اثرات محافظت نورونی اسیدکارنوسیک بر هیپوکمپ موش‌های صحرایی آسیب‌دیده با ۶- هیدروکسی دوپامین

مهدیه تمدنی [۱](M.Sc)، مریم حاجی‌قاسم‌کاشانی [۲*](Ph.D)، محمدتقی قربانیان [۲](Ph.D)، کتانه ابراری [۲](Ph.D)، رسول آرش‌پور [۱] (M.Sc)

۱- *دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی سلولی- تکوینی*

۲- *دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، پژوهشکده علوم زیستی*

چکیده

سابقه و هدف: در بیماری‌های تخریبی سیستم عصبی مرکزی مانند بیماری پارکینسون (Parkinson's disease, PD) کاهش سطح دوپامین منجر به کاهش نورون‌زایی در شکنج دندانه‌ای (Dentate gyrus, DG) هیپوکمپ می‌گردد. با توجه به ارتباط مستقیمی که بین کاهش تعداد نورون‌ها در هیپوکمپ و اختلال حافظه وجود دارد. در این تحقیق تأثیر اسیدکارنوسیک (CA) بر نورون‌زایی هیپوکمپ پس از ضایعه با ۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA)، مدل اختلال حافظه‌ی PD، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به شش گروه تقسیم شدند. گروه اول: به این گروه ۶-میکروگرم نوروتوکسین 6-OHDA، به صورت دو طرفه در محل SNc تزریق شد (گروه آسیب)، گروه‌های دوم تا پنجم: موش‌های آسیب‌دیده که به آن‌ها به ترتیب عصاره رزماری حاوی۴۰٪ اسید کارنوسیک با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (گروه‌های تیمار) و آب مقطر (گروه کنترل)، ۱۴ روز قبل و ۱۴ روز بعد از تزریق نوروتوکسین، یک بار در روز و به صورت گاواژ خورانده شد. به گروه ششم (شم) نیز به جای نوروتوکسین، نرمال سالین تزریق شد. پس از پایان طول درمان مغزها خارج شدند و پس از فیکساسیون با پارافرمالدئید ۴٪، آب‌گیری، تهیه بلوک‌های پارافینی، برش‌های ۱۰ میکرونی گرفته شد. پس از رنگ‌آمیزی با کرزیل فاست ویوله، شمارش سلولی در مناطق DG, CA1, CA3 هیپوکمپ صورت گرفت. به منظور تأیید تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در اثر آسیب با نوروتوکسین از نشانگر تیروزین هیدروکسیلاز TH استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی ایمنوهیستوشیمی، کاهش نورون‌های TH مثبت را در محل تزریق در گروه آسیب نسبت به گروه شم نشان می‌داد. کاهش معنی‌دار سلول‌های دانه‌دار منطقه DG و سلول‌های هرمی CA1 در گروه کنترل و آسیب نسبت به گروه شم مشاهده شد (P<۰/۰۵). هم‌چنین افزایش معنی‌دار سلول‌های دانه‌دار در گروه‌های تیمارشده با دوزهای متفاوت CA و سلول‌های هرمی CA1 در گروه‌های تیمارشده با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه کنترل و آسیب مشاهده شد (P<۰/۰۵). در صورتی‌که تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA3 در گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه کنترل و آسیب افزایش معنی‌داری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: تجویز خوراکی عصاره رزماری حاوی اسید کارنوسیک اثر حفاظتی بر هیپوکمپ داشته و از مرگ نورون‌ها در اثر القاء نوروتوکسین 6-OHDA جلوگیری می‌کند. بنابراین می‌توان عصاره رزماری را به عنوان یک داروی گیاهی مؤثر با پتانسیل درمانی بالا در بهبود اختلالات حافظه PD معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: اسید کارنوسیک، محافظت نورونی، هیپوکمپ، دوپامین، ۶-هیدروکسی دوپامین

مقدمه

مغز میانی بخشی از ساقه مغز است که محل تجمع نورون‌های دوپامینرژیک می‌باشد، به طوری‌که ۹۰٪ این نورون‌ها در سه ناحیه از بخش شکمی مغز میانی شامل مناطق متراکم جسم سیاه (SN_C)، شکمی تگمنتوم (VTA) و خلفی هسته قرمز قرار گرفته‌اند[۱].

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۷۴۵۴۹۸۰۳ نمابر: ۳۵۲۴۷۱۴۶ - ۰۲۳۲

Email: kashani_tmu@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۷

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

بخشی از خروجی‌های SN_C به ناحیه پشتی جسم مخطط (هسته دم‌دار و پوتامن) ختم‌شده که این مسیر در کنترل حرکات ارادی نقش دارد. خروجی‌های دیگری از بخش داخلی SN_C که VTA نامیده می‌شود شروع شده و به هسته‌های آکومبنس، آمیگدالوئید، شکنج سینگولی، شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ وارد می‌شوند. به مجموعه مسیرهای عصبی که از بخش داخلی SN_C شروع شده و به مناطق نام‌برده ختم می‌شوند، سیستم دوپامینرژیک مزولیمبیک گفته می‌شود [۲].

هیپوکمپ از مناطق شکنج دندانه‌ای و Hippocampus proprius تشکیل‌شده، نورون‌ها در این مناطق بر اساس میزان تراکم، اندازه و نحوه انشعابات دندریتی و آکسونی به سه شکل CA1, CA2 و CA3 دیده می‌شوند. در مغز بالغ نورون‌زایی در مناطق SVZ (سلول‌های زیر اپاندیمی بطن‌های مغزی) و SGZ (بخش زیرین لایه‌ی دندانه‌ای هیپوکمپ) صورت می‌گیرد. سلول‌های پیش‌ساز عصبی در SGZ قابلیت تکثیر داشته و سلول‌های حاصل از تقسیم به لایه سلول‌های دانه‌دار مهاجرت می‌کنند. به طوری‌که زوائد دندریتی آن‌ها به سمت لایه مولکولار CA1 و آکسون‌هایشان به طرف سلول‌های پیرامیدال یا هرمی CA3 هدایت می‌شوند و با آن‌ها سیناپس برقرار می‌کنند [۳].

دوپامین آزاد شده از انتهای آکسون‌های نورون‌های دوپامینرژیک، نورون‌زایی را در ناحیه SGZ شکنج دندانه‌ای تحت تأثیر قرار می‌دهد. در تحقیقی تأثیر آنتاگونیست‌های دوپامینی بر کاهش تکثیر سلولی در مناطق SGZ و SVZ در پریمات‌ها و جوندگان گزارش شده است [۴].

