

Effect of Trans-cinnamic Acid on Cognitive Deficit, Cell Density of CA1/CA3 Regions, and Cholinergic Activity of Hippocampus in Trimethylettin Model of Alzheimer's Disease

Shima Mokhtarkia¹ , Mohammad Amin Edalatmanesh^{1*} 

¹ Dept of Biology, Faculty of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 06 June 2022
Revised: 05 September 2022
Accepted: 03 October 2022
Published Online: 26 February 2023

*** Correspondence to:**
Mohammad Amin Edalatmanesh
Dept of Biology, Faculty of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
Email:
amin.edalatmanesh@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Trimethyltin (TMT) intoxication is associated with damage to the cholinergic system in the hippocampus. The aim of this study was to evaluate the effect of trans-cinnamic acid on cognitive deficit and cell damage in CA1/CA3 regions of the hippocampus, as well as measure the activity of acetyl choline esterase (AChE) in the hippocampus of a rat model of Alzheimer's disease (AD).
Material & Methods: In this experimental study, 40 adult male Wistar rats were randomly divided into four groups: control, TMT+Saline, TMT+CIN20, and TMT+CIN40. The AD model was induced by intraperitoneal injection of 8 mg/kg TMT body weight, and 72 h after TMT administration, doses of 20 and 40 mg of trans-cinnamic acid were gavaged daily for four weeks. Subsequently, working memory, passive avoidance learning, neuronal density in hippocampal CA1 and CA3 regions, and AChE enzyme activity were measured in this study.
(Ethic Code: IR.IAU.SHIRAZ.REC.1400.014)

Findings: There was a significant increase in CA1/CA3 neuronal density, percentage of motor frequency, and improved passive avoidance memory in the groups receiving trans-cinnamic acid, compared to the group receiving normal saline. Moreover, AChE enzyme activity in the hippocampus, especially in the TMT+CIN40 group, increased significantly, compared to the TMT+Saline group.

Discussion & Conclusion: It seems that trans-cinnamic acid with AChE inhibitory effects improves cognitive decline and hippocampal cell damage in the TMT model of AD.

Keywords: Acetylcholinesterase, Cinnamic Acid, Dementia, Rat, Trimethylettin

➤ How to cite this paper

Mokhtarkia S, Edalatmanesh MA. Effect of Trans-cinnamic Acid on Cognitive Deficit, Cell Density of CA1/CA3 Regions, and Cholinergic Activity of Hippocampus in Trimethylettin Model of Alzheimer's Disease. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(1): 1-12.

اثر ترانس سینامیک اسید بر آسیب شناختی، دانسیتۀ سلولی نواحی CA1/CA3 و فعالیت کولینزیک هیپوکامپ در گونهٔ تری‌متیل‌تینی بیماری آلزایمر

شیما مختارکیا^۱ ، محمدامین عدالتمنش^{*}

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۰۷

نویسنده مسئول:

محمدامین عدالتمنش

گروه آسیب‌شناسی دهان و فک،
دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه شاهد،
تهران، ایران.

مقدمه: مسمومیت ناشی از تری‌متیل‌تین (Trimethyltin; TMT) با آسیب دستگاه کولینزیک در هیپوکامپ همراه

است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ترانس سینامیک اسید بر زوال شناختی، آسیب سلولی نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ و سنجش فعالیت استیل کولین استراز (Acetyl Choline Esterase, AChE) در هیپوکامپ موش‌های صحرایی گونهٔ بیماری آلزایمر انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نزد ویستار در ۴ گروه کنترل، TMT+CIN20، TMT+Saline و TMT+CIN40 به صورت تصادفی تقسیم گردیدند. القای گونهٔ بیماری آلزایمر با تزریق درون سفاقی ۸ میلی‌گرم بر کلوگرم وزن بدن TMT صورت گرفت. ۷۲ ساعت پس از تجویز TMT، دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم ترانس سینامیک اسید روزانه به مدت ۴ هفته گاواز شد؛ سپس سنجش حافظه کاری، یادگیری اجتنابی غیرفعال، تراکم نورونی در نواحی CA1 و CA3 و فعالیت آنزیم AChE هیپوکامپ انجام گردید.

یافته‌ها: افزایش معنادار تراکم نورونی CA1/CA3، درصد تناوب حرکتی و بهبود حافظه اجتنابی غیرفعال در گروه‌های دریافت کننده ترانس سینامیک اسید در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین دیده شد؛ همچنین فعالیت آنزیم AChE در هیپوکامپ بهویژه در گروه TMT+CIN40، در مقایسه با گروه TMT+Saline، به طور معناداری افزایش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ترانس سینامیک اسید با آثار مهار‌کننده AChE سبب بهبود زوال شناختی و آسیب سلولی هیپوکامپ در گونهٔ تری‌متیل‌تینی بیماری آلزایمر گردد.

واژه‌های کلیدی: سینامیک اسید، دمانس، تری‌متیل‌تین، استیل کولین استراز، موش صحرایی

استناد: مختارکیا، شیما؛ عدالتمنش، محمدامین. اثر ترانس سینامیک اسید بر آسیب شناختی، دانسیتۀ سلولی نواحی CA1/CA3 و فعالیت کولینزیک هیپوکامپ در گونهٔ تری‌متیل‌تینی بیماری آلزایمر. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، فروردین ۱۴۰۲؛ ۳۱(۱): ۱-۱۲.



مهار رادیکال های آزاد، تعدادیل فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و تغییر در انتقال سیگناال دارند (۶). دارچین (Cinnamomum cassia) برای قرن هاست که به عنوان یک ادویه طبیعی و ماده طعم دهنده در سراسر جهان استفاده می شود و در برخی کشورها کاربرد گسترده ای در طب سنتی دارد. دارچین حاوی روغن های فرار مانند سینامالدئید، اوژنول و اسید سینامیک، ترکیبات فلی مانند تانن، کاتچین و پروآنتوسینانیدین، مونوتربن ها و سسکوئیترپن ها و کومارین است (۷). در میان این ترکیبات، اسید سینامیک و سینامالدئید اجزای اصلی عصاره آبی دارچین را تشکیل می دهند. علاوه بر این، در دستگاه گوارش موش ها، سینامالدئید به اسید سینامیک متabolیزه می شود و پیش از ورود به خون، تقریباً به طور کامل در کبد به اسید سینامیک متabolیزه می گردد (۸). اسید سینامیک یک اسید کربوکسیلیک معطر است. آمیناسیون فنیل آلانین توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیاک لیاز (Phenylalanine Ammonia Lyase; PAL) باعث تولید اسید سینامیک می شود که تحت تغییرات آنزیمی بیشتر برای تولید ترکیبات فیتوشیمیایی متعددی از جمله کومارین ها، فلاونوئید ها، ایزو فلاونوئید ها، فنیل-پروپانوئید ها و لیگنین ها قرار می گیرد. مطالعات متعددی نقش اسید سینامیک و مشتقه اسید دارویی آن را به عنوان عوامل ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد آتروژنیک، ضد سسل و ضد قارچ برجسته کرده اند (۹).

