

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۷، آبان ۱۳۹۷، ۸۲۸-۸۱۵

اثر اسید گالیک بر سطح افسردگی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و سایتوکاین‌های التهابی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی به دنبال مسمومیت با تری‌متیل‌تین: یک مطالعه تجربی

محمدامین عدالت‌منش^۱، سولماز شاهسون^۲، سمانه رفیعی^۳، حبیب‌الله خدابنده^۴

دریافت مقاله: ۹۷/۳/۱۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۴/۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۷/۴ پذیرش مقاله: ۹۷/۷/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: تری‌متیل‌تین (Trimethyltin; TMT)، اورگانوتینی است که سبب دژنراسیون انتخابی هیپوکامپ و بروز نشانه‌های افسردگی در انسان و جوندگان می‌گردد. مطالعه حاضر، اثر اسید گالیک (Gallic Acid; GA) را بر نشانه‌های افسردگی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و فعالیت سایتوکاین‌های التهابی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی به دنبال مسمومیت با TMT بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی در ۵ گروه شامل کنترل، TMT+Saline، TMT+GA۵۰، TMT+GA۱۰۰ و TMT+GA۲۰۰ قرار گرفتند. ۴۸ ساعت پس از مسمومیت با TMT، گروه‌های دریافت‌کننده GA، دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و گروه TMT+Saline، نرمال سالین را به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. پس از بررسی علائم افسردگی، سطوح هیپوکامپی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا (TNF-) و اینترلوکین ۱ بتا (IL-1) به روش الایزا سنجیده شد. جهت بررسی اختلاف بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه با آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دهنده افزایش مدت زمان بی‌حرکتی در گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل و کاهش معنی‌دار این زمان در گروه‌های دریافت‌کننده اسید گالیک در دوزهای بالا بود ($p < 0.001$). اسید گالیک سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT و GPX) و کاهش میزان MDA، TNF- و IL-1 نسبت به گروه TMT+Saline گردید ($P = 0.05$).

نتیجه‌گیری: تجویز اسید گالیک با تعدیل فاکتورهای التهابی و کاهش استرس اکسیداتیو سبب بهبود علائم افسردگی ایجاد شده توسط TMT گردید.

واژه‌های کلیدی: تری‌متیل‌تین، افسردگی، اسید گالیک، استرس اکسیداتیو، سایتوکاین‌های التهابی، موش صحرایی

۱- (نویسنده مسئول) استادیار فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

تلفن: ۰۷۱-۳۶۴۱۰۰۴۱، دورنگار: ۰۷۱-۳۶۴۱۰۰۵۹، پست الکترونیکی: amin.edalatmanesh@gmail.com

۲- دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۳- دانشجوی دکتری بیوشیمی و متابولیسم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، پردیس بین‌المللی کیش، دانشگاه تهران، کیش، ایران

۴- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی-تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

مقدمه

منجر به آزادسازی سیتوکروم C و فعالیت کاسپازها می‌شود. افزایش کلسیم با آزاد سازی کلسیم از ذخایر درون سلولی (میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی) نتیجه فعالیت کالپین و کاتپسین D است که به دنبال مسمومیت با TMT در سلول‌های مغزی رخ می‌دهد [۸]. مطالعات اخیر التهاب عصبی را به دنبال مسمومیت با TMT در سلول‌های میکروگلیال نشان داده است [۹]. فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا (Tumor Necrosis Factor; TNF-) قوی‌ترین تنظیم کننده التهابی است که می‌تواند تولید سایتوکین‌های دیگری را که مسئول شروع مرگ نورونی هستند، القاء نماید [۱۰]. این عامل به عنوان فاکتور اصلی القاء کننده مرگ سلولی ناحیه ژيروس دندانه‌ای به دنبال تجویز TMT شناخته شده است [۱۱] که احتمالاً با SNN نیز مرتبط است [۷]. فعالیت میکروگلیالی به موازات افزایش بیان TNF-، تولید سایتوکین‌های دیگر نظیر اینترلوکین ۱-آلفا و بتا را نیز در هیپوکامپ افزایش می‌دهد [۱۱]. در واقع، بین عمل کرد سایتوکین‌ها در مغز و فعالیت عصبی در بیماران مبتلا به اختلالات عصبی-روانی ارتباط وجود دارد [۱۲]. مطالعات نشان داده‌اند که بیماری‌های مبتلا به افسردگی و اختلال دو قطبی سطوح افزایش یافته‌ای از سایتوکین‌های پیش التهابی را در سرم خون دارند [۱۳].

اسید گالیک (۳ و ۴ و ۵- تری هیدروکسی بنزوئیک اسید) یکی از مهم‌ترین ترکیبات پلی فنولی در گیاهان و محصول هیدرولیز تانن‌ها می‌باشد [۱۴]. این ترکیب اثرات ضد دیابتی، ضد سرطان و جهش‌زایی و ضد ویروسی و آپوپتوز و آنتی‌اکسیدان را نشان می‌دهد [۱۵] و از آسیب

تری‌متیل‌تین (Trimethyltin; TMT) ارگانوتین است که در پلی وینیل کلراید (Poly Vinyl Chloride; PVC) و محصولات سیلیکونی مانند ظروف آشپزخانه، بسته‌بندی‌های مواد غذایی و آفت‌کش‌ها به فراوانی یافت می‌شود [۱]. این ترکیب در سیستم آب آشامیدنی منازل، محیط‌های آبی و دریایی نیز دیده شده است [۲]. از آنجایی که این ماده به عنوان یک فرآورده جانبی جهت تثبیت پلاستیک کاربرد دارد، غالباً مسمومیت حاد آن در کارخانه‌جات پلاستیک یا صنایعی که نیاز به حرارت دادن پلاستیک دارند، مشاهده شده است [۳].