در بیماری پارکینسون نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی تخریب می‌شوند و منجر به کاهش دوپامین در جسم مخطط و هیپوکمپ گشته و به دنبال آن اختلالات حرکتی، حافظه و یادگیری در بیماران ایجاد می‌گردد [۵]، دوپامین در تعدیل حرکات، حالت و انگیزه دخالت دارد [۶].

گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 نیز در نورون‌های CA1 هیپوکمپ شناسایی شده‌اند [۷]. با توجه به این‌که دوپامین در افزایش سیناپس‌های بین نورونی هیپوکمپ و تقویت حافظه نقش دارد، بنابراین در بیماری پارکینسون که با تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در SN_C و به دنبال آن کاهش دوپامین همراه است، حافظه و یادگیری دچار اختلال می‌گردد. در این بیماران اختلالات حافظه در مراحل اولیه بیماری که هنوز اختلال حرکتی مشهود نیست ظاهر می‌شود. اختلال حافظه از نوع حافظه فضایی (Spatial memory) که جز حافظه کوتاه‌مدت است می‌باشد [۸].

با توجه به ارتباطاتی که بین دوپامین، تعداد نورون‌های DG هیپوکمپ و حافظه وجود دارد با تخریب نورون‌های مناطق SNC و VTA به وسیله نوروتوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین، مدل مناسبی را برای مطالعه می‌توان ایجاد کرد. این نوروتوکسین با مهار کمپلکس I میتوکندری و القاء استرس اکسیداتیو، نورون‌های دوپامینرژیک را هدف قرار داده و تخریب می‌کند و در نتیجه با حذف ورودی‌های دوپامینی به هیپوکمپ، از تراکم نورون‌ها در این منطقه کاسته شده و قبل از آن‌که اختلالات حرکتی در بیماری ظاهر گردد، اختلال حافظه در بیماری پارکینسون مدل‌سازی خواهد شد [۱۰,۹].

Holinger و همکارانش با مطالعاتی که بر روی بیماران پارکینسونی پس از مرگشان انجام دادند، حضور فاکتورهای استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد را در پیش‌رفت این بیماری به اثبات رساندند. آنان گزارش دادند که تعداد سلول‌های با توانایی تکثیر در منطقه ساب‌اپاندیمی و هم‌چنین سلول‌های پیش‌ساز عصبی در SGZ و پیاز بویایی کاهش می‌یابد. آنان حدس زدند که کاهش نورون‌های پیش‌ساز عصبی به دنبال تخریب سیستم دوپامینرژیک در این بیماری، منجر به ایجاد علائم غیر حرکتی در بیمار می‌گردد که مقدم بر علائم حرکتی آن است [۱۰]. از طرفی نیز تحقیقات نشان داده ورودی‌های مناطق SNC و VTA به هیپوکمپ و آزاد شدن دوپامین در این ناحیه باعث افزایش سیناپس‌های بین نورونی و تقویت حافظه می‌گردد. بنابراین با تخریب نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی حافظه و یادگیری در بیماران پارکینسونی دچار اختلال می‌شود [۱۱]. عوامل دیگری نیز به

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

جزء دوپامین در نورون‌زایی نقش دارند از جمله می‌توان از استرس، پیری، هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدها، ورزش، استروژن، داروهای ضد افسردگی، لیتیوم و گیاهان دارویی نام برد [۱۶-۱۲].

عصاره رزماری از برگ گیاه Rosmarinic officinalis استخراج می‌شود. بخش اصلی این عصاره ترکیبات پلی‌فنولیکی مانند اسیدکارنوسیک، کارنوسل، اسیدرزمارینیک و اسیداورسلیک است [۱۷].

در میان این ترکیبات اسیدکارنوسیک از قدرت آنتی‌اکسیدانتی بالایی برخوردار است، به اتم‌های کربن شماره ۱۱ و ۱۲ این ترکیب، دو گروه هیدروکسیل O فنولیک متصل است. این ساختار بسیار شبیه به ساختار آنتی‌اکسیدانت‌های دیگر است. گزارش‌هایی نیز اثرات ضد افسردگی، ضد حساسیت، ضد التهابی، ضد توموری و ضد آپوپتوتیکی این عصاره را تأیید می‌کند [۱۹,۱۸].

در این تحقیق با تزریق دو طرفه ۶-OHDA ، نورون‌های دوپامینی SNC و VTA تخریب شده و با توجه به ارتباط عصبی بین این مناطق و هیپوکمپ اختلال حافظه‌ای مشابه با بیماری پارکینسون ایجاد می‌گردد که این اختلال حافظه در اثر کاهش نورون‌های دوپامینرژیک هیپوکمپ است. اگر بتوان با تجویز یک فاکتور خارجی، نورون‌زایی و یا شکل‌گیری سیناپس‌ها را در هیپوکمپ تحریک کرد و یا از مرگ نورون‌ها جلوگیری گردد، گامی در جهت بهبود اختلال حافظه در بیماری پارکینسون برداشته خواهد شد، به طوری‌که اختلال حافظه در مراحل پیش‌رفته بیماری، با ظهور علائم کلینیکال منجر به دمانس و جنون خواهد شد. در تحقیق حاضر تجویز خوراکی اسیدکارنوسیک به صورت گاواژ و اثرات نورون‌زایی و جفاظت نورونی این داروی گیاهی بر هیپوکمپ بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

گروه‌های مورد مطالعه. این مطالعه بر روی ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۸۰-۲۲۰ گرم خریداری شده از انستیتو رازی کرج، در دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان انجام شد. اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان رعایت شد. موش‌های صحرایی سالم به طور تصادفی به شش گروه (n=۷) تقسیم شدند. گروه اول: به این گروه نوروتوکسین (6-OHDA هیدروبرومید-سیگما)، به میزان ۶ میکروگرم در ۲ میکرولیتر نرمال سالین با سرعت ۰/۳۳ میکرو لیتر در دقیقه و به صورت دو طرفه در محل SNc تزریق شد (گروه آسیب)، گروه‌های دوم تا پنجم: حیوانات آسیب دیده با نوروتوکسین که به آن‌ها به ترتیب عصاره رزماری حاوی ۴۰٪ اسیدکارنوسیک با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خریداری شده از شرکت Geneham Biomedical Technology چین (گروه‌های تیمار) و آب مقطر (حلال عصاره) (گروه کنترل)، ۱۴ روز قبل و ۱۴ روز بعد از تزریق نوروتوکسین به صورت گاواژ خورانده شد. به گروه ششم (شم) نیز به جای نوروتوکسین، نرمال سالین تزریق شد [۲۳-۲۰].

