Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Ezi, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(5):.
doi: 10.34172/mj.026.35453
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

The effects of Chrysin on melphalan-induced histopathological changes and autophagy-related gene expression in the rat hippocampus

In Press

Samira Ezi[1], Maryam Moghimian[2], Zahra Rajabzadeh[3], Amirhasan Atarodi Shahri[3], Malihe Soltani[1*]

[1]Department of Anatomy, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran
[2]Department of Physiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran
[3]Central Research Laboratory Expert, Student Research Committee, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 15 Jul 2026
Revised: 22 Aug 2026
Accepted: 24 Aug 2026
ePublished: 1 Nov 2026

Keywords:
- Melphalan
- Chrysin
- Autophagy
- Hippocampus
- Histopathology

Abstract

Background. Chemotherapy with alkylating agents such as melphalan can induce neurotoxic effects in the hippocampus. This study was conducted to investigate the protective effect of chrysin on melphalan-induced histopathological changes and the expression of autophagy-related genes in the rat hippocampus.

Methods. In this experimental study, 48 male Wistar rats (21 days old) were randomly assigned to six groups: a control group, a melphalan-treated group (0.5 mg/kg, intraperitoneally), two groups receiving melphalan in combination with chrysin (25 and 50 mg/kg, respectively, orally), and two groups receiving chrysin alone (25 and 50 mg/kg, respectively, orally). The treatment period for the groups receiving melphalan and/or chrysin was 14 days. At the end of the experimental period, hippocampal histological changes were assessed using toluidine blue staining, and the expression of autophagy-related genes was evaluated using real-time PCR.

Results. The administration of melphalan significantly increased the number of dark neurons and significantly decreased the expression of autophagy-related genes compared with the control group. Treatment with chrysin (50 mg/kg) significantly reduced the number of dark neurons and increased the expression of autophagy-related genes.

Conclusion. The administration of chrysin was associated with reduced melphalan-induced histopathological alterations and modulation of the expression of autophagy-related genes in the hippocampus. These findings suggest that changes in the expression of autophagy-related genes may play an important role in the protective response of chrysin against melphalan-induced neuronal injury.

Practical Implications. Chrysin was associated with favorable changes in histopathological indices and the expression of autophagy-related genes in this animal model. However, further pharmacokinetic studies, evaluation of brain tissue penetration, safety assessment, and investigation of its potential effects on the antitumor efficacy of melphalan are required before clinical translation.

How to cite this article: Ezi S, Moghimian M, Rajabzadeh Z, Atarodi Shahri A, Soltani M.The effects of Chrysin on melphalan-induced histopathological changes and autophagy-related gene expression in the rat hippocampus. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(5):. doi: 10.34172/mj.026.35453. Persian.

Extended Abstract

Background

Melphalan is an alkylating chemotherapeutic agent extensively used in the treatment of hematological malignancies and conditioning regimens before hematopoietic stem cell transplantation. Despite its established antitumor activity, melphalan may

*Corresponding author; Email: soltanimalihe@yahoo.com, soltani.m@gmu.ac.ir
© 2026 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

adversely affect normal tissues, including the central nervous system. Chemotherapy-induced neurotoxicity has increasingly been recognized as an important complication that contributes to cognitive impairment and structural alterations within the hippocampus, a brain region essential for learning, memory, and neurogenesis. Although oxidative stress, mitochondrial dysfunction, neuroinflammation, and apoptosis have been implicated in chemotherapy-induced neuronal injury, growing evidence suggests that dysregulation of autophagy-related pathways may also contribute to neuronal vulnerability. Autophagy is a highly conserved intracellular homeostatic process regulated by autophagy-related (ATG) genes, and disturbances in this pathway have been associated with several neurodegenerative conditions. Chrysin (5,7-dihydroxyflavone), a naturally occurring flavonoid, possesses antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective properties. However, its potential influence on melphalan-induced hippocampal damage and alterations in autophagy-related gene expression remains insufficiently investigated. Therefore, this study examined the association between treatment with chrysin, histopathological alterations, and autophagy-related gene expression in the hippocampus of rats treated with melphalan.

Methods

This experimental study was performed on 48 male Wistar rats aged 21 days. Animals were randomly allocated into 6 groups (n=8): Control, Melphalan (Mel), Melphalan plus Chrysin 25 mg/kg (Mel+Chr25), Melphalan plus Chrysin 50 mg/kg (Mel+Chr50), Chrysin 25 mg/kg (Chr25), and Chrysin 50 mg/kg (Chr50). Melphalan was administered intraperitoneally at a dose of 0.5 mg/kg/day, whereas chrysin was dissolved in corn oil and administered orally by gavage at doses of 25 or 50 mg/kg/day for 14 consecutive days. In the combination groups, chrysin was administered approximately 30 minutes before the injection of melphalan.

All procedures were conducted according to institutional ethical guidelines, ARRIVE recommendations, and the principles of Replacement, Reduction, and Refinement (3Rs). Animals were randomly assigned to experimental groups, and histopathological and molecular evaluations were performed by investigators blinded to treatment allocation.

Twenty-four hours after the final treatment, hippocampal tissues were collected. Histopathological evaluation was performed on the right hippocampus using toluidine blue staining. Dark neurons were identified based on established morphological criteria including hyperbasophilic cytoplasm, nuclear condensation, and irregular cellular morphology. Quantitative assessment was performed using systematic random sampling, and neuronal density was expressed as cells/mm^2.

The left hippocampus was processed for molecular analyses. Total RNA was extracted and reverse transcribed into complementary DNA. Then, quantitative real-time PCR was performed to determine the relative expression of Atg5, Atg6 (Beclin-1), Atg7, Atg8 (LC3), and Atg12 using GAPDH as the endogenous reference gene. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

The normality of data distribution was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. Comparisons among experimental groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. Results were expressed as mean±standard error (SE), and $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results

The administration of melphalan produced pronounced histopathological alterations in the hippocampus. Compared with control animals, the Mel group exhibited a significant increase in dark neuron density, indicating enhanced neuronal degeneration. Histological examination demonstrated numerous hyperchromatic shrunken neurons with typical morphological characteristics of dark neurons throughout the hippocampal regions.

Treatment with chrysin attenuated these histopathological changes in a dose-dependent manner. Administration of 25 mg/kg chrysin produced only a modest reduction in dark neuron density compared with the Mel group, whereas

treatment with 50 mg/kg significantly reduced the number of dark neurons and partially preserved normal hippocampal morphology. Chrysin administered alone at either dose did not induce detectable histopathological abnormalities relative to untreated controls.

Real-time PCR analysis demonstrated that melphalan significantly reduced the mRNA expression of all evaluated autophagy-related genes, including Atg5, Atg6, Atg7, Atg8, and Atg12, compared with the control group. These findings indicate that exposure to melphalan was associated with altered transcription of genes involved in autophagy regulation.

Co-treatment with chrysin increased the expression of all investigated autophagy-related genes relative to treatment with melphalan alone. Although animals receiving 25 mg/kg chrysin showed an upward trend in gene expression, these changes were generally not statistically significant. In contrast, treatment with 50 mg/kg chrysin significantly increased the expression of Atg5, Atg6, Atg7, Atg8, and Atg12 compared with the Melphalan group, with expression levels approaching those observed in control animals.

