

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، دانسیته سلولی نواحی CA1/CA3 و فعالیت کولینرژیک هیپوکامپ در گونه تری متیل تینی بیماری آلزایمر

شیمیا مختار کیا^۱ ، محمدامین عدالت منش^{۱*}

^۱ گروه زیست شناسی، 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 عدالت منش

گروه آسیب شناسی دهان و فک ،
دانشکده دندان پزشکی ، دانشگاه شاهد ،
تهران ، ایران.

Email:

amin.edalatmanesh@gmail.com

مقدمه: مسمومیت ناشی از تری متیل تین (Trimethyltin; TMT) با آسیب دستگاه کولینرژیک 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 موش های صحرایی گونه بیماری آلزایمر انجام شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق تجربی، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در ۴ گروه کنترل، TMT+Saline، TMT+CIN20 و TMT+CIN40 به صورت تصادفی تقسیم گردیدند. القای گونه بیماری آلزایمر با تزریق درون صفاقی ۸ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن TMT صورت گرفت. ۷۲ ساعت پس از تجویز TMT، دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی گرم ترانس سینامیک اسید روزانه به مدت ۴ هفته گاوژ شد؛ سپس سنجش حافظه کاری، یادگیری اجتنابی غیر فعال، تراکم نورونی در نواحی CA1 و CA3 و فعالیت آنزیم AChE هیپوکامپ انجام گردید.

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

بحث و نتیجه گیری: به نظر می رسد ترانس سینامیک اسید با آثار مهارکنندگی AChE سبب بهبود زوال شناختی و آسیب سلولی هیپوکامپ در گونه تری متیل تینی بیماری آلزایمر گردد.

واژه های کلیدی: سینامیک اسید، دمانس، تری متیل تین، استیل کولین استراز، موش صحرایی

استناد: مختار کیا، شیمیا؛ عدالت منش، محمدامین. اثر ترانس سینامیک اسید بر آسیب شناختی، دانسیته سلولی نواحی CA1/CA3 و فعالیت کولینرژیک

هیپوکامپ در گونه تری متیل تینی بیماری آلزایمر. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، فروردین ۱۴۰۲؛ ۳۱(۱): ۱-۱۲.



بیماری آلزایمر نوعی زوال عقل است که به علل مختلف و سازوکارهای متعدد پاتوژنیک مانند عوامل ژنتیکی، افت متابولیسم انرژی مغزی، سمیت تحریکی و استرس اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود. در این میان، استرس اکسایشی مهم‌ترین 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 اکسیدان‌هایی نظیر گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) و آنتی‌اکسیدان‌های بافتی (مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز) استرس اکسایشی به وجود می‌آید. محصول طبیعی متابولیسم هوازی است؛ اما تحت شرایط پاتوفیزیولوژیک، سرعت تولید آن چندین برابر می‌گردد که به سایتوپاتی میتوکندریایی منجر می‌شود (۳).

زوال شناختی با اختلال در عملکرد دستگاه کولینرژیک مانند کاهش فعالیت استیل کولین ترانسفراز (Choline Acetyltransferase; ChAT) و افزایش فعالیت کولین استراز (Acetylcholinesterase; AChE) در مغز دیده شده است. استیل کولین (Acetylcholine; ACh) نوروترانسمیتری است که نقش مهمی در فرایندهای یادگیری و حافظه دارد (۴). در دستگاه کولینرژیک مغز، ACh از کولین و استیل کوآنزیم A توسط ChAT سنتز می‌شود. ChAT و AChE به ترتیب مسئول سنتز و هیدرولیز ACh در نورون‌های کولینرژیک هستند. مهارکننده‌های AChE به طور گسترده برای بیماران مبتلا به AD تجویز می‌گردند. مهارکننده‌های سنتتیک AChE از جمله تاکرین، دونپیزیل و ریواستیگمین در کلینیک استفاده شده‌اند. با این حال، عوارض جانبی این داروها محققان را به سوی منابع طبیعی سوق داده است که مهارکننده‌های AChE هستند (۵).