روش ایجاد مدل تجربی موش‌های صحرایی آسیب‌دیده با 6-OHDA. حیوانات پیش از عمل جراحی، با تزریق درون صفاقی کتامین-زایلازین ۱۰/۱۰۰ mg/kg بی‌هوش شدند. سر حیوانات به کمک میله دهانی جلویی و میله‌های داخل گوشی در دستگاه استریوتاکس ثابت شد و پس از ایجاد برش طولی در حد فاصل چشم‌ها و گوش‌ها، سطح روی جمجمه تمیز شده و سپس مناطق (SN_C) با مختصات ۰/۵- میلی‌متر قدامی-خلفی و ۷/۷- میلی‌متر شکمی-پشتی و ۲/۱± داخلی-خارجی مطابق با مختصات اطلس پاکسینوس، روی سطح جمجمه با کمک دستگاه تنظیم و علامت‌گذاری شد. پس از سوراخ کردن محل علامت‌گذاری شده به کمک دریل دندان‌پزشکی، ۶ میکروگرم 6-OHDA در ۲ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹٪ حل شد و به صورت دو طرفه درون SN_C چپ و راست مغز تزریق گردید. تزریقات با سرنگ همیلتون ۵۰ میکرولیتری و با کمک پمپ میکرواینجکشن با سرعت ۰/۳۳ میکرولیتر در دقیقه انجام شد. به منظور جلوگیری از بازگشت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

محلول به درون سرنگ و نیز برای انتشار بهتر محلول درون SNc، سرسوزن به مدت ۵ دقیقه پس از تزریق در جای خود باقی ماند به منظور جلوگیری از عفونت‌های بعدی در پایان جراحی، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین به حیوانات تزریق شد [۲۵،۲۴،۲۲،۲۰]. پس از اتمام عمل جراحی، حیوانات جراحی شده تا زمان به هوش آمدن به اطاقی با دمای مناسب انتقال یافتند و پس از به هوش آمدن به طور انفرادی نگه‌داری شدند. پس از گذشت سه تا چهار روز دوره بهبودی، حیوانات در قفس‌های سه تایی قرار گرفتند.

مطالعه بافتی. پس از پایان یافتن دوره درمان، حیوانات بی‌هوش شده و با استفاده از پارافرمالدئید ۴٪ پرفیوژن شدند. سپس مغزها خارج شد و به مدت ۲۴ ساعت در فیکساتیو پارافرمالدئید ۴٪ قرار داده شدند، به‌دنبال آن قالب‌گیری نمونه‌ها با پارافین انجام شد و با استفاده از میکروتوم روتاری مقاطع ۱۰ میکرونی تهیه و پس از رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله (Cresyl fast violet) و ایمنوهیستوشیمی آنتی‌تیروزین هیدروکسیلاز مورد بررسی قرار گرفتند [۲۲،۲۰].

رنگ‌آمیزی کرزیل فاست ویوله. با توجه به اطلس پاکسینوس در محدوده‌ی ۲/۸ میلی‌متر پشت برگما تا ۴/۵۲ میلی‌متری آن (در این محدوده مناطق DG CA1, و CA3 قابل مشاهده هستند)، مقاطع میکروسکوپی کرونال با ضخامت ۱۰ میکرون تهیه شد. سپس از هر گروه ۵ تا ۷ مقطع با فاصله ۲۰۰mμ برداشته شده (از هر ۲۰ برش یک برش برداشته شد)، مقاطع به روش کرزیل ویوله ۰/۷۵٪ رنگ‌آمیزی شدند و سپس با بزرگ‌نمایی X۴۰۰، شمارش شد. به این صورت که تعداد نورون‌های مناطق DG (به طور کامل) و CA1 در پنج میدان دید با مساحت ۲۵۵ μm^2 شمارش شده و میانگین به دست آمده محاسبه گردید، شمارش سلولی ۷ بار تکرار شد. در مورد منطقه‌ی CA3 میانگین تعداد نورون‌ها در مساحت ۱۷۰μm^2 محاسبه شد [۲۶،۲۷]. نورون‌هایی که هسته گردی داشته و کروماتین‌شان به صورت توده‌های متراکم به شدت بازوفیل بود، نورون‌های آپوپتوتیک در نظر گرفته شدند و شمارش نشدند [۲۲].

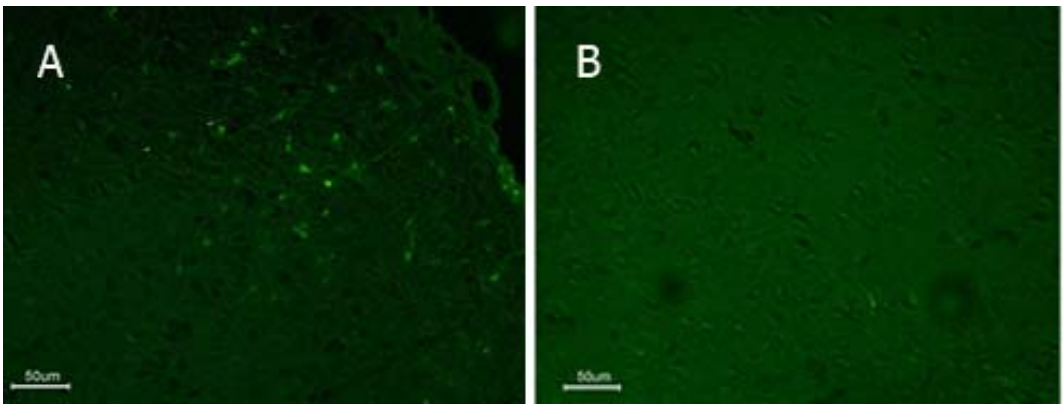
مطالعه ایمنوهیستوشیمی. به منظور تأیید تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در اثر آسیب با نوروتوکسین، از آنتی‌بادی آنتی TH (Chemicon) استفاده شد. جهت بازیابی آنتی‌ژن، تعدادی از مقاطع بافتی به همراه محلول بافرسیترات و Tween۰/۰۵٪ در مایکرویو با برنامه ۸۰۰، ۴۰۰ و ۲۶۰ وات به ترتیب هر کدام به مدت پنج دقیقه قرار داده شدند. به دنبال آن شستشو با PBS حاوی تریتون ۰/۳٪ صورت گرفت، سپس از محلول بلاک‌کننده سرم بز ۱۰٪ به مدت ۲-۱ ساعت، برای بلوکه کردن آنزیم‌های آندوژن استفاده شد. انکوباسیون با آنتی‌بادی ضد تیروزین هیدروکسیلاز (۱:۱۰۰)-Rabbit anti phospho-Tyrosine (Hydroxylase, Invitrogen) به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و پس از شستشو با بافر فسفات با آنتی‌بادی ثانویه کونژگه به FITC (۱:۱۰۰) به مدت دو ساعت، در °C ۳۷ قرار داده شد [۳۰-۲۷]. مقاطع با میکرسکوپ فلورسنت (NikonEclipse, E600, Japan) و دوربین دیجیتال(Nikon, DXM 120, USA) مطالعه و عکس‌برداری شدند.