The concordance between histopathological improvement and modulation of autophagy-related gene expression suggests that these molecular alterations may be associated with the neuroprotective response observed following the administration of chrysin. Nevertheless, the present study evaluated only messenger RNA expression. Therefore, the observed transcriptional changes cannot be interpreted as direct evidence of enhanced autophagic activity or autophagic flux. Likewise, the findings do not establish a causal relationship between altered ATG gene expression and the reduction in neuronal degeneration. Other biological mechanisms previously reported for chrysin, including attenuation of oxidative stress, suppression of inflammatory responses, and regulation of apoptosis, may also have contributed to the observed protective effects.

Conclusion

The present study demonstrates that the administration of melphalan was associated with hippocampal neuronal degeneration accompanied by reduced expression of several autophagy-related genes. Chrysin treatment, especially at the dose of 50 mg/kg, was associated with attenuation of histopathological damage and partial restoration of autophagy-related gene expression. These findings suggest that modulation of autophagy-related transcription may contribute to the neuroprotective effects observed following the administration of chrysin. However, because only gene expression was evaluated, no definitive conclusions can be drawn regarding functional autophagy or autophagic flux. Additional investigations incorporating protein expression, autophagic flux analyses, oxidative stress biomarkers, inflammatory mediators, behavioral assessments, and long-term outcome studies are required to clarify the underlying molecular mechanisms and to determine whether chrysin has translational potential as an adjunctive strategy for reducing chemotherapy-induced neurotoxicity.

ایزی و همکاران. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
doi: 10.34172/mj.025.35393
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

اثرات کریسین بر تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی ناشی از ملفالان در هیپوکامپ موش صحرایی

In Press

سمیرا ایزی[1]، مریم مقیمیان[2]، زهرا رجب‌زاده[3]، امیرحسن عطاردی شهری[3]، ملیحه سلطانی[1*]

[1]گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
[2]گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
[3]کارشناس آزمایشگاه تحقیقات مرکزی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۵/۴/۲۴
اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۵/۳۱
پذیرش: ۱۴۰۵/۶/۲
انتشار برخط: ۱۴۰۵/۷/۱۰

کلیدواژه‌ها:
- ملفالان
- کریسین
- اتوفاژی
- هیپوکامپ
- هیستوپاتولوژی

چکیده

زمینه. شیمی‌درمانی با داروهای آلکیله‌کننده مانند ملفالان می‌تواند موجب بروز عوارض نوروتوکسیک در هیپوکامپ شود. این مطالعه با هدف بررسی اثر محافظتی کریسین بر تغییرات بافت‌شناسی و بیان ژن‌های اتوفاژی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی تیمارشده با ملفالان انجام شد.

روش‌کار. در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۲۱ روزه) به‌طور تصادفی به شش گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه دریافت‌کننده ملفالان (۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل‌صفاقی)، دو گروه دریافت‌کننده ملفالان همراه با کریسین (به‌ترتیب ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، خوراکی) و دو گروه دریافت‌کننده کریسین به‌تنهایی (به‌ترتیب ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، خوراکی). دوره تیمار در گروه‌های دریافت‌کننده کریسین و ملفالان به مدت ۱۴ روز بود. در انتهای دوره آزمایش، تغییرات بافتی هیپوکامپ با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو و بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی با استفاده از روش Real-Time PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها. تجویز ملفالان منجر به افزایش معنادار تعداد نورون‌های تیره و کاهش معنادار بیان ژن‌های اتوفاژی در مقایسه با گروه کنترل شد. درمان با کریسین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معناداری تعداد نورون‌های تیره را کاهش و بیان ژن‌های اتوفاژی را افزایش داد.

نتیجه‌گیری. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تجویز کریسین با کاهش تغییرات بافت‌شناسی القاءشده توسط ملفالان و تعدیل بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در بافت هیپوکامپ همراه بود. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات در بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی ممکن است در پاسخ محافظتی کریسین در برابر آسیب‌های نورونی ناشی از ملفالان نقش داشته باشند.

پیامدهای عملی. این یافته‌ها نشان می‌دهد که کریسین در مدل حیوانی حاضر با تغییرات مطلوب در شاخص‌های بافتی و بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی همراه بود. با این حال، برای ارزیابی قابلیت ترجمه این نتایج به کاربردهای بالینی، انجام مطالعات فارماکوکینتیکی، بررسی نفوذ به بافت مغز، ارزیابی ایمنی و بررسی اثر احتمالی بر کارایی ضدتوموری ملفالان ضروری است.

مقدمه

شیمی‌درمانی به‌عنوان یکی از روش‌های اصلی درمان سرطان، نقش مؤثری در افزایش بقای بیماران دارد؛ با این حال، بروز عوارض جانبی ناشی از تجویز سیستمیک داروهای شیمی‌درمانی، به‌ویژه عوامل آلکیله‌کننده، همچنان یک چالش مهم محسوب می‌شود. داروهای آلکیله‌کننده مانند ملفالان با ایجاد آسیب مستقیم به DNA، موجب توقف چرخه سلولی و مرگ سلولی می‌شوند و علاوه بر سلول‌های سرطانی، می‌توانند سلول‌های سالم با نرخ تقسیم بالا را نیز تحت تأثیر قرار دهند.[1] هیپوکامپ به‌دلیل نقش کلیدی در یادگیری، حافظه و نوروژنز مادام‌العمر در ناحیه دندانه‌دار، از حساس‌ترین نواحی مغز نسبت به داروهای شیمی‌درمانی است.[2] از آنجا که برخی داروها مانند ملفالان قادر به عبور از سد خونی–مغزی

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: soltani.m@gmu.ac.ir ,soltaniimalihe@yahoo.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

هستندک؛[3] بروز اختلالات شناختی و نوروژنیک در بازماندگان سرطان گزارش شده است. با این وجود، مکانیسم‌های مولکولی دخیل در نوروتوکسیسیته القاءشده توسط شیمی‌درمانی، به‌ویژه در هیپوکامپ، هنوز به‌طور کامل روشن نشده‌اند. در هیپوکامپ، القای مرگ سلولی نه‌تنها از طریق فرایند آپوپتوز، بلکه از طریق اختلال در پروسه اتوفاژی نیز امکان‌پذیر است.