ترکیبات فنلی به عنوان منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مطالعه شده‌اند. بیش از ۱۰۰۰۰ ترکیب فنلی در گیاهان مختلف وجود دارد. پلی‌فنل‌های غذایی آثار بیولوژیکی مانند

مه‌ار رادیکال‌های آزاد، تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تغییر در انتقال سیگنال دارند (۶). دارچین (*Cinnamomum cassia*) برای قرن‌هاست که به عنوان یک ادویه طبیعی و ماده طعم‌دهنده در سراسر جهان استفاده می‌شود و در برخی کشورها کاربرد گسترده‌ای در طب سنتی دارد. دارچین حاوی روغن‌های فرار مانند سینامالدئید، اوژنول و اسید سینامیک، ترکیبات فنلی مانند تانن، کاتچین و پروآنتوسیانیدین، مونوترپن‌ها و سسکوئیترپن‌ها و کومارین است (۷). در میان این ترکیبات، اسید سینامیک و سینامالدئید اجزای اصلی عصاره آبی دارچین را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، در دستگاه گوارش موش‌ها، سینامالدئید به اسید سینامیک متابولیزه می‌شود و پیش از ورود به خون، تقریباً به طور کامل در کبد به اسید سینامیک متابولیزه می‌گردد (۸). اسید سینامیک یک اسید کربوکسیلیک معطر است. دآمیناسیون فنیل آلانین توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیاک لیاز (Phenylalanine Ammonia Lyase; PAL) باعث تولید اسید سینامیک می‌شود که تحت تغییرات آنزیمی بیشتر برای تولید ترکیبات فیتوشیمیایی متعددی از جمله کومارین‌ها، فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، فنیل-پروپانوئیدها و لیگنین‌ها قرار می‌گیرد. مطالعات متعددی نقش اسید سینامیک و مشتقات فعال دارویی آن را به عنوان عوامل ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدآرتروز، ضدسل و ضدقارچ برجسته کرده‌اند (۹).

تری‌متیل‌تین (Trimethyltin, TMT) یک ارگانوتین و نوروتوکسینی قدرتمند است که آسیب سلولی هیپوکامپ را به دنبال دارد. تزریق درون صفاقی TMT باعث افزایش سرعت تولید ROS در نواحی مغزی مختلف از جمله هیپوکامپ، کورتکس فرونتال، کورتکس اتورینال و مخچه و افزایش سطح آسیب‌اکسیداتیو ناشی از ROS می‌گردد که سبب فعال شدن مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز در مغز می‌شود (۱۰)؛ بنابراین، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر ترانس سینامیک اسید روی اختلال حافظه ناشی از TMT، تراکم نورونی نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ و فعالیت آنزیم کولین

زوال شناختی با اختلال در عملکرد دستگاه کولینرژیک مانند کاهش فعالیت استیل کولین ترانسفراز (Choline Acetyltransferase; ChAT) و افزایش فعالیت کولین استراز (Acetylcholinesterase; AChE) در مغز دیده شده است. استیل کولین (Acetylcholine; ACh) نوروترانسمیتری است که نقش مهمی در فرایندهای یادگیری و حافظه دارد (۴). در دستگاه کولینرژیک مغز، ACh از کولین و استیل کوآنزیم A توسط ChAT سنتز می‌شود. ChAT و AChE به ترتیب مسئول سنتز و هیدرولیز ACh در نورون‌های کولینرژیک هستند. مهارکننده‌های AChE به طور گسترده برای بیماران مبتلا به AD تجویز می‌گردند. مهارکننده‌های سنتتیک AChE از جمله تاکرین، دونپیزیل و ریواستیگمین در کلینیک استفاده شده‌اند. با این حال، عوارض جانبی این داروها محققان را به سوی منابع طبیعی سوق داده است که مهارکننده‌های AChE هستند (۵).

ترکیبات فنلی به عنوان منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مطالعه شده‌اند. بیش از ۱۰۰۰۰ ترکیب فنلی در گیاهان مختلف وجود دارد. پلی‌فنل‌های غذایی آثار بیولوژیکی مانند

ترکیبات فنلی به عنوان منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مطالعه شده‌اند. بیش از ۱۰۰۰۰ ترکیب فنلی در گیاهان مختلف وجود دارد. پلی‌فنل‌های 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 سر موش 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 سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد و چرخه ی 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 پزشکی 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 کنترل (بدون هیچ تیماری)، گروه TMT+Saline (دریافت‌کننده تری‌متیل‌تین و نرمال سالین به‌عنوان حلال ترانس سینامیک اسید)، TMT+CIN20 (دریافت‌کننده تری‌متیل‌تین و دوز ۲۰ میلی‌گرم ترانس سینامیک اسید) و TMT+CIN40 (دریافت‌کننده تری‌متیل‌تین و دوز ۴۰ میلی‌گرم ترانس سینامیک اسید) تقسیم شدند. برای القای گونه بیماری آلزایمر، تری‌متیل‌تین (TMT; Sigma, Germany) به‌صورت تک‌دوز و با میزان ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان، به‌صورت درون‌صفافی همراه با نرمال سالین تزریق گردید (۱۱). ۷۲ ساعت پس از تزریق TMT، گروه‌های دریافت‌کننده ترانس سینامیک اسید (Sigma, Germany) دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم از این