روش آماری. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون LSD بررسی گردید. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه گردید، ($P\leq$۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در ارزیابی بافتی به روش ایمنوهیستوشیمی از منطقه SNC، بیان نورون‌های TH مثبت به عنوان نشان‌گر دوپامینرژیکی مورد بررسی قرار گرفت، شکل ۱ حضور نورون‌های TH مثبت را در گروه‌های شم و آسیب نشان می‌دهد، همان‌گونه که مشخص است در گروه شم تراکمی از نورون‌های TH مثبت در محل تزریق دیده می‌شود (A) ولی در گروه آسیب از تراکم نورونی کاسته شده است (B).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

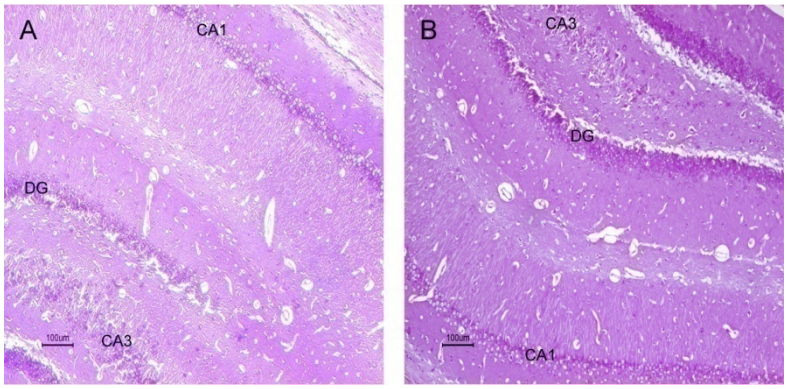


شکل ۱. ایمنوهیستوشیمی آنتی TH بخش متراکم جسم سیاه در ناحیه تزریق نشان داده شده است: نورون‌های TH مثبت در گروه شم (A) و گروه آسیب‌دیده با نوروتوکسین (B) که با نور فلوئورسنت به رنگ سبز دیده شدند (فلش). بزرگ‌نمایی ۴۰۰×

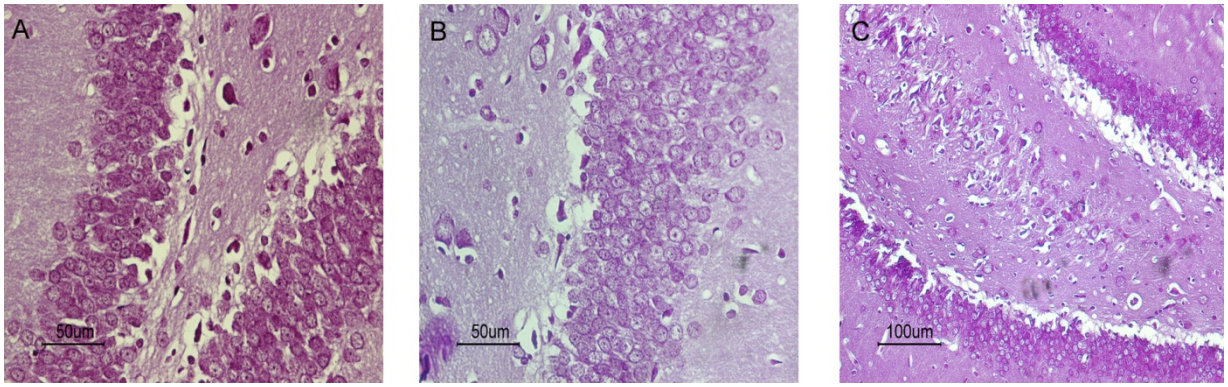
در شکل ۲ مناطق مختلف هیپوکمپ پس از رنگ‌آمیزی با کرزیل ویوله را در دو گروه شم و آسیب نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در گروه آسیب، از تراکم نورون‌ها در منطقه شکنج دندانه‌ای کاسته شده است.

اشکال ۳ تا ۵ اثر عصاره رزماری را با غلظت‌های مختلف بر تراکم نورونی در مناطق مختلف هیپوکمپ نشان می‌دهند.

بررسی کیفی اشکال نشان داد که تراکم نورون‌های سالم در شکنج دندانه‌ای، CA1 و CA3 هیپوکمپ در گروه‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف عصاره رزماری نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب افزایش یافت و این نتایج با شمارش سلولی و از نظر کمی نیز تایید شد (شکل‌های ۸-۶).

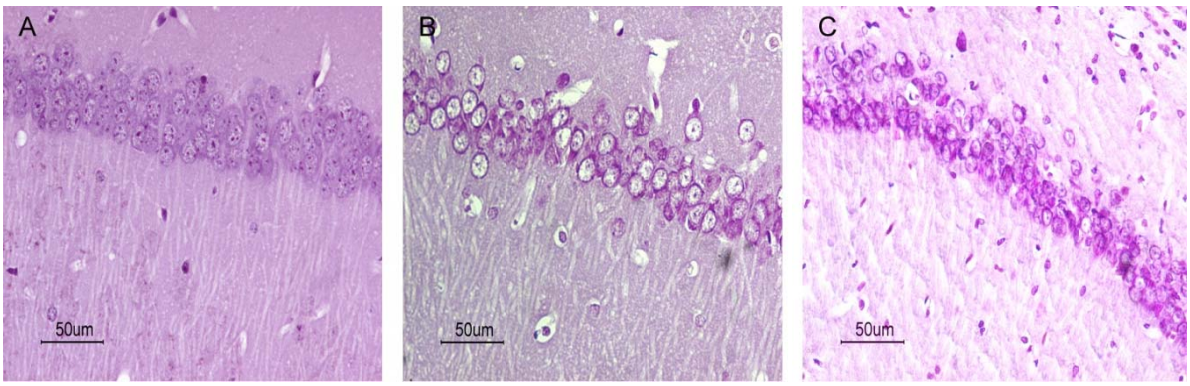


شکل ۲. مناطق مختلف هیپوکمپ پس از رنگ‌آمیزی با کرزیل ویوله در دو گروه شم (A) و آسیب (B) که شامل شکنج دندانه‌ای (DG، CA1 و CA3) می‌باشد در تصویر نشان داده شده است. بزرگ‌نمایی ۲۰۰×