تری متیل تین (Trimethyltin, TMT) یک ارگانوتین و نورو توکسینی قدر تمند است که آسیب سلوی هیپو کامپ را به ذنبال دارد. تزریق درون صفاتی TMT باعث افزایش سرعت تولید ROS در نواحی مغزی مختلف از جمله هیپو کامپ، کورتکس فرونتال، کورتکس انترینال و مخچه و افزایش سطح آسیب اکسیداتیو ناشی از ROS می گردد که سبب فعال شدن مسیر پیام رسانی آپوپتوز در مغز می شود (۱۰)؛ بنابراین، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر ترانس سینامیک اسید روی اختلال حافظه ناشی از TMT، تراکم نورونی نواحی CA1/CA3 هیپو کامپ و فعالیت آنزیم کولین

بیماری آلزایمر نوعی زوال عقل است که به علل مختلف و سازو کارهای متعدد پاتوژنیک مانند عوامل ژنتیکی، افت متابولیسم انرژی مغزی، سمیت تحریکی و استرس اکسایشی ناشی از رادیکال های آزاد ایجاد می شود. در این میان، استرس اکسایشی مهم ترین علت در بیماری آلزایمر است (۱). از سویی، عواملی مانند آپوپتوز، کاهش تراکم عصبی، اختلالات متابولیک و استرس اکسایشی در پاتوژنز اختلالات شناختی و زوال حافظه نقش دارند (۲). به سبب نبود تعادل میان اکسیدان هایی نظیر گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) و آنتی اکسیدان های بافتی (مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاکتون پراکسیداز) استرس اکسایشی به وجود می آید ROS. محصول طبیعی متابولیسم هوایی است؛ اما تحت شرایط پاتوفیزیولوژیک، سرعت تولید آن چندین برابر می گردد که به سایتوپاتی میتوکندریایی منجر می شود (۳).

زوال شناختی با اختلال در عملکرد دستگاه کولینزیک مانند کاهش فعالیت استیل کولین ترانس فراز (Choline Acetyltransferase; ChAT) و افرایش فعالیت کولین استراز (Acetylcholinesterase; AChE) در مغز دیده شده است. استیل کولین (Acetylcholine; ACh) نوروترانسミتری است که نقش مهمی در فرایندهای یادگیری و حافظه دارد (۴). در دستگاه کولینزیک مغز، ACh از کولین و استیل ChAT توسط ChAT سنتز می شود. AChE به ترتیب مسئول سنتز و هیدرولیز ACh در نورون های کولینزیک هستند. مهار کننده های AChE به طور گسترده برای بیماران مبتلا به AD تجویز می گردند. مهار کننده های سنتیک AChE از جمله تاکرین، دونپریل و ریواستیگمین در کلینیک استفاده شده اند. با این حال، عوارض جانبی این داروها محققان را به سوی منابع طبیعی سوق داده است که مهار کننده های AChE هستند (۵).

ترکیبات فلی به عنوان منبع آنتی اکسیدان های طبیعی مطالعه شده اند. بیش از ۱۰۰۰۰ ترکیب فلی در گیاهان مختلف وجود دارد. پلی فلی های غذایی آثار بیولوژیکی مانند

استراز در هیپوکامپ موش‌های صحرایی متعاقب مسمومیت ناشی از TMT است.

مواد و روش‌ها

حیوانات، گروه‌بندی و القای مدل: تعداد ۴۰ سرموش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار، با میانگین وزنی 210 ± 10 گرم در مطالعه حاضر استفاده شد. پس از یک هفته تا حصول سازش حیوانات با محیط آزمایشگاه، طراحی آزمایش‌ها و اجرای آن‌ها صورت گرفت. حیوانات تحت شرایط استاندارد دمایی 25 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته (۶ صبح تا ۶ عصر) نگهداری گردیدند. در مدت زمان انجام آزمایش‌ها، تغذیه حیوانات با غذای استاندارد موش آزمایشگاهی (محصول شرکت ۱۱۰ فارس) به همراه آب شرب شهری انجام شد. رعایت اصول اخلاقی بر اساس قوانین بین‌المللی و ضوابط کمیته اخلاقی زیست پژوهشی و حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز با کد اخلاق IR.IAU.SHIRAZ.REC.1400.014 صورت گرفت.

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به ۴ گروه (N=10) شامل گروه کنترل (بدون هیچ تیماری)، گروه TMT+Saline (دریافت کنندهٔ تری‌متیل‌تین و نرمال سالین به عنوان حلال ترانس سینامیک اسید)، ۲۰ TMT+CIN20 (دریافت کنندهٔ تری‌متیل‌تین و دوز ۴۰ میلی گرم ترانس سینامیک اسید) و ۴۰ میلی گرم ترانس سینامیک اسید) و دریافت کنندهٔ تری‌متیل‌تین و دوز ۸ میلی گرم ترانس سینامیک اسید) تقسیم شدند. برای القای گونه بیماری آلمایمر، تری‌متیل‌تین (TMT; Sigma, Germany) به صورت تک دوز و با میزان ۸ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن حیوان، به صورت درون صفاقی همراه با نرمال سالین تزریق گردید (۱۱). ۷۲ ساعت پس از تزریق TMT، گروه‌های دریافت کنندهٔ ترانس سینامیک اسید (Sigma, Germany) دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی گرم از این

ماده را به روش دهانی (گاواژ) به مدت ۴ هفته در ساعت‌های اولیه صبح دریافت کردند (۱۲).

آزمون‌های رفتاری؛ آزمون ماز: ۶ برای ارزیابی حافظه کوتاه‌مدت از آزمون ماز ۷ استفاده شد. این ماز از سه بازوی شبیه به حرف ۷ تشکیل شده است. ابعاد هر بازو $15 \times 30 \times 40$ سانتی‌متر است. بازوها از طریق یک محوطه مرکزی به هم متصل هستند. جوندگان به طور معمول ترجیح می‌دهند به بررسی بازوی جدید بپردازند و تعاملی برای بازگشت به بازویی که پیش‌تر دیده‌اند، ندارند، مگر آن را فراموش کرده باشد. هر موش صحرایی به آرامی و بدون القای استرس، در بازوی شروع قرار گرفت و حرکات حیوان به مدت ۵ دقیقه مشاهده گردید. تعداد دفعات ورود به هر بازو ثبت شد. بر اساس قرارداد، ورود هر حیوان به داخل یک بازو زمانی در نظر گرفته شد که پا‌های عقبی حیوان به طور کامل در داخل بازو قرار گرفت. برای تعیین میزان حافظه کوتاه‌مدت کاری، درصد رفتارهای تناوبی از حاصل جمع ورودهای موفق تقسیم بر ورودی‌های کل بازو منهای ۲ ضرب در صد محاسبه شد منظور از ورودهای موفق، ورودهای متناوب و پشت سر هم و سریالی در هر سه بازو است (۱۳).

