

The Effect of Gallic Acid on Motor Learning and Cerebellar Level of Brain Derived Neurotrophic Factor in a Rat Model of Autism

Mohammad Amin Edalatmanesh*, Parvin Samimi

Department of Physiology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Article Info:

Received: 9 Feb 2018

Revised: 31 May 2018

Accepted: 2 Jul 2018

ABSTRACT

Introduction: Exposure to Valproic acid (VPA) during pregnancy in rats leads to oxidative stress, brain deficits, and autistic-like behaviors in the offspring. On the other hand, Gallic acid (GA) can effectively be used in the treatment of free radicals-induced nervous system disorders. The aim of this study was to investigate the effect of GA on motor learning and cerebellar level of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in rats embryonically exposed to VPA. **Materials and Methods:** Pups of 30 pregnant rats were randomly divided into 5 groups: control, VPA (500 mg/kg Valproic acid) at embryonic day (ED) 12.5 groups as well as three groups of VPA+GA50, VPA+GA100, and VPA+ GA200 (receiving 50, 100 and 200 mg/kg GA, respectively). GA was orally administered from 12 to 19 ED. Then, to assess the motor disorders beam walking and rotarod tests were carried out at postnatal day 30. Finally, the cerebellar level of BDNF was measured using ELISA. **Results:** Impairments were observed in the motor function test of the VPA group compared to the control rats. In contrast, GA-treated groups have a significant improvement in speed on beam and balance in beam walking test as well as an increase time spent in rotarod as well. A significant increase of BDNF was seen in GA-treated rats compared to VPA group. **Conclusion:** GA can alleviate the adverse effects of VPA on motor learning and balance in a rat model of autism.

Key words:

1. Gallic Acid
2. Valproic Acid
3. Motor Disorders
4. Autistic Disorder
5. Rats

*Corresponding Author: Mohammad Amin Edalatmanesh

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

اثر گالیک اسید بر یادگیری حرکتی و سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در مخچه موش‌های صحرایی مدل اوتیسم

محمد امین عدالت منش^{*}، پروین صمیمی

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

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۱ تیر ۱۳۹۷

اصلاحیه: ۱۰ خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۲۰ بهمن ۱۳۹۶

چکیده

مقدمه: قرار گرفتن در معرض والپروئیک اسید طی بارداری در موش‌های صحرایی باعث استرس اکسیداتیو، آسیب‌های مغزی و رفتارهای شبه اوتیستیک در فرزندان می‌شود. به عبارتی دیگر گالیک اسید در درمان اختلالات سیستم عصبی ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌تواند مؤثر واقع شود. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی اثر گالیک اسید بر یادگیری حرکتی و سطح مخچه‌ای فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در موش‌های صحرایی مواجه شده با والپروئیک اسید در دوران جنینی می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** نوزادان حاصل از ۳۰ سر موش صحرایی باردار به طور تصادفی در ۵ گروه: کنترل، VPA (۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم والپروئیک اسید) در روز ۱۲/۵ بارداری و همچنین ۳ گروه VPA+GA100، VPA+GA50 و VPA+GA200 (به ترتیب گالیک اسید ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند) تقسیم شدند. تجویز دهانی گالیک اسید از روز ۱۲ تا ۱۹ بارداری انجام شد. سپس به منظور بررسی اختلالات حرکتی آزمون‌های راه رفتن شعاعی و روتارود در ۳۰ روزگی انجام شد. سرانجام سطح مخچه‌ای فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت. **یافته‌ها:** اختلال در آزمون‌های حرکتی در گروه والپروئیک اسید در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل مشاهده شد. در مقابل گروه‌های درمان شده با گالیک اسید بهبود معنی‌داری در سرعت پیمایش مسیر و تعادل طی آزمون راه رفتن شعاعی و همچنین افزایش مدت زمان باقی ماندن بر روی روتارود نشان دادند. افزایش معنی‌دار فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در موش‌های صحرایی درمان شده با گالیک اسید در مقایسه با گروه والپروئیک اسید دیده شد. **نتیجه‌گیری:** گالیک اسید می‌تواند سبب کاهش عوارض والپروئیک اسید بر یادگیری حرکتی و تعادل در مدل موش‌های صحرایی اوتیسم شود.

کلید واژه‌ها:

۱. گالیک اسید
۲. والپروئیک اسید
۳. اختلالات حرکتی
۴. اختلال اوتیسم
۵. موش‌های صحرایی

^{*} نویسنده مسئول: محمد امین عدالت منش

آدرس الکترونیکی: amin.edalatmanesh@gmail.com

مقدمه

مختلف مغز تاکنون به صورت قطعی مشخص نشده است.