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

آزمون‌های رفتاری؛ آزمون ماز Y: برای ارزیابی حافظه کوتاه‌مدت از آزمون ماز Y استفاده شد. این ماز از سه بازوی شبیه به حرف Y تشکیل شده است. ابعاد هر بازو $15 \times 30 \times 40$ سانتی‌متر است. بازوها از طریق یک محوطه مرکزی به هم متصل هستند. چونندگان به‌طور معمول ترجیح می‌دهند به بررسی بازوی جدید بپردازند و تمایلی 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 به‌طور 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 تعبیه شده است که برای القای شوک در محفظه تاریک به الکتروشوک وصل هستند. در مرحله سازگار شدن، حیوان وارد محفظه روشن می‌گردد و اجازه داده می‌شود تا خودش وارد محفظه تاریک گردد. زمان تأخیر 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 که ۲۴ ساعت پس از مرحله سازگار شدن انجام گرفت، پس از اولین ورود حیوان به محفظه تاریک، بلافاصله

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

آنالیز بیوشیمیایی؛ سنجش فعالیت AChE هم‌زمان با ارزیابی‌های بافتی، تعدادی از حیوانات هر گروه ($N=6$) به کمک گاز کلروفورم بی‌هوش و بلافاصله سر حیوان با استفاده از گیوتین مخصوص جوندگان جدا شد. کل مغز به سرعت از بخش زیرین مجموعه خارج گردید و با استفاده از نرمال سالین روی یخ 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 ۱۳۰۰۰ 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 اندازه‌گیری گردید (۱۶). مخلوط هموژنیزه مغز و بافر ۵۰ میلی‌مولار سدیم فسفات ($pH=8.0$) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید و سپس به مخلوط واکنش Ellman (5/0 میلی‌مولار استیل تیوکولین و ۱ میلی‌مولار ۵،۵-dithiobis-nitrobenzoic acid); DTNB در بافر ۵۰ میلی‌مولار فسفات سدیم اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۲۰ دقیقه)، میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده گشت (۱۶).

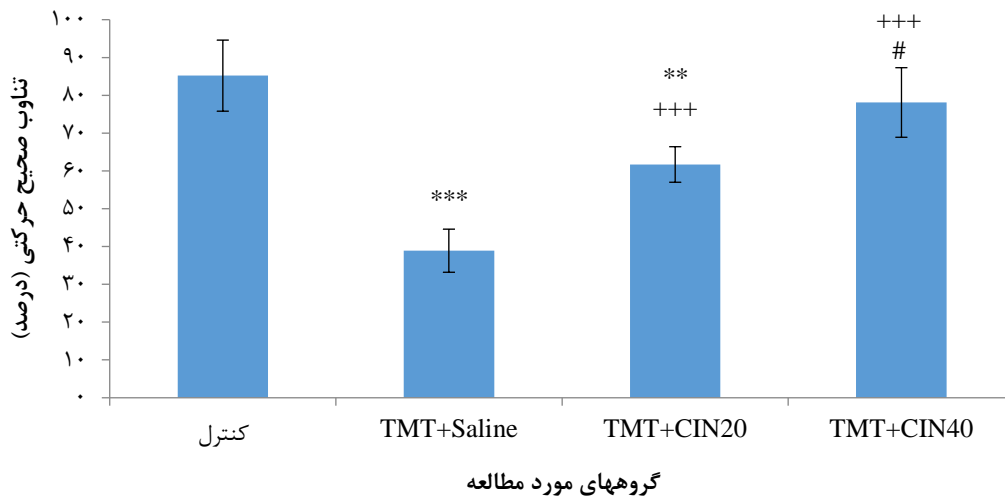
تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری میان گروه‌های مختلف از نرم‌افزار SPSS vol.20 استفاده گردید. داده‌های به دست آمده پس از مرتب شدن، به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش داده شد.

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 (۱۴).

هیستوپاتولوژی؛ ارزیابی تراکم نورونی هیپوکامپ: پس از انجام آزمون حافظه اجتنابی و کاری و برای سنجش تراکم نورونی در نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ، تعدادی از حیوانات در هر گروه ($N=4$) به صورت تصادفی انتخاب و با مخلوطی از دو داروی کتامین هیدروکلراید (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش و سپس پرفیوژن قلبی با محلول پارافرمالدهید ۴ درصد انجام شد. پس از اتمام پرفیوژن، مغز با دقت از مجموعه خارج گردید؛ سپس نمونه‌های مغز با کمک دستگاه پردازشگر بافتی و درجات اتانول پردازش شد و پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، برش‌گیری از ناحیه هیپوکامپ طبق اطلس پاکسینوس و واتسون صورت گرفت. اسلایدهای تهیه‌شده با هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شد و با میکروسکوپ نوری (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 معنی داری دیده شد ($P < 0.01$). مقایسه میان گروه TMT+Saline با گروه های دریافت کننده سینامیک اسید نشان داد که در گروه های TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نسبت به گروه TMT+Saline، افزایش معناداری در درصد تناوب حرکتی وجود دارد ($P < 0.001$). درصد تناوب حرکتی در گروه دریافت کننده سینامیک اسید با دوز ۲۰ میلی گرم (TMT+CIN20) با گروه دریافت کننده دوز ۴۰ میلی گرم (TMT+CIN40) نیز اختلاف معناداری داشت (شکل شماره ۱، $P < 0.05$).