آزمون ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال: با استفاده از الکتروشوک و جعبه شاتل (شامل دو محفظه روشن و تاریک که توسط یک درب گیوتینی از هم جدا می‌شوند)، حافظه اجتنابی غیرفعال ارزیابی گردید. در کف محفظه‌ها میله‌های استیل تعییه شده است که برای القای شوک در محفظه تاریک به الکتروشوک وصل هستند. در مرحله سازگار شدن، حیوان وارد محفظه‌ی روشن می‌گردد و اجازه داده می‌شود تا خودش وارد محفظه‌ی تاریک گردد. زمان تأخیر تا ورود به محفظه‌ی تاریک و مدت زمان باقی ماندن در محفظه‌ی تاریک و روشن در مدت زمان ۳۰۰ ثانیه ثبت شد. در مرحله آموزش که ۲۴ ساعت پس از مرحله سازگار شدن انجام گرفت، پس از اولین ورود حیوان به محفظه تاریک، بلا فاصله

نورونی با فرمول $NA = \sum Q / \sum P \times AH$ محاسبه گردید که در آن $NA = \text{دانسیتی نورونی} = \sum Q / \sum P$ مجموع سلول‌های شمارش شده در یک نمونه، $\sum P$ تعداد دفعات نمونه برداری شده در یک نمونه، $AH = \text{مساحت چهارچوب نمونه برداری و} = H$ فاصله میان دو برش متواالی یا ضخامت هر برش است.

آنالیز بیو شیمیایی؛ سنجش فعالیت AChE: هم‌زمان با ارزیابی‌های بافتی، تعدادی از حیوانات هر گروه (N=6) به کمک گاز کلروفورم بی‌هوش و بلا فاصله سر حیوان با استفاده از گیوتین مخصوص جوندگان جدا شد. کل مغز به سرعت از بخش زیرین جمجمه خارج گردید و با استفاده از نرمال سالین روی بخش شستشو داده شد؛ سپس هیپوکامپ موشهای صحرایی با دقت در زیر استریوسکوپ (Olympus, Japan)، از سایر قسمتهای مغز جدا گردید. با استفاده از هموژنایزر (IKA, Germany) با سرعت ۱۳۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه، یک هموژن ۱۰ درصد (w/v) از نمونه‌های هیپوکامپ با محلول ۰/۰۳ مولار بافر فسفات سدیم (pH=7.4) تهیه شد. سطح فعالیت AChE از طریق فعالیت هیدرولیز ACh و به روش Ellman اندازه گیری گردید (۱۶). مخلوط هموژنیزه مغز و بافر ۳۷ میلی مولار سدیم فسفات (pH=8.0) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید و سپس به مخلوط واکنش ۵/۰ (Ellman میلی مولار استیل تیوکولین و ۱ میلی مولار ۲-۵-dithiobis- DTNB) فسفات سدیم اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد (۲۰ دقیقه)، میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر تو سط دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده گشت (۱۶).

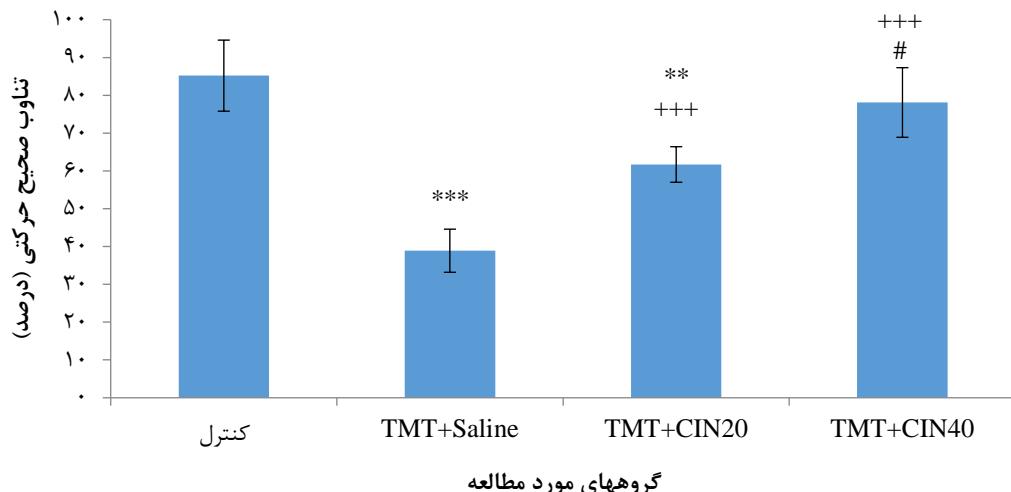
تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری میان گروه‌های مختلف از نرم افزار SPSS vol.20 استفاده گردید. داده‌های به دست آمده پس از مرتب شدن، به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش داده شد.

درب گیوتینی میان دو محفظه بسته و شوک الکتریکی به میزان ۲ میلی‌آمپر، ۵۰ هرتز و به مدت ۲ ثانیه به کف پای حیوان وارد گردید؛ سپس درب محفظه برداشته شد تا حیوان خود وارد محفظه روشن شود. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از وارد شدن شوک و در مرحله آزمون، حیوان دوباره وارد محفظه روشن گردید و زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک و نیز مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک در بازه زمانی ۳۰۰ ثانیه ثبت شد. در این مرحله، حیوان پس از ورود به محفظه تاریک شوک دریافت نکرد (۱۶).

هیستوپاتولوژی؛ ارزیابی تراکم نورونی هیپوکامپ: پس از انجام آزمون حافظه اجتنابی و کاری و برای CA1/CA3 هیپوکامپ، تعدادی از حیوانات در هر گروه (N=4) به صورت تصادفی انتخاب و با محلولی از دو داروی کتامین هیدروکلراید (۵ میلی گرم/کیلو گرم) و زیالازین (۵ میلی گرم/کیلو گرم) بی‌هوش و سپس پرفیوژن قلبی با محلول پارافرمالدھید ۴ درصد انجام شد. پس از اتمام پرفیوژن، مغز با دقت از جمجمه خارج گردید؛ سپس نمونه‌های مغز با کمک دستگاه پردازشگر بافتی و درجهات اتانول پردازش شد و پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، برش گیری از ناحیه هیپوکامپ طبق اطلس پاکسینوس و واتسون صورت گرفت. اسلایدهای تهیه شده با هماتوکسیلین-ائوزین (Olympus BH2, Japan) تصویربرداری انجام گردید.