بین علائم اوتیسم در انسان و علائم یافت شده در مدل‌های حیوانی اوتیسم، شباهت‌های زیادی وجود دارد و همین موضوع می‌تواند باعث شناسایی تغییرات نورواناتومیکی، نوروشیمیایی، رفتاری و شناختی مربوط به اوتیسم شود (۱۱). یکی از داروهای رایج به‌منظور ایجاد مدل بیماری اوتیسم استفاده از داروی والپروئیک اسید (VPA) می‌باشد. VPA، سطح گابا را در خون و مغز افزایش می‌دهد و همچنین از طریق اثر بر روی گیرنده‌های گابا بر روی انتقال گابا اثر می‌گذارد و تعداد گیرنده‌های $GABA_A$ و $GABA_B$ را افزایش می‌دهد و به این طریق باعث افزایش انعطاف‌پذیری در قشر مغز می‌شود (۱۲). همچنین، VPA از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئینی در سلول‌های قشری موش صحرایی باعث افزایش انتقال سیگنالی وابسته به گیرنده‌های NMDA و افزایش انعطاف‌پذیری در قشر می‌شود (۱۳). در جوندگان قرار گرفتن در معرض VPA طی روز ۱۲ ام، یعنی روزی که لوله عصبی بسته می‌شود، می‌تواند باعث به وجود آمدن اختلالاتی شود که در اوتیسم انسانی دیده می‌شود (۱۴). یکی از مکانیسم‌های احتمالی والپروئیک اسید، ایجاد استرس اکسیداتیو و در نتیجه آن اختلال در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیدایش بسیاری از تغییرات نورولوژیک و رفتاری در بیماری اوتیسم ایفاء می‌کند (۱۵).

با وجود اینکه تشخیص و درمان زود هنگام اوتیسم بهترین روش در کمک به درمان این بیماری است، برخی از محققین معتقدند که روش‌های درمانی مکمل دیگری نیز وجود دارند که می‌توانند اثرات سودمندی داشته باشند (۱۶، ۱۷). از انواع این درمان‌ها می‌توان به استفاده از انواع آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره نمود. با توجه به نقش کلیدی آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان عاملی علیه رادیکال‌های آزاد، استفاده از این ترکیبات امروزه اهمیت قابل توجهی در درمان اختلالات ناشی از استرس اکسیداتیو دارند (۱۸). گالیک اسید، یک آنتی‌اکسیدان قوی است که دارای فعالیت‌های ضد جهش‌زایی و ضد سرطان می‌باشد. تأثیرات حفاظتی عصبی بسیاری از پلی‌فنول‌ها از جمله گالیک اسید بر توانایی آن‌ها در نفوذ به سد خونی-مغزی تکیه می‌کنند (۱۹). گالیک اسید، از طریق مهار فعالیت تیروزین کینازی، فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند (۲۰). همچنین، اسید گالیک با کاهش اثر کلسیم درون سلولی در هموستاز کلسیم نقش دارد و اثرات ضد التهابی و ضد

اوتیسم نوعی اختلال رشدی است که با رفتارهای ارتباطی و کلامی غیرطبیعی مشخص می‌شود. این بیماری، یک اختلال تکاملی عصبی است که معمولاً از سن سه سالگی تشخیص داده می‌شود (۱). افراد اوتیستیک، شدیداً دچار اختلالات حرکتی، نظیر دیس پراکسی و آتاکسی، تشنج و نیز حساسیت به برخی محرکات خاص، تغییر در آستانه تحمل به درد، اختلال در فرایندهای دیداری و شنیداری، اختلالات گوارشی مختلف، ادم مغزی، اختلالات هورمونی، اختلال در سیستم‌های ناقلین عصبی^۱ مختلف، استرس اکسیداتیو، التهاب مزمن، نقص در سیستم ایمنی و نقص میتوکندریایی می‌شوند (۲).

دانشمندان در نشست سالانه ۲۰۱۴ علوم اعصاب در واشنگتن ارتباط سلول‌های پورکینز مخچه را با اختلالات طیف اوتیسم نشان دادند (۳). در نوامبر سال ۲۰۱۴، انجمن علوم اعصاب کنفرانس نتیجه شگفت انگیزی از نقش سلول‌های پورکینز مخچه در فرایندهای حرکتی و شناختی درگیر ارائه کرد و شواهدی نشان داده شد که می‌تواند بیانگر نقش سلول‌های پورکینز هر دو نیمکره مخچه به طور مستقیم با اوتیسم باشد (۳). اختلالات مخچه در کودکان اوتیستیک با حذف یک منطقه کروموزومی 22q13 در ارتباط است. حذف این منطقه موجب تأخیر در رشد و در اغلب موارد، اختلال شدید مربوط به زبان در بسیاری از افراد نیز با اوتیستیک تشخیص داده شده است (۴). مطالعات قبلی، کاهش تراکم سلول‌های پورکینز را در بیماران اوتیستیک گزارش کرده‌اند (۵).

تشکیل مدارات عصبی صحیح در طول فرایند تکوین، برای عملکردهای سیستم عصبی ضروری است (۶). مولکول‌های متعددی از جمله: گیرنده‌های گلوتاماتی، پروتئین کیناز C و کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ در تکوین مدار عصبی پورکینز در مخچه نقش دارند (۷). اما یکی از مهم‌ترین این مولکول‌ها، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)^۲ است (۷). BDNF نقش‌های بسیار گسترده‌ای در حفظ حیات نورون‌ها، ایجاد سیناپس‌های جدید، گسترش نورونی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی دارد (۸). همچنین، BDNF و گیرنده آن پردازش سیناپسی فیبرهای بالارونده و نورون‌های پورکینز را در مخچه تعدیل می‌کند (۷). حذف این فاکتور سبب تأخیر در تکامل مخچه می‌گردد (۹). هر چند، نتایج برخی مطالعات حاکی از آن است که تغییر در سطوح این فاکتور در اتیولوژی اختلال اوتیسم نقش دارد (۱۰). اما میزان و نحوه تغییر این فاکتور به‌ویژه به صورت ناحیه‌ای در بخش‌های

¹ Neurotransmitter

² Brain derived neurotrophic factor

³ Valproic acid

⁴ Receptors

میلی گرم بر کیلوگرم والپروئیک اسید (سیگما، آمریکا) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند. همچنین از روز ۱۹ بارداری، حیوانات هم حجم داروی گاوژ شده در گروه‌های تجربی، حلال گالیک اسید (سیگما، آمریکا) یعنی نرمال سالین را به صورت گاوژ دریافت کردند. گروه‌های VPA+GA50، VPA+GA100 و VPA+GA200: در این گروه‌ها مادران در روز ۱۲/۵ بارداری والپروئیک اسید دریافت کردند و همچنین از روز ۱۰ بارداری تا ۱۹ بارداری، دوزهای متفاوت گالیک اسید (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان) را به صورت گاوژ دریافت کردند.

