

مقاله پژوهشی

اثر گالیک اسید بر حافظه اجتنابی غیر فعال، حافظه کاری و تراکم نورون‌های تیره نواحی CA1/CA3 در مدل دژنراسیون هیپوکامپ موش صحرایی

سید کمال‌الدین یزدانفر، محمد امین عدالت‌منش*، سید ابراهیم حسینی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

*مسئول مکاتبات: amin.edalatmanesh@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1940557.1308

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۵

چکیده

مسمومیت با تری‌متیل‌تین (TMT) با القاء دژنراسیون هیپوکامپ سبب بروز آسیب شناختی و تولید نورون‌های تیره در مناطق مختلف هیپوکامپ می‌شود. مطالعه حاضر اثر اسید گالیک (GA) را بر حافظه کاری، حافظه اجتنابی، و تراکم نورون‌های تیره در نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ موش‌های صحرایی در پی مسمومیت با TMT ارزیابی می‌کند. در این مطالعه، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به صورت تصادفی در ۴ گروه شامل کنترل، TMT+NS، TMT+GA100 و TMT+GA200 قرار گرفتند. اسید گالیک با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان، ۲۴ ساعت پس از مسمومیت با TMT (۸ mg/kg) به صورت دهانی تجویز شد. جهت ارزیابی حافظه کاری از ماز Y و جهت سنجش حافظه اجتنابی از جعبه شاتل استفاده شد. آنگاه تراکم نورون‌های تیره در نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ به روش دایسکتور بررسی شد. همچنین، به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های مورد نظر، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد و از نظر آماری مقادیر $p < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد. کاهش معنی‌دار درصد رفتار تناوبی، تاخیر ورود به محفظه تاریک شاتل باکش، به همراه افزایش تراکم نورون‌های تیره در گروه TMT+NS نسبت به گروه کنترل دیده شد ($p < 0/001$). در حالی که تجویز گالیک اسید سبب بهبود حافظه کاری و اجتنابی و کاهش تراکم نورون‌های تیره CA1/CA3 هیپوکامپ نسبت به گروه TMT+NS گردید ($p < 0/001$). به نظر می‌رسد تجویز اسید گالیک با کاهش میزان آسیب دیدگی نورون‌های نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ سبب بهبود علائم شناختی به دنبال مسمومیت با TMT می‌گردد.

کلمات کلیدی: تری‌متیل‌تین، گالیک اسید، هیپوکامپ، موش صحرایی.

مقدمه

دژنراسیون‌های عصبی مانند بیش‌فعالی، پرخاشگری و نقص شناختی است (۱۰). به سبب کاربرد فراوان TMT در صنایع پلاستیک، محصولات سیلیکونی، بسته‌بندی مواد غذایی و آفت‌کش‌ها به آلوده‌کننده‌ای محیطی تبدیل شده است. این ترکیب به سیستم آب آشامیدنی منازل، آب رودخانه‌ها و دریاها وارد شده و

تری‌متیل‌تین (TMT)، یک نوروٹوکسین قوی است که سبب ایجاد اختلالات رفتاری-شناختی در انسان و حیوانات آزمایشگاهی می‌گردد (۲۶). این اورگانوتین سبب آسیب‌پذیری انتخابی نورونی در سیستم لیمبیک و به ویژه هیپوکامپ می‌گردد و بدین ترتیب مدل کارآمدی برای بررسی تغییرات رفتاری وابسته به

التهابی و آنتی‌اکسیدانی دارد و به سلول‌های بدن در محافظت از آسیب‌های اکسایشی کمک می‌کند (۱). ترکیبات پلی‌فنولی مختلف دارای فعالیت پاک‌کنندگی و توانایی فعال‌سازی آنزیم‌های اصلی آنتی‌اکسیدانی در مغز دارند؛ در نتیجه چرخه معیوب استرس اکسایشی و آسیب بافتی را مهار می‌کنند (۶).

مطالعات نشان داده‌اند که گالیک اسید نه تنها فعالیت مجدد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز را برقرار می‌سازند، بلکه به طور قابل توجهی مقدار مالون‌دی‌آلدهید (محصول پراکسیداسیون لیپیدی) در کبد، مغز و کلیه را نیز کاهش می‌دهند. این نتایج، بیان می‌کند که درمان با گالیک اسید صدمات استرس اکسایشی مغز در موش‌های صحرایی را به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن بهبود می‌بخشد (۳). لذا با توجه به سوابق مطالعاتی، هدف از پژوهش حاضر ارزیابی اثر اسید گالیک بر اختلال در حافظه اجتنابی غیر فعال و حافظه کاری به عنوان ارزیابی‌های شناختی و سنجش دانسیته دارک نورونی در نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ متعاقب مسمومیت با TMT می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات، گروه‌بندی و القای مدل: در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، با میانگین وزنی 210 ± 10 گرم و حدوداً ۲/۵ ماهه استفاده شد. پس از تهیه حیوانات از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز به اتاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی شیراز منتقل شدند. پس از یک هفته تا حصول سازش حیوانات با محیط، آزمایش روی آن‌ها انجام شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 50 ± 10 درصد و چرخه روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته (۶ صبح تا ۶ عصر) نگهداری شدند. در این

گاهی سبب مسمومیت حاد در حیوانات، آبزبان و انسان شده است (۱۵). در انسان، مسمومیت حاد با TMT باعث سندرم لیمبیک-مخچه می‌شود که با اختلال در حافظه، گیجی، تشنج، فراموشی، بی‌خوابی و افسردگی همراه است (۲۲). آسیب ناشی از TMT در نورون‌های هرمی و دندان‌دار هیپوکامپ می‌توانند ظرف ۲ تا ۳ روز پس از مسمومیت رخ دهد و این آسیب احتمالاً ریشه در تحریک شدید میکروگلیالی و آستروگلیالی در هیپوکامپ دارد (۱۸).

