



## The effect of Crocin on scopolamine induced spatial learning and memory deficits in rats

Mohammad Rasoul Ghadami, Ali Pourmotabbed\*

Dept. Physiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Received: 26 May 2008

Revised: 18 Dec 2008

Accepted: 31 Dec 2008

### Abstract

**Introduction:** The cholinergic system plays an important role in learning and memory. Administration of either extracts of *Crocus Sativus* (Saffron) or its constituent, crocin, reduced ethanol-induced memory impairment. Based on the above findings, we investigated the effect of crocin in antagonizing spatial learning and memory impairment induced by scopolamine, a cholinergic receptor antagonist, in rats by using Morris water maze (MWM).

**Methods:** Male rats received crocin (1, 5 or 10 mg/kg, i.p.) 30 min after injection of scopolamine (0.5 mg/kg, i.p.) or saline for 6 consecutive days. Control animals received only scopolamine or saline. Spatial learning and memory parameters in the same days were tested using MWM. For this purpose, escape latency and swim distance to hidden platform were tested for four consecutive days. In probe trials, percentages of time that animals spent in target quadrant were recorded. 24 h later, visible version of MWM was performed in which escape latency to visible platform and swim speed were tested.

**Results:** The results indicated that administration of scopolamine impaired the formation of spatial learning and memory processes. Application of crocin in a dose-dependent manner ameliorated the effects of scopolamine. In the visible version of MWM, there was not any significant difference in spatial performance among animals in studied groups.

**Conclusion:** It could be concluded that the crocin can inhibit scopolamine-induced impairments of spatial learning and memory in rats.

**Keywords:** Scopolamine, Crocin, Spatial learning and memory, Rat, Morris water maze.

\* Corresponding author e- mail: apourmotabbed@yahoo.com  
Available online @: www.phypha.ir/ppj

## اثر کروسین بر اختلالات یادگیری و حافظه فضایی ناشی از اسکوپولامین در موش صحرایی

محمدرسول قدمی، علی پورمتعبد\*

گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

دریافت: ۶ خرداد ۸۷ بازبینی: ۲۸ آذر ۸۷ پذیرش: ۱۱ دی ۸۷

### چکیده

**مقدمه:** سیستم کولینرژیک نقش مهمی را در یادگیری و حافظه ایفا می‌کند. تجویز عصاره زعفران و یا کروسین موجود در آن اختلالات حافظه ناشی از تجویز اتانول را بهبود می‌بخشد. بر اساس یافته‌های بالا ما اثرات کروسین در بهبود اختلال یادگیری و حافظه ناشی از اسکوپولامین (به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های کولینرژیک) را در موش صحرایی با استفاده از ماز آبی موریس بررسی نمودیم.

**روش‌ها:** در این مطالعه موش‌های صحرایی نر بمدت شش روز متوالی تحت تجویز کروسین (۱۰ mg/kg, i.p. یا ۵ یا ۱ سی دقیقه پس از تجویز اسکوپولامین ۵ mg/kg, i.p.) یا سالین قرار گرفتند. حیوانات گروه شاهد فقط اسکوپولامین یا سالین دریافت نمودند. شاخصه‌های یادگیری و حافظه فضایی همزمان در روزهای فوق‌الذکر در ماز آبی موریس بررسی شد. بدین منظور زمان سپری شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان به مدت چهار روز بررسی شد. سپس در مرحله probe trial، درصد حضور حیوانات در ربع دایره هدف ثبت گردید. بیست و چهار ساعت بعد، آزمون سکوی آشکار انجام شد که در آن زمان لازم برای رسیدن به سکوی آشکار و سرعت شنای حیوانات بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد تجویز اسکوپولامین موجب اختلال در یادگیری و حافظه فضایی می‌گردد که با تجویز کروسین به صورت وابسته به دوز بهبود می‌یابد. در آزمون سکوی آشکار تفاوت معنی‌داری بین عملکرد حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت.

**نتیجه‌گیری:** تجویز کروسین می‌تواند اثرات تخریبی اسکوپولامین در روند یادگیری و حافظه فضایی موش صحرایی را بهبود بخشد.

**واژه‌های کلیدی:** اسکوپولامین، کروسین، یادگیری و حافظه فضایی، موش صحرایی، ماز آبی موریس.

### مقدمه

استیل کولین استراز و استیل کولین ترانسفراز در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر می‌گردد [۲۳]. همچنین ثابت شده که داروهای آنتی کولینرژیک از قبیل اسکوپولامین، سبب اختلال در فرآیند حافظه در انسان‌ها و حیوانات می‌شود و تجویز این ماده یک مدل سودمند برای بررسی فراموشی انسانی به طور کلی و مشابه با بیماری آلزایمر در حیوانات می‌باشد [۷، ۸، ۲۵].

بسیاری از گیاهان سنتی، به دلیل اثرات آن‌ها در تقویت فرآیند یادگیری و حافظه، کانون توجه تحقیقات علمی و

برخی مطالعات بالینی [۶، ۱۰، ۱۵] و تجربی [۹، ۱۱] نشان داده‌اند که سیستم کولینرژیک نقش مهمی را در یادگیری و حافظه ایفا می‌کند. گزارش شده که تخریب سیستم کولینرژیک منجر به تغییر در توزیع گیرنده‌های کولینرژیک و کاهش سطح

\* نویسنده مسئول مکاتبات: apourmotabbed@yahoo.com

وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

## مواد و روش‌ها

در این آزمایش تعداد ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد N-MRI در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۵۰ گرم در شروع آزمایش، مورد بررسی قرار گرفتند. حیوانات به تعداد ۲-۳ سر در هر قفس قرار گرفته و در معرض سیکل نور- تاریکی ۱۲ ساعته و درجه حرارت کنترل شده محیط نگهداری می‌شدند. آزمایشات در مرحله نوری دوره ۲۴ ساعته انجام می‌شد و حیوانات به غیر از زمان آزمایش دسترسی کافی به آب و غذا داشتند. در کلیه موارد کار با حیوانات نکات اخلاقی مورد توجه قرار گرفته و نهایت تلاش ممکن جهت کاهش تعداد حیوانات مورد آزمایش انجام گردید. ضمناً هر موش تنها یک دوره مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته و پس از اتمام آزمایش توسط اتر تحت بیهوشی عمیق تا ایجاد مرگ قرار می‌گرفت.

