

مقاله پژوهشی

اثرات عصاره آبی-الکلی زعفران بر توزیع فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ و پروتئین اسید گلیال فیبریلاری در تشکیلات هیپوکامپ موش‌های صحرایی ماده دمیلینه‌شده

زهرا جاوید، مهناز طاهریان‌فرد^{*}، جواد ساجدی‌ان‌فرد، حمیدرضا مرادی

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

پذیرش: ۲۰ تیر ۱۴۰۲

دریافت: ۹ خرداد ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: بیماری‌های دمیلینه‌کننده از اختلالات اتوایمون سیستم عصبی مرکزی هستند. هدف از مطالعه حاضر تأثیر عصاره آبی-الکلی زعفران بر تخریب سد خونی-مغزی، توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ در سلول‌های الیگودندروسیت و آستروسیت و تعداد سلول‌های مذکور است.

روش‌ها: از ۴۰ موش صحرایی ماده بالغ نژاد اسپراگ داولی در چهار گروه شم، کنترل درمان، درمان زعفران، درمان اینفلکسیمب استفاده شد. دمیلیناسیون با تزریق اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد در شکنج دنداندار القا شد. توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ سلول‌های الیگودندروسیت و آستروسیت توسط ایمونوهیستوشیمی شناسایی و توسط نرم افزار آنالیزور تصویری بررسی شد. وسعت دمیلیناسیون توسط رنگ‌آمیزی لوکسول فست بلو مشخص و با برنامه تصویر-ز مورد ارزیابی قرار گرفت. وسعت تخریب سد خونی-مغزی توسط تکنیک الایزا و اندازه‌گیری میزان خروج اوانس بلو از رگ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تخریب در سد خونی-مغزی به طور معنی داری ($p < 0/05$) در گروه کنترل درمان در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشتر بود. توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ سلول‌های الیگودندروسیت و آستروسیت و تعداد این سلول‌ها به‌طور قابل‌توجهی ($p < 0/05$) در گروه کنترل درمان نسبت به سایر گروه‌ها کمتر بود.

نتیجه‌گیری: عصاره آبی-الکلی زعفران باعث بهبود سد خونی-مغزی، افزایش توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ بر روی سلول‌های آستروسیت و الیگودندروسیت و تعداد این سلول‌ها در گروه درمان زعفران شده است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین اسید فیبریلاری گلیال، دمیلینه‌شدن، سد خونی مغزی، فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲

مقدمه

دمیلینه‌شدن یک رویداد پاتولوژیک خودایمنی است. بیماری‌های خودایمنی (باواسطه سلول یا آنتی‌بادی)، ازجمله مولتیپل اسکلروزیس، بیشتر در زنان رخ می‌دهد. فناوری‌های نوپهور ممکن است روش‌های جدیدی را برای تشریح بیشتر مکانیسم‌های ژنتیکی و ایمنی‌شناختی مرتبط با تفاوت‌های مشاهده‌شده بین زنان و مردان مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس را ارائه دهند [۱]. اجزای اصلی سد خونی-مغزی، سلول‌های اندوتلیال، مسئول حفظ هموستاز بسیار تخصصی با هدف اصلی

تنظیم دقیق سیستم ایمنی، سیستم عصبی مرکزی^۱ هستند. اختلال عملکرد سد خونی-مغزی یک مرحله اساسی در شروع و حمله ایمنی علیه ساختارهای سیستم عصبی مرکزی و فرآیند تخریب عصبی در مولتیپل اسکلروزیس در نظر گرفته می‌شود [۲]. دانش فعلی در مورد مکانیسم‌های مولکولی واسطه اختلال عملکرد سد خونی-مغزی در مولتیپل اسکلروزیس تا حد زیادی از مدل‌های حیوانی، مانند آنفالومیلیت خودایمنی تجربی^۲

¹ Central nervous system

² Experimental autoimmune encephalomyelitis

یکی از راه‌های ایجاد دمی‌لیناسیون در مدل حیوانی تزریق موضعی اتیدیوم بروماید در ساختارهای مغز است. سه روز پس از تجویز اتیدیوم بروماید، ضایعات پیشرونده در الیگودندروسیت‌ها و آستروسیت‌ها مشاهده شده و سپس منجر به دمی‌لیناسیون آکسون می‌شود [۱۰]. هیپوکامپ، بخشی فعال از مغز بزرگسالان است که در آن سلول‌های بنیادی عصبی در طول زندگی به تکثیر و تمایز به سایر نورون‌ها ادامه می‌دهند [۱۱]. چندی مطالعه انسانی با استفاده از تکنیک‌های تصویربرداری رزونانس مغناطیسی^۶ گزارش کرده‌اند که تشکیلات هیپوکامپ در مولتیپل اسکلروزیس تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در مطالعات پلاک‌های دمی‌لینه‌کننده در قسمت‌های مختلف هیپوکامپ مشاهده شد. میکروگراف‌های فراساختاری شکنج دنداندار هیپوکامپ، غلاف‌های میلین برجسته را در آکسون‌ها با سیتوپلاسم و هسته فشرده‌شده نشان داد [۱۲]. با توجه به اهمیت تشکیلات هیپوکامپ و جسم پینه‌ای در این تحقیق میزان دمی‌لینه‌شدن در سه منطقه CA1^۷، شکنج دندانهای^۸ و جسم پینه‌ای^۹ مورد بررسی قرار گرفت.

در طب گیاهی، زعفران سال‌ها است که به‌عنوان مسکن درد استفاده می‌شود [۱۳]. زعفران دارای چهار ترکیب فعال زیستی است: کروسین، کروسیتین، پیکروکروسین و سافرنال. این چهار ترکیب مسئول ارزش بالای اثرات دارویی و غذایی زعفران هستند [۱۴]. زعفران و ترکیبات فعال آن می‌توانند از سیستم عصبی مرکزی محافظت کنند، یادگیری و حافظه را بهبود می‌بخشند [۱۵]. تزریق عصاره اتانولی زعفران در موش‌هایی که توسط تزریق اتیدیوم بروماید در هیپوکامپ القا مولتیپل اسکلروزیس انجام شده بود، رفتارهای شناختی را بهبود بخشید [۱۳].

هدف مطالعه حاضر بررسی اثر محافظتی احتمالی زعفران بر اختلال سد خونی-مغزی، تعداد سلول‌های مثبت به فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ و پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و توزیع فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ و پروتئین اسید فیبریلاری گلیال در سلول‌های الیگودندروگلیا و آستروسیت در ناحیه CA1 هیپوکامپ، جسم پینه‌ای و شکنج‌دندانهای در موش صحرایی ماده دمی‌لینه شده است.

حاصل شده است. اگرچه تغییرات سد خونی-مغزی به پاتوژنز مولتیپل اسکلروزیس کمک می‌کند، عوامل مولکولی زمینه‌ای منجر به اختلال عملکرد سد خونی-مغزی در مولتیپل اسکلروزیس ناشناخته باقی مانده است [۳].

آسیب مغزی منجر به آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها و متعاقب آن تخریب آکسون می‌شود که به نوبه خود یکپارچگی و عملکرد رشته‌های عصبی را تهدید می‌کند [۴]. در سیستم عصبی مرکزی بالغ و در حال تکامل، سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت جمعیت اصلی سلول‌های گلیال را تشکیل می‌دهند. سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت ابتدا فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ را بیان می‌کنند که یک عامل اصلی رونویسی مارپیچ-مارپیچ است. سلول‌های پیش‌ساز عصبی از طریق فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ به رده اولیگودندروگلیا تمایز می‌یابند [۵]. علاوه بر این، رمی‌لینه‌شدن^۴ برای بهبود هدایت عصبی ضروری است که به تکثیر سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت به الیگودندروسیت‌های تولیدکننده میلین بستگی دارد [۶].

همانگی عمل سلول‌های گلیال بقای سلول‌های عصبی را افزایش می‌دهد. آستروسیت‌ها علاوه بر نقشی که در تشکیل زخم دارند، در مولتیپل اسکلروزیس ترشح قوی سیتوکین‌های مختلف التهابی و عوامل سیتوتوکسیک را انجام می‌دهند که منجر به اختلال عملکرد میتوکندری می‌شوند [۷]. فرآیند آستروسیت‌ها برای بیان پروتئین اسید فیبریلاری گلیال^۵ جهت مشارکت در تشکیل سد خونی مغزی در تماس مستقیم با رگ‌های خونی ضروری هستند. در واقع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال، به‌عنوان یک نشانگر استاندارد شناسایی آستروسیت‌ها در نظر گرفته می‌شود [۸].

