Journal of Military Medicine
2024, Volume 26, Issue 4
Pages: 2409-2419
doi 10.30491/jmm.2024.1006752.1239

Investigating the Effects of Crocin- Nanoparticle on Inflammatory Factors and Serum Oxidative Stress in the Chronic Stress Model of Male Rats

Ali Masalegoo [1], Gila Pirzad Jahromi [2*], Hedayat Sahraei [2,3], Yousef Alimohamadi [4]

[1] *Student Research Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2] *Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Department of Physiology and Medical Physics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[4] *Health Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 6 October 2024 **Accepted:** 17 October 2024

Abstract

Background and Aim: Stressful conditions have become integral to people's lives and are among the destructive factors affecting brain function. These conditions are often more severe and damaging in military environments. Crocin possesses anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective properties. However, it has limitations, such as instability in varying pH levels, rapid absorption, and low bioavailability. The aim of the study was to enhance the efficacy of crocin by encapsulating it in chitosan and utilizing it as a nanocarrier to treat the effects of chronic stress in a male rat model.

Methods: Thirty-five adults male Wistar rats (weighing between 220 and 250 grams) were randomly divided into five groups of seven each: a control group (not exposed to stress or drugs), a stress group (subjected to immobility stress), an immobility stress group receiving crocin nanoparticles (administered 180 mg/kg), a crocin group (administered 6 mg/kg), and a chitosan group (administered 160 mg/kg). The open field test was conducted to evaluate anxiety-like behaviors. Serum oxidative stress factors (GPX, MDA, and CAT) and inflammatory serum factors (IL-6, IL-10, and TNFα) were evaluated using the ELISA method. Additionally, cresyl violet and G-fab staining were performed to assess cell damage in the hippocampus.

Results: The findings of this study indicated that stress induction was associated with increased anxiety behaviors, and the administration of crocin nanoparticles can effectively improve these behavioral disorders. Crocin nanoparticles significantly reduced inflammatory factors and oxidative stress and also demonstrated substantial healing effects compared to the crocin ($P<0.05$) and chitosan ($P<0.001$) treatment groups. The results of tissue staining revealed that chronic stress significantly decreased the number of neurons in the stained areas, while the administration of crocin nanoparticles mitigated this reduction in cell count in the hippocampus, showing a significant difference compared to the crocin group ($P<0.05$).

Conclusion: Our study demonstrates that crocin encapsulated in chitosan can overcome the limitations of low bioavailability associated with this substance and yields better results compared to the free form of crocin.

Keywords: Stress, Nanoparticle, Oxidative Stress, Interleukin, Anxiety Disorders.

*Corresponding author: **Gila Pirzad Jahromi,** Email: dr.pirzad@bmsu.ac.ir; g_pirzad_jahromi@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۲۶، شماره ۴، مهر و آبان ۱۴۰۳
صفحات: ۲۴۱۹-۲۴۰۹
10.30491/jmm.2024.1006752.1239

بررسی اثرات نانو ذره کروسین بر فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو سرم درمدل استرس مزمن موش صحرایی نر

علی مسئله‌گو[۱]، ژیلا پیرزاد جهرمی[۲*]، هدایت صحرایی[۲،۳]، یوسف علی محمدی[۴]

[۱] *کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران*
[۲] *مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران*
[۳] *گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران*
[۴] *مرکزتحقیقات بهداشت، انستیتو سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران*

چکیده

زمینه و هدف: شرایط استرس‌زا به عنوان یکی از عوامل مخرب بر عملکردهای مغزی بخش جدایی‌ناپذیر زندگی مردم شده است که این شرایط در محیط‌های نظامی شدیدتر و مخرب‌تر می‌باشد. کروسین دارای خواص ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و محافظت کننده عصبی است. کروسین دارای محدودیت‌هایی مانند بی ثباتی در pHهای متغیر، جذب سریع و زیست فراهمی پایین می‌باشد. هدف این مطالعه افزایش کارایی کروسین با محصور کردن آن توسط کیتوزان به عنوان نانوحامل در درمان اثرات استرس مزمن در مدل حیوانی موش صحرایی نر بوده است.

روش‌ها: ۳۵ رت نر بالغ نژاد ویستار (وزن ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم) به‌طور تصادفی در ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند: کنترل (بدون دریافت استرس و دارو)، استرس (استرس بی حرکتی)، گروه استرس بی حرکتی + نانوذره کروسین (دریافت ۱۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، گروه کروسین (دریافت ۶ میلی‌گرم/کیلوگرم) و گروه کیتوزان (دریافت ۱۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم). از آزمون میدان باز جهت ارزیابی رفتارهای شبه اضطرابی استفاده شد. ارزیابی میزان بیان فاکتورهای استرس اکسیداتیو (گلوتاتیون پراکسیداز، مالون دی آلدهید و کاتالاز) سرم و فاکتورهای سرمی التهاب (اینترلوکین-۶، اینترلوکین-۱۰ و تومورنکروز فاکتور آلفا) به روش الایزا و رنگ آمیزی کرزیل ویولت و G-fab جهت ارزیابی آسیب‌های سلولی در هیپوکمپ انجام شد.

یافته‌ها: یافته‌های این مطالعه نشان داد که القای استرس با افزایش رفتارهای اضطرابی همراه بوده و تجویز نانوذره کروسین به‌طور موثر این اختلالات رفتاری را بهبود می‌بخشد. نانوذره کروسین به‌طور قابل ملاحظه‌ای فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو را کاهش داده و همچنین در مقایسه با گروه‌های درمانی کروسین ($P<۰/۰۵$) و کیتوزان ($P<۰/۰۰۱$) اثرات بهبودی معناداری را نشان داد. نتایج رنگ‌آمیزی بافتی نشان داد که استرس مزمن به‌طور قابل توجهی تعداد نورون‌ها را در نواحی رنگ‌آمیزی شده کاهش می‌دهد و تجویز نانوذره کروسین این کاهش تعداد سلول‌ها را در نواحی هیپوکمپ سرکوب می‌کند که این نتایج در مقایسه با کروسین نیز تفاوت معنادار داشت ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: کروسین در فرم پوشش داده شده با کیتوزان می‌تواند بر محدودیت زیست فراهمی پایین این ماده غلبه کند و نتایج بهتری در مقایسه با فرم آزاد کروسین نشان دهد.

کلیدواژه‌ها: استرس، نانوذره، استرس اکسیداتیو، اینترلوکین، اختلالات اضطرابی.

*نویسنده مسئول: **ژیلا پیرزاد جهرمی.** پست الکترونیک: g_pirzad_jahromi@yahoo.com; dr.pirzad@bmsu.ac.ir
دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۲۶

مقدمه

استرس پدیده‌ای رایج در زندگی روزمره مردم است که منجر به پاسخ‌های هماهنگ سیستم عصبی و هورمونی می‌شود، این پاسخ‌ها برای تغییرات فیزیولوژیکی و رفتاری مناسب به منظور پاسخ‌های غریزی بقا ضروری می‌باشند (۱). بی‌حرکتی یک روش متداول برای القای مدل استرس است که به طور گسترده در جوندگانی مانند موش استفاده می‌شود. در طول استرس بی حرکتی، حرکات بدن محدود می‌شود که می‌تواند منجر به شرایط پاتولوژیک متنوعی شود (۲).