با القاء ضایعه در سیستم گابارژیک هیپوکامپ، کاهش میل به بازجذب نوروترانسمیتر به دنبال مسمومیت با TMT دیده شده است که بسیاری از نشانه‌های درگیر در نورودژنراسیون از جمله صرع و پرخاشگری را به همراه دارد (۱۱). پاتولوژی تحلیل عصبی القاء شده با تری‌متیل‌تین با ناتوانی‌های تحلیل‌برنده عصبی، از قبیل مرگ سلولی و اختلالات شناختی، مشترک است. بنابراین، TMT برای مدل‌های تجربی در مطالعات بیماری‌های شبه‌آزایمر مفید است (۲۰).

مرگ نورونی ناشی از TMT با آپوپتوز ایجاد می‌شود که همراه با تراکم کروماتینی، قطعه قطعه شدن DNA، بیان کاسپاز ۳ و COX-2 در سلول‌های دژنره دیده می‌شوند (۵). از طرف دیگر، آسیب ناشی از TMT در سلول‌های حساس به استرس اکسیداتیو، افزایش کلسیم درون سلولی و آسیب میتوکندریایی همراه است. استرس اکسیداتیو با تولید اکسیژن واکنشی (ROS)، افزایش نیتروژن واکنشی (RNS) و لیپوپراکسیداسیون مشخص می‌گردد (۱۲). از این رو، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها مانند اسید گالیک می‌تواند در درمان آسیب نورونی ناشی از TMT و بهتر شدن اختلال‌های شناختی موثر واقع شود.

اسید گالیک، ترکیب پلی‌فنولی و محصول هیدرولیز تانن‌ها در گیاهان است که از راه مهار فعالیت تیروزین فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد

گیوتینی بین دو محفظه بسته و یک شوک ۲ میلی آمپری و ۵۰ هرتزی به مدت ۲ ثانیه از طریق میله های فلزی کف محفظه تاریک به حیوان وارد شد. سپس درب محفظه را برداشته تا حیوان خود وارد محفظه روشن شود. این مرحله یک روز بعد از مرحله سازگار شدن انجام شد. در مرحله آزمون، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از وارد شدن شوک، حیوان مجدد وارد محفظه روشن شده و زمان تاخیر در ورود به محفظه تاریک و نیز مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک در مدت ۳۰۰ ثانیه ثبت شد. در این مرحله حیوان پس از ورود به محفظه تاریک شوک دریافت نکرد (۳۲).

آزمون ارزیابی حافظه کاری (ماز Y): این آزمون با ارزیابی میزان رفتارهای تناوبی، برای سنجش حافظه کاری استفاده شد. ماز Y از سه بازو با ابعاد هر بازو ۶۰×۱۵×۱۵ سانتی متر تشکیل شده بود که از راه یک محوطه مرکزی مثلث شکل به هم متصل بودند. ابتدا هر حیوان در قسمت انتهایی یک بازو قرار داده شد، به طوری که امکان دسترسی آزاد حیوان به سایر بازوهای ماز در دوره زمانی ۵ دقیقه‌ای امکانپذیر شد. جوندگان نوعاً ترجیح دادند به بررسی بازوی جدید بپردازند و تمایلی برای بازگشت به بازویی که آن را قبلاً دیده بودند، نداشتند، مگر فراموش کرده بودند. ورود حیوان به داخل هر بازو با مشاهده ثبت شد. ورود حیوان به بازو زمانی در نظر گرفته شد که پاهای عقبی حیوان به طور کامل در داخل بازو قرار می‌گرفت، رفتارهای تناوبی به عنوان ورودهای موفق و پشت سر هم (سریال) به داخل همه‌ی بازوها در مجموعه‌های ۳ تایی هم‌پوشانی کننده در نظر گرفته شد. به این ترتیب درصد تناوب مشاهده شده به حداکثر تناوب (تعداد کل بازو های وارد شده) ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد (۸).

پژوهش، غذای مخصوص موش آزمایشگاهی با فرمولاسیون استاندارد (محصول شرکت ۱۱۰ فارس) به همراه آب آشامیدنی آزادانه در اختیار حیوانات قرار داشت. رعایت اصول اخلاقی طبق قوانین بین المللی و ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز (کد اخلاق: IR.IAUSHIRAZ.1399.18.45) صورت گرفت. موش‌های صحرایی تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی شامل گروه کنترل سالم، گروه TMT+NS: دریافت کننده تری‌متیل تین و نرمال سالین به عنوان حلال گالیک اسید، TMT+GA100: دریافت کننده تری‌متیل تین و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم اسید گالیک و TMT+GA200: دریافت کننده تری‌متیل تین و دوز ۲۰۰ میلی‌گرم اسید گالیک تقسیم شدند. برای القای مسمومیت تری‌متیل‌تینی، دوز ۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان، TMT (Sigma, Germany) به صورت درون صفاقی همراه با نرمال سالین تزریق شد (۹). ۲۴ ساعت پس از تزریق TMT، گروه‌های دریافت کننده گالیک اسید (Sigma, Germany)، دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم از این ماده را به روش دهانی (گاواژ) به مدت ۴ هفته در ساعات اولیه صبح دریافت نمودند (۲۴).

آزمون ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال: به کمک دستگاه شانل باکس که شامل دو محفظه هم اندازه روشن و تاریک است و توسط یک درب گیوتینی به هم ارتباط دارند، آزمون انجام شد. در کف محفظه‌ها میله‌های استیل متصل به دستگاه الکتروشوک قرار داشت. در مرحله سازگار شدن، حیوان وارد محفظه روشن شده و اجازه داده شد تا خودش وارد محفظه تاریک شود. زمان تاخیر تا ورود به محفظه تاریک و مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک و روشن در مدت زمان ۳۰۰ ثانیه ثبت شد. در مرحله آموزش، پس از اولین ورود حیوان به محفظه تاریک بلافاصله درب

شده در یک نمونه، $\sum P$ = تعداد دفعات نمونه برداری شده در یک نمونه، A = مساحت چهارچوب نمونه برداری و H = فاصله بین دو برش متوالی، یا ضخامت هر برش می‌باشد (۳۲). حداقل ۱۰ اسلاید از هر نمونه هیپوکامپ (۵۰ اسلاید در هر گروه) جهت ارزیابی دانسیته دارک نورونی شمارش شدند.

