

Protective Effects of Wheat Sprout on Acrylamide Toxicity in the Hippocampus Structure and Spatial Learning and Memory of Rat

Hamid Reza Moradi*, Mahnaz Taherianfard, Mohsen Rashidi, Zahra Javid, Sayed Amir Hessami

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

Article Info:

Received: 18 Apr 2023

Revised: 8 June 2023

Accepted: 12 June 2023

ABSTRACT

Introduction: Main resources of acrylamide include tobacco smoking and fried foods with high temperatures as well as laboratory and occupational exposures. Acrylamide can cause carcinogenicity and neurotoxicity in animals and humans. Wheat sprout is an accessible herbal plant and contains a notable level of strong antioxidants and a high absorption rate. Therefore, the aim of the present study included investigating the protective effects of hydro alcoholic extract of wheat sprout against acrylamide toxicity in the hippocampal structure and spatial memory and learning of rats. **Materials and Methods:** 16 healthy adult rats were divided equally into 4 groups: control group (1 ml of distilled water), acrylamide group (50 mg/kg), wheat sprout group (200 mg/kg), and the treatment group receiving wheat sprout (200 mg/kg), and acrylamide (50 mg/kg). After 21 days, the Morris water maze test was done to study learning and spatial memory, and then blood and brain tissue samples were collected for serum biochemical and histological assessments, respectively. **Results:** After the second day, along with the training and learning process, the groups receiving acrylamide spent a longer duration finding the Morris platform compared to the control and wheat sprout groups. The histological structure showed a remarkable improvement in groups receiving wheat sprouts compared to the acrylamide group. **Conclusion:** The results of the present study show that wheat sprouts can play a protective role against the negative effects of acrylamide in the histological structure as well as spatial memory and learning of the rats.

Keywords:

1. Acrylamide
2. Oxidative Stress
3. Spatial Memory
4. Rats

*Corresponding Author: Hamid Reza Moradi

Email: hr.moradi@shirazu.ac.ir

اثرات محافظتی جوانه گندم بر روی سمیت آکريل آميد در ساختار هيپوکامپ و يادگيري و حافظه فضايي موش صحرایی

حمید رضا مرادی^{*}، مهناز طاهریان فرد، محسن رشیدی، زهرا جاوید، سید امیر حسامی

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

اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۲۲ خرداد ۱۴۰۲

اصلاحیه: ۱۸ خرداد ۱۴۰۲

دریافت: ۲۹ فروردین ۱۴۰۲

چکیده

مقدمه: منابع اصلی آکريل آميد شامل دود سيگار، غذاهای سرخ شده با درجه حرارت بالا و نیز مواجهه آزمایشگاهی و شغلی است. آکريل آميد می تواند موجب سرطان زایی و سمیت عصبی در حیوانات و انسان شود. جوانه گندم به عنوان یک گیاه داروئی قابل دسترس دارای سطح آنتی اکسیدانی قوی با نسبت جذب بالا می باشد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی نقش محافظتی عصاره هیدروالکلی جوانه گندم در مقابل سمیت آکريل آميد در ساختار هيپوکامپ و يادگيري و حافظه فضايي موش صحرایی بود. **مواد و روش ها:** ۱۶ سر موش صحرایی بالغ و سالم در ۴ گروه به صورت برابر تقسیم شدند. گروه کنترل (۱ میلی لیتر آب مقطر)، گروه آکريل آميد ۵۰ (میلی گرم/کیلوگرم)، گروه جوانه گندم ۲۰۰ (میلی گرم/کیلوگرم)، و گروه درمان دریافت کننده جوانه گندم (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) و آکريل آميد (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم). بعد از ۲۱ روز، روش ماز آبی موریس برای مطالعه يادگيري و حافظه فضايي انجام شد، سپس نمونه های خون و بافت مغز به ترتیب برای بررسی های بیوشیمی سرم و بافت شناسی جمع آوری شدند. **یافته ها:** بعد از روز دوم با ادامه روند آموزش و به یادآوری، گروه های دریافت کننده آکريل آميد با مدت زمان تأخیر بالاتری در مقایسه با گروه های کنترل و جوانه گندم به سکوی موریس رسیدند. ساختار بافت شناسی بهبود معنی داری را در گروه های دریافت کننده جوانه گندم در مقایسه با گروه آکريل آميد نشان داد. **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که جوانه گندم می تواند نقش محافظتی را در مقابل اثرات منفی آکريل آميد در ساختار بافت شناسی و نیز حافظه فضايي و يادگيري موش ها ایفا کند.

واژه های کلیدی:

- ۱- آکريل آميد
- ۲- استرس اکسیداتیو
- ۳- حافظه فضايي
- ۴- موش صحرایی

*نویسنده مسئول: حمید رضا مرادی

پست الکترونیک: hr.moradi@shirazu.ac.ir

مقدمه

آکریل آمید (ACM)^۱ در مواد غذایی از جمله غذاهای نشاسته‌ای که با حرارت زیاد تهیه می‌شوند مثل سیب زمینی سرخ کرده، چیپس و نان وجود دارد (۱). آکریل آمید به راحتی از طریق گوارش جذب و وارد گردش خون می‌شود. آکریل آمید به علت وزن مولکولی پایین و حلالیت بالا، به آسانی از غشاهای بیولوژیک عبور می‌کند و در بافت‌های مختلف موجب اثرات توکسیک می‌شود (۲). استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های مطرح برای اثرات آکریل آمید است که موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)^۲ و منجر به پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (۳، ۴). آکریل آمید در حیوانات آزمایشگاهی و انسان موجب سمیت سیستم عصبی و سرطان‌زایی می‌شود (۳، ۵، ۶). همچنین، این ماده موجب آسیب به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک و سروتونرژیک و نیز موجب سرکوب نورون‌زایی در ساختار هیپوکامپ می‌شود (۳، ۷). تشنج، عدم تعادل، لرزش عضلانی و کاهش فعالیت اندام‌های عصبی - عضلانی از مهمترین تظاهرات بالینی ایجاد شده توسط آکریل آمید می‌باشد (۶، ۸).