شکل شماره ۱. مقایسه میانگین \pm انحراف استاندارد درصد تناوب صحیح حرکتی در گروه‌های مختلف نتایج نشان می‌دهد که میان گروه کنترل با گروه TMT+Saline و TMT+CIN20 اختلاف معنادار است ($P < 0.001$ و $P < 0.01$). 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 ($P < 0.05$).

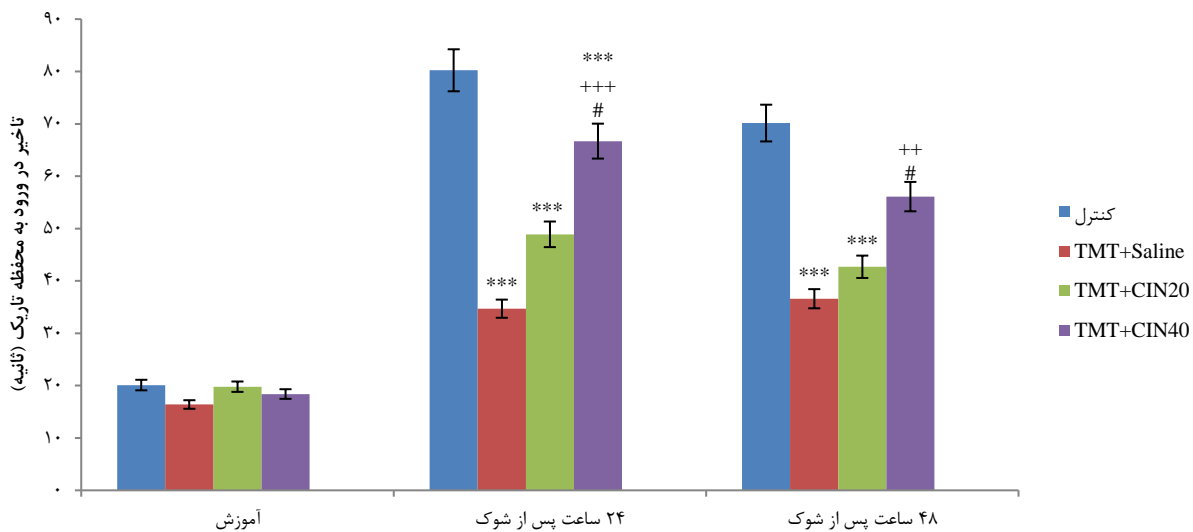
معنادار بود (شکل شماره ۲، $P < 0.05$). ۴۸ ساعت پس از دریافت شوک، در گروه‌های TMT+Saline ($P < 0.001$) و TMT+CIN20 ($P < 0.001$) کاهش معنا داری در مدت زمان تأخیر ورود به محفظه تاریک نسبت به گروه کنترل دیده شد؛ همچنین در گروه‌های TMT+CIN20 و TMT+CIN40 در مقایسه با گروه TMT+Saline، افزایش معنادار بود (به ترتیب: $P < 0.05$ و $P < 0.01$) و نیز اختلاف معناداری میان دو گروه TMT+CIN20 و TMT+CIN40 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 معنی دار میان گروه‌های مدنظر از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی استفاده شد. از نظر آماری، مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی حافظه کوتاه مدت کاری: نتایج ANOVA و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که درصد تناوب صحیح حرکتی در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی داری دارد ($P < 0.001$), هر چند

