

Effects of Crocin on Oxidative Stress Indices in Rat Brain Demyelated with Ethidium Bromide

Hadi Fathi-Moghadam¹,
Yagoub Farbod²,
Ata A. Ghadiri³,
Rohallah Fatemi⁴

¹ Professor, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Assistant Professor, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

³ Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁴ PhD in Physiology, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received September 29, 2018 ; Accepted December 31, 2018)

Abstract

Background and purpose: The purpose of this study was to investigate the effects of crocin (Cr) on brain oxidative stress indices in animal model demyelinated with intracerebroventricular ethidium bromide (EB).

Materials and methods: In an interventional study, female Wistar rats were randomly divided into 7 groups. Crocin administration was done 1 day after EB injection for 21 days. The values for Glutathione peroxidase (GPx), Superoxide dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) were measured before and after receiving Cr and analyzed using Paired t test and ANOVA.

Results: The levels of GPx, SOD, and MDA significantly reduced in the group that received Cr100 mg/kg ($P < 0.05$). The effects of crocin were dose-dependent and other doses did not demonstrate significant effects on oxidative stress indices ($P < 0.05$).

Conclusion: The antioxidant effects of Crocin were dose-dependent, and it could be used as a strong antioxidant in management of patients with multiple sclerosis.

Keywords: demyelination, oxidative stress, crocin, malondialdehyde, superoxide dismutase

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (172): 121-126 (Persian).

* **Corresponding Author: Rohallah Fatemi** - Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran (E-mail: r.fatemi61@gmail.com)

تاثیر کروسین بر شاخص های استرس اکسیداتیو مغز موش صحرایی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید

هادی فتحی مقدم^۱

یعقوب فر بود^۲

عطاله غدیری^۳

روح اله فاطمی^۴

چکیده

سابقه و هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات کروسین (Cr) بر شاخص های استرس اکسیداتیو مغز، در مدل حیوانی دمیلینه شده با تزریق اتیدیوم بروماید (EB) داخل بطن چهارم مغز بود.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت مداخله ای و با طرح تجربی انجام گرفت. حیوانات به طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند. تجویز Cr بلافاصله روز بعد از تزریق EB به مدت ۲۱ روز انجام شد. مقادیر متغیرهای گلوکوتایون پرکسیداز (GPx)، سوپراکسیددسموتاز (SOD) و مالون دی آلدئید (MDA) مغزی در دو مرحله قبل و بعد از دریافت Cr اندازه گیری و با استفاده از آزمون های تی مستقل و آنوا تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که پس از تیمار با Cr سطوح GPx، SOD و MDA در گروه دریافت کننده $Cr 100 \text{ mg/kg}$ به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0.05$). اثرات Cr وابسته به دوز بود به طوری که گروه $Cr 100$ بهترین نتیجه را نشان داد و دوزهای دیگر تاثیر معنی داری بر شاخص ها نداشتند ($p < 0.05$).

استنتاج: بر اساس نتایج حاضر، تاثیرات آنتی اکسیدانی Cr وابسته به دوز بوده و می توان از Cr به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در ملاحظات و مدیریت درمانی بیماران MS استفاده کرد.

واژه های کلیدی: دمیلیناسیون، استرس اکسیداتیو، کروسین، مالون دی آلدئید، سوپراکسید دسموتاز

مقدمه

مغز و نخاع می شود. بر خلاف بسیاری از اختلالات دیگر عصبی که استرس اکسیداتیو نقش ثانویه را در بروز و پیشرفت بیماری دارد، مالتیل اسکروزیس و انسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis - EAE) به طور هم زمان با ایجاد آسیب های اکسیداتیو و نیتروژنیکی ظهور و پیشرفت می کنند (۱). دندرو و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که در

مالتیل اسکروزیس (MS- Multiple sclerosis) یک بیماری التهابی خودایمنی مزمن است که بر سیستم عصبی مرکزی تاثیر می گذارد و منجر به پلاک های دمیلیناسیون و تخریب اکسونی می شود. این مناطق به علت تخریب ایمونولوژیک پروتئین های پایه میلین (MBP-Myelin Basic Protein) توسعه یافته و در نهایت منجر به از دست رفتن اکسون ها و آتروفی ماده خاکستری

E-mail: r.fatemi61@gmail.com

مؤلف مسئول: روح اله فاطمی - اهواز: مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۱. استاد، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳. دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴. دکتری فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۷/۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۱۰

