

Investigating the Effects of Crocin and Hydroalcoholic Extract of Terminalia Chebula on Memory and the Expression of PSD 95, Synapsin-1, and Synaptophysin Genes in the Hippocampus Following Stress in Male Rats

Neda Javadi¹
Gholam Hossein Meftahi²
Mohsen Korani³

¹ MSc in Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Associate Professor, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received October 1, 2023; Accepted February 12, 2024)

Abstract

Background and purpose: Stress is a stimulus that leads to a physical or psychological reaction. Stress affects memory and cognition. Common drugs for treating stress and memory disorders have limited effects and many side effects, so the search for new effective compounds with natural origin and fewer side effects is of interest. Various studies have shown that Terminalia chebula (T. chebula) and crocin are effective in improving memory. Several proteins, including synapsin-1, synaptophysin, and PSD95, are involved in the transmission of nerve messages in synapses involved in memory. In this study, the effect of the hydroalcoholic extract of T. chebula and crocin in improving memory and stress and the expression of synaptophysin, PSD 95, and synapsin-1 genes in the hippocampal tissue of male rats of the immobility stress model has been evaluated.

Materials and methods: 25 adult male Wistar rats were randomly divided into five groups, including a control group, a stress group, treated with hydroalcoholic extract of T. chebula group, treated with crocin group, simultaneously treated with hydroalcoholic extract of T. chebula, and crocin group. All groups except the control group were subjected to immobility stress for 14 days. Crocin was injected intraperitoneally (30 mg/kg) and hydroalcoholic extract of T. chebula was given as intragastric gavage (50 mg/kg). After fourteen days, the shuttle box test was performed to check the memory, then the animals were anesthetized and their hippocampal tissue was isolated, and the expression changes of synapsin-1, synaptophysin, and PSD 95 genes in the tissue were analyzed by Real-time PCR method.

Results: Immobility stress caused disruption in two memory indicators, i.e. increased the duration of staying in the dark chamber ($P < 0.01$) and decreased the latency time to enter the dark chamber compared to the control group ($P < 0.0001$). Treatment with the alcoholic extract of T. chebula did not affect the duration of staying in the dark chamber ($P > 0.05$), but crocin decreased it compared to the stress group ($P < 0.05$). The hydroalcoholic extract of T. chebula and crocin increased the latency time to enter the dark chamber compared to the stress group ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). As a result, both of them affected memory improvement parameters. The combination of the hydroalcoholic extract of T. chebula and crocin decreased the duration of staying in the dark chamber ($P < 0.05$) and increased the latency time to enter the dark chamber compared to the stress group ($P < 0.001$). Also, Immobility stress decreased the expression of synaptophysin, synapsin-1, and PSD95 genes in the hippocampus tissue compared to the control group ($P < 0.001$ for all genes). The expression of synaptophysin, synapsin-1, and PSD95 genes in the hippocampus tissue of groups treated with hydroalcoholic extract of T. chebula ($P < 0.01$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively), crocin ($P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively), and their combination ($P < 0.001$, $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively), increased compared to the stress group.

Conclusion: treatment with crocin and hydroalcoholic extract of T. chebula separately or their combination was effective in improving memory and reducing stress by increasing the expression of synapsin 1, synaptophysin, and PSD95 genes.

Keywords: stress, memory, hydroalcoholic extract of Terminalia chebula, crocin, synapsin-1, PSD95, synaptophysin

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 33 (230): 1-15 (Persian).

Corresponding Author: Mohsen Korani- Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
(E-mail: mohsenkorani@gmail.com)

اثرات کروسین و عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه بر حافظه و بیان ژن‌های PSD 95، synapsin-1، synaptophysin در هیپوکمپ به دنبال استرس در موش صحرایی نر

ندا جوادی^۱
غلام حسین مفتاحی^۲
محسن کرانی^۳

چکیده

سابقه و هدف: استرس یک محرک است که منجر به واکنش فیزیکی یا روانی می‌شود. استرس، حافظه و شناخت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. داروهای رایجی که برای درمان استرس و اختلالات حافظه استفاده می‌شوند اثرات محدود و عوارض جانبی فراوانی دارند، بنابراین جستجوی ترکیبات موثر جدید با منشأ طبیعی و عوارض جانبی کم‌تر، مورد توجه می‌باشند. مطالعات مختلف نشان داده است که هلیله سیاه و کروسین در بهبود حافظه مؤثر هستند. چندین پروتئین از جمله سیناپسین ۱، سیناپتوفیزین و PSD95 در انتقال پیام عصبی در سیناپس‌های دخیل در حافظه نقش دارند. در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه و کروسین در بهبود حافظه و استرس و بیان ژن‌های سیناپسین ۱، سیناپتوفیزین و PSD95 در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر مدل استرس بی حرکتی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۲۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به‌طور تصادفی به پنج گروه شامل گروه کنترل، گروه استرس، گروه تیمار شده با عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه، گروه تیمار شده با کروسین، گروه تیمار هم‌زمان با عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه و کروسین تقسیم شدند. همه گروه‌ها غیر از گروه کنترل به مدت ۱۴ روز تحت استرس بی حرکتی قرار گرفتند. کروسین به‌صورت داخل صفاقی (۳۰ mg/kg) و عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه به‌صورت گاوژ داخل معدی (۵۰ mg/kg) داده شد. پس از ۱۴ روز تست shuttle box جهت بررسی حافظه انجام شد. سپس حیوانات بی‌هوش شدند و هیپوکمپ آن‌ها جدا گردید و تغییرات بیان ژن‌های سیناپسین ۱، سیناپتوفیزین و PSD95 در بافت، توسط روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** استرس بی حرکتی باعث اختلال در دو شاخص حافظه شد، یعنی مدت زمان توقف در اتاقک تاریک را افزایش داد (P<۰/۰۰۱) و مدت زمان تأخیر جهت ورود به اتاقک تاریک را نسبت به گروه کنترل کاهش داد (P<۰/۰۰۱). درمان با عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه تأثیری بر روی مدت زمان توقف در اتاقک تاریک نداشت (P>۰/۰۵). اما کروسین منجر به کاهش مدت زمان توقف در اتاقک تاریک نسبت به گروه استرس شد (P<۰/۰۵). عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه و کروسین هر دو مدت زمان تأخیر جهت ورود به اتاق تاریک را افزایش دادند (به ترتیب P<۰/۰۱ و P<۰/۰۰۱). در نتیجه هر دوی آن‌ها پارامترهای بهبود حافظه را تحت تأثیر قرار دادند. ترکیب عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه و کروسین مدت زمان توقف در اتاقک تاریک را کاهش داد (P<۰/۰۵) و مدت زمان تأخیر جهت ورود به اتاقک تاریک را نسبت به گروه استرس افزایش داد (P<۰/۰۰۱). استرس بی حرکتی باعث کاهش بیان ژن‌های سیناپتوفیزین، سیناپسین ۱ و PSD95 در بافت هیپوکمپ نسبت به گروه کنترل شد (همگی P<۰/۰۰۱). هم‌چنین بیان ژن‌های سیناپتوفیزین، سیناپسین ۱ و PSD95 در بافت هیپوکمپ گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه (به ترتیب P<۰/۰۱، P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۰۱)، کروسین (به ترتیب P<۰/۰۰۱، P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۰۱) و ترکیب آن‌ها (به ترتیب P<۰/۰۰۱، P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه استرس افزایش یافت.

استنتاج: درمان با کروسین و عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه به‌طور جداگانه و یا ترکیب آن‌ها در بهبود حافظه و کاهش استرس با افزایش بیان ژن‌های سیناپسین ۱، سیناپتوفیزین و PSD95 موثر بود.