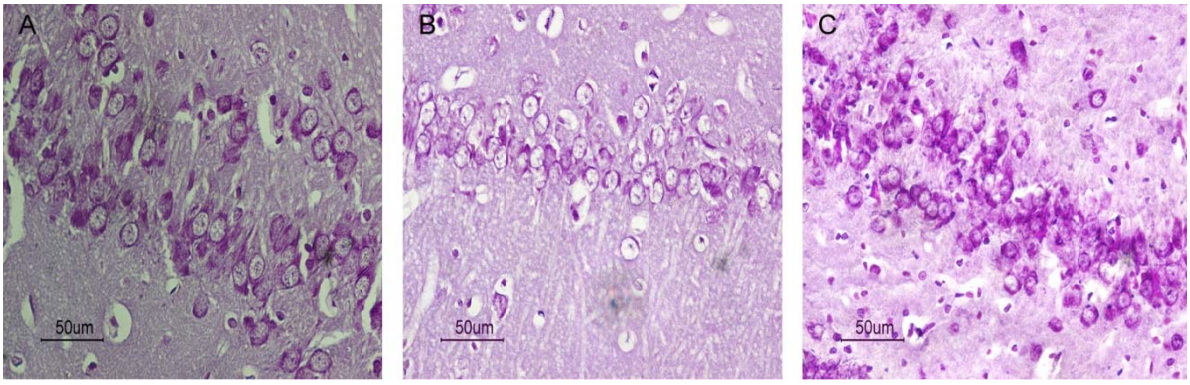


شکل ۳. تراکم نورون‌ها در ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ در گروه‌های تیمارشده با اسیدکارنوسیک با غلظت‌های ۱۰۰ mg/kg (A)، ۵۰ mg/kg (B) و ۲۵ mg/kg(C) نشان داده شده است، تعداد سلول‌های دانه‌دار ناحیه شکنج دندانه‌ای در گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب افزایش یافته است. بزرگ‌نمایی ۴۰۰×. فلش‌های مشکی سلول‌های دانه‌دار سالم و فلش‌های قرمز سلول‌های دانه‌دار تخریب‌شده را نشان می‌دهد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]



شکل ۴: نورون‌ها در ناحیه CA1 هیپوکمپ در گروه‌های تیمارشده با اسیدکارنوسیک با غلظت‌های ۱۰۰ mg/kg (A)، ۵۰ mg/kg (B) و ۲۵ mg/kg (C) نشان داده شده است، تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA1 در گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب افزایش یافته است. بزرگ‌نمایی ۴۰۰×

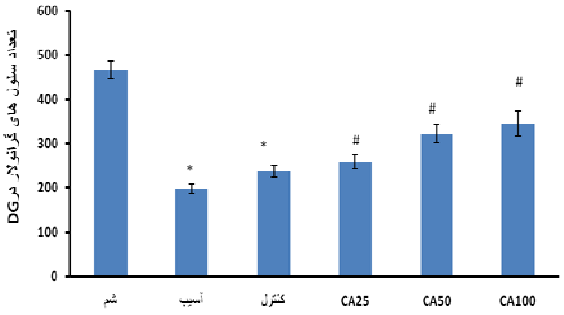


شکل ۵: نورون‌ها در ناحیه CA3 هیپوکمپ در گروه‌های تیمارشده با اسیدکارنوسیک با غلظت‌های ۱۰۰ mg/kg (A)، ۵۰ mg/kg (B) و ۲۵ mg/kg (C) نشان داده شده است. بزرگ‌نمایی ۴۰۰×

به منظور بررسی اثرات محافظتی اسیدکارنوسیک بر نورون‌های مناطق شکنج دندانه‌ای، CA1 و CA3 هیپوکمپ تراکم نورون‌ها از نظر کمی در گروه‌های مورد مطالعه محاسبه شد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵).

در گروه‌های تیمارشده با اسیدکارنوسیک با غلظت‌های (۵۰،۱۰۰،۲۵ mg/kg)، افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های دانه‌دار ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب مشاهده شد (P<۰/۰۵). هم‌چنین تعداد سلول‌های دانه‌دار در گروه‌های کنترل و آسیب کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شم نشان داد (P<۰/۰۵) (نمودار ۱).

در گروه‌های تیمارشده با CA به میزان ۵۰ mg/kg و ۱۰۰، افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب مشاهده شد (P<۰/۰۵) و هم‌چنین در گروه‌های کنترل و آسیب تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA1 کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شم را نشان داده شده (P<۰/۰۵). (شکل ۷).

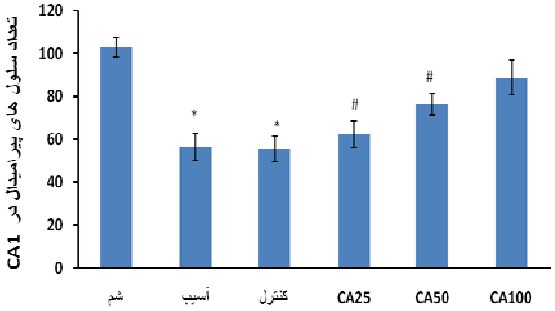


شکل ۶. تراکم نورون‌ها در منطقه شکنج دندانه‌ای در گروه‌های مورد مطالعه نشان داده شده است. اسیدکارنوسیک با هر سه غلظت به کار رفته تراکم سلولی را نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب به طور معنی‌داری افزایش داده است. * تفاوت معنی‌دار با گروه شم (P<۰/۰۵)، # تفاوت معنی‌دار با گروه‌های آسیب و کنترل (P<۰/۰۵).

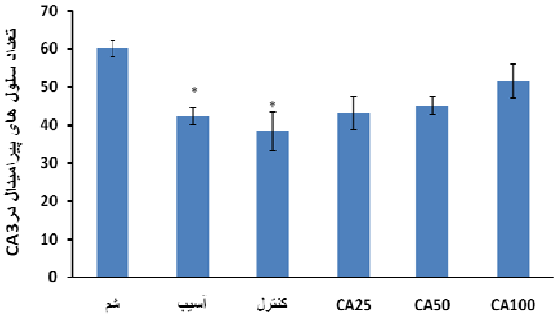
مصرف خوراکی اسیدکارنوسیک به میزان ۵۰،۲۵ mg/kg و ۱۰۰ افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های هرمی ناحیه

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

CA3 نسبت به گروه کنترل و آسیب را نشان نداد، در صورتی که تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA3 گروه‌های آسیب و کنترل کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شم را نشان داد (P<۰/۰۵). (شکل ۸).



شکل ۷. تراکم نورون‌ها در منطقه CA1 در گروه‌های مورد مطالعه نشان داده شده است. اسیدکارنوسیک با غلظت‌های ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ تراکم سلولی را نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب به طور معنی‌داری افزایش داده است. * تفاوت معنی‌دار با گروه شم (P<۰/ ۰۵)، # تفاوت معنی‌دار با گروه‌های آسیب و کنترل (P<۰/۰۵).