جوانه گندم یکی از گیاهان دارویی قوی با ترکیبات بسیار مفید است که در تغذیه و فرهنگ ایرانی از دیرباز استفاده شده است. سنتز فنول‌ها، ویتامین‌ها و دیگر آنتی اکسیدان‌ها از طریق جوانه زدن دانه رخ می‌دهد و قابلیت جذب بالا دارند (۹، ۱۰). در مطالعات مختلف، اثرات سودمند با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی جوانه گندم در مقابل مواد توکسیک از قبیل فلزات سنگین گزارش شده است (۹-۱۳). این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات محافظتی جوانه گندم بر روی سمیت آکریل آمید در ساختار بافت شناسی هیپوکامپ، یادگیری و حافظه فضایی موش صحرایی صورت می‌پذیرد.

مواد و روش‌ها

آماده کردن موش‌ها و طرح مطالعه

۱۶ سر موش صحرایی نر بالغ و به ظاهر سالم با میانگین وزنی 20 ± 20 گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شدند. موش‌ها به مدت یک هفته به‌منظور سازش با شرایط محیطی نگهداری شدند. قبل از شروع آزمایش، موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. در هر گروه ۴ سر موش صحرایی که در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آب و غذای مورد نیاز موش‌ها به صورت آزاد در دسترس قرار داده شد. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در مطالعه حاضر طبق دستورالعمل اصول و موازین اخلاقی در پژوهش‌های علوم زیستی دانشگاه

شیراز در تمام مراحل تحقیق رعایت گردید. دوز عصاره جوانه گندم، آکریل آمید و طول ۲۱ روز دوره مطالعه بر اساس مطالعات پیشین تعیین شدند (۹، ۱۳، ۱۴). در مطالعه حاضر، عصاره هیدروالکلی از جوانه گندم با روش حجمی یا خیساندن در بخش فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز تهیه شد. روش خیساندن در تهیه عصاره هیدروالکلی یک روش رایج است که در مطالعات گذشته آمده است (۱۳). وزن تمامی موش‌های صحرایی قبل از شروع مطالعه به‌منظور تعیین دوز داروها با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و ثبت شدند. برای تعیین دوز جدید داروها به فاصله هر ۷ روز یکبار موش‌ها توزین شدند. گروه‌بندی موش‌ها در مطالعه حاضر به شرح زیر انجام شد:

- ۱- گروه کنترل سالم: روزانه ۱ میلی‌لیتر آب مقطر توسط گاواژ دریافت کردند.
- ۲- گروه آکریل آمید: روزانه ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن آکریل آمید محلول در آب مقطر توسط گاواژ همزمان با عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کردند.
- ۳- گروه آکریل آمید+عصاره جوانه گندم: روزانه ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن آکریل آمید محلول در آب مقطر توسط گاواژ همزمان با عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کردند.
- ۴- گروه عصاره جوانه گندم: عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کردند.

ارزیابی حافظه فضایی و یادگیری موش‌ها

پس از گذشت ۲۱ روز از مطالعه، ارزیابی حافظه فضایی و یادگیری موش‌ها با استفاده از روش استاندارد ماز آبی موریس^۳ صورت گرفت (۱۵، ۱۶). ماز آبی مورد استفاده در این مطالعه یک حوضچه استوانه‌ای به قطر ۱۵۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر، با سطح داخلی تیره رنگ بود که به چهار ربع تقسیم شده و هر ربع به وسیله یک علامت فضایی ثابت (مربع، مثلث، دایره، لوزی) مشخص گردیده بود. این حوضچه به وسیله آب تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر پر شد و در یک اتاق تاریک قرار داشت. سکوی تیره رنگی با قطر ۱۰ سانتی‌متر در مرکز یکی از ربع‌ها قرار داشت. در بالای مرکز حوضچه یک دوربین متصل به رایانه وجود داشت و نرم افزار ویدیو تراکینگ داده‌های دوربین را ثبت کرد. ماز آبی موریس ۳ مرحله دارد که به ترتیب زیر انجام گردید:

مرحله سکوی آشکار^۴: در این مرحله سکوی ۵ سانتی‌متر بالاتر از سطح آب و در معرض دید موش‌های صحرایی قرار گرفت و میله‌ای پرچم مانند نیز به سکوی متصل گردید. آموزش در ۳ روز متوالی و هر روز یک نوبت که

^۱ Acrylamide^۲ Reactive Oxygen Species^۳ Morris Water Maze^۴ Visible Platform

بعد از گذشت ۱۲۰ ثانیه، حیوان برای تجربه بعدی از ربع دیگر سکو (به صورت تصادفی) رها می‌گشت. در مرحله بازخوانی پارامتر سرعت رسیدن به ربع هدف و عملکرد شناختی مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی بافت شناسی

به منظور مطالعه بافت شناسی، نمونه‌های مغز بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. بعد از فیکس کامل نمونه‌ها، به روش استاندارد تهیه مقاطع بافتی عمل گردید. در این روش با استفاده از دستگاه هیستوکینت مراحل مختلف پاساژ بافتی شامل آگیری، شفاف‌سازی و آغشتگی به پارافین انجام گرفت. سپس نمونه‌ها قالب‌گیری شده و با استفاده از میکروتوم دورانی برش‌هایی با ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه و با روش‌های هماتوکسیلین-ئوزین (H&E)^۵ و لوکسال فست بلو^۶ رنگ‌آمیزی شدند. روش رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو به منظور تمایز بهتر سلول‌ها در شمارش تعداد آنها بکار گرفته شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری ساختار بافت‌شناسی هیپوکامپ و مقایسه آن در گروه‌های مختلف مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. ساختار بافت شناسی هیپوکامپ شامل ضخامت لایه‌های گرانولار مولکولار ناحیه CA1، ضخامت لایه‌های مولکولار و گرانولار ناحیه شکنج دنداندار و نیز شمارش تعداد نورون‌های پیرامیدال در مقیاس ثابت بافت هیپوکامپ مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعات هیستومتری از لنز دیجیتال Dino-lite و نرم افزار Dino Capture 2 استفاده شد. برای شمارش و اندازه‌گیری هر یک از مشخصه‌های مورد مطالعه، حداقل ۲۰ میدان دید به صورت تصادفی از ۲ مقطع بافتی هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها برای هر مشخصه محاسبه گردید.