شواهد نشان می‌دهد که آسیب نورونی ناشی از شیمی‌درمانی تنها به آپوپتوز محدود نبوده و اختلال در فرایند اتوفاژی نیز می‌تواند در این زمینه نقش داشته باشد.[4] اتوفاژی یک مسیر حیاتی برای حفظ هموستاز سلولی در نورون‌هاست که از طریق بیان هماهنگ ژن‌های خانواده ATG از جمله Atg5 ، Atg6 (Beclin-1)، Atg7، Atg8و Atg12 تنظیم می‌شود.[5] اختلال در این مسیر با بروز بیماری‌های نورودژنراتیو و نقص‌های شناختی ارتباط دارد.[6]

در سال‌های اخیر، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه فلاونوئیدها، به‌دلیل توانایی آن‌ها در تعدیل استرس اکسیداتیو و تنظیم مسیر اتوفاژی، مورد توجه قرار گرفته‌اند.[7]

کریسین (Chrysin) یک فلاونوئید طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و نورومحافظتی است که اثرات مفیدی در بهبود اختلالات شناختی، حفظ نوروژنز و مقابله با مسیرهای مختلف مرگ سلولی گزارش شده است[8]. همچنین، توانایی این ماده در برابر آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو و ظرفیت آن در مقابله با اشکال مختلف مرگ سلولی، از جمله آپوپتوز و اتوفاژی، به‌خوبی اثبات شده است.[7] کریسین به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و آنتی‌آپوپتوتیک، گزینه‌ای مناسب در مطالعات مربوط به اختلالات عصبی از جمله صرع، کاهش حافظه، اختلالات رفتاری-حرکتی، ایسکمی مغزی، پارکینسون و آلزایمر بوده است.[9,10] با این حال، نقش کریسین در تعدیل اختلالات اتوفاژی القاءشده توسط ملفالان در هیپوکامپ به‌طور مشخص بررسی نشده است.

بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط نوروتوکسیسیته ناشی از ملفالان با تغییرات اتوفاژی و ارزیابی اثر کریسین بر بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی و تغییرات بافت‌شناسی هیپوکامپ در موش صحرایی طراحی شد.

روش کار

این پژوهش بر روی ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در سن ۲۱ روزگی (با میانگین وزنی۲۵ ±۱۵۰ گرم) انجام شد. حیوانات در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی گناباد تحت شرایط استاندارد آزمایشگاهی شامل چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و تهویه مطلوب نگهداری شدند. در طول دوره مطالعه، موش‌ها دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند.

کلیه مراحل پژوهش با رعایت اصول اخلاقی مراقبت و کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطابق با دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی جمهوری اسلامی ایران انجام گرفت. این مطالعه با کد اخلاق IR.GMU.REC.1402.003 مورخ 10/11/1402 (30 January 2024) در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گناباد به تصویب رسیده است. پژوهش حاضر مطابق با دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی، راهنمای گزارش‌دهی ARRIVE و اصول جایگزینی، کاهش و اصلاح (3Rs) انجام شد. حیوانات به‌صورت تصادفی به گروه‌های آزمایشی تخصیص داده شدند. تمامی ارزیابی‌های بافت‌شناسی و مولکولی توسط پژوهشگرانی که از تخصیص گروه‌ها آگاهی نداشتند، به‌صورت کور انجام شد. همچنین، هیچ حیوانی در طول مطالعه حذف نشد و تمامی حیوانات وارد تحلیل نهایی شدند.

در این مطالعه، موش‌های ۲۱ روزه به‌عنوان مدل مغز در حال رشد انتخاب شدند؛ زیرا این مرحله از رشد با حساسیت بیشتر به عوامل نوروتوکسیک و تغییرات فرآیندهای تکاملی دستگاه عصبی همراه است. موش‌ها به‌صورت تصادفی به شش گروه هشت‌تایی بر اساس مواجهه با ملفالان و درمان با کریسین به شرح ذیل تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل: دریافت روزانه نرمال سالین به‌صورت تزریق داخل صفاقی همراه با روغن ذرت به‌صورت گاواژ خوراکی به مدت ۱۴ روز.
۲. گروه ملفالان (Mel) : دریافت ملفالان با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز به‌صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز.
۳. گروه ملفالان + کریسین ۲۵(Mel+Chr25) : دریافت همزمان ملفالان ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز (داخل صفاقی) و کریسین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، گاواژ خوراکی) به مدت ۱۴ روز.
٤. گروه ملفالان + کریسین ۵۰(Mel+Chr50) : دریافت همزمان ملفالان ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز (داخل صفاقی) و کریسین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، گاواژ خوراکی) به مدت ۱۴ روز.
۵. گروه کریسین ۲۵(Chr25): دریافت کریسین به‌تنهایی با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز به‌صورت گاواژ خوراکی به مدت ۱۴ روز.
٦. گروه کریسین ۵۰(Chr50): دریافت کریسین به‌تنهایی با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز به‌صورت گاواژ خوراکی به مدت ۱۴ روز.

در این مطالعه حجم نمونه، آماده سازی و تجویز داروها بر اساس تجربیات حاصل از مطالعات پیشین پژوهشگران در این حوزه انتخاب شده‌اند. به این ترتیب، کریسین هر روز در دو دوز ۲۵

و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روغن ذرت حل و به‌صورت گاواژ خوراکی حدود ۳۰ دقیقه قبل از تزریق داخل صفاقی ملفالان (با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تجویز شد.[۱۱،۱۲] بیست‌وچهار ساعت پس از آخرین تزریق، حیوانات با تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و مراحل بعدی آزمایش انجام گرفت.

پیامدهای اصلی (Primary outcomes) این مطالعه شامل تراکم نورون‌های تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ و تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی (Atg8، Atg6، Atg5، Atg7 وAtg12) بودند.

در پایان دوره آزمایش، نیمکره‌های مغز از جمجمه خارج و با برش ساژیتال از یکدیگر جدا شدند. هیپوکامپ نیمکره راست جهت مطالعات بافت‌شناسی جدا و در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت تثبیت گردید.[۱۳]

پس از تثبیت نمونه‌ها، فرآیند آبگیری با غلظت‌های صعودی اتانول، شفاف‌سازی با گزیلول و آغشته‌سازی با پارافین مایع (مرک، آلمان) انجام شد. پس از قالب‌گیری پارافینی، برش‌هایی با ضخامت ۴ میکرومتر توسط میکروتوم(GMI-Leitz1512، آمریکا) تهیه گردید. مقاطع پس از پارافین‌زدایی و هیدراتاسیون، جهت ارزیابی مرگ نورونی در نواحی هیپوکامپ با روش تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند.

برای رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، مقاطع پس از خشک شدن در هوا به مدت ۱ تا ۲ دقیقه در محلول تولوئیدین بلو ۰/۰۳ درصد (PH=۱/۵) قرار گرفته، سپس با آب مقطر شسته شدند. رنگ‌زدایی با اتیل الکل ۷۵ درصد و آبگیری با اتیل الکل ۹۵ و ۱۰۰ درصد انجام گرفت. در نهایت، مقاطع به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در گزیلن شفاف‌سازی شده و با چسب انتلان لامل‌گذاری گردیدند. اسلایدها با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر مورد مطالعه قرار گرفتند.

شمارش نورون‌های تیره (Dark neurons) به روش نمونه‌برداری تصادفی سیستماتیک انجام شد. در هر حیوان، تعداد ۱۰ میدان تصادفی از هر یک از نواحی هیپوکامپ (CA1، DGوCA3) (در مجموع ۳۰ میدان) با بزرگنمایی ۴۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفت. مساحت هر میدان ۰۳۲/۰ mm^2 بود. نورون‌هایی به‌عنوان *Dark neuron* در نظر گرفته شدند که دارای سیتوپلاسم هایپربازوفیل، هسته کوچک و پُررنگ و حاشیه نامنظم بودند.