واژه‌های کلیدی: استرس، حافظه، عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه، کروسین، سیناپسین ۱، سیناپتوفیزین، PSD95

E-mail: mohsenkorani@gmail.com

مؤلف مسئول: محسن کرانی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۷/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳

مقدمه

هر شرایطی که به طور جدی هومئوستاز فیزیولوژیکی-روانی یک ارگانیسم را مختل کند، استرس نامیده می شود (۱). برای ایجاد رفتارهای مناسب و پاسخ های فیزیولوژیکی نیاز به تعامل هماهنگ بین سیستم های عصبی و هورمونی است (۲).

یکی از ساختارهای مغزی که در حافظه و تنظیم نورواندوکرین هورمون های استرس نقش مهمی دارد، هیپوکمپ است (۳). هیپوکمپ بازخورد منفی روی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال اعمال می کند. کورتیکواستروئیدها که توسط محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال در پاسخ به استرس سنتز و ترشح می شوند، واسطه اثرات استرس بر هیپوکمپ هستند (۴). استرس مزمن، دندریت نورون های ناحیه CA3 هیپوکمپ و شکنج دندانهای را کاهش می دهد و سبب از بین رفتن خارهای دندریتی ناحیه CA1 هیپوکمپ می شود (۵). قرار گرفتن در معرض عوامل استرس زا باعث کاهش نورونز هیپوکمپ حتی در بزرگسالی می شود (۶).

چندین پروتئین در انتقال پیام عصبی در سیناپس های دخیل در حافظه نقش دارند. سیناپتوفیزین یک پروتئین غشای پیش سیناپسی است که برای انتقال عصبی در نورون های هیپوکمپ ضروری است (۷). از دست دادن آن در وزیکول پیش سیناپسی در هیپوکمپ با زوال شناختی در بیماری آلزایمر ارتباط دارد (۸). علاوه بر این، شواهدی برای کاهش سطوح سیناپتوفیزین در قشر جلوی مغز بیماران اسکیزوفرنی وجود دارد (۹). PSD95 نیز یک پروتئین داربست پس سیناپسی است که با تثبیت افزایش سیناپسی مرتبط است، همچنین یک جزء ضروری در انتقال گلوتاماترژیک، شکل پذیری سیناپسی و مورفوزن خارهای دندریتیک در طول توسعه عصبی است (۱۰). PSD95 ارتباط نزدیکی با حافظه دارد و کاهش بیان آن با اختلال در حافظه کاری فضایی مرتبط است (۱۱). سیناپسین از پروتئین های سیناپسی مهم

دیگر در سیناپس نورون ها می باشد. در هیپوکمپ، اینوزفرم های سیناپسین یکی از پروتئین های موثری هستند که از طریق آن حافظه مرتبط با استرس را تقویت می کند. Synapsin-Ia/Ib بیشترین فسفو پروتئین های مرتبط با وزیکول پیش سیناپسی هیپوکمپ هستند (۱۲).

گیاهان دارویی از زمان های قدیم در درمان بیماری های مختلف مورد استفاده قرار می گرفتند. در این راستا زعفران علاوه بر این که به عنوان یک ادویه مورد استفاده قرار می گرفته، در درمان بیماری های مختلف نیز به کار می رفته است. از اجزای مهم تشکیل دهنده زعفران می توان به کروسین، کروستین و پیکروکروسین و سافرانال اشاره کرد (۱۳). این اجزا علاوه بر خواص آنتی اکسیدانی (۱۴،۱۳) واجد خواصی چون کاهنده لیپیدهای سرمی (۱۵) محافظ قلب و عروق و اعصاب (۱۶،۱۷)، افزایش دهنده حساسیت به انسولین و ضدالتهابی هستند (۱۸). کروسین خواص ضد سرطانی داشته و فعالیت آنتی اکسیدانی کروسین در درمان آسیب های نورونی گزارش شده است (۱۹). شواهد اخیر اثرات محافظت کننده عصبی کروسین را در مدل های تجربی مختلف اختلالات عصبی نشان داده اند (۲۰،۲۱). گیاه هلیله سیاه (*Terminalia chebula*) یکی از گیاهان دارویی در طب سنتی هند و جنوب آسیا به شمار می رود. در طب سنتی ایرانی و هندی، از هلیله سیاه برای درمان بیماری های زیادی از قبیل دیابت، عفونت های چشمی، اسهال و خونریزی استفاده می شود. گیاه هلیله سیاه دارای خواص ضد درد، ضد التهاب، اثرات آنتی اکسیدانی و همچنین دارای اثرات محافظتی بر سلول ها می باشد (۲۲). هلیله سیاه بر اختلال شناختی ناشی از اتانول و فراموشی ناشی از دیازپام اثر محافظتی دارد و باعث فعالیت یادگیری و تقویت حافظه می شود (۲۳).

بیشتر اثرات کروسین و هلیله سیاه مربوط به خواص آنتی اکسیدانی آن ها است، اگرچه در برخی مطالعات اثر کروسین بر اختلالات حافظه و یادگیری به دنبال استرس بررسی شده، ولی هنوز مطالعه ای بر روی

حیوانات آزمایشگاهی در تمامی مراحل انجام بر طبق دستورالعمل NIH انجام گرفت. این مطالعه با کد اخلاق IR.BMSU.AEC.1401.011 در کمیته اخلاق دانشگاه بقیه الله به تصویب رسیده است.

آماده سازی کروسین و عصاره

کروسین به صورت آماده از شرکت Sigma-Aldrich تهیه و در نرمال سالین حل گردید. میوه هلیله سیاه از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد. برای تهیه عصاره هیدرو الکلی، میوه هلیله سیاه در دمای اتاق در هوا خشک شده، سپس آسیاب شده و برای تهیه عصاره از اتانول: آب (۷۰:۳۰) (V/V) استفاده شد و در نهایت عصاره به دست آمده برای استفاده بیش تر در دمای ۵ درجه سلسیوس نگهداری شد (۲۴). برای گاوژ عصاره در نرمالین سالین حل گردید.

طراحی مطالعه

این مطالعه بر روی ۲۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار انجام گرفت. موش ها به طور تصادفی در پنج گروه ۵ تایی تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل: هیچ گونه مداخله ای دریافت نکرد.
۲. گروه استرس: تنها تحت استرس قرار گرفتند.
۳. گروه کروسین+استرس: هر روز ۳۰ دقیقه قبل از استرس کروسین (۳۰ mg/kg) دریافت می کردند (۲۵).
۴. گروه استرس+ عصاره هلیله سیاه: هر روز ۳۰ دقیقه قبل از استرس، عصاره هلیله سیاه (۵۰ mg/kg) را دریافت می کردند (۲۶).
۵. گروه استرس+ عصاره هلیله سیاه+کروسین: هر روز ۳۰ دقیقه قبل از استرس، عصاره هلیله سیاه و کروسین را دریافت می کردند.