ارزیابی مالون دی‌آلدهید در بافت مغز

مالون دی‌آلدهید (MDA)^۷ یکی از رایج‌ترین محصولات جانبی پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد که در میان محققین از پذیرفته شده‌ترین نشانگرها جهت سنجش میزان آسیب یا استرس اکسیداتیو می‌باشد. در مطالعه حاضر، ارزیابی غلظت مالون دی‌آلدهید توسط دستورالعمل کیت اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید شرکت کیازیت، ایران در نمونه‌های مغز هموژنایز شده انجام شد.

آنالیز آماری

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ۷.18 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SE}$ ارائه شدند. برای مقایسه میانگین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه از آزمون ANOVA و پس‌آزمون Tukey استفاده شد. در مواردی که $P \geq 0.05$ بود اختلاف بین گروه‌های مطالعه معنی‌دار تلقی شد.

هر نوبت شامل ۴ تجربه می‌باشد، انجام شد و هر روز جای سکو تغییر داده می‌شد. در این مرحله موش‌های صحرایی به طور تصادفی از ربع‌های مختلف حوضچه تحت آزمایش قرار گرفتند. در هر تجربه در حالی که صورت حیوان به طرف دیواره حوضچه قرار داشت در یکی از قسمت‌های چهارگانه ماز رها می‌شد. همزمان با رهاسازی حیوان درون آب، دکمه شروع برنامه فشار داده می‌شد و برنامه شروع به ثبت حرکات حیوان درون ماز می‌کرد. زمانی یک تجربه به اتمام می‌رسید که موش صحرایی بر روی سکو رفته یا ۹۰ ثانیه گذشته باشد. پس از پیدا کردن سکو به موش صحرایی اجازه داده می‌شد که به مدت ۶۰ ثانیه بر روی آن باقی بماند و با دیدن علائم موجود بر روی دیواره‌های حوضچه، موقعیت اطراف خود را شناسایی کند. در صورتی که موش قادر به پیدا کردن سکو در مدت ۹۰ ثانیه نمی‌شد، حیوان با دست به طرف سکو هدایت می‌شد و ۶۰ ثانیه برای موقعیت‌یابی زمان داده می‌شد. بعد از گذشت این زمان حیوان از روی سکو برداشته و پس از خشک شدن، به قفس بازگردانده می‌شد و بعد از گذشت ۱۲۰ ثانیه، حیوان برای تجربه بعدی از ربع دیگر سکو (به صورت تصادفی) رها می‌گشت.

مرحله سکوی پنهان^۵: سکو در این مرحله ۵ سانتی‌متر زیر سطح آب و پنهان از دید موش صحرایی قرار گرفت. آموزش در ۳ روز متوالی و هر روز یک نوبت که هر نوبت شامل ۴ تجربه بود، انجام شد. هر روز جای سکو تغییر داده می‌شد. در این مرحله موش‌های صحرایی به طور تصادفی از ربع‌های مختلف حوضچه تحت آزمایش قرار گرفتند. در هر تجربه در حالی که صورت حیوان به طرف دیواره حوضچه قرار داشت در یکی از قسمت‌های چهارگانه ماز رها می‌شد. زمانی یک تجربه به اتمام می‌رسید که موش بر روی سکو رفته یا ۶۰ ثانیه گذشته باشد. پس از پیدا کردن سکو به موش اجازه داده می‌شد که به مدت ۳۰ ثانیه بر روی آن باقی بماند و با دیدن علائم موجود بر روی دیواره‌های حوضچه موقعیت اطراف خود را شناسایی کند. بعد از گذشت این زمان، حیوان از روی سکو برداشته و پس از خشک نمودن، به قفس بازگردانده می‌شد و سپس بعد از گذشت ۱۲۰ ثانیه، حیوان برای تجربه بعدی از ربع دیگر سکو (به صورت تصادفی) رها می‌گشت.

مرحله تست پروب^۶: ۲۴ ساعت پس از پایان مرحله قبل، مرحله تست پروب انجام گردید که برای هر موش یکبار صورت گرفت. برای انجام آزمایش در ابتدا سکو از درون حوضچه برداشته و موش به درون ماز رها شد. در این مرحله ۶۰ ثانیه به حیوان زمان داده شد و پس از پایان این مدت موش از درون استخر برداشته و پس از خشک نمودن، به قفس بازگردانده می‌شد.