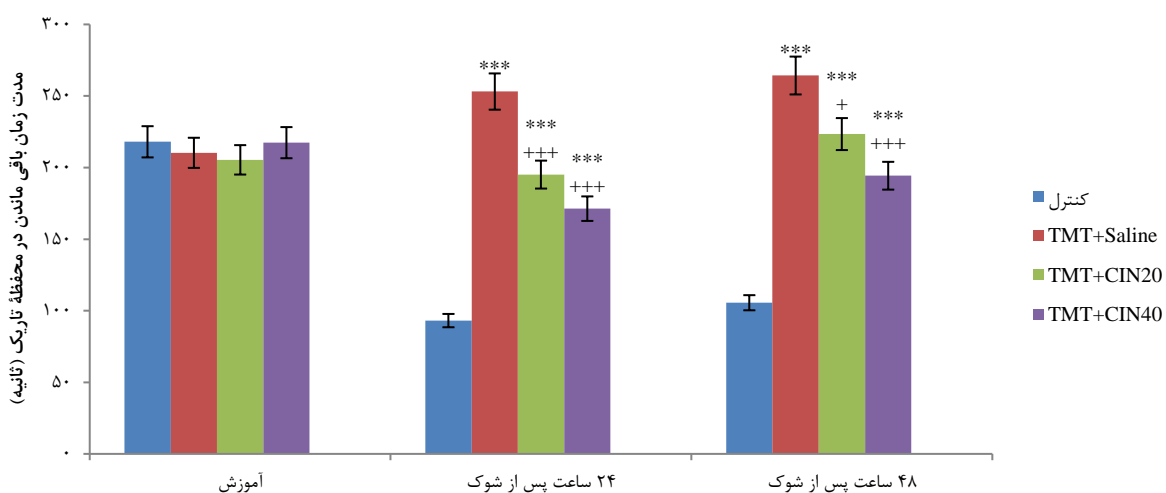
ارزیابی حافظه اجتنابی غیرفعال: در مرحله آموزش تأخیر در ورود به محفظه تاریک، تفاوت معناداری میان گروه‌های مطالعه وجود نداشت (شکل شماره ۲). ۲۴ ساعت پس از دریافت شوک، در تأخیر ورود به محفظه تاریک، گروه کنترل افزایش معناداری در مقایسه با گروه‌های TMT+Saline، TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نشان داد ($P < 0.001$);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



شکل شماره ۲. مقایسه میانگین \pm 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+CIN40 و TMT+CIN20 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 $P<0.01$).

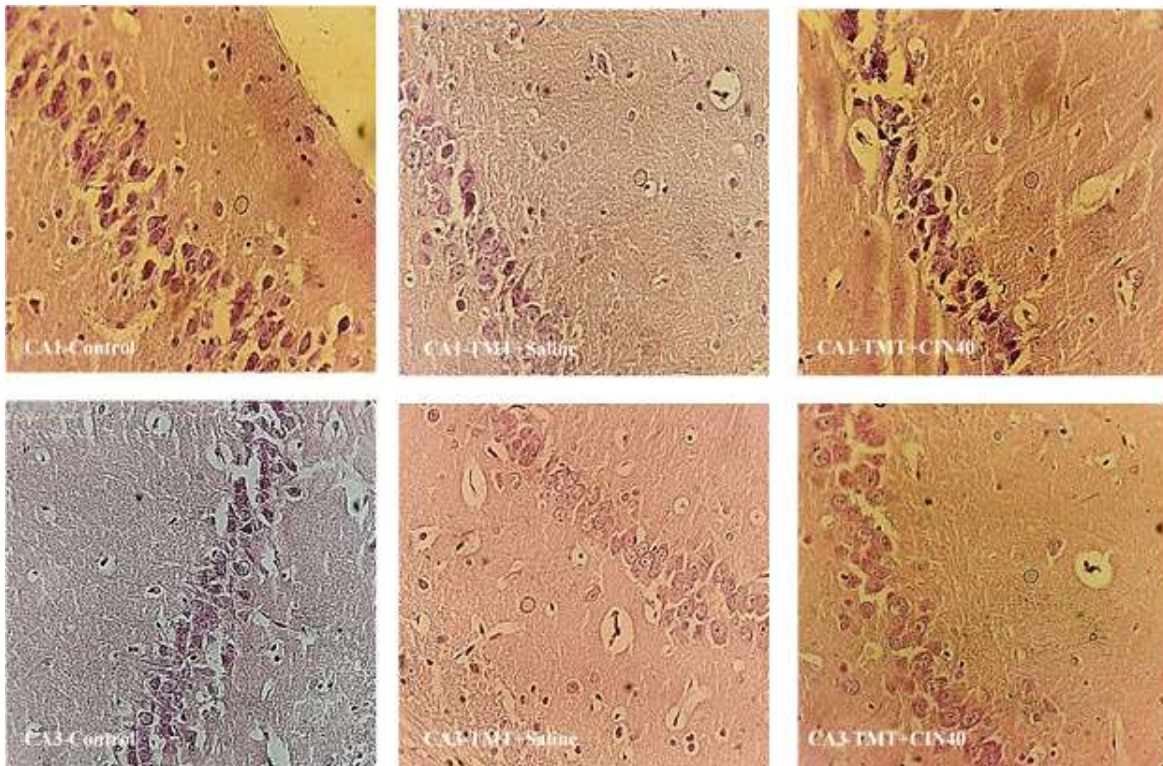
میانگین مدت زمان حضور حیوان در محفظه تاریک (شکل شماره ۳) نشان داد که اختلافی میان گروه‌های مطالعه در مرحله آموزش وجود ندارد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از دریافت شوک، در گروه‌های TMT+Saline، TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری دیده شد ($P<0.001$).