آزمون‌های رفتاری

آزمون‌های حرکتی (شامل آزمون راه رفتن شعاعی و روتارود) در ۳۰ روزگی نوزادان نسل اول ($n=20$) و در ساعاتی از شبانه روز که تحرک موش‌های صحرایی بالاست (بین ساعت ۱۷ تا ۲۰) انجام شد.

آزمون راه رفتن شعاعی: برای ارزیابی هماهنگی حرکتی در موش‌های صحرایی مورد استفاده قرار گرفت. ابزار مورد نیاز برای این تست عبارتست از یک میله چوبی به قطر ۳ سانتی‌متر و طول یک متر که ۳۰ سانتی‌متر بالاتر از سطح میز قرار دارد و در یک انتها به یک سکوی ۴۰ سانتی‌متر مربعی ختم می‌شود. حیوانات قبل از انجام آزمایش چند دقیقه بر روی این میله چوبی قرار خواهند گرفت و به آن‌ها آموخته خواهد شد که به سمت سکو حرکت کنند. در هر روز سه بار متوالی موش‌های صحرایی بر روی این میله چوبی قرار خواهند گرفت و مدت زمان رسیدن از ابتدا به انتهای این میله و نیز سرعت حرکت آن‌ها ثبت و محاسبه خواهد شد. مدت زمان یک دقیقه برای قطع آزمایش در نظر گرفته شد. برای موش‌های صحرایی که قادر نیستند تمام طول میله را طی کنند و از روی آن می‌افتند، مسافت پیموده شده به همراه سرعت حرکت محاسبه خواهد شد (۲۵).

آزمون روتارود (میله چرخان): دستگاه روتارود با قابلیت افزایش خود به خودی تعداد دور در دقیقه برای ارزیابی هماهنگی حرکتی و یادگیری حرکتی طراحی شده است (۲۵). حیوانات بر روی میله چرخان این دستگاه در محل خود قرار داده شده و دستگاه روشن می‌شود. در ابتدای هر دوره آزمایش دستگاه از تعداد ۵ دور (حداقل دور) در دقیقه شروع به چرخش می‌کند و این تعداد دور در زمان ۵ دقیقه به ۴۵ دور در دقیقه (ماکزیمم دور) خود می‌رسد. دو روز قبل از انجام این آزمایش، حیوانات با دستگاه آشنا می‌شوند. سپس در روز آزمون، توانایی موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف برای حفظ تعادل و یادگیری حرکتی آن‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. برای هر حیوان میانگین مدت زمان حفظ تعادل و ماندن بر روی میله چرخان

آپوتوزی دارد (۲۱). همچنین، اسید گالیک سبب بهبود اختلالات عصبی مختلف، از جمله بیماری آلزایمر (۲۲) و نفروپاتی دیابتی می‌گردد (۲۳).

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر درمانی اسید گالیک بر یادگیری حرکتی و غلظت مخچه‌ای BDNF در مدل حیوانی اوتیسم القاء شده با والپروئیک اسید انجام شد.

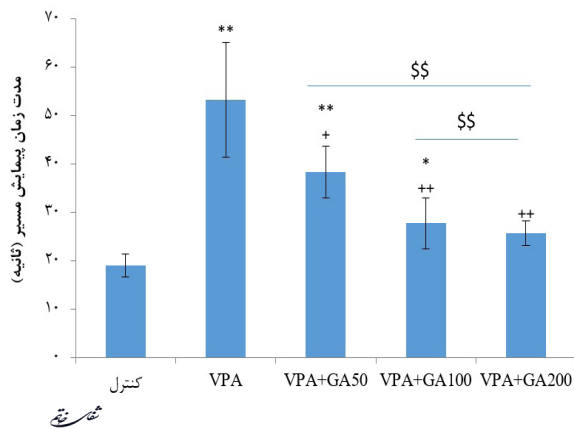
مواد و روش‌ها

حیوانات و گروه‌بندی

حیوانات مورد آزمایش در این مطالعه تجربی، زاده‌های نسل اول از ۳۰ سر موش صحرایی ماده بالغ با میانگین وزنی 10 ± 180 گرم (جهت بارداری) و ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ (جهت جفتگیری) از نژاد اسپراگ داولی می‌باشند که از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از به دنیا آمدن نوزادان تا ۲۴ روزگی در کنار مادرانشان نگهداری شدند و سپس از شیر گرفته شده و تا یک ماهگی در قفس‌های خود نگهداری شدند. سپس از بین نوزادان تعداد ۲۰ نوزاد موش صحرایی به صورت تصادفی از هر گروه انتخاب شدند. در تمام مراحل کار با حیوانات اصول اخلاقی، قوانین بین‌المللی و ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه (شماره مجوز: ۷۲۹۸-۱۴-۳۰-۹۴) رعایت شد.