ارزیابی آماری: تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم افزارهای آماری SPSS ویرایش ۲۰ انجام شد. همچنین، به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های مورد نظر، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد و از نظر آماری مقادیر $p < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

ارزیابی حافظه کاری (تناوب حرکتی): نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد تناوب حرکتی (حافظه کاری) در گروه دریافت کننده نرمال سالین (TMT+NS) نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت ($p < 0/001$). از طرفی، بین گروه کنترل با گروه TMT+GA100 ($p < 0/01$) و گروه TMT+GA200 ($p < 0/05$) نیز اختلاف معنی‌دار دیده شد. هرچند، تجویز اسید گالیک در هر دو دوز مورد استفاده (TMT+GA100 و TMT+GA200) سبب بهبود تناوب حرکتی و حافظه کاری شد و افزایش معناداری نسبت به گروه TMT+NS داشت. بین گروه TMT+GA100 با گروه TMT+NS و نیز بین گروه TMT+GA200 با گروه TMT+NS اختلاف معنی‌دار بود (به ترتیب: $p < 0/05$ و $p < 0/01$). با وجود اختلاف بین گروه TMT+GA100 و TMT+GA200، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های حاضر دیده نشد.

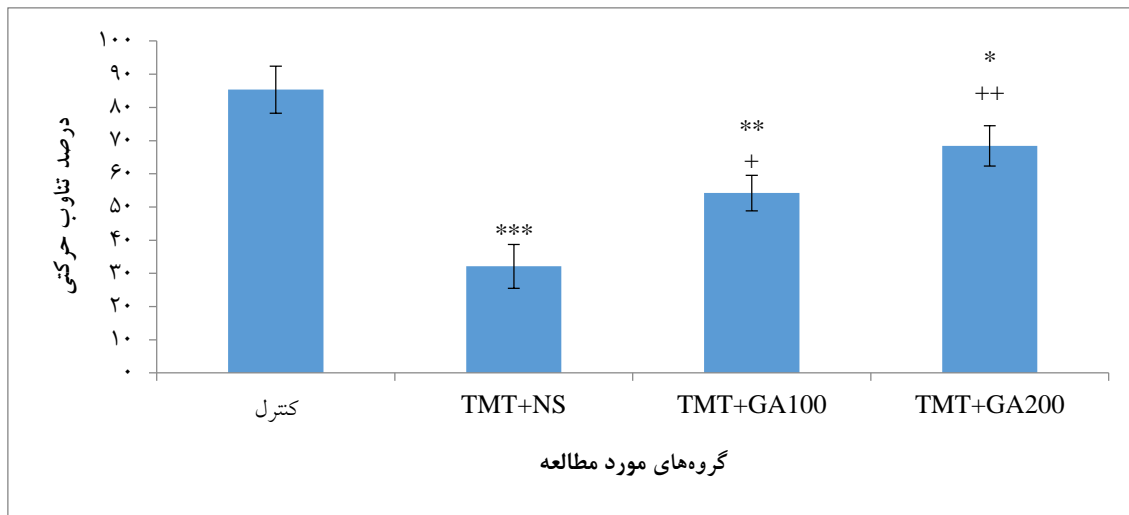
هیستوپاتولوژی: به منظور ارزیابی بافت شناسی هیپوکامپ و سنجش دانسیته دارک نورونی در نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ، در پایان دوره تیمار با اسید گالیک حیوانات هر گروه با قرار گرفتن در دسیکاتور حاوی کلروفورم به طور عمیق بیهوش شدند و بلافاصله پرفیوژن قلبی با جایگزینی فرمالین ۱۰ درصد متعاقب شستشوی خون از بدن انجام شد. در پایان پرفیوژن ترانس کاردیالی، مغز با دقت از جمجمه خارج و پردازش بافتی با کمک دستگاه اتوتکنیکون صورت گرفت. پس از تهیه بلوک‌های پارافینه، برش‌گیری از ناحیه هیپوکامپ مغز طبق راهنمای اطلس پاکسینوس و واتسون انجام شد. جهت سنجش تراکم دارک نورونی از رنگامیزی آبی تولوئیدین استفاده شد (۲۸). به طور خلاصه، پس از پرفیوژن از اسلایدهای تهیه شده، فرایند آبدهی با درجات نزولی الکی انجام شد و پس از شستشو، اسلایدها به مدت یک دقیقه در رنگ آبی تولوئیدین ۱ درصد قرار گرفتند. در پایان، برش‌ها مجدداً با درجات صعودی الکل آگیری و پس فرایند شفاف‌سازی، تصویربرداری با میکروسکوپ نوری (Olympus-BH₂, Japan) متصل به سیستم کامپیوتری و آنالیز به کمک نرم افزار استریولایت صورت گرفت.