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که محرک‌های استرس‌زای مزمن می‌توانند باعث اختلال در انعطاف‌پذیری سیناپسی نورون‌ها در نواحی مختلف مغز از جمله هیپوکامپ شوند که این اختلال سیناپسی می‌تواند منجر به از دست دادن حافظه، اختلال در عملکرد و یادگیری و همچنین ایجاد اختلالات عصبی شود (۳). استرس مزمن معمولاً منجربه اضطراب که یک حالت روانی یا ذهنی مبتنی بر ترس است می‌شود (۴). همچنین استرس ایجاد شده با تداخل در سیستم ایمنی بدن موجب تغییر در میزان بیان فاکتورهای التهابی و همچنین فاکتورهای استرس اکسیداتیو می‌شود (۵،۶). استفاده از آنتی اکسیدان‌ها با پیشگیری و درمان بیماری‌های انسانی عجین شده‌اند. کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز از مهمترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی درون سلولی می‌باشند. کاتالاز با میل ترکیبی بالا با پراکسید هیدروژن واکنش می‌دهد و آب و اکسیژن مولکولی را تولید می‌کند که با تجزیه پراکسید هیدروژن نقش مهمی در محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کنند (۷). گلوتاتیون پراکسیداز، آنزیمی است که نقش مهمی در محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند. کاهش پراکسید هیدروژن و هیدروپراکسیدهای آلی را کاتالیز می‌کند و از تجمع اکسیدان‌های مضر جلوگیری می‌کند (۸). مالون دی آلدهید یک نشانگر زیستی است که معمولاً برای ارزیابی استرس اکسیداتیو در نمونه‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود. استرس اکسیداتیو زمانی اتفاق می‌افتد که بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (رادیکال‌های آزاد) و توانایی بدن در خنثی‌سازی آن‌ها، عدم تعادل وجود داشته باشد. مالون دی آلدهید محصول پراکسیداسیون لیپیدی که یک واکنش زنجیره‌ای که به غشای سلولی و سایر مولکول‌های مهم آسیب می‌رساند است. هنگامی که رادیکال‌های آزاد به لیپیدها حمله می‌کنند، مالون دی آلدهید تشکیل می‌شود. افزایش سطح مالون دی آلدهید در بدن اغلب با بیماری‌ها و شرایط مختلف مرتبط است (۹).

تومور نکروز فاکتور آلفا (TNFα) پروتئینی است که نقش مهمی در التهاب دارد و در پاسخ‌های ایمنی در افراد سالم و هم در طول بیماری نقش دارد. هنگامی که فعال می‌شود یک واکنش زنجیره‌ای ایجاد می‌کند که منجر به التهاب می‌شود (۱۰). اینترلوکین-۶، سیتوکینی است که نقش کلیدی در پاسخ التهابی دارد، در محل التهاب تولید می‌شود و هم به عنوان یک سیتوکین پیش التهابی و هم به عنوان یک سیتوکین ضد التهاب عمل می‌کند. اینترلوکین-۶، در تولید پروتئین‌های فاز حاد نقش داشته که این پروتئین‌ها در مبارزه با عفونت و ترمیم بافت‌های آسیب دیده نقش دارند (۱۱). اینترلوکین-۱۰ یک سایتوکین ضد التهابی است که با تنظیم فعالیت سلول‌های ایمنی و تولید سیتوکین به کنترل و کاهش التهاب کمک می‌کند. اینترلوکین-۱۰ یک جزء کلیدی از مجموعه گسترده تنظیم کننده سیستم ایمنی است که از پاسخ‌های ایمنی بیش از حد جلوگیری می‌نماید (۱۲).

استرس مزمن اغلب منجربه تحلیل راسی دندریت‌های CA3 هیپوکامپ می‌شود و درصورت حضور استرس مزمن با شدت و زمان طولانی منجربه بروز این تحلیل دندریتی در سایر نواحی دیگر هیپوکامپ CA1 و شکنج دندانه‌دار (DG) می‌شود. همچنین به دنبال استرس مزمن، به موجب افزایش فعالیت سلول‌های التهابی، میکروگلیاها، آستروسیت‌ها و مکانیسم‌های دیگر، عملکرد سیستم عصبی مرکزی مختل می‌شود که احتمالاً به دلیل مرگ سلول‌های عصبی یا تغییرات ساختاری اساسی در آن‌ها است (۱۳،۱۴).

امروزه بسیاری از داروهای شیمیایی با هدف کاهش اثرات نامطلوب استرس در بازار موجود هستند، با این حال این داروهای شیمیایی دارای عوارض جانبی و محدودیت‌های بسیاری می‌باشند. بنابراین ساخت داروهایی با عوارض جانبی کمتر که بتواند استرس و اثرات نامطلوب آن را بر بدن به ویژه بر فاکتورهای مضر مربوط به استرس اکسیداتیو و التهاب کاهش دهد، از اهمیت بالایی برخوردار است. داروهای گیاهی همیشه در مرکز توجه بسیاری از مطالعات قرار داشته‌اند، زیرا در مقایسه با داروهای شیمیایی دارای عوارض جانبی کمتری هستند و به راحتی می‌توان از آن‌ها در صنعت دارویی استفاده کرد که این موضوع آن‌ها را به گزینه‌ای عالی برای درمان اختلالات عصبی از جمله اختلالات استرس حاد و مزمن، افسردگی، بیماری آلزایمر، پارکینسون تبدیل می‌کند (۱۷-۱۵).

زعفران و ترکیبات آن شامل کروسین و سافرانال به عنوان یک ترکیب پاک کننده رادیکال‌های آزاد شناخته شده‌اند (۱۸). مطالعات قبلی خواص کروسین را بر روی اثرات نامطلوب استرس و همچنین خواص محافظت کننده عصبی و آنتی اکسیدانی آن را در برابر بسیاری از اختلالات عصبی بررسی کرده‌اند. با این حال این ترکیب بسیار ارزشمند با محدودیت‌هایی مانند پایداری کم در محیط های مختلف، فراهمی زیستی کم همراه می‌باشد (۱۹).

کیتوزان یکی از پرکاربردترین پلی ساکاریدهای طبیعی در تحقیقات و صنایع دارویی است که از کیتین مشتق می‌شود. با توجه به خواص عالی کیتوزان مانند غیر سمی بودن، زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری آن، از این پلی ساکارید به طور گسترده‌ای در بسیاری از مطالعات با تمرکز بر اختلالات عصبی مختلف و همچنین شرایط ناشی از استرس به عنوان یک حامل دارویی استفاده شده است (۲۰،۲۱). ویژگی‌های کیتوزان از جمله انعطاف‌پذیری آن برای تبدیل در سطح نانوذره، ظرفیت اتصال به

انواع مولکول‌های لیگاند و توانایی ساخت نانوذرات پایدار، تحت شرایط مختلف فیزیولوژیکی، همگی کیتوزان را به گزینه‌ای عالی برای استفاده از آن به عنوان یک حامل دارویی به خصوص در سطح نانو تبدیل کرده است (۲۱).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر تجویز نانوذرات کروسین با قابلیت فراهمی زیستی بالاتر نسبت به کروسین بر میزان فاکتورهای التهابی و فاکتورهای مربوط به استرس اکسیداتیو در سرم، شاخص‌های مربوط به مرگ سلولی در مرفولوژی سلول‌های ناحیه هیپوکمپ و همچنین میزان اضطراب با استفاده از تست رفتاری میدان باز در مدل استرس مزمن در موش صحرایی می‌باشد.