داروهای مورد استفاده در این مطالعه دو داروی اسکوپولامین (سیگما- آلمان) و کروسین (سیگما- آلمان) بود. لازم به ذکر است که هر دو دارو ابتدا در نرمال سالین حل شده و سپس مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

بنابراین جهت انجام آزمایشات، حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شده و در هر گروه ۷ سر موش مورد آزمایش قرار گرفت:

- ۱- گروه سالین-سالین، ۲- گروه اسکوپولامین-سالین، ۳- گروه‌های سالین-کروسین شامل زیرگروه‌های: الف - سالین-کروسین ۱، ب - سالین-کروسین ۵، ج - سالین-کروسین ۱۰، ۴- گروه‌های اسکوپولامین-کروسین شامل زیرگروه‌های: الف - اسکوپولامین-کروسین ۱، ب - اسکوپولامین-کروسین ۵، ج - اسکوپولامین-کروسین ۱۰

پس از طی مرحله handling، روزانه به حیوانات در کلیه گروه‌ها، به مدت شش روز (از روز ششم تا یازدهم) به شرح زیر دارو تجویز شده و سی دقیقه بعد، آزمایشات در ماز آبی موریس انجام می‌شد: حیوانات گروه ۱ دو بار در روز، به فاصله زمانی ۳۰ دقیقه تحت تجویز نرمال سالین قرار گرفتند. حیوانات گروه ۲ روزانه ابتدا اسکوپولامین (۵ mg/kg, i.p.) و ۳۰ دقیقه بعد نرمال سالین دریافت نمودند. حیوانات گروه ۳ در روزهای مذکور و با توالی مطروحه در گروه‌های ۲ و ۱ نرمال سالین و سپس به فاصله ۳۰ دقیقه کروسین (۱۰ یا ۵ یا ۱ mg/kg, i.p.) دریافت نمودند. به حیوانات گروه ۴ نیز روزانه ابتدا اسکوپولامین

پزشکی قرار دارند. با این وجود، خصوصیات دارویی این گیاهان به طور وسیع در مدل‌های رایج بیماری آلزایمر مورد بررسی قرار نگرفته است. میوه و گل‌های زعفران (crocus sativus) از اجزاء مهم رژیم غذایی در ایران، هند و سایر کشورهای استوایی می‌باشد. در طب سنتی، مادگی زعفران به طور عام به عنوان ضد درد و عامل محافظت کننده قلب و نیز در درمان اشکال مختلف بیماری‌های ذهنی کاربرد دارد [۵]. کروسین (crocin)، یک کاروتنوئید محلول در آب که در کلاله زعفران وجود دارد، به دلیل اثرات دارویی گسترده‌اش، در تحقیقات مورد توجه قرار گرفته است [۲۹]. گزارش شده است که کروسین دارای خواص دارویی بسیاری نظیر خواص ضد پلاکتی [۱۷]، محافظت کننده سیستم عصبی [۳، ۱۸، ۲۶]، تنظیم کننده چربی و ضدآترواسکلروز [۱۳، ۱۶]، ضدسرطان و ضد فعالیت توموری [۱، ۲، ۱۲] می‌باشد. همچنین شواهد آزمایشگاهی وجود دارد که زعفران و اجزاء آن در یادگیری مؤثر می‌باشند. نشان داده شده است که عصاره الکلی زعفران فرآیند یادگیری و حافظه را در موش تحت تاثیر قرار می‌دهد [۳۱]. حسین زاده و همکاران نشان دادند که دوزهای ۵۰۰-۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی زعفران به صورت خوراکی، به خودی خود بر رفتار یادگیری موش‌ها در آزمون احترازی غیر فعال بی‌تاثیر است ولی قادر است اختلالات حافظه ناشی از اتانول را به مقدار قابل توجهی بهبود بخشد. بررسی‌های بیشتر نشان داد که این اثرات زعفران توسط مهمترین ترکیب آن، کروسین اعمال شده است. این محققین همچنین نشان دادند که کروسین و سافرانال بر روی حافظه سالم اثر تقویت کننده ندارند ولی کروسین اثرات هیوسین بر روی حافظه را مهار می‌کند اما سافرانال بر روی حافظه سالم و تخریب شده اثری ندارد که احتمالاً اثرات سداتیو بیشتر سافرانال در این امر دخیل است [۱۴]. اخیراً نشان داده شده که عصاره زعفران اختلالات حافظه شناختی موش صحرایی را مرتفع نموده و از اختلال عملکرد ناشی از اسکوپولامین در آزمون احترازی غیرفعال جلوگیری به عمل می‌آورد [۲۰]. بر اساس یافته‌های بالا، ما اثرات کروسین را بر اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از اسکوپولامین در موش‌های صحرایی، در ماز آبی موریس بررسی نمودیم.

مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در درون هر گروه به تنهایی (به منظور بررسی روند یادگیری فضایی در طی روزهای آموزش) از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه با تکرار اندازه‌گیری (One-way ANOVA; variable: day) استفاده شد. همچنین از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA with repeated measure) به منظور بررسی تفاوت روزها و گروه‌ها و برهمکنش روزها و گروه‌ها در طی روزهای آموزش استفاده شد. از طرف دیگر برای بررسی تفاوت درصد حضور در ربع دایره هدف در مرحله probe trial، و زمان سپری شده برای یافتن سکوی آشکار و مقایسه سرعت شنای حیوانات در این آزمون از آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. در مواقعی که اختلاف معنی‌دار بود، آزمون توکی انجام گردید.  $P < 0.05$  به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌های مورد آزمایش در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

شکل ۱ عملکرد حیوانات گروه‌های شاهد و اسکوپولامین با و یا بدون درمان با کروسین را در ماز آبی مورس نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل ۱-الف مشخص است با استناد به شاخصه زمان سپری شده برای رسیدن به سکوی (escape latency)، حیوانات کلیه گروه‌های مورد مطالعه بجز دو گروه اسکوپولامین-سالین و اسکوپولامین-کروسین ۱ در طی چهار روز آموزش موفق به یادگیری مکان سکوی پنهان در آب شده‌اند. به طوری که در شاخصه زمان سپری شده برای رسیدن به سکوی در بین روزهای آموزش در گروه‌های سالین-سالین [ $F_{(3,18)}=16.72, P<0.0001$ ، اسکوپولامین-کروسین ۵ [ $F_{(3,18)}=13.95, P<0.0001$ ، اسکوپولامین-کروسین ۱۰ [ $F_{(3,18)}=13.89, P<0.0001$ ] تفاوت وجود دارد. این تفاوت در کلیه گروه‌های فوق‌الذکر بین روز اول و چهارم آموزش معنی‌دار ( $P<0.001$ ) است. اما در گروه‌های اسکوپولامین-سالین [ $F_{(3,18)}=0.5, P=0.68$ ] و اسکوپولامین-کروسین ۱ [ $F_{(3,18)}=1.75, P=0.19$ ] تفاوت معنی‌داری بین روزهای آموزش وجود ندارد. همچنین بررسی نتایج حاصل از میانگین زمان لازم برای رسیدن به سکوی نشان داد که بطور کلی بین

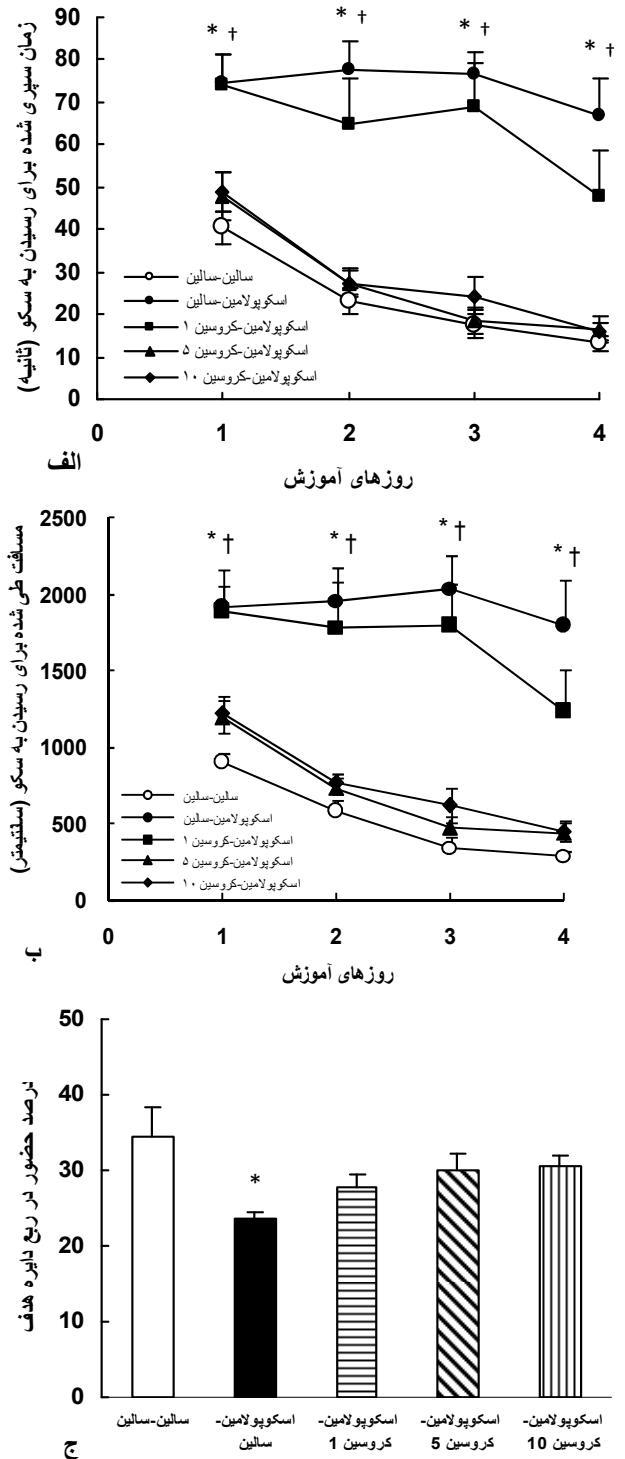
(۰/۵ mg/kg, i.p.) و سپس به فاصله زمانی ۳۰ دقیقه کروسین (۱۰ یا ۵ mg/kg, i.p.) تجویز شد. لازم به ذکر است که در کلیه گروه‌های مورد مطالعه حجم تزریق نهائی در هر بار تزریق (۱ ml/kg) بود. دوز اسکوپولامین با توجه به مطالعات محققین دیگر [۳۰] و همچنین مطالعات مقدماتی ما (pilot study) انتخاب شد. دوزهای کروسین نیز بر اساس مطالعات مقدماتی ما در آزمایشگاه انتخاب گردید.