با روش نمونه‌برداری تصادفی و با استفاده از روش دایسکتور سنجش تراکم دارک نورونی در نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ انجام شد. به طور خلاصه، در این روش سلول‌ها در یک چهارچوب مرجع شمارش شدند. اگر سلولی در هر دو چهارچوب باشد، در شمارش محسوب نمی‌شود. اما اگر سلولی در چهار چوب مرجع باشد، ولی در چهارچوب بعدی (برش دوم) نباشد، مورد شمارش قرار می‌گیرد. پس از شمارش سلول‌ها، دانسیته نورونی، با فرمول $N_A = \sum Q / \sum P \times AH$ محاسبه شد که در آن N_A = دانسیته نورونی، $\sum Q$ = مجموع سلول‌های شمارش

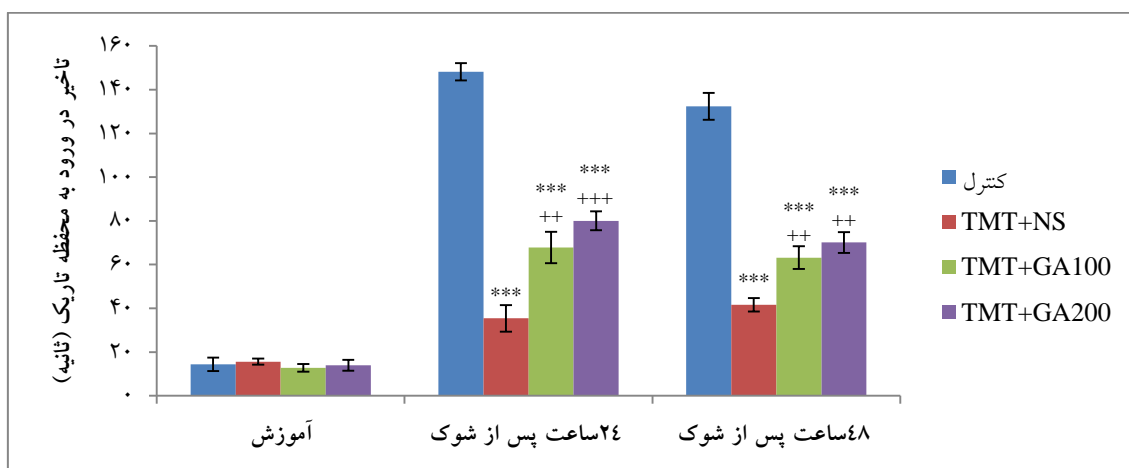
معناداری در مدت زمان حضور در محفظه تاریک داشتند ($p < 0/001$). همچنین، بین گروه TMT+NS با گروه TMT+GA100 و TMT+GA200 کاهش معناداری دیده شد ($p < 0/001$). گروه TMT+GA100 در مقایسه با گروه TMT+GA200 اختلاف معناداری داشت ($p < 0/05$ ، شکل ۳).

سنجش تراکم نورون‌های آپوپتیک (دارک نورون‌ها): در رنگامیزی آبی تولوئیدین، دارک نورون‌ها یا همان نورون‌های آپوپتیک در برش‌های هیپوکامپ قابل مشاهده است. در این مطالعه افزایش تراکم دارک نورون‌ها در نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ در شکل ۵ دیده شد. بر این اساس، تراکم دارک نورون‌ها در این نواحی از هیپوکامپ مورد شمارش قرار گرفت. نتایج حاضر نشان دهنده اختلاف معنادار بین گروه کنترل و گروه TMT+NS در نواحی CA1 و CA3 بود. افزایش تراکم نورون‌های آپوپتیک در گروه TMT+NS در مقایسه با گروه کنترل نشان‌دهنده مرگ سلولی و آپوپتوز در نواحی مورد بررسی هیپوکامپ است ($p < 0/001$). هرچند، در گروه‌های تیمار شده با گالیک اسید در هر دو ناحیه اختلاف معنی‌داری با گروه TMT+NS دیده شد. در واقع، در نواحی CA1 و CA3 و در گروه‌های TMT+GA100 و TMT+GA200 در مقایسه با گروه TMT+NS کاهش معناداری در سطح $p < 0/001$ دیده شد. همچنین، اختلاف معناداری بین گروه TMT+GA100 و TMT+GA200 در ناحیه CA1 و CA3 دیده شد ($p < 0/01$). بین گروه TMT+GA100 با گروه کنترل در ناحیه CA1 ($p < 0/01$) و ناحیه CA3 ($p < 0/05$) اختلاف معنادار دیده شد (شکل ۴).

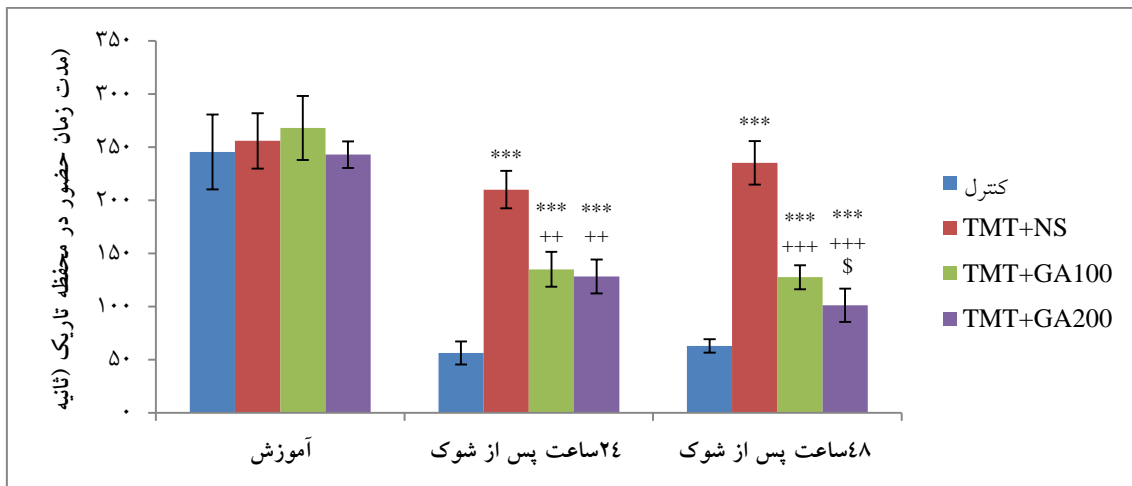
ارزیابی حافظه اجتنابی غیر فعال: در ارزیابی حافظه اجتنابی غیر فعال، اختلاف معناداری در میزان تأخیر در مرحله آموزش (تأخیر ورود به محفظه تاریک قبل از القای شوک)، دیده نشد (شکل ۲). پس از ۲۴ ساعت از القای شوک، کاهش معناداری در تأخیر ورود به محفظه تاریک بین گروه کنترل با گروه‌های TMT+NS، TMT+GA100 و TMT+GA200 وجود داشت ($p < 0/001$). از طرفی، افزایش معناداری در مدت زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک در گروه‌های TMT+GA100 ($p < 0/01$) و TMT+GA200 ($p < 0/001$) نسبت به گروه TMT+NS وجود داشت. (شکل ۲). ۴۸ ساعت پس از القای شوک، کماکان گروه‌های TMT+NS، TMT+GA100 و TMT+GA200 کاهش معنی‌داری در مدت زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک نشان دادند ($p < 0/001$). این در حالی است که در گروه‌های TMT+GA100 و TMT+GA200 در مقایسه با گروه TMT+NS افزایش معنادار دیده شد ($p < 0/01$). سنجش میانگین مدت زمان حضور حیوان در محفظه تاریک، بیانگر اختلافی معنادار بین گروه‌های مطالعه در مرحله آموزش نبود. با این حال، ۲۴ ساعت پس از القای شوک، مدت زمان حضور در محفظه تاریک در گروه‌های TMT+NS، TMT+GA100 و TMT+GA200 نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت. در مقایسه با گروه TMT+NS، گروه‌های TMT+GA100، TMT+EX و TMT+GA200 در سطح $p < 0/001$ کاهش معنادار نشان دادند. پس از ۴۸ ساعت از القای شوک کماکان گروه‌های TMT+NS، TMT+GA100 و TMT+GA200 در مقایسه با گروه کنترل افزایش