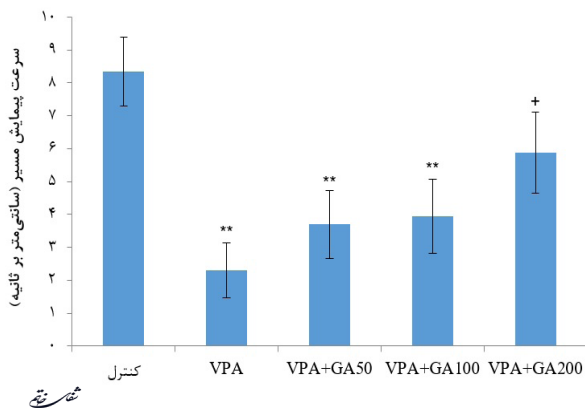
قبل از گروه‌بندی، ابتدا از موش‌های صحرایی ماده، اسمیر واژنی تهیه شد و حیواناتی که در سیکل استروس قرار داشتند، با حیوان نر هم قفس شدند تا جفتگیری انجام شود. موش‌های صحرایی ماده‌ای که دارای ۲ الی ۳ دوره استروس منظم در طی ۱۲ الی ۱۴ روز مشاهده اسمیر واژینال بودند، استفاده شد. جهت تهیه اسمیر واژنی، ابتدا ۰/۲۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی توسط سمپلر به آرامی در واژن حیوان تزریق شد. سپس یک تا دو قطره از مایع فوق برداشته و اسمیر تهیه شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر بررسی شدند. موش‌هایی که در مرحله استروس سیکل تولیدمثلی قرار داشتند، جهت مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند (۲۴). همچنین، جهت اطمینان از جفتگیری، روز بعد دوباره حیوانات مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت مشاهده پلاک واژنی و یا وجود سلول‌های اسپرماتوزوآ در اسمیر واژنی، آن روز به عنوان روز صفر حاملگی تعیین می‌شد.

در این پژوهش موش‌های صحرایی باردار، بعد از وزن کردن اولیه، به طور تصادفی در ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل: این گروه تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و فقط از آب و غذای استاندارد آزمایشگاهی استفاده کردند. گروه والپروئیک اسید: در این گروه موش صحرایی ماده در روز ۱۲/۵ بارداری میزان ۵۰۰



نمودار ۱- میانگین مدت زمان پیمودن مسیر بر روی میله چوبی در گروه‌های مورد بررسی. نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با گروه‌های VPA، VPA+GA50 و VPA+GA100 می‌باشد ($P < 0.01$) و ($P < 0.05$). همچنین، بین گروه‌های دریافت‌کننده گالیک اسید با گروه VPA اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.01$ و $P < 0.05$). بین گروه‌های VPA+GA50 و VPA+GA100 و VPA+GA200 با گروه VPA نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P < 0.01$). داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.

($2/3 \pm 0/83$ سانتی‌متر بر ثانیه) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل ($8/34 \pm 1/05$ سانتی‌متر بر ثانیه) نشان داد ($P < 0.01$). این در حالی است که تنها در گروه VPA+GA200 ($5/1 \pm 87/23$ سانتی‌متر بر ثانیه) افزایش معنی‌داری در سرعت پیمایش مسیر نسبت به گروه VPA دیده شد ($P < 0.05$). بین گروه‌های VPA+GA50 ($3/1 \pm 7/03$ سانتی‌متر بر ثانیه) و VPA+GA100 ($3/1 \pm 95/12$ سانتی‌متر بر ثانیه) با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار است (نمودار ۲، $P < 0.01$).



نمودار ۲- میانگین سرعت پیمایش مسیر بر روی میله چوبی در گروه‌های مورد بررسی. اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه‌های VPA، VPA+GA50 و VPA+GA100 دیده شد ($P < 0.01$). همچنین، بین گروه VPA+GA200 با گروه VPA اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.

بررسی مدت زمان باقی ماندن بر روتارود

میانگین مدت زمان باقی ماندن بر روی میله چرخان (روتارود) در تمامی گروه‌های تیمار شده با والپروئیک اسید در دوران جنینی نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی را نشان داد (نمودار ۳). به گونه‌ای که بین گروه کنترل ($245/34 \pm 6/2$ ثانیه) با گروه‌های VPA

با حداقل سه تکرار ثبت شد (۲۵).

سنجش سطح مخچه‌ای BDNF

به دنبال بیهوشی حیوانات با استفاده از اتر، سر حیوانات با گیوتین جدا شد و با خارج نمودن مغز، مخچه از بقیه قسمت‌های مغز جدا گردید. پس از شستشو با محلول سالین به همراه بافر تریس (سیگما، آلمان) به مدت ۵ دقیقه با دستگاه هموژنایزر (IKA, Germany) با ۵۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه شد. محلول هموژنیزه شده توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hermle, Germany) سانتریفیوژ شد. جهت جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (سانتریفیوژ یخچال‌دار) انجام شد و از محلول ۰/۵ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (Sigma-Aldrich, Germany) به‌عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده شد (۲۶). پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به کمک سمپلر برداشته شد و سپس میزان بافتی BDNF توسط روش ELISA و به کمک دستگاه الایزا ریدر مدل 2100 (Stat Fax, USA) و کیت شرکت باستر (Rat BDNF Picokine TM, Boster, China) مورد سنجش قرار گرفت.