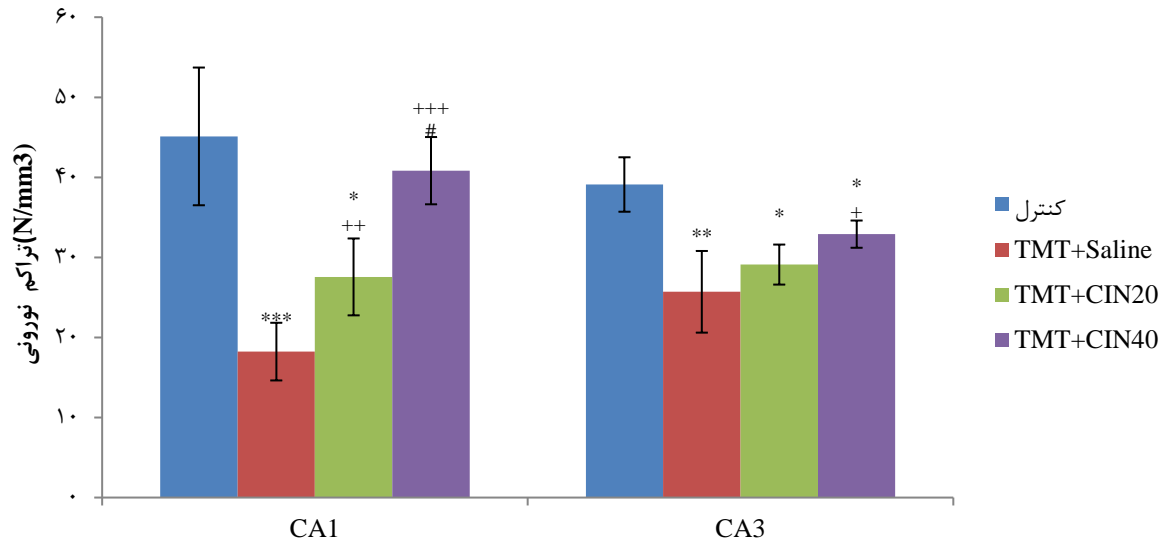
شکل شماره ۳. مقایسه میانگین \pm انحراف استاندارد مدت زمان باقی ماندن در محفظه تاریک. در مرحله آموزش، اختلاف معناداری میان گروه‌ها دیده نشد. پس از دریافت شوک در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، میان گروه کنترل با گروه‌های TMT+Saline، TMT+CIN20 و TMT+CIN40 اختلاف معناداری مشاهده گردید ($***P<0.001$). در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

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 دریافت‌کننده 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 TMT+CIN20 و کنترل نیز اختلاف معنادار بود ($P < 0.05$).

در میان گروه‌های تیمار، هر دو گروه TMT+CIN20 و TMT+CIN40 ($P < 0.001$) 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 ($P < 0.01$)، TMT+CIN20 و TMT+CIN40 ($P < 0.05$) 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، $P < 0.05$).



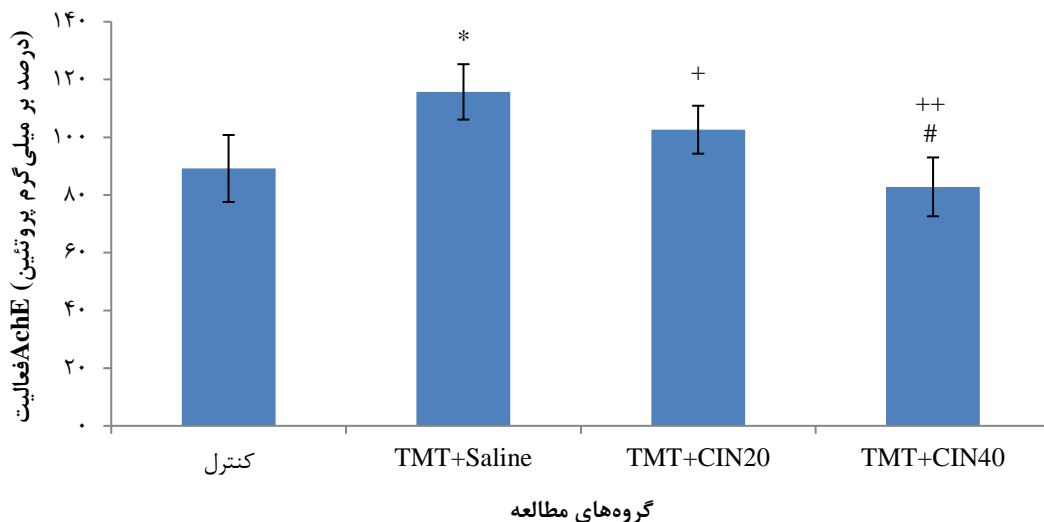
شکل شماره ۴. میکروگراف تهیه‌شده از هیپوکامپ موش‌های صحرایی در گروه‌های مطالعه، رنگ آمیزی H-E، بزرگ‌نمایی ۴۰۰. کاهش تراکم نورونی در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل و افزایش تراکم نورونی در گروه TMT+CIN40 و در مقایسه با گروه TMT+Saline در هر دو ناحیه CA1 و CA3 هیپوکامپ دیده می‌شود.