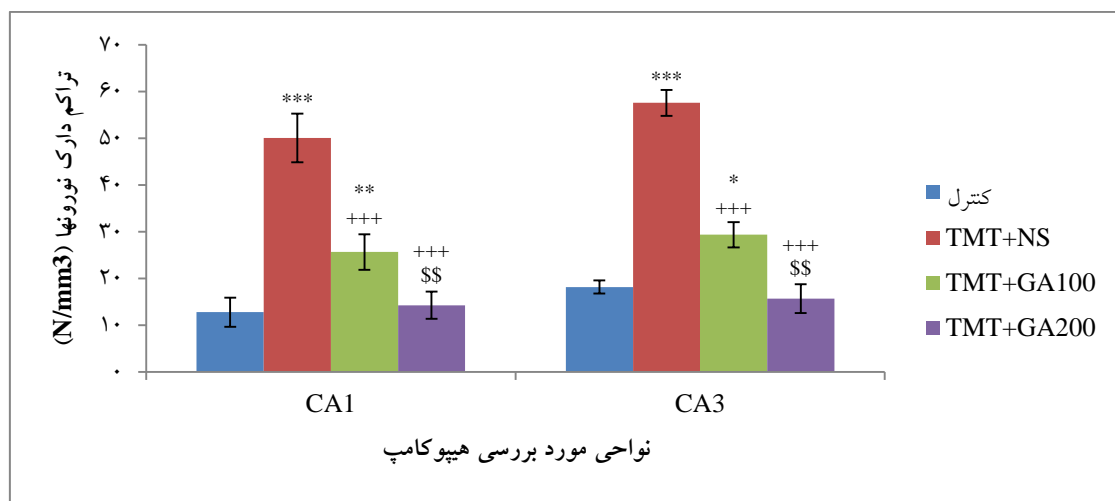
شکل ۱. مقایسه میانگین \pm انحراف استاندارد درصد تناوب صحیح حرکتی در گروه‌های مختلف. نتایج بین گروه کنترل با گروه‌های TMT+NS، TMT+GA100 و TMT+GA200 اختلاف معنادار نشان داد ($p < 0/001$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/05$ و $p < 0/01$). در گروه‌های TMT+GA100 و TMT+GA200 در مقایسه با گروه TMT+NS، افزایش معناداری دیده شد ($p < 0/01$ و $p < 0/05$).



شکل ۲. مقایسه میانگین \pm انحراف استاندارد مدت زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک. در مرحله آموزش، اختلاف معناداری بین گروه‌ها دیده نشد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القای شوک، بین گروه کنترل با گروه‌های TMT+NS و TMT+GA200 و TMT+GA100 اختلاف معناداری دیده شد ($p < 0/001$). همچنین، بین گروه TMT+NS و گروه‌های TMT+GA100 و TMT+GA200 در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القای شوک اختلاف معنادار بود ($p < 0/001$ و $p < 0/01$).



شکل ۳. مقایسه میانگین \pm انحراف استاندارد مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک. در مرحله آموزش، اختلاف معناداری بین گروه‌ها دیده نشد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القای شوک بین گروه کنترل با گروه‌های TMT+NS، TMT+GA100 و TMT+GA200 اختلاف معناداری دیده شد ($p < 0.001$). از طرفی، گروه TMT+NS با گروه‌های TMT+GA100 و TMT+GA200، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القای شوک اختلاف معناداری نشان داد ($p < 0.01$ و $p < 0.001$). ۴۸ ساعت پس از القای شوک، گروه بین گروه TMT+GA100 با گروه TMT+GA200 اختلاف معناداری دیده شد ($p < 0.05$).



شکل ۴. مقایسه میانگین \pm انحراف استاندارد تراکم دارک نورونها در نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ. نتایج نشان دهنده وجود اختلاف معنادار در گروه‌های TMT+NS، TMT+GA100 نسبت به گروه کنترل در نواحی CA1/CA3 است ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$). همچنین، کاهش معناداری در گروه TMT+GA100 و TMT+GA200 در ناحیه CA1 و CA3 نسبت به گروه TMT+NS دیده شد ($p < 0.001$). بین گروه TMT+GA100 و TMT+GA200 در ناحیه CA1/CA3 اختلاف معنادار بود ($p < 0.01$).