تحلیل آماری

اعداد خام به دست آمده از مطالعات رفتاری توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ و از طریق روش ANOVA یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی برای هر آزمون جداگانه آنالیز و با یکدیگر مقایسه شدند و نمودارهای آن‌ها بر اساس اطلاعات به دست آمده از آنالیز اعداد رسم گردیدند. مقادیر به کار گرفته شده میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار (SEM) و سطح معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشد.

یافته‌ها

ارزیابی سرعت و مسافت در آزمون راه رفتن شعاعی

با توجه به نمودار ۱ مدت زمان پیمودن مسیر میله چوبی جهت بررسی یادگیری حرکتی در گروه VPA ($53/2 \pm 11/8$ ثانیه) افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل ($19/2 \pm 11/3$ ثانیه) در سطح $P < 0.01$ نشان داد. همچنین، بین گروه‌های VPA+GA50 ($38/5 \pm 3/4$ ثانیه، $P < 0.01$) و VPA+GA100 ($27/5 \pm 7/3$ ثانیه، $P < 0.05$) نیز با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دیده شد. مدت زمان پیمودن مسیر میله چوبی در هر سه گروه دریافت‌کننده اسید گالیک، به‌ویژه گروه VPA+GA200 ($25/2 \pm 7/5$ ثانیه، $P < 0.01$) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه VPA نشان داد. همچنین، بین گروه‌های VPA+GA50 و VPA+GA100 با گروه VPA+GA200 نیز اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.01$).

سرعت پیمایش مسیر میله چوبی در گروه VPA

بحث و نتیجه گیری

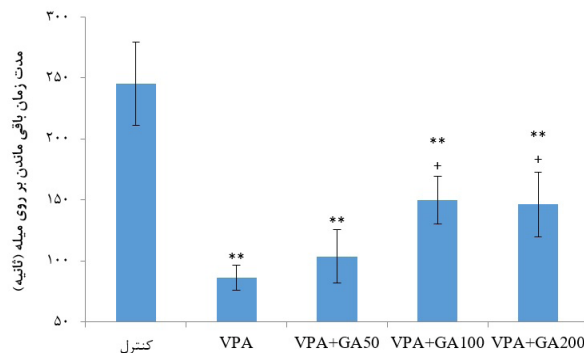
اثرات اپی ژنتیکی حاصل از تجویز VPA طی بارداری، سبب تغییراتی در بیان برخی از ژن‌ها یا فاکتورهای خاص که به‌ویژه در فرایندهای مربوط به انعطاف‌پذیری یا مرگ نورونی، از جمله نورون‌زایی مرگ سلولی، نقش دارند و یا باعث فعالسازی برخی از مسیرهای پیام‌رسانی سلولی می‌گردند (۲۷). این اثرات احتمالاً توجیه‌کننده تغییرات میکروآنتومیک دیده شده در موش‌های صحرایی مدل VPA اوتیسم می‌باشند (۲۸). هر چند، تیمار با VPA طی دوران بارداری علی‌رغم افزایش ریسک ابتلاء به اوتیسم، سبب تسهیل درحافظه کاری به همراه افزایش بیان سرمی BDNF می‌شود (۲۹). با این حال مطالعات نشان داده است که عدم تکامل صحیح مخچه یا کند شدن تکامل آن ممکن است با کاهش سطح BDNF در مخچه همراه باشد (۷). به طور کلی می‌توان گفت که مخچه نقش کلیدی را در یادگیری و انجام وظایف حرکتی ایفاء می‌کند (۳۰). آسیب به مخچه موجب اختلالاتی در حرکت و پشتیبانی بدن و اغلب ناهماهنگی حرکات بدن می‌شود (۳۰).

در این پژوهش آزمون روتارود جهت بررسی یادگیری حرکتی استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که گروه VPA نسبت به گروه کنترل میزان یادگیری حرکتی و تعادل به مراتب کمتر است. از طرفی در گروه‌های تحت تیمار با گالیک اسید مدت زمان باقی ماندن بر روی میله چرخان به‌ویژه در دوز ۲۰۰ میلی گرم به طور قابل توجهی نسبت به گروه VPA افزایش می‌یابد. در آزمون راه رفتن شعاعی، مدت زمان پیمودن مسیر بر روی میله چوب در موش‌های صحرایی گروه VPA نسبت به کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود. در واقع، حیوانات گروه VPA توانایی کمتری در برقراری تعادل به هنگام راه رفتن از خود نشان دادند.

Teitelbaum و همکارانش نشان دادند که موش‌های صحرایی که در معرض VPA قرار می‌گیرند در هماهنگی حرکات و یادگیری آن‌ها اختلال وجود داشته و در بروز رفلکس‌های عصبی نیز تأخیر دارند (۳۱).

نتیجه حاصل از آزمون‌های حرکتی در این مطالعه، نشان می‌دهند که احتمالاً کاهش قدرت تعادل و یادگیری حرکتی در موش صحرایی مدل VPA اوتیسم، نسبت به گروه کنترل، می‌تواند ناشی از کاهش محتوای BDNF یا آسیب به سلول‌های پورکینز باشد. همان گونه که قبلاً نیز اشاره شد، به نظر می‌رسد رفتارهای تکراری و بیش فعالی، به‌عنوان یکی از علائم عمومی طیف اختلالات اوتیسم، ممکن است به علت آسیب مخچه‌ای و کاهش تعداد سلول‌های پورکینز باشد و کاهش جمعیت سلول‌های پورکینز مخچه نهایتاً می‌تواند منجر به اختلال و ضعیف شدن هماهنگی‌های حرکتی گردد. در نتیجه این آزمون نیز می‌تواند به نوعی بیانگر

(۴/۱۰±۸۶/۳ ثانیه)، VPA+GA50 (۹/۲۱±۱۰۳/۷ ثانیه)، VPA+GA100 (۵/۱۹±۱۵۰/۰۸ ثانیه) و VPA+GA200 (۸/۲۶±۱۴۶/۳۲ ثانیه) اختلاف معنی‌دار است ($P<0.001$). در بین گروه‌های دریافت‌کننده گالیک اسید گروه VPA+GA100 و VPA+GA200 نسبت به گروه VPA افزایش معنی‌داری را در بهبود یادگیری و تعادل حرکتی با افزایش مدت زمان باقی ماندن بر روی روتارود نشان داد ($P<0.05$).