برای سنجش تراکم نورونی در مناطق مختلف هیپوکامپ با نمونه برداری تصادفی و از روش دایسکتور استفاده گردید (۱۵). به طور خلاصه، در این روش سلول‌ها در یک چهارچوب مرجع شمارش می‌شوند. اگر سلولی در هر دو چهارچوب باشد، در شمارش محسوب نمی‌گردد؛ اما اگر سلولی در چهارچوب مرجع باشد، ولی در چهارچوب بعدی (برش دوم) نباشد، شمارش می‌شود. پس از شمارش سلول‌ها، تراکم

میان گروه کنترل و گروه TMT+CIN20 نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P<0.01$). مقایسه میان گروه TMT با گروه‌های دریافت کننده سینامیک اسید نشان داد که در گروه‌های TMT+CIN20 و TMT+Saline نسبت به گروه TMT+CIN40، افزایش معناداری در درصد تناوب حرکتی وجود دارد ($P<0.001$). درصد تناوب حرکتی در گروه دریافت کننده سینامیک اسید با دوز ۲۰ میلی‌گرم (TMT+CIN20) با گروه دریافت کننده دوز ۴۰ میلی‌گرم (TMT+CIN40) نیز اختلاف معناداری داشت (**شکل شماره ۱**, $P<0.05$).



شکل شماره ۱. مقایسه میانگین تاخیر اسناندار درصد تناوب صحیح حرکتی در گروه‌های مختلف نتایج نشان می‌دهد که میان گروه کنترل با گروه TMT+CIN20 و TMT+Saline اختلاف معنادار است ($P<0.001$) و (** $P<0.01$ و *** $P<0.001$). در گروه‌های TMT+CIN20 و TMT+CIN40 در مقایسه با گروه TMT+Saline، افزایش معنادار دیده شد ($P<0.001$ +++); همچنین میان گروه‌های TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نیز اختلاف معناداری قابل مشاهده است. (# $P<0.05$)

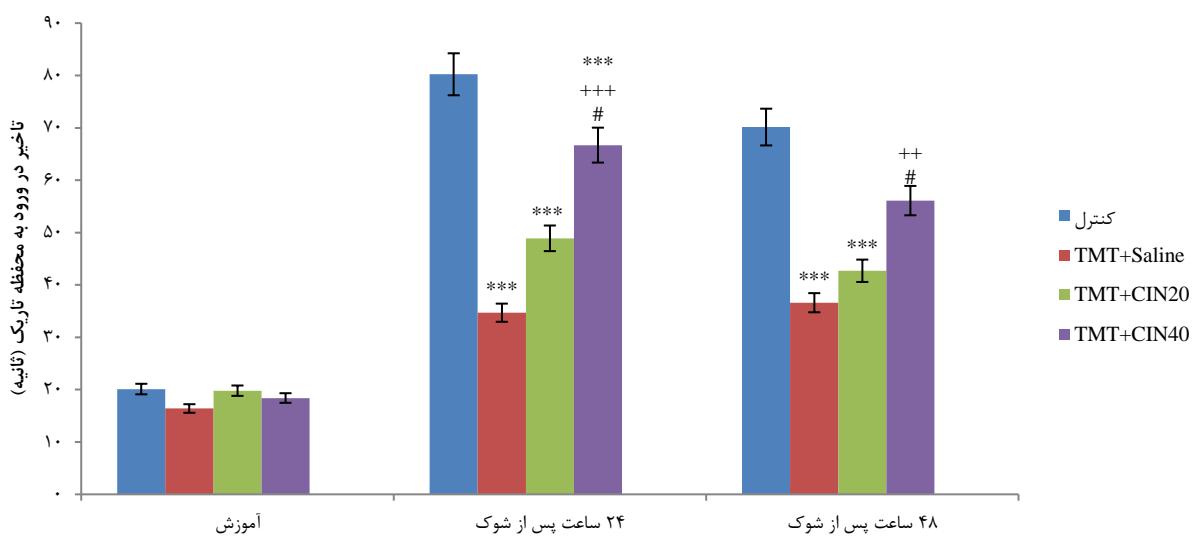
معنادار بود (شکل شماره ۲، $P<0.05$). ۴۸ ساعت پس از دریافت شوک، در گروه‌های TMT+Saline (P<0.001) و TMT+CIN20 (P<0.001) کاهش معناداری در مدت زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک نسبت به گروه کنترل دیده شد؛ همچنین در گروه‌های TMT+CIN40 و TMT+CIN20 در مقایسه با گروه TMT+Saline، افزایش معنادار بود (به ترتیب: $P<0.05$ و $P<0.01$) و نیز اختلاف معناداری میان دو گروه TMT+CIN40 و TMT+CIN20 دیده شد ($P<0.01$).

برای ارزیابی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف استفاده گردید و پس از اطمینان طبیعی بودن توزیع داده‌ها، برای سنجش اختلاف معنی‌دار میان گروه‌های مدنظر از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی استفاده شد. از نظر آماری، مقادیر $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی حافظه کوتاه‌مدت کاری: نتایج ANOVA و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که درصد تناوب صحیح حرکتی در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌دار دارد ($P<0.001$)، هرچند

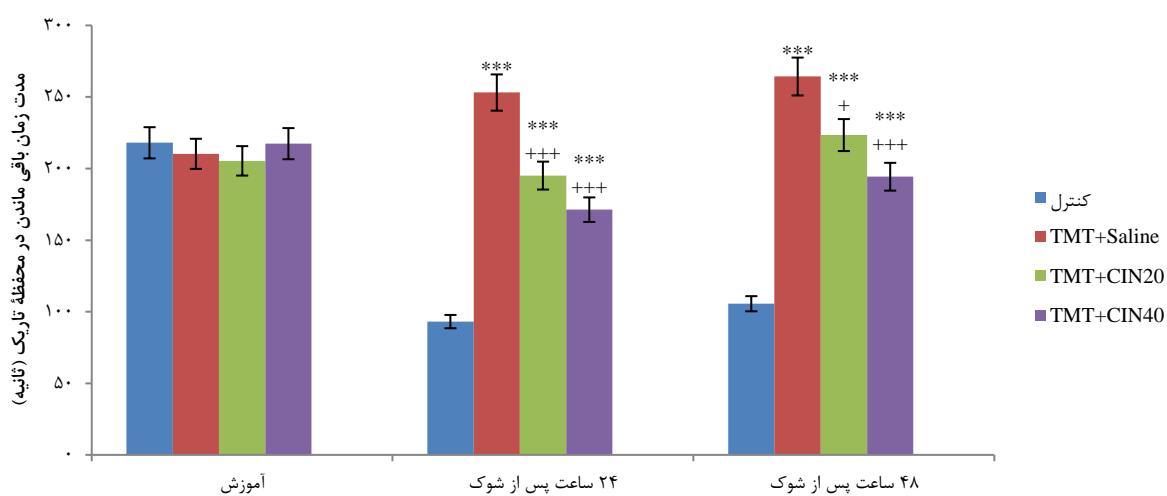
ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال: در مرحله آموزش تأخیر در ورود به محفظه تاریک، تفاوت معناداری میان گروه‌های مطالعه وجود نداشت (شکل شماره ۲). ۲۴ پس از ساعت از دریافت شوک، در تأخیر ورود به محفظه تاریک، گروه کنترل افزایش معناداری در مقایسه با گروه‌های TMT+Saline، TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نشان داد ($P<0.001$); همچنین گروه TMT+CIN40 افزایش معناداری نسبت به گروه TMT+CIN20 داشت ($P<0.001$). از سویی، میان گروه TMT+CIN40 و TMT+CIN20 نیز اختلاف