حیوانات کلیه گروه‌ها به مدت یازده روز جهت بررسی روند یادگیری و حافظه فضایی در ماز آبی مورس به روشی که قبلاً گزارش شده [۲۲] مورد مطالعه قرار گرفتند. به طور خلاصه در این روش به مدت پنج روز سازش دادن (handling) و آماده سازی حیوانات انجام شده و از روز ششم تا یازدهم همزمان با تجویز دارو آزمایشات اصلی صورت گرفت. بدین ترتیب که مرحله آموزش حیوانات از روز ششم تا نهم به منظور بررسی شاخصه‌های یادگیری فضایی، و در روز دهم مرحله probe trial بمنظور مطالعه شاخصه‌های حافظه فضایی انجام گردید. لازم به ذکر است که در روزهای آموزش سکوی پنهان در آب در مرکز ربع دایره شمال غربی ماز قرار داشت. در این تحقیق از شاخصه‌های زمان سپری شده (escape latency) و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی (فاصله شنا) در طی روزهای آموزش جهت بررسی روند یادگیری فضایی استفاده شد. چنانچه حیوانات یک گروه موفق می‌شدند در روزهای پایانی آموزش نسبت به روز اول با طی زمان و مسافت کمتر سکوی پنهان در آب را پیدا نمایند روند یادگیری در آنها مثبت ارزیابی می‌شد. جهت بررسی میزان تثبیت حافظه از شاخصه درصد حضور در ربع دایره هدف در مرحله probe trial استفاده شد. یک روز پس از آزمون probe trial، یعنی در روز یازدهم، آزمون سکوی آشکار انجام شد که در آن سکوی یک سانتیمتر بالاتر از سطح آب و در مرکز ربع دایره جنوب شرقی قرار گرفته و کلیه علائم خارج ماز حذف گردید. در این روز مدت زمان لازم برای رسیدن به سکوی آشکار و سرعت شنای حیوانات در گروه‌های مختلف ثبت و بررسی گردید. آزمایش سکوی آشکار جهت بررسی احتمال تداخل هرگونه فاکتور حسی-حرکتی و یا انگیزشی که ممکن است بر توانایی حیوان برای رسیدن به سکوی موثر باشد طراحی و انجام گردید [۱۹].

جهت بررسی نتایج حاصل از تغییرات زمان سپری شده و

Post hoc نشان داد تفاوت مذکور در کلیه روزهای آموزش بین گروه سالیین-سالیین با گروه‌های اسکوپولامین-سالیین و اسکوپولامین-کروسین ۱ معنی دار ( $P < 0.05$ ) است. اما تفاوت معنی‌داری بین گروه سالیین-سالیین با گروه‌های اسکوپولامین-کروسین ۵ و اسکوپولامین-کروسین ۱۰ در هیچیک از روزهای آموزش مشاهده نشد (شکل ۱-الف). نتایج مشابهی در شاخصه مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در طی روزهای آموزش دیده می‌شود (شکل ۱-ب). با توجه به این شاخصه نیز حیوانات گروه‌های سالیین-سالیین، اسکوپولامین-کروسین ۵ و اسکوپولامین-کروسین ۱۰ موفق به یادگیری شدند. بطوری که در شاخصه مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان بین روزهای آموزش در گروه سالیین-سالیین [ $F_{(3,18)}=40.89, P < 0.0001$ ]، اسکوپولامین-کروسین ۵ [ $F_{(3,18)}=15.56, P < 0.0001$ ] و اسکوپولامین-کروسین ۱۰ [ $F_{(3,18)}=9.58, P < 0.001$ ] تفاوت وجود دارد. این تفاوت در کلیه گروه‌های فوق الذکر بین روز اول و چهارم آموزش معنی دار ( $P < 0.001$ ) است. اما در گروه‌های اسکوپولامین-سالیین [ $F_{(3,18)}=0.27, P = 0.84$ ] و اسکوپولامین-کروسین ۱ [ $F_{(3,18)}=1.66, P = 0.21$ ] تفاوت معنی‌داری بین روزهای آموزش وجود ندارد. تجزیه و تحلیل نتایج اثر گروه‌ها [ $F_{(3,90)}=13.65, P = 0$ ] و روزهای آموزش [ $F_{(4,30)}=27.77, P = 0$ ] را در این رابطه نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که در کلیه روزهای آموزش تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بین گروه سالیین-سالیین با گروه‌های اسکوپولامین-سالیین و اسکوپولامین-کروسین ۱ وجود دارد. اما تفاوت بین گروه سالیین-سالیین با گروه‌های اسکوپولامین-کروسین ۵ و اسکوپولامین-کروسین ۱۰ معنی‌دار نیست (شکل ۱-ب).