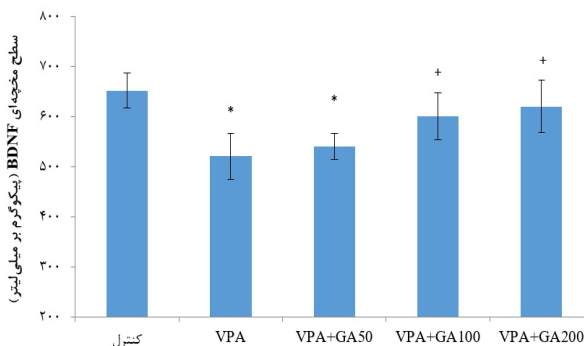


شماره ۳

نمودار ۳- میانگین مدت زمان باقی ماندن بر روتارود در گروه‌های مورد بررسی. اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه‌های دیگر دیده شد ($P<0.001$) و ($P<0.05$). همچنین، بین گروه‌های VPA+GA100 و VPA+GA200 با گروه VPA اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0.05$). داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.

سنجش سطح مخچه‌ای BDNF

نتایج نشان داد که سطح مخچه‌ای فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در گروه‌های VPA (۳/۹۴±۵۲۰/۴۶ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) و VPA+GA50 (۱۸/۴۶±۵۴۰/۲۶ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (۱۷/۳۵±۶۵۱/۷۸ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) دارد ($P<0.05$). این در حالی است که گروه‌های دریافت‌کننده گالیک اسید با دوز ۱۰۰ (۶/۴۷±۶۰۱/۲۲ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) و ۲۰۰ (۲۱/۵۳±۶۲۰/۵۳ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به گروه VPA افزایش معنی‌داری را در سطح بیان مخچه‌ای BDNF نشان دادند ($P<0.05$ ، نمودار ۴).



شماره ۴

نمودار ۴- میانگین غلظت فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در مخچه گروه‌های مورد بررسی. بین گروه کنترل با گروه‌های VPA و VPA+GA50 اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0.05$). همچنین، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های VPA+GA100 و VPA+GA200 با گروه VPA دیده شد ($P<0.05$). داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.

پورکینز نقش اساسی ایفاء می‌کند کاهش میزان این فاکتور سبب اختلال در عملکرد این سلول می‌گردد (۷). به طور کلی سلول‌های پورکینز در بیماری‌زایی اختلالات تحلیل برندهٔ عصبی مانند آتاکسی نخاعی -مخچه‌ای، اوتیسم و انسفالوپاتی دخالت دارد (۳۵).

ترکیبات فنولی کوچک مانند گالیک اسید، پروتوکاتچوئیک اسید^۸، تایروزول^۹، اسید کافئیک و اسید کافتاریک^{۱۰} همانند دیگر فلاونوئیدها می‌توانند اثرات مؤثری بر حافظه از طریق تعدیل در مسیر سیگنالی هیپوکامپ و بیان پروتئین‌هایی نظیر BDNF ایفاء می‌نمایند (۳۸). مطالعات قبلی ما نقش گالیک اسید را به‌عنوان ترکیب حمایت‌کنندهٔ عصبی در مدل دژنراسیون هیپوکامپ به‌عنوان مدلی از بیماری آلزایمر نشان داده است (۳۹). طی واکنش‌های استرس اکسیداتیو سطح تیول تام و فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx)^۹ کاهش می‌یابد در حالی که میزان مالون دی آلدئید (MDA)^{۱۰} در نواحی مختلف مغزی افزایش می‌یابد (۳۲). گالیک اسید با افزایش تیول تام و فعالیت آنزیم GPx و کاهش MDA اثرات استرس اکسیداتیو را در سلول‌ها کاهش می‌دهد (۳۲). همچنین، این ترکیبات از طریق تعدیل در مسیر سیگنالی و بیان پروتئین‌هایی نظیر BDNF می‌توانند اثرات نوروتروفیک در مناطق مختلف مغزی ایفاء نمایند (۳۸، ۴۰).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که والپروئیک اسید سبب ایجاد اختلال حرکتی در موش صحرایی مورد آزمایش شده است و گالیک اسید سبب بهبود اختلالات حرکتی در این حیوانات شده است. همچنین، گالیک اسید با افزایش سطح BDNF مخچه بهبود یادگیری حرکتی در حیوانات تحت تیمار با والپروئیک اسید در دوران جنینی را به دنبال داشته است. مطالعهٔ حاضر نقش مؤثر آنتی‌اکسیدان‌ها به‌ویژه اسید گالیک را در بهبود علایم حرکتی در بیماران اوتیستیک توصیه می‌کند.