مسمومیت با TMT سبب ایجاد اختلالات رفتاری-شناختی در انسان و حیوانات آزمایشگاهی می‌شود [۴]. عوارض نورووتوکسیک این ترکیب در انسان باعث ایجاد سندرم لیمبیک‌مخچه می‌گردد که با اختلال حافظه، گیجی، صرع، فراموشی، بی‌خوابی و افسردگی همراه است [۵]. در جوندگان، TMT سبب القاء ضایعاتی در هیپوکامپ و سیستم لیمبیک می‌گردد [۶]. به عنوان یک مدل حیوانی، مکانیزم‌های مولکولی نظیر التهاب عصبی، سمیت تحریکی، افزایش درون سلولی کلسیم، اختلالات میتوکندریایی و استرس اکسیداتیو به دنبال مسمومیت با TMT قابل بررسی هستند، منجر به دژنراسیون هیپوکامپ می‌گردند [۷]. استرس اکسیداتیو با تولید گونه‌های اکسیژن و نیتروژن واکنشی و لیپو پراکسیداسیون مشخص می‌گردد. در حالی که آسیب میتوکندریایی احتمالاً نتیجه بر هم کنش TMT با پروتئین استاتین (SNN) است که

در اختیار حیوانات قرار گرفت. به منظور حصول سازش با محیط، آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز بعد از استقرار حیوانات به انجام رسید. تمام آزمایش‌ها مطابق با قوانین بین‌المللی نگهداری (شامل استفاده از حداقل تعداد نمونه آزمایشگاهی) و مراقبت از حیوانات و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و با کد اخلاق ۴۵۱۲-۲۱۳۶-۹۵ انجام شد.

حیوانات به صورت تصادفی در ۵ گروه (هر گروه شامل ۱۰ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل: در حیوانات این گروه هیچ نوع ماده‌ای تزریق نشده و به منظور بررسی با سایر گروه‌های مورد مطالعه، مورد استفاده قرار گرفت. گروه TMT+Saline: حیوانات این گروه دوز ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم تری متیل تین (TMT; Sigma, Germany) را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند [۲۰] و سپس حلال اسید گالیک یعنی نرمال سالین را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه‌های TMT+GA۵۰، TMT+GA۱۰۰ و TMT+GA۲۰۰: حیوانات این سه گروه ۴۸ ساعت پس از دریافت تری‌متیل‌تین، به مدت ۱۴ روز به ترتیب دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید گالیک (Sigma, Germany) را به صورت گاوژ دریافت نمودند.

آزمون‌های رفتاری سنجش افسردگی پس از پایان دوره تیمار با نرمال سالین و یا اسید گالیک انجام شد. به منظور اطمینان از داده‌های به دست آمده فیلم‌های به دست آمده توسط شخص دیگری به جز محققین بازبینی شدند. کلیه آزمایشات در زمان غروب آفتاب که تحرک موش‌های صحرایی بالاتر است، انجام شد. هر آزمایش

اکسایشی به کبد و کلیه جلوگیری می‌کند [۱۶]. هم‌چنین، سلول‌های عصبی را در برابر مرگ القاء شده توسط پپتیدهای آمیلوئیدی (A) حفاظت می‌کند [۱۷]. هر چند، مطالعات نشان داده اند که TMT بدون آسیب به سد خونی سبب ایجاد ضایعات نورونی می‌گردد [۱۸]، با این حال اسید گالیک می‌تواند به راحتی از طریق سد خونی مغزی عبور کند و عملکرد نورونی را در نواحی بحرانی مغز بهبود بخشد [۱۹].

بنابراین، با توجه به توزیع گسترده ارگانوتین‌ها و امکان مسمومیت با آن و از طرفی یافتن یک ترکیب آنتی‌اکسیدان با خصوصیت محافظت کننده عصبی و تعدیل کننده خلق، پژوهش حاضر به ارزیابی اثر اسید گالیک بر سطح افسردگی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و سایتوکین‌های التهابی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی به دنبال مسمومیت با TMT می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، از ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داوولی با وزن 220 ± 10 گرم و سن تقریبی دو ماه استفاده شد. موش‌های صحرایی در طول مدت آزمایش در شرایط استاندارد با چرخه‌ی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 50 ± 10 درصد در حیوان‌خانه آزمایشگاه تحقیقاتی علوم جانوری دانشگاه آزاد اسلامی شیراز نگهداری شدند. در این پژوهش از غذای مخصوص موش با فرمولاسیون استاندارد (شرکت تولیدی غذای دام و طیور فارس) استفاده شد و به همراه آب آشامیدنی به صورت نامحدود

می‌باشد. مدت زمان مورد محاسبه در این آزمون ۵ دقیقه می‌باشد. در این بازه زمانی، مدت زمان عدم تحرک حیوان به وسیله آزمایش‌گر ثبت شد.