روش‌ها

حیوانات انتخاب شده

موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم) به‌عنوان نمونه‌های مورد مطالعه انتخاب و به‌طور تصادفی به پنج گروه (۷ تایی) تقسیم شدند. موش‌های هر گروه در دو قفس ۳ الی ۴ تایی چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعتی بدون محدودیت آب و غذا قرار گرفتند و دمای اتاق در ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۲±۲۵) تنظیم گردید.

گروه های مطالعاتی

موش ها به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. کنترل اولین گروه آزمایشی که هیچ مداخله‌ای بر روی آن‌ها صورت نگرفت. گروه دوم، گروه استرسی بودند که به مدت ۱۴ روز متوالی به مدت ۲ ساعت تحت فرآیند استرس‌زایی بی‌حرکتی قرار گرفتند اما مداخله دارویی دریافت نکردند. گروه نانوذره کروسین که تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند و نانوذره کروسین با دز ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز متوالی پس از اولین روز استرس دریافت کردند. گروه چهارم، گروه کروسین که القای استرس بی‌حرکتی در آن‌ها صورت گرفت و مداخله درمانی به‌وسیله کروسین آزاد با دوز ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز متوالی در آن‌ها انجام گرفت. پنجمین گروه آزمایشی، گروه کیتوزان بوده است که تحت استرس مزمن بی‌حرکتی قرار گرفت و کیتوزان آزاد را با دوز ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز متوالی به عنوان مداخله درمانی دریافت کرد.

ساخت نانوذره

به منظور به‌دست آوردن نانوذره کروسین- کیتوزان از روش اصلاح شده‌ای که در مطالعه قبلی مفصل توضیح داده شده است، استفاده کردیم (۱۸). برای تعیین میزان دقیق کروسین در نانوذرات طراحی شده، تفاوت بین مقدار کل کروسین مصرفی در فرآیند تهیه نانوذرات و میزان کروسین محبوس نشده در مایع‌رویی محاسبه شد. محتوای کروسین با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis (Infinite 200 PRO, TECAN, Switzerland) در ۴۴۰ نانومتر آنالیز شد (۲۲).

فرآیند القای استرس بی‌حرکتی مزمن

در این روش، موش‌ها را در یک بطری پلاستیکی به ابعاد ۲۵×۷ سانتی‌متر قرار دادیم تا حیوان دیگر قادر به حرکت نباشد. برای اینکه فضایی برای تنفس ایجاد کنیم، در یک سر بطری یک سوراخ یک‌سانتی متری ایجاد کردیم. هر حیوان به مدت ۱۴ روز متوالی روزانه دو ساعت تحت استرس قرار گرفت. روند بی حرکت کردن موش‌ها هر روز بین ۸ تا ۱۰ صبح انجام شد (۲۳).

تست رفتاری میدان باز (Open field)

تست میدان باز یک تست رفتاری است که برای ارزیابی سطح فعالیت حرکتی عمومی، اضطراب و تمایل حیوان به کاوش استفاده می‌شود. این شامل قرار دادن حیوان در یک فضای باز و بزرگ و مشاهده رفتار آن است. این آزمایش معمولاً در تحقیقات با جوندگان استفاده می‌شود. این یک ارزیابی آسان و نسبتاً سریع از رفتارهای کاملاً تعریف شده ارائه می‌دهد که نیازی به آموزش دادن حیوانات برای انجام تست ندارد. ماز میدان باز شامل یک ناحیه محصور شده با دیوار است که دارای ارتفاعی کافی برای جلوگیری از فرار حیوان مورد آزمایش می‌باشد. شکل‌های ماز معمولا دایره‌ای یا مربعی با مساحت کافی بر اساس اندازه سوژه مورد آزمایش هستند، تا احساس رها و آزاد بودن را در مرکز ماز ایجاد کنند. در این تست ما پارامتر هایی از قبیل میزان مسافت طی شده، مدت زمان حضور موش‌ها در ناحیه مرکزی میدان و تعداد دفعات ورود به مرکز میدان را بررسی کردیم (۲۴).

اندازه‌گیری فاکتورهای استرس اکسیداتیو

به منظور اندازه‌گیری فاکتور های استرس اکسیداتیو ابتدا حیوانات با استفاده از داروی ترکیبی متشکل از زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، IP) به همراه کتامین هیدروکلراید (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم، IP) بیهوش شدند. سپس خونگیری از چشم حیوانات تحت بیهوشی انجام شد، بعد از جداسازی سرم فاکتورهای گلوتاتیون پراکسیداز توسط کیت Nagpix™ Glutathione Peroxidase (GPx) Activity Assay Kit، کاتالاز به‌وسیله کیت تجاری Nactaz™ Catalase Activity Assay Kit و مالون دی آلدهید توسط کیت تجاری Nalondi™ Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit که هر سه از شرکت نوند سلامت بودند اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری فاکتور های التهابی

به منظور اندازه‌گیری فاکتورهای التهابی موجود در سرم حیوانات مورد آزمایش پس از بیهوش‌سازی حیوانات و اخذ خون از چشم، سرم هر حیوان جدا شد و فاکتورهای التهابی تومور نکروز فاکتور آلفا توسط کیت (CN: KPG-TNF-α)، اینترلوکین-۶ توسط کیت تجاری (CN: KPG-RIL1β) و اینترلوکین-۱۰

توسط کیت (CN: KPG-RIL10 -96) که هر سه از شرکت کارمانیا پارس ژن بودند اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی هیستوپاتولوژیک

پس از انجام تست رفتاری میدان باز، به منظور ارزیابی تغییرات حاصله از استرس بی‌حرکتی مزمن بر روی بافت مغزی در قسمت هیپوکمپ و سنجش تعداد سلول‌های عصبی، آسیب سلولی و همچنین جایگزینی سلول‌های عصبی آسیب دیده با آستروسیت‌ها حیوانات توسط کتامین/زایلازین بیهوش شدند و سپس بافت مغز حیوانات به روش پرفیوژن توسط سالین ۰/۹٪ و متعاقب آن پارافرمالدهید ۴٪ در بافر فسفات ۱ مولار (pH = ۷/۴) با روش ترانس کاردیال تثبیت شد. پس از استخراج بافت مغز از جمجمه، بافت‌ها به مدت ۱۰ روز در پارافرمالدهید ۴٪ نگهداری شده و پس از آماده‌سازی بافتی، بلوک‌های پارافینی در مقاطع کرونال به منظور رنگ‌آمیزی‌های کریزل ویولت و ایمنوهیستوشیمی G-Fab برش داده شدند (۲۵،۲۶).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شد. برای نشان دادن میانگین و معنی‌داری بین گروه‌ها، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون متعاقب توکی انجام شد. $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

در این مطالعه تمام ملاحظات اخلاقی و روش‌های کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) در تهران با کد اخلاقی: IR.BMSU.AEC.1403.008 تایید شده است.