فاکتور نکروز توموری α واسطه اصلی پاسخ‌های التهابی است و ممکن است در پاتوژنز و پیشرفت، بیماری التهابی مولتیپل اسکلروزیس مهم باشد. آنتاگونیست‌های فاکتور نکروز توموری α ، از جمله اینفلکسیمب گزینه‌های درمانی مولتیپل اسکلروزیس بودند، اما مشخص شد که این اثرات کوتاه‌مدت بوده و در دراز مدت این دارو خود باعث دمی‌لینه‌شدن می [۹]. در این مطالعه به‌صورت کوتاه مدت اثر این دارو با اثرات عصاره زعفران مقایسه می‌گردد.

⁶ Magnetic resonance imaging⁷ CA1 region of hippocampus⁸ Dentate gyrus⁹ Corpus callosum³ Oligodendrocyte transcription factor 2⁴ Remyelination⁵ Glial fibrillary acidic protein

مواد و روش‌ها

حیوانات و طراحی آزمایش

موش‌های صحرایی ماده نژاد اسپراگ داولی^{۱۰} (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) از مرکز آزمایشگاهی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شدند. آن‌ها در یک اتاق استاندارد با دمای کنترل شده 24 ± 2 درجه سانتیگراد با چرخه ۱۲ ساعته روز/شب (چراغ‌ها در ساعت ۰۶:۰۰ روشن و در ساعت ۱۸:۰۰ خاموش می‌شدند) قرار گرفتند. غذا و آب آزادانه در اختیار حیوانات بود. تمامی مراحل مربوط به آزمون‌های حیوانی توسط کمیته اخلاق پژوهشی موسسه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (INT1M1755 - 98) بررسی و تایید شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه ($n = 15$) تقسیم شدند: ۱- گروه شم: موش‌ها ۳ میکرولیتر مایعات مغزی نخاعی مصنوعی^{۱۱} در شکنج‌دندانه‌دار $+ 0.25$ میلی‌لیتر سالین نرمال به صورت داخل صفاقی دریافت کردند؛ ۲- گروه کنترل درمان: القای دمی‌لیناسیون بدون درمان؛ ۳- گروه درمان زعفران: القای دمی‌لیناسیون + زعفران (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز به صورت داخل صفاقی) ۴- درمان اینفلیکسیمب: القای دمی‌لیناسیون + اینفلیکسیمب (۵ میلی گرم بر کیلوگرم در هفته به صورت داخل صفاقی). زعفران و اینفلیکسیمب یک هفته پس از القا دمی‌لیناسیون، به مدت ۲۱ روز تجویز شد. در ضمن آزمایش در تمام موش‌ها در مرحله پرواستروس شروع شد.

تعیین سیکل استروس

جهت تعیین سیکل از نمونه برداری واژنی استفاده گردید. ابتدا نوک یک پیپت پاستور را به کمک حرارت مرتب کرده و با قراردادن یک عدد پوار در انتهای آن جهت نمونه‌گیری استفاده شد. پیپت ابتدا در الک، سپس در آب مقطر و در نهایت در سالین نرمال شسته و سپس نمونه واژنی تهیه شد. نمونه‌های واژنی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی و حضور تعداد زیادی سلول‌های اپیتلیومی به همراه گاه‌ها تعدادی سلول‌های شاخی شده بیانگر مرحله پرواستروس بود.

تهیه عصاره زعفران

در تحقیق حاضر زعفران سرگل مرغوب از قائنات

جمع‌آوری شد (شماره شناسایی ۵۵۱۳۰)، گونه گیاه توسط دکتر خسروی استاد بخش زیست‌شناسی گیاهی دانشکده علوم دانشگاه شیراز تعیین گردید. عصاره آبی زعفران طبق روش فرجه و همکاران تهیه شد [۱۶]. برای تعیین میزان کروسین در عصاره تهیه شده، کروسین ۱۰۰ درصد خالص تهیه‌شده از شرکت سیگما با غلظت‌های مختلف رقیق و در دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق شد و پیک مربوطه بدست آمد. سپس نمونه زعفران عصاره‌گیری شده نیز با غلظت‌های مختلف به دستگاه تزریق شد و پیک مربوط به هر غلظت بدست آمد. با مقایسه پیک‌های مربوط به کروسین خالص و عصاره هیدروالکلی مطالعه حاضر میزان کروسین موجود در نمونه‌ها محاسبه گردید.

جراحی استریوتاکتیک و القای دمی‌لیناسیون

موش‌ها با کتامین هیدروکلراید ۱۰ درصد (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) (شرکت آلفاسان هلند) و زایلازین ۲ درصد (۸ میلی گرم بر کیلوگرم) (شرکت آلفاسان هلند) بیهوش شدند. سپس موش‌ها در یک دستگاه استریوتاکتیک آمریکا^{۱۲} قرار گرفتند و یک کانول راهنما در شکنج‌دندانه‌ای کاشته شد. مختصات استریوتاکتیک $AP = -3.96$ میلی‌متر $ML = 2$ میلی‌متر؛ $DV = -4.1$ میلی‌متر از قشر بر اساس اطلس مغز موش پاکسینوز بود [۱۷]. القای دمی‌لیناسیون با تزریق ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید (شرکت سیگما آلدریج آمریکا) ۰/۰۱ درصد در شکنج‌دندانه‌ای راست انجام شد.

ارزیابی خروج اوانس بلو

محلول ۲ درصد اوانس بلو (شرکت سیگما آلدریج آمریکا E2129) در نرمال سالین (۴ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن بدن) به ورید ژوگولار تزریق شد. به مدت یک ساعت اجازه داده شد تا رنگ در گردش باشد. پس از آن، موش‌های تحت بیهوشی با اتر با ۵۰ میلی‌لیتر PBS^{۱۳} سرد پرفیوژن شدند. متعاقباً، بافت مغز برداشته شده و هیپوکامپ جدا شد. هیپوکامپ در ۱/۱ میلی‌لیتر PBS سونیکیت شده و سانتریفیوژ شد (۳۰ دقیقه، ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، درجه حرارت ۴ سانتی‌گراد). مایع رویی به مقدار کمی جمع‌آوری شد. به هر ۰/۰۵ میلی لیتر، مقدار مساوی

¹² Stoelting, USA

¹³ Phosphate-buffered saline

¹⁰ Sprague-Dawley

¹¹ Artificial cerebrospinal fluid

۳ درصد H_2O_2 به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. نمونه‌های کنترل منفی با جایگزینی آنتی‌بادی اولیه با محلول رقیق‌کننده آنتی‌بادی (محلول معرف Ab-diluent، Invitrogen، CA، Carlsbad، USA) در همان غلظت تهیه شد. پس از چند بار شستشو، اسلایدها با یک آنتی‌بادی ثانویه بیوتینیل‌شده (Invitrogen، Broad Spectrum، Histostain-Plus Kit، CA، Carlsbad، USA) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و دی‌آمینوبنزدین (DAB) (DAB Substrate Kit، CA، Carlsbad، USA) (انکوبه و برای مشاهده آماده شد. مقاطع با همتوکسیلین مایر (CA، Carlsbad، Invitrogen، USA) رنگ‌آمیزی شدند و با (ClearMount Invitrogen، CA، Carlsbad، USA) روی لام‌های شیشه‌ای نصب شدند. اسلایدها در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus BX 50، توکیو، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفتند و فتومیکروگراف‌ها با سیستم Leica DM 100 (Leica DFC 290HD، Wetzlar، Hessen، آلمان) گرفته شد. از همان پروتکل برای تمام نمونه‌ها استفاده شد. پس از گرفتن تصاویر دیجیتالی از اسلایدها، از نرم افزار آنالیزور تصویر (نسخه ۱.۴۲.۱) برای تعیین توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و Olig-2 و رنگ‌سنجی استفاده شد. سه شاخص مشخص‌کننده توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و Olig-2 (رنگ، اشباع پذیری، و شدت) در نظر گرفته شد. باید در نظر گرفت که نرم‌افزار شاخص‌های فوق را با مقادیر معکوس بیان می‌کند، به این معنی که مقادیر بیشتر نشان‌دهنده توزیع کمتر پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و Olig-2 است. همچنین تعداد سلول‌های مثبت نسبت به پروتئین‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ توسط برنامه تصویر-J^{۱۴} شمارش شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۲) استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. همه نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان شد.

