

اثر گالیک اسید بر اختلالات عملکرد شناختی با محدودیت رشد درون رحمی در موش صحرایی

زهرا صابری^۱، محمد امین
عدالت‌منش^{۲*}

^۱کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی،
واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز،
ایران

^۲استادیار، گروه زیست شناسی، واحد
شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۶/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: محدودیت رشد درون رحمی (IUGR) سبب اختلال در سیستم عصبی مرکزی جنین می‌گردد و آپوتوز سلول‌های هیپوکامپ و قشر مغز را به دنبال دارد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر گالیک اسید به منظور بهبود اختلالات شناختی - رفتاری و سطح بیان فاکتور هسته‌ای کاپا B (NFκB) در مدل حیوانی IUGR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۳۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن تقریبی 180 ± 25 گرم به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل: که هیچ تیماری دریافت نکردند. گروه IUGR: جهت القای IUGR موش‌های صحرایی بارداری از روز ۱۴ بارداری تا زایمان تحت محدودیت ۵۰ درصدی رژیم غذایی قرار گرفتند. گروه‌های تجربی ۱ و ۲: که موش‌های صحرایی بارداری جهت القای IUGR از روز ۱۴ بارداری تا زایمان تحت محدودیت ۵۰ درصدی رژیم غذایی قرار گرفتند و از روز ۱۲ بارداری تا زمان تولد نوزادان دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان گالیک اسید را روزانه با روش گاوژ دریافت نمودند. ارزیابی‌های مورفولوژیک متعاقب تولد در گروه‌های مختلف انجام شد. سپس، در یک ماهگی آزمون‌های حافظه کاری، حافظه مبتنی بر ترس و اضطراب انجام شد. آنگاه سنجش سطح سرمی NFκB به روش الایزا صورت گرفت.

یافته‌ها: میزان حافظه کاری و حافظه مبتنی بر ترس در گروه IUGR کاهش معنی داری را نسبت به کنترل نشان داد. علاوه بر این، محدودسازی رژیم غذایی باعث افزایش سطح اضطراب و NFκB گردید. از طرفی گالیک اسید سبب بهبود حافظه کاری و مبتنی بر ترس، کاهش سطح اضطراب و تعدیل سطح NFκB در گروه‌های تحت تیمار گردید.

نتیجه گیری: پژوهش اخیر نشان داد که محدود سازی رژیم غذایی در دوران بارداری سبب ایجاد اختلالات رفتاری شناختی در موش‌های صحرایی می‌گردد که این امر احتمالاً ناشی از افزایش سطح بیان سایتوکاین‌های پیش آپوتوزی نظیر NFκB می‌باشد. از طرفی اثرات نوروپروتکتیو گالیک اسید منجر به بهبود اختلالات شناختی در مبتلایان به IUGR می‌گردد.

کلمات کلیدی: گالیک اسید، اختلالات شناختی، محدودیت رشد درون رحمی، NFκB، موش صحرایی

*نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، واحد شیراز،
دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۰۹۳۹-۶۳۳۵۰۴۰

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

مقدمه

محدودیت رشد درون رحمی (IUGR) یک بیماری جنینی است که رشد جنین در آن بسیار کند و یا متوقف می‌شود. نوزادان مبتلا به IUGR دارای عوارض کوتاه مدت و بلند مدت هستند و این اختلال علت پنهان مرگ و میرهای مختلف در این نوزادان است که به دلایل مختلفی از جمله مشکلات مربوط به مادر، جفت، جنین و مشکلات ژنتیکی رخ می‌دهد^۱. محدود سازی رژیم غذایی در دوران بارداری باعث بروز اختلالات عصبی-شناختی در مبتلایان می‌شود. مرگ برنامه‌ریزی شده یکی از مکانیسم‌های اصلی از دست دادن نوروها است. در واقع آپوپتوز عامل اصلی در پاتوفیزیولوژی IUGR می‌باشد. در قشر مغز و هیپوکامپ این بیماران که قطب اصلی تشکیلات حافظه و یادگیری است، تغییراتی ایجاد می‌شود که این تغییرات ناشی از آپوپتوز نوروها است. به دنبال این عارضه اختلالات شناختی نظیر زوال حافظه و اختلال در یادگیری که مرتبط با آسیب شدید کورتکس و هیپوکامپ مغز است، نمایان می‌گردند^۲. با القای محدودسازی رژیم غذایی در رت‌های باردار به مدت ۲ تا ۳ روز متوالی مدل عملکردی مناسبی برای ارزیابی مرگ نوروها در سیستم لیمبیک و ارتباط آن با اختلالات شناختی فراهم می‌گردد^۳. در بیماری‌های Pre-eclampsia و IUGR کاهش در تعداد تروفوبلاست‌های درون سرخرگ‌های مارپیچی بوجود می‌آید که این کاهش در ارتباط با افزایش آپوپتوز و کاهش اندازه لومینال می‌باشد^۴.

در کودکان مبتلا به محدودیت رشد درون رحمی، مشکلات یادگیری دیده شده است. در نواحی مختلف مغز این بیماران بخصوص هیپوکامپ، قشر مغزی و ساختارهای عصبی تغییراتی دیده می‌شود. عملکردهای حافظه در کودکان مبتلا به محدودیت رشد درون رحمی نامتقارن طولانی مدت با انواع محرک‌های مختلف کلامی و بصری مورد بررسی قرار گرفت^۵.

در این بیماران با مشکلات حافظه کوتاه مدت، تغییرات عملکردی و ساختاری در ناحیه هیپوکامپ و مغز قدیمی دیده می‌شود. محدودیت رشد درون رحمی (IUGR) به ناتوانی‌های عصبی تکاملی و یادگیری مرتبط است. در مطالعه این بیماران، تنها مدل‌های تغذیه‌ای استفاده شده است. محدودیت رشد درون

رحمی (IUGR) نقش مهمی در بروز میزان بالای اختلال عملکرد مغز و اختلال تکاملی عصبی دارد. این پیامدهای بالینی در دوران تکامل کودکان می‌تواند ضعف تحصیلی، حافظه، مشکلات گفتاری و دیگر مشکلات عملکردی را شامل شود. کمبود تغذیه مادر در طول حاملگی می‌تواند منجر به عقب ماندگی رشد داخل رحمی، وزن کم هنگام تولد و مرگ و میر بالای نوزادان شود^۶.

به گزارش ایکوفوکامی و همکارانش درمان رژیم غذایی و رت‌ها سبب القای ضایعاتی در هیپوکامپ، کورتکس و حافظه فضایی می‌گردد. کورتکس مغز دارای عملکردهای متعدد حیاتی در فرآیند حافظه است که شامل برنامه‌ریزی، تصمیم‌گیری، یادگیری، توجه، آگاهی، تفکر و درک می‌باشد. در این میان حافظه فضایی، به ویژه به این ساختار بستگی دارد. آسیب کورتیکال به میزان شدیدی باعث آسیب به حافظه فضایی می‌شود^۷.