شکل شماره ۵. مقایسه میانگین \pm انحراف استاندارد تراکم نورونی نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ در گروه‌های گوناگون. میان گروه کنترل با گروه‌های TMT+NS و TMT+GA200 در نواحی CA1 و CA3، اختلاف معنادار بود ($P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.05$)*؛ همچنین اختلاف معناداری میان هر دو گروه تیمار شده با سینامیک اسید با گروه TMT+Saline در CA1 و میان گروه TMT+CIN40 با گروه TMT+Saline در CA3 وجود داشت ($P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.05$)*. 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 کولینرژیک: برای سنجش فعالیت کولینرژیک در بافت هیپوکامپ، فعالیت AChE سنجیده شد (شکل شماره ۶). نتایج نشان داد که سطح فعالیت این آنزیم به دنبال تجویز TMT، به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.05$)، در حالی که سطح فعالیت این آنزیم در



شکل شماره ۶. مقایسه میانگین \pm 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 ($P < 0.05$ و $P < 0.01$)*. میان گروه‌های TMT+CIN20 و TMT+CIN40 نیز اختلاف معناداری دیده شد ($P < 0.05$)*.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که مسمومیت حاد با تری‌متیل‌تین (TMT) سبب اختلال در حافظه فضایی، حافظه کاری و آسیب سلولی در نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ می‌شود و تجویز سینامیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند سبب بهبود نواقص شناختی ناشی از TMT و افزایش تراکم سلولی در CA1/CA3 نسبت به گروه درمان‌نشده گردد.

بیماری آلزایمر (AD) یکی از پیچیده‌ترین اختلالات عصبی مغز است. این بیماری عمدتاً بر جمعیت سالخورده تأثیر می‌گذارد و به اختلال عملکرد شناختی پیش‌رونده، اختلالات رفتاری و مشکلات در زندگی روزمره منجر می‌شود. AD از نظر نوروپاتولوژیک، با زوال نورون‌های کولینرژیک مغز قدامی، اختلالات دستگاه عصبی مرکزی و پلاک‌های آمیلوئیدی قشر مغز و هایپرفسفریلاسیون حاوی پروتئین تاو مرتبط است (۱۷). استیل‌کولین (ACh) یکی از میانجی‌های عصبی در گیر در حافظه و یادگیری است. به‌نظر می‌رسد کاهش فعالیت دستگاه کولینرژیک مغزی در تشکیلات هیپوکامپ لوب تمپورال یکی از عوامل تعیین‌کننده در پیشرفت زوال حافظه، هم در طول پیری طبیعی و هم در بیماران آلزایمری باشد (۱۸). بر اساس فرضیه کولینرژیک، کاهش فعالیت کولین استیل ترانسفراز (ChAT) و سنتز ACh ارتباط نزدیکی با اختلالات شناختی مانند AD دارد (۱۹).

TMT یک ترکیب نوروتوکسیک است که الگوی مشخصی از مرگ عصبی را در هیپوکامپ و سایر اجزای دستگاه لیمبیک القا می‌کند. آسیب هیپوکامپی ناشی از TMT می‌تواند مسئول اختلالات شناختی باشد. بسیاری از مطالعات گزارش داده‌اند که تجویز TMT در جوندگان سبب اختلالات نوروپاتولوژیک هیپوکامپ و زوال چشمگیری در حافظه و یادگیری می‌شود (۲۰). هیپوکامپ آوران‌ها و وبران‌های متعددی دارد. آکسون سلول‌های هرمی ناحیه CA1 خروجی اصلی هیپوکامپ است که به ساختمان مختلف مغزی ارسال می‌شود. سپتوم یکی از نواحی‌ای است که از هیپوکامپ ورودی دریافت می‌کند. خروجی هیپوکامپ از نواحی CA1 و CA3 وارد سپتوم می‌گردد. امروزه نقش