۵۰ درصد تری‌کلرواستیک اسید اضافه شد، یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سانتریفیوژ شد (۳۰ دقیقه، ۱۵۰۰۰ RPM، درجه حرارت ۴ سانتی‌گراد). رنگ اوانس بلو توسط اسپکتروفوتومتر (Thermo Spectronic Genesys 10، MA، USA) در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و براساس منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت μg رنگ اوانس بلو بازای یک گرم بافت (ارائه شد).

رنگ‌آمیزی همتوکسیلین-آئوزین و لوکسول فست بلو

در پایان آزمایش برای مطالعه بافت‌شناسی، موش‌ها با دوز بالای کتامین (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر اساس اخلاق زیستی عمیقاً بیهوش شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر فرمالدئید ۴ درصد به عنوان محلول تثبیت‌کننده به قلب تزریق شد. پس از تثبیت اولیه، مغز حیوانات به طور کامل از جمجمه خارج شد و با کمک دستگاه پردازش بافت بلوک بافتی تهیه و سپس برش‌های بافتی با ضخامت ۳-۵ میکرون با میکروتوم تهیه شد. سپس اسلاید بر اساس روش کار مرسوم رنگ‌آمیزی همتوکسین-آئوزین انجام گرفت.

روش ایمونو هیستوشیمی

به دنبال این روش، روش بازبازی آنتی‌ژن مربوطه برای شناسایی پروتئین‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ بر روی آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها انجام شد. مقاطع پارافینی از مغز موش تهیه شد، سپس اسلایدهایی با ضخامت ۴ میکرون از مغز تهیه شد. اسلایدها با فرمالین بافر خنثی ۱۰ درصد تثبیت شدند. مقاطع در زایلن پارافین‌زدایی شدند، از طریق یک سری الکل درجه‌بندی شده هیدراته شدند و با PBS شسته شدند. به دنبال این روش‌ها، یک روش بازبازی آنتی‌ژن تخصصی پروتئین اسید فیبریلاری گلیال (شرکت Novus آمریکا NB300-141) با رقت یک به ۵۰۰۰ و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ (شرکت Novus آمریکا NBP3-13712) با رقت یک به ۵۰۰۰ بر نمونه‌ها در بافر ۱۰ میلی‌لیتری سیترات (pH 6.0) در اجاق مایکروویو با قدرت ۶۰۰ وات به مدت ۵ دقیقه دوبار انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق خنک شده و در

¹⁴ Image J

یافته‌ها

در تحقیق حاضر بازای ۱۰۰ گرم زعفران سرگل پس از عصاره گیری ۱۲/۶ گرم پودر خشک زعفران تهیه شد، از طرفی بازای ۱۰۰ گرم زعفران سرگل ۴/۳ گرم کروسین وجود داشت. از این ۱۲/۶ گرم براساس مقایسه پیک‌های $^{15}\text{HPLC}$ ، در کروسین خالص و محلول ۶۰ میلی‌گرم بازای وزن بدن به این نتیجه رسیدیم که عصاره زعفران بکارگرفته‌شده در این تحقیق حاوی معادل ۴/۳ میلی‌گرم بازای یک کیلو وزن بدن ماده کروسین بوده است.

شکل ۱ الف نشان می‌دهد که در موش‌های صحرایی دمیلینه‌شده، درصد دمیلینه‌شدن گروه شم نزدیک به صفر است. دمیلینه‌شدن در گروه کنترل درمان به‌طور معنی‌داری $[F(6) = 190, (p < 0.001)]$ بیشتر از سایر گروه‌ها بود. در واقع، دمیلینه‌شدن در درمان زعفران و اینفلیکسیمب به‌طور معنی‌داری $(p < 0.001)$ کمتر از گروه کنترل درمان و بیشتر از گروه شم بود. شکل ۱ ب تصویر میکروگراف تشکیلات هیپوکامپ را در همه گروه‌ها در رنگ آمیزی لوکسول فست بلو نشان می‌دهد. اختلال سد خونی-مغزی هیپوکامپ؛ در گروه کنترل درمان به‌طور قابل‌توجهی $[F(6) = 18, (p < 0.001)]$ بالاتر از سایرین بود. هیچ تفاوتی بین سایر گروه‌ها وجود نداشت (نمودار ۱).

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی برای پروتئین اسید فیبریلاری گلیال تأیید کرد که تعداد آستروسیت‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت در شکنج دندانهای گروه کنترل درمان در مقایسه با گروه شم $(p < 0.001)$ ، درمان زعفران $(p < 0.01)$ و درمان اینفلیکسیمب $(p < 0.05)$ به‌طور قابل‌توجهی $[F(6) = 20, (p < 0.001)]$ کمتر بود. تعداد آستروسیت‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت شکنج دندانهای در گروه درمان زعفران نیز به‌طور معنی‌داری $(p < 0.001)$ کمتر از شم، اما به‌طور معنی‌داری $(p < 0.001)$ بیشتر از کنترل درمان بود. تعداد آستروسیت‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت شکنج دندانهای در گروه درمان زعفران اینفلیکسیمب به‌طور قابل‌توجهی کمتر از درمان زعفران $(p < 0.01)$ و شم $(p < 0.001)$ بود (شکل ۲ الف). تعداد آستروسیت‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت CA1 گروه کنترل درمان به‌طور واضح کمتر از گروه شم

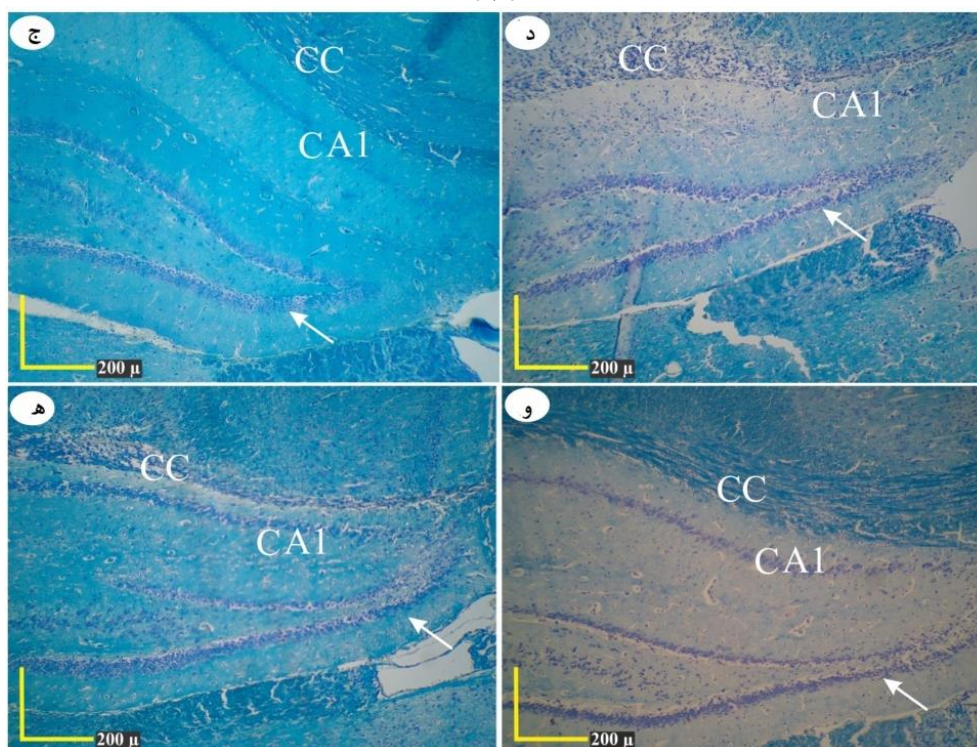
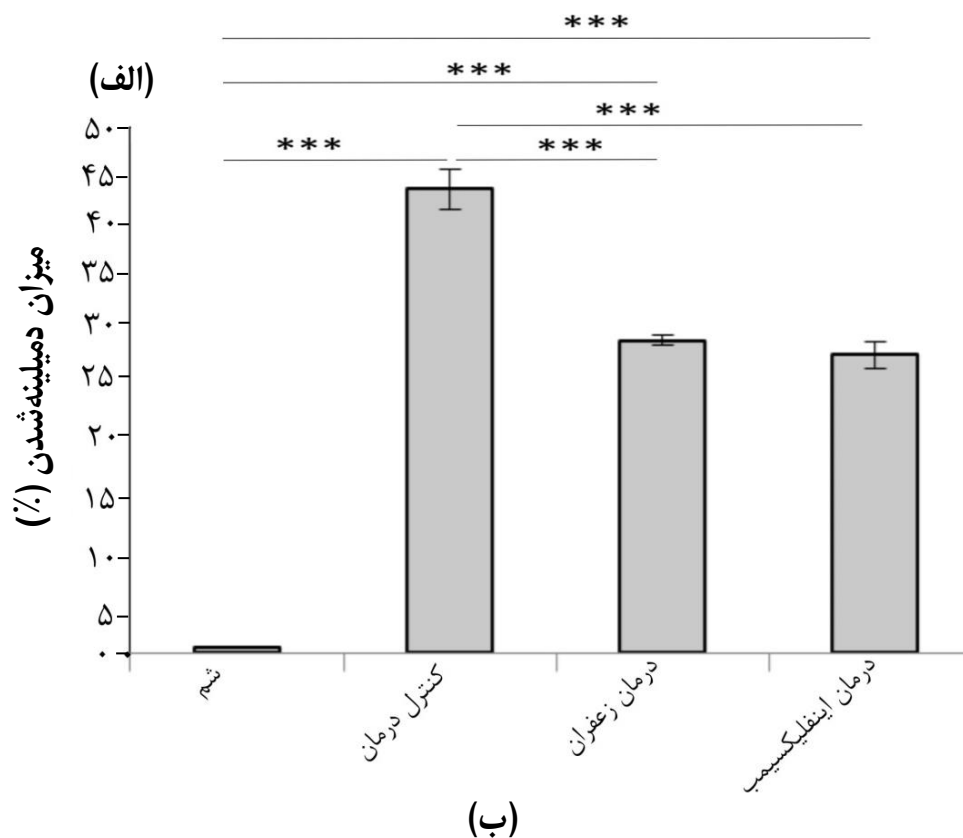
$(p < 0.001)$ ، درمان زعفران و اینفلیکسیمب بود $(p < 0.05)$. تعداد آستروسیت‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت زعفران و تیمار اینفلیکسیمب به‌طور معنی‌داری $(p < 0.001)$ در CA1 کمتر از شم بود (شکل ۲ الف). تعداد آستروسیت‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت جسم پینه‌ای در کنترل درمان به‌طور مشخص $(p < 0.05)$ کمتر از گروه شم و درمان زعفران بود (شکل ۲ الف). شکل ۲ ب تصویر میکروگراف آستروسیت پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت را در ساختار بافت هیپوکامپ گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.