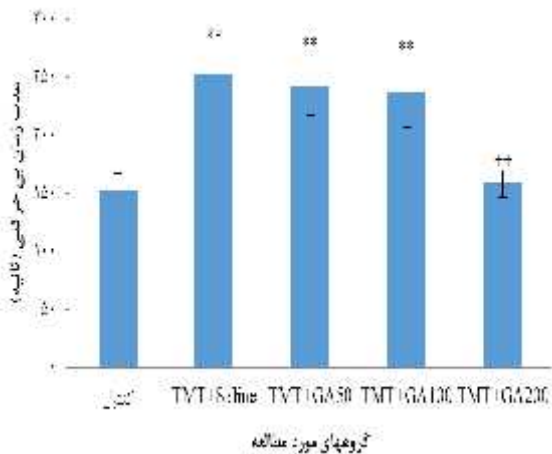
پس از انجام آزمون‌های رفتاری، حیوانات هر گروه با دوز کشنده کلروفورم بیهوش و بلافاصله سر حیوان با دستگاه گیوتین مخصوص جوندگان جدا گردید. مغز به طور کامل از جمجمه خارج شد و به سرعت بر روی یخ قرار گرفت. هیپوکامپ موش‌های صحرایی با دقت در زیر استریوسکوپ (Olympus, Japan) از بقیه قسمت‌های مغز جدا شد. پس از شستشو با محلول سالین به همراه بافر تریس (Sigma, Germany) به مدت ۵ دقیقه با دستگاه هموژنایزر (IKA, Germany) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه شد. محلول هموژنیزه شده توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hermle, Germany) سانتریفیوژ و از محلول ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (Sigma-) (Aldrich, Germany) به‌عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده شد. پس از سانتریفیوژ، رو شناور به کمک سمپلر برداشته شد و سپس میزان بافتی فاکتورهای استرس اکسیداتیو و سایتوکین‌های التهابی مورد سنجش قرار گرفت [۲۲].

توسط روش ELISA و کیت‌های شرکت فاین تست سطح آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase; SOD) با حساسیت $< 9/375$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/۶ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، کاتالاز (Catalase; CAT) با حساسیت $< 18/75$ میلی‌واحد بین الملل بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲ میلی‌واحد بین الملل بر میلی‌لیتر، گلوکوتائون پراکسیداز

حداقل برای هر حیوان سه بار در فواصل زمانی ۲۴ ساعته تکرار شد.

آزمون شنا کردن اجباری، بازتاب دهنده یک مرحله از یأس رفتاری در افسردگی می‌باشد. در این آزمون موش‌های صحرایی در استوانه‌ای به ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر و قطر ۱۸ سانتی‌متر که ۳۰ سانتی‌متر از آن توسط آب آشامیدنی با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد پر شده است، قرار داده شدند. حیوانات پس از تجربه ۱۵ دقیقه‌ای شنا در روز اول، ۲۴ ساعت بعد به مدت ۵ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفتند. دوره زمانی عدم تحرک (بی‌حرکتی)، مدت زمان شنا، مدت زمانی که موش صحرایی در زیر آب قرار دارد (شیرجه زدن) و مدت زمانی که صرف بالا رفتن از دیواره می‌کند توسط دوربین مدار بسته ثبت و سپس بر حسب ثانیه اندازه‌گیری شد. عدم تحرک مدت زمان بی‌حرکتی برای حداقل ۲ ثانیه یا تنها آن دسته از حرکاتی که الزاماً برای نگهداری بینی بالای آب انجام می‌شود، در نظر گرفته شد [۲۱]. به منظور بررسی اعتبار مدل ایجاد شده و سنجش میزان افسردگی در گروه‌های مختلف از آزمون آویزان کردن از دم استفاده شد. هر حیوان از سقف یک محفظه مکعب شکل با اضلاعی به طول ۲۵ سانتی‌متر از دم آویزان می‌شود به طوری که دو دست حیوان روی کف محفظه قرار دارد [۲۱]. دم حیوان به کمک نوار چسب پلاستیکی نرم به قلابی که درست در مرکز سقف این محفظه قرار دارد بسته می‌شود. سعی می‌شود تا هیچ نوع آسیبی در این وضعیت به حیوان وارد نشود. دیواره‌ای که رو به روی آزمایش‌گر قرار دارد به منظور ایجاد ثبت حرکات حیوان، از جنس پلاستیک شفاف و متحرک

در میانگین مدت زمان بی‌حرکتی نشان داد (شکل ۱).
 بین گروه‌های دریافت کننده دوز ۵۰
 (۲۴/۹±۲۴۲/۲ ثانیه) و ۱۰۰ (۳۰/۵±۲۳۷/۶) اسید
 گالیک با گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌دار بود
 ($P < 0.001$).



شکل ۱- مقایسه میانگین (آنالیز واریانس یک طرفه) مدت زمان بی‌حرکتی طی تست معلق شدن از دم. $P < 0.001$ **مقایسه گروه‌های مختلف با گروه TMT+Saline $P < 0.001$ **مقایسه گروه‌های دریافت کننده اسید گالیک با گروه TMT+Saline.