تراکم نورون‌های تیره با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

تراکم نورون‌های تیره = ($cell/mm^2$) تعداد کل نورون‌های تیره شمارش‌شده ÷ (تعداد میدان‌ها × مساحت هر میدان)

در این مطالعه، هر حیوان به‌عنوان واحد آزمایشی (experimental unit)در نظر گرفته شد. بدین منظور، پس از محاسبه تراکم نورون‌های تیره در ۳۰ میدان بررسی‌شده، میانگین تراکم برای هر حیوان محاسبه و این مقادیر (n=8) در هر گروه برای تحلیل‌های آماری بین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

به‌منظور کاهش سوگیری، شمارش نورون‌های تیره توسط ارزیابی که از تخصیص گروه‌های آزمایشی آگاهی نداشت، در دو نوبت و به‌صورت کور (blinded assessment) انجام شد.[۱۴]

هیپوکامپ نیمکره چپ پس از خروج از جمجمه با استفاده از هموژنایزر (Polytron PT 1200E، سوئیس) همگن شد. استخراج RNA کل بافت هیپوکامپ طبق دستورالعمل سازنده (کیت استخراج SuPer RNA، یکتاتجهیز، ایران) انجام گرفت. خلوص و کیفیت RNA با الکتروفورز بر روی ژل آگارز تأیید گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت مربوطه (یکتاتجهیز، ایران) بر اساس پروتکل سازنده انجام شد.

واکنش Real-Time PCR در دستگاه (APPlied Biosystems StePOne آمریکا) با پلیت ۴۸ چاهکی انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل ۱ میکرولیتر cDNA الگو، ۰/۲ میکرومولار پرایمر رفت، ۰/۲ میکرومولار پرایمر برگشت، ۳/۶ میکرولیتر آب استریل و ۵ میکرولیتر (SYBR Green AmPliqon ، دانمارک) بود. ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن مرجع داخلی استفاده گردید (پایداری بیان *GAPDH* در تمام گروه‌های تیمار در این مطالعه بررسی شد و نتایج نشان داد که تغییرات بیان آن ناچیز و غیرمعنادار می‌باشد).

برنامه حرارتی بهینه‌شده شامل: واسرشت اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت به مدت ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه، اتصال پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه و گسترش به مدت ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. تغییرات بیان ژن‌های Atg5، Atg6، Atg7، Atg8 و Atg12 با استفاده از روش $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه گردید. توالی پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی (Oligogen ، کره جنوبی) در زیر ارایه شده است.[۱۵]

Atg۶ (F Primer: CGAAAGGTGGTGGCAGAAAAC/ R Primer: ACTATATTCTCGCTGGTACTGAGC),

Atg۸ (F Primer: TCAGTGAGAGCTGCCTCTGTC/ R Primer: AGCAGTGGGGATTTACACAGTG),

Atg۵ (F Primer: AGATCACAGTTCTGGGATGC/ R Primer: TCAGGCGGTAGAGATCGTAG),

Atg۷ (F Primer: TGTCTTGCAGCATCCTGAG/ R Primer: TCAAGAACTTTGGATGAACAGG),

Atg۱۲ (F Primer: GCACTCATCGACTTCATCAG/ R Primer: ACTGCCAAAACACTCATATAGAG),

GAPDH (F Primer GGTCTACATGTTCCAGTATGACTC/ R Primer: CATTTGATGTTAGCGGGATCTCG).

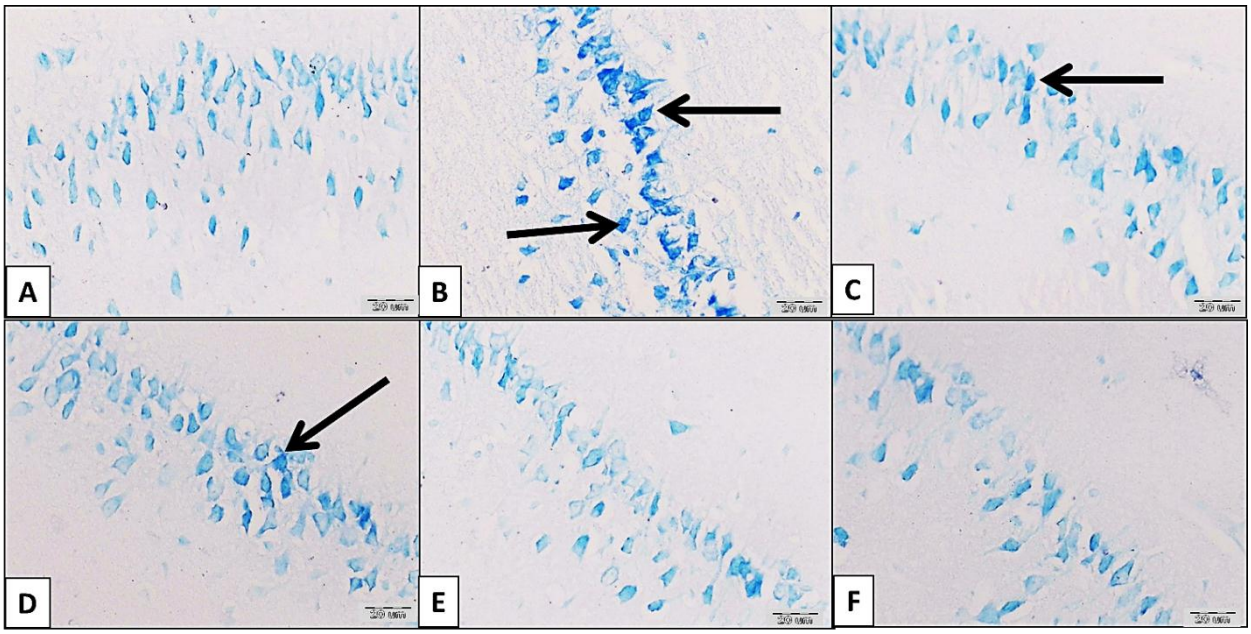
تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار (SPSS نسخه IBM۲۰ ، آمریکا) انجام شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. در صورت برقراری پیش‌فرض نرمالیتی، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای معیار (M±SE) گزارش شدند. سطح معناداری آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