شکل شماره ۲. مقایسه میانگین ± انحراف استاندارد مدت زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک. در مرحله آموزش، اختلاف معناداری میان گروه‌ها دیده نشد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از دریافت شوک، میان گروه کنترل با گروه‌های دیگر اختلاف معناداری دیده شد ($***P<0.001$)؛ همچنین میان گروه‌های مطالعه با گروه TMT+Saline در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از دریافت شوک، اختلاف معنادار بود ($P<0.001$ و $+P<0.01$). اختلافی معناداری میان دو گروه TMT+CIN20 و TMT+CIN40 در هر دو بازه زمانی دیده شد ($.#P<0.05$).

۲۴ ساعت پس از دریافت شوک، در مقایسه با گروه TMT+Saline، گروه‌های TMT+CIN20 و TMT+CIN40 کاهش معناداری نشان دادند ($P<0.001$). ۴۸ ساعت پس از دریافت شوک، کاهش معناداری در دو گروه TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نسبت به گروه TMT+Saline دیده شد (به ترتیب: $P<0.05$ و $P<0.01$).

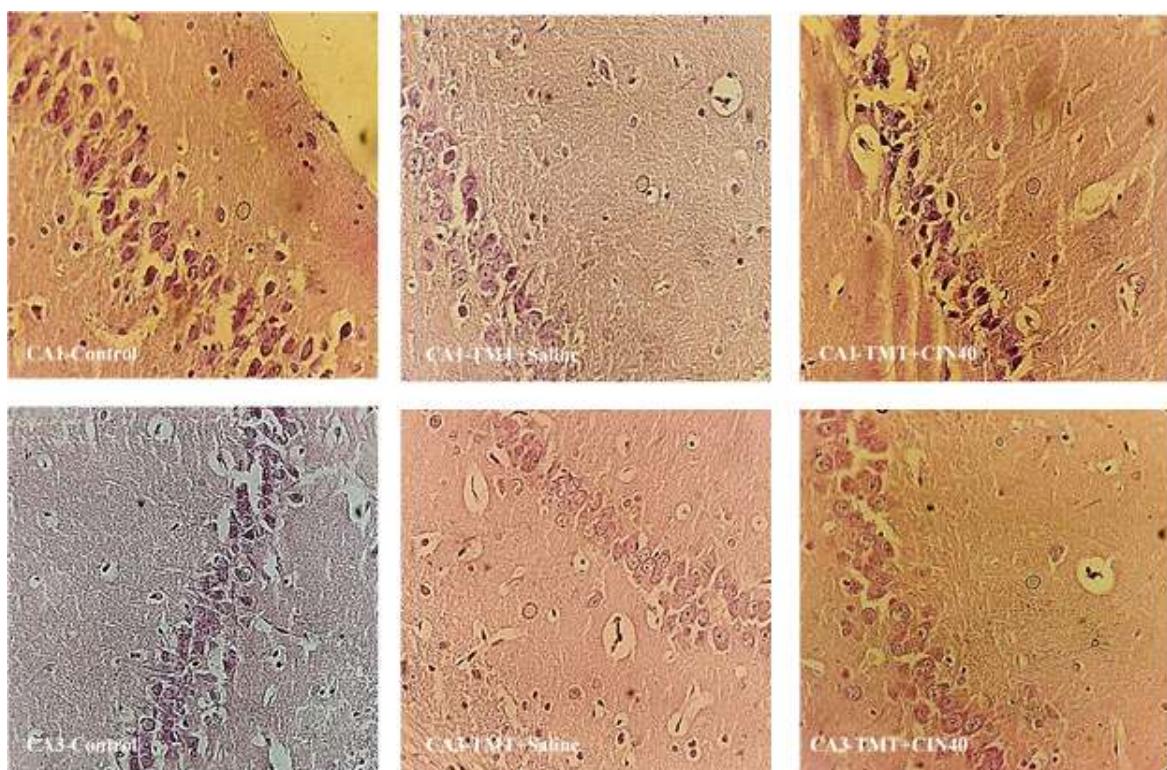
میانگین مدت زمان حضور حیوان در محفظه تاریک (شکل شماره ۳) نشان داد که اختلافی میان گروه‌های مطالعه در مرحله آموزش وجود ندارد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از دریافت شوک، در گروه‌های TMT+Saline، TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری دیده شد ($P<0.001$).



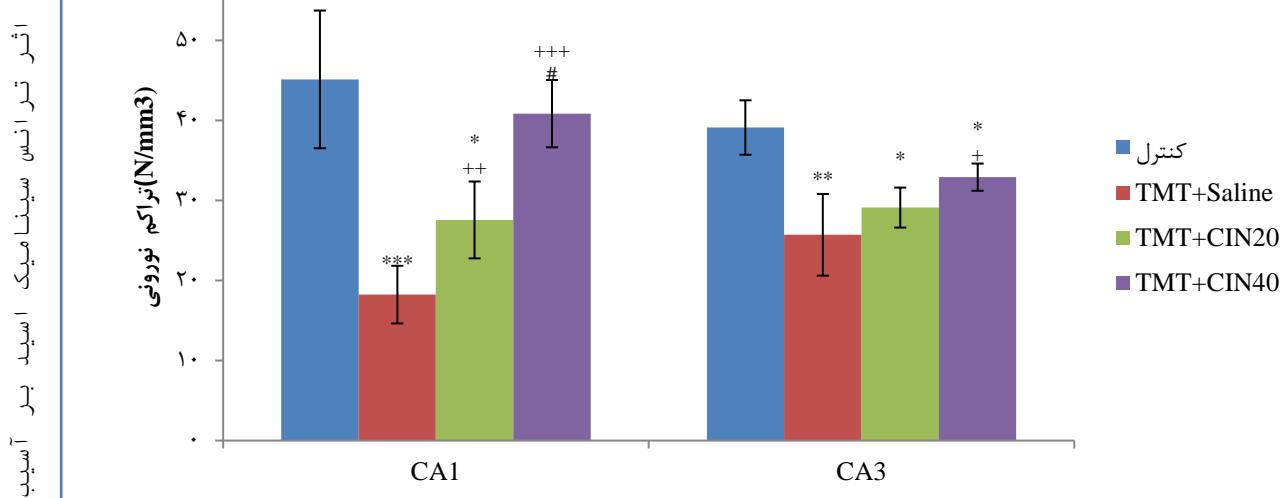
شکل شماره ۳. مقایسه میانگین ± انحراف استاندارد مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک. در مرحله آموزش، اختلاف معناداری میان گروه‌ها دیده نشد. پس از دریافت شوک در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، میان گروه کنترل با گروه‌های TMT+Saline، TMT+CIN20 و TMT+CIN40 اختلاف معناداری مشاهده گردید ($***P<0.001$). در مقایسه با گروه TMT+Saline، گروه‌های TMT+CIN20 و TMT+CIN40 اختلاف معناداری در هر دو بازه زمانی نشان دادند ($.++P<0.001$ و $+P<0.05$).