علاوه بر این، نتایج نشان دادند که حیوانات گروه TMT+Saline که تری‌متیل‌تین و نرمال سالین دریافت نموده‌اند، اختلاف معنی‌داری در مدت شنا نسبت به گروه کنترل نشان نمی‌دهند (جدول ۱). هر چند مدت زمان شنا کردن در گروه‌های تست نسبت به گروه TMT+Saline افزایش یافته است با این حال، این افزایش در هیچ یک از گروه‌های مورد مطالعه معنی‌دار نیست ($p > 0.05$). تیمار با TMT به طور قابل توجهی مدت زمان بی‌حرکتی را در حیوانات گروه TMT+Saline نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($P < 0.001$). از طرفی، تیمار با دوزهای مختلف اسید گالیک سبب کاهش معنی‌دار مدت

(Glutathione Peroxidase; GPX) با حساسیت $< 18/75$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و مالون دی‌آلدئید (Malondealdehyde;) با حساسیت $< 4/688$ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۵۰۰-۷/۸۱۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر در هیپوکامپ سنجش شد. هم‌چنین، سطح هیپوکامپی TNF- حساسیت $< 46/875$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۵۰۰۰-۷۸/۱۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و اینترلوکین-۱ (Interleukin-1 ; IL-1) با حساسیت $< 18/75$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر نیز مورد سنجش قرار گرفت [۲۲]. تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد نظر در آزمون‌های رفتاری از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. از نظر آماری مقادیر $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس وجود اختلاف معنی‌داری در مدت زمان بی‌حرکتی بین گروه‌های کنترل و TMT+Saline نشان داد (شکل ۱). در این آزمون مدت زمان بی‌حرکتی حیوان در گروه TMT+Saline به مراتب بیشتر از گروه کنترل می‌باشد (۳۱/۷±۲۵۲/۴ ثانیه در مقابل ۱۳/۴±۱۵۲/۸ ثانیه، $P < 0.001$). هم‌چنین، در بین گروه‌های دریافت کننده اسید گالیک، گروه TMT+GA۲۰۰ با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌دار

دیواره استوانه نسبت به گروه TMT+Saline گردید (جدول ۱، $P < 0/001$). در شاخص مدت زمان شیرجه زده در آب، بین گروه کنترل و گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌داری دیده شد. در واقع این میزان در گروه TMT+Saline کاهش قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل نشان داد (جدول ۱، $P < 0/01$). بین گروه‌های تیمار با اسید گالیک و گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌دار دیده شد ($P < 0/01$). اما بین گروه TMT+Saline با گروه‌های دریافت کننده اسید گالیک اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

زمان بی‌حرکتی در گروه‌های TMT+GA50، TMT+GA100 و TMT+GA200 نسبت به گروه TMT+Saline گردید ($P < 0/001$). همچنین، بین گروه‌های TMT+GA50 و TMT+GA100 با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0/05$). مدت زمان بالا رفتن از دیواره در آزمون شنای اجباری کاهش معنی‌داری را در گروه TMT+Saline نسبت گروه کنترل نشان داد ($P < 0/001$). همچنین، در بین گروه‌های دریافت کننده اسید گالیک تنها گروه TMT+GA50 با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P < 0/001$). تیمار با اسید گالیک، سبب افزایش معنی‌داری در مدت زمان بالارفتن از

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار پارامترهای سنجیده شده بر حسب ثانیه در آزمون شنا کردن اجباری به تکنیک گروه ($n=10$)

گروه / پارامتر	مدت زمان شنا کردن	مدت زمان بی حرکتی	مدت زمان بالارفتن از دیواره	مدت زمان شیرجه زدن
کنترل	۲۲۷/۱۱ ± ۱۷/۴۲	۴۲/۳۶ ± ۶/۳۴	۳۴/۱۰ ± ۶/۱۷	۴/۴۰ ± ۰/۶۶
TMT+Saline	۲۰۰/۸۲ ± ۲۵/۳۶	^a ۸۹/۲۵ ± ۸/۵۷	^a ۱۰/۸۲ ± ۲/۴۹	^a ۱/۰۶ ± ۰/۵
TMT+GA50	۲۱۵/۷۵ ± ۴۴/۷۱	^{a,b} ۵۱/۹۶ ± ۶/۰۴	^{a,b} ۲۲/۵۰ ± ۷/۶۵	^a ۱/۵۹ ± ۰/۲۴
TMT+GA100	۲۱۲/۰۸ ± ۳۷/۲۶	^{a,b} ۵۰/۸۱ ± ۸/۲۷	^{a,b,c} ۲۹/۴۷ ± ۵/۸۷	^a ۱/۳۱ ± ۰/۷۰
TMT+GA200	۲۲۴/۲۱ ± ۳۰/۱۲	^b ۴۸/۳۶ ± ۵/۱۵	^{b,c,d} ۳۷/۸۶ ± ۴/۴۵	^a ۱/۶۱ ± ۰/۳۵
سطح معنی‌داری	۰/۰۶۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱۸

آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey a ، b و c در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0/05$ در مقایسه با گروه TMT+Saline و $p < 0/05$ در مقایسه با گروه TMT+GA50 و $p < 0/05$ در مقایسه با گروه TMT+GA100.

TNF- و IL-1 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). در مقایسه با گروه TMT+Saline، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPX هیپوکامپ در گروه‌های تیمار شده با دوزهای مختلف اسید گالیک وابسته به میزان دوز تزریقی به‌طور معنی‌داری افزایش و

همچنین، نتایج حاصل از تحلیل داده‌های این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX در نمونه‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی دریافت کننده TMT که تنها نرمال سالین دریافت نمودند در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش و میزان MDA،

میزان MDA، TNF- و IL-1 به طور معنی داری کاهش یافت (جدول ۲، $P < 0.05$).