در موش‌های دمیلینه‌شده، تعداد آستروسیت‌های فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ مثبت شکنج دندانهای و CA1 در گروه کنترل درمان به‌طور معنی‌داری $(p < 0.001)$ کمتر از بقیه بود (شکل ۳ الف). تعداد آستروسیت‌های فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ مثبت جسم پینه‌ای در کنترل درمان به‌طور واضح $[F(6) = 3, (p < 0.001)]$ کمتر از شم و درمان اینفلیکسیمب $(p < 0.01)$ و زعفران $(p < 0.05)$ بود (شکل ۳ الف). شکل ۳ ب فتومیکروگراف بافت هیپوکامپ در همه گروه‌ها با روش ایمونوهیستوشیمی برای آنتی‌بادی فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ نشان می‌دهد.

داده‌های موجود نشان داد که توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال در آستروسیت‌ها به‌طور معنی‌داری $[F(6) = 16, (p < 0.001)]$ در کنترل درمان نسبت به گروه‌های دیگر در ساختارهای شکنج دندانهای، CA1 و جسم پینه‌ای کمتر بود. علاوه بر این، افزایش قابل‌توجهی $(p < 0.01)$ در توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال آستروسیت‌ها در درمان زعفران در مقایسه با درمان اینفلیکسیمب در تمام ساختارهای فوق مشاهده شد (نمودار ۲).

نمودار ۳ نشان داد که توزیع فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ در الیگودندروسیت‌ها به‌طور معنی‌داری $[F(6) = 5, (p < 0.001)]$ در کنترل درمان کمتر از گروه‌های دیگر در ساختارهای شکنج دندانهای، CA1 و جسم پینه‌ای بود. همچنین، توزیع فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ در گروه درمان زعفران نسبت به گروه درمان با اینفلیکسیمب در ساختار شکنج دندانهای افزایش قابل‌توجهی $(p < 0.01)$ داشت (نمودار ۳).

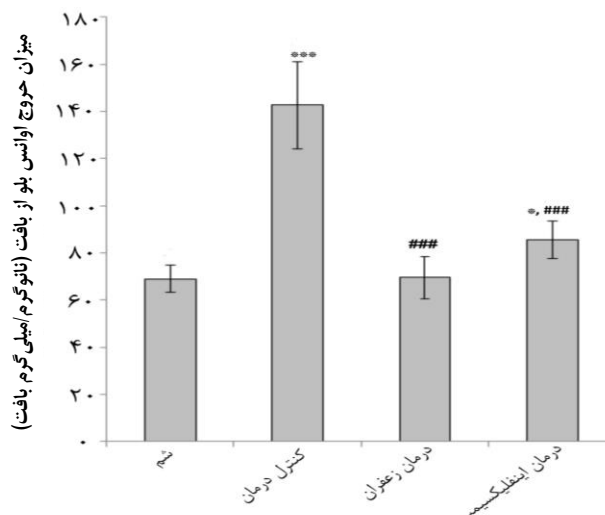
15 High performance liquid chromatography



شکل ۱- تأثیر عصاره زعفران بر دمیله‌ناسیون در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی. (الف) درصد دمیله‌ناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ. (ب) نمایش فتومیکروگراف (رنگ‌آمیزی لوکسول فست بلو) از هیپوکامپ در چهار گروه؛ ج: شم. د: کنترل درمان. ه: درمان زعفران. و: درمان اینفلکسیمب. فلش سفید نشان‌دهنده شکنج‌دندانه‌دار (DG) است. در تصویر CC نشان‌دهنده جسم پینه ای است. ***: تفاوت معنی‌دار با $p < 0.001$.

باعث افزایش رمیلینه شدن سلول‌های عصبی در هیپوکامپ می‌شود. در مطالعه حاضر، میزان خروج اوانس بلو نشان‌دهنده وسعت تخریب سد خونی-مغزی است، عصاره زعفران همچنین بر اساس اندازه گیری خروج اوانس بلو از عروق خونی نشان داد که سد خونی-مغزی را در موش‌های ماده دمیلینه شده ترمیم می‌کند. کروسین ۸۰ میلی گرم/کیلوگرم در روز تعداد سلول‌های ائوزینوفیلیک و همچنین دمیلینه شدن رشته‌های عصبی را به دنبال آسیب مغزی ناشی از ایسکمی و خونرسانی مجدد در موش کاهش می‌دهد [۱۸]. کروسین بیان ژن‌های التهابی XBP-1/s را هفت روز پس از القای آنسفالومیلیت خودایمنی تجربی در موش‌ها کاهش می‌دهد [۱۹].

کروسین مانع از بین رفتن پیوستگی سلول‌های اپیتلیومی سد خونی-مغزی در موش‌های صحرایی پیر پس از ایسکمی در ناحیه قشر مغز شد [۲۰]. عصاره زعفران اتصال سلول‌هایی را که ساختار سد خونی مغزی را تشکیل می‌دهند محکم می‌کند [۲۱]. نقش آستروسیت‌ها در شکل‌گیری و نگهداری تراکم میلین سیستم عصبی مرکزی خیلی کم شناخته شده است. آستروسیت‌ها عملکرد دوگانه‌ای دارند، در سیستم عصبی مرکزی نرمال و آسیب‌نندیده، آستروسیت‌ها اغلب غیرفعال، با نقش‌های حمایتی هستند، با این حال، پس از آسیب یا بیماری، خواص آن‌ها به‌طور چشمگیری تغییر می‌کند تا یک فنوتیپ ترمیمی به خود گیرند [۲۲]. در مطالعه‌ای ذکر گردیده است که علت دردهای پس از جراحی فعال شدن آستروسیت‌ها است. آستروسیت‌ها در دو فنوتیپ آستروسیت A1 (مخرب) و آستروسیت A2 (حفاظت سیستم عصبی) وجود دارند، پس از هر واکنش التهابی نسبت آستروسیت A1 به آستروسیت A2 افزایش قابل توجهی دارد. در این تحقیق با تزریق مینوسیکلین^{۱۸} (مهارکننده میکروگلیا و ضد درد) مشاهده کردند که بیان CXCR7 (گیرنده جفت‌شده با پروتئین G^{۱۹}) افزایش می‌یابد. افزایش بیان CXCR7 با تغییر نسبت فنوتیپ‌های آستروسیت همراه است و نسبت آستروسیت A2 به آستروسیت A1 افزایش می‌یابد. در این تحقیق متوجه شدند که CXCR7 با پروتئین اسید فیبریلاری گلیال کولوکالیزه^{۲۰} است. از طرفی بیان CXCR7 در شکنج‌دندانه‌ای در سلول‌هایی انجام می‌شود که بیان پروتئین اسید فیبریلاری گلیال صورت می‌گیرد [۲۳].