القا/ استرس بی حرکتی مزمن

برای القای استرس بی حرکتی از دستگاه Restrainer استفاده شد، که این دستگاه شامل استوانه پلاستیکی بود که یک انتهای آن به صورت

اثر بخشی همزمان مصرف کروسین و عصاره هیدرو الکلی هلیله سیاه انجام نشده است. لذا، با توجه به نیاز حوزه بالینی به یک گزینه درمانی جدید با عوارض جانبی کم در درمان اختلالات حافظه به دنبال استرس، هدف اول در مطالعه حاضر، بررسی اثرات تجویز به تنهایی و همزمان عصاره هلیله سیاه و کروسین بر پاسخ های حافظه در مدل استرس بی حرکتی در موش صحرایی نر بود. از طرفی با توجه به این که استرس بیان ژن های سیناپسی از جمله synapsin-1، synaptophysin و PSD95 را در هیپوکمپ دچار تغییر می کند، لذا هدف دوم، بررسی اثرات تجویز به تنهایی و همزمان عصاره هلیله سیاه و کروسین بر بیان این ژن ها در هیپوکمپ به دنبال استرس بی حرکتی بود. به عبارتی دیگر، بعضی از مطالعات حیوانی و کلینیکی نشان داده است که درمان با کروسین یا هلیله سیاه به تنهایی اگرچه اثرات محافظت عصبی دارد ولی این اثرات محافظت نورونی قابل توجه نمی باشد. در این راستا، درمان ترکیبی با روش های مؤثر مختلف ممکن است به پیشگیری از نقص های شناختی و ژن های دخیل در اختلالات استرسی کمک کند. براساس این مطالعات، ما فرض کردیم که درمان با کروسین همراه با هلیله سیاه ممکن است برای جلوگیری از نقص های شناختی و اختلال ژن های مربوط به آن در نورون های هیپوکامپ ناشی از استرس مزمن، مفیدتر باشد.

مواد و روش ها

حیوانات

موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بقیه الله تهیه شدند. قبل از شروع آزمایش برای سازگاری به مدت یک هفته در شرایط دسترسی آزاد به آب و غذا، سیکل نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دمای 25 ± 3 درجه سلسیوس و هم چنین شرایط تهویه و رطوبت کنترل شده نگهداری شدند. دستورالعمل مراقبت و نگهداری از

نیمه کامل بسته شده بود، به نحوی که حیوانات می توانستند پوزه خود را در قسمت نیمه باز لوله قرار داده و نفس بکشند، اما امکان چرخش یا عقب گرد حیوان وجود نداشت، انتهای این لوله به وسیله یک درپوش بسته می شد، در نتیجه حیوان امکان جابجایی در داخل لوله را نداشت. هر حیوان دو ساعت در روزبه مدت ۱۴ روز استرس داده می شد.

تست یادگیری/احترازی غیر فعال

این تست یک روز پس از پایان استرس انجام شد. برای انجام آن از دستگاه Shuttle box استفاده شد. این دستگاه دارای دو محفظه تاریک و روشن مجزا است که توسط یک درب گیوتینی قابل کنترل از هم جدا شده اند. این تست شامل سه مرحله سازش پذیری، یادگیری و یادآوری بود (۲۷).

مرحله سازش پذیری

در روز هشتم استرس مرحله سازش پذیری انجام شد. در این مرحله حیوان به طوری که رو به درب گیوتینی باشد درون محفظه روشن قرار داده می شد و پس از ۱۰ ثانیه به آرامی درب میانی باز می شد و مدت زمان تاخیر (Step through latency: STL) برای ورود حیوان به بخش تاریک ثبت می شد. در صورتی که این زمان بیش از ۳۰۰ ثانیه بود به دلیل عدم تمایل به بخش تاریک، حیوان از مطالعه خارج می شد.

مرحله یادگیری

دو ساعت پس از مرحله سازش پذیری حیوان (در روز هشتم استرس) هم چون مرحله قبل درون محفظه روشن قرار می گرفت، با این تفاوت که به محض ورود حیوان به محفظه تاریک درب بسته شده و به کف دست و پای حیوان شوک الکتریکی با شدت ۰/۵ میلی آمپر و فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۲ ثانیه اعمال می شد و پس از ۲۰ ثانیه حیوان از دستگاه خارج می شد و ۲ دقیقه بعد

مجدداً این مرحله تکرار می شد. در صورت امتناع حیوان از ورود به بخش تاریک در دفعات دوم و سوم یادگیری، حیوان با دست به محفظه تاریک هدایت شده و شوک اعمال می گردید.

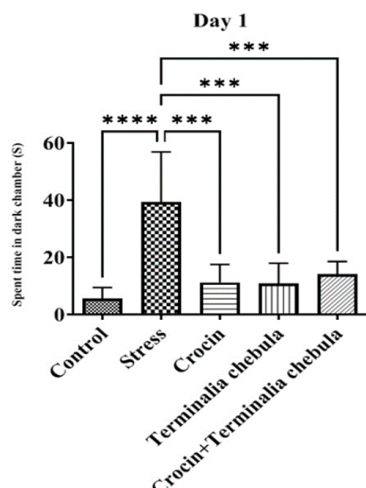
مرحله یادآوری

مرحله یادآوری در روزهای ۱، ۴ و ۷ روز پس از آموزش (که به ترتیب معادل روزهای ۹ و ۱۲ استرس و یک روز پس از پایان استرس بود) انجام گرفت. بدین صورت که همچون مراحل قبل حیوان در محفظه روشن قرار داده می شد و مدت زمان تاخیر جهت ورود به محفظه تاریک ثبت می شد. حد اکثر زمان سنجش جهت ورود به بخش تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد. یادآوری در روزهای ۱، ۴ و ۷ به ترتیب نمایانگر حافظه کوتاه مدت، میان مدت و دراز مدت می باشد.

Real time PCR

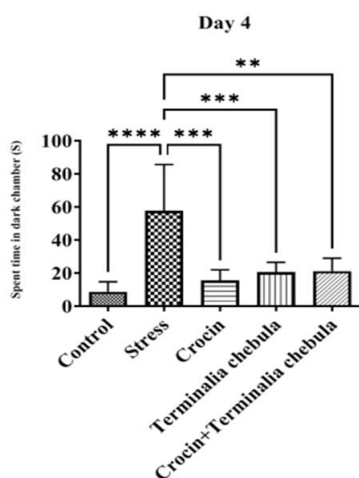
یک روز پس از اتمام استرس و پس از انجام تست یادآوری با استفاده از کتامین هیدرو کلرید ۱۰ درصد و زایلازین ۲ درصد حیوانات بیهوش و مغز حیوان جدا شد. سپس هیپوکمپ آن ها جدا و در نیتروژن مایع قرار داده شد. نمونه های بافتی تا زمان آنالیز ژن ها در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در زمان آنالیز بیان ژن ها ابتدا با استفاده از محلول ترایزول (Invitrogen، آمریکا) و بر اساس دستورالعمل سازندگان کیت RNA توتال استخراج گردید و سپس با استفاده از کیت QuantiTect Rev transcriptase (Qiagen، آمریکا) سنتز cDNA انجام گردید و در نهایت با استفاده از کیت Quanti Fast SYBER Green PCR (Qiagen، آمریکا) و پرایمرهای اختصاصی بیان ژن های synaptophysin، PSD95 و ژن GAPDH به عنوان house-keeping سنجیده شد.

در پایان بیان نسبی ژن ها نسبت به ژن GAPDH در حالات مختلف سالم، استرس و گروه های بیمار شده با



نمودار شماره ۱: زمان توقف در محفظه تاریک در گروه‌های مورد مطالعه در روز اول بعد از زمان یادگیری
 *** معنی‌داری $P < 0/001$ و **** معنی‌داری $P < 0/0001$

در روز ۴ بعد از یادگیری نیز الگوی مشابه روز اول مشاهده شد (نمودار شماره ۲). زمان توقف در محفظه تاریک در گروه استرس نسبت به کنترل به‌طور معنی‌داری ($P < 0/0001$) افزایش یافت. تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و تیمار همزمان آن‌ها زمان توقف را کاهش دادند (به ترتیب $P < 0/001$ ، $P < 0/001$ و $P < 0/01$) در روز ۴ بعد از یادگیری نیز همانند روز اول بعد از یادگیری نیز بین گروه‌های مختلف، تفاوتی در این زمان مشاهده نشد ($P < 0/05$).