ترکیبات پلی‌فونونی مختلف نشان داده‌اند که دارای فعالیت پاک‌کنندگی و توانایی فعال‌سازی آنزیم‌های اصلی آنتی‌اکسیدانی در مغز می‌باشد. در نتیجه چرخه معیوب استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی را مهار می‌کنند. تأثیرات حفاظتی عصبی بسیاری از پلی‌فنول‌ها از جمله گالیک اسید بر توانایی آن‌ها در نفوذ به سد خونی-مغزی (BBB) (Blood Brain Barrier) تکیه می‌کنند. این نتایج بیان می‌کند که درمان با گالیک اسید صدمات استرس اکسایشی مغز در موش‌های صحرایی را به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن بهبود می‌بخشد. گالیک اسید می‌تواند از طریق سد خونی مغزی عبور کند و عملکرد نوروها را در نواحی بحرانی مغز از جمله شناخت پس از آسیب مغزی توسط کم‌خونی موضعی، بهبود بخشد^۸.

گالیک اسید یک ترکیب پلی‌هیدروکسی فنولی با طیف وسیعی از عملکردهای بیولوژیکی می‌باشد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که گالیک اسید در جلوگیری از تکثیر و القای آپوپتوز در این سلول سرطانی مؤثر می‌باشد و توصیه می‌شود^۹. همچنین این ترکیب به‌عنوان ماده ضد سرطان، آنتی‌باکتریال، آنتی‌موتازنیک و ضدالتهاب استفاده می‌شود. گالیک اسید و مشتقات آن در درمان بیماری‌های مانند سرطان و عفونت‌های میکروبی کاربرد دارند و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و به سلول‌های بدن در محافظت از صدمات اکسیداتیو کمک می‌کنند^{۱۰}.

اسید(IUGR+GA400) به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل: حیوانات این گروه تحت هیچ گونه تیماری قرار نگرفتند. در این گروه القای مدل محدودیت رشد درون رحمی (IUGR) صورت نگرفت.

گروه با محدودیت رشد رحمی (IUGR): در این گروه القای مدل محدودیت رشد درون رحمی به شیوه محدود سازی غذایی انجام گرفت. موشهای صحرایی ماده باردار پس از تعیین روز صفر بارداری، از روز ۱۴ بارداری تا زمان زایمان به منظور القای مدل تحت محدودیت غذایی ۵۰٪ قرار گرفتند.

گروه تجربی با محدودیت رشد رحمی و دریافت کننده ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم گالیک اسید(IUGR+GA200): در این گروه نیز القای مدل محدودیت رشد درون رحمی به شیوه محدود سازی غذایی انجام گرفت. موشهای صحرایی ماده باردار پس از تعیین روز صفر بارداری، از روز ۱۴ بارداری تا زمان زایمان به منظور القای مدل تحت محدودیت غذایی ۵۰٪ قرار گرفتند. این حیوانات از روز ۱۲ بارداری تا زمان به دنیا آمدن نوزادان تحت تیمار با گالیک اسید با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان بصورت گاوآژ قرار می‌گیرند.

گروه تجربی با محدودیت رشد درون رحمی و دریافت کننده ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم گالیک اسید(IUGR+GA400): در این گروه نیز القای مدل محدودیت رشد درون رحمی به شیوه محدود سازی غذایی انجام گرفت. موشهای صحرایی ماده باردار پس از تعیین روز صفر بارداری، از روز ۱۴ بارداری تا زمان زایمان به منظور القای مدل تحت محدودیت غذایی ۵۰٪ قرار گرفتند. این حیوانات از روز ۱۲ بارداری تا زمان به دنیا آمدن نوزادان تحت تیمار با گالیک اسید با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان بصورت گاوآژ قرار می‌گیرند. دوزهای مصرفی گالیک اسید با توجه به مطالعات قبلی انتخاب شدند^{۱۱}.

جفت گیری

موش‌های صحرایی نر بالغ و ماده‌های باکره جهت جفت گیری مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌های صحرایی ماده که در شرایط استروس سیکل جنسی قرار دارند جهت جفت گیری انتخاب می‌شوند. برای تشخیص سیکل استروس از همه موش‌های

باتوجه به مطالعات گذشته که اثبات گردیده که گالیک اسید دارای اثرات محافظت‌کنندگی عصبی می‌باشد و با توجه به عوارض جانبی کم پلی فنول‌های گیاهی از جمله گالیک اسید و از آنجا که عمدتاً تا به حال درمان مؤثری برای بیشتر بیماری‌های اختلالات عصبی - شناختی مانند محدودیت رشد درون رحمی یافت نشده است، بدین سبب در این مطالعه اثر گالیک اسید بر بهبود اختلالات شناختی در مدل حیوانی محدودیت رشد درون رحمی مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۳۲ سر موش صحرایی ماده باکره نژاد ویستار با میانگین وزنی 25 ± 180 گرم و سن ۸ هفته استفاده شد. حیوانات پس از سازگاری ۷ روزه با محیط برای مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات در قفس‌های پلی کربنات (محصول شرکت رازی راد، ایران) در شرایط آزمایشگاهی کنترل شده نگهداری شدند. دمای محیط ۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵-۵۵ درصد، چرخه ۱۲/۱۲ نور/ تاریکی (با شروع نور در ساعت ۶:۰۰) در نظر گرفته شد که در تمام مراحل انجام آزمایش این شرایط به صورت نسبی تنظیم شده بود. غذای استاندارد آزمایشگاهی مخصوص موش‌های صحرایی (محصول شرکت خوراک دام و طیور فارس، ایران) و آب به میزان دلخواه حیوان و آزادانه (*ad libitum*) در دسترس بود. تمام مراحل انجام کار با حیوانات زیر نظر کمیته اخلاقی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد واحد شیراز و منطبق با استانداردهای بین‌المللی و قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

تیمار حیوانات

حیوانات پس از توزین به ۴ گروه ۸ تایی شامل گروه کنترل، گروه با محدودیت رشد درون رحمی (IUGR)، گروه تجربی با محدودیت رشد درون رحمی و دریافت کننده ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم گالیک اسید(IUGR+GA200) و گروه تجربی با محدودیت رشد درون رحمی و دریافت کننده ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم گالیک

آزمون‌های رفتاری

به منظور بررسی اثر IUGR در نوزادان گروه های مختلف و نیز اثرات بهبود دهنده گالیک اسید بر اختلالات شناختی و رفتاری و مقایسه با گروه کنترل، آزمون‌های رفتاری در تمام گروه‌ها انجام شد. این آزمون‌ها عبارتند از: آزمون ماز Y (Y Maze) (حافظه کاری) - آزمون شاتل باکس (حافظه اجتنابی غیر فعال) و آزمون ماز صلیبی مرتفع (elevated Plus Maze) (میزان اضطراب) می‌باشند.