نمودار ۱- تأثیر زعفران بر خروج اوانس بلو در دمیلیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید. ***: تفاوت معنی‌دار با $p < 0.001$; *: تفاوت معنی‌دار با $p < 0.05$ در مقایسه با گروه شام. ###: تفاوت معنی‌دار با $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل درمان.

بحث

یکی از بیماری‌های دمیلینه سیستم عصبی مرکزی، مولتیپل اسکلروزیس است. در طول چند دهه گذشته، دانشمندان علوم اعصاب برای درک انواع مختلف دمیلینه شدن، مدل‌های حیوانی بسیاری را ارائه کرده‌اند. در مطالعه حاضر از اتیدیوم بروماید برای دمیلیناسیون استفاده شد. اتیدیوم بروماید یک سرکوب کننده RNA^{۱۶} و DNA^{۱۷} و سنتز پروتئین در سلول‌های پستانداران است. اتیدیوم بروماید خود را بین دو رشته DNA قرار می‌دهد و DNA را از بین می‌برد و منجر به مرگ سلول می‌شود. اولین علامت مولتیپل اسکلروزیس تخریب سد خونی-مغزی است [۲]. اختلال عملکرد سد خونی-مغزی همراه با افزایش نفوذ سلول‌های ایمنی به سیستم عصبی مرکزی یکی از مشخصه‌های اولیه پاتوژنز مولتیپل اسکلروزیس است و اختلال عملکرد سد خونی-مغزی که به‌عنوان ضایعه افزایش‌دهنده ردیاب‌های برون‌زاد مانند اوانس بلو شناسایی می‌شود، یکی از معیارهای تشخیصی مولتیپل اسکلروزیس است [۳].

نتایج رنگ‌آمیزی لوکسول فست‌بلو نشان داد که عصاره زعفران ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز به‌طور قابل توجهی

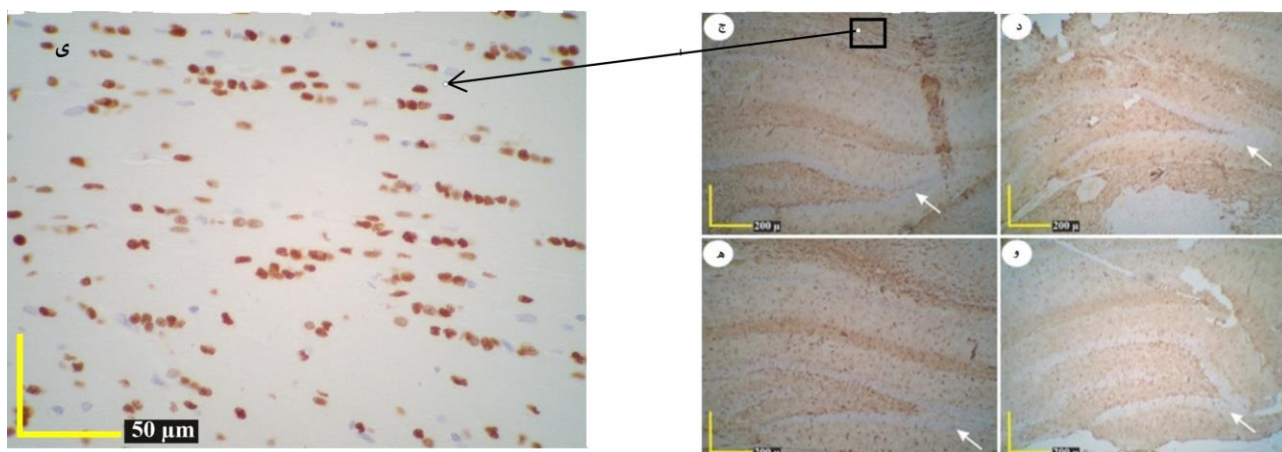
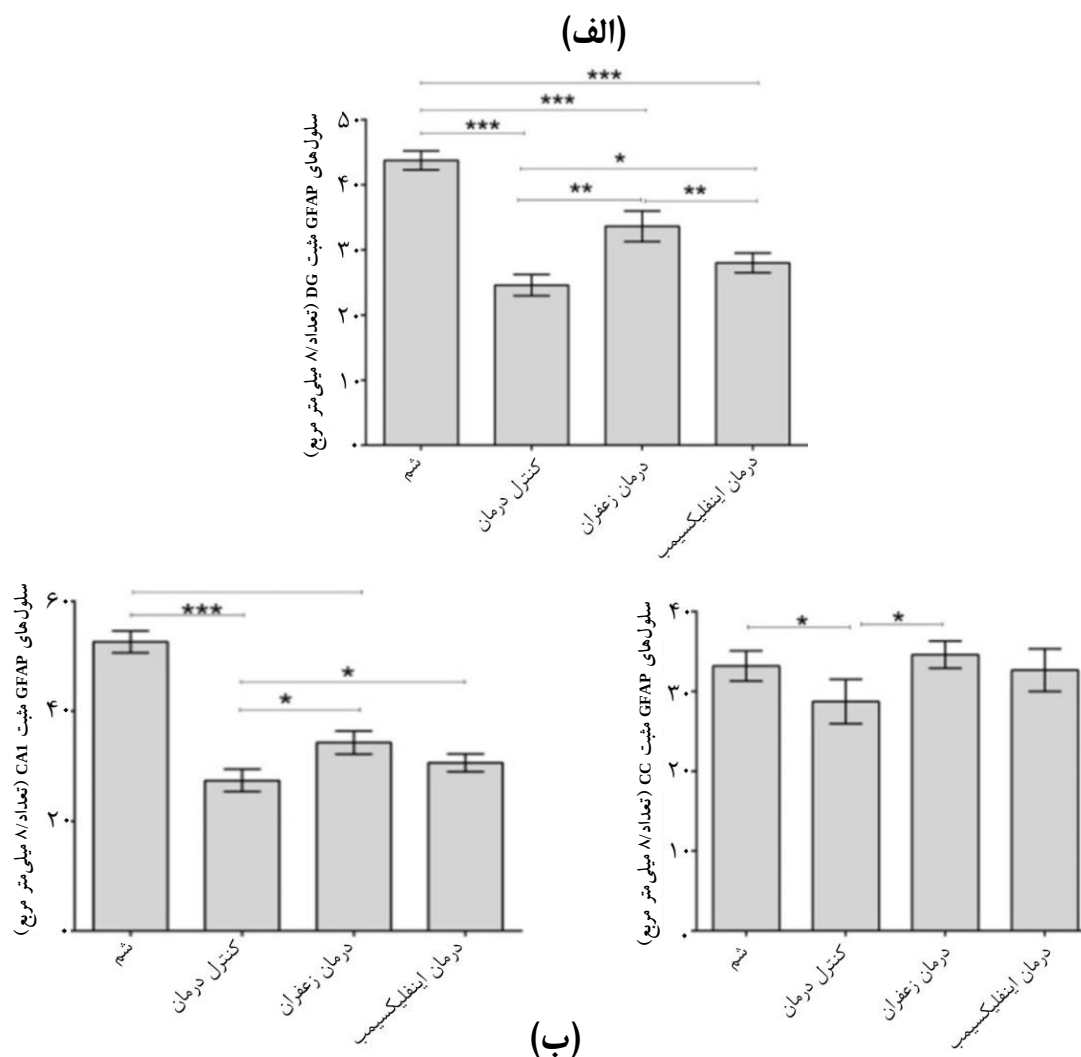
¹⁸ Minocycline