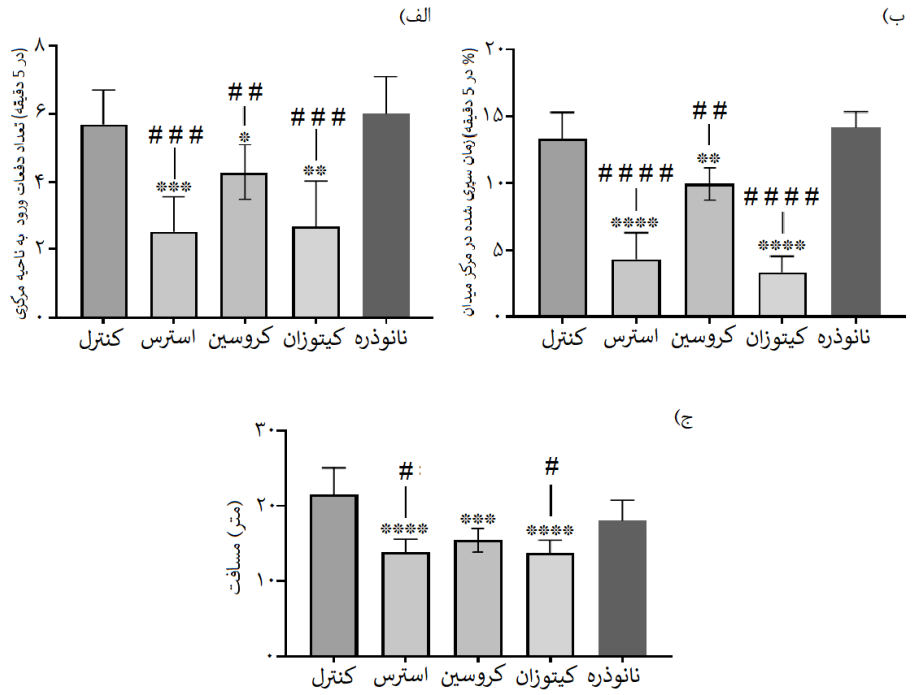
نتایج

خصوصیات، راندمان گیر افتادن (٪) و ظرفیت بارگیری

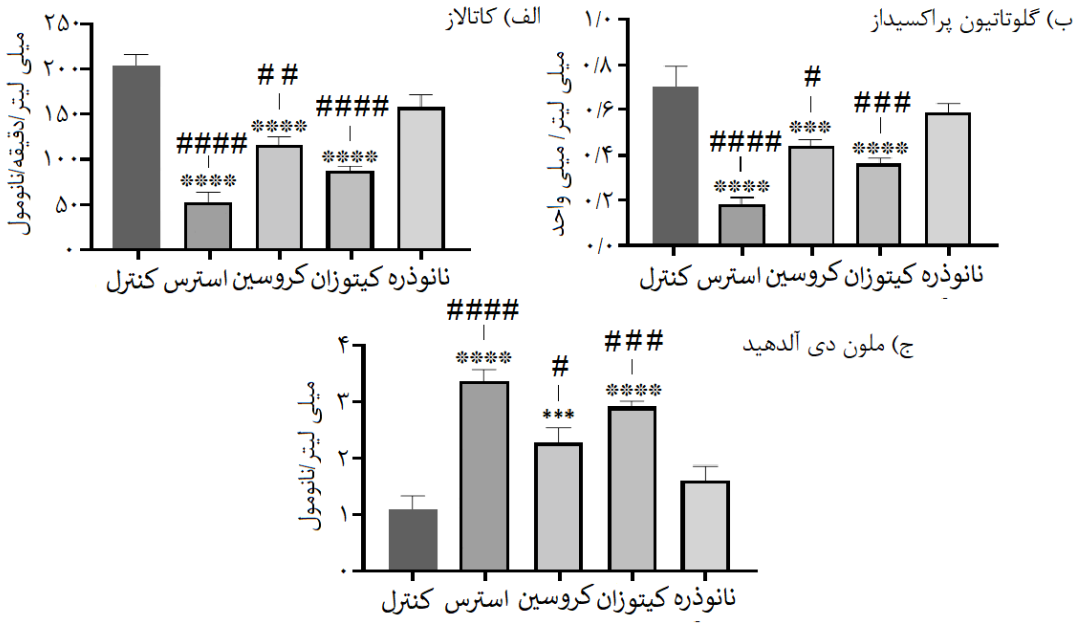
پس از سانتریفیوژ کردن، ۹/ . میلی‌گرم از ۶ میلی‌گرم داروی تعیین شده آزاد بود. همچنین با توجه به معادلات مربوطه و منحنی استاندارد کروسین که در طول موج ۴۴۰ نانومتر (جذب UV-VIS) رسم شد، راندمان گیر افتادن با میزان ۸۵٪ و ظرفیت بارگیری ۲۵٪ محاسبه شد. علاوه بر این، نانوذرات ما پس از آماده‌سازی دارای اندازه هیدرودینامیکی ۵±۱۷۵ نانومتر بودند.

بررسی اضطراب به‌وسیله آزمون میدان باز

پس از بررسی وآنالیز داده‌های تست میدان باز، تعداد دفعات ورود موش به ناحیه مرکزی، مدت زمانی که موش در ناحیه مرکزی سپری کرده است و مسافت طی شده به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون متعاقب توکی محاسبه شد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده تفاوت معناداری در بین گروه نانوذره با گروه کنترل مشاهده نشد. از سوی دیگر پس از درمان با داروهای کروسین و کیتوزان در دزهای استفاده شده در ترکیب نانوذره به تنهایی تفاوت معناداری در رفتارهای اضطرابی نسبت به هر دو گروه کنترل و نانوذره مشاهده شد. این نتایج نشان دهنده کارامدی بیشتر ترکیب نانوذره کروسین نسبت به کروسین و کیتوزان به تنهایی بوده است.



شکل-۱. نتایج اندازه‌گیری فاکتورهای اضطرابی مرتبط با تست رفتاری میدان باز. الف) تعداد دفعات ورود به ناحیه مرکزی، ب) مدت زمان سپری شده در ناحیه مرکزی و ج) مسافت طی شده. میانگین (± خطای استاندارد) در هر پنج گروه آزمایشی نشان داده شد. ****$P<۰/۰۰۰۱$ ، ***$P<۰/۰۰۱$ و **$P<۰/۰۱$ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل است. ####$P<۰/۰۰۰۱$، ###$P<۰/۰۰۱$ و #$P<۰/۰۵$ تفاوت معناداری را بین گروه‌های آزمایشی با گروه نانوذره کروسین نشان می‌دهد.