آزمون ماز Y (Y Maze): اندازه گیری رفتار تناوب (Alternation behavior)

این آزمون برای بررسی حافظه کاری حیوان در سطح ساده مورد استفاده قرار می‌گیرد، دستگاه آزمایش ماز Y از سه بازو از جنس MDF تشکیل شده است. هر بازوی ماز Y شکل ۴۶cm طول، ۱۵cm ارتفاع و ۱۵cm پهنا داشته و به صورت زاویه دار به شکل متساوی الاضلاع نسبت به همدیگر قرار می‌گیرند و بازوها از طریق یک محوطه مرکزی به هم متصل می‌گردند (که بازوها حروف A, B, C, نشان گذاری می‌شود). حیوان به آرامی و بدون استرس و پس از هندلینگ در یکی از سه بازو قرار داده و حرکات آن به مدت ۵ دقیقه مورد مشاهده گرفت. پس از تمام شدن ۵ دقیقه، رت به آرامی از ماز برداشته شده و تمام سطوح داخلی ماز به منظور جلوگیری از اثر حس بویایی موش صحرایی در انتخاب بازو، با الکل ۷۰ درصد تمیز شد. حیوانی که دارای مشکلات حافظه بود، مسیر یک بازو را به دفعات بیشتری طی می‌کرد. برای انجام این آزمون هر موش صحرایی در قسمت انتهایی یک بازو قرار می‌گیرد و امکان دسترسی او به تمام نواحی ماز در یک بازه زمانی ۵ دقیقه فراهم می‌گردد، تعداد دفعات ورود حیوان به هر بازو با مشاهده ثبت گردید. ورود هر حیوان به بازو زمانی است که پاهای عقبی حیوان به طور کامل در داخل بازو قرار گیرند، رفتار تناوب به عنوان ورودهای موفق و پشت سرهم (سریال) به داخل همه بازوها در مجموعه‌های ۳ تایی همپوشانی کننده در نظر گرفته می‌شود. این آزمون در یک ماهگی در تمامی گروه های مورد مطالعه انجام شد. در هر بار آزمایش سه تکرار صورت گرفت و میانگین سه تکرار برای هر موش صحرایی یادداشت شد^{۱۲}.

صحرایی ماده قبل از جفت گیری نمونه واژینال تهیه می‌گردد که در بخش بعدی توضیح داده خواهد شد. سپس لامهای تهیه شده با رنگ گیمسا رنگ آمیزی می‌شوند. وجود سلولهای شاخی شده بدون هسته نشاندهنده فاز استروس سیکل جنسی خواهد بود. در هر قفس جفت گیری، یک حیوان نر و یک ماده بالغ قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت از قرار گرفتن در قفس ویژه جفت گیری، اولین نمونه واژینال جهت تعیین زمان صفر بارداری گرفته شد (اولین روز مشاهده اسپرماتوزوآ در نمونه واژینال به عنوان روز صفر بارداری محسوب می‌شود).

پاپ اسمیر

برای تعیین روز صفر بارداری ۲۴ ساعت پس از جفت گیری به کمک سوآب یک نمونه از واژن موش صحرایی ماده برداشته و گسترشی بر روی لام تهیه شد. سپس یک قطره آب مقطر استریل روی آن ریخته و با لامل فیکس شد. نمونه‌ها در زیر میکروسکپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰× مشاهده شدند. سپس جهت شناسایی بهتر اسپرم با بزرگ نمایی ۴۰× بررسی شدند. وجود و عدم وجود اسپرماتوزوآ در نمونه‌ها عاملی برای تشخیص جفت گیری به کار رفت. بدین صورت که اگر در نمونه‌ها اسپرماتوزوآ یافت می‌شد، آن روز، روز صفر بارداری محسوب می‌شد. همه نمونه‌ها با رنگ گیمسا رنگ آمیزی می‌شوند و تصاویر آنها به کمک سیستم تصویربرداری متصل به کامپیوتر صورت گرفت. همه نمونه برداری‌ها در همان ساعات اولیه دوره روشنایی (اول صبح) انجام گرفت. به محض تعیین روز صفر بارداری موشهای صحرایی ماده باردار از نرها جدا شدند و در قفس‌های جداگانه‌ای نگهداری شدند.

بررسی نوزادان در زمان تولد

تقریباً در روز ۲۱ تا ۲۳ بارداری نوزادان به دنیا آمدند. پس از تولد تعداد نوزادان در هر گروه شمارش شدند و به صورت تصادفی از هر گروه تعدادی نوزاد انتخاب شده و توزین شد. همچنین قد این نوزادان مورد سنجش قرار گرفت. نوزادان تا زمان شیرگیری یعنی روز ۲۴ پس از تولد به واسطه مادران خود پرورش یافتند و بعد از آن از شیر گرفته شدند.

تست ماز صلیبی مرتفع (Elevated Plus Maze)

تست ماز مرتفع صلیبی، به منظور بررسی اعتبار مدل ایجاد شده و سنجش میزان ترس و اضطراب در گروه‌های مورد بررسی، در یک ماهگی انجام شد. IUGR سبب افزایش میزان ترس و اضطراب در موش‌های صحرایی می‌گردد. در این آزمون، حیوانات به مدت ۵ دقیقه داخل ماز مرتفع صلیبی شکل قرار می‌گیرند که شامل دو بازوی باز مقابل هم و دو بازوی بسته مقابل هم است. عرض بازوها ۱۰ سانتی متر، طول آنها ۵۰ سانتی متر و ارتفاع ماز از سطح زمین ۶۰ سانتی متر می‌باشد. میانگین مدت زمان ماندن در بازوهای بسته، نشان دهنده میزان ترس و اضطراب حیوان و میانگین مدت زمان ماندن در بازوی باز نشان دهنده عدم اضطراب حیوان است.