¹⁹ G-Protein coupled receptor

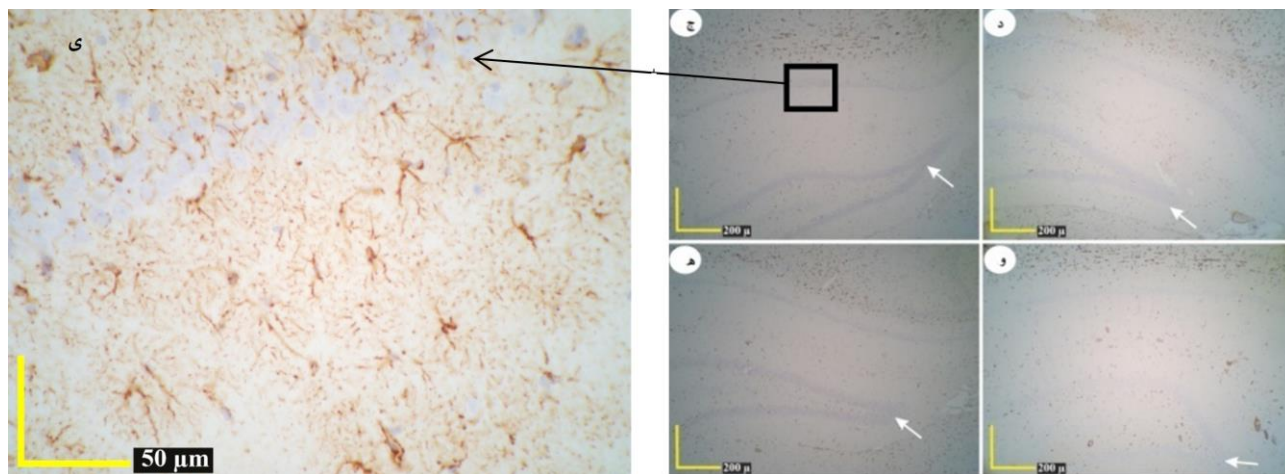
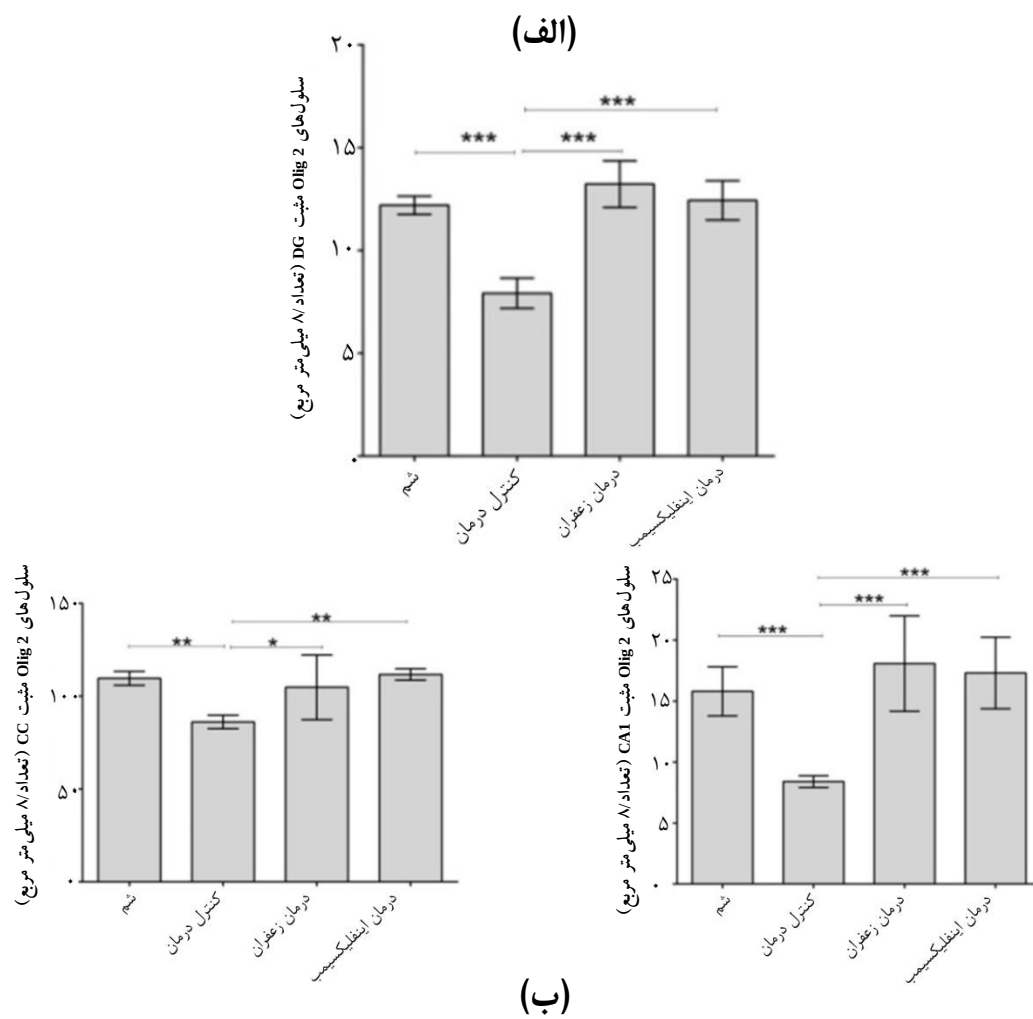
²⁰ Colocalized

¹⁶ Ribonucleic acid

¹⁷ Deoxyribonucleic acid



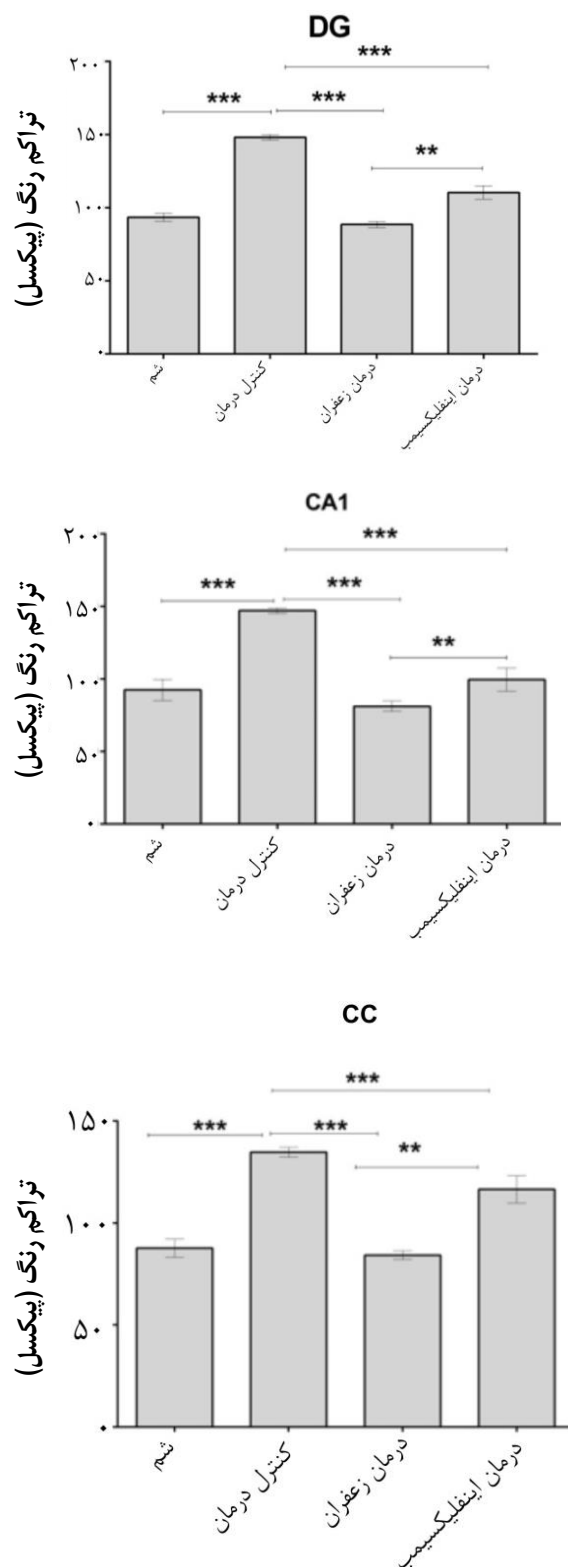
شکل ۲- تأثیر زعفران بر تعداد آستروسیت‌های پروتئین اسید گلیال فیبریلاری (GFAP) مثبت در موش‌های صحرایی دچار دمیانسین ناشی از اتیدیوم بروماید. (الف) در شکنج‌دندانه‌ای (DG)، CA1 و جسم پینه‌ای (CC) در دمیانسین ناشی از اتیدیوم بروماید. (ب) تصویر فتومیکروگرافی (ایمونوهیستوشیمی برای آنتی‌بادی پروتئین اسید گلیال فیبریلاری) تشکیل‌دهنده هیپوکامپ در چهار گروه: ج: شم، د: کنترل درمان، ه: درمان زعفران، و: درمان اینفلیکسیمب. (ج، د، ه، و) بزرگنمایی ۱۰ × ۱۰ (ی: بزرگنمایی ۴۰ × ۱۰ جسم پینه‌ای در گروه شم، فلش سفید نشان‌دهنده شکنج‌دندانه‌دار است. ***: تفاوت معنی‌دار با $p < 0.001$; **: تفاوت معنی‌دار با $p < 0.01$; *: تفاوت معنی‌دار با $p < 0.05$.