نمودار شماره ۲: زمان توقف در محفظه تاریک در گروه‌های مورد مطالعه در روز چهارم بعد از زمان یادگیری. (** معنی‌داری $P < 0/01$ ، *** معنی‌داری $P < 0/001$ و **** معنی‌داری $P < 0/0001$)

فرمول $2^{-\Delta C}$ سنجش شد (۲۸). پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از مقالات مختلف تهیه شده‌اند که پس از بلاست در NCBI و اطمینان از کارایی آن‌ها برای این مطالعه انتخاب شدند. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: توالی‌ها و اندازه آمپلیکون پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	ترادف	اندازه آمپلیکون (جفت باز)	رفرنس
Synapsin-1	F: GTGTCAGGGAAGCTGGAAGACC R: AGGAGCCCAACACCTCAATA	۱۸۱	(۲۹)
PSD95	F: AGTGACAACCAAGAAATACCGC R: CCCTCTGTTCATTACCTGTC	۱۵۹	(۳۰)
Synaptophysin	F: AGGGCTATGATGGACITTTCTG R: TCCGTGGCCATCTTCACAT	۱۰۵	(۷)
GAPDH	F: CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA R: GGCATGGACTGTGGTCATGA	۱۱۸	(۲۹)

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:

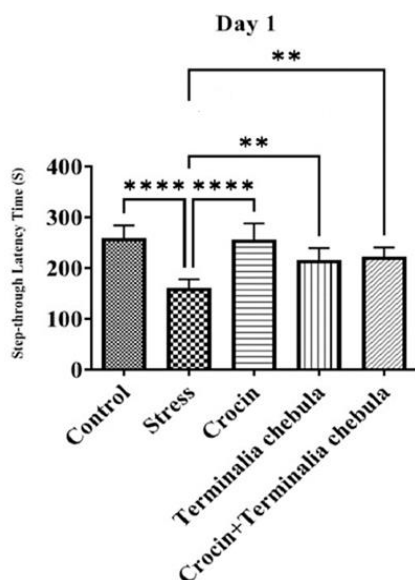
محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 18.0 انجام گرفت. نتایج کمی به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($Mean \pm SD$) بیان شدند. از روش ANOVA و Post Hock Tukey multiple comparison جهت مقایسه نتایج آزمایشگاهی بین گروه‌های مختلف استفاده شد. سطح معنی‌دار بودن $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

در روزهای ۱، ۴ و ۷ بعد از یادگیری پارامترهای تست shuttle box بررسی شد که شامل دو پارامتر مدت‌زمان توقف در اتاقک تاریک و مدت زمان تاخیر برای ورود به اتاقک تاریک بود.

زمان توقف در محفظه تاریک

نتایج آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری را در زمان سپری شده در محفظه تاریک در بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (نمودار شماره ۱). یک روز بعد از یادگیری، زمان سپری شده در محفظه تاریک به‌طور معنی‌داری ($P < 0/0001$) در گروه استرس در مقایسه با کنترل افزایش یافته است. تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و تیمار همزمان آن‌ها زمان توقف را کاهش دادند (برای همه گروه‌ها $P < 0/001$).

($P < 0.0001$) کاهش یافت. تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و تجویز همزمان آن‌ها این مدت زمان را نسبت به گروه استرس به‌طور معناداری افزایش داد (به ترتیب $P < 0.0001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.01$) (نمودار شماره ۴).

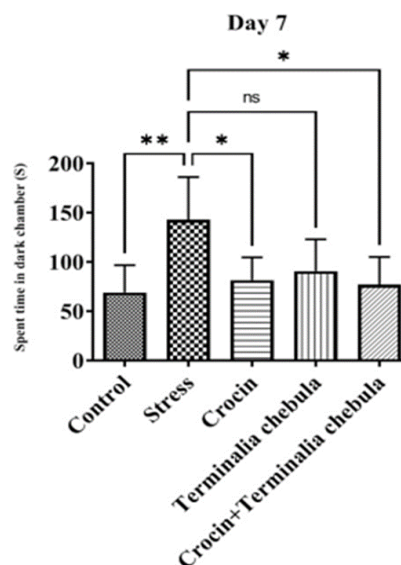


نمودار شماره ۴: مدت زمان تاخیر در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در روز اول پس از یادگیری
 ** معنی‌داری $P < 0.01$ و **** معنی‌داری $P < 0.0001$

در روز ۴ بعد از یادگیری هم الگوی مشابه روز اول پس از یادگیری دیده شد. مدت زمان تاخیر در گروه استرس نسبت به کنترل به‌طور معناداری ($P < 0.0001$) کاهش یافت. تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و تجویز همزمان آن‌ها این زمان را نسبت به گروه استرس به‌طور معناداری افزایش داد (به ترتیب $P < 0.0001$ ، $P < 0.05$ و $P < 0.01$) (نمودار شماره ۵).

در روز ۷ بعد از یادگیری نیز مدت زمان تاخیر گروه استرس نسبت به کنترل به‌طور معناداری ($P < 0.0001$) کاهش یافت. همانند روزهای ۱ و ۴ تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و تجویز همزمان کروسین و عصاره هلیله سیاه زمان تاخیر را نسبت به گروه استرس به‌طور معناداری افزایش دادند (به ترتیب $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.01$) (نمودار شماره ۶).

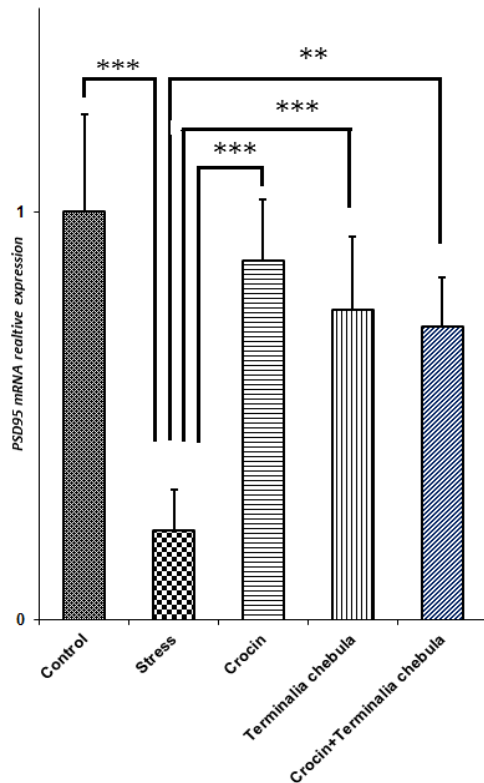
در روز ۷ بعد از یادگیری، زمان سپری شده در محفظه تاریک به‌طور معنی‌داری ($P < 0.01$) در رت‌های تحت استرس در مقایسه با کنترل افزایش یافت (نمودار شماره ۳). کروسین باعث کاهش معنادار زمان توقف نسبت به گروه استرس ($P < 0.05$) شد در حالی که عصاره هلیله سیاه از نظر آماری تغییری را در زمان توقف نسبت به گروه استرس ایجاد نکرد ($P > 0.05$) اما تجویز همزمان کروسین و عصاره هلیله سیاه به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) زمان سپری شده در محفظه تاریک را نسبت به گروه استرس کاهش داد. تفاوت معنی‌داری ($P > 0.05$) بین گروه کروسین، عصاره هلیله سیاه و ترکیب آن‌ها در زمان سپری شده در محفظه تاریک در روزهای مختلف مشاهده نشد.



نمودار شماره ۳: زمان توقف در محفظه تاریک در گروه‌های مورد مطالعه در روز هفتم بعد از زمان یادگیری
 * معنی‌داری $P < 0.05$ ، ** معنی‌داری $P < 0.01$ و ns معنی‌داری نبود.