دستگاه سپتوم هیپوکامپی در انجام اعمال مختلف یادگیری و حافظه به اثبات رسیده است (۲۱). آسیب به نواحی CA1/CA3 هیپوکامپ 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 هیستوشیمیایی در اتصال گیرنده‌های موسکاربینی هیپوکامپ 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 مهارکننده‌های 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 TMT+Saline فعالیت AChE را در هیپوکامپ 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. مهارکننده‌های AChE مانند تاکرین، دونزیل و فیزوستیگمین به‌صورت طولانی‌مدت در کلینیک برای درمان علائم بیماران AD استفاده شده است، با این حال، اگرچه این مهارکننده‌ها قادرند تا حدودی نقایص شناختی را بهبود بخشند، اما عوارض جانبی شدید، مشکلات فراهمی زیستی و هزینه‌های بالایی نیز دارند (۲۴)؛ بنابراین، یافتن مهارکننده‌های AChE طبیعی، ایمن‌تر و ماندگارتر ضروری به‌نظر می‌رسد. از ترکیبات طبیعی و مواد شیمیایی گیاهی می‌توان به‌عنوان منبع مهارکننده‌های AChE استفاده کرد.

سینامیک اسید یک ترکیب فعال زیستی طبیعی است که به‌وفور در میوه‌ها، سبزی‌ها و غلات کامل وجود دارد. به‌طورکلی می‌توان آن را از دارچین (Cinnamomum

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

ترانس سینامیک اسید، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی، نقش حفاظت‌کننده عصبی در اختلالات شناختی و زوال حافظه ناشی از TMT دارد و سبب بهبود آسیب سلولی و جلوگیری از کاهش تراکم نورونی در نواحی حساس به استرس اکسایشی هیپوکامپ می‌گردد. این عملکرد حفاظت‌کننده عصبی سینامیک اسید احتمالاً ناشی از آثار مهارکننده استیل کولین استراز (AChE) در هیپوکامپ مغز باشد؛ بنابراین، تجویز این ترکیب در کلینیک به‌عنوان درمان کمکی در بیماران مبتلا به بیماری آلزایمر توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از زحمات معاونت پژوهشی دانشگاه در فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.IAU.SHIRAZ.REC.1400.014

References

1. Mantzavinos V, Alexiou A. Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Curr Alzheimer Res* 2017;14:1149-54. doi: 10.2174/1567205014666170203125942.
2. 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.
3. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017;57:1105-21. doi: 10.3233/JAD-161088.
4. 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: 10.1093/brain/awy132.
5. 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 به‌دست آورد. علاوه بر اینکه مطالعات نقش سینامیک اسید را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب، ضددیابت و عامل ضدسرطان برجسته کرده است، این ترکیب خواص دارویی مختلفی دارد که می‌تواند در برابر اختلالات عصبی مختلف عمل کند (۲۵). یک مشتق ۳ و ۲ دی‌متیل اسید سینامیک استخراج‌شده از برگ‌های گیاه جوز هندی (*pycnanthus angolensis*) فعالیت بالقوه مهار کولین استراز داشته است (۲۶)؛ همچنین یکی دیگر از مشتقات جدید سینامیک اسید که پتانسیل بازدارندگی AChE بالایی در محدوده غلظت ۳۰-۷/۵ نانومول در لیتر دارد، در مقایسه با مهارکننده استاندارد AChE، دونیزیل، بیش از سه برابر پتانسیل بازدارندگی بالاتری نشان می‌دهد (۲۶). علاوه بر این، برای این مشتق ویژگی ضدآلزایمری مانند مهار تجمع A β ، محافظت عصبی در برابر سمیت ناشی از آمیلوئید و توانایی نفوذ به سد خونی مغزی گزارش شده است (۲۷). عصاره بومادران سرشار از پلی‌فنول‌هایی است که مشتقات اسید سینامیک را شامل می‌شود. عصاره این گیاه به‌طور رقابتی باعث مهار AChE می‌گردد و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد و به‌عنوان یک عامل بالقوه درمانی در برابر AD

6. Ruwizhi N, Aderibigbe BA. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *Int JMolSci* 2020;215712. doi: 10.3390/ijms21165712.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Edalatmanesh MA, Hosseini M, Ghasemi S, Golestani 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, Hossini 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 Fucoïdan from *Ecklonia cava* Prevents the A β -Induced Cognitive Decline with Mitochondrial and Cholinergic Activation. *Mar Drugs* 2021;19:434. doi: 10.3390/md19080434.
 17. Shekari A, Fahnstock 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.bjp.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.