^۵ Hidden Platform

^۶ Probe Test

^۷ Hematoxylin and Eosin

^۸ Luxol Fast Blue

^۹ Malondialdehyde

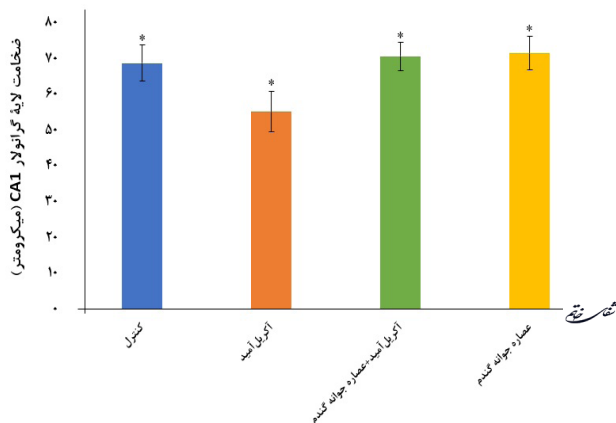
یافته‌ها

نتایج بافت شناسی

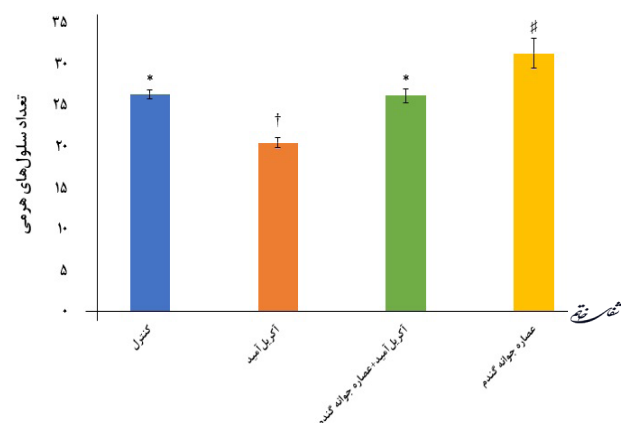
همان‌طور که در نتایج میکرومتری مربوط به شمارش تعداد نورون‌های پیرامیدال در مقیاس ثابت بافت هیپوکامپ در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد گروه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم با تعداد میانگین $20/40 \pm 0/62$ در مقایسه با گروه کنترل سالم با تعداد میانگین $26/32 \pm 0/54$ کاهش نشان داد که از لحاظ آماری این کاهش معنی‌دار بود ($P < 0/05$). گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم به‌صورت روزانه با تعداد میانگین $31/22 \pm 1/8$ دارای بیشترین تعداد نورون‌های پیرامیدال در مقیاس ثابت بافت هیپوکامپ مشاهده شد. از لحاظ آماری، این افزایش تعداد نورون‌های پیرامیدال در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه معنی‌دار دیده شد ($P < 0/05$). همچنین، تعداد نورون‌های پیرامیدال در گروه دریافت کننده جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم به‌همراه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم به‌صورت روزانه با تعداد میانگین $26/09 \pm 0/89$ دیده شد که در مقایسه با گروه آکریل آمید اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$) (نمودار ۱؛ تصویر ۱ و ۲).

در نتایج میکرومتری مربوط به ضخامت لایه گرانولار بافت هیپوکامپ در گروه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم ($55/03 \pm 5/6$ میکرومتر) در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه کاهش دیده شد، اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. گروه کنترل سالم با میانگین ضخامت $68/67 \pm 5$ میکرومتر، گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم با میانگین ضخامت $71/39 \pm 4/7$ میکرومتر و گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم به‌همراه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم با میانگین ضخامت $70/54 \pm 3/9$ میکرومتر دیده شدند (تصویر ۲؛ نمودار ۲).

در نتایج میکرومتری مربوط به ضخامت لایه مولکولار بافت هیپوکامپ در گروه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم ($80/18 \pm 1/2$ میکرومتر) در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه کاهش دیده شد، اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. گروه کنترل سالم با میانگین ضخامت $84/26 \pm 6/7$ میکرومتر، گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم با میانگین ضخامت $98/23 \pm 8/23$ میکرومتر و گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم

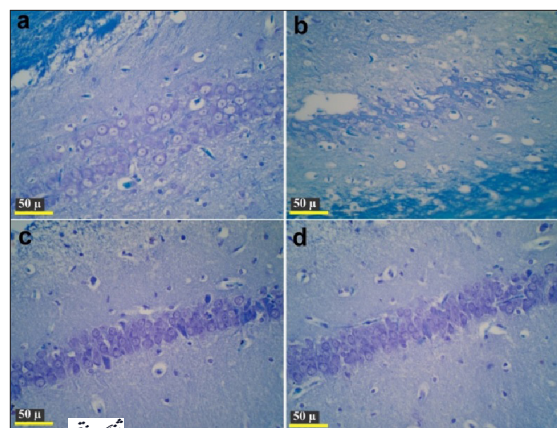


نمودار ۲- Mean $\pm$ SE و ضخامت لایه گرانولار در ناحیه CA1 بافت هیپوکامپ. تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین گروه‌های مطالعه مشاهده نشدند.

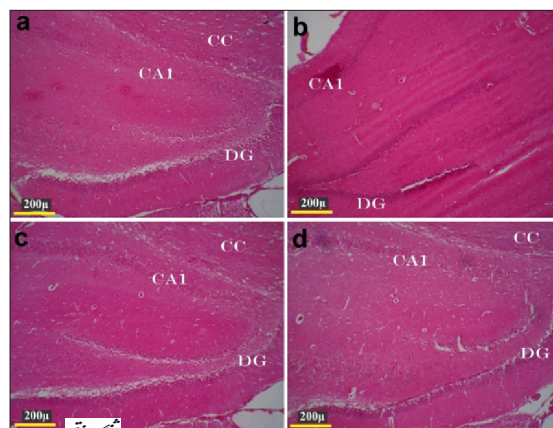


نمودار ۱- Mean $\pm$ SE و تعداد نورون‌های هرمی (پیرامیدال) در مقیاس ثابت بافت هیپوکامپ. وجود علامت متفاوت (#) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مطالعه می‌باشد ($P < 0/05$).