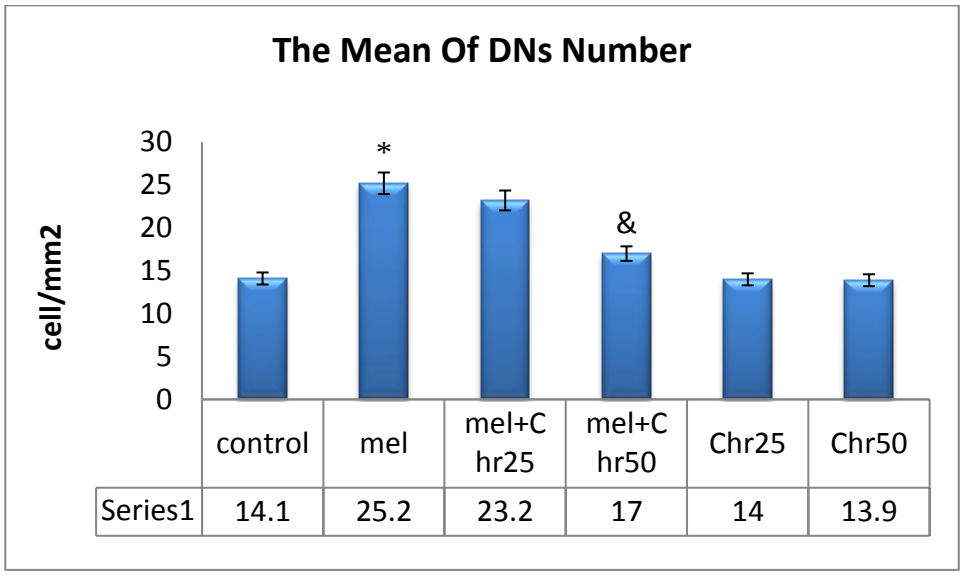
در بافت هیپوکامپ نمونه‌های مورد مطالعه، میانگین تعداد نورون‌های تیره در واحد سطح (cell/mm^2) شمارش گردید. در گروه کنترل، تعداد اندکی نورون تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ مشاهده شد. تجویز ملفالان در گروه Mel منجر به افزایش معنادار میانگین تعداد نورون‌های تیره در واحد سطح در مقایسه با گروه کنترل گردید (*P*=۰/۰۱۵). درمان با کریسین در گروه‌های Mel+Chr25 و Mel+Chr50 موجب کاهش میانگین تعداد نورون‌های تیره نسبت به گروه Mel شد؛ با این حال، این کاهش تنها در گروه Mel+Chr50 از نظر آماری معنادار بود (*P*=۰/۰۱) (شکل ۱و ۲).

در بررسی بیان mRNA ژن Atg6 به‌عنوان شاخص آغاز اتوفاژی و mRNA ژن Atg8 به‌عنوان نشانگر اصلی فرآیند اتوفاژی، مشخص گردید که سطح بیان طبیعی این دو ژن در گروه کنترل برقرار است. در گروه Mel، سطح بیان Atg6 و Atg8 در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد (*P*=۰/۰۲۲). درمان با کریسین در گروه Mel+Chr25توانست سطح بیان این دو ژن را نسبت به گروه Mel افزایش دهد؛ هرچند این افزایش از نظر آماری معنادار نبود. در گروه Mel+Chr50، افزایش معناداری در سطح بیان Atg6 (*P*=۰/۰۳۲) و Atg8 (*P*=۰/۰۱۱)نسبت به گروه تیمارشده با ملفالان مشاهده گردید (شکل۳).

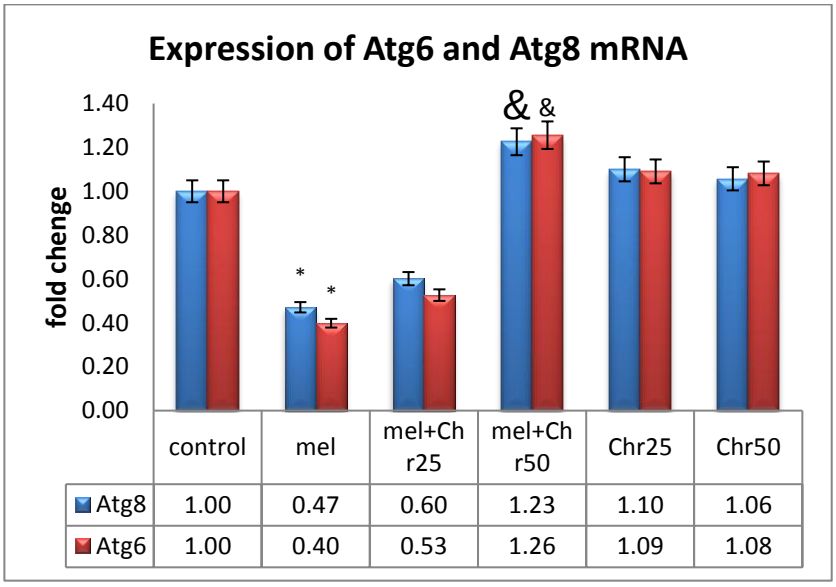
نتایج بررسی سطوح mRNA ژن‌های Atg5، Atg7 و Atg12 در بافت هیپوکامپ نشان داد که در گروه کنترل، سطح طبیعی بیان این ژن‌ها برقرار است. تجویز ملفالان در گروه Mel منجر به کاهش معنادار بیان Atg5، Atg7 و Atg12 نسبت به گروه کنترل شد (*P*=۰/۰۱). درمان با کریسین در هر دو گروه Mel+Chr25 و Mel+Chr50 توانست سطح mRNA این ژن‌ها را نسبت به گروه Melافزایش دهد؛ اما این افزایش تنها در گروه Mel+Chr50 از نظر آماری معنادار بود (*P*=۰/۰۳) (شکل٤).



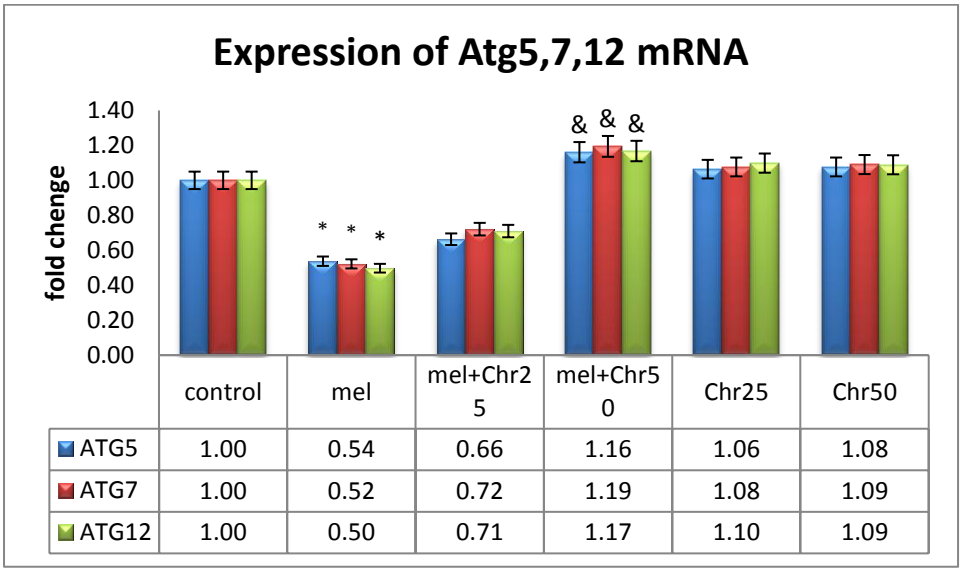
شکل ۱. تصاویر رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو بافت هیپوکامپ مغز موش صحرایی به دنبال مصرف ملفالان و درمان با کریسین در تمامی گروه‌های مورد مطالعه (n=8). فلش‌ها نورون‌های تیره را نشان می‌دهند (400×). A: گروه کنترل، B: گروه Mel، C: گروه Mel +Chr50 ، D: گروه Mel +Chr25، E: گروه Chr50، F: گروه Chr25.