جریان پیشرفت بیماری، عواملی مانند اینترلوکین‌ها، سلول‌های پیش‌التهابی و پراکسیداسیون لیپیدی سبب آسیب سلولی و درنراسیون اکسون در بافت مغزی بیماران MS می‌شوند (۲). مطالعات بر روی بیماران MS نشان می‌دهد که نشان‌گرهای استرس اکسیداتیو در این بیماران به طور معنی‌داری بیش‌تر از افراد سالم است (۳). هم‌چنین مشاهده شد که در حیوانات مبتلا به مدل MS فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی مانند مالون دی‌آلدهید (MDA) افزایش یافته است اما سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، کاتالاز (Cat) و گلوکاتایون (Glu) به طور معنی‌داری کاهش قابل توجهی دارند (۲، ۱). کروسین از مواد موثره زعفران می‌باشد که هم به صورت خالص و هم به صورت عصاره آبی در مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است (۴، ۱). مطالعات نشان دادند که با تزریق مستقیم عصاره آبی زعفران به هیپوکامپ موش‌های دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید، این عصاره از طریق نقش آنتی‌اکسیدانی خود و با خنثی کردن گونه‌های بازفعال اکسیژن و حذف رادیکال‌های آزاد باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های GPx و MDA و افزایش فعالیت cat می‌شود (۵، ۱). هم‌چنین مطالعات نشان دادند که تجویز عصاره آبی زعفران موجب تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی کبد موش‌های نژاد ویستار شده و از تغییرات معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی بافت مغز در نتیجه فعالیت تا مرز خستگی جلوگیری می‌کند (۶). هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثر کروسین روی مکانیسم پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد و این که کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، تا چه اندازه می‌تواند اثرات مشابه آنتی‌اکسیدانی تکفیدرا (Tecfidera) به عنوان یک داروی متداول ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدان قوی در درمان بیماری MS را نشان دهد.

مواد و روش‌ها

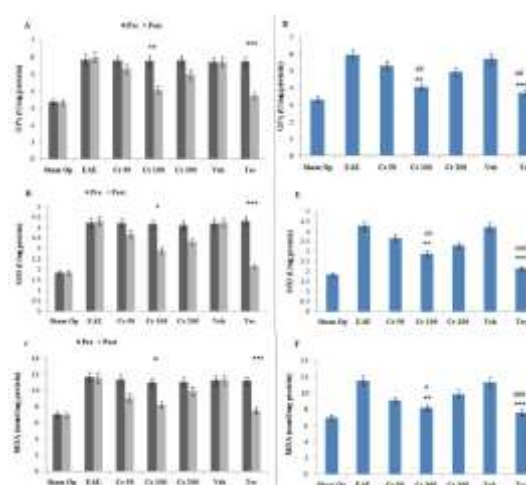
مطالعه حاضر بصورت مداخله‌ای و با طرح تجربی

پیش درمان - پس درمان انجام گرفت. برای انجام مطالعه از موش‌های صحرایی ماده، نژاد ویستار مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور استفاده شد. کلیه آزمایشات و مداخلات با تایید کمیته اخلاق دانشگاه جندی شاپور و بر اساس دستورالعمل‌های اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق معاهده هلسینکی انجام گرفت. حیوانات به طور تصادفی ساده به هفت گروه تقسیم شدند که شامل:

۱- شاهد جراحی (Sham Op) با دریافت حلال و بدون تزریق EB، ۲- تزریق EB بدون درمان (EAE)، ۳ و ۴-۵- تزریق EB و دریافت Cr ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (Cr50, Cr100, Cr200)، ۶- تزریق EB و دریافت تکفیدرا (Tec) و ۷- تزریق EB و دریافت حلال نرمال سالین (Veh) (۷). جهت ایجاد مدل MS، یک وهله ۵ میکرولیتر EB ۰/۱ درصد با استفاده از سرنگ همیلتون به آرامی داخل بطن چهارم سمت راست مغز تزریق شد. ۵ میکرولیتر EB ۰/۱ درصد نیز به طرف دیگر بطن تزریق شد (۱). سپس جهت درمان، یک روز بعد از القای مدل، ۳ دوز متفاوت کروسین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و هم‌چنین داروی تکفیدرا (تهیه شده از Sigma Aldrich Co, USA) با هدف کنترل مثبت با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۱ روز، یک بار در روز به هر حیوان به صورت خوراکی تجویز شد. پس از این دوره، حیوان کشته شده و مغز آن جهت ارزیابی پارامترهای GPx، SOD و MDA در دو مرحله پیش و پس از تیمار با کروسین با استفاده از کیت‌های استاندارد مخصوص هر آیتم تهیه شده از شرکت RANDOX RANSOD, UK) براساس دستورالعمل‌های مخصوص که در کیت لحاظ شده اندازه‌گیری شدند. مقادیر متغیرها در گروه‌های مختلف به وسیله آزمون‌های آماری t مستقل و آنالیز واریانس (ANOVA) به صورت یک طرفه با اندازه‌گیری مکرر توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها و بحث