مدت زمان تاخیر

در روز اول پس از یادگیری مدت زمان تاخیر ورود به اتاقک تاریک (مدت زمانی که طول می‌کشد تا موش‌ها از اتاقک روشن به محفظه تاریک بروند) در گروه استرس نسبت به کنترل به‌طور معناداری



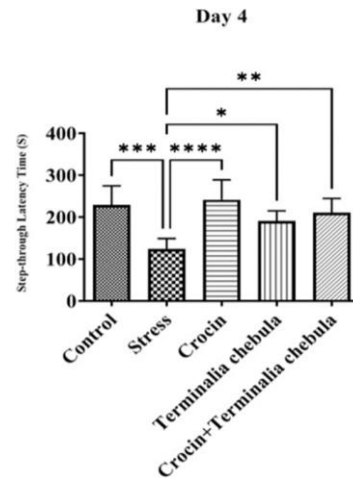
نمودار شماره ۷: بیان نسبی ژن PSD95 در گروه‌های مورد مطالعه
** معنی‌داری $P < 0.01$ و *** معنی‌داری $P < 0.001$

نتایج بررسی بیان نسبی mRNA ژن سیناپسین ۱ در جمعیت مورد مطالعه

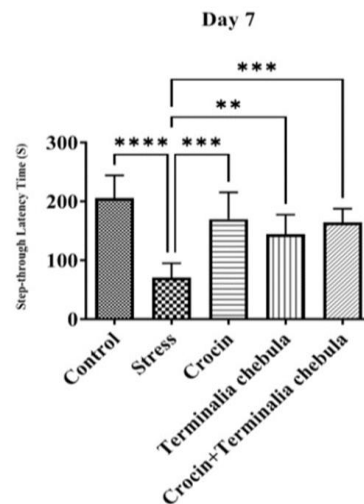
چنانچه در نمودار شماره ۸ مشاهده می‌شود بیان ژن سیناپسین ۱ در گروه استرس نسبت به کنترل به شکل معناداری ($P < 0.001$) کاهش یافت. تیمارهای مختلف با این کاهش مقابله کردند. تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و ترکیب همزمان آن‌ها سبب افزایش بیان نسبت به گروه استرس شد (به ترتیب $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$).

نتایج بررسی بیان نسبی mRNA ژن سیناپتوفیزین در جمعیت مورد مطالعه

همانطور که در نمودار شماره ۹ مشاهده می‌شود بیان ژن سیناپتوفیزین در گروه استرس نسبت به کنترل کاهش معناداری ($P < 0.001$) داشت. تجویز کروسین، هلیله و ترکیب آن‌ها سبب افزایش معنادار در بیان این ژن نسبت به گروه استرس شد (به ترتیب $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$).



نمودار شماره ۵: مدت زمان تاخیر در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در روز چهارم پس از یادگیری
* معنی‌داری $P < 0.05$ ، ** معنی‌داری $P < 0.01$ ، *** معنی‌داری $P < 0.001$ و **** معنی‌داری $P < 0.0001$



نمودار شماره ۶: مدت زمان تاخیر در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در روز هفتم پس از یادگیری (** معنی‌داری $P < 0.01$ ، *** معنی‌داری $P < 0.001$ و **** معنی‌داری $P < 0.0001$)

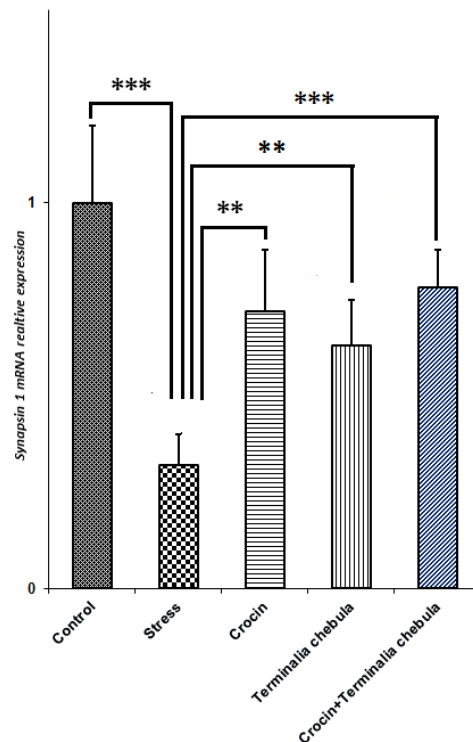
نتایج بررسی بیان نسبی mRNA ژن PSD95 در جمعیت مورد مطالعه

همان‌طور که در نمودار شماره ۷ نشان داده شده بیان PSD95 در گروه استرس نسبت به کنترل به‌طور معناداری ($P < 0.001$) کاهش یافته است. تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و تجویز همزمان آن‌ها باعث افزایش معنادار بیان آن نسبت به گروه استرس شد (به ترتیب $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.01$).

باتوجه به نمودارهای شماره ۱ تا ۶ که مربوط به دو شاخصه حافظه یعنی زمان توقف در محفظه تاریک و مدت زمان تاخیر برای ورود به محفظه تاریک می باشد، استرس سبب افزایش زمان توقف و کاهش مدت زمان تاخیر می شود و تیمارهای مختلف سبب بهبود در این شاخصه ها شده اند. هیچ اختلافی بین تیمارهای مختلف در تاثیرگذاری بر حافظه وجود نداشت. هم چنین همان طور که از مقایسه نتایج نمودارهای شماره ۷ تا ۹ مشخص است، استرس باعث کاهش بیان ژن های مختلف می شود. بیشترین کاهش بیان در گروه استرس نسبت به کنترل به ترتیب مربوط به ژن های سیناپتوفیزین (کاهش ۸/۳۳ برابری) و PSD95 (کاهش ۴/۵۵ برابری) و سپس سیناپسین ۱ (کاهش ۳/۱۳ برابری) می باشد. تیمارهای مختلف سبب افزایش بیان این ژن ها نسبت به گروه استرس شدند. بیشترین افزایش بیان هم پس از تیمار به ترتیب مربوط به ژن های سیناپتوفیزین، PSD95 و سپس سیناپسین ۱ می باشد. کروسین باعث افزایش ۶/۷ برابری، ۴ برابری و ۲/۲۵ برابری؛ عصاره هلیله سیاه باعث افزایش ۵ و ۳/۴۵ و ۲ برابری و ترکیب کروسین و عصاره هلیله سیاه باعث افزایش ۷/۹ و ۳/۲۷ و ۲/۴۴ برابری در بیان ژن به ترتیب سیناپتوفیزین، PSD95 و ژن سیناپسین ۱ شده است. تفاوتی بین گروه های مختلف در سطح بیان دیده نشد.

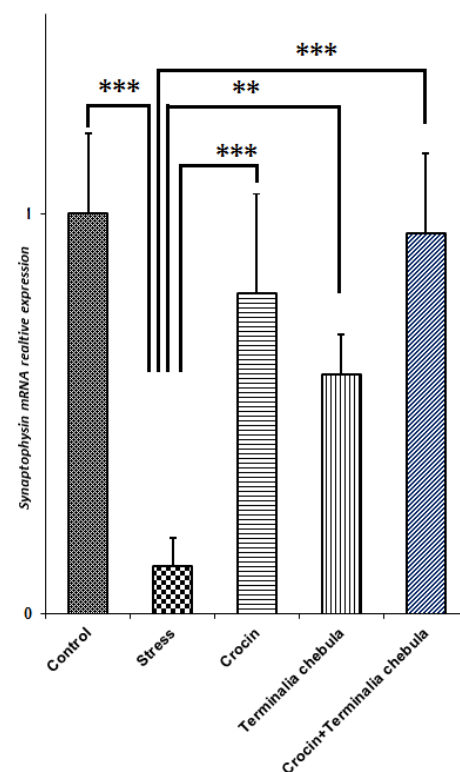
بحث

مطالعه حاضر بر پایه ای مبتنی بر بررسی اثربخشی عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه و کروسین بر استرس و اختلال حافظه ناشی از آن و نیز اثر آن بر میزان بیان سه ژن synapsin-1، synaptophysin، PSD95 صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که استرس بر شاخصه های حافظه شامل زمان توقف در محفظه تاریک و مدت زمان تاخیر تاثیر می گذارد به گونه ای که مدت زمان توقف در محفظه تاریک را افزایش و مدت زمان تاخیر برای ورود به محفظه تاریک را کاهش می دهد