در میان گروههای تیمار، هر دو گروه TMT+CIN20 (P<0.001) و (P<0.01) TMT+CIN40 افزایش معناداری نسبت به گروه TMT+NS داشت (P<0.01). میان گروه TMT+CIN20 با گروه TMT+CIN40 اختلاف معناداری دیده شد (P<0.05). در ارزیابی تراکم نورونی ناحیه CA3، کاهش معناداری در گروه TMT+Saline (P<0.01) و TMT+CIN40 (P<0.05) و TMT+CIN20 (P<0.05) نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید؛ همچنین افزایش معناداری در دانسیته نورونی ناحیه CA3 در گروه TMT+CIN40 نسبت به گروه TMT+Saline دیده شد (شکل شماره ۵). (P<0.05).

بافت‌شناسی: همان‌گونه که در شکل شماره ۴ دیده می‌شود، تراکم نورونی در نواحی CA1 و CA3 گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل، کمتر است. این در حالی است که گروه دریافت کننده سینامیک اسید با دوز ۴۰ میلی‌گرم تراکم بالاتری را نسبت به گروه TMT+Saline نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه نیز نشان داد که تراکم نورونی در ناحیه CA1 در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل، کاهش معناداری داشت (P<0.001). این در حالی است که میان گروه ۲ TMT+CIN20 و کنترل نیز اختلاف معنادار بود (P<0.05).



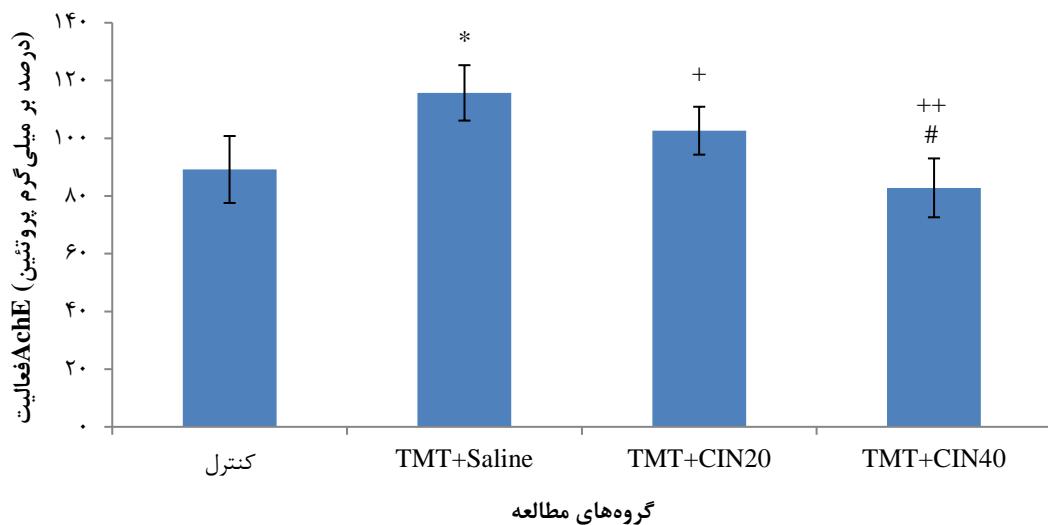
شکل شماره ۵. میکروگراف تهیه شده از هپیو کامپ موش های صحرایی در گروه های مطالعه، رنگ آمیزی H-E، بزرگنمایی ۴۰۰. کاهش تراکم نورونی در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل و افزایش تراکم نورونی در گروه TMT+CIN40 و در مقایسه با گروه TMT+Saline در هر دو ناحیه CA1 و CA3 هپیو کامپ دیده می شود.



شکل شماره ۵. مقایسه میانگین انحراف استاندارد تراکم نورونی نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ در گروههای گوناگون. میان گروه کنترل با گروههای TMT+GA200 و TMT+NS در نواحی CA1 و CA3، اختلاف معنادار بود ($*P<0.05$ ، $**P<0.01$ ، $***P<0.001$)؛ همچنین اختلاف معناداری میان هر دو گروه تیمارشده با سینامیک اسید با گروه TMT+Saline در CA1 و میان گروه TMT+CIN40 با گروه TMT+Saline در CA3 وجود داشت ($**P<0.01$ ، $***P<0.001$). میان گروههای TMT+CIN20 و TMT+CIN40 اختلاف معناداری در ناحیه CA1 مشاهده گردید ($#P<0.05$).

گروه TMT+CIN20 نسبت به گروه TMT+Saline، کاهش معناداری داشت ($P<0.05$). فعالیت AchE در گروه TMT+CIN40 تقریباً با گروه کنترل برابر بود و اختلاف معناداری با گروه TMT+Saline نشان داد ($P<0.05$)؛ همچنین اختلاف میان دو گروه TMT+CIN20 و TMT+CIN40 معنادار بود ($P<0.05$).

فعالیت کولینزیک: برای سنجش فعالیت کولینزیک در بافت هیپوکامپ، فعالیت AChE سنجیده شد (شکل شماره ۶). نتایج نشان داد که سطح فعالیت این آنزیم به دنبال تجویز TMT، به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P<0.05$)، در حالی که سطح فعالیت این آنزیم در



شکل شماره ۶. مقایسه میانگین انحراف استاندارد درصد فعالیت AChE در گروههای مختلف. میان گروه کنترل با گروه TMT+Saline اختلاف معنادار است ($*P<0.05$). گروههای TMT+CIN20 و TMT+CIN40 در مقایسه با گروه TMT+Saline، افزایش معناداری نشان دادند ($+P<0.05$ ، $++P<0.01$)؛ میان گروههای TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نیز اختلاف معناداری دیده شد ($#P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