جدول ۲- میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان MDA و سایتوکین‌های التهابی هیپوکامپ به تفکیک گروه ($n=10$)

گروه / پارامتر	SOD (میلی لیتر)	CAT (میلی واحد بین الملل بر میلی لیتر)	GPX (میلی لیتر)	MDA (نانوگرم بر میلی لیتر)	TNF- (پیکوگرم بر میلی لیتر)	IL-1 (پیکوگرم بر میلی لیتر)
کنترل	۶۰/۳۹ ± ۱۱/۴۵	۱۱۴/۲۳ ± ۱۷/۹۷	۹۰/۳۷ ± ۷/۴۲	۳۷/۴۴ ± ۵/۲۶	۹۵/۴۳ ± ۸/۴۲	۴۹/۳۰ ± ۵/۲۱
TMT+Saline	^a ۳۵/۲۰ ± ۷/۱۵	^a ۴۵/۶۷ ± ۹/۱۸	^a ۳۸/۰۸ ± ۴/۸۶	^a ۹۰/۱۷ ± ۹/۴۳	^a ۱۸۸/۱۱ ± ۱۵/۴۱	^a ۱۰۳/۷۸ ± ۹/۰۸
TMT+GA50	^{a,b} ۴۶/۰۵ ± ۷/۹۶	^{a,b} ۵۳/۱۱ ± ۱۰/۷۵	^a ۴۲/۲۷ ± ۷/۸۹	^{a,b} ۶۷/۸۳ ± ۷/۰۵	^a ۱۵۷/۶۳ ± ۱۱/۷۴	^a ۹۴/۵۳ ± ۷/۳۵
TMT+GA100	^{a,b,c} ۴۹/۱۱ ± ۴/۶۳	^{a,b,c} ۸۲/۳۵ ± ۷/۸۶	^{a,b,c} ۵۹/۴۰ ± ۵/۲۳	^{a,b} ۵۹/۱۱ ± ۸/۲۲	۱۱۸/۳۳ ± ۱۰/۵۳ ^{a,b,c}	^{a,b,c} ۷۱/۱۸ ± ۸/۱۰
TMT+GA200	^{a,b,c} ۵۲/۷۲ ± ۸/۸۳	^{b,c,d} ۹۲/۳۶ ± ۱۲/۵۷	^{a,b,c} ۶۲/۳۷ ± ۶/۷۱	^{b,c,d} ۴۴/۷۱ ± ۶/۳۵	^{b,c} ۱۰۶/۸۴ ± ۱۴/۰۲	^{a,b,c,d} ۶۲/۴۳ ± ۵/۳۷
سطح معنی داری	۰/۰۰۵	۰/۰۰۴	۰/۰۱۱	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱	۰/۰۱۳

آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0.05$ در مقایسه با گروه TMT+Saline x و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه TMT+GA100 dl و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه TMT+GA50 dl .

بحث

هیپوکامپ، اثرات ضد افسردگی و اضطراب قابل توجهی به ویژه در دوزهای بالا نشان می‌دهد. از آنجایی که در بسیاری از مطالعات اثرات سمیت عصبی TMT به اثبات رسیده است [۳-۴] و مطالعات متعددی به بیان عملکردهای شناختی و رفتاری مرتبط با این نوع سمیت عصبی پرداخته اند [۸]. با این حال، هنوز مکانیزم دقیق پاتولوژی این اختلالات و نشانه‌های خلقی مرتبط با آن مشخص نشده است.

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که به دنبال مسمومیت با TMT و به دلیل مرگ انتخابی نورون‌ها در سیستم لیمبیک و به ویژه هیپوکامپ، نقصان حافظه و یادگیری رخ می‌دهد [۹]. علیرغم اینکه اطلاعات اندکی درباره اثر TMT بر بروز رفتارهای شبه افسردگی وجود دارد، مطالعه Moghadas و Edalatmanesh در سال ۲۰۱۵ نشان داد که تجویز این ماده در موش‌های صحرایی سبب بروز علائم افسردگی همراه با اختلالات شناختی

طی این پژوهش به بررسی اثر سمیت تری‌متیل‌تین و ارتباط آن با افسردگی در موش‌های صحرایی پرداخته شد. سپس، اثر آنتی‌اکسیدانی اسید گالیک در مهار التهاب مغزی و بهبود افسردگی ناشی از این مسمومیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متعاقب مسمومیت با TMT و افزایش رفتارهای شبه اضطرابی و افسردگی، سطح سایتوکین‌های التهابی نظیر TNF- و IL-1 در هیپوکامپ موش‌های صحرایی به شدت افزایش می‌یابد. هم‌چنین، علیرغم کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT و GPX)، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و سطح MDA افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند. این در حالی است که تیمار با گالیک اسید به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بالقوه ضمن کاهش سطح سایتوکین‌های التهابی و پراکسیداسیون لیپیدی و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت

[۲۹]. این ملکول‌ها نقش تعدیل‌کننده‌های در مراحل آغازین سمیت عصبی با واسطه TMT دارند [۲۶]. افزایش سطوح سایتوکاین‌های التهابی در افسردگی و کاهش سطح آن‌ها به دنبال مصرف داروهای ضد افسردگی وجود دارد [۳۰]. با شدت گرفتن سطح افسردگی میزان TNF- در سرم بیماران افزایش می‌یابد و احتمال وجود رابطه‌ی مثبت بین سایتوکاین‌های پیش التهابی و رفتار خودکشی در میان بیماران افسرده وجود دارد [۳۱]. لذا در این مطالعه احتمالاً مسمومیت TMT با افزایش سطح سایتوکاین‌های التهابی سبب بروز افسردگی می‌گردد. Himmerich و همکاران سطوح افزایش یافته‌های از TNF-، IL-۴، IL-۶ و IL-۱۰ در موش‌های صحرایی به دنبال استرس بی حرکتی یا شنای اجباری مشاهده نمودند [۳۲].