شکل-۲. نتایج اندازه‌گیری سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو. الف) کاتالاز، ب) گلوتاتیون پراکسیداز و ج) مالون دی آلدهید. میانگین (± خطای استاندارد) در هر پنج گروه آزمایشی نشان داده شد. ****$P<۰/۰۰۰۱$ و ***$P<۰/۰۰۱$ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل است. ###$P<۰/۰۰۱$، ##$P<۰/۰۱$ و #$P<۰/۰۵$ تفاوت معناداری را بین گروه‌های آزمایشی با گروه نانوذره کروسین نشان می‌دهد.

شکل-۳. نتایج اندازه‌گیری سطح فاکتورهای التهابی. الف) اینترلوکین-۶، ب) اینترلوکین-۱۰ و ج) تومور نکروز فاکتور آلفا. میانگین (± خطای استاندارد) در هر پنج گروه آزمایشی نشان داده شد. ****$P<۰/۰۰۰۱$، ***$P<۰/۰۰۱$ و *$P<۰/۰۵$ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل است. ###$P<۰/۰۰۱$، ##$P<۰/۰۱$ و #$P<۰/۰۵$ تفاوت معناداری را بین گروه‌های آزمایشی با گروه نانوذره نشان می‌دهد.

بررسی فاکتور های استرس اکسیداتیو

با توجه به نتایج به‌دست آمده در نمودارهای شکل ۲ از بررسی و آنالیز داده‌ها به واسطه آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون متعاقب توکی، نشان داده شده است که تفاوت معناداری در بیان و بروز فاکتورهای استرس اکسیداتیو پس از استفاده از ترکیب نانوذره مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل مشاهده نشده است. از سوی دیگر تفاوت تاثیر بر روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو به صورت افزایش سرمی فاکتور گلوتاتیون پراکسیداز ($P<۰/۰۰۰۱$)، افزایش سرمی فاکتور کاتالاز ($P<۰/۰۰۰۱$) و کاهش سرمی فاکتور مالون دی آلدهید ($P<۰/۰۰۰۱$) در گروه‌های درمانی (کروسین و

کیتوزان) نسبت به گروه درمانی نانوذره معنادار و مشهود بوده و همچنین تفاوت معناداری بین این گروه‌ها با گروه کنترل نیز مشاهده شد.

بررسی فاکتورهای التهابی

با توجه به نتایج آنالیز داده‌های به‌دست آمده با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون متعاقب توکی که در شکل ۳ نشان داده شده، مشاهده می‌شود که پس از استفاده از ترکیب نانوذره کروسین تفاوت معناداری در بیان و بروز فاکتورهای التهابی نسبت به گروه استرس مشاهده شده درحالی که این تفاوت نسبت به گروه کنترول معنادار نبوده. از سوی دیگر تفاوت تاثیر بر روی فاکتورهای التهالبی به‌صورت کاهش سرمی فاکتور اینترلوکین-۶ ($P<۰/۰۰۰۱$)، افزایش سرمی فاکتور اینترلوکین-۱۰ ($P<۰/۰۰۰۱$) و کاهش سرمی فاکتور تومور نکروز فاکتور آلفا ($P<۰/۰۰۰۱$) در گروه های کروسین و کیتوزان نسبت به گروه درمانی نانوذره معنادار و مشهود بوده و همچنین تفاوت معناداری بین این گروه‌ها با گروه کنترل نیز مشاهده شد.

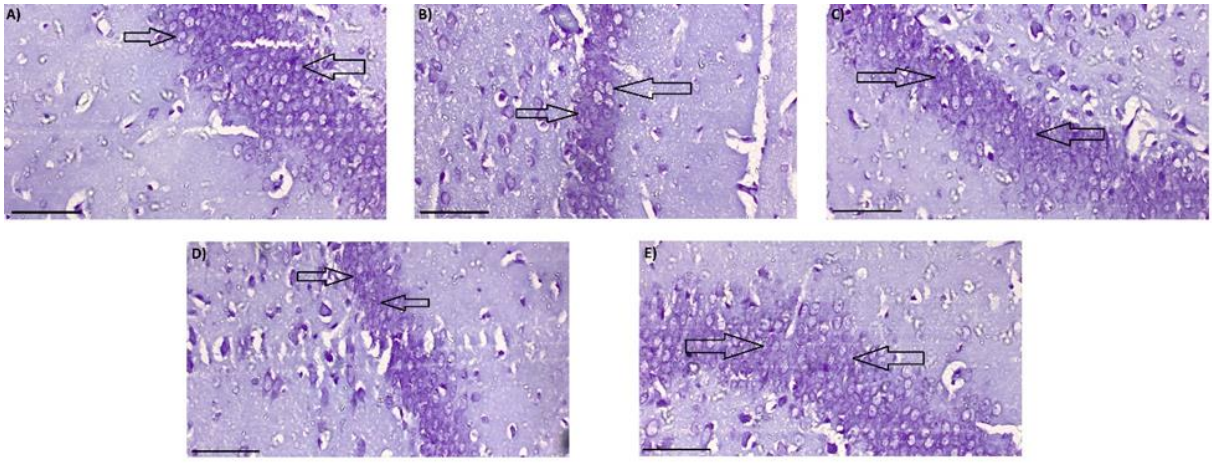
بررسی تغییرات بافتی هیپوکمپ به‌وسیله رنگ‌آمیزی کرزیل ویولت

در بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر تعداد سلول‌های کرزیل ویولت مثبت در ناحیه CA1 هیپوکمپ ($P<۰/۰۰۰۱$)، پس از آنالیز آماری داده‌ها به وسیله تست واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون متعاقب توکی در گروه کیتوزان به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های درمانی سلول‌های کمتری شمارش شدند. درحالی که در گروه نانو ذره و کروسین تفاوت معناداری در تعداد سلول‌های این ناحیه از هیپوکمپ نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

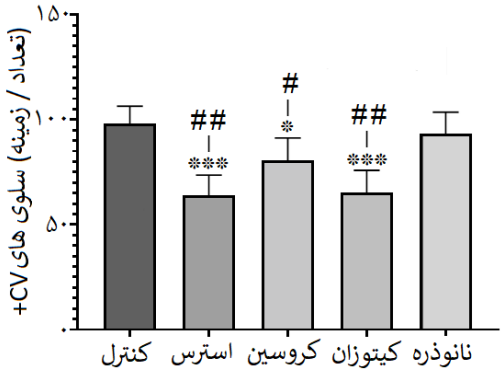
بررسی ناحیه هیپوکمپ به‌وسیله رنگ آمیزی G-fab

پس از بررسی مقاطع بافتی به‌دست آمده از مغز گروه‌های مختلف مورد آزمایش و آنالیز داده‌های به‌دست آمده توسط آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون متعاقب توکی، در گروه استرس و گروه درمانی کیتوزان به‌طور معناداری میزان بیشتری سلول در ناحیه CA1 هیپوکمپ ($P<۰/۰۰۰۱$) نسبت به این رنگ آمیزی واکنش نشان داده و ظاهر شده بودند. میزان سلول‌های رنگ گرفته بر اساس درصد بروز رنگ در ناحیه بیان شده است که توسط نرم‌افزار پردازش تصویر شرکت زایس به‌دست آمده است.