شکل ۸. تراکم نورون‌ها در منطقه CA3 در گروه‌های مورد مطالعه نشان داده شده است. اسیدکارنوسیک تأثیر معنی‌داری بر تراکم سلولی نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب نداشت. * تفاوت معنی‌دار با گروه شم (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر که به منظور بررسی اثر اسیدکارنوسیک بر تراکم سلولی هیپوکمپ پس از تزریق دوطرفه و مستقیم نوروتوکسین به SN_C صورت گرفت، نتایجی به شرح زیر در بر داشت:

– تزریق دوطرفه و مستقیم نوروتوکسین به SN_C کاهش معنی‌داری در تراکم نورون‌ها در مناطق هیپوکمپ ایجاد کرد.

– تجویز خوراکی اسیدکارنوسیک با دوزهای ۲۵ mg/kg، ۵۰ و ۱۰۰ از مرگ نورون‌ها در اثر القاء نوروتوکسین 6-OHDA در ناحیه شکنج دندانه‌ای جلوگیری می‌کند. در ناحیه CA1 این اثر تنها با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ مشاهده شد و در ناحیه CA3 اثر معنی‌داری مشاهده نشد.

از آن‌جا که ارتباط عصبی بین مناطق SNC، VTA مغز میانی و هیپوکمپ وجود دارد. دوپامین آزادشده در این مسیر نورون‌زایی را در DG تحریک می‌کند. مکانیسم اثر دوپامین بر نورون‌زایی بسیار پیچیده است، تعدادی از گیرنده‌های دوپامینی در هیپوکمپ شناسایی شده‌اند [۷،۶،۴]. هم‌چنین نقش دوپامین بر سرعت تکثیر پیش‌سازهای نورونی در شرایط in vivo و in vitro بررسی شده، در این شرایط دوپامین اثر تحریکی بر سرعت تکثیر نورون‌ها دارد [۹]. با توجه به نقش دوپامین در سیستم عصبی مزولیمبیک، در تحقیق حاضر نیز با استفاده از نوروتوکسین 6-OHDA ورودی‌های دوپامینرژیک مربوط به هیپوکمپ حذف شده و با کاهش دوپامین، تعداد نورون‌های دانه‌دار شکنج دندانه‌ای، CA1 و CA3 در گروه‌های کنترل و آسیب نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری را نشان داد. البته بررسی‌های ایمنوهیستوشیمی نیز کاهش تراکم نورون‌های TH مثبت را در گروه آسیب نسبت به گروه شم تأیید کرد. 6-OHDA نوروتوکسین اکسیدکننده‌ای است که نورون‌های دوپامینرژیک را در شرایط in vivo و in vitro تخریب می‌کند [۳۱] و با القاء آپوپتوز در نورون‌های مذکور سبب کاهش آن‌ها می‌گردد [۳۲].

مدل‌های حیوانی مورد بررسی در این تحقیق با تزریق دوطرفه و مستقیم نوروتوکسین در SN_C، آماده شدند. تحقیقات نشان داده با تزریق 6-OHDA در نواحی پشتی یا میانی SN_C، مدلی ایجاد خواهد شد که بسیار شبیه به اختلال حافظه مرحله‌ی اولیه بیماری پارکینسون خواهد بود و در این مدل کم‌تر از ۷۰٪ نورون‌های دوپامینرژیک در SNc تخریب می‌شوند حتی قبل از آن‌که حرکات چرخشی حیوان ظاهر شود [۳۳]. بنابراین مدل‌های به کار برده شده در این تحقیق که با تخریب دوطرفه SNc در اثر تزریق نوروتوکسین طراحی شده بودند نه تنها کاهش معنی‌دار نورون‌ها را در مناطق

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

هیپوکمپ نشان می‌دادند بلکه اختلال حافظه را در بیماری پارکینسون شبیه‌سازی می‌کرد.

با توجه به این‌که در بیماری پارکینسون، تا زمان شروع مرحله پیش‌رفته بیماری، تخریب نورونی بیش‌تر در بخش متراکم جسم سیاه بوده و کم‌ترین تخریب نورونی مربوط به VTA است. به همین دلیل در مراحل اولیه بیماری، اختلال حافظه مشکلی برای بیمار ایجاد نخواهد کرد ولی در مراحل پیش‌رفته بیماری که با تخریب VTA هم‌راه است، کاهش دوپامین باعث کاهش نورون‌زایی در DG و سیناپس‌های بین نورونی در هیپوکمپ می‌گردد و در نهایت حافظه و یادگیری دچار اختلال می‌شود. به طوری‌که در مراحل پیش‌رفته بیماری به دمانس و جنون منتهی شده که برای بیمار مشکل‌ساز خواهد بود [۳۴]. مدل به کار برده شده در این تحقیق نیز علاوه بر تخریب دوطرفه SNc در اثر تزریق نوروتوکسین و القاء کاهش معنی‌دار نورون‌ها در مناطق مختلف هیپوکمپ، اختلال حافظه را در بیماری پارکینسون شبیه‌سازی می‌کرد.

بنابراین هر عاملی که بتواند نورون‌زایی را در DG هیپوکمپ تحریک کند و یا از آپوپتوز نورون‌ها در مناطق مختلف هیپوکمپ بکاهد و اثر حفاظتی بر نورون‌ها داشته باشد، کاندید مناسبی در بهبود اختلال حافظه بیماران پارکینسونی خواهد بود. با توجه به مطالعات دیگران که تعدادی از آن‌ها در زیر می‌آید، عصاره رزماری به‌عنوان یک محافظ نورونی انتخاب شد.

Kosaka در سال ۲۰۰۳، عصاره برگ رزماری را به محیط کشت سلول‌های گلیوبلاستومای انسانی اضافه کرد و به دنبال آن سنتز NGF در این سلول‌ها افزایش یافت، وی از این عصاره برای درمان کاهش حافظه در بیماری آلزایمر استفاده کرد، با توجه به این‌که عصاره قادر است از سد خونی مغزی گذشته و سنتز NGF را تحریک کند و هم‌چنین نقش حفاظتی بر نورون‌های کولینرژیک بخش قاعده‌ای مغز قدامی داشته باشد [۳۴].

Ito و هم‌کارانش نیز در سال ۲۰۰۸ گزارش دادند اسیدرزمارینیک که یکی از ترکیبات عصاره رزماری است، مشابه داروی ضد افسردگی، تکثیر نورون‌ها را در شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ تحریک می‌کند. وی هم‌چنین اثر آنتی‌آپوپتیک اسید رزمارینیک بر آستروسیت‌ها را به اثبات رساند [۲۱]. Lee در سال ۲۰۰۸ اثر آنتی‌اکسیدانتی این ترکیب را بر نورون‌های دوپامینرژیک گزارش داد و معتقد بود اسید رزمارینیک با اثر آنتی‌اکسیدانتی، نقش حفاظتی بر نورون‌های دوپامینرژیک دارد [۱۹].