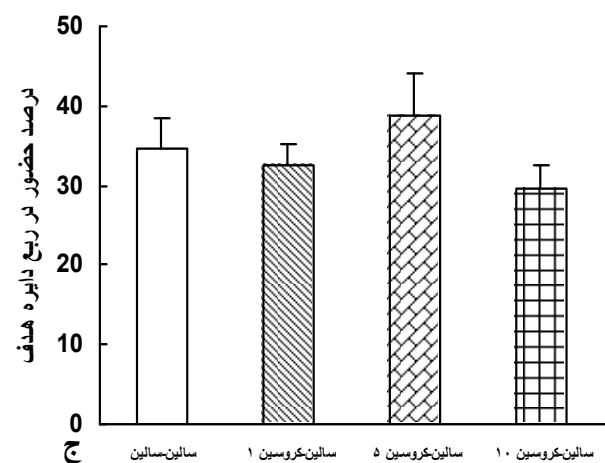
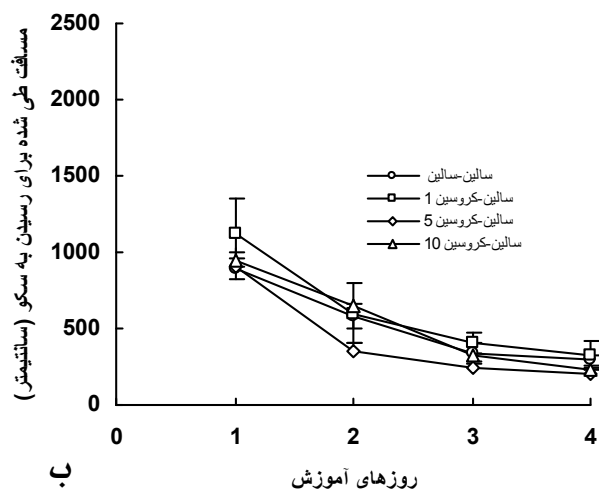
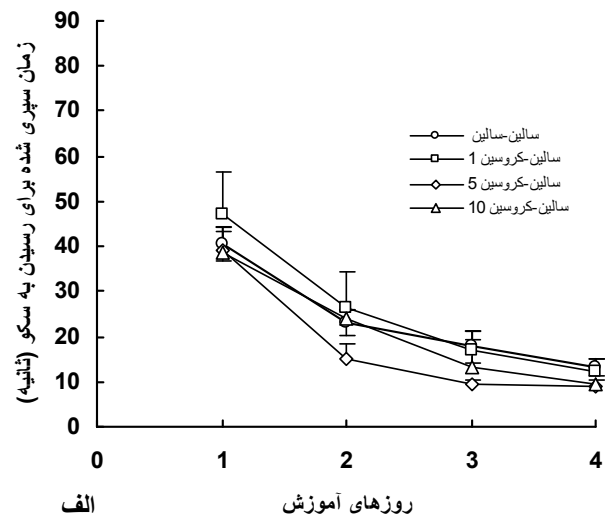
همچنین اسکوپولامین در تثبیت حافظه اختلال ایجاد نمود که خود را با درصد زمان صرف شده در ربع دایره هدف در مرحله probe trial نشان داد. اثرات اسکوپولامین و کروسین بر عملکرد حیوانات در مرحله probe trial در شکل ۱-ج نشان داده شده‌است. آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد [ $F_{(4,30)}=3.559834, P < 0.05$ ] و آزمون توکی نشان داد که حیوانات گروه اسکوپولامین-سالیین زمان کمتری را در ربع دایره هدف نسبت به گروه سالیین-سالیین صرف نموده‌اند ( $P < 0.05$ ). این اثر با تجویز کروسین بهبود یافت



شکل ۱- مقایسه escape latency (الف) و مسافت طی شده (ب) برای رسیدن به سکوی پنهان در طی روزهای آموزش و همچنین درصد حضور در ربع دایره هدف در مرحله probe trial (ج) در گروه‌های مورد مطالعه جهت بررسی اثر کروسین بر اثرات اسکوپولامین.  $P < 0.05$ \* نسبت به گروه سالیین-سالیین و  $P < 0.05$ † نسبت به گروه اسکوپولامین-کروسین ۵

گروه‌های آزمایش [ $F_{(4,30)}=39.49, P < 0.00001$ ] و روزهای آموزش [ $F_{(3,90)}=17.18, P < 0.00001$ ] تفاوت وجود دارد. آنالیز

عملکرد حیوانات در مقایسه با گروه شاهد (سالین-سالین) در ماز آبی در شکل ۲ نشان داده شده است. در رابطه با شاخصه زمان سپری شده برای رسیدن به سکوی پنهان، نتایج نشان داد که کلیه گروه‌های مورد مطالعه موفق به یادگیری شدند. بطوریکه میانگین زمان سپری شده برای رسیدن به سکوی پنهان در بین روزهای آموزش در گروه‌های سالین-سالین  $[F_{(3,18)}=16.41, P<0.0001]$ ، سالین-کروسین ۱  $[F_{(3,18)}=7.83, P<0.01]$ ، سالین-کروسین ۵  $[F_{(3,18)}=32.39, P<0.0001]$  و سالین-کروسین ۱۰  $[F_{(3,18)}=37.53, P<0.0001]$  تفاوت دارد. این تفاوت در کلیه گروه‌های مذکور بین روز اول و چهارم آموزش معنی‌دار است.  $(P<0.01)$  مقایسه آماری میانگین زمان سپری شده برای رسیدن به سکوی پنهان در بین گروه‌های دریافت کننده کروسین و گروه شاهد (سالین-سالین) این نتایج را در پی داشت: اثر گروه‌ها  $[F_{(3,24)}=1.23, P=0.32]$ ، اثر روزها  $[F_{(3,72)}=60.07, P=0]$  و برهمکنش میان گروه‌ها و روزها  $[F_{(9,72)}=0.4, P=0.92]$ . لازم به ذکر است که در هیچیک از روزهای آموزش تفاوت آماری معنی داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت (شکل ۲-الف). نتایج مشابهی نیز در مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی دیده می‌شود. با در نظر گرفتن این شاخصه نیز حیوانات کلیه گروه‌های مورد مطالعه موفق به یادگیری شدند. زیرا مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در بین چهار روز آموزش در گروه‌های سالین-سالین  $[F_{(3,18)}=9.21, P<0.001]$ ، سالین-کروسین ۱  $[F_{(3,18)}=6.7, P<0.01]$ ، سالین-کروسین ۵  $[F_{(3,18)}=32.59, P<0.0001]$  و سالین-کروسین ۱۰  $[F_{(3,18)}=45.11, P<0.0001]$  تفاوت دارد. این تفاوت در کلیه گروه‌های مذکور بین روز اول و چهارم آموزش معنی‌دار است.  $(P<0.01)$  مقایسه آماری شاخصه مذکور بین گروه‌های دریافت کننده کروسین و گروه شاهد (سالین-سالین) اثر گروه‌ها  $[F_{(3,24)}=1.62, P=0.21]$ ، اثر روزها  $[F_{(3,72)}=48.71, P=0]$  و برهمکنش میان گروه‌ها و روزها  $[F_{(9,72)}=1.1, P=0.37]$  را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که در هیچیک از روزهای آموزش تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود ندارد (شکل ۲-ب). اثر سه دوز مختلف کروسین بر تثبیت حافظه فضایی با محاسبه