اسید گالیک و مشتقات آن به فرم‌های متیله شده (مانند سیرنژیک اسید) یا فرم‌های گالوئیلی در بسیاری از عمل‌کردهای بیولوژیکی و فارماکولوژیکی مانند اثرات ضد التهابی و حفاظت نورونی دخالت دارند [۳۳]. این عملکردها احتمالاً ناشی از پتانسیل ضد اکسیدانی این ترکیبات است که به قابلیت آن‌ها در جلوگیری از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد و نیز جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد اشاره دارد [۳۴]. اسید گالیک قادر است سلول‌های عصبی را از مرگ ناشی از رسوب بتا آمیلوئیدی حفظ نماید [۳۵]. تجویز مزمن استرهای تری متیل اسید گالیک اختلالات رفتاری ناشی از استرس مزمن نظیر اختلال در فعالیت‌های لوکوموتور، اضطراب و کاهش ظرفیت حافظه و یادگیری را بهبود می‌بخشد. همچنین،

می‌گردد [۲۳]. پاتوژنز مشترکی بین اختلالات سایکولوژیک و نورودژنراتیو دیده می‌شود و در واقع بین اختلالاتی نظیر افسردگی و استرس با مرگ نورونی در هیپوکامپ رابطه مستقیمی وجود دارد [۲۴]. آسیب سلولی هیپوکامپ به همراه افزایش سطح سایتوکاین‌های التهابی مانند TNF- و IL-1 در هیپوکامپ و بروز رفتارهای شبه افسردگی، نشانه افسردگی با التهاب هیپوکامپ است که در این مطالعه دیده شد.

علاوه بر این، اثر تعدیل‌کنندگی خلق اسید گالیک بر کاهش شدت رفتارهای شبه افسردگی ناشی از TMT، فرضیه التهاب عصبی درگیر در اختلالات خلقی را با بررسی اثرات اسید گالیک بر سطح بیان سایتوکاین‌های التهابی در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار داد. تیمار با اسید گالیک سطح سایتوکاین‌های التهابی مانند TNF- و IL-1 را در نمونه‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی مسموم شده با TMT به طور معنی‌داری کاهش داد. مطالعات قبلی نشان داده اند که سمیت TMT با فعالیت میکروگلیاها وابسته است [۲۷-۲۵] و فعالیت میکروگلیایی سبب تولید سایتوکاین‌های التهابی می‌گردد [۲۷]. میکروگلیاها در نخستین روز مسمومیت با TMT فعال شده و در یک بازه زمانی نسبتاً طولانی فعالیت‌شان حفظ می‌شود [۲۸]. شواهدی مبنی بر فعالیت سلول‌های میکروگلیایی و تنظیم افزایشی سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر TNF-، IL-1 و IL-۶ در هیپوکامپ نیز وجود دارد [۱۱]. همچنین، در سلول‌های هیپوکامپی کشت داده شده از ناحیه‌ی ژيروس دندان‌ای بیان TNF- و گیرنده‌ی TNFR1 در حضور TMT افزایش یافته است

TMT سبب بروز رفتارهای شبه افسردگی در موش‌های صحرایی می‌گردد و این رفتارها نه تنها به مرور زمان کاهش نمی‌یابند، بلکه تثبیت شده و به طور پیشروندهای ادامه پیدا خواهند کرد. لذا، مدل دژنراسیون عصبی القاء شده با TMT می‌تواند به عنوان یک مدل پایدار در مطالعه رفتار افسردگی مورد بررسی قرار گیرد و مدل معتبری برای بررسی فرضیات افسردگی باشد. هم‌چنین، مطالعه حاضر با بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد افسردگی اسید گالیک نشان داد که این ترکیب قابلیت تعدیل خلق را در مدل حاضر دارد و می‌تواند به عنوان یک داروی کارآمد مورد مصرف انسانی نیز قرار گیرد و با توجه به این اثرات جانبی بسیار کم، نوید داروی مؤثر و مفیدی در تعدیل رفتارهای اضطرابی و افسردگی را بدهد.

تشکر و قدردانی

از زحمات معاونت و مدیریت محترم پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز در اعطای تسهیلات لازم جهت اجرای این پروژه صمیمانه قدردانی می‌شود. بخشی از منابع مالی این پژوهش از محل پژوهانه سال ۱۳۹۶ نویسنده مسئول تامین شده است.