پس از آشنائی موش‌های صحرایی با محیط ماز که ۱۵ دقیقه قبل از انجام هر بار آزمایش صورت می‌گیرد، حیوانات به آرامی و بدون وارد نمودن هر نوع استرس و با هندلینگ کامل در مرکز ماز قرار داده می‌شوند. آنگاه به مدت ۵ دقیقه، عملکرد حیوان در ماز، بررسی می‌شود؛ بدین صورت که مدت زمان باقی ماندن در هر یک از بازوهای باز و بسته، ثبت می‌گردد ($n=20$ ، در هر گروه). این آزمون با ۳ تکرار در دو روز متوالی، انجام شد. پس از اتمام تست برای هر رت، ماز با اتانول ۷۰٪ به منظور برطرف نمودن بوی ادرار و جهت جلوگیری از اثرات بوی نامطبوع بر رفتار حیوان، تمیز می‌شود.^{۱۴}

سنجش سطح سرمی فاکتور هسته‌ای کاپا B

پس از خونگیری و تهیه سرم برای سنجش مقدار سرمی NF- κ B (ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)) ساخت شرکت Gloria آمریکا استفاده شد. اساس این کیت به روش ساندویچ (Sandwich ELISA) (چون در این روش آنتی ژن در بین دو آنتی بادی قرار می‌گیرد، لذا به ساندویچ مشهور شده است) و با استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال می‌باشد. در این روش آنتی بادی مونوکلونال ضد آنتی ژن به سطح چاهک‌ها چسبانده می‌شود و سپس فرصت داده می‌شود تا آنتی ژن به آن متصل شود.

آزمون شاتل باکس: آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال

(Passive Avoidance Learning Test)

در یک ماهگی نوزادان حاصل از گروه‌های مختلف، موش‌های صحرایی تحت مطالعه یادگیری اجتنابی غیر فعال قرار گرفتند. دستگاه یادگیری اجتنابی غیر فعال (Shuttle Box) شامل یک اتاق روشن با دیواره‌های پلاستیکی گلاس روشن و یک اتاق تاریک با دیواره‌های پلاستیکی گلاس تیره که توسط یک در گیوتینی بهم متصل شده‌اند. شوک‌های الکتریکی بوسیله یک محرک الکتریکی به میله‌های کف شاتل باکس می‌رسند. در اولین و دومین روزهای آزمون، هر موش در دستگاه قرار داده شد و برای عادت کردن به دستگاه ۵ دقیقه رها شدند.^{۱۳}

در مرحله یادگیری موش را در حالی که پشتش به سمت درب گیوتینی است، در داخل اتاق روشن گذاشته و ۱۰ ثانیه بعد درب گیوتینی بالا کشیده می‌شود، بعد از ورود موش به ناحیه تاریک در گیوتینی بسته شده و شوک الکتریکی به شدت ۲ میلی آمپر به مدت ۲ ثانیه و ۵۰ هرتز به کف پای حیوان اعمال گردید، پس از آن در گیوتینی باز، تا حیوان وارد اتاق روشن شده و به قفس منتقل گردد. فاصله زمانی هر مرحله آموزش تا مرحله بعدی برای هر حیوان ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. به منظور ارزیابی حافظه ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از دریافت شوک الکتریکی حیوان دوباره در داخل اتاق روشن قرار داده شد و در گیوتینی باز گردید. مدت زمان سپری شده برای ورود حیوان به اتاق تاریک بعد از باز شدن درب به صورت تأخیر زمانی (LDR) در نظر گرفته می‌شود و در هر دو مرحله یادگیری و ارزیابی حافظه، سقف زمانی ۳۰۰ ثانیه می‌باشد. برای ارزیابی میزان به خاطر آوری و عملکرد حافظه، در گروه‌های متفاوت، بررسی میزان عملکرد حافظه حیوان با سنجش زمان تأخیر در ورود به ناحیه تاریکی که شوک را دریافت کرده بود در آزمون اجتنابی غیر فعال صورت گرفت. طولانی تر بودن تأخیر زمانی برای ورود به اتاق تاریک در مرحله ارزیابی حافظه، نشانه یادگیری بهتر می‌باشد. از طرف دیگر، مدت زمان باقی ماندن در اتاق تاریک (TDR) و تعداد دفعات ورود به اتاق تاریک (EDR) نیز مورد بررسی قرار گرفت و در بازه زمانی ۳۰۰ ثانیه سنجیده شد.^{۱۳}

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS ورژن ۲۲ انجام شده است. همچنین به منظور تعیین وجود اختلاف معنی دار در هر گروه و بین گروه‌های مختلف، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی انجام گردید. از نظر آماری مقادیر $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار EXCEL استفاده شده است.

نتایج

بررسی مدت زمان باقی ماندن در بازوی بسته

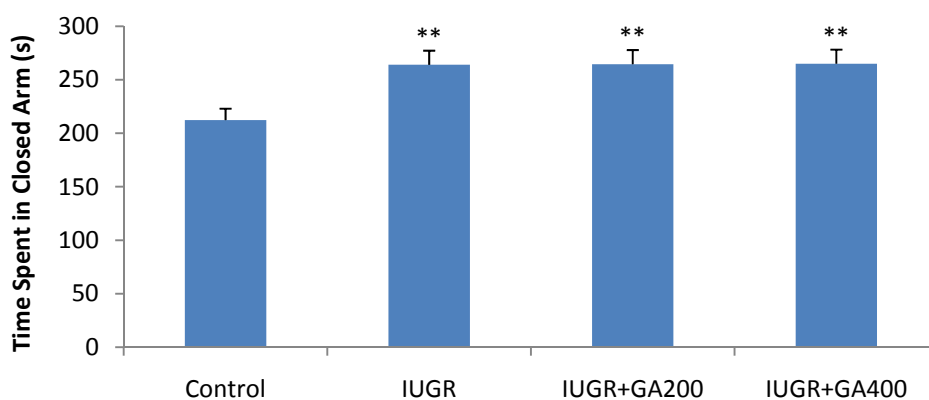
نتایج حاصل از آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های IUGR و تیمار با گروه کنترل نشان داد. این نتایج نشان دهنده افزایش میزان اضطراب در گروه‌هایی که در دوران جنینی در معرض محدودیت دریافت مواد غذایی شده‌اند، نسبت به گروه کنترل می‌باشد. همچنین، بررسی‌های آماری حاکی از آن است که هیچ‌گونه کاهش قابل توجهی در میزان اضطراب در گروه‌های دریافت کننده گالیک اسید با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان نسبت به گروه IUGR وجود ندارد. یافته‌های این بخش نشان می‌دهد که گالیک اسید نتوانسته است تاثیری بر کاهش میزان اضطراب در نوزادانی که در دوران جنینی

تحت استرس بی غذایی بوده‌اند داشته باشد (نمودار ۱).