الف)

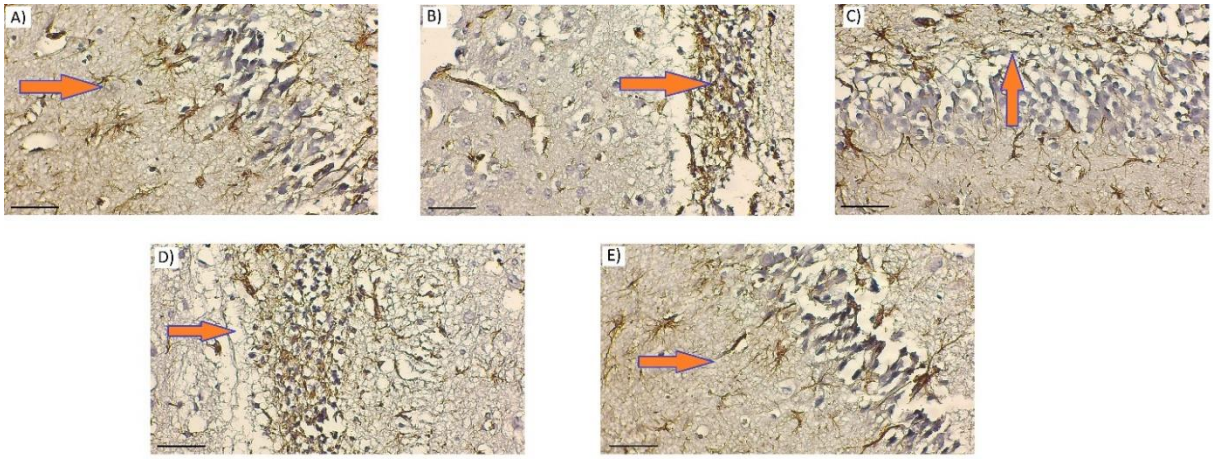


ب)

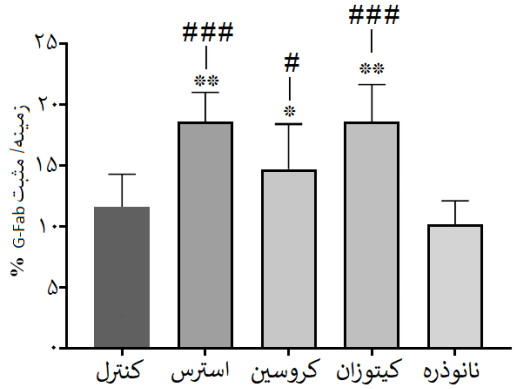


شکل-۴. الف) رنگ‌آمیزی هیپو کامپ با کریزل ویوله با بزرگنمایی ۲۰X در پنج گروه آزمایشی: (A) گروه کنترل، (B) گروه استرس، (C) گروه کروسین، (D) گروه کیتوزان، (E) گروه نانوذره. ب) میانگین (± خطای استاندارد) تعداد سلول‌های کرزیل ویولت مثبت در ناحیه CA1 هیپوکامپ. ***$P<۰/۰۰۱$ و *$P<۰/۰۵$ تفاوت معناداری بین گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل. ##$P<۰/۰۱$ و #$P<۰/۰۵$ تفاوت معناداری بین گروه‌های آزمایشی با گروه نانوذره.

الف)



ب)



شکل-۵. الف) ایمونوهیستوشیمی ناحیه CA1 هیپوکامپ با G-Fab با بزرگنمایی ۲۰X در پنج گروه آزمایشی: (A) گروه کنترل، (B) گروه استرس، (C) گروه کروسین، (D) گروه کیتوزان، (E) گروه نانوذره. ب) میانگین (± خطای استاندارد) تعداد سلول‌های G-Fab مثبت در ناحیه CA1. $P<۰/۰۱$** و $P<۰/۰۵$* نشان‌دهنده تفاوت معناداری بین گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل. $P<۰/۰۰۱$### و $P<۰/۰۵$# نشان‌دهنده تفاوت معناداری بین گروه‌های آزمایشی با گروه نانوذره.

بحث

مطالعات متعددی اثرات درمانی ترکیبات طبیعی، با عوارض جانبی کمتر مانند کروسین را به عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی بر روی اختلالات عصبی ناشی از شرایط استرس‌زا از جمله تخریب عصبی، زوال عقل، زوال حافظه، اضطراب و افسردگی بررسی کرده‌اند (۲۷،۲۸).

در مقایسه با سایر مطالعاتی که از کروسین با دز بالا بین ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استفاده کرده‌اند (۲۹)، در اینجا سعی کردیم با استفاده از روش نانوتکنولوژی از کیتوزان به عنوان نانوحامل آن، کارایی کروسین را در دزهای کمتر (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش دهیم. و پس از آن، با مقایسه اثرات این ترکیب با کروسین آزاد نتایج قابل توجهی در آزمون‌های رفتاری، بیومولکولی و هیستوپاتولوژی به‌دست آوردیم.

شرایط استرس‌زا به‌ویژه مزمن‌ها می‌توانند موجب تاثیرگذاری بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو شوند (۳۰). از جمله این فاکتورها می‌توان به کاتالاز، مالون دی آلدهید و گلوتاتیون پراکسیداز اشاره کرد (۳۱). در مطالعات متعددی نشان داده شده است که کروسین با خواص ضد اکسیداتیو خود با دز مشخص در اختلالات گوناگون می‌تواند موجب کاهش فاکتور مالون دی آلدهید و افزایش دو فاکتور کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سرم شود (۳۲،۳۳) که این امری حیاتی در دست یافتن به بهبودی مطلوب و مورد نظر می‌باشد. همچنین در مطالعه حاضر نشان داده شده است، که ترکیب نانوذره کروسین اگر چه دارای دزهای پایین‌تری از کروسین نسبت به سایر مطالعات است ولی با این حال اثرات مطلوبی در کاهش سرمی فاکتور مالون دی آلدهید (۰/۱۲۷ ± ۱/۶۰۶) و افزایش سرمی دو فاکتور کاتالاز (۶/۷۶۱ ± ۱۵۷/۸) و گلوتاتیون پراکسیداز (۰/۱۴۱ ± ۰/۴۳۹) به‌منظور مقابله با استرس اکسیداتیو در مدل استرس بی‌حرکتی مزمن موش نشان داده است که این اثرات در دز مشابه کروسین به تنهایی (به ترتیب ۰/۱۳۴ ± ۲/۲۶۵، ۴/۲۹۲ ± ۱۱۶/۷ و ۰/۰۱۴ ± ۰/۴۳۹)، تفاوت معناداری داشته است.