نمودار شماره ۸: بیان نسبی ژن سیناپسین ۱ در گروه های مورد مطالعه

** معنی داری $P < 0.01$ و *** معنی داری $P < 0.001$



نمودار شماره ۹: بیان نسبی ژن سیناپتوفیزین در گروه های مورد مطالعه

** معنی داری $P < 0.01$ و *** معنی داری $P < 0.001$

که نشان دهنده اختلال در حافظه است. علاوه بر این بیان ژن‌های دخیل در حافظه شامل synaptophysin و PSD95 و synapsin-1 در گروه استرس نسبت به کنترل کاهش می‌یابد. تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و تجویز همزمان آن‌ها باعث کاهش مدت زمان توقف و افزایش مدت زمان تاخیر و افزایش بیان ژن‌های فوق گردید که نشان دهنده اثربخشی تیمارهای مختلف بر حافظه در سطح مولکولی و رفتاری می‌باشد.

استرس یک واکنش به محرک‌های داخلی و خارجی است که باعث ایجاد بسیاری از اختلالات مغزی مانند کمبود حافظه می‌شود (۳۱). استرس شدید و یا طولانی مدت ممکن است منجر به تغییراتی در عملکرد و ساختار مغز به ویژه در هیپوکمپ می‌شود (۳۲). هیپوکمپ نقش مهمی در حافظه و تنظیم هورمون‌های استرس عصبی دارد (۳۳). استرس بر مورفولوژی و فیزیولوژی سیستم عصبی تأثیر می‌گذارد و به هیپوکمپ آسیب می‌رساند و در نهایت منجر به اختلال در یادگیری و حافظه می‌شود (۳۴). استرس بی‌حرکتی مزمن باعث مرگ و آتروفی نورون‌های هیپوکمپ در موش صحرایی می‌شود (۳۵). بخش مهمی از تحقیقات علوم اعصاب نشان داده است که تجربیات استرس‌زا می‌تواند به جنبه‌های خاصی از عملکرد مغز آسیب برساند. استرس غیرقابل کنترل می‌تواند عوارض جانبی نامطلوبی مانند اختلال یادگیری و ظرفیت حافظه داشته باشد که باعث تشدید کاهش شناخت مرتبط با پیری، رفتارهای مضطرب، کاهش فعالیت تولیدمثلی و افزایش مستعد شدن نورون‌های هیپوکمپ به آتروفی یا نکروز شود (۳۶، ۳۷). امروزه، گزینه‌های درمانی برای درمان استرس تنها تسکین نسبی ایجاد می‌کند و درمان استرس هنوز وجود ندارد. بنابراین، استفاده از داروهای قابل تحمل‌تر و کم‌تر سمی‌تر با اثرات مطلوب‌تر برای مهار یادگیری و اختلال و کاهش رفتارهای شبه اضطرابی و آسیب‌های ساختاری عصبی در استرس ضروری به نظر می‌رسد (۳۸).

کروسین یکی از موادی است که می‌تواند اختلال

حافظه ناشی از استرس را بهبود دهد. چنان‌چه در مطالعه حاضر کروسین هم مدت زمان توقف و هم مدت زمان تاخیر در اتاقک تاریک را بهبود بخشید، مطالعات نسبتاً مشابهی در این مورد صورت گرفته است. کروسین سبب کاهش قابل توجه رفتارهای شبه اضطرابی می‌شود.

در سال ۲۰۱۵ طلایی و همکاران اثر ضد اضطرابی کروسین را در بیماران مبتلا به اختلال افسردگی بررسی کردند که نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد کروسین باعث بهبود قابل توجهی در علائم اضطراب می‌شود (۳۸).

در سال ۲۰۱۹ ادبی‌زاده و همکاران اثرات کروسین بر اختلال حافظه فضایی ناشی از هیوسین در هیپوکمپ موش صحرایی مورد بررسی قرار دادند. کروسین، هیوسین، نرمال سالین و ریواسیتگمین به مدت ۵ روز به موش‌های صحرایی نر و یستار به صورت داخل صفاقی تجویز شد. تجویز کروسین و ریواسیتگمین به‌طور قابل توجهی یادگیری را بهبود بخشید. اختلال در یادگیری و حافظه ناشی از هیوسین توسط کروسین بهبود یافت (۳۹).

در سال ۲۰۱۸ فرخنده و همکاران به بررسی تأثیرات محافظتی کروسین در مدیریت بیماری‌های عصبی پرداختند و اثرات ضد صرع و ضد آلزایمر کروسین را گزارش دادند. کارایی کروسین در درمان ایسکمی مغزی و آسیب مغزی تروماتیک نیز با استفاده از مدل‌های حیوانی تأیید شد. درمان با کروسین باعث افزایش سطح دوپامین در مغز مدل تجربی بیماری پارکینسون شد، این بررسی هم‌چنین نشان داد که کروسین می‌تواند به‌عنوان یک کاندید موثر در مدیریت بیماری‌های سیستم عصبی به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن در نظر گرفته شود (۴۰).

یکی دیگر از گیاهانی که در این مطالعه جهت بهبود اختلال حافظه ناشی از استرس استفاده شد، هلیله سیاه بود که باعث بهبود شاخصه‌های حافظه و افزایش بیان ژن‌هایی دخیل در حافظه شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدرو الکلی هلیله سیاه اختلال حافظه ناشی از استرس بی‌حرکتی را بهبود می‌بخشد.

مطالعات نشان داده است که هلیله سیاه اثرات ضد درد، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و اثرات محافظتی بر روی سلول‌ها دارد (۴۱).

در سال ۲۰۱۱ مطالعه‌ای که توسط Debnath و همکاران انجام شد فعالیت ضد استرسی عصاره اتانولی هلیله سیاه (۲۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) مورد بررسی قرار داد. نتایج این مطالعه نشان داد که هلیله سیاه مانع افزایش سطوح بیوشیمیایی گلوکز، تری گلیسرید، کورتیکوسترون پلازما و هم چنین تغییر وزن آدرنال، کبد و کلیه ناشی از استرس می‌شود (۴۲). این مطالعه اثر ضد استرسی عصاره اتانولی هلیله سیاه را نشان می‌دهد، زیرا توانسته بود فاکتورهای مختلف مرتبط با استرس را بهبود ببخشد. علی‌رغم تفاوت در طراحی مطالعه و نوع و دوز عصاره اما به گونه‌ای همسو با نتایج مطالعه ما می‌باشد.