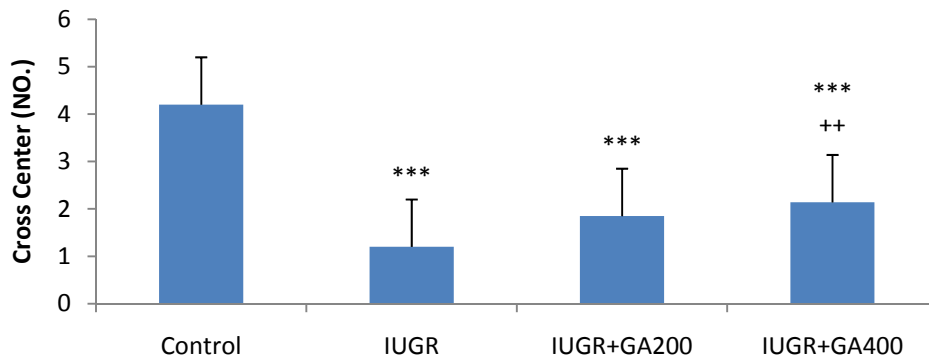
بررسی‌های حاصل از مقایسه مدت زمان ماندن در بازوی بسته در گروه‌های مختلف به شرح زیر است: در گروه IUGR اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل دیده شد ($p < 0.001$). بین گروه IUGR+GA200 با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.001$). همچنین بین گروه IUGR+GA400 نیز با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری در سطح $p < 0.001$ دیده شد. بین گروه‌های تیمار با گالیک اسید با گروه IUGR اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p > 0.05$).

تعداد دفعات عبور از مرکز

نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که میزان دفعات عبور از مرکز در گروه IUGR نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی داشته است ($1.1 \pm 1/2$ در مقابل $1.5 \pm 4/2$) و این کاهش در سطح $p < 0.0001$ معنی دار است. همچنین، بین گروه کنترل با گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ گالیک اسید نیز اختلاف معنی‌داری در سطح $p < 0.0001$ دیده می‌شود. از طرف دیگر نتایج نشان می‌دهد که تجویز گالیک اسید در دوران جنینی به همراه محدودیت غذایی سبب کاهش معنی دار میزان این شاخص اضطراب و افزایش رفتارهای جستجوگرانه پس از تولد در گروه IUGR+GA400 نسبت به گروه IUGR می‌باشد ($p < 0.001$).



نمودار ۱: مقایسه میانگین مدت زمان باقی ماندن در بازوی بسته ماز صلیبی مرتفع در گروه‌های مختلف نتایج نشان می‌دهد که بین گروه کنترل با گروه‌های IUGR، IUGR+GA200 و IUGR+GA400 اختلاف معنی‌دار دیده می‌شود ($p < 0.001$).



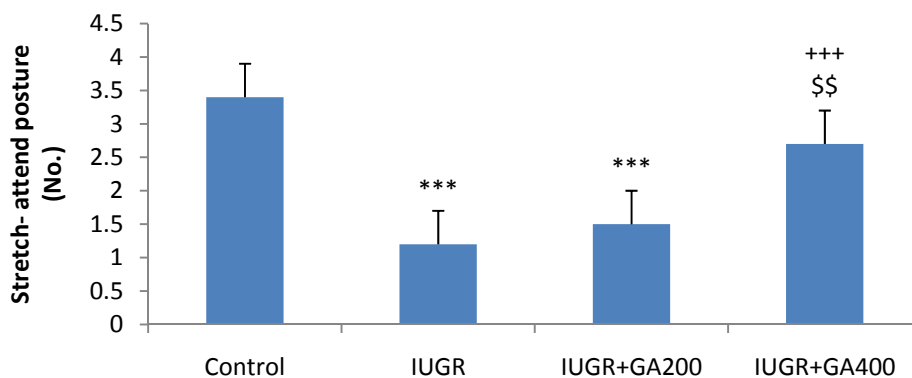
نمودار ۲: مقایسه میانگین \pm انحراف معیار تعداد دفعات عبور از مرکز ماز مرتفع صلیبی در گروه‌های مختلف: نتایج نشان می‌دهد که بین گروه کنترل با گروه های IUGR، IUGR+GA200 و IUGR+GA400 اختلاف معنی دار است ($p < 0/0001$). همچنین، بین گروه IUGR با گروه IUGR+GA400 اختلاف معنی داری دیده می‌شود ($p < 0/01$).

توجهی داشته است و این کاهش در سطح $p < 0/0001$ معنی دار است. همچنین، بین گروه کنترل با گروه IUGR+GA200 نیز اختلاف معنی داری در سطح $p < 0/0001$ دیده می‌شود. از طرف دیگر نتایج نشان می‌دهد که در گروه IUGR+GA400 نسبت به گروه IUGR اختلاف معنی داری در تعداد دفعات سرک کشیدن به بازوی IUGR+GA200 دارد ($p < 0/0001$). همچنین، بین گروه IUGR+GA200 با گروه IUGR+GA400 نیز اختلاف معنی داری در سطح $p < 0/01$ دیده شد (نمودار ۳).

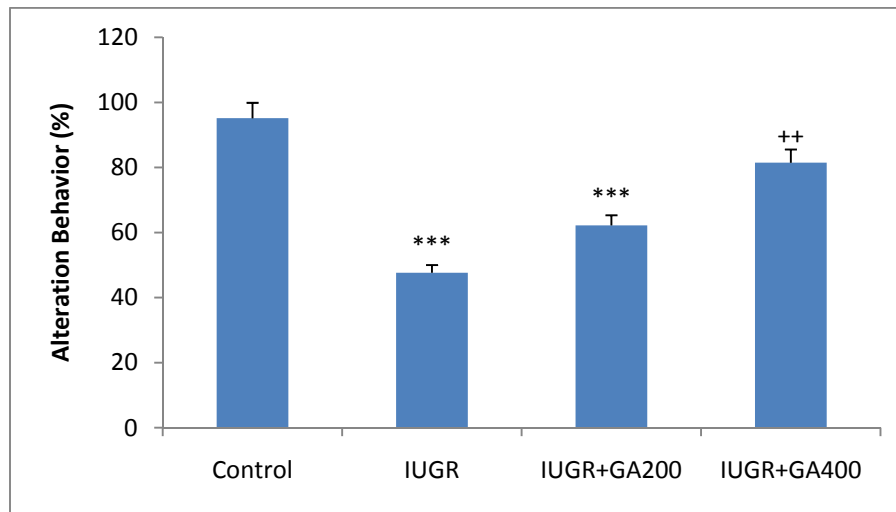
به گونه‌ای که تعداد دفعات عبور از مرکز ماز در گروه دریافت کننده دوز ۴۰۰ گالیک اسید نسبت به گروه IUGR افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد. بین گروه IUGR با گروه دریافت کننده دوز ۲۰۰ گالیک اسید اختلاف معنی داری دیده نشد. بین گروه های تیمار با یکدیگر نیز اختلاف معنی داری دیده شد (نمودار ۲).