از سوی دیگر در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که

شرایط استرس‌زا به ویژه استرس بی‌حرکتی مزمن موجب بر هم خوردن تعادل فاکتورهای التهابی در سرم و هیپوکمپ مغز می‌شوند که از جلمه تغییر این فاکتورها در شرایط استرس‌زا می‌توان به کاهش اینترلوکین-۱۰، افزایش اینترلوکین-۶ و افزایش فاکتور تومور نکروز فاکتور آلفا اشاره کرد (۳۶-۳۴). همچنین در مطالعه حاضر بهبود اثر کروسین در کاهش سرمی اینترلوکین-۱۰ (۱/۳۵۵ ± ۲۳/۶۱)، افزایش سرمی اینترلوکین-۶ (۰/۷۷۶ ± ۱۷/۶۹) و افزایش سرمی فاکتور تومور نکروز فاکتور آلفا (۰/۸۴۳ ± ۱۲۸/۶۹) در دزهای پایین به‌واسطه ترکیب آن با نانو کیتوزان به عنوان حامل نسبت به کروسین به تنهایی (به ترتیب ۱/۱۲۱ ± ۱۷/۱۳، ۱/۷۱۶ ± ۲۶/۱ و ۰/۸۸۳ ± ۱۸/۸۲) به خوبی نشان داده شده که این تفاوت معنادار بوده است و به گروه کنترل بسیار نزدیک می‌باشد.

نتایج تست رفتاری میدان باز نشان دهنده تاثیر مثبت کروسین در هر دو فرم آزاد و حمل شده به وسیله نانو کیتوزان در بهبود اضطراب موش‌های صحرایی نر بوده که این نتایج به‌دست آمده همسو با مطالعات دیگر می‌باشد (۲۴,۳۷). با این حال نتایج به‌دست آمده از نانوذره کروسین به مراتب بهتر از نتایج کروسین به حالت آزاد بوده و اختلاف معناداری بین آن‌ها مشاهده شده است، در صورتی که نانو ذره مورد نظر با گروه کنترل تفاوتی معنادار نداشته ولی کروسین آزاد دارای تفاوت معنادار با گروه کنترل ما بوده، که این نشان دهنده تاثیر بهتر نانوذره مورد سنجس مطالعه نسبت به کروسین با همان دز پایین و یکسان می‌باشد.

همسو با مطالعه‌ای که مفتاحی و همکاران (۳۸) به تازگی در مدل آلزایمری انجام داده‌اند، در مطالعه حاضر نتایج به‌دست آمده توسط رنگ آمیزی کرزیل ویولت نشان دهنده کاهش از بین رفتن سلول‌های عصبی در ناحیه CA1 هیپوکمپ بوده، که در این روش رنگ‌آمیزی تعداد سلول‌های کرزیل ویولت مثبت در گروهی که نانوذره کروسین را دریافت کرده بودند (۴/۶۴۱ ± ۹۳/۲) به طور معناداری بیشتر از گروهی که کروسین آزاد (۴/۳۰۱ ± ۷۹/۱) را دریافت کرده بودند است.

همانطور که در مطالعات دیگر نشان داده شده است، استرس بی‌حرکتی مزمن موجب بروز آسیب نورونی و جایگزینی آستروسیت‌ها به جای سلول‌های عصبی می‌شود (۳۹,۴۰) که این جایگزینی را می‌توان با رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی G-Fab مشخص کرد.

در مطالعه حاضر همسو با نتایج فاکتورهای استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی و همچنین نتایج رنگ‌آمیزی کرزیل ویولت، نتایج رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی G-Fab نشان‌دهنده تاثیر معنادار و مثبت نانوذره کروسین (۰/۸۶ ± ۱۰/۲) بر روی جلوگیری از تخریب و آسیب سلولی و جایگزینی سلول‌های عصبی تخریب شده با آستروسیت‌ها نسبت به کروسین آزاد (۱/۲۲۵ ± ۱۴/۵) و دیگر گروه‌های درمانی بوده است.

نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از کروسین در فرم پوشش داده شده با نانو کیتوزان می‌تواند بر فراهمی زیستی کم این ترکیب طبیعی غلبه کند، همچنین ما را به دستیابی به دز موثر کروسین در غلظت‌های بسیار پایین‌تر برای درمان اثرات نامطلوب استرس بی‌حرکتی از جمله اضطراب و اختلال حافظه، در مقایسه با سایر مطالعات رساند. این مطالعه برای بررسی روشی عملی‌تر برای بهبود خواص درمانی کروسین و یافتن یک درمان جدید برای علائم و به دنبال آن شرایط استرس‌زا برای کمک به پیشرفت دانش در مدل موش طراحی و اجرا شد.

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- نتایج این پژوهش می‌تواند به عنوان راه حلی برای داروسازی هدفمند نانوذره‌کروسین در جهت کاهش اثرات استرس مزمن در محیط‌های نظامی باشد.

تشکر و قدردانی: پژوهش حاضر برگرفته از رساله دکتری حرفه‌ای پیوسته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) است. بدین‌وسیله نویسندگان از گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده سیستم بیولوژی و پزشکی شخصی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) به جهت حمایت‌های مالی و کلیه کسانی که ما را در اجرای این پژوهش یاری کردند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2011;35 (5):1291-301. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.003
2. Sakhri FZ, Adachi N, Zerizer S, Ohashi Y, Ikemoto H, Tsukada M, et al. Behavioral and neurological improvement by *Cydonia oblonga* fruit extract in chronic immobilization stress rats. Phytotherapy Research. 2021;35(4):2074-84. doi:10.1002/ptr.6953
3. Jiang N, Wang K, Zhang Y, Huang H, Lv J-w, Wang Q, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 against chronic restraint stress (CRS)-induced memory impairments in rats. Behavioural Brain Research. 2021;405:113146. doi:10.3389/fphar.2023.1167398
4. Fekri K, Nayebi AM, Sadigh-Eteghad S, Farajdokht F, Mahmoudi J. The neurochemical changes involved in immobilization stress-induced