تصویر شماره ۱ آنالیز مقادیر متغیرهای مطالعه را با استفاده از آزمون t مستقل (A,B,C) و ANOVA (D,E,F) نشان می دهد. نتایج t مستقل نشان داد که بین مقادیر پیش و پس از تیمار با کروسین، متغیرهای GPx, SOD و MDA تنها در گروه های Cr100 ($p < 0.01$) و تکفیدرا ($p < 0.001$) تفاوت معنی داری دارند. تصویر شماره ۱- D نتایج آزمون ANOVA نشان داد که در مقایسه با گروه EAE، تفاوت معنی داری در مقادیر پس از تیمار هر سه متغیر، با گروه های Cr100 ($p = 0.01$) و تکفیدرا ($p = 0.01$) وجود دارد و همچنین تفاوت معنی داری بین گروه Veh با گروه های Cr100 ($p = 0.01$) و تکفیدرا ($p = 0.01$) وجود دارد.



تصویر شماره ۱: سمت چپ تصویر مقایسه پیش آزمون و پس آزمون متغیرها را در هر گروه با استفاده از آزمون تی زوجی نشان می دهد و سمت راست تصویر مقایسه مقادیر پس درمان را بین تمام گروه ها با استفاده از ANOVA نشان می دهد.

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ در مقایسه با گروه EAE, #: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$; ####: $p < 0.0001$ در مقایسه با Vehicle

نتایج نشان داد که اگر چه هر سه دوز کروسین منجر به بهبود سطوح شاخص های آنتی اکسیدانی شده ولی دوز Cr100 بهترین نتیجه را در بهبود هر سه متغیر دارد هم چنین نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین

گروه های درمان و کنترل و سالیین وجود دارد. کروسین باعث بهبود معنی دار سطوح متغیرها شده و آن را تا نزدیک به سطوح گروه شاهد جراحی و گروه تکفیدرا تنظیم کرد. یافته قابل توجه مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی کروسین در روندی به نسبت مشابه تکفیدرا (به عنوان یک داروی استاندارد در درمان بیماری MS) و با قابلیت ۶۰ تا ۷۰ درصدی آن می باشد. این نتیجه با نتایج Sheng و همکاران که نقش آنتی اکسیدانی کروسین و عصاره زعفران را اثبات کردند هم خوان می باشد (۸-۱۰). یکی از دلایل تاثیر آنتی اکسیدانی کروسین، خنثی کردن گونه های بازفعال اکسیژن و حذف رادیکال های آزاد بوده که منجر به کاهش معنادار فعالیت آنزیم های GPx و MDA و افزایش فعالیت Cat می شود (۷، ۱۰). غفاری و همکاران (۲۰۱۵) اثرات درمانی عصاره زعفران را بر شاخص های استرس اکسیداتیو مغز موش مبتلا به مدل MS را بررسی کردند و نتایج مشابهی با مطالعه حاضر مشاهده کردند. عصاره زعفران و ترکیبات فعال آن مانند کروسین از طریق نقش آنتی اکسیدانی خود با خنثی کردن گونه های بازفعال اکسیژن و حذف رادیکال های آزاد منجر به افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های GPx و MDA و افزایش فعالیت Cat می شود (۱).

وکیلی و همکاران (۱۳۹۰) نشان دادند که تجویز عصاره زعفران، غلظت آنزیم های GPx، SOD و MDA در بافت ایسکمیک مغز را افزایش می دهد که نتایج هم سو با یافته های حاضر می باشد (۱۱). هم چنین در راستای یافته های هم سو با نتایج مطالعه حاضر، مطالعه He و همکاران ۲۰۰۷ غلظت های (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰) میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن کروسین را بر شاخص های پراکسیداسیون لیپیدی بررسی کرده و کاهش سطح MDA و افزایش کلسترول تام را مشاهده کردند (۱۲). Sheng و همکاران (۲۰۰۶) اثرات مثبت Cr100 را بر کاهش پراکسیداسیون لیپیدی موش های صحرایی گزارش کردند (۸). هر چند تزریق داخل بطنی

ممکن است تعداد گیرنده‌های بتا-آدرنرژیک را از طریق خودتنظیمی منفی (down-regulation) کاهش دهد (۱۴). از یافته‌های فوق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی از طریق کاهش فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های درگیر در مکانیزم اکسیدانی می‌تواند در مدیریت و درمان بیماران مالتیپل اسکروزیس استفاده شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در قالب پایان‌نامه دکتری فیزیولوژی با کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1395.11 انجام شده است.