بحث

تراکم نورون‌های تیره در نواحی مختلف هیپوکامپ پرداخت و نتایج نشان داد که علیرغم افزایش قابل

مطالعه حاضر به ارزیابی اثر محافظت کننده عصبی گالیک اسید به عنوان یک آنتی اکسیدان بالقوه بر

کردن رنگ های کاتیونی لیوفیلیک را از دست می‌دهد. همچنین، مصرف اکسیژن میتوکندریایی کاهش می‌یابد و سیتوکروم c از میتوکندری آزاد می‌شود (۱۶). مرگ سلولی ناشی از TMT در محیط کشت عمدتاً به دلیل آپوپتوز و با افزایش در شکست DNA، فعال سازی اعضای خانواده کاسپازها و همچنین نکروز می‌باشد (۴).

در موش‌های صحرایی اغلب نورون‌های ناحیه Fascia Dentata از اثرات TMT در امان می‌مانند، اما آسیب‌های گسترده‌ای را در ناحیه CA نشان می‌دهند. مرگ نورونی در نورون‌های هرمی CA1 و CA3 دیده می‌شود. هرچند، در مطالعه‌ای دیده شده است که مرگ نورونی سلول‌های CA3 بسیار بیشتر و سریعتر از ناحیه CA1 است (۱۳)، با این حال در مطالعه حاضر تفاوتی بین شدت آسیب‌دیدگی در دو ناحیه مورد بررسی دیده نشد. آسیب نورونی با دژنراسیون انتخابی جمعیت نورون‌های گاباژریک که حاوی پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم، پاروالبومین و کالرتینین هستند، همراه است (۳۴).

تولید گونه های اکسیژن (ROS) و نیتروژن واکنشی (RNS) نقش مهمی را در میانجی‌گری نورودژنراسیون ناشی از TMT بازی می‌کند. TMT باعث افزایش ROS در بدن موجود زنده و هم در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. مرگ سلولی ایجاد شده توسط TMT ممکن است توسط آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین افزایش سطح گلوتاتیون درون سلولی، کاهش یابد (۱۹).

اسید گالیک دارای اثرات ضد دیابتی، ضد رگ‌زایی و ضد توموری است و می‌تواند شاخص انفارکتوس قلبی را کاهش دهد و از آسیب های اکسایشی کبدی و کلیوی جلوگیری به عمل آورد (۲۷). اسید گالیک، آسیب‌های نورونی و اختلال شناختی را در مدل حیوانی بیماری آلزایمر بهتر می‌کند (۲). همچنین،

توجه جمعیت نورون‌های آپوپتیک در نواحی مورد بررسی هیپوکامپ طی رنگ‌آمیزی با آبی تولوئیدین در گروه دریافت کننده تری‌متیل‌تین (TMT+NS)، تجویز گالیک اسید طی ۴ هفته توانست میزان آسیب سلولی در نواحی مختلف هیپوکامپ را به طور معنی‌داری کاهش دهد.

متعاقب مسمومیت با TMT نورون‌های عصبی در مناطق مختلف هیپوکامپ از بین می‌روند که این تخریب نورونی منجر به اختلالات شناختی و رفتاری می‌گردد (۲۵). حساسیت بالای ناحیه CA1 هیپوکامپ و مشاهده آسیب سلولی در سلول‌های گلپال همراه با بیان سایتوکاین‌های التهابی در این منطقه دیده شده است (۲۱). هیپوکامپ به عنوان مرکز مهم دخیل در فرایندهای حافظه و یادگیری دارای اوران و وایران-های متعددی است. خروجی اصلی هیپوکامپ اکسون سلول‌های هرمی CA1 است که به ساختارهای مختلف مغزی از جمله سیتوم ارسال می‌شوند (۲۹).

در مطالعات انسانی نیز نوعی آسیب پذیری انتخابی نسبت به ایسکمی در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ وجود دارد (۱۷). مطالعات قبلی نشان داده است که تیمار سه هفته‌ای موش‌های صحرایی با TMT یک مدل پیشرونده از مرگ سلول‌های پیرامیدال CA1/CA3 ایجاد می‌کند و مرگ نورونی ناشی از TMT برخی از ویژگی‌های بیماری آلزایمر را در موش‌های صحرایی منعکس می‌کند (۷). همسو با مطالعه فوق آسیب نواحی CA1/CA3 با افزایش تراکم نورون‌ها تیره در تحقیق حاضر دیده شد. وجود آرتیفکت‌های نورونی و تراکم بالای نورون‌های تیره رنگ در نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ با رنگ آمیزی با آبی تولوئیدین در گروه TMT+NS نسبت به گروه کنترل نشان‌دهنده آسیب سلولی و مرگ و میز ناشی از سمیت تری‌متیل‌تین در هیپوکامپ بود. به دنبال تجویز TMT میتوکندری آسیب می‌بیند و توانایی وارد