شکل ۲- مقایسه escape latency (الف) و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی (ب) در طی روزهای آموزش و همچنین درصد حضور در ربع دایره هدف در مرحله probe trial (ج) در گروه‌های مورد مطالعه جهت بررسی اثر دوزهای مختلف کروسین به تنهایی

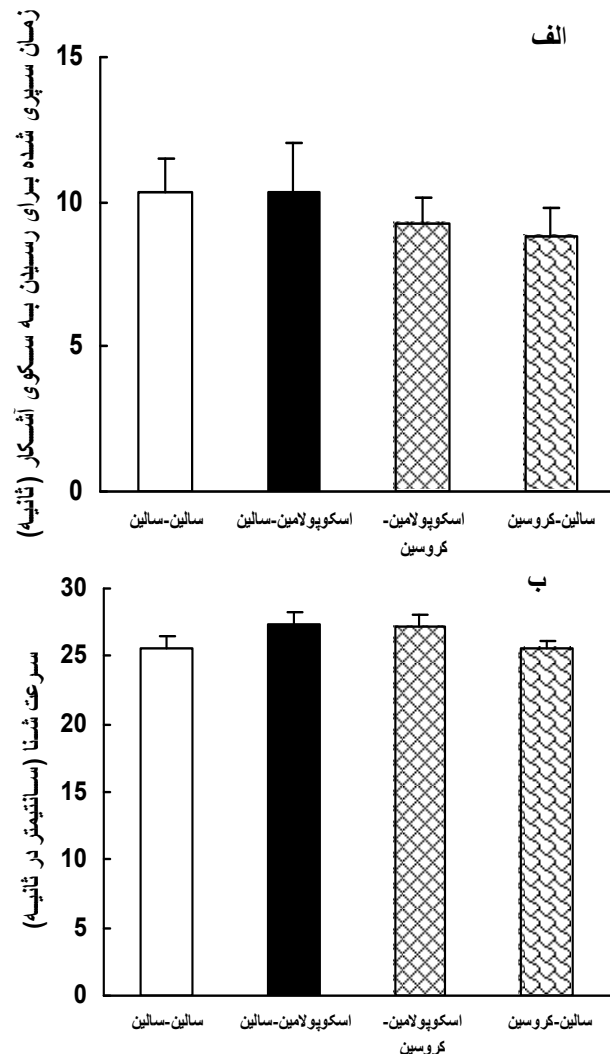
که خود را با عدم وجود اختلاف در بین گروه‌های مذکور با گروه سالین-سالین نشان می‌دهد.

اثر دوزهای مختلف کروسین (۱۰، ۵، ۱ mg/kg) بر

## بحث

در این مطالعه با استفاده از ماز آبی موریس، اثرات درمانی کروسین بر فراموشی ناشی از اسکوپولامین در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. همانند مطالعات گذشته [۶، ۸] تجویز داخل صفاقی اسکوپولامین، به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های کولینرژیک، موجب اختلال در یادگیری و حافظه فضایی گردید. اسکوپولامین موجب افزایش میانگین زمان و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در ماز آبی موریس شد که نشان دهنده اختلال در یادگیری فضایی در موش‌های صحرایی می‌باشد. در آزمایشات ما، تجویز کروسین با دوز ۱ mg/kg نتوانست موجب بهبود در عملکرد یادگیری گردد، در حالی که کروسین با دوزهای ۱۰ و ۵ mg/kg به صورت معنی‌داری موجب بهبود اختلال عملکرد فضایی ناشی از تجویز داخل صفاقی اسکوپولامین گردید. در گروه‌های اسکوپولامین-کروسین ۵ و اسکوپولامین-کروسین ۱۰، میانگین زمان مسافت طی شده برای رسیدن به سکو، به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه اسکوپولامین-سالین کاهش یافت. علاوه بر این، هنگامی که حافظه حیوانات در مرحله probe trial مورد ارزیابی قرار گرفت، حیوانات گروه‌های اسکوپولامین-کروسین، زمان بیشتری را در ربع دایره هدف سپری نمودند که نشان دهنده بهبود حافظه فضایی در این گروه‌ها می‌باشد. از سوی دیگر در آزمون سکوی آشکار، اختلاف معنی‌داری در سرعت شنا بین گروه‌های مختلف دیده نشد. لذا بنظر نمی‌رسد هیچیک از دستکاری‌های فارماکولوژیک از جمله تجویز اسکوپولامین باعث ایجاد اختلالات حرکتی در حیوانات گروه‌های مختلف شده باشد. در مجموع، این مطالعه رفتاری نشان داد که تجویز کروسین می‌تواند در بهبود اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از اسکوپولامین در ماز آبی موریس مؤثر واقع گردد.