پیکروکروسین در مطالعه مشابهی توسط Abe و همکاران (۲۰۰۰) این اثرات را نشان نداد (۱۳).

نتایج دوز- پاسخ مطالعه حاضر نشان داد که از بین تجویز کروسین ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، هر سه دوز منجر به پاسخ مثبت شدند ولی بهترین پاسخ با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مشاهده شد. به طوری که دوز Cr^{۱۰۰} در هر سه شاخص GPx، SOD و MDA به بیش‌ترین تاثیر منتهی شده است. این اثر می‌تواند در نتیجه کم اثر بودن دوز Cr^{۵۰} و Cr^{۲۰۰} در سلول‌ها باشد. فعالیت گیرنده‌های بتا آدرنرژیک یکی دیگر از مکانیسم‌هایی است که با تغییرات سطوح میانجی‌های التهابی توسط کروسین ثابت شده است. فعالیت گیرنده‌های آدیوسیت بتا آدرنرژیک ترشح سیتوکاین‌های التهابی را افزایش می‌دهد و کروسین

References

1. Ghaffari S, Hatami H, Dehghan G. Saffron ethanolic extract attenuates oxidative stress, spatial learning, and memory impairments induced by local injection of ethidium bromide. *Res Pharm Sci* 2015; 10(3): 222-232.
2. Dendrou C A, Fugger L, Friesen M A. Immuno pathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(9): 545-558.
3. Wang S-w, Yang S-g, Liu W, Zhang Y-x, Xu P-x, Wang T, et al. Alpha-tocopherol quinone ameliorates spatial memory deficits by reducing beta-amyloid oligomers, neuroinflammation and oxidative stress in transgenic mice with Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2016; 296: 109-117.
4. Vakili A, Ainali MR, Bandagi AR. The protective effects of Saffron against the oxidative damage in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. *Tehran Univ Med J* 2011; 69(7): 405-412 (Persian).
5. Bakhtiari Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Soltanali F. Protective Effect of Crocin on DNA Damage of Sperm and in Vitro Fertilization (IVF) in Adult Male Mice Treated with Cyclophosphamide. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24(118): 45-59 (Persian).
6. Khosravi A, Omidali F, Rasoulzadeh B, Choobineh S. The effects of Short-Term aqueous Saffron extracts consumption on malondialdehyde and anti-oxidant system content of liver of young male rats following an acute bout of exhaustive exercise. *Yafteh* 2017; 19(1): 20-30 (Persian).
7. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2005; 8(3): 387-393.

8. Sheng L, Qian Z, Zheng S, Xi L. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: crocin inhibits pancreatic lipase. *Euro J pharmacol.* 2006; 543(1):116-122.
9. Raouf Sarshoori J, Asadi MH, Mohammadi MT. Neuroprotective effects of crocin on the histopathological alterations following brain ischemia-reperfusion injury in rat. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17(11): 895-902 (Persian).
10. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ghaeni FA, Motamedshariaty VS, Mohajeri SA. Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Phytother Res* 2012; 26(3): 381-386.
11. Vakili A, Ainali MR, Bandagi AR. The protective effects of Saffron against the oxidative damage in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. *Tehran Univ Med J* 2011; 69(7): 405-412 (Persian).
12. He S-Y, Qian Z-Y, Wen N, Tang F-T, Xu G-L, Zhou C-H. Influence of crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidamic-diet quails. *Euro J Pharmacol* 2007; 554(2-3): 191-195.
13. Abe KH. Saito. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiating. *Phytother Res* 2000; 14(3):149-152.
14. Amani Shalamzari S, Agha Alinejad H, Gharakhanlou R, Molanouri Shamsi M, Talebi Badrabadi K. The effect of body composition and physical activity on basal levels of insulin, glucose, IL-18, IL-6 & CRP and their relationship with insulin resistance. *Iran J Endocrinol Metab* 2009; 11(6): 699-706.