شکل ۲. مقایسه آنالیز میانگین تعداد نورون‌های تیره در بافت هیپوکامپ، به دنبال مصرف ملفالان و درمان با کریسین در تمامی گروه‌های مورد مطالعه (n=8). تعداد نورون‌های تیره درهر یک میلی‌مترمربع شمارش شدند. داده‌ها به‌صورت mean±SE بیان شده‌اند. *نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل؛& نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه Mel.



شکل ۳. تحلیل Real time ژن Atg8 و Atg6 به‌عنوان مارکر اتوفاژی در بافت هیپوکامپ موش صحرایی به دنبال مصرف ملفالان و درمان با کریسین در تمامی گروه‌های مطالعه(n=8). داده‌ها به‌صورت mean±SE بیان شده‌اند. *نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل؛& نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه Mel.



	control	mel	mel+Chr25	mel+Chr50	Chr25	Chr50
ATG5	1.00	0.54	0.66	1.16	1.06	1.08
ATG7	1.00	0.52	0.72	1.19	1.08	1.09
ATG12	1.00	0.50	0.71	1.17	1.10	1.09

شکل ٤: تحلیل Real time ژن Atg5,7,12 به‌عنوان مارکر اتوفاژی در بافت هیپوکامپ موش صحرایی به دنبال مصرف ملفالان و درمان با کریسین در تمامی گروه‌های مطالعه (n=8). داده‌ها به‌صورت mean±SE بیان شده‌اند. *نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل؛& نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه Mel.

بحث

به‌دلیل نقش مهم هیپوکامپ در حفظ انعطاف‌پذیری مغز و وجود نوروژنز فعال در این بافت، هیپوکامپ کاندیدای مناسبی برای تحقیقات انکولوژی است. به همین منظور، مطالعه حاضر به بررسی عوارض تجویز سیستمیک ملفالان در پیدایش نورودژنراسیون هیپوکامپ پرداخته و سپس نقش محافظتی کریسین بر آسیب‌های هیپوکامپ مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، حضور نورون‌های تیره و نیز بیان نشانگرهای اتوفاژی (Atg8، Atg6، Atg5، Atg7 و Atg12) در بافت هیپوکامپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که به‌دنبال شیمی‌درمانی، اختلالاتی مانند آسیب به سد خونی-مغزی (BBB)، پاسخ‌های التهابی عصبی، افزایش استرس اکسیداتیو واکنشی و اختلال عملکرد میتوکندری می‌تواند باعث کاهش بقای سلول‌های پیش‌ساز عصبی اولیه و جلوگیری از تولید سلول‌های جدید شود که منجر به کاهش نوروژنز هیپوکامپ پس از درمان می‌گردد.[۱۶،۱۷] با توجه به اینکه عوامل آلکیله‌کننده مانند ملفالان قادر به عبور از سد خونی-مغزی و القای آسیب به بافت مغز هستند،[۳] بررسی‌های هیستوپاتولوژیک این مطالعه بر روی هیپوکامپ، افزایش تراکم نورون‌های تیره را به‌دنبال تیمار با ملفالان نشان داد.

نورون تیره نوعی دژنراسیون سلولی است که در مطالعات بافت‌شناسی با خاصیت هایپربازوفیلی و چگالی هایپرالکترون شناخته می‌شود. این تغییرات در برخی از آسیب‌های عصبی به هیپوکامپ مشاهده شده است.[۱۸] این احتمال وجود دارد که استرس اکسیداتیو ناشی از عوامل آلکیله‌کننده منجر به ارایه سیگنال‌هایی در جهت نورودژنراسیون هیپوکامپ شود[۱۹]. در مطالعه پیشین، پتانسیل بالقوه ملفالان را در بیان مارکرهای استرس اکسیداتیو و تخریب تعادل اتوفاژی در سلول‌های غیرسرطانی با تکثیر بالا مانند گنادها را نشان داده شده است.[۲۰] همچنین، در آن مطالعه به این نتیجه رسیدیم که افزایش تراکم نورون‌های تیره همسو با اختلال در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بر هم‌زدن تعدیل اتوفاژی و آپوپتوز، با بروز اختلال در حافظه و یادگیری در هیپوکامپ مبتلا به هیپوآندروژنی همراه است[۴]. با این حال، مطالعات مربوط به مکانیسم‌های آسیب به هیپوکامپ به‌دنبال مصرف این داروها بسیار محدود است.

در این مطالعه، این فرضیه مورد بررسی قرار گرفت که مواجهه با ملفالان با تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی و بروز دژنراسیون در بافت هیپوکامپ همراه باشد. اتوفاژی مکانیسم طبیعی تخریب داخل‌سلولی است و آن را همچون شمشیر دولبه توصیف می‌کنند؛ به‌گونه‌ای که سطوح متوسط بیان آن نقش محافظ دارد، اما افزایش یا کاهش بیش‌ازحد بیان آن، پیش‌برنده مرگ سلولی است. فعالیت نرمال اتوفاژی برای ارتقای ظرفیت نورون‌های هیپوکامپ در تشکیل خارهای دندریتیک، افزایش قدرت سیناپسی و نهایتاً تشکیل خاطرات جدید و حافظه ضروری است. اما اتوفاژی غیرطبیعی باعث فعال‌شدن آبشارهای آپوپتوز می‌شود که در نهایت به مرگ نورون‌ها منجر می‌گردد.[۲۱]

در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از Real-Time PCR نشان داد که تیمار با ملفالان با کاهش بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی (Atg8، Atg6، Atg5، Atg7 وAtg12) همراه بود. در همین راستا، در

مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های سرطانی انجام شده است، نشان داد که القای اتوفاژی در سلول‌های سرطانی در طول شیمی‌درمانی، با به تأخیر انداختن آپوپتوز، بقای سلول را طولانی‌تر می‌کند و استفاده از عوامل آلکیله‌کننده با توانایی اختلال در اتوفاژی و القای آپوپتوز، منجر به آسیب به سلول‌های سرطانی می‌شود.[۲۲]

در این مطالعه، به‌دنبال تیمار با ملفالان، افزایش نورون‌های تیره و کاهش بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده اختلال احتمالی در تنظیم این مسیر باشد. با توجه به آسیب‌پذیری بافت هیپوکامپ در مقابل تأثیرات مخرب عامل آلکیله‌کننده ملفالان، نیاز به اقدامات محافظتی ضروری است. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که اختلالاتی که در هیپوکامپ منجر به مرگ نورون‌ها، تغییر در حافظه و یادگیری می‌شوند، به‌خوبی با درمان‌هایی بر پایه آنتی‌اکسیدان‌ها بهبود می‌یابند.[۲۳]