تصویر ۲- سلول‌های هرمی (پیرامیدال) لایه گرانولار ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف مطالعه (رنگ آمیزی لوکسال فست بلو). نورون‌های پیرامیدال هیپوکامپ با سیتوپلاسم اندک و زوائد سلولی مثلثی شکل قابل مشاهده هستند. این سلول‌ها با هسته گرد مرکزی و حالت کاملاً یوکرمانتین و هسته مشخص دیده شدند. همان‌طور که قابل مشاهده است تعداد و تراکم نورون‌های پیرامیدال در گروه آکریل آمید (b) در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه کاهش نشان می‌دهد. a: گروه کنترل سالم، c: گروه آکریل آمید+عصاره جوانه گندم و d: گروه عصاره جوانه گندم.



تصویر ۱- ساختار بافتی هیپوکامپ موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف مطالعه (رنگ آمیزی H&E). موقعیت ناحیه CA1 هیپوکامپ نسبت به ناحیه شکنج دنداندار (DG) در گروه‌های مختلف مطالعه قابل مشاهده است. CC نشان دهنده ناحیه جسم پینه‌ای می‌باشد. لایه‌های گرانولار و مولکولار در هر دو ناحیه CA1 و DG با تراکم سلولی آنها قابل مشاهده و تفکیک است. a: گروه کنترل سالم، b: گروه آکریل آمید، c: گروه آکریل آمید+عصاره جوانه گندم و d: گروه عصاره جوانه گندم.



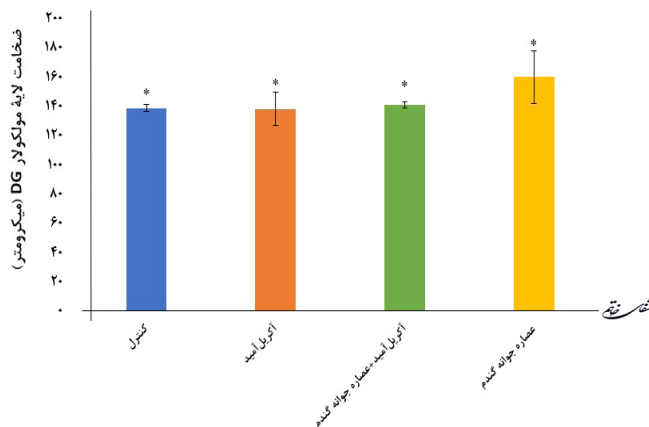
شکنج دنداندار بافت هیپوکامپ در گروه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم ($42/54 \pm 0/56$ میکرومتر) در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش نشان داد. از لحاظ آماری این کاهش در مقایسه با گروه‌های عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم ($54/21 \pm 1/05$ میکرومتر) و عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم به همراه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم ($53/66 \pm 3/44$ میکرومتر) معنی‌دار دیده شدند ($P < 0/05$). گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم و نیز گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم به همراه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل سالم با میانگین ضخامت $48/94 \pm 1/44$ میکرومتر افزایش نشان دادند که از لحاظ آماری این تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند (نمودار ۵).

نتایج حافظه فضایی و یادگیری موش‌ها

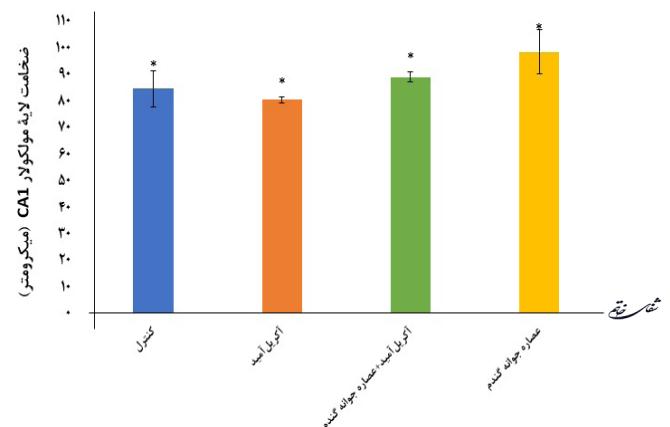
با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم به همراه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم با میانگین ضخامت $88/7 \pm 1/8$ میکرومتر دیده شدند (تصویر ۲؛ نمودار ۳).

در نتایج میکرومتری مربوط به ضخامت لایه مولکولار شکنج دنداندار بافت هیپوکامپ در گروه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم ($137/77 \pm 11/27$ میکرومتر) در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه کاهش دیده شد، اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. گروه کنترل سالم با میانگین ضخامت $138/28 \pm 2/41$ میکرومتر، گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم با میانگین ضخامت $159/66 \pm 17/98$ میکرومتر و گروه دریافت کننده عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم به همراه آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم با میانگین ضخامت $140/45 \pm 2/15$ میکرومتر دیده شدند (تصویر ۲؛ نمودار ۴).

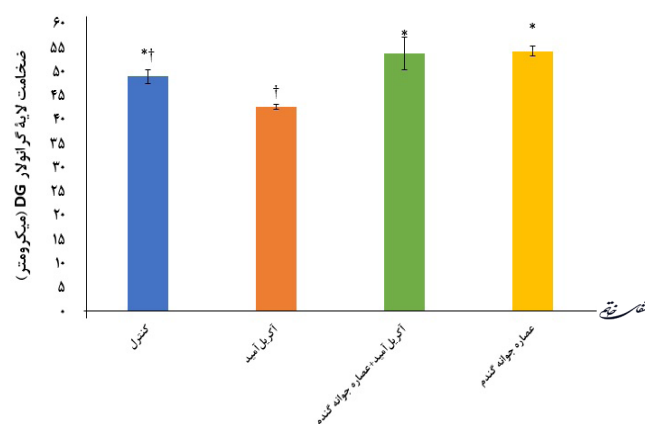
در نتایج میکرومتری مربوط به ضخامت لایه گرانولار



نمودار ۴- Mean±SE و ضخامت لایه مولکولار در ناحیه شکنج دنداندار (DG) بافت هیپوکامپ. تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین گروه‌های مطالعه مشاهده نشدند.