منابع

1. Al Zahrani NA, El-Shishtawy RM, Asiri AM. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *Eur J Med Chem.* 2020;204:112609.
2. Bazyar Y, Rafiei S, Hosseini A, Edalatmanesh M A. Effect of Endurance Exercise Training and Gallic Acid on Tumor Necrosis Factor- α in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Shefaye Khatam.* 2015; 3 (3) :21-26.
3. Cascella M, Bimonte S, Muzio MR, Schiavone V, Cuomo A. The efficacy of Epigallocatechin-3-gallate (green tea) in the treatment of Alzheimer's disease: an overview of pre-clinical studies and translational perspectives in clinical practice. *Infect Agent Cancer.* 2017;12:36.
4. Childers GM, Perry CA, Blachut B, Martin N, Bortner CD, Sieber S, Li JL, Fessler MB, Harry GJ. Assessing the Association of Mitochondrial Function and Inflammasome Activation in Murine Macrophages Exposed to Select Mitotoxic Tri-Organotin Compounds. *Environ Health Perspect.* 2021;129(4):47015.
5. Corvino V, Marchese E, Michetti F, Geloso MC. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin. *Neurochem Res.* 2013;38(2):240-53.
6. Dlodla PV, Nkambule BB, Jack B, Mkandla Z, Mutize T, Silvestri S, Orlando P, Tiano L, Louw J, Mazibuko-Mbeje SE. Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. *Nutrients.* 2018;11(1):23.
7. Dragić M, Zarić M, Mitrović N, Nedeljković N, Grković I. Two Distinct Hippocampal Astrocyte Morphotypes Reveal Subfield-Different Fate during Neurodegeneration Induced by Trimethyltin Intoxication. *Neuroscience.* 2019;423:38-54.

آسیب مغزی، نقص در LTP هیپوکامپی و آسیب شناختی القا شده پس از هایپوپرفیوژن مغزی را در موش‌های صحرایی بهتر کرده است (۳۱). تیمار با اسید گالیک کاهش میزان التهاب، بهبود در عملکرد الکتروفیزیولوژی مغز و رفتار در موش‌های صحرایی مدل صدمه ترومای مغزی را به دنبال دارد که احتمالاً این عمل را از طریق کاهش سایتوکین‌های پیش التهابی مغزی اعمال می‌کند (۱۴). اسید گالیک دارای اثر حفاظت‌کنندگی عصبی بر آسیب LTP و حافظه مرتبط با صدمه ترومای مغزی از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپید مغزی و سایتوکین‌های پیش التهابی مغزی دارد (۳۰). پیش‌درمانی با اسید گالیک صدمه ایسکمی و ریپرفیوژن مغزی را تصحیح می‌کند و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را در مواجهه با ایسکمی و ریپرفیوژن در موش‌های صحرایی تحریک می‌کند (۲۳).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف گالیک اسید سبب بهبود حافظه کاری و حافظه اجتنابی غیر فعال به همراه کاهش تراکم نورون‌های تیره در نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ در موش‌های صحرایی متعاقب مسمومیت با TMT دارد. به نظر می‌رسد گالیک اسید با اثر حفاظت‌کننده عصبی خود و جلوگیری از مرگ نورونی، سبب بهبود در عملکردهای شناختی در موش‌های صحرایی دچار مسمومیت با TMT می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از زحمات معاونت و مدیریت محترم پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز در اعطای تسهیلات لازم جهت اجرای این پروژه صمیمانه قدردانی می‌شود.

- mediated apoptosis in retinal cells during zebrafish eye development. *Sci Total Environ.* 2019; 653:36-44.
16. Kim SA, Chai JH, Jang EH. Prenatal Trimethyltin Exposure Induces Long-Term DNA Methylation Changes in the Male Mouse Hippocampus. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8009.
17. Lee B, Sur B, Cho SG, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. Wogonin Attenuates Hippocampal Neuronal Loss and Cognitive Dysfunction in Trimethyltin-Intoxicated Rats. *Biomol Ther (Seoul).* 2016;24(3):328-37.
18. Lee S, Yang M, Kim J, Kang S, Kim J, Kim JC, Jung C, Shin T, Kim SH, Moon C. Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration: A mechanism-based review. *Brain Res Bull.* 2016; 125:187-99.
19. Liu Z, Lv J, Zhang Z, Wang B, Duan L, Li C, Xie H, Li T, Zhou X, Xu R, Chen N, Liu W, Ming H. The main mechanisms of trimethyltin chloride-induced neurotoxicity: Energy metabolism disorder and peroxidation damage. *Toxicol Lett.* 2021;345:67-76.
20. Malekzadeh S, Edalatmanesh MA, Mehrabani D, Shariati M. Drugs Induced Alzheimer's Disease in Animal Model. *Galen Medical Journal.* 2017; 6(3):185-96.
21. Mataram MBA, Hening P, Harjanti FN, Karnati S, Wasityastuti W, Nugrahaningsih DAA, Kusindarta DL, Wihadmadyatami H. The neuroprotective effect of ethanolic extract *Ocimum sanctum* Linn. in the regulation of neuronal density in hippocampus areas as a central autobiography memory on the rat model of Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat.* 2021;111:101885.
22. Mignini F, Nasuti C, Artico M, Giovannetti F, Fabrizi C, Fumagalli L, Iannetti G, Pompili E. Effects of trimethyltin on hippocampal dopaminergic markers and cognitive behaviour. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;25(4):1107-19.
8. Edalatmanesh M A, Khodabandeh H, Yazdani N, Rafiei S. Effect of *Cinnamomum Zeylanicum* Extract on Memory and Hippocampal Cell Density in Animal Model of Diabetes. *J Arak Uni Med Sci.* 2018; 21 (6): 56-66. [In Persian]
9. Edalatmanesh MA, Hosseini M, Ghasemi S, Golestani S, Sadeghnia HR, Mousavi SM, Vafae F. Valproic acid-mediated inhibition of trimethyltin-induced deficits in memory and learning in the rat does not directly depend on its anti-oxidant properties. *Ir J Med Sci.* 2016;185(1):75-84.
10. Fabrizi C, Pompili E, Somma F, De Vito S, Ciraci V, Artico M, Lenzi P, Fornai F, Fumagalli L. Lithium limits trimethyltin-induced cytotoxicity and proinflammatory response in microglia without affecting the concurrent autophagy impairment. *J Appl Toxicol.* 2017;37(2):207-213. doi: 10.1002/jat.3344.
11. Ferraz da Silva I, Freitas-Lima LC, Graceli JB, Rodrigues LCM. Organotins in Neuronal Damage, Brain Function, and Behavior: A Short Review. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; 8:366. doi: 10.3389/fendo.2017.00366.
12. Geloso MC, Corvino V, Michetti F. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochemistry Int.* 2011;58(7): 729-38.
13. Hainmueller T, Bartos M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat Rev Neurosci.* 2020;21(3):153-168.
14. Hajipour S, Sarkaki A, Farbood Y, Eidi A, Mortazavi P, Valizadeh Z. Effect of Gallic Acid on Dementia Type of Alzheimer Disease in Rats: Electrophysiological and Histological Studies. *Basic Clin Neurosci.* 2016;7(2):97-106.
15. Kim J, Kim CY, Oh H, Ryu B, Kim U, Lee JM, Jung CR, Park JH. Trimethyltin chloride induces reactive oxygen species-