تجویز این ترکیب سبب افزایش سطح گلوکوتائون و کاهش پراکسیداسیون چربی و سطح نیتريت می‌گردد [۳۶]. Mansouri و همکاران نشان دادند که احتمالاً اسید گالیک از طریق تأثیر بر گیرنده سروتونینی 5HT-1A و نه گیرنده‌های بنزودیازپینی دارای اثرات ضد اضطرابی می‌باشد [۳۷]. هر چند نیاز به مطالعه بیشتر درباره اثرات ضد افسردگی اسید گالیک احساس می‌شود، Can و همکاران به نقش دوگانه گیرنده‌های سروتونینی و کولینرژیک در بیان اثرات ضد افسردگی اسید گالیک اشاره می‌کنند [۳۸]. در مطالعه حاضر، علیرغم کاهش سطح SOD، CAT و GPX در گروه TMT+Saline، در گروه‌های تیمار با اسید گالیک افزایش سطح این آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو با افزایش دوز تجویزی دیده شد. در واقع TMT با القاء استرس اکسیداتیو سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش فعالیت MDA می‌گردد.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که طی این مطالعه مشخص گردید، تجویز

References

- [1] Ferraz da Silva I, Freitas-Lima LC, Graceli JB, Rodrigues LCM. Organotins in Neuronal Damage, Brain Function, and Behavior: A Short Review. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;8:366.
- [2] Gomez FD, Apodaca P, Holloway LN, Pannell KH, Whalen MM. Effect of a series of

- triorganotins on the immune function of human natural killer cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23(1): 18-24.
- [3] Shintani N, Ogita K, Hashimoto H, Baba A. Recent studies on the trimethyltin actions in central nervous systems. *Yakugaku Zasshi* 2007; 127(3): 451-61.
- [4] Lee S, Yang M, Kim J, Kang S, Kim J, Kim JC, et al. Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration: A mechanism-based review. *Brain Res Bull* 2016; 125: 187-99.
- [5] Saary MJ, House RA. Preventable exposure to trimethyltin chloride: a case report. *Occup Med* 2002; 52(4): 227-30.
- [6] Baciak L, Gasparova Z, Liptaj T, Juranek I. In vivo magnetic resonance approach to trimethyltin induced neurodegeneration in rats. *Brain Res* 2017; 1673: 111-6.
- [7] Billingsley ML, Yun J, Reese BE, Davidson CE, Buck-Koehntop BA, Veglia G. Functional and structural properties of stannin: roles in cellular growth, selective toxicity, and mitochondrial responses to injury. *J Cell Biochem* 2006; 98(2): 243-50.
- [8] Geloso MC, Corvino V, Michetti F. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochemistry Int* 2011; 58(7): 729-38.
- [9] Kaur S, Sharma N, Nehru B. Anti-inflammatory effects of Ginkgo biloba extract against trimethyltin-induced hippocampal neuronal injury. *Inflammopharmacology* 2018; 26(1): 87-104.
- [10] Harry GJ, Kraft AD. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 2012; 33(2): 191-206.
- [11] Harry GJ, Funk JA, Lefebvre d' Harry GJ, Funk JA, Lefebvre d'Hellencourt C, McPherson CA, et al. The type 1 interleukin 1 receptor is not required for the death of murine hippocampal dentate granule cells and microglia activation. *Brain Res* 2008; 1194: 8-20.
- [12] Felger JC, Lotrich FE. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience* 2013; 246: 199-229.
- [13] Barbosa IG, Bauer ME, Machado-Vieira R, Teixeira AL. Cytokines in bipolar disorder:

- paving the way for neuroprogression. *Neural Plast* 2014; 2014: 360481.
- [14] Kosuru RY, Roy A, Das SK, Bera S. Gallic Acid and Gallates in Human Health and Disease: Do Mitochondria Hold the Key to Success? *Mol Nutr Food Res* 2018; 62(1).
- [15] Choubey S, Goyal S, Varughese LR, Kumar V. Probing Gallic Acid for Its Broad Spectrum Applications. *Mini Rev Med Chem* 2018; 18(15): 1283-93.
- [16] Reckziegel P, Dias VT, Benvegnú DM, Bouffleur N, Barcelos RCS, Segat HJ, et al. Antioxidant protection of gallic acid against toxicity induced by Pb in blood, liver and kidney of rats. *Toxicol Rep* 2016; 3: 351-36.
- [17] Omar SH, Scott CJ, Hamlin AS, Obied HK. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2017; 47: 1-20.
- [18] Little AR, Miller DB, Li S, Kashon ML, O'Callaghan JP. Trimethyltin-induced neurotoxicity: gene expression pathway analysis, q-RT-PCR and immunoblotting reveal early effects associated with hippocampal damage and gliosis. *Neurotoxicol Teratol* 2012; 34(1): 72-82.
- [19] Farbood Y, Sarkaki A, Hashemi S, Mansouri MT, Dianat M. The effects of gallic acid on pain and memory following transient global ischemia/reperfusion in Wistar rats. *Avicenna J Phytomed* 2013; 3(4): 329-40.
- [20] Rafiei S, Bazyar 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. [Farsi]
- [21] Moghadas M, Edalatmanesh MA, Hosseini M. Effect of Lithium Chloride on Serum Levels of BDNF, TNF- α , and Wet Weight of Brain in an Animal Model of Depression. *Shefaye Khatam* 2014; 2(4): 9-19. [Farsi]
- [22] Sadoughi SD, Edalatmanesh MA, Rahbarian R. The Effect of Curcumin on Pituitary-Gonadal Axis, DNA Oxidative Damage and Antioxidant Enzymes Activity of Testicular Tissue in Male Diabetic Rats. *J Fasa Univ Med Sci* 2018; 7(4): 511-20 [Farsi].