تعداد دفعات سرک کشیدن به بازوی باز

نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که میزان سرک کشیدن به بازوی باز در گروه IUGR نسبت به گروه کنترل کاهش قابل



نمودار ۳: مقایسه میانگین \pm انحراف معیار تعداد سرک کشیدن به بازوی باز مرتفع صلیبی در گروه‌های مختلف: نتایج نشان می‌دهد که بین گروه کنترل با گروه های IUGR و IUGR+GA200 اختلاف معنی دار است ($p < 0/0001$). همچنین، بین گروه IUGR با گروه IUGR+GA400 اختلاف معنی داری دیده می‌شود ($p < 0/0001$). بین گروه IUGR+GA200 با گروه IUGR+GA400 اختلاف معنی داری قابل مشاهده است ($p < 0/01$).



نمودار ۴: مقایسه میانگین \pm خطای استاندارد درصد تناوب صحیح حرکتی در گروه‌های مختلف: نتایج نشان می‌دهد که بین گروه کنترل با گروه IUGR و IUGR+GA200 ($p < 0/0001$) و نیز بین گروه‌های IUGR+GA400 با گروه IUGR اختلاف معنی دار دیده شد ($p < 0/001$).

آزمون شاتل باکس: ارزیابی حافظه اجتنابی

تأخیر در ورود به اتاق تاریک (LDR) (Latency to the Dark Room)

نتایج تأخیر زمانی در ورود به اتاق تاریک آزمون شاتل باکس، پس از گذشت ۲۴ ساعت از القای شوک نشان می‌دهد بین گروه کنترل با گروه IUGR اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0/0001$). همچنین، بین گروه IUGR و گروه‌های IUGR+GA200 و IUGR+GA400 اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < 0/0001$) که این امر نشان دهنده اثرات بهبود بخش گالیک اسید بر حافظه اجتنابی در موش‌های صحرایی است. بین گروه‌های تیمار در این بازه زمانی اختلاف معنی داری دیده نشد.

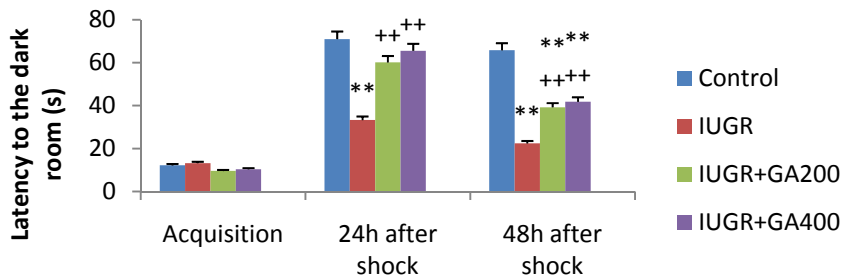
بعد از گذشت ۴۸ ساعت از القای شوک بین گروه کنترل با گروه‌های IUGR، IUGR+GA200 و IUGR+GA400 اختلاف معنی داری دیده شد ($p < 0/0001$). همچنین، بین گروه IUGR و گروه دریافت کننده گالیک اسید با دوز ۲۰۰ و دوز ۴۰۰ اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < 0/0001$). بین گروه‌های تیمار اختلاف معنی داری دیده نشد.

ارزیابی حافظه کاری: ماز Y

نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که درصد تناوب حرکتی (که نشان دهنده‌ی حافظه کاری در جوندگان است) در گروه IUGR نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری دارد (نمودار ۴) ($p < 0/0001$).

همچنین، بین گروه کنترل و گروه IUGR+GA200 اختلاف معنی داری در سطح $p < 0/0001$ دیده شد. مقایسه بین گروه IUGR یا همان گروه محدودیت غذایی پرناتال (PFR)، کاهش ۵۰ درصدی حجم غذای استاندارد در دوران بارداری) با گروه‌های دریافت کننده گالیک اسید در دوران جنینی به همراه القای PFR نشان داد که بین گروه IUGR+GA400 با گروه IUGR ($p < 0/001$) اختلاف معنی داری وجود دارد. هر چند بین گروه IUGR+GA200 با گروه IUGR اختلاف معنی داری دیده نشد ($p > 0/05$). بین گروه‌های تیمار با گالیک اسید با یکدیگر نیز اختلاف معنی داری دیده نشد.

نتایج حاصل از این آزمون نشان می‌دهد که علی‌رغم آسیب در حافظه کاری (درصد تناوب صحیح حرکتی) در گروه IUGR، تجویز پرناتال گالیک اسید به ویژه در دوز ۴۰۰ واحد/کیلوگرم وزن بدن توانسته است سبب بهبود حافظه کاری گردد.

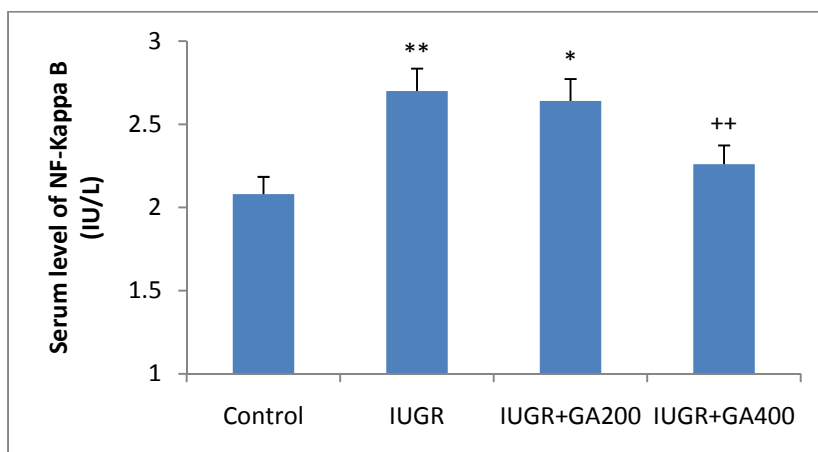


نمودار ۵: مقایسه میانگین و انحراف معیار مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک: قبل از اعمال شوک اختلاف معنی داری بین گروه‌ها وجود ندارد. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القای شوک بین گروه کنترل با گروه‌های IUGR، IUGR+GA200 و IUGR+GA400 اختلاف معنی داری دیده شد ($p < 0.0001$). بین گروه IUGR و گروه IUGR+GA200 و IUGR+GA400 در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القای شوک اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < 0.0001$) (**).

در گروه‌های دریافت‌کننده گالیک اسید بین گروه IUGR+GA200 با گروه کنترل نیز اختلاف معنی داری دیده شد ($p < 0.05$). در گروه‌های دریافت‌کننده گالیک اسید تنها بین گروه‌های IUGR+GA400 با گروه IUGR اختلاف معنی دار مشاهده شد ($p < 0.01$). این امر نشان می‌دهد گالیک اسید در دوز بالای ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب بهبود آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از محدودیت رشد درون رحمی در موش‌های صحرایی شده است (نمودار ۶).