شکل ۳- تأثیر زعفران بر تعداد آستروسیت‌های فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ مثبت در موش‌های صحرایی دچار دمی‌لیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید. (الف) سلول‌های الیگودندروسیت فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ (Olig2) مثبت در شکنج دندان‌های (DG)، CA1 و جسم پینه‌ای (CC). (ب) فتومیکروگرام نمایش الیگودندروسیت فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ مثبت در تشکیلات هیپوکامپ در چهار گروه؛ ج: شم. د: کنترل درمان. ه: درمان زعفران. و: درمان اینفلیکسیمب. (ج، د، ه، و بزرگنمایی ۱۰ × ۱۰) ی: بزرگنمایی ۱۰ × ۴۰ CA1 در گروه شم. فلش سفید نشان‌دهنده شکنج دندان‌دار است. ***: تفاوت معنی‌دار با تفاوت معنی‌دار با $p < 0.001$ ** : تفاوت معنی‌دار با $p < 0.01$ * : تفاوت معنی‌دار با $p < 0.05$.

نتایج حاضر نشان می‌دهد که دمیلیناسیون منجر به کاهش آستروسیت‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت و الیگودندروسیت‌های فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ مثبت در شکنج‌دندانه‌ای، CA1 و جسم پینه‌ای می‌شود، علاوه بر این، توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال در آستروسیت‌ها و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ در الیگودندروسیت‌ها پس از دمیلینه‌شدن کاهش یافت. این کاهش در گروه درمان زعفران کمتر بود. با این وجود، همچنین تعداد و توزیع آستروسیت‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت و الیگودندروسیت‌های فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ مثبت در گروه‌های درمان زعفران و اینفلکسیمب کمتر از گروه شم بود، که بیانگر آن است که زعفران به‌طور صددرصد اثرات اتیدیوم بروماید را از بین نبرده است. در تحقیقی که از القاکننده شیمیایی دایمرشدن^{۲۱} جهت القا دمیلینه‌شدن در موش استفاده شده است، نتایج مشابه تحقیق حاضر بوده است. تزریق موضعی القا-کننده شیمیایی دایمرشدن منجر به القای انتخابی موضعی آپوپتوز آستروسیت پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت می‌شود. تزریق القاکننده شیمیایی دایمر شدن به خط وسط جسم پینه‌ای در موش‌های بالغ باعث آپوپتوز هدفمند سلول‌های پروتئین اسید فیبریلاری گلیال مثبت و همچنین کاهش تعداد سلول‌های فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ مثبت شد [۲۴].

نتایج حاضر نشان می‌دهد که ۲۸ روز بعد از دمیلیناسیون توسط تزریق اتیدیوم بروماید در جسم پینه‌ای، تعداد و توزیع پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و فاکتور رونویسی الیگودندروسیت ۲ به‌طور معنی‌داری در جسم پینه‌ای، CA1 و شکنج‌دندانه‌ای هیپوکامپ افزایش می‌یابد. آستروسیت‌ها با فرآیندهای ظاهراً طولانی‌تر به‌طور گسترده در سه ناحیه هیپوکامپ توزیع شده‌اند. هیپرتروفی و تکثیر آستروسیت‌ها و سایر سلول‌های گلیال مسئول ترمیم آسیب‌های مغزی هستند [۱۱]. تجویز عصاره زعفران ساختار بافت‌شناسی سه ناحیه اصلی هیپوکامپ مرتبط با بیان پروتئین اسید فیبریلاری گلیال را بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، محققان ثابت کردند که بیان خیلی زیاد پروتئین اسید فیبریلاری گلیال با پاسخ التهابی ارتباط تنگاتنگی دارد [۲۵].



نمودار ۲- تأثیر زعفران بر توزیع پروتئین اسید گلیال فیبریلاری در آستروسیت‌های نواحی شکنج‌دندانه‌ای، CA1 و جسم پینه‌ای. ***: تفاوت معنی‌دار با ۰/۰۰۱، $p < ۰/۰۱$: تفاوت معنی‌دار با ۰/۰۵، $p < ۰/۰۵$.

²¹ Chemical inducer of dimerization

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، تزریق اتیدیوم بروماید در شکنج دندانهای باعث دمیلینه شدن گردید. از طرفی عصاره زعفران با افزایش در یکپارچگی سد خونی- مغزی باعث افزایش بیان ژن پروتئین اسید فیبریلاری گلیال و در نتیجه افزایش تعداد سلولهای اولیگودندروسیت و رمیلینه شدن گردید.

سپاسگزاری

نویسندگان از کمکهای گروه فیزیولوژی دانشگاه شیراز در این مطالعه قدردانی می کنند.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه شیراز جهت انجام پایان نامه دکتری تخصصی خانم زهرا جاوید (INT1M1755-98) انجام شد.

تعارض در منافع

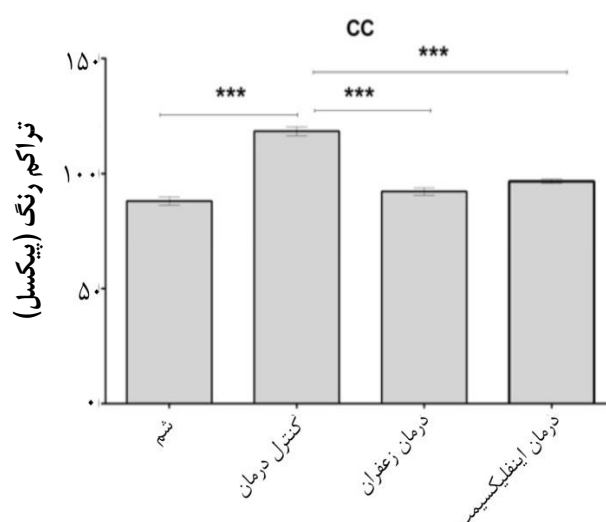
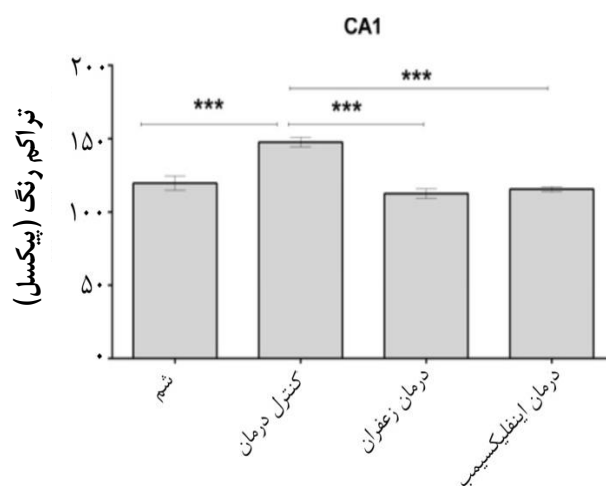
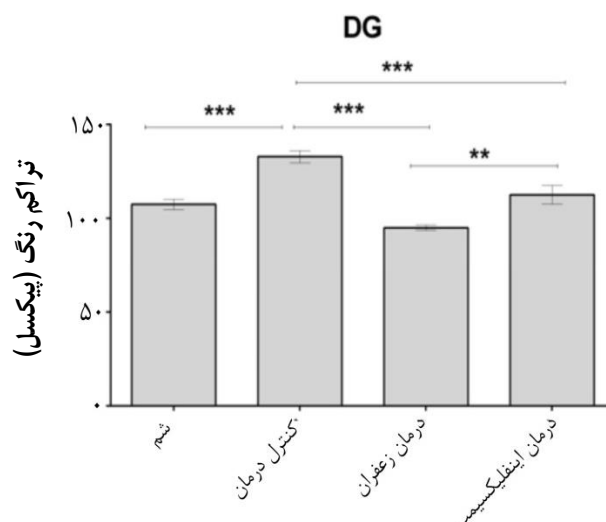
نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

زج: ایده، طراحی و اجرای مطالعه؛ م.ط.: ایده، طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛ نگارش مقاله؛ آنالیز آماری؛ ج.س.: ایده، طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛ ج.م.: انجام مطالعه؛ آنالیز آماری.