DU در سال ۲۰۱۰ بیان کرد اسیدرزمارینیک با داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانتی و آنتی‌آپوپتوتیکی از مرگ نورون‌های دوپامینی در شرایط in vitro که حاصل القائات 6-OHDA و MPTP است، جلوگیری می‌کند [۳۶].

با توجه به گزارشات قبلی در این تحقیق، مدل‌های ایجادشده با عصاره برگ رزماری حاوی ۴۰٪ اسیدکارنوسیک تیمار شدند و تأثیر آن بر نورون‌زایی DG مورد بررسی قرار گرفت. عصاره برگ رزماری ۱۴روز قبل و ۱۴ روز بعد از ضایعه به حیوانات به صورت گاواژ خورانده می‌شد. این عصاره قادر است از سد خونی مغزی گذشته، به محل آسیب رسیده و تأثیرگذار باشد [۱۸].

در تحقیقی که آزاد در سال ۲۰۱۱ انجام داد اسیدکارنوسیک را به صورت داخل صفاقی به موش‌های صحرایی مدل آلزایمر تزریق کرد، طول درمان ۱۴روز قبل و ۱۴روز بعد از ضایعه به هیپوکمپ بود. وی مشاهده کرد اسیدکارنوسیک از مرگ نورون‌های CA1 در هیپوکمپ می‌کاهد. زمان شروع درمان، فاکتور بسیار مهمی است که در این گزارش مناسب‌ترین زمان تیمار با اسیدکارنوسیک، ۱۴ روز قبل از آسیب ذکر شد [۲۲]. در صورتی‌که درمان با عصاره قبل از آسیب باشد مانع از کاهش غیر قابل برگشت نورون‌ها می‌گردد. مطالعه دیگری نیز نشان داد که درمان قبل از ضایعه، با کاهش ROS موجب تأخیر در سرعت تخریب نورون‌ها ایجاد خواهد کرد [۳۷].

در این تحقیق نیز با توجه به این‌که شروع درمان قبل از ضایعه بوده، اثر حفاظتی اسیدکارنوسیک نشان داده شد. بررسی‌های شمارش سلولی تأیید کرد که تجویز

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

اسیدکارنوسیک با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، با طول درمان ۱۴ روز قبل و ۱۴ روز پس از تخریب موجب افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های دانه‌دار ناحیه DG در مقایسه با گروه‌های کنترل و آسیب می‌گردد ($P<0/05$).

در گروه‌های تیمارشده با اسیدکارنوسیک با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) در تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA1 مشاهده شد و هم‌چنین در گروه‌های تیمارشده با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اسیدکارنوسیک منجر به افزایش نورون‌های CA3 نسبت به گروه‌های کنترل و آسیب گردید.

نتایج شمارش سلولی، اثر حفاظت عصبی اسیدکارنوسیک را ثابت کرد به گونه‌ای که اگر درمان قبل از ضایعه شروع شود، سرعت تخریب نورون‌ها در هیپوکمپ کاهش می‌یابد. اگر چه تعداد نورون‌ها در مناطق مختلف هیپوکمپ در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری را نشان داد. با این وجود اثر حفاظت عصبی اسیدکارنوسیک بر نورون‌های دانه‌دار DG و هرمی CA1 در مقایسه با CA3 مشهودتر بود. اگر چه تعداد نورون‌های هرمی CA3 افزایش یافته بودند ولی این افزایش در مقایسه با گروه‌های کنترل و آسیب معنی‌دار نبود. با توجه به این‌که آکسون‌های نورون‌های دانه‌دار با CA3 سیناپس دارند و زوائد نورونی CA3 نیز با نورون‌های CA1 سیناپس برقرار می‌کنند، تحقیقات نشان می‌دهند حفظ سیناپس‌های بین نورونی در این مناطق و هم‌چنین جلوگیری از آپوپتوز نورون‌های CA1 نقش مهمی در حافظه و یادگیری دارد [۳۹،۳۸]. بنابراین با توجه به این‌که تجویز خوراکی عصاره توانسته بود نقش حفاظتی را در مناطق مختلف هیپوکمپ داشته باشد و هم‌چنین با در نظر گرفتن ارتباط مستقیم تعداد نورون‌ها در هیپوکمپ و میزان حافظه می‌توان از این عصاره برای بهبودی اختلال حافظه بیماری تخریب عصبی مانند پارکینسون استفاده کرد و به عنوان داروی گیاهی مناسب و مؤثر برای بهبود علائم اولیه بیماری پارکینسون معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم مهدیه تمدنی برای اخذ درجه کارشناسی‌ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی از دانشگاه دامغان بود. بدین‌وسیله از دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Gardaneh M. Dopamine-synthesizing neurons: An overview of their development and application for cell therapy. Iran J Biotechenol 2010; 8: 213-228.

[2] Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. Trends Neurosci 2007; 30: 194-202.

[3] Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? Nat Rev Neurosci 2010; 11: 339-350.

[4] Yang P, Arnold SA, Habas A, Hetman M, Hagg T. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-Induced CNS neurogenesis in adult mice. J Neurosci 2008; 28: 2231-2241.

[5] Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington.Clinical, morphological and neurochemical correlations. J Neurol Sci 1973; 20: 415-455.

[6] Diaz J, Ridray S, Mignon V, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P. Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the brain . J Neurosic 1997; 17: 4282-4292.

[7] Otmakhova NA, Lisman JE. D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. J Neurosci 1996; 16: 7478-7486.

[8] Bethus I, Tse D, Morris RG. Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. J Neurosci 2010; 30: 1610-1618.

[9] O'Keeffe GC, Tyers P, Aarsland D, Dalley JW, Barker RA, Caldwell MA. Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 8754-8759.

[10] Suzuki K, Okada K, Wakuda T, Shinmura C, Kameno Y, Iwata K, et al. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. PLoS One 2010; 5: e9260.

[11] Veena J, Rao BS, Srikumar BN. Regulation of adult neurogenesis in the hippocampus by stress, acetylcholine and dopamine. J Nat Sc Biol Med 2011; 2: 26-37.

[12] Artegiani B, Calegari F. Age-related cognitive decline: Can neural stem cells help us? Aging 2012; 4: 176-186.

[13] Bowers JM, Waddell J, McCarthy MM. A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. Biol Sex Differ 2010; 1: 1-13.

[14] Malberg JE, Schechter LE. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. Curr Pharm Des 2005; 11: 145-155.

[15] Kim YP, Kim H, Shin MS, Chang HK, Jang MH, Shin MC, et al. Age-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. Neurosci Lett 2004; 355: 152-154.

[16] Eadie BD, Redila VA, Christie BR. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. J Comp Neurol 2005; 486: 39-47.