تشکر و قدردانی

لازم به ذکر است بخشی از منابع مالی این پروژه توسط معاونت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز و در قالب پژوهانه تأمین شده است. از زحمات مدیریت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز در اعطای تسهیلات لازم جهت اجرای این پروژه صمیمانه قدردانی می‌شود.

وضعیت آسیب به مخچه و سلول‌های پورکینز آن باشد (۱۵). همچنین، آنچه که مسلم است در گروه‌های دریافت‌کنندهٔ گالیک اسید توانایی بیشتری در برقراری تعادل به هنگام راه رفتن نسبت به گروه VPA وجود دارد که نشان‌دهندهٔ اثرات مثبت گالیک اسید بر یادگیری حرکتی در مدل اوتیسم VPA می‌باشد. نتایج مطالعات منصوری در سال ۲۰۱۳ نشان داد که گالیک اسید به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از آسیب مغزی و اختلالات ناشی از آسیب‌های مغزی که ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشد جلوگیری کند به طوری که این اثرات محافظتی، به صورت وابسته به دوز می‌باشد (۳۲) در این مطالعه نیز مشخص گردید که دوز بالای گالیک اسید (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) اثرات مؤثرتری را در بهبود اختلالات حرکتی نشان می‌دهد.

نوروتروفین‌ها تنظیم‌کننده‌های اصلی تکوین، رشد و تمایز بخش‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی و محیطی هستند. عملکرد نوروتروفین‌ها توسط دو گیرندهٔ سطح سلولی: گیرندهٔ تیروزین کینازی و گیرندهٔ نوروتروفینی p75 میانجی‌گری می‌شود (۳۳). BDNF یکی از نوروتروفین‌هایی است که در سرتاسر زندگی در مغز تولید می‌شود و دارای اثرات تروفیک در رشد و تکوین سیستم عصبی می‌باشد. علاوه بر اثرات تروفیک در نورون‌های هدف، BDNF بخشی از مکانیسم تعدیل وابسته به فعالیت سیناپسی محسوب می‌شود (۳۴). مطالعات نشان داده‌اند که BDNF با بیماری‌زایی^۵ بیماری‌های عصبی -روانی متعددی از قبیل اسکیزوفرنی، افسردگی، ایسکمی مغزی، بیماری آلزایمر، بیماری هانتینگتون و بیماری پارکینسون، ارتباط دارد (۳۵). از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که افزایش اولیهٔ فعالیت BDNF، ممکن است نقش اتیولوژیکی در اوتیسم، طی دوران ابتدایی زندگی ایفاء نماید. هرچند، برخی از یافته‌ها نشان داده‌اند که سطوح BDNF، سرم خون در گروه مبتلا به اوتیسم، در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است (۳۶). علاوه بر این افزایش فعالیت BDNF، ممکن است با افزایش رشد مغز پس از تولد، در کودکان اوتیستیک ارتباط داشته باشد (۳۷). با این حال، مطالعهٔ حاضر نشان داد که میزان این فاکتور در مخچه کاهش قابل توجهی در مدل اوتیسم داشته است. از آنجایی که BDNF در انعطاف‌پذیری نورون‌های

^۵ Pathogenicity

^۶ Protocatechuic acid

^۷ Tyrosol

^۸ Caffeic acid

^۹ Glutathione peroxidase

^{۱۰} Malondialdehyde

- Shinoda Y, Sadakata T, Furuichi T. Animal models of autism spectrum disorder (ASD): a synaptic-level approach to autistic-like behavior in mice. *Exp Anim*. 2013; 62(2): 71-8.
- Hastings PR, Brown T. Behavior problems of children with autism, parental self-efficacy, and mental health. *Am J Ment Retard*. 2002; 107(3): 222-32.
- Deweerd S. Mounting evidence implicates cerebellum in autism. *SFARI*. 2014; 8: 1-6.
- Skefos J, Christopher C, Katelyn E, Holiday J, Weed K, Levy E, et al. Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. *PLoS One*. 2014; 10: 1371. doi.org/10.1371/journal.pone.0081255.
- Bergland Ch. How are purkinje cells in the cerebellum linked to autism? *The Athlete's Way*. 2014; 519: 14-51.
- Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Liu JQ, Kusaka T, Suzuki S, et al. Differential effects of neonatal maternal separation on the expression of neurotrophic factors in rat brain. II: regional differences in the cerebellum versus the cerebral cortex. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 2013; 90(3): 53-8.
- Choo M, Miyazaki T, Yamazaki M, Kawamura M, Nakazawa T, Zhang J, et al. Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum. *Nat Commun*. 2017; 8(1): 195. doi: 10.1038/s41467-017-00260-w.
- Kim J, Lee S, Kang S, Kim SH, Kim JC, Yang M, et al. Brain-derived neurotrophic factor and GABAergic transmission in neurodegeneration and neurodegeneration. *Neural Regen Res*. 2017; 12(10): 1733-41.
- Bath KG, Pimentel T. Effect of early postnatal exposure to valproate on neurobehavioral development and regional BDNF expression in two strains of mice. *Epilepsy Behav*. 2017; 70(Pt A): 110-7.
- Rahmani F, Rezaei N. brain-derived neurotrophic factor role in autism remains elusive: a flashback on the route that has brought us here. *Acta Med Iran*. 2017; 55(12): 733-5.
- Iwata K, Matsuzaki H, Takei N, Manabe T, Mori N. Animal models of autism: an epigenetic and environmental viewpoint. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2010; 2: 37-44.
- Rinaldi T, Kulangara K, Antonello K, Markram H. Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(33): 13501-6.
- Kang J, Kim E. Suppression of NMDA receptor function in mice prenatally exposed to valproic acid improves social deficits and repetitive behaviors. *Front Mol Neurosci*. 2015; 8: 17. doi: 10.3389/fnmol.2015.00017.
- Nicolini C, Fahnstock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol*. 2018; 299(Pt A): 217-27.
- Khongrum J, Wattanathorn J. Laser acupuncture at HT7 improves the cerebellar disorders in valproic acid-rat model of autism. *J Acupunct Meridian Stud*. 2017; 10(4): 231-9.
- Rahimian S, Amin Yazdi A, Edalatmanesh MA. Environmental enrichment: a new therapy based on findings in animal models of autism. *Shefaye Khatam*. 2016; 4 (4) :89-98.
- Yui K, Kawasaki Y, Yamada H, Ogawa S. Oxidative stress and nitric oxide in autism spectrum disorder and other neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2016; 15(5): 587-96.
- Alasalvar C, Bolling BW. Review of nutraceuticals, fat-soluble bioactives, antioxidant components and health effects. *Br J Nutr*. 2015; 113(2): S68-78.
- Choubey S, Varughese LR, Kumar V, Beniwal V. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharm Pat Anal*. 2015; 4(4): 305-15.
- Sarjit A, Wang Y, Dykes GA. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food Microbiol*. 2015; 46: 227-33.
- Hsieh SC, Wu CC, Hsu SL, Yen JH. Molecular mechanisms of gallic acid-induced growth inhibition, apoptosis, and necrosis in hypertrophic scar fibroblasts. *Life Sci*. 179: 130-8.
- Rafiei S, Bazayr Y, Edalatmanesh MA. Effect of gallic acid and endurance exercise training on bdnf in a model of hippocampal degeneration. *Shefaye Khatam*. 2016; 4(1) :1-6.
- Garud MS, Kulkarni YA. Gallic acid attenuates type I diabetic nephropathy in rats. *Chem Biol Interact*. 2018;