نمودار ۳- Mean±SE و ضخامت لایه مولکولار در ناحیه CA1 بافت هیپوکامپ. تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین گروه‌های مطالعه مشاهده نشدند.



نمودار ۵- Mean±SE و ضخامت لایه گرانولار در ناحیه شکنج دنداندار (DG) بافت هیپوکامپ. وجود علامت متفاوت (*†) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مطالعه می‌باشد ($P < 0/05$).

نتایج غلظت MDA در بافت مغز

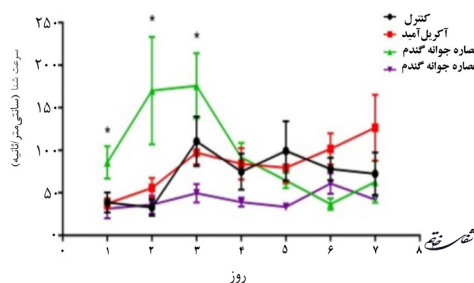
همان‌طور که در نتایج ارزیابی غلظت MDA در بافت مغز در نمودار ۸ مشاهده می‌گردد گروه آکريل آميد با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($16/83 \pm 0/45$ نانومول/میلی‌گرم) در مقایسه با گروه کنترل سالم ($12/1 \pm 0/47$ نانومول/میلی‌گرم) افزایش معنی‌دار بود ($P < 0/05$). گروه دریافت‌کننده عصارهٔ جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت روزانه با ($9/13 \pm 0/6$ نانومول/میلی‌گرم) دارای کمترین غلظت MDA در بافت مغز مشاهده شد. از لحاظ آماری این کاهش غلظت MDA در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه معنی‌دار دیده شد ($P < 0/05$). همچنین، غلظت MDA در گروه دریافت‌کنندهٔ جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌همراه آکريل آميد با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت روزانه ($14/16 \pm 0/13$ نانومول/میلی‌گرم) دیده شد که در مقایسه با گروه آکريل آميد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$) (نمودار ۸).

بحث و نتیجه‌گیری

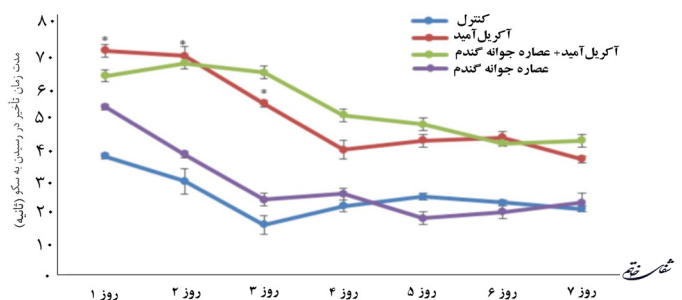
مطالعه حاضر اولین مطالعه تجربی است که به ارزیابی

همان‌طور که در نتایج حاصل از تغییرات مدت زمان تأخیر در رسیدن به سکو برحسب روز مورد آزمایش در ماز آبی موریس در نمودار ۶ مشاهده می‌شود در روز اول اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نمی‌شود ولی از روز دوم به بعد با ادامهٔ پروسه آموزش و به یادآوری گروه آکريل آميد با گروه کنترل و عصاره جوانه گندم اختلاف معنی‌دار نشان داد. این اختلاف معنی‌دار تا روزهای ۲ و ۳ نسبت به گروه آکريل آميد ادامه داشت ($P < 0/05$). تغییرات مدت زمان تأخیر در رسیدن به سکو در روزهای ۴، ۵، ۶ و ۷ بین گروه‌های مختلف مطالعه اختلاف معنی‌داری را از لحاظ آماری نشان نداد (نمودار ۶).

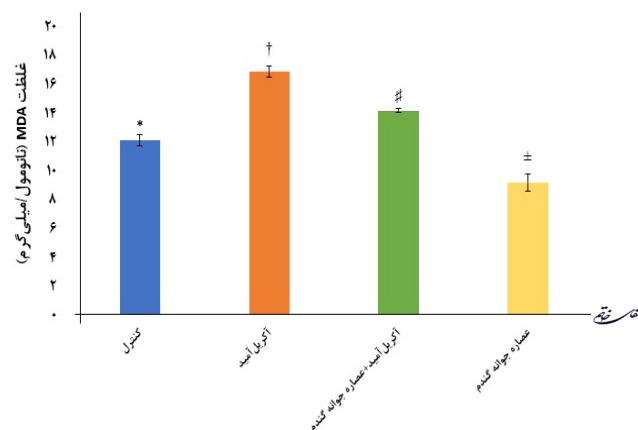
همان‌طور که در نتایج حاصل از بررسی سرعت رسیدن به ربع هدف بر حسب روز مورد آزمایش^{۱۰} در ماز آبی موریس در نمودار ۷ مشاهده می‌شود، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت، تنها در گروه عصارهٔ جوانه گندم به‌همراه آکريل آميد در روزهای اول و دوم سرعت رسیدن به ربع هدف بطور معنی‌داری در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه افزایش نشان داد ($P < 0/05$) (نمودار ۷).



نمودار ۷- سرعت شنای موش‌ها در ماز آبی موریس به‌منظور یافتن سکوی پنهان بر حسب روز علامت * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ بین گروه‌های مطالعه می‌باشد.



نمودار ۶- تغییرات مدت زمان تأخیر در رسیدن به سکو برحسب روز مورد آزمایش علامت * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ بین گروه‌های مطالعه می‌باشد.



نمودار ۸- Mean $\pm$ SE و ارزیابی غلظت MDA در بافت مغز. وجود علامت (*#†) متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مطالعه می‌باشد ($P < 0/05$).