[17] Munne´-Bosch S, Alegre L. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. Plant Physiol 2001; 125: 1094-1102.

[18] Richheimer SL, Bairley DT, Bernat MW, Kent M, Vininski JV, Anderson LD. Antioxdant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary. Rec Res Dev Oil Chem 1999; 3: 45-58.

[19] Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. Toxicology 2008; 250: 109-115.

[20] Sriraksa N, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tiamkao S, Brown K, Chaisiwamongkol K. Cognitive-enhancing effect of Quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-Hydroxydopamin. Evid Based Complement Alternat Med 2012; 2012: 1-9.

[21] Ito N, Yabe T, Gamo Y, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T. Rosmarinic acid from PerillaeHerba produces an antidepressant-like effect in mice through cell proliferation in the hippocampus. Biol Pharm Bull 2008; 31: 1376-1380.

[22] Azad N, Rasoolijazi H, Joghataie MT, Soleimani S. Neuroprotective effects of carnosic acid in an experimental model of Alzheimer's disease in rats. Cell J 2011; 13: 39-44.

[23] Sheyab FM, Abuharfeil N, Salloum L, Hani RB, Awad DS. The effect of Rosemary (Rosmarinus officinalis. L) plant extracts on the Immune response and lipid profile in mice. J Biol Life Sci 2012; 3: 37-58.

[24] Da Cunha C, Angelucci ME, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. Cell Mol Neurobiol 2002; 22: 227-237.

[25] Da Cunha C, Wietzikoski S, Wietzikoski EC, Miyoshi E, Ferro MM, Anselmo-Franci JA, Canteras NS. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. Neurobiol Learn Mem 2003; 79: 236-242.

[26] Wattanathorn J, Jittiwat J, Tongun T, Muchimapura S, Ingkaninan K. Zingiber officinale mitigates brain damage and improves memory impairment in focal cerebral ischemic rat. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011: 1-8.

[27] Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, Okuyama N, Mochizuki N, Takeo S. Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. J Cereb Blood Flow Metab 2004; 24: 548-555.

[28] Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, Suh-Kim H. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. Exp Mol Med 2008; 40: 387-397.

[29] Park JH, Enikolopov G. Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion. Exp Neurol 2010; 222: 267-276.

[30] Krugers HJ, van der Linden S, van Olst E, Alfarez DN, Maslam S, Lucassen PJ, Joëls M. Dissociation between apoptosis, neurogenesis, and synaptic potentiation in the dentate gyrus of adrenalectomized rats. Synapse 2007; 61: 221-230.

[31] Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. Prog Neurobiol 2001; 65: 135-172.

[32] Jiang H, Song N, Xu H, Zhang S, Wang J, Xie J. Up-regulation of divalent metal transporter 1 in 6-hydroxydopamine intoxication is IRE/IRP dependent. Cell Res 2010; 20: 345-356.

[33] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS, Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. J Neurosci Methods 2005; 148: 78-87.

[34] Martig AK, Mizumori SJ. Ventral tegmental area and substantianigra neural correlates of spatial learning. Learn Mem 2011; 18: 260-271.

[35] Kosaka K, Yokoi T. Carnosic Acid, a component of Rosemary (Rosmarinusofficinalis L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. Biol Pharm Bull 2003; 26: 1620-1622.

[36] Du T, Li L, Song N, Xie J, Jiang H. Rosmarinic acid antagonized 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced neurotoxicity in MES23.5 dopaminergic cells. Int J Toxicol 2010; 29: 625-633.

[37] Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Antioxidant treatment in Alzheimer's disease: current state. J Mol Neurosci 2003; 21: 1-11.

[38] Bendel O, Bueters T, Von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J, von Euler G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. J Cereb Blood Flow Metab 2005; 25: 1586-1595.

[39] Kumar A. Long-term potentiation at CA3–CA1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease, and stress. Front Aging Neurosci 2011; 3: 1-20.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

Neuroprotective effects of carnosic acid on the hippocampus of 6-hydroxydopamine injured rats

Mahdiye Tamadoni (M.Sc)[1], Maryam Haji GhasemKashani (Ph.D)[*2], Mohamad Taghi Ghorbanian (Ph.D)[2], Kataneh Abrari (Ph.D) [2], Rasoul Arashpour (M.Sc)[1]
1 – Dept. of Developmental Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
2 - Institute of Biological Sciences, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

(Received: 19 Dec 2012; Accepted: 8 Sep 2012)

Introduction: The reduction of dopamine level caused by neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD) may reduce the production of new neurons in dentate gyrus (DG) of the hippocampus. In addition, there is a direct link between the reduction of neurons in the hippocampus and memory impairment. In this study, the effect of carnosic acid (CA) on the hippocampal neurogenesis was evaluated after 6-OHDA injury.

Materials and Methods: Male Wistar rats were randomly divided into six groups. First group was injected by bilateral intra-nigral of 6-OHDA at a dose of 6µg (injury). Groups 2-5 were injured rats which received orally Rosemary extract containing 40% CA at doses of 25, 50 and100 mg/kg (treated) and distilled water (control), once daily in a period of 14 days before and after injury. The sixth group (sham) was injected with saline instead of neurotoxin. After treatment, the brains were removed and fixed with 4% paraformaldehyde, dehydrated, embedded in paraffin and cut into 10µm thick slices. Sections were stained with cresyl fast violet and cell counting of hippocampal regions was done.The loss of dopaminergic neurons in the 6-hydroxydopamine-lesioned rats, compared to sham-operated rats, was verified by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry.

Results: Immunostaining analysis revealed a high density of TH^+ cells in sham compared to injured group. The number of DG granular and CA1 pyramidal cells were decreased significantly in both control and injured groups compared to sham ($P<0.05$). The number of granular and CA1pyramidal cells were increased significantly in CA (25, 50,100) and CA (50,100) treated groups respectively, compared to control and injured rats ($P<0.05$). The number of CA3 pyramidal cells was not increased significantly in treated groups compared to control and injured rats**.**

Conclusion: CA plays an important role in protecting hippocampal neurons from further damage in response to 6-OHDA. Then it is the effective herbal drug with treatment potential to improve memory impairment in PD which caused by neurons degeneration in the hippocampus.

Keywords: Carnosic acid, Neuroprotective, Hippocampus, Dopamine, 6-Hydroxydopamine

Corresponding author: Fax: +98 232 35247146 Tel: +98 9374549803
kashani_tmu@yahoo.com

How to cite this article:
Tamadoni M, Haji ghasem kashani M, Ghorbanian M, Abrari K, Arashpour R. Neuroprotective effects of carnosic acid on the hippocampus of 6-hydroxydopamine injured rats. koomesh. 2014; 15 (2) :232-241
URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-1842-1&slc_lang=en&sid=1

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]