دستگاه سپتوم هیپو کامپی در انجام اعمال مختلف یادگیری و حافظه به اثبات رسیده است (۲۱). آسیب به نواحی CA1/CA3 هیپو کامپ در مسمومیت با TMT در این مطالعه، حساسیت بالای این نواحی را به استرس اکسایشی نشان می‌دهد. سمیت عصبی-رفتاری ناشی از TMT با تغییراتی در مؤلفه‌های کولینرژیک مشابهت دارد که در بیماران مبتلا به AD نیز مشاهده می‌شود (۲۰). مسمومیت با TMT سبب کاهش فعالیت دستگاه کولینرژیک، از دست دادن سلول، دژنراسیون آکسون و تغییر در آزادسازی میانجی‌های عصبی و گیرنده‌های آن‌ها می‌گردد. اثر TMT بر فعالیت AChE از کاهش هیستوشیمیابی در اتصال گیرنده‌های موسکارینی هیپو کامپ و همچنین تغییر در ظرفیت مغز برای آزادسازی ACh نشان دارد (۲۲)؛ بنابراین، زوال یادگیری و حافظه ناشی از TMT را می‌توان از طریق افزایش سطح ACh توسط مهار کننده‌های AChE بهبود بخشید. مطالعات نشان داده است که TMT سبب کاهش فعالیت ChAT و افزایش AChE می‌گردد. از سویی، کاهش فعالیت AChE می‌تواند عملکرد شناختی را با افزایش سطح ACh افزایش دهد (۲۳). در مطالعه حاضر، گروه نوروفاتولوژیکی (TMT+Saline) فعالیت AChE را در هیپو کامپ، مغز در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد (شکل شماره ۵)، هرچند درمان با ترانس سینامیک اسید به‌طور چشمگیری اختلال کولینرژیک ناشی از TMT را مهار کرد و سبب کاهش AChE گردید. مهار کننده‌های AChE مانند تاکرین، دونپزیل و فیزوستیگمین به صورت طولانی مدت در کلینیک برای درمان علائم بیماران AD استفاده شده است، با این حال، اگرچه این مهار کننده‌ها قادرند تا حدودی نقايسن شناختی را بهبود بخشنند، اما عوارض جانبی شدید، مشکلات فراهمی زیستی و هزینه‌های بالایی نیز دارند (۲۴)؛ بنابراین، یافتن مهار کننده‌های AChE طبیعی، این‌تر و ماندگارتر ضروری به‌نظر می‌رسد. از ترکیبات طبیعی و مواد شیمیابی گیاهی می‌توان به‌عنوان منع مهار کننده‌های AChE استفاده کرد. سینامیک اسید یک ترکیب فعال زیستی طبیعی است که بهوفور در میوه‌ها، سبزی‌ها و غلات کامل وجود دارد. به‌طور کلی می‌توان آن را از دارچین (Cinnamomum

Mطالعه حاضر نشان داد که مسمومیت حاد با تری‌متیل‌تین (TMT) سبب اختلال در حافظه فضایی، حافظه کاری و آسیب سلوی در نواحی CA1/CA3 هیپو کامپ می‌شود و تجویز سینامیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند سبب بهبود نواقص شناختی ناشی از TMT و افزایش تراکم سلوی در CA1/CA3 نسبت به گروه درمان‌نشده گردد. بیماری آزمایمر (AD) یکی از پیچیده‌ترین اختلالات عصبی مغز است. این بیماری عمدتاً بر جمعیت سالخوردۀ تأثیر می‌گذارد و به اختلال عملکرد شناختی پیش‌رونده، اختلالات رفتاری و مشکلات در زندگی روزمره منجر می‌شود. AD از نظر نوروفاتولوژیکی، با زوال نورون‌های کولینرژیک مغز قدامی، اختلالات دستگاه عصبی مرکزی و پلاک‌های آمیلوئیدی قشر مغز و هایپرفسفیریلاسیون حاوی پروتئین تاو مرتبط است (۱۷). استیل کولین (ACh) یکی از میانجی‌های عصبی در گیر در حافظه و یادگیری است. به‌نظر می‌رسد کاهش فعالیت دستگاه کولینرژیک مغزی در تشکیلات هیپو کامپ لوب تمپورال یکی از عوامل تعیین‌کننده در پیشرفت زوال حافظه، هم در طول پیری طبیعی و هم در بیماران آزمایمری باشد (۱۸). بر اساس فرضیه کولینرژیک، کاهش فعالیت کولین استیل ترانسفراز (ChAT) و سنتر ACh ارتباط نزدیکی با اختلالات شناختی مانند AD دارد (۱۹). یک ترکیب نوروتوكسیک است که الگوی مشخصی از مرگ عصبی را در هیپو کامپ و سایر اجزای دستگاه لیمیک القا می‌کند. آسیب هیپو کامپی ناشی از TMT می‌تواند مسئول اختلالات شناختی باشد. بسیاری از مطالعات گزارش داده‌اند که تجویز TMT در جوندگان سبب اختلالات نوروفاتولوژیکی هیپو کامپ و زوال چشمگیری در حافظه و یادگیری می‌شود (۲۰). هیپو کامپ آوران‌ها و واپران های متعددی دارد. آکسون سلوی‌های هرمی ناحیه CA1 خروجی اصلی هیپو کامپ است که به ساختمان مختلف مغزی ارسال می‌شود. سپتوم یکی از نواحی ای است که از هیپو کامپ ورودی دریافت می‌کند. خروجی هیپو کامپ از نواحی CA1 و CA3 وارد سپتوم می‌گردد. امروزه نقش

پیشنهاد می شود (۲۸). با این حال، مطالعات بالینی بیشتری برای درک پتانسیل کامل اسید سینامیک و مشتقات آن در مدیریت AD موردنیاز است.

ترانس سینامیک اسید، به عنوان یک آنتی اکسیدان گیاهی، نقش حفاظت کننده عصبی در اختلالات شناختی و زوال حافظه ناشی از TMT دارد و سبب بهبود آسیب سلوولی و جلوگیری از کاهش تراکم نورونی در نواحی حساس به استرس اکسایشی هیپوکامپ می گردد. این عملکرد حفاظت کننده عصبی سینامیک اسید احتمالاً ناشی از آثار مهار کننده استیل کولین استراز (AChE) در هیپوکامپ مغز باشد؛ بنابراین، تجویز این ترکیب در کلینیک به عنوان درمان کمکی در بیماران مبتلا به بیماری آلزایمر توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان از زحمات معاونت پژوهشی دانشگاه در فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی قدردانی می نمایند.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.IAU.SHIRAZ.REC.1400.014

References

- Mantzavinos V, Alexiou A. Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Curr Alzheimer Res* 2017;14:1149-54. doi: 10.2174/1567205014666170203125942.
- Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res* 2018;7: F1000 Faculty Rev-1161. doi: 10.12688/f1000research.14506.1.
- Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017;57:1105-21. doi: 10.3233/JAD-161088.
- Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 2018;141:1917-33. doi: 0.1093/brain/awy132.
- Gao H, Jiang Y, Zhan J, Sun Y. Pharmacophore-based drug design of AChE and BChE dual inhibitors as potential anti-Alzheimer's disease agents. *Bioorg Chem* 2021;114:105149. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105149.