موجب افزایش سرعت و کاهش تأخیر در زمان یافتن سکوی پنهان توسط موش‌ها شود. همچنین، عصاره جوانه گندم موجب افزایش تعداد نوروهای پیرامیدال، ضخامت لایه مولکولار و گرانولار در ناحیه CA1 و ضخامت لایه گرانولار در ناحیه شکنج دنداندار در بافت هیپوکامپ شد. همسو با این نتایج گزارش شده است که تغذیه و استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی قوی می‌تواند منجر به افزایش نوروهای، یادگیری و حافظه و نیز بهبود عملکردهای شناختی گردد (۲۵). بهبود عملکرد شناختی موش‌ها تحت تأثیر عصاره جوانه گندم در مطالعه حاضر می‌تواند احتمالاً در ارتباط با تغییرات مثبت ساختار بافت‌شناسی هیپوکامپ باشد. همچنین، در مطالعه حاضر عصاره جوانه گندم منجر به کاهش معنی‌دار غلظت مالون دی‌آلدهید بافت مغز در موش‌ها شد. نشان داده شده است که ارتباط کیفی بین القای نوروهای و افزایش عملکرد شناختی مغز وجود دارد (۲۸-۲۶). ترکیبات قوی آنتی‌اکسیدانی عصاره جوانه گندم شامل مقادیر بالای ویتامین‌های E و C، روی، منیزیم، فلاونوئیدها، تیامین، ریبوفلاوین، آهن و نیاسین است که اثرات محافظتی در مقابل مواد توکسیک را در مطالعات گذشته نشان داده است (۹، ۱۰). اثبات شده است که فلاونوئیدها و ویتامین‌های E و C از طریق تنظیم مسیرهای سیگنالینگ عصبی حیاتی درگیر در فرآیندهای حافظه می‌توانند موجب بهبود حافظه، یادگیری و شناخت شوند و بر پلاستیسیته و مکانیسم‌های تقویت طولانی مدت سیناپسی تأثیر مثبت می‌گذارند (۳۰، ۲۹). با این وجود، به‌منظور درک بهتر و تأیید دقیق مکانیسم اثرات عصاره جوانه گندم و آکریل‌آمید به ارزیابی‌ها و مطالعات بیشتر مولکولی نیاز است. به‌طور کلی یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم می‌تواند منجر به اثرات محافظتی نسبی از قبیل کاهش سطح مالون دی‌آلدهید، افزایش یادگیری و ارتقاء حافظه فضایی و نیز بهبود ساختار بافت‌شناسی هیپوکامپ موش‌ها در مقابل استرس اکسیداتیو، آسیب بافت‌شناسی و نوروتوکسیسیته القاء شده توسط آکریل‌آمید شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، بدین وسیله تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز به خاطر حمایت مالی از تحقیق حاضر که در قالب پایان‌نامه دانشجویی بود، ابراز می‌دارند.

اثرات محافظتی عصبی عصاره جوانه گندم در مقابل سمیت آکریل‌آمید در موش صحرایی پرداخته است. اثرات آکریل‌آمید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در مدت ۲۱ روز بر روی ساختار بافت‌شناسی هیپوکامپ در نتایج مطالعه ما شامل کاهش تعداد نوروهای پیرامیدال، ضخامت لایه گرانولار در ناحیه CA1 و ضخامت لایه گرانولار در ناحیه شکنج دنداندار بود. همچنین، آکریل‌آمید در تست حافظه فضایی و یادگیری موش‌های مطالعه حاضر موجب کاهش سرعت و نیز افزایش تأخیر در زمان یافتن سکوی پنهان ماز آبی موریس شد. همسو با این نتایج، تخریب عصبی آکریل‌آمید پیش‌تر در مطالعات نشان داده شده است (۱۸، ۱۷) و گزارش شده است که آکریل‌آمید با تغییرات بافتی و بیوشیمیایی شدید از طریق استرس اکسیداتیو و تولید ROS که منجر به عدم تعادل آنتی‌اکسیدانی می‌شود در ارتباط است. در مطالعه حاضر، آکریل‌آمید منجر به افزایش معنی‌دار غلظت مالون دی‌آلدهید بافت مغز در موش‌ها شد. مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان داده‌اند که آکریل‌آمید از طریق افزایش سطوح ROS مانند پراکسیدها، سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و نیز با کاهش سطح GSH موجب استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۰، ۱۹). استرس اکسیداتیو با تولید مقادیری از ROS که از دفاع طبیعی آنتی‌اکسیدانی فراتر برود، دلیل اصلی آسیب‌های سلولی می‌شود (۲۱)، بنابراین می‌توان گفت نتایج بافت‌شناسی مطالعه حاضر تحت تأثیر آکریل‌آمید احتمالاً حاصل ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و آسیب نورونی بوده است. همانطور که می‌دانیم هیپوکامپ نقش اساسی در شکل‌گیری حافظه فضایی و یادگیری دارد و از سوی دیگر مطالعات متعدد نشان داده‌اند که ساختار بافت‌شناسی و عملکردی هیپوکامپ در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است و حفظ شرایط ردوکس طبیعی در هیپوکامپ برای جلوگیری از کاهش عملکردهای شناختی مهم است (۲۳، ۲۲). حافظه به‌عنوان فرآیندی در نظر گرفته می‌شود که دارای مراحل شامل اکتساب، تثبیت و بازیابی است. انجام تست ماز آبی موریس یک روش مهم برای بررسی مدار هیپوکامپ است و همچنین با تقویت سیناپسی طولانی مدت و عملکرد گیرنده NMDA مرتبط است (۲۴، ۲۳، ۱۵). نتایج تست ماز آبی موریس در مطالعه حاضر تحت تأثیر آکریل‌آمید حاکی از کاهش سرعت و افزایش تأخیر در زمان یافتن سکوی پنهان توسط موش‌ها بود. در مقابل، عصاره جوانه گندم با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم توانست به‌طور معنی‌داری