بررسی سطح سرمی فاکتور هسته‌ای کاپا B

نتایج حاصل از آنالیز آماری در گروه‌های مختلف مورد بررسی نشان داد که سطح فاکتور هسته‌ای کاپا B که یکی از فاکتورهای آپوپتوزی محسوب می‌شود در گروه IUGR نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری دارد (نمودار ۴-۸، $p < 0.01$). در واقع افزایش سطح فاکتور آپوپتیک و التهابی NF- κ B در گروه IUGR نسبت به گروه کنترل نشان‌دهنده میزان آسیب وارده به حیوان در نتیجه استرس اکسیداتیو ناشی از محرومیت غذایی در دوران جنینی می‌باشد.



نمودار ۶: مقایسه میانگین \pm خطای استاندارد سطح سرمی فاکتور هسته‌ای کاپا B در گروه‌های مختلف: نتایج نشان می‌دهد که بین گروه کنترل با گروه IUGR و IUGR+GA200 ($p < 0.01$ ، $p < 0.05$) و نیز بین گروه‌های IUGR+GA400 با گروه IUGR اختلاف معنی دار دیده شد ($p < 0.01$) (**).

بحث

در این پژوهش بعد از القای محدودیت رشد درون رحمی یا مدل تغذیه‌ای به اثرات نوروپروتکتیو گالیک اسید بر بهبود اختلالات شناختی ایجاد شده بر نوزادان پرداخته شده است. گالیک اسید با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و نوروپروتکتیو باعث کند شدن پیشرفت اختلالات شناختی و احتمالاً محافظت نورونی می‌شود.

مطالعات متعددی به بیان عملکردهای رفتاری مرتبط با اختلال IUGR پرداخته‌اند. همچنین بروز علائم ناشی از این اختلال در انسان همانند برخی از انواع ناهنجاری‌های اسکلتی از جمله: کوتاهی قد، دیسپلازی استخوان، نارسایی آدرنال، اختلال در رشد و اختلالات تناسلی در زنان و مردان به اثبات رسیده است.^{۱۵}

اختلال در محیط مادری در دوران بارداری که شامل حوادثی مانند هیپوکسی، استرس، سموم، التهاب و کاهش جریان خون جفتی هستند می‌تواند بر رشد جنین تاثیر بگذارد. نارسایی مزمن جفتی، قطع مصرف اکسیژن و مواد مغذی جنین منجر به رشد غیرطبیعی جنین می‌شود. شناسایی واسطه‌های مسئول تغییر در توسعه مغز در نوزاد IUGR کلید پیشگیری و درمان آسیب مغزی در این نوزادان است.^{۱۶} محدودیت رشد درون رحمی در ۳ تا ۷ درصد از همه حاملگی‌ها رخ می‌دهد. مطالعات انسانی اخیر نشان داده است که ناتوانی‌های عصبی، اختلالات یادگیری، اختلال حافظه، اختلالات خلقی در فرزندان با محدودیت رشد درون رحمی رایج هستند. با این حال، تعامل بین این اختلال و اختلالات توسعه عصبی ناشی از طیف گسترده‌ای از علل محدودیت رشد درون رحمی مانند سوء تغذیه مادران، نارسایی جفتی، توکسین‌های بارداری و ناهنجاری‌های جنینی می‌باشد.^{۱۷}

مطالعات متعددی به دنبال یافتن عوامل سودمند موجود در گیاهان جهت حفظ و حمایت سیستم عصبی به دنبال آسیب‌های مغزی بوده‌اند. در این زمینه بسیاری متوجه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان می‌باشند که رادیکال‌های آزاد را تخریب می‌نمایند و سلول‌های بدن را از آسیب‌های اکسیداتیو حفظ می‌کنند، برخی از این آنتی‌اکسیدان‌ها که مطالعات متعددی بر روی آنها صورت گرفته است، رزوراترول و کاتچین‌ها هستند.^{۱۸}

گالیک اسید (۳،۴ و ۵ تری‌هیدروکسی بنزوئیک اسید) یک فنول گیاهی است که فعالیت‌های زیستی متعددی دارد. گالیک اسید در القای آپوپتوز سلول‌های توموری نقش موثری ایفا می‌کند.^{۱۹} این ترکیب به عنوان یک از بین برنده قوی رادیکال‌های آزاد شناخته شده است.^{۲۰} علیرغم اثرات آنتی‌دیابتی، ضد رگ‌زایی و ضد توموری، این ترکیب قادر است شاخص انفارکتوس قلبی را کاهش دهد و از آسیب‌های اکسیداتیو کبدی و کلیوی نیز جلوگیری به عمل آورد.^{۲۱،۲۲} گالیک اسید آسیب‌های نورونی ناشی از اختلالات ذهنی ناشی آلزایمر را در موش‌های صحرایی بهبود می‌بخشد.^{۲۳}

مطالعات نشان داده‌اند که گالیک اسید و سایر پلی‌فنول‌های گیاهی دارای اثرات سودمند متعددی هستند و به صورت آنتی‌اکسیدان اثر می‌گذارند.^{۲۴} برخی از مشتقات گالیک اسید دارای اثرات نوروپروتکتیو می‌باشند. این اثرات نوروپروتکتیو وابسته به خصوصیت از بین بردگی رادیکال‌های آزاد این ترکیب دارد.^{۲۵}

در مطالعه Sarkaki و همکاران در سال ۲۰۱۴ مشخص گردید که گالیک اسید صدمه مغزی و نقایص پتانسیل دراز مدت هیپوکامپی و شناختی القا شده توسط هیپوپرفیوژن مغزی را در موش‌های صحرایی بهبود می‌بخشد.^{۲۶} همچنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که گالیک اسید التهاب، الکتروفیزیولوژی مغزی و رفتار را در موش‌های صحرایی با مدل صدمه ترومای مغزی بهبود می‌بخشد که احتمالاً این عمل را از طریق کاهش سیتوکاین‌های پیش‌التهابی مغزی اعمال می‌کند.^{۲۷}

در مطالعه Mishekar و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که گالیک اسید دارای اثر حفاظت‌کنندگی عصبی بر آسیب LTP و حافظه مرتبط با صدمه ترومای مغزی از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپید مغزی و سیتوکاین‌های پیش‌التهابی مغزی دارد.^{۲۸} علاوه بر این در مطالعه Farbood و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که گالیک اسید دارای اثرات مفیدی بر آسیب‌های رفتاری بعد از صدمه القا شده توسط ایسکمی و رپرفیوژن می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که پیش‌درمانی با گالیک اسید صدمه ایسکمی و رپرفیوژن مغزی را تصحیح می‌کند و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را برعلیه ایسکمی و رپرفیوژن در موش‌های صحرایی تحریک می‌کند و بنابراین گالیک اسید خواص محافظت‌کنندگی مغزی را ارائه