(cassia)، مرکبات، انگور، چای، کاکائو، اسفناج، کرفس و سبزی‌های براسیکا به دست آورد. علاوه بر اینکه مطالعات نقش سینامیک اسید را به عنوان یک آنتی اکسیدان، ضدالتهاب، ضددیابت و عامل ضدسرطان برجسته کرده است، این ترکیب خواص دارویی مختلفی دارد که می تواند در برابر اختلالات عصبی مختلف عمل کند (۲۵). یک مشتق ۳ و ۲ دی‌متیل اسید سینامیک استخراج شده از برگ‌های گیاه جوز هندی (*pycnanthus angolensis*) فعالیت بالقوه مهاری کولین استراز داشته است (۲۶)؛ همچنین یکی دیگر از مشتقات جدید سینامیک اسید که پتانسیل بازدارندگی AChE بالایی در محدوده غلظت ۷/۵-۳۰ نانومول در لیتر دارد، در مقایسه با مهار کننده استاندارد AChE، دونپریل، بیش از سه برابر پتانسیل بازدارندگی بالاتری نشان می دهد (۲۶). علاوه بر این، برای این مشتق ویژگی ضدآلزایمری مانند مهار تجمع β -محافظت عصبی در برابر سمیت ناشی از آمیلوئید و توانایی نفوذ به سد خونی مغزی گزارش شده است (۲۷). عصاره بومادران سرشار از پلی فولهایی است که مشتقات اسید سینامیک را شامل می شود. عصاره این گیاه به طور رقباتی باعث مهار AChE می گردد و همچنین خواص آنتی اکسیدانی بالایی دارد و به عنوان یک عامل بالقوه درمانی در برابر AD

- Ruwizhi N, Aderibigbe BA. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *Int JMolSci* 2020;21:5712. doi: 10.3390/ijms21165712.
- Chandra S, Roy A, Jana M, Pahan K. Cinnamic acid activates PPAR α to stimulate Lysosomal biogenesis and lower Amyloid plaque pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Dis* 2019; 124:379-95. doi: 10.1016/j.nbd.2018.12.007.
- Caruso G, Godos J, Privitera A, Lanza G, Castellano S, et al. Phenolic Acids and Prevention of Cognitive Decline: Polyphenols with a Neuroprotective Role in Cognitive Disorders and Alzheimer's Disease. *Nutrients* 2022;14:819. doi: 10.3390/nu14040819.
- Feng LS, Cheng JB, Su WQ, Li HZ, Xiao T, et al. Cinnamic acid hybrids as anticancer agents: A mini-review. *Arch Pharm (Weinheim)* 2022; 355:e2200052. doi: 10.1002/ardp.202200052.
- Edalatmanesh MA, Hosseini M, Ghasemi S, Golestan S, Sadeghnia HR, et al. 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;185:75-84. doi: 10.1007/s11845-014-1224-y.
11. 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;17:659-67.doi: 10.22074/cellj.2016.3838.
 12. Chae HK, Kim W, Kim SK. Phytochemicals of Cinnamomi Cortex: Cinnamic Acid, but not Cinnamaldehyde, Attenuates Oxaliplatin-Induced Cold and Mechanical Hypersensitivity in Rats. *Nutrients* 2019;11:432. doi: 10.3390/nu11020432.
 13. Edalatmanesh MA, Nemati S, Khodabandeh H. Systemic Transplantation Effect of Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells on Cognitive Deficits and Hippocampal Antioxidant Capacity in Trimethyltin Model of Alzheimer's Disease. *J Ilam Uni Med Sci* 2021; 29:32-43. doi: 10.52547/sjimu.29.5.32.
 14. Safarpour M, Edalatmanesh MA, Hosseini SE, Forouzanfar M. Neuroprotective Effect of Cinnamic Acid on Cognitive Impairment and the Level of Oxidative Stress Indicators in Rat's Offspring in an Uteroplacental Insufficiency Model. *J Ilam Uni Med Sci* 2020; 28:33-46. doi: 10.29252/sjimu.28.6.33.
 15. Safarpour M, Edalatmanesh MA, Hosseini SE, Forouzanfar M. The effect of cinnamic acid on fetal hippocampus in pregnant rats. *Comp Clin Pathol* 2020; 29: 945-54. doi:10.1007/s00580-020-03118-8.
 16. Han HJ, Park SK, Kang JY, Kim JM, Yoo SK, et al. Mixture of Phlorotannin and Fucoidan from *Ecklonia cava* Prevents the Aβ-Induced Cognitive Decline with Mitochondrial and Cholinergic Activation. *Mar Drugs* 2021;19:434. doi: 10.3390/md19080434.
 17. Shekari A, Fahnestock M. Cholinergic neurodegeneration in Alzheimer disease mouse models. *Handb Clin Neurol* 2021; 182:191-209. doi: 10.1016/B978-0-12-819973-2.00013-7.
 18. Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol Med Rep*2019;20:1479-87.doi: 10.3892/mmr.2019.10374.
 19. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol* 2016;14:101-15. doi: 10.2174/1570159x13666150716165726.
 20. Ye M, Han BH, Kim JS, Kim K, Shim I. Neuroprotective Effect of Bean Phosphatidylserine on TMT-Induced Memory Deficits in a Rat Model. *Int J Mol Sci* 2020;21:4901. doi: 10.3390/ijms21144901.
 21. McDonald AJ, Mott DD. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J Neurosci Res* 2017;95:797-820. doi: 10.1002/jnr.23709.
 22. Kim CR, Choi SJ, Kim JK, Park CK, Gim MC, et al. 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol from *Cinnamomum loureirii* Improves Cognitive Deficit, Cholinergic Dysfunction, and Oxidative Damage in TMT-Treated Mice. *Biol Pharm Bull* 2017;40:932-5. doi: 10.1248/bpb.b16-00997.
 23. Chainoglou E, Siskos A, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D. Hybridization of Curcumin Analogues with Cinnamic Acid Derivatives as Multi-Target Agents Against Alzheimer's Disease Targets. *Molecules* 2020;25:4958. doi: 10.3390/molecules25214958.
 24. Jabir NR, Khan FR, Tabrez S. Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 2018;24:753-62. doi: 10.1111/cns.12971.
 25. Hemmati AA, Alboghobeish S, Ahangarpour A. Effects of cinnamic acid on memory deficits and brain oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. *Korean J Physiol Pharmacol* 2018;22:257-67. doi: 10.4196/kjpp.2018.22.3.257.
 26. Elufioye TO, Obuotor EM, Agbedahunsi JM, Adesanya SA. Cholinesterase inhibitory activity and structure elucidation of a new phytol derivative and a new cinnamic acid ester from *Pycnanthus angolensis*. *Rev Bras Farmacogn* 2016; 26:433-7. doi: 10.1016/j.bjpf.2016.01.010.
 27. Lan JS, Hou JW, Liu Y, Ding Y, Zhang Y, et al. Design, synthesis and evaluation of novel cinnamic acid derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017;32:776-88. doi: 10.1080/14756366.2016.1256883.
 28. Tadić V, Arsić I, Zvezdanović J, Zugić A, Cvetković D, et al. The estimation of the traditionally used yarrow (*Achillea millefolium* L. Asteraceae) oil extracts with anti-inflammatory potential in topical application. *J Ethnopharmacol* 2017;199:138-48. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.002.