- hippocampus: What's bad? *Epilepsy Behav.* 2021;121(Pt B):106595.
30. Sarkaki A, Farbood Y, Gharib-Naseri MK, Badavi M, Mansouri MT, Haghparast A, Mirshekar MA. Gallic acid improved behavior, brain electrophysiology, and inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93(8):687-94.
31. Sarkaki A, Fathimoghaddam H, Mansouri SM, Korrani MS, Saki G, Farbood Y. Gallic acid improves cognitive, hippocampal long-term potentiation deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pak J Biol Sci.* 2014;17(8):978-90.
32. Seghatoleslam M, Alipour F, Shafieian R, Hassanzadeh Z, Edalatmanesh MA, Sadeghnia HR, Hosseini M. The effects of *Nigella sativa* on neural damage after pentylenetetrazole induced seizures in rats. *J Tradit Complement Med.* 2015;6(3):262-8.
33. Shams-Alam S, Edalatmanesh M A. The Effete of Lithium Chloride on the Granular Cell Density in Cerebellar Folia V and VI in a Trimethyltin Intoxication Model. *Shefaye Khatam.* 2015; 3 (2) :41-48. [In Persian]
34. Szalak R, Kukula-Koch W, Matysek M, Kruk-Słomka M, Koch W, Czernicka L, Khurelbat D, Biała G, Arciszewski MB. Effect of Berberine Isolated from Barberry Species by Centrifugal Partition Chromatography on Memory and the Expression of Parvalbumin in the Mouse Hippocampus Proper. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4487.
23. Mirshekar MA, Sarkaki A, Farbood Y, Gharib Naseri MK, Badavi M, Mansouri MT, Haghparast A. Neuroprotective effects of gallic acid in a rat model of traumatic brain injury: behavioral, electrophysiological, and molecular studies. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(10):1056-1063.
24. Moghadas M, Edalatmanesh MA, Robati R. Histopathological Analysis from Gallic Acid Administration on Hippocampal Cell Density, Depression, and Anxiety Related Behaviors in A Trimethyltin Intoxication Model. *Cell J.* 2016;17(4):659-67.
25. Moghadas M, Edalatmanesh MA. Protective effect of Lithium Chloride against Trimethyltin-induced hippocampal degeneration and comorbid depression in rats. *Comp Clin Pathol.* 2014; 24:1165-75.
26. Pompili E, Fabrizi C, Fumagalli L, Fornai F. Autophagy in trimethyltin-induced neurodegeneration. *J Neural Transm (Vienna).* 2020;127(7):987-998.
27. Reckziegel P, Dias VT, Benvegnú DM, Boufleur N, Barcelos RCS, Segat HJ, Pase CS, Dos Santos CMM, Flores ÉMM, Bürger ME. Antioxidant protection of gallic acid against toxicity induced by Pb in blood, liver and kidney of rats. *Toxicol Rep.* 2016;3:351-356.
28. Sahraeian S, Rajabpour H, Edalatmanesh M A. The Effect of Sodium Butyrate on Hippocampal Cell Damage and Apoptic Neurons Density in Cerebral Hypoxic-Ischemia Model. *Alborz Uni Med J.* 2021; 10 (2): 153-164. [In Persian]
29. Santos VR, Melo IS, Pacheco ALD, Castro OW. Life and death in the

The Effect of Gallic Acid on Passive Avoidance Memory, Working Memory, and Dark Neuron Cell Density in CA1/CA3 Areas in Rats Hippocampal Degeneration Model

Seyed Kamaladdin Yazdanfar, Mohammad Amin Edalatmanesh^{*}, Seyed Ebrahim Hosseini

Department of Biology, Faculty of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Abstract

Trimethyltin (TMT) intoxication with hippocampal degeneration induces the production of dark neurons in different areas of the hippocampus. The present study assessed the effect of Gallic acid (GA) on working memory, avoidance memory, and the density of dark neurons in the CA1/CA3 regions of the rat hippocampus following TMT intoxication. In this study, 32 adult male Wistar rats were randomly assigned to four groups including control, TMT+NS, TMT+GA100, and TMT+GA200. GA at doses of 100 and 200 mg/kg per body weight was administered orally 24 hours after TMT injection (8 mg/kg). The Y-maze was used to assess the working memory and the shuttle box was used to measure avoidance memory. The density of dark neurons in CA1 and CA3 regions of the hippocampus was then assessed by dissector method. Moreover, in order to determine the existence of significant differences between the groups, one-way ANOVA and Tukey's post hoc test were used and $p < 0.05$ was considered statistically significant. There was a significant decrease in the percentage of alteration behavior, delay in entering the dark room of shuttle box, along with an increased density of dark neurons in the TMT+NS group compared to the control group ($p < 0.001$). While, administration of GA ameliorated the working and avoidance memory and reduced the density of CA1/CA3 dark neurons in the hippocampus compared to TMT+NS group ($p < 0.001$). GA administration appears to improve cognitive symptoms following TMT intoxication by reducing neuronal damage to CA1/CA3 areas of the hippocampus.

Keywords: Trimethyltin, Gallic Acid, Hippocampus, Rat