در سال ۲۰۱۸ Lakshmi و همکاران اثر عصاره اتانولی (۱۰۰ mg/kg) و عصاره آبی (۱۰۰ mg/kg) میوه هلیله سیاه بر فعالیت یادگیری و تقویت حافظه در موش‌های صحرایی دچار اختلال شناختی ناشی از اتانول و فراموشی ناشی از دیازپام را مورد بررسی قرار دادند که مشخص شد هر دو عصاره اثر حفاظتی دارند (۲۳) که همسو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استرس سبب کاهش بیان ژن‌های مرتبط با حافظه یعنی سیناپتوفیزین، سیناپسین و PSD 95 می‌شود و تیمار با کروسین، عصاره هلیله سیاه و تیمار همزمان آن‌ها بیان این ژن‌ها را در هیپوکمپ افزایش می‌دهند. سیناپتوفیزین یک گلیکوپروتئین ساختاری و جزء اصلی غشاهای وزیکولی سیناپسی است. سیناپتوفیزین در آگروسیتوز انتقال‌دهنده عصبی نقش دارد و یک نشانگر عصبی غدد درون ریز است. سیناپسین ۱ پروتئینی محیطی در وزیکول‌های سیناپسی است که در تعدیل انتشار انتقال‌دهنده‌های عصبی نقش دارد. تقریباً در تمام انواع سلول‌های عصبی بیان می‌شود اما در هیچ سلول غیر عصبی یافت نشده

است (۴۳). PSD95 نیز یک پروتئین داربست پس سیناپسی است که با تثبیت افزایش سیناپسی مرتبط است، هم چنین یک جزء ضروری در انتقال گلو تاماتریک، شکل‌پذیری سیناپسی و مورفوژن خا‌های دندریتیک در طول توسعه عصبی است (۱۰). اخیراً مطالعات ژنومی، اختلال عملکرد PSD95 را با اختلالات عصبی روانی مانند اسکیزوفرنی، اختلال طیف اوتیسم و اختلال فکری مرتبط می‌کند (۴۴). مطالعاتی اثر ضد اضطرابی ژن‌های سیناپتوفیزین و PSD95 را بررسی کرده‌اند به‌طور مثال در مطالعه Kai و همکارانش در موش‌های مبتلا به اختلال استرس پس از سانحه (PTSD) تحت درمان با طب سوزنی، بیان سیناپتوفیزین و PSD95 افزایش یافت و هم چنین رفتارهای اضطرابی و حافظه در طی درمان بهبود یافت (۴۵). هم چنین کاهش سطوح PSD95 و سیناپتوفیزین و افزایش پلاک‌های آمیلوئیدی در هیپوکمپ موش‌های صحرایی که از سنین پایین از مادر خود جدا شده بودند گزارش شده است که نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین‌ها در سیستم شناختی و حافظه می‌باشد (۴۶).

در سال ۲۰۱۶ Wang و همکاران اثرات استرس مزمن بر شناخت موش‌های نر SAMP8 را بررسی کردند. برای بررسی مکانیسم‌های عصبی اثرات استرس بر روی شناخت در موش، تغییرات در بیان PSD95 و سیناپتوفیزین، ارزیابی شد و نتایج نشان داد که استرس مزمن باعث کاهش بیان mRNA و پروتئین سیناپتوفیزین و PSD95 در هیپوکمپ موش‌ها می‌شود. نتایج نشان داد که مکانیسم‌های عصبی استرس مزمن بر شناخت ممکن است با کاهش بیان سیناپتوفیزین و PSD95 که برای پلاستیسیته سیناپسی ساختاری حیاتی هستند، همراه باشد (۴۷).

نتایج مطالعه ما نشان داد که استرس تغییرات قابل توجهی در رفتارهای اضطرابی حیوانات ایجاد می‌کند، از جمله کاهش مدت زمان تاخیر جهت ورود به محفظه تاریک و افزایش زمان حضور در اتاق تاریک که نشان‌دهنده اختلال حافظه می‌باشد. پیش‌درمانی با کروسین و

سیناپسی ممکن است در تولید برخی از اثرات فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی استرس در هیپوکمپ مهم باشد. این تغییرات ممکن است به خصوص به اختلالات بالینی مانند افسردگی و اختلال استرس پس از سانحه که به استرس حساس هستند و شامل تغییرات در شکل پذیری عصبی و سیناپسی هستند مربوط باشد (۴۹،۴۸).

مطالعه ما نشان داد که درمان با کروسین و عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه به طور جداگانه و یا ترکیب آن‌ها در بهبود حافظه و کاهش استرس با افزایش بیان ژن‌های سیناپسین، سیناپتوفیزین و PSD95 موثر بود. این نتایج نشان می‌دهد که کروسین یا عصاره هلیله سیاه می‌تواند یک درمان جایگزین برای اختلالات حافظه و استرس باشد. با این حال این نتایج اولیه هستند نیاز به مطالعات بیش تر در مورد مکانیسم دقیق اثر و آزمایشات بالینی دارد.

هلیله سیاه به تنهایی و ترکیب آن‌ها در مقایسه با گروه استرس منجر به افزایش مدت زمان تاخیر جهت ورود به محفظه تاریک و کاهش زمان حضور در اتاق تاریک شد که نشان‌دهنده بهبود حافظه در این گروه‌ها می‌باشد. سطح بیان برخی از پروتئین‌های سیناپسی احتمالاً به دنبال مصرف هلیله سیاه و زعفران تغییر می‌کند، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض استرس منجر به کاهش بیان سیناپتوفیزین، سیناپسین و PSD95 در هیپوکمپ می‌شود. درمان ترکیبی هلیله سیاه و کروسین در بهبود حافظه و استرس و افزایش بیان ژن‌های نامبرده مفید بود. به طور خلاصه، یافته‌های ما نشان می‌دهد که سیناپتوفیزین، سیناپسین و PSD95 ژن‌های پاسخ‌دهنده به استرس هستند و این احتمال را افزایش می‌دهند که تغییرات در بیان این یا سایر پروتئین‌های وزیکول

References

- Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(6): 453-562.
- Gunn BG, Baram TZ. Stress and seizures: space, time and hippocampal circuits. *Trends Neurosci* 2017; 40(11): 667-679.
- Leng L, Li J, Luo XM, Kaim JY, Li YM, Guo XM et al. Polychlorinated biphenyls and breast cancer: A congener-specific meta-analysis. *Environ Int* 2016; 88: 133-141.
- Dedovic K, Duchesne A, Andrews J, Engert V, Pruessner JC. The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage* 2009; 47(3): 864-871.
- McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2016; 41(1): 3-23.
- Wang Z, Neylan TC, Mueller SG, Lenoci M, Truran D, Marmar CR, et al. Magnetic resonance imaging of hippocampal subfields in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67(3): 296-303.
- Beheshti S, Tohidloo S, Esmaeili A. Frankincense improves memory retrieval and down-regulates the hippocampal synaptophysin mRNA during the development of the rat brain. *Physiology and Pharmacology* 2020; 24(1): 46-53.
- Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell Jr W, Kaye J, Manczak M. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis* 2005; 7(2): 103-117.
- Howes OD, Cummings C, Chapman GE, Shatalina E. Neuroimaging in schizophrenia: an overview of findings and their implications for synaptic changes. *Neuropsychopharmacology* 2023; 48(1): 151-167.