anxiety and depression: Roles for oxidative stress and neuroinflammation. Neurochemical Journal. 2020;14:133-49. doi:10.1134/S181971242002004X
5. Bisht K, Sharma K, Tremblay M-È. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. Neurobiology of Stress. 2018;9:9-21. doi:10.1016/j.ynstr.2018.05.003
6. Tian R, Hou G, Li D, Yuan TF. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. The Scientific World Journal. 2014;2014 (1):780616. doi:10.1155/2014/780616
7. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019;2019(1):9613090. doi:10.1155/2019/9613090
8. Sarıkaya E, Doğan S. Glutathione peroxidase in health and diseases. Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease. 2020;49. doi:10.5772/intechopen.91009
9. Singh Z, Karthigesu IP, Singh P, Rupinder K. Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. Iranian Journal of Public Health. 2014; 43(Supple 3):7-16.
10. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in autoimmune disease and current TNF-α inhibitors in therapeutics. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(5):2719. doi:10.3390/ijms22052719
11. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. International immunology. 2021;33(3): 127-48. doi:10.1093/intimm/dxaa078
12. Martinez-Espinosa I, Serrato JA, Ortiz-Quintero B. Role of IL-10-producing natural killer cells in the regulatory mechanisms of inflammation during systemic infection. Biomolecules. 2021;12(1):4. doi:10.3390/biom12010004
13. Conrad CD, Ortiz JB, Judd JM. Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: Methodological and functional considerations. Physiology & Behavior. 2017;178:66-81. doi:10.1016/j.physbeh.2016.11.017
14. Jung S, Choe S, Woo H, Jeong H, An HK, Moon H, et al. Autophagic death of neural stem cells mediates chronic stress-induced decline of adult hippocampal neurogenesis and cognitive deficits. Autophagy. 2020;16(3):512-30. doi:10.1080/15548627.2019.1630222
15. Ghadrdoost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, et al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. European Journal of Pharmacology. 2011;667(1-3):222-9. doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.012
16. Hadipour M, Kaka G, Bahrami F, Meftahi GH, Pirzad Jahromi G, Mohammadi A, et al. Crocin improved amyloid beta induced long-term potentiation and memory deficits in the hippocampal CA1 neurons in freely moving rats. Synapse. 2018;72(5):e22026. doi:10.1002/syn.22026
17. Jahromi GP, Khodadadi H, Fasihi-Ramandi M, Esmaeili M, Shahriary A. Neuroprotective and antiapoptotic effects of N-acetylcystein and Crocus sativus aqueous extract on arsenic-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2019; 53(4):695-702. doi:10.5530/ijper.53.4.133
18. Meftahi GH, Khodadadi M, Pirzad Jahromi G, Ezami Razliqi M, Valipour H. Crocin nano-chitosan-coated compound improves anxiety disorders, learning, and spatial memory in Alzheimer's model induced by beta-amyloid in rats. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2024; 27(7):879-87. doi:10.22038/IJBMS.2024.74823.16247
19. Zhang CF. Research progress on pharmacokinetics and dosage forms of crocin and crocetin. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 2019:234-42.
20. El Knidri H, Belaabed R, Addaou A, Laajeb A, Lahsini A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. International Journal of Biological Macromolecules. 2018;120: 1181-9. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139
21. Sarvaiya J, Agrawal YK. Chitosan as a suitable nanocarrier material for anti-Alzheimer drug delivery. International Journal of Biological Macromolecules. 2015;72:454-65. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.052
22. Dudhani AR, Kosaraju SL. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. Carbohydrate Polymers. 2010;81(2):243-51. doi:10.1016/j.carbpol.2010.02.026
23. Hadipour M, Meftahi GH, Jahromi GP. Date palm spathe extract reverses chronic stress-induced changes in dendritic arborization in the amygdala and impairment of hippocampal long-term potentiation. Synapse. 2023:e22278. doi10.1002/syn.22278
24. Hadipour M, Bahari Z, Afarinesh MR, Jangravi Z, Shirvani H, Meftahi GH. Administering crocin ameliorates anxiety-like behaviours and reduces the inflammatory response in amyloid-beta induced neurotoxicity in rat. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2021;48(6):877-89. doi:10.1111/1440-1681.13494
25. Pourkhodadad S, Oryan S, Hadipour MM, Kaka G, Sadraie SH. Minocycline Enhance the Restorative Ability of Olfactory Ensheathing Cells by the Upregulation of BDNF and GDNF Expression After Spinal Cord Injury. Basic and Clinical Neuroscience. 2021;12(6):777-88. doi:10.32598/bcn.2021.1727.1
26. Zwirner J, Lier J, Franke H, Hammer N, Matschke J, Trautz F, et al. GFAP positivity in neurons following traumatic brain injuries. International Journal of Legal Medicine. 2021;135: 2323-33. doi:10.1007/s00414-021-02568-1
27. Alsanie WF, Alamri AS, Abdulaziz O, Salih

MM, Alamri A, Asdaq SM, et al. Antidepressant effect of Crocin in mice with chronic mild stress. Molecules. 2022;27(17):5462. doi:10.3390/molecules27175462
28. Jahromi GP, Jangravi Z, Hadipour M, Shirvani H, Afarinesh MR, Meftahi GH. Comparative effects of the alcoholic extract of Terminalia chebula and crocin on stress-induced anxiety-like behavior and memory impairment in male rats. Acta Neurobiologiae Experimentalis. 2023;83(2):179-93.
29. Dastgerdi AH, Radahmadi M, Pourshanazari AA, Dastgerdi HH. Effects of crocin on learning and memory in rats under chronic restraint stress with special focus on the hippocampal and frontal cortex corticosterone levels. Advanced Biomedical Research. 2017;6(1):157.
30. Juszczyk G, Mikulska J, Kasperek K, Pietrzak D, Mrozek W, Herbet M. Chronic stress and oxidative stress as common factors of the pathogenesis of depression and Alzheimer's disease: The role of antioxidants in prevention and treatment. Antioxidants. 2021;10(9):1439. doi:10.3390/antiox10091439
31. Nazifi S, Saeb M, Ghafari N, Razeghian I, Razavi SM, Vosoughi F, et al. Reference values of oxidative stress parameters in adult native Iranian goats. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2009;12(2):119-24.
32. Cerdá-Bernad D, Valero-Cases E, Pastor JJ, Frutos MJ. Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: Effect on oxidative stress and mechanisms of action. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2022;62(12):3232-49. doi:10.1080/10408398.2020.1864279
33. Yaribeygi H, Mohammadi MT, Sahebkar A. Crocin potentiates antioxidant defense system and improves oxidative damage in liver tissue in diabetic rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018;98: 333-7. doi:10.1016/j.biopha.2017.12.077
34. Voorhees JL, Tarr AJ, Wohleb ES, Godbout JP, Mo X, Sheridan JF, et al. Prolonged restraint stress increases IL-6, reduces IL-10, and causes persistent depressive-like behavior that is reversed by recombinant IL-10. PloS One. 2013;8(3):e58488. doi:10.1371/journal.pone.0058488
35. Feng X, Zhao Y, Yang T, Song M, Wang C, Yao Y, et al. Glucocorticoid-driven NLRP3 inflammasome activation in hippocampal microglia mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2019;12:210. doi:10.3389/fnmol.2019.00210
36. López-López AL, Jaime HB, Villanueva MD, Padilla MB, Palacios GV, Aguilar FJ. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. Physiology & Behavior. 2016;161:15-23. doi:10.1016/j.physbeh.2016.03.017
37. Kamaei AK, Hosseini SF, Teimourparsaei P, Payamani M, Vaseghi S. The effect of acute crocin on behavioral changes and BDNF expression level in socially isolated rats. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2024;397(6):3929-44. doi:10.1007/s00210-023-02843-5
38. Meftahi GH, Jahromi GP, Razliqi ME, Valipour H. Crocin nano-chitosan-coated compound improves anxiety disorders, learning, and spatial memory in Alzheimer's model induced by beta-amyloid in rats. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2024;27(7):879. doi:10.22038/IJBMS.2024.74823.16247
39. Phatnani H, Maniatis T. Astrocytes in neurodegenerative disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2015;7(6):a020628. doi:10.1101/cshperspect.a020628
40. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. Nature Clinical Practice Neurology. 2006;2(12): 679-89. doi:10.1038/ncpneuro0355