282: 69-76.

24. Sadoghi SD, Rahbariyan R. Investigation the effect of glycyrrhizic acid on ovarian follicle in polycystic ovarian syndrome mice model. *SJIMU*. 2017; 24(6): 138-48.

25. Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Moghadas M, Haddad-Mashadrizesh A, Robati R, Hashemzadeh MR. Histopathological and behavioral assessment of toxin-produced cerebellar lesion: a potent model for cell transplantation studies in the cerebellum. *Cell J*. 2014; 16(3): 325-34.

26. Sadoughi D, Khayatizadeh J. Effect of curcumin on hippocampal levels of brain-derived neurotrophic factor and serum levels of inflammatory cytokines in rat model for Alzheimer's disease. *Shefaye Khatam*. 2018; 6(1): 1-9.

27. Chris tensen J, Gronborg TK, Sorensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*. 2013; 309(16): 1696-703.

28. Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Vafae F, Moghadas M. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain Res*. 2013; 1526: 15-25.

29. Borzou Z, Edalatmanesh MA. The evaluation of brain derived neurotrophic factor and working memory in valproic acid animal model of autism. *Shefaye Khatam*. 2015; 3(4): 10-6.

30. Starowicz-Filip A, Chrobak AA, Moskała M, Krzyżewski RM, Kwinta B, Kwiatkowski S, et al. The role of the cerebellum in the regulation of language functions. *Psychiatr Pol*. 2017; 51(4): 661-71.

31. Teitelbaum P, Teitelbaum O, Fryman J, Maurer R. Infantile reflexes gone astray in autism. *J Dev Learn Disord*. 2000; 6: 15-22.

32. Mansouri MT, Farbood Y, Sameri JM, Sarkaki A,

Naghizadeh B, Rafieirad M. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chemistry*. 2012; 138(2-3): 1028-33.

33. Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol*. 2005; 15(1): 49-57.

34. Kishi T, Yoshimura R, Ikuta T, Iwata N. Brain-derived neurotrophic factor and major depressive disorder: evidence from meta-analyses. *Front Psychiatry*. 2018; 8: 308. doi: 10.3389/fpsy.2017.00308.

35. Vazquez-Sanroman D, Sanchis-Segura C, Toledo R, Hernandez ME, Manzo J, Miquel M. The effects of enriched environment on BDNF expression in the mouse cerebellum depending on the length of exposure. *Behav Brain Res*. 2013; 243: 118-28.

36. Soori M, Edalatmanesh MA. Survey of serum levels of brain-derived neurotrophic factor in autistic rats. *J Clin Res Paramed Sci*. 2014; 3(4): 264-70.

37. Meng WD, Sun SJ, Yang J, Chu RX, Tu W, Liu Q. Elevated serum brain-derived neurotrophic factor (bdnf) but not bdnf gene val66met polymorphism is associated with autism spectrum disorders. *Mol Neurobiol*. 2017; 54(2): 1167-72.

38. Corona G, Vauzour D, Hercelin J, Williams CM, Spencer JP. Phenolic acid intake, delivered via moderate champagne wine consumption, improves spatial working memory via the modulation of hippocampal and cortical protein expression/activation. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19(14): 1676-89.

39. Doroodi L, Edalatmanesh MA. The histopathological evaluation of gallic acid on rat purkinje cells after trimethyltin intoxication. *Shefaye Khatam*. 2017; 5(2): 11-8.

40. Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Talas ZS, Nabavi SM. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! *Curr Pharm Biotechnol*. 2014; 15(4): 362-72.