10. Gilman S, Iossifov I, Levy D, Ronemus M, Wigler M, Vitkup D. Rare De Novo Variants Associated with Autism Implicate a Large Functional Network of Genes Involved in Formation and Function of Synapses. *Neuron* 2011; 70(5):898-907.
11. Han S, Nam J, Li Y, Kim S, Cho SH, Cho YS, et al. Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. *J Neurosci* 2010; 30(45): 15102-15112.
12. Evergren E, Benfenati F, Shupliakov O. The synapsin cycle: a view from the synaptic endocytic zone. *J Neurosci Res* 2007; 85(12): 2648-2656.
13. Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010; 50(8): 761-786.
14. Mousavi SZ, Bathaie S Z .Historical uses of saffron: Identifying potential new avenues for modern research. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2011; 1(2): 57-66.
15. Iliass Lahmass, Ouahhoud S, Sabouni A, Elyoubi M, Benabbas R, Elmoussaoui R, et al. Antihyperlipidemic effect of crude extract of saffron (*Crocus sativus*) stigma in healthy male rats. *J Med Allied Sci* 2017; 7(1): 20-25.
16. Mehdizadeh R, Parizadeh MR, Khoei AR, Mehri S, Hosseinzadeh H. Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16(1): 56-63 (Persian).
17. Riaz H. Hepatoprotective effect of crocus sativuse on amiodarone induced liver toxicity. *BJPR* 2016; 12(4): 1-11.
18. Bathaie SZ, Ashrafi M, Azizian M, Tamanoi F. Recent progress in saffron and its constituents: crocin, crocetin, picrocrocin and safranal. *Recent Progress in Medicinal Plants* 2016; 43: 1-29.
19. Bastani S, Vahedian V, Rashidi M, Mir A, Mirzaei S, Alipourfard I, Pouremamali F, Nejabati H, Maroufi NF, Akbarzadeh M. An evaluation on potential anti-oxidant and anti-inflammatory effects of Crocin. *Biomed Pharmacother* 2022; 153: 113297.
20. Chen L, Qi Y, Yang X. Neuroprotective effects of crocin against oxidative stress induced by ischemia/reperfusion injury in rat retina. *Ophthalmic Res* 2015; 54(3): 157-168.
21. Morelli S, Salerno A, Piscioneri F, Tasselli E, Drioli L. De Bartolo, Neuronal membrane bioreactor as a tool for testing crocin neuroprotective effect in Alzheimer's disease, *Chem Eng J* 2016; 305: 69-78.
22. Rao GS, Razavi M, Karimian H, Kumar NP, Khajuria DK, Srinivas P, Sahebrao DS. Antinociceptive effect of terminalia belliricain diabetic peripheral neuropathy: a comparison with fluoxetine, imipramine and quercetin. *Lat Am J Pharm* 2012; 31(4): 520-525.
23. Lakshmi K, Karishma S, Chandra Sekhar G, Babu AN, Kumar NB. Terminalia chebula Retz improve memory and learning in Alzheimer's Model: (Experimental Study in Rat). *Research J Pharma Tech* 2018; 11(11): 4888-4891.
24. Ahmadi-Naji R, Heidarian E, Ghatreh-Samani K. Evaluation of the effects of the hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits on diazinon-induced liver toxicity and oxidative stress in rats. *Avicenna J Phytomed* 2017; 7(5): 454-466.
25. Hadipour M, Meftahi GH, Afarinesh MR, Jahromi GP, Hatef B. Crocin attenuates the granular cells damages on the dentate gyrus and pyramidal neurons in the CA3 regions of the hippocampus and frontal cortex in the rat

- model of Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 2021; 113: 101837.
26. Haghani M, Jafari M, Meftahi GH, Behzadnia MJ, Bahari Z, Salimi-Sabour E, et al. Analgesic effects of *Terminalia chebula* extract are mediated by the suppression of the protein expression of nerve growth factor and nuclear factor- κ B in the brain and oxidative markers following neuropathic pain in rats. *Mol Biol Rep* 2022; 49(11): 10457-10467.
 27. Valipour H, Jahromi GP, Mohammadi A, Meftahi GH. Effects of the suppression of 5-HT_{1A} receptors in the left, right, or bilateral basolateral amygdala on memory consolidation in chronic stress in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2023; 1-16.
 28. Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 2002; 296(5567): 557-559.
 29. Joshi H, Sharma R, Prashar S, Ho J, Thomson S, Mishra R. Differential expression of synapsin I and II upon treatment by lithium and valproic acid in various brain regions. *Int J Neuropsychopharmacol* 2018; 21(6): 616-622.
 30. Tyler RE, Weinberg BZS, Lovelock DF, Ornelas LC, Besheer J. Exposure to the predator odor TMT induces early and late differential gene expression related to stress and excitatory synaptic function throughout the brain in male rats. *Genes Brain Behav* 2020; 19(8): e12684.
 31. Abou-Hany HO, Atef H, Said E, Elkashef HA, Salem HA. Crocin mediated amelioration of oxidative burden and inflammatory cascade suppresses diabetic nephropathy progression in diabetic rats. *Biol Interact* 2018; 284: 90-100.
 32. Ghorbanzadeh V, Mohammadi M, Mohaddes G, Dariushnejad H, Chodari L, Mohammadi S. Protective effect of crocin and voluntary exercise against oxidative stress in the heart of high-fat diet-induced type 2 diabetic rats. *Physiol Int* 2016; 103(4): 459-468.
 33. Goldfarb EV, Rosenberg MD, Seo D, Constable RT, Sinha R. Hippocampal seed connectome-based modeling predicts the feeling of stress. *Nat Commun* 2020; 11(1): 2650.
 34. Allen AP, Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. Biological and psychological markers of stress in humans: focus on the Trier Social Stress Test. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 38: 94-124.
 35. Takuma K, Matsuo A, Himeno Y, Hoshina Y, Ohno Y, Funatsu Y, et al. 17 β -estradiol attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress in varietomized rats. *Neurosci* 2007; 146(1): 60-68.
 36. Surget A, Belzung C. Adult hippocampal neurogenesis shapes adaptation and improves stress response: a mechanistic and integrative perspective. *Molecular Psychiatry* 2022; 27(1): 403-421.
 37. Ehteram BZ, Sahraei H, Meftahi GH, Khosravi M. Effect of intermittent feeding on gonadal function in male and female NMRI mice during chronic stress. *Braz Arch Biol Technol* 2017; 60: e17160607.
 38. Talaei A, Moghadam MH, Tabassi SAS, Mohajeri SA. Crocin, the main active saffron constituent, as an adjunctive treatment in major depressive disorder: a randomized, double blind, placebo controlled, pilot clinical trial. *J Affect Disord* 2015; 174: 51-56.
 39. Adabizadeh M, Mehri S, Rajabpour M, Abnous K, Rashedinia M, Hosseinzadeh H.

- The effects of crocin on spatial memory impairment induced by hyoscine: Role of NMDA, AMPA, ERK, and CaMKII proteins in rat hippocampus. *Iran J Basic Med Sci* 2019; 22(6): 601-609.
40. Farkhondeh T, Samarghandian S, Yazdi HS, Samini F. The protective effects of crocin in the management of neurodegenerative diseases: a review. *Am J Neurodegener Dis* 2018; 7(1): 1-10.
 41. Rao GS, Razavi M, Karimian H, Kumar NP, Khajuria DK, Srinivas P, et al. Antinociceptive effect of terminalia belliricain diabetic peripheral neuropathy: a comparison with fluoxetine, imipramine and quercetin. *Lat Am J Pharm* 2012; 31(4): 520-525.
 42. Debnath J, Prakash T, Karki R, Kotresha D, Sharma P. An experimental evaluation of anti-stress effects of Terminalia chebula. *J Physiol Biomed Sci* 2011; 29: 24(2): 13-19.
 43. Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 1993; 269(5096): 780-785.
 44. Coley AA, Gao WJ. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2018; 82: 187-194.
 45. Kai SO, Wang YT, Xiong FJ, Huang AL, Zhang H. Effects of electroacupuncture on behaviors and expressions of SYN and PSD95 in hippocampus of rats with post-traumatic stress disorder. *World Journal of Acupuncture-Moxibustion* 2023; 33(2): 135-141.
 46. Martisova E, Aisa B, Guereñu G, Ramírez MJ. Effects of early maternal separation on biobehavioral and neuropathological markers of Alzheimer's disease in adult male rats. *Curr Alzheimer Res* 2013; 10(4): 420-432.
 47. Wang J, Yuan J, Pang J, Ma J, Han B, Geng Y, et al. Effects of chronic stress on cognition in male SAMP8 mice. *Cell Physiol Biochem* 2016; 39(3): 1078-1086.
 48. Gage FH. Structural plasticity: Cause, result, or correlate of depression. *Biol Psychiatry* 2000; 48(8): 713-714.
 49. Sapolsky RM. Atrophy of the hippocampus in posttraumatic stress disorder: How and when? *Hippocampus* 2001; 11(2): 90-91.