کریسین یکی از فعال‌ترین فلاونوئیدهای موجود در طبیعت است که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، آنتی‌آپوپتوتیک و ضدالتهاب برای درمان بیماری‌های کبدی،[۲۴] نورودژنراتیو[۲۵] و سیستم تولیدمثل[۲۶] استفاده شده است. نشان داده شده است که کریسین اثر محافظت‌کننده عصبی خود را به‌طور مستقیم، عمدتاً از طریق کاهش ROS و پراکسیداسیون لیپیدی اعمال می‌کند. همچنین، می‌تواند به‌طور غیرمستقیم با القای بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر استرس اکسیداتیو داخل‌سلولی تأثیر بگذارد. کریسین به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود، می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از داروهای شیمی‌درمانی و مهار مسیرهای التهابی، به بهبود عملکرد و بازسازی سلولی کمک کند.[۲۷] فلاونوئیدها به‌طور کلی با تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی، از جمله آپوپتوز، اتوفاژی و التهاب، نقش مهمی در حفظ هموستاز سلولی ایفا می‌کنند.[۲۸]

در این مطالعه، در گروه‌های درمان‌شده با کریسین، افزایش بیان ژن‌های اتوفاژی (Atg8، Atg6، Atg5، Atg7 و Atg12) همزمان با تغییرات بافت‌شناسی به‌نفع کاهش تراکم نورون‌های تیره مشاهده شد. این یافته‌ها نشان‌دهنده یک همبستگی بالقوه بین تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی و کاهش نورودژنراسیون است و می‌تواند بازتابی از پاسخ سلولی به درمان با کریسین باشد. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که کریسین می‌تواند بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای مرگ سلولی اثرگذار باشد.[۷] با این حال، از آنجا که در مطالعه حاضر تنها بیان ژن‌ها در سطح mRNA ارزیابی شد، نمی‌توان بر اساس یافته‌های موجود درباره تغییر عملکرد اتوفاژی یا شار اتوفاژیک نتیجه‌گیری قطعی کرد.

داده‌های حاضر همچنین نشان می‌دهد که دوزهای بالاتر کریسین ممکن است با تعدیل بیشتر بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی همراه بوده باشد و این امر با کاهش نسبی نورودژنراسیون هیپوکامپ همزمان باشد؛ هرچند برای اثبات یک رابطه علت-معلولی به بررسی‌های بیشتر نیاز است. در همین راستا، مطالعه‌ای نشان داد که اثرات تنظیمی وابسته به دوز کریسین را در مدل‌های سلولی سرطان و سلول‌های طبیعی گزارش کردند که دوزهای بالاتر باعث تعدیل بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و اتوفاژی می‌شود.[۲۹،۳۰] این توضیح می‌تواند به توجیه نتایج مطالعه حاضر کمک کند که دوز 50 میلی‌گرم کریسین اثر محافظتی نسبتاً بهتری داشته است. با وجود مشاهده تغییرات همزمان در بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی و کاهش نورون‌های تیره، نمی‌توان نقش سایر مسیرهای شناخته‌شده اثر کریسین از جمله کاهش استرس اکسیداتیو، مهار التهاب یا تنظیم آپوپتوز را رد کرد. ازاین‌رو، مطالعات آینده با اندازه‌گیری همزمان این شاخص‌ها برای تعیین سهم نسبی هر یک از این مسیرها ضروری است.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به اتکا به نورون‌های تیره به‌عنوان شاخص دژنراسیون عصبی اشاره کرد که به‌تنهایی قادر به بازتاب تمامی جنبه‌های آسیب عصبی نیست. نورون‌های تیره ممکن است تحت تأثیر شرایط پردازش بافت نیز قرار گیرند و لزوماً قادر به تمایز آسیب برگشت‌پذیر از مرگ نورونی برگشت‌ناپذیر نیستند. بنابراین، استفاده از این شاخص به‌تنهایی نمی‌تواند تمامی ابعاد نورودژنراسیون را نشان دهد. علاوه بر این، نبود آزمون‌های رفتاری امکان ارزیابی پیامدهای عملکردی تغییرات مشاهده‌شده را محدود می‌کند. بنابراین، ارتباط مستقیم بین تغییرات مولکولی و پیامدهای عملکردی نظیر حافظه و یادگیری در این مطالعه قابل نتیجه‌گیری نیست. در این مطالعه استفاده از حیوانات نر با هدف حذف تغییرات هورمونی وابسته به چرخه فحلی و کاهش عوامل مداخله‌گر انجام شده است. با این حال، تعمیم نتایج به جنس ماده نیازمند انجام مطالعات مستقل خواهد بود. همچنین با توجه به اینکه مطالعه حاضر بر روی موش‌های نابالغ انجام شده است، یافته‌های مطالعه حاضر لزوماً قابل تعمیم به حیوانات بالغ یا انسان نبوده و تفاوت‌های وابسته به سن می‌تواند بر پاسخ به ملفالان و کریسین تأثیرگذار باشد. از دیگر محدودیت‌های این مطالعه عدم انجام محاسبه رسمی حجم نمونه بر اساس توان آماری پیش از آغاز پژوهش بود که می‌تواند بر توان آماری مطالعه برای شناسایی برخی اختلافات بین گروه‌ها تأثیرگذار باشد. عدم بررسی شاخص‌های استرس اکسیداتیو و نبود داده‌های پروتئینی، تفسیر دقیق

مکانیسم‌های زیربنایی دژنراسیون عصبی را محدود می‌سازد که این امر از جمله محدودیت‌های دیگر این مطالعه بود.

نتیجه‌گیری

این پژوهش اثرات سوء ملفالان شامل افزایش تراکم نورون‌های آسیب‌دیده در هیپوکامپ و اختلال در تعادل بیان ژن-های اتوفاژی مشخص شد. در گروه‌های درمان‌شده با کریسین، مشاهده شد که بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی به‌طور نسبی تعدیل شده و پارامترهای بافتی آسیب‌دیده تا حدی بهبود یافتند. این یافته‌ها نشان‌دهنده یک ارتباط احتمالی بین فعالیت کریسین و تغییرات بافتی هیپوکامپ است، اما برای استنباط در مورد کاربرد درمانی کریسین در انسان و کاهش عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی، مطالعات بیشتر و بررسی‌های بالینی لازم است.

قدردانی‌ها

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی گناباد برای حمایت از اجرای این پژوهش، فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و تأمین بخشی از منابع مالی مطالعه صمیمانه قدردانی می‌کنند.

مشارکت پدیدآوران

سمیرا ایزی :طراحی مطالعه، نظارت بر اجرای پژوهش، تحلیل داده‌ها و بازنگری علمی مقاله.

مریم مقیمیان: طراحی مطالعه، تفسیر نتایج، بازنگری انتقادی مقاله.

زهرا رجب‌زاده: انجام آزمایش‌ها، گردآوری داده‌ها و نگارش پیش‌نویس مقاله.

امیرحسن عطاردی شهری: انجام آزمایش‌ها، گردآوری و تحلیل اولیه داده‌ها.

ملیحه سلطانی: ایده‌پردازی، طراحی مطالعه، نظارت بر اجرای پژوهش، تحلیل داده‌ها، نگارش و ویرایش نهایی مقاله، تأیید نسخه نهایی مقاله و مسئول مکاتبات.

تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کرده‌اند و مسئولیت تمامی جنبه‌های پژوهش را مطابق با معیارهای ICMJE می‌پذیرند.

منابع مالی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی گناباد انجام شده است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های ایجادشده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارایه می‌گردد.