فهرست منابع

- [1] Harbo HF, Gold R, Tintore M, Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 6 (2013) 237-248.
- [2] Balasa R, Barcutean L, Mosora O, Manu D, Reviewing the significance of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis pathology and treatment. *Int J Mol Sci* 22 (2021).
- [3] Nishihara H, Perriot S, Gastfriend BD, Steinfert M, Cibien C, Soldati S, Matsuo K, Guimbal S, Mathias A, Palecek SP, Shusta EV, Pasquier RD, Engelhardt B, Intrinsic blood-brain barrier dysfunction contributes to multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* 145 (2022) 4334-4348.
- [4] Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M, Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 54 (2003) 70-75.



نمودار ۳- اثر زعفران بر توزیع فاکتور رونویسی لیگوندروسیت ۲ در لیگوندروسیت های شکنج دندانهای، CA1 و جسم پینه ای. **: تفاوت معنی دار با ۰/۰۱، $p < ۰/۰۱$; ***: تفاوت معنی دار با ۰/۰۰۱، $p < ۰/۰۰۱$.

- [5] Azari H, Ebrahimi S, Saeb S, Ghanbari A, Peyravian F, Mokarram P, The effect of saffron aquatic extract and crocin on the differentiation of neural stem cells into oligodendrocyte precursor cells. *Shiraz E-Medical Journal* 19 (2018).
- [6] Pantazou V, Roux T, Oliveira Moreira V, Lubetzki C, Desmazieres A, Interaction between neurons and the oligodendroglial lineage in multiple sclerosis and its preclinical models. *Life (Basel)* 11 (2021).
- [7] Abdelhak A, Huss A, Kassubek J, Tumani H, Otto M, Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis. *Sci Rep* 8 (2018) 14798.
- [8] Sofroniew MV, Vinters HV, Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119 (2010) 7-35.
- [9] Kaltsonoudis E, Voulgari PV, Konitsiotis S, Drosos AA, Demyelination and other neurological adverse events after anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev* 13 (2014) 54-58.
- [10] Abdallah ANE, Shamaa A, Tookhy EI, Ethidium bromide induced spinal cord demyelination in a dog a model of multiple sclerosis. *Biosci Res* 15 (2018) 2260-2271.
- [11] Li DR, Ishikawa T, Zhao D, Michiue T, Quan L, Zhu BL, Maeda H, Histopathological changes of the hippocampus neurons in brain injury. *Histol Histopathol* 24 (2009) 1113-1120.
- [12] Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tiraihi T, Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol* 30 (2010) 289-299.
- [13] Ghaffari S, Hatami H, Dehghan G, Saffron ethanolic extract attenuates oxidative stress, spatial learning, and memory impairments induced by local injection of ethidium bromide. *Res Pharm Sci* 10 (2015) 222-232.
- [14] Skladnev NV, Johnstone DM, Neuroprotective properties of dietary saffron: more than just a chemical scavenger? *Neural Regen Res* 12 (2017) 210-211.
- [15] Omidkhoda SF, Hosseinzadeh H, Saffron and its active ingredients against human disorders: A literature review on existing clinical evidence. *Iran J Basic Med Sci* 25 (2022) 913-933.
- [16] Farjah GH, Salehi S, Ansari MH, Pourheidar B, Protective effect of *Crocus sativus* L. (Saffron) extract on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci* 20 (2017) 334-337.
- [17] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press publications, 2007.
- [18] Sarshoori JR, Asadi MH, Mohammadi MT, Neuroprotective effects of crocin on the histopathological alterations following brain ischemia-reperfusion injury in rat. *Iran J Basic Med Sci* 17 (2014) 895-902.
- [19] Fathimoghadam H, Farbod Y, Ghadiri A, Fatemi R, Moderating effects of crocin on some stress oxidative markers in rat brain following demyelination with ethidium bromide. *Heliyon* 5 (2019) e01213.
- [20] Zhang X, Fan Z, Jin T, Crocin protects against cerebral- ischemia-induced damage in aged rats through maintaining the integrity of blood-brain barrier. *Restor Neurol Neurosci* 35 (2017) 65-75.
- [21] Batarseh YS, Bharate SS, Kumar V, Kumar A, Vishwakarma RA, Bharate SB, Kaddoumi A, *Crocus sativus* extract tightens the blood-brain barrier, reduces amyloid beta load and related toxicity in 5XFAD mice. *ACS Chem Neurosci* 8 (2017) 1756-1766.
- [22] Nash B, Thomson CE, Linington C, Arthur AT, McClure JD, McBride MW, Barnett SC, Functional
- [23] Li T, Liu T, Chen X, Li L, Feng M, Zhang Y, Wan L, Zhang C, Yao W, Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes via the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain. *J Neuroinflammation* 17 (2020) 211.
- [24] Tognatta R, Karl MT, Fyffe-Maricich SL, Popratiloff A, Garrison ED, Schenck JK, Abu-Rub M, Miller RH, Astrocytes are required for oligodendrocyte survival and maintenance of myelin compaction and integrity. *Front Cell Neurosci* 14 (2020) 74.
- [25] Trenova AG, Slavov GS, Manova MG, Draganaova-Filipova MN, Mateva NG, Miteva LD, Stanilova SA, Alterations in serum levels of IL-17 in contrast to TNF-alpha correspond to disease-modifying treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 77 (2017) 283-288.

Research paper

Effects of saffron hydro-alcoholic extract on the hippocampal oligodendrocyte transcription factor 2 and glial fibrillary acidic protein distribution in female demyelinated rats

Zahra Javid, Mahnaz Taherianfard*, Javad Sajedianfard, Hamid Reza Moradi

Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: 30 May 2023

Accepted: 11 July 2023

Abstract

Background and aim: Demyelinating diseases are autoimmune disorders of the nervous system. The present study aims to effect of the hydro-alcoholic extract of saffron on blood brain-barrier destruction, Glial fibrillary acidic protein, and Oligodendrocyte transcription factor 2 distribution in astrocyte and oligodendroglia cells and the number of mentioned cells.

Methods: Forty female Sprague Dawley adult rats in four groups, Sham, treatment control, saffron treatment, and infliximab treatment were used. Demyelination was induced by 3 µl of 0.01% ethidium bromide injection in the dentate gyrus. Immunohistochemistry was used, for the distribution of Glial fibrillary acidic protein and Oligodendrocyte transcription factor 2 determination. The Image Analyzer software have evaluated the distribution of Glial fibrillary acidic protein and Oligodendrocyte transcription factor 2. Demyelination was determined by Luxol fast blue staining and image-j software. The ELISA method and Evans blue extravasation measurement have investigated the extent of blood brain-barrier disruption.

Results: Blood brain-barrier disruption was meaningfully ($p < 0.05$) more in the treatment control compared to the other groups. The distribution of Glial fibrillary acidic protein and Oligodendrocyte transcription factor 2 and the number of both cells were considerably ($p < 0.001$) lower in the treatment control relative to the other groups. Glial fibrillary acidic protein and Oligodendrocyte transcription factor 2 remarkably ($p < 0.05$) were lesser in the treatment control compared to the other groups.

Conclusion: The hydro-alcoholic extract of saffron ameliorates blood brain-barrier destruction, improved Glial fibrillary acidic protein, and Oligodendrocyte transcription factor 2 distribution and number of astrocyte and oligodendroglia cells.

Keywords: Glial fibrillary acidic protein, Demyelination, Blood Brain Barrier, Oligodendrocyte transcription factor

Please cite this article as follows:

Javid Z, Taherianfard M, Sajedianfard J, Moradi HR, Effects of saffron hydro-alcoholic extract on the hippocampal oligodendrocyte transcription factor 2 and glial fibrillary acidic protein distribution in female demyelinated rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 7 (2023) 19-31.

*Corresponding authors: taherian@shirazu.ac.ir (ORCID: 0000-0002-8819-1619)