial prefrontal cortical deficits in rats. Neurotoxicology and Teratology. 23: 453-462.

26. **Jacobson, S.W., Hoyme, H.E., Carter, R.C., Dodge, N.C., Molteno, C.D., Meintjes, E.M. and Jacobson, J.L., 2020.** Evolution of the Physical Phenotype of Fetal Alcohol Spectrum Disorders from Childhood through Adolescence. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 45: 395-408.

27. **Lawrence, R.C., Otero, N.K. and Kelly, S.J., 2012.** Selective effects of perinatal ethanol exposure in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. Neurotoxicology and Teratology. 34: 128-135.

28. **Kelly, S.J., Goodlett, C.R. and Hannigan, J.H., 2009.** Animal models of fetal alcohol spectrum disorders: impact of the social environment. Developmental Disabilities Research Reviews. 15: 200-208.

29. **Ethen, M.K., Ramadhani, T.A., Scheuerle, A.E., Canfield, M.A., Wyszynski, D.F., Druschel, C.M. and Romitti, P.A., 2009.** Alcohol consumption by women before and during pregnancy. Matern Child Health Journal. 13: 274-285.

30. **Gadami, S., Gadami, M.R., Haghighizad, H., Pourmotabbed, A., Sahraei, H. and Kamal nejad, M., 2016.** Investigating the effect of saffron extract on learning and spatial memory in rats. The 18th Congress of Physiology and Pharmacology of Iran. (In Persian)

31. **Hosseinzadeh, H. and Ziaeei, S.T., 2015.** Investigating the effect of saffron and its active ingredients, safranal and crocin, on healthy and hyoscine-destroyed memory on spatial learning in rats. Medicinal Plants. 5: 40-50. (In Persian)

32. **Hosseinzadeh, H., Abnous, Kh., Razavi, B.M. and Behrvanfar, N., 2014.** Investigating the effects of crocin on hisosin-degraded memory on spatial learning and its effect on the level of BDNF, CREB and P-CREB proteins in the rat brain. The first international congress of physiology and pharmacology and the 22nd congress of physiology and pharmacology of Iran. (In Persian)

33. **Haghighizad, H., Pourmotabbed, A., Gadami, M.R., Gadami, S., Sahraei, H. and Nedaeei, S.A., 2016.** The effect of saffron aqueous extract on the destruction of learning and spatial memory caused by morphine. The 18th Congress of Physiology and Pharmacology of Iran. (In Persian)

34. **Sohrabi Asadabad, J., Ghotbeddin, Z. and Tabandeh, M.R., 2017.** Study the Effect of Crocin on Avoidance Memory and Motor Activity Impairment Induced by Doxorubicin Administration in Adult Male Rats. Arak Medical University Journal. 20(126): 45-56. (In Persian)

35. **Naghizadeh, B., Mansouri, S.M.; Gorbanzadeh, B., Farbod, Y. and Sarkaki, A., 2013. Investigating** the protective effects of oral administration of crocin on spatial memory deficits and oxidative damage caused by streptozotocin in rats. The 21st Congress of Physiology and Pharmacology of Iran. (In Persian)

36. **Rajaei, Z., Alai, H. and Hosseini, S.M., 2014.** The effect of crocin on motor behavior and oxidative stress in the striatum region of the brain in an experimental model of Parkinson's disease. The first international congress of physiology and pharmacology and the 22nd congress of physiology and pharmacology of Iran. (In Persian)

37. **Allan, A.M., Chynoweth, J., Tyler, L.A. and Caldwell, K.K., 2003.** A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 27: 2009-2016.

38. **Johnson, T.B. and Goodlett, C.R., 2002.** Selective and enduring deficits in spatial learning after limited neonatal binge alcohol exposure in male rats. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 26: 83-93.