هنگامی که کروسین به تنهایی و به صورت سیستمیک تجویز می‌گردد، نمی‌توان تاثیر فاکتورهای مختلف که ممکن است عملکرد حیوانات را تحت تأثیر قرار دهد، نادیده گرفت. این احتمال را شاید بتوان کنار گذاشت زیرا در آزمایشات ما اختلاف معنی‌داری در میانگین زمان سپری شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در طی روزهای آموزش بین گروه‌های دریافت‌کننده کروسین و گروه سالین-سالین دیده نشد که نشان



شکل ۳- مقایسه escape latency (الف) و سرعت شنا (ب) بین گروه‌های مورد مطالعه در آزمون سکوی آشکار

درصد حضور در ربع دایره هدف، در شکل ۲-ج دیده می‌شود. آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های مختلف نشان نمی‌دهد  $[F_{(3,24)}=1.30, P=0.29]$ .

اگرچه نتایج به دست آمده، نشان دهنده ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه فضایی توسط اسکوپولامین می‌باشد، اما این امکان وجود دارد که اختلال مشاهده شده، به سبب آسیب‌های حسی-حرکتی، و نه به دلیل اختلال در یادگیری ایجاد شده باشد. با این وجود مقایسه عملکرد گروه‌های مختلف در کارآزمایی سکوی آشکار نشان داد که اختلاف معنی‌داری در زمان رسیدن به سکو  $[F_{(3,52)}=0.369, P=0.776]$  (شکل ۳-الف) و یا سرعت شنا  $[F_{(3,52)}=1.054, P=0.377]$  (شکل ۳-ب) وجود ندارد ( $P>0.05$ ). (نتایج حاصل از دوزهای مختلف کروسین با هم نشان داده شده است، شکل ۳).

ناشی از فعالیت رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شوند. عصاره زعفران حاوی کاروتینوئیدهای فراوانی است که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی قوی هستند و می‌توانند سلول‌های عصبی سیستم اعصاب مرکزی را در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کنند [۲۴] در نتیجه عصاره زعفران یا مواد موثره آن، به خصوص کروسین، قادر هستند انواع خاصی از اختلالات حافظه و یادگیری را با مکانیسم‌های مختلف بهبود بخشند. بر این اساس، زعفران و یا کروسین می‌توانند در درمان بیماری‌های استحال‌ای عصبی سیستم اعصاب مرکزی که همراه با زوال حافظه و یادگیری هستند موثر واقع شوند [۱۴]. از میان مکانیسم‌های مهم احتمالی باید به القاء تقویت طولانی مدت (LTP) هیپوکامپ، که فرمی از پلاستیسیته سیناپتیک وابسته به فعالیت است اشاره نمود، که ممکن است اساس یادگیری و حافظه باشد. این مکانیسم در برخی مطالعات گذشته در مورد عصاره زعفران و کروسین مورد بحث قرار گرفته است [۳، ۴، ۲۷، ۲۸]. مطالعات بیشتری، به خصوص بررسی تعامل نوروترانسمیترهای کولینرژیک، به منظور روشن ساختن مکانیسم‌های اثر این ماده مورد نیاز است. به طور خلاصه، نتایج حاصل از آزمایشات ما نشان داد که کروسین می‌تواند به صورت وابسته به دوز موجب بهبود اختلال یادگیری و حافظه فضایی ناشی از اسکوپولامین در ماز آبی موریس گردد.

## سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب حوزه آموزشی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد. نویسندگان مقاله بدینوسیله از حمایت مالی مسئولین محترم حوزه مذکور نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

## منابع

- [1] Abdullaev FI, Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med (Maywood)* 227 (2002) 20–25.
- [2] Abdullaev Jafarova F, Caballero-Ortega H, Riverón-Negrete L, Pereda-Miranda R, Rivera-Luna R, Manuel Hernández J, Pérez-López I, Espinosa-Aguirre JJ, In vitro

می‌دهد تجویز کروسین به تنهایی، موجب تغییر در عملکرد حیوانات نمی‌گردد. از سوی دیگر، در مرحله probe trial اختلافی در زمان حضور حیوانات در ربع دایره هدف بین گروه‌ها دیده نمی‌شود. سرعت شنا در آزمون سکوی آشکار نیز در گروه‌های دریافت‌کننده کروسین اختلافی با گروه‌های دیگر نداشت. مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که تجویز کروسین به تنهایی تاثیری در عملکرد فضایی حیوانات نداشته بلکه این ترکیب با تداخل در عملکرد اسکوپولامین اثرات خود را به جا گذاشته است. همچنین در آزمون سکوی آشکار نیز تفاوتی بین عملکرد حیوانات در گروه‌های مختلف وجود نداشت. این نتایج نیز نشان می‌دهد که اختلالات آشکار حسی-حرکتی و رفتاری [۱۹] در حیوانات به سبب درمان‌های مختلف ایجاد نشده است.

برخی مطالعات نشان داده‌اند که عصاره زعفران موجب بهبودی یادگیری در حیوانات می‌گردد. Pitsikas و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که تجویز داخل صفاقی عصاره زعفران موجب بهبود اثر تخریبی اسکوپولامین بر حافظه می‌شود. آن‌ها نشان دادند که تزریق عصاره زعفران تاثیری بر یادگیری موش صحرایی ندارد اما اختلال حافظه ایجاد شده توسط اسکوپولامین را در تست احترازی غیر فعال بهبود می‌بخشد [۲۰]. به علاوه نشان داده شده‌است که عصاره زعفران موجب بهبود اختلال یادگیری ناشی از اتانول در آزمون احترازی غیرفعال در موش می‌گردد و این اثر به کروسین موجود در آن نسبت داده شده است [۳۱]. مشاهدات ما مبنی بر اینکه کروسین می‌تواند اختلال ناشی از اسکوپولامین را در ماز آبی موریس بهبود بخشد به موازات نتایج حاصل از مطالعه Pitsikas و همکاران در سال ۲۰۰۷ می‌باشد که گزارش کرده بودند که کروسین می‌تواند اختلال عملکرد ناشی از اسکوپولامین را در ماز شعاعی بهبود بخشد [۲۱]. این نکته حائز اهمیت می‌باشد که کروسین به صورت وابسته به دوز بر اختلال ناشی از اسکوپولامین در دوزهای ۵۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مؤثر واقع شده است که این نیز مطابق با نتایج Pitsikas و همکاران بوده است. توجه این نتایج مشکل است. به هر حال شواهد اندکی در رابطه با اثرات رفتاری کروسین وجود دارد. مکانیسم‌های اثر کروسین بر حافظه هنوز در دست بررسی می‌باشد. شواهد متعددی در دست است که نشان می‌دهند بیماری‌های استحال‌ای عصبی سیستم اعصاب مرکزی شامل آلزایمر و پارکینسون در اثر آسیب سلولی