- [23] Moghadas M, Edalatmanesh, MA. Protective effect of Lithium Chloride against Trimethyltin-induced hippocampal degeneration and comorbid depression in rats. *Comp Clin Pathol* 2015; 24: 1165.
- [24] Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord* 2002; 4(2): 117-28.
- [25] Fabrizi C, Pompili E, Somma F, De Vito S, Ciraci V, Artico M, et al. Lithium limits trimethyltin-induced cytotoxicity and proinflammatory response in microglia without affecting the concurrent autophagy impairment. *J Appl Toxicol* 2017; 37(2): 207-13.
- [26] Kraft AD, McPherson CA, Harry GJ. Association Between Microglia, Inflammatory Factors, and Complement with Loss of Hippocampal Mossy Fiber Synapses Induced by Trimethyltin. *Neurotox Res* 2016; 30(1): 53-66.
- [27] Kim J, Yang M, Son Y, Jang H, Kim D, Kim JC, et al. Glial activation with concurrent up-regulation of inflammatory mediators in trimethyltin-induced neurotoxicity in mice. *Acta Histochem* 2014; 116(8): 1490-500.
- [28] Kim DJ, Kim YS. Trimethyltin-Induced Microglial Activation via NADPH Oxidase and MAPKs Pathway in BV-2 Microglial Cells. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 729509.
- [29] Figiel I, Dzwonek K. TNF alpha and TNF receptor 1 expression in the mixed neuronal-glial cultures of hippocampal dentate gyrus exposed to glutamate or trimethyltin. *Brain Res* 2007; 1131: 17-28.
- [30] Rushaniya A K, Rodrigo MV, Jing D, Hussein KM. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12: 561-78.
- [31] Serafini G, Pompili M, Innamorati M, Dwivedi Y, Brahmachari G, Girardi P. Pharmacological properties of glutamatergic drugs targeting NMDA receptors and their application in major depression. *Curr Pharm Des* 2013; 19(10): 1898-922.
- [32] Himmerich H, Fischer J, Bauer K, Kirkby KC, Sack U, Krügel U. Stress-induced cytokine changes in rats. *Eur Cytokine Netw* 2013; 24(2): 97-103.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] Omar SH, Scott CJ, Hamlin AS, Obied HK. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2017; 47:1-20.
- [36] Chhillar R, Dhingra D. Antidepressant-like activity of gallic acid in mice subjected to unpredictable chronic mild stress. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27(4): 409-18.
- [37] Mansouri MT, Soltani M, Naghizadeh B, Farbood Y, Mashak A, Sarkaki A. A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; 117: 40-6.
- [38] Can ÖD, Turan N, Demir Özkay Ü, Öztürk Y. Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. *Life Sci* 2017; 190: 110-7.

The Effect of Gallic Acid on Depression Symptoms, Oxidative Stress Markers and Inflammatory Cytokines in Rats' Hippocampus After TMT Intoxication: An Experimental Study

M. A. Edalatmanesh¹, S. Shahsavan², S. Rafiei³, H. Khodabandeh⁴

Received: 03/06/2018 Sent for Revision: 27/06/2018 Received Revised Manuscript: 26/09/2018 Accepted: 02/10/2018

Background and Objectives: Trimethyltin (TMT) is an organotin which causes selective degeneration in hippocampus and leads to the appearance of depression in humans and rodents. The present study investigated the effect of Gallic acid (GA) on depression symptoms, oxidative stress markers and inflammatory cytokines functions in rats' hippocampus after TMT intoxication.

Materials and Methods: In this experimental study, 50 adult Wistar rats were randomly divided into 5 groups: Control, TMT+Saline, TMT+GA50, TMT+GA100, and TMT+GA200. 48 h after TMT intoxication, GA-treated groups received 50, 100 and 200 mg/kg of GA, and TMT+saline group received saline for 14 days. After evaluation of depression symptoms, the hippocampal levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), malondealdehyde (MDA), Tumor necrosis factor (TNF-) and interleukin-1 (IL-1) were measured by ELISA technique. Differences between the groups were analyzed by ANOVA with Tukey's post hoc test.

Results: The results indicated an increase in the immobility time in the TMT+Saline group compared with the controls and a significant decrease in immobility time in the groups treated with high doses of GA (p 0.001). GA treatment increased the function of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPX) and decreased MDA, TNF- and IL-1 in comparison with the TMT+Saline group (p 0.05).

Conclusion: Administration of GA led to amelioration of depression symptoms caused by TMT intoxication through adjustment of inflammatory factors and reduction of oxidative stress.

Key words: Trimethyltin, Depression, Gallic acid, Oxidative stress, Inflammatory cytokine, Rat

Funding: This research was funded partially by Islamic Azad University of Shiraz .

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University of Shiraz approved the study with approval number of 96-4512-3754.

How to cite this article: Edalatmanesh MA, Shahsavan S, Rafiei S, Khodabandeh H. The Effect of Gallic Acid on Depression Symptoms, Oxidative Stress Markers and Inflammatory Cytokines in Rats' Hippocampus After TMT Intoxication: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (9): 815-28. [Farsi]

1- Assistant Prof. of Physiology, Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, ORCID: 0000-0002-7936-1145.

(Corresponding Author): Tel: (071)36410041, Fax:(071)36410059, E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

2- PhD Candidate of Animal Physiology, Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, ORCID: 0000-0001-7505-7595.

3- PhD Candidate of Biochemistry and Exercise Metabolism, Dept. of Exercise Physiology, Kish International Campus, Tehran University, Kish, Iran, ORCID: 0000-0001-8516-9902.

4- MSc in Cell and Developmental Biology, Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, ORCID: 0000-0003-1541-0507.