- Choe E, Min DBJ. *Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods*. 2005; 70(9): R142-R59.
- Ibrahim AG, Sayed AZ, El-Wahab H, Sayah MMJ. *JPST. Synthesis of poly (acrylamide-graft-chitosan) hydrogel: Optimization of the grafting parameters and swelling studies*. 2019; 5: 55-62.
- Park HR, Kim M-S, Kim SJ, Park M, Kong KH, Kim HS, et al. *Acrylamide induces cell death in neural progenitor cells and impairs hippocampal neurogenesis*. 2010; 193(1): 86-93.
- Rajeh NA, Al-Dhaheer NMJ. *Antioxidant effect of vitamin E and 5-aminosalicylic acid on acrylamide induced kidney injury in rats*. 2017; 38(2): 132.
- Thonning Olesen P, Olsen A, Frandsen H, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. *Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study*. 2008; 122(9): 2094-100.
- Zamani E, Shokrzadeh M, Fallah M, Shaki FJP, research b. *A review of acrylamide toxicity and its mechanism*. 2017; 3(1): 1-7.
- Dortaj H, Yadegari M, Hosseini Sharif Abad M, Abbasi Sarcheshmeh A, Anvari MJ. *Effects of Acrylamide and Vitamin C on Histological Changes and Stereological Parameters of Cerebellum in Rat Offsprings*. 2014; 2(3): 9-18.
- Rafieian-Kopaei M, Heidarian EJ. *The effect of acryl amide on tissue changes, blood and enzymatic parameters in male rats*. 2013; 14(6): 27-37.
- HR M, MT S, J Salar A. *wheat sprout effects on Histological and histometrical structure and sperm parameters in testis of rat exposed to lead*. 2017.
- Moradi H, Morovvati H, Adibmoradi M, Najafzadeh Varzi HJ. *The Effect of Wheat Sprout extract on skin injury following injection of lead Acetate in rat*. 2017; 22(2): 161-75.
- Adibmoradi M, Morovvati H, Moradi HR, Sheybani M-T, Amoli JS, Mazaheri Nezhad Fard R, et al. *Protective effects of wheat sprout on testicular toxicity in male rats exposed to lead*. 2015; 4(4): 1-9.
- Hadijafari M, Morovvati HJ. *Effect of Wheat Sporout extract on changes in ovarian sex hormones in rat exposed to lead*. 2019; 15: 102-10.
- Morovvati H, Moradi H, Biabani MJ. *Effect of hydroalcoholic extract of wheat sprout on histology and histometry structure of rat's prostate exposed to lead*. 2018; 20(6): 540-52.
- Abou Zaid OAR, El-Sonbaty SM, Barakat WJ. *Ameliorative effect of selenium nanoparticles and ferulic acid on acrylamide-induced neurotoxicity in rats*. 2017; 3(2): 35-45.
- Vorhees CV, Williams MT. *Water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory*. 2006; 1(2): 848-58.
- Zavvari F, Karimzadeh FJ. *A review on the behavioral tests for learning and memory assessments in rat*. 2017; 5(4): 110-24.
- LoPachin RM, Gavin TJ. *Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry*. 2012; 120(12): 1650-7.
- Tian S-m, Ma Y-x, Shi J, Lou T-y, Liu S-s, Li G-y. *Acrylamide neurotoxicity on the cerebrum of weaning rats*. 2015; 10(6): 938.
- Elhelaly AE, AlBasher G, Alfarraj S, Almeer R, Bahbah EI, Fouda MM, et al. *Protective effects of hesperidin and diosmin against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats*. 2019; 26: 35151-62.
- Sun J, Li M, Zou F, Bai S, Jiang X, Tian L, et al. *Protection of cyanidin-3-O-glucoside against acrylamide-and glycidamide-induced reproductive toxicity in leydig cells*. 2018; 119: 268-74.
- Yeung AWK, Tzvetkov NT, El-Tawil OS, Bungău SG, Abdel-Daim MM, Atanasov AGJ. *Antioxidants: scientific literature landscape analysis*. 2019; 2019.
- Marosi K, Bori Z, Hart N, Sárga L, Koltai E, Radák Z, et al. *Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats*. 2012; 226: 21-8.
- Rasoolijazi H, Mehdizadeh M, Soleimani M, Nikbakhte F, Farsani ME, Ababzadeh SJ. *The effect of rosemary extract on spatial memory, learning and antioxidant enzymes activities in the hippocampus of middle-aged rats*. 2015; 29: 187.
- Abel T, Lattal KMJ. *Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval*. 2001; 11(2): 180-7.
- Dias GP, Cavegn N, Nix A, do Nascimento Bevilacqua MC, Stangl D, Zainuddin MSA, et al. *The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety*. 2012; 2012.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza P-V, Abrous DNJ. *Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis*. 2003; 100(24): 14385-90.

27. Moradi HR, Hajali V, Khaksar Z, Vafae F, Forouzanfar F, Negah SSJMBR. The next step of neurogenesis in the context of Alzheimer's disease. 2021; 48(7): 5647-60.
28. Sahab-Negah S, Hajali V, Moradi HR, Gorji AJC, Neurobiology M. The impact of estradiol on neurogenesis and cognitive functions in Alzheimer's disease. 2020; 40: 283-99.
29. Ambrogini P, Betti M, Galati C, Di Palma M, Lattanzi D, Savelli D, et al. α -Tocopherol and hippocampal neural plasticity in physiological and pathological conditions. 2016; 17(12): 2107.
30. Rendeiro C, Spencer JP, Vauzour D, Butler LT, Ellis JA, Williams CMJG, et al. The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms. 2009; 4(4): 251-70.