- intact and hyosin induced spatial learning and memory deficits in rats. *J Med Plants* 19 (2006) 40-50.
- [15] Jones GM, Sahakian BJ, Levy R, Warburton DM, Gray JA, Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 108 (1992) 485-494.
- [16] Lee IA, Lee JH, Baek NI, Kim DH, Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin. *Biol Pharm Bull* 28 (2005) 2106-2110.
- [17] Liakopoulou-Kyriakides M, Skubas AI, Characterization of the platelet aggregation inducer and inhibitor isolated from *Crocus sativus*. *Biochem Int* 22 (1990) 103-110.
- [18] Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H, Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol. *Neurosci Lett* 362 (2004) 61-64.
- [19] Omrani A, Ghadami MR, Fathi N, Tahmasian M, Fathollahi Y, Touhidi A, Naloxone improves impairment of spatial performance induced by Pentylene tetrazol kindling in rats. *Neuroscience* 145 (2007) 824-831.
- [20] Pitsikas N, Sakellariadis N, *Crocus sativus* L. extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. *Behav Brain Res* 173 (2006) 112-115.
- [21] Pitsikas N, Zisopoulou S, Tarantilis PA, Kanakis CD, Polissiou MG, Sakellariadis N, Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory. *Behav Brain Res* 183 (2007) 141-146.
- [22] Pourmotabbed A, Tahmasian M, Shahi M, Karami Darabkhani H, Fathollahi Y, Facilitating effects of morphine dependence on spatial learning and memory in rat. *DARU* 15 (2007) 156-161.
- [23] Rogers J, Bloom FE, Neurotransmitter metabolism and function in the aging central nervous system. In: Finch GE, Schneider EL, editors. *Handbook of the biology of aging*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Van Nosupand Reidhold, 1985, p.113- 147.
- [24] Singh HK, Dhawan BN, Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on avoidance responses in rat. *J Ethnopharmacol* 5 (1982) 205-214.
- [25] Sitaram N, Weingartner H, Gillin JC, Human serial learning enhancement with arecholine and choline impairment with evaluation of the chemopreventive potential of saffron. *Rev Invest Clin* 54 (2002) 430-436.
- [3] Abe K, Saito H, Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother Res* 14 (2000) 149-152.
- [4] Abe K, Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. *Brain Res* 787 (1998) 132-138.
- [5] Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F, Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol Biochem Behav* 81 (2005) 805-813.
- [6] Beatty WW, Butters N, Janowsky DS, Pattern of memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypothesis of dementia. *Behav Neural Biol* 45 (1986) 196-211.
- [7] Blokland A, Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Brain Res Rev* 21 (1995) 285-300.
- [8] Chen Z, Kamei C, Facilitating effect of histamine on spatial memory deficit induced by scopolamine in rats. *Acta Pharmacol Sin* 21 (2000) 814-818.
- [9] Dunnett SB, Toniolo G, Fine A, Ryan CN, Björklund A, Iversen SD, Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis-II. Sensorimotor and learning impairments. *Neuroscience* 16 (1985) 787-797.
- [10] Eagger SA, Levy R, Sahakian BJ, Tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet* 337 (1991) 989-992.
- [11] Eidi M, Zarrindast MR, Eidi A, Oryan S, Parivar K, Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Eur J Pharmacol* 465 (2003) 91-96.
- [12] Garcia-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontanon J, Fernandez JA, Atienzar M, Garcia-Olmo D, Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rat. *Nutr Cancer* 35 (1999) 120-126.
- [13] He SY, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu GL, Sheng L, Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. *Life Sci* 77 (2005) 907-921.
- [14] Hosseinzadeh H, Ziaei T, Evaluation of the effect of saffron and its effective articles, safranal and crocin, on

- [29] Xi L, Qian Z, Du P, Fu J, Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine* 14 (2007) 633-636.
- [30] Zhang ww, Song MK, Cui YY, Wang H, Zhu L, Niu YY, Yang LM, Lu Y, Chen HZ, Differential neuropsychopharmacological influences of naturally occurring tropane alkaloids anisodamine versus scopolamine. *Neurosci Lett* (2008) In Press.
- [31] Zhang Y, Shoyama Y, Sugiura M, Saito H, Effects of *Crocus sativus* L. on the ethanol-induced impairment of passive avoidance performance in mice. *Biol Pharm Bull* 17 (1994) 217-221.
- scopolamine. *Science* 201 (1978) 274-276.
- [26] Soeda S, Ochiai T, Paopong L, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H, Crocin suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sci* 69 (2001) 2887-2898.
- [27] Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Abe K, Crocin (crocetin digentiobiose ester) prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 271 (1994) 703-707.
- [28] Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Abe K, The Effects of Ethanol and Crocin on the Induction of Long-Term Potentiation in the CA1 Region of Rat Hippocampal Slices. *Jpn J Pharmacol* 67 (1995) 395-397.