تعارض منافع

بدین‌وسیله پدیدآوران اعلام می‌کنند که این اثر حاصل یک پژوهش مستقل بوده و هیچ‌گونه تضاد منافعی با سازمان‌ها و اشخاص دیگری ندارد.

References

1. Siddik Z.H. Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: DNA-interactive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs. The cancer handbook. 2005;1:1-16. doi: 10.1002/0470025077.chap84b
2. Sekeres MJ, Bradley-Garcia M, Martinez-Canabal A, Winocur G. Chemotherapy-induced cognitive impairment and hippocampal neurogenesis: a review of physiological mechanisms and interventions. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(23):12697. doi: 10.3390/ijms222312697
3. Cornford EM, Young D, Paxton JW, Sofia RD. Blood-brain barrier penetration of felbamate. Epilepsia. 1992;33(5):944-54. doi: 10.1111/j.1528-1157.1992.tb02205.x
4. Ebadi AH, Moghimian M, Abtahi-Evari SH, Saadatian Z, Fathi A, Soltani M. Chrysin Modulates Behavior and Hippocampal Histopathology in Adult Male Hypoandrogenic Rats: The Regulatory Role of miR-30a, miR-375, and miR-204. Brain Behav. 2025;15(5):e70529. doi: 10.1002/brb3.70529
5. Lin PW, Chu ML, Liu HS. Autophagy and metabolism. Kaohsiung J Med Sci. 2021;37(1):12-19. doi: 10.1002/kjm2.12299
6. Lu J, Di Florio DN, Boya P, Maday S, Springer W, Chu CT. Autophagy and mitophagy at the synapse and beyond: implications for learning, memory and neurological disorders. Autophagy. 2026;22(1):10-52. doi: 10.1080/15548627.2025.2581217
7. Jung G-H, Lee J-H, Han S-H, et al. Chrysin induces apoptosis via the MAPK pathway and regulates ERK/mTOR-mediated autophagy in MC-3 cells. International journal of molecular sciences. 2022;23(24):15747. doi: 10.3390/ijms232415747
8. Souza LC, Antunes MS, Borges Filho C, et al. Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain.

Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2015;134:22-30. doi: 10.1016/j.pbb.2015.04.010
9. Ranjan Lal U, Lal S. Bioactive Molecules from Indian Medicinal Plants as Possible Candidates for the Management of Neurodegenerative Disorders [Internet]. Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health. IntechOpen; 2021. doi: 10.5772/intechopen.92043
10. Lal UR, Lal S. Candidates for the Management of Neurodegenerative Disorders. Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health. 2021:17. doi: 10.5772/intechopen.92043
11. Hafström L, Naredi P. Isolated hepatic perfusion with extracorporeal oxygenation using hyperthermia TNF alpha and melphalan: Swedish experience. Recent Results Cancer Res. 1998;147:120-6. doi: 10.1007/978-3-642-80460-1_12
12. Pai SA, Martis EA, Munshi RP, Gursahani MS, Mestry SN, Juvekar AR. Chrysin mitigated obesity by regulating energy intake and expenditure in rats. J Tradit Complement Med. 2019;10(6):577-85. doi: 10.1016/j.jtcme.2019.09.002
13. Mandour DA, Bendary MA, Alsemeh AE. Histological and imunohistochemical alterations of hippocampus and prefrontal cortex in a rat model of Alzheimer like-disease with a preferential role of the flavonoid "hesperidin". J Mol Histol. 2021;52(5):1043-65. doi: 10.1007/s10735-021-09998-6
14. Kirino T, Tamura A, Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. Acta Neuropathol. 1984;64(2):139-47. doi: 10.1007/bf00695577
15. Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, Yao C, Dave JR, Tortella FC. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. J Cereb Blood Flow Metab. 2002;22(9):1068-79. doi: 10.1097/00004647-200209000-00004
16. Gupta P, Makkar TK, Goel L, Pahuja M. Role of inflammation and oxidative stress in chemotherapy-induced neurotoxicity. Immunol Res. 2022;70(6):725-41. doi: 10.1007/s12026-022-09307-7
17. Song K, Li Y, Zhang H, Na A, Wei Y, Wang L, et al . Oxidative stress mediated blood brain barrier (BBB) disruption in neurological diseases. Oxidative medicine and cellular longevity. 2020;2020(1):4356386. (27 pages). doi: 10.1155/2020/4356386
18. Zsombok A, Tóth Z, Gallyas F. Basophilia, acidophilia and argyrophilia of "dark" (compacted) neurons during their formation, recovery or death in an otherwise undamaged environment. J Neurosci Methods. 2005;142(1):145-52. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.08.005
19. Moreira PI, Smith MA, Zhu X, et al. Oxidative stress and neurodegeneration. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005;1043(1):545-552. doi: 10.1196/annals.1333.062
20. Ebadi A-H, Moghimian M, Abtahi-Evari Moreira PI, Smith MA, Zhu X, Nunomura A, Castellani RJ, Perry G. Oxidative stress and neurodegeneration. Ann N Y Acad Sci. 2005 Jun;1043:545-52. doi: 10.1196/annals.1333.062.
21. Nikoletopoulou V, Tavernarakis N. Regulation and Roles of Autophagy at Synapses. Trends Cell Biol. 2018;28(8):646-61. doi: 10.1016/j.tcb.2018.03.006
22. Bordin DL, Lima M, Lenz G, Saffi J, Meira LB, Mésange P, et al. DNA alkylation damage and autophagy induction. Mutat Res. 2013;753(2):91-99. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.07.001
23. Martinelli C, Pucci C, Battaglini M, Marino A, Ciofani G. Antioxidants and Nanotechnology: Promises and Limits of Potentially Disruptive Approaches in the Treatment of Central Nervous System Diseases. Adv Healthc Mater. 2020;9(3):e1901589. doi: 10.1002/adhm.201901589
24. Pai SA, Munshi RP, Panchal FH, Gaur IS, Juvekar AR. Chrysin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2019;392(12):1617-28. doi: 10.1007/s00210-019-01705-3
25. Goyal A, Singh G, Verma A. A Comprehensive Review on Therapeutic Potential of Chrysin in Brain Related Disorders. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2023;22(6):789-800.
26. Ciftci O, Ozdemir I, Aydin M, Beytur A. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. Andrologia. 2012;44(3):181-6. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01127.x
27. Temel Y, Kucukler S, Yıldırım S, Caglayan C, Kandemir FM. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2020;393(3):325-37. doi: 10.1007/s00210-019-01741-z
28. García-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Pérez-García E, Carrero S, Blanco EJ, Carretero-Hernández M, et al. Role of Flavonoids in The Interactions among Obesity, Inflammation, and Autophagy. Pharmaceuticals (Basel). 2020;13(11):342. doi: 10.3390/ph13110342

29. Shahbaz M, Naeem H, Imran M. Chrysin a promising anticancer agent: recent perspectives. International Journal of Food Properties. 2023;26(1):2294-337. doi: 10.1080/10942912.2023.2246678
30. Jubaidi FF, Zainalabidin S, Taib IS, Hamid ZA, Budin SB. The Potential Role of Flavonoids in Ameliorating Diabetic Cardiomyopathy via Alleviation of Cardiac Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis. Int J Mol Sci. 2021;22(10):5094. doi: 10.3390/ijms22105094