می‌دهد.^{۲۹}

طریق تحریک دفاع آنتی اکسیدانی مغزی می‌باشد. همچنین مطالعه اخیر پیشنهاد می‌کند که گالیک اسید ممکن است در درمان زوال عقلی عروقی سودمند باشد. علاوه بر این القای مزمن گالیک اسید بطور معنی‌داری حافظه فضایی و محتوی گلوتاتینون پراکسیداز و تیول تام را اصلاح کرد.^{۳۴}

در مطالعه Kim و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثبات گردید که گالیک اسید (یک مهار کننده هیستون استیل ترانسفراز) مسمومیت عصبی بتا-آمیوئیدی را بوسیله مهار التهاب عصبی واسطه شده توسط میکروگلیا کاهش می‌دهد. این نتایج نشان داد که مهار انتخابی استیل‌سیون NF-kB بوسیله گالیک اسید یک روش درمانی برای پیشروی التهاب بیماری آلزایمر می‌باشد.^{۳۵}

مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸ نشان داد که گالیک اسید و ویدیلولاکتون منجر به بهبود عملکرد حرکتی آسیب دیده و مسمومیت عصبی القا شده توسط کینولینیک اسید در موش‌های صحرائی نژاد ویستار می‌گردند. در این مطالعه مشخص گردید که اثرات حفاظت‌کنندگی عصبی گالیک اسید و ویدیلولاکتون از طریق اثرات ضد التهابی آنها اعمال می‌گردد. علاوه بر این مطالعات آسیب شناسی بافتی مخچه، هیپوکامپ، جسم مخطط و طناب نخاعی اثرات حفاظتی عصبی گالیک اسید و ویدیلولاکتون را تایید کردند.^{۳۶}

همچنین در مطالعه Mansouri و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که گالیک اسید دارای اثرات محافظتی عصبی بر علیه استرس اکسیداتیو مغزی و نقایص حافظه‌ای القا شده توسط ۶-هیدروکسی دوپامین از طریق تحریک دفاع آنتی اکسیدانی در موش‌های صحرائی می‌باشد.^{۳۷}

در مطالعه Pereira و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که گالیک اسید، اثرات شبه ضد اضطراب را در دیابت القا شده توسط استروپتوزوتوسین القا می‌کند. گالیک اسید، استرس اکسیداتیو القا شده توسط استروپتوزوتوسین را معکوس می‌کند. این نتایج پیشنهاد می‌کند که اثرات حفاظت‌کننده عصبی و آنتی اکسیدانی درمان با گالیک اسید در هیپوکامپ و قشر پیش‌پیشانی مغز در حیوانات دیابتی ممکن است برای ایجاد اثرات شبه ضد اضطرابی ضروری باشد.^{۳۸}

همچنین در مطالعه Dhingra و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که گالیک اسید دارای فعالیت شبه ضد اضطراب در موش

در مطالعه Ban و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که گالیک اسید دارای خواص حفاظت‌کنندگی عصبی بر مسمومیت القا شده توسط پروتئین بتا آمیوئیدی در نورون‌های قشری کشت داده شده موش‌های صحرائی می‌باشد. گالیک اسید رهاسازی گلوتامات و تولید ROS را مهار می‌کند و این اثرات ممکن است که بخشی از آن با اثرات محافظت‌کنندگی عصبی آن ارتباط داشته باشد. گالیک اسید از مرگ سلولی عصبی برنامه ریزی شده القا شده توسط پروتئین بتا آمیوئیدی بوسیله تداخل عمل با افزایش کلسیم جلوگیری می‌کند.^{۳۰}

در مطالعه Maya و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که گالیک اسید و ویدیلولاکتون دارای اثرات محافظت‌کنندگی عصبی بر تخریب عصبی القا شده توسط آلومینیوم می‌باشند. گالیک اسید و ویدیلولاکتون می‌توانند نورون‌های حرکتی را از مسمومیت ایجاد شده از اسکروز جانبی آمیوتروفیک از طریق بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی و BDNF و بوسیله پیشگیری از مسمومیت تحریکی گلوتامات حفاظت کنند. همچنین گالیک اسید و ویدیلولاکتون اثر مهاری بر فعالیت کاسپاز ۳ و تنظیم منفی سیتوکاین‌های التهابی دارند.^{۳۱}

در مطالعه Mansouri و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که گالیک اسید از نقایص حافظه‌ای و استرس اکسیداتیو القا شده توسط تزریق درون بطنی مغزی استروپتوزوتوسین در موش‌های صحرائی جلوگیری می‌کند که این عمل را از طریق تحریک سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی اعمال می‌کند.^{۳۲} همچنین در مطالعه Yadav و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که گالیک اسید دارای اثرات حفاظتی در مدل تجربی مبتلا به روانپزشی القا شده توسط کتامین می‌باشد. گالیک اسید پراکسیداسیون لیپید و پروتئین‌های مغزی توتال را اصلاح کرد. علاوه بر این گالیک اسید به طور قابل ملاحظه‌ای سطوح دوپامین و فعالیت استیل کولین استراز و علائم التهاب از جمله TNF-a را کاهش و سطوح گابا و گلوتاتینون را در موش افزایش داد.^{۳۳}

علاوه بر این در Korani و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که گالیک اسید دارای فعالیت مفیدی بر علیه صدمه اکسیداتیو مغزی و نقایص شناختی القا شده توسط هیپوپرفیوژن مغزی از

آزاد باعث جلوگیری از آسیب‌های شناختی احتمالی در موش صحرایی با محدودیت رشد درون رحمی می‌گردد. تحقیق حاضر نشان داد که گالیک اسید آسیب‌های شناختی را در مدل محدود سازی غذایی پریناتال به عنوان مدلی از IUGR کاهش می‌دهد و به ویژه در دوزهای بالاتر (۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) این بهبودی قابل ملاحظه است.

نتیجه گیری کلی

گالیک اسید با خاصیت آنتی اکسیدانی بالقوه خود قادر است استرس اکسیداتیو و اثرات ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد را خنثی نماید و از این رو در این تحقیق نیز مشخص گردید که گالیک اسید میتواند با داشتن این ویژگی نقش مهمی در بهبود علائم مغزی ناشی از نارسایی رحمی - جفتی یا همان محدود سازی رشد درون رحمی در نوزادان اعمال نماید. هر چند، اثر گالیک اسید در این مطالعه پیشگیرانه بوده است و در دوران بارداری باید به این مهم اشاره کرد که جهت جلوگیری از آسیب‌های شناختی احتمالی در نوزادان IUGR درمان باید از دوران جنینی آغاز گردد چرا که بسیاری از بخش‌های مغز در دوران جنینی به تکامل نهایی خود رسیده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری صمیمانه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شیراز تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

های بدون استرس از طریق مهار نیتریک اکسید سنتاز می‌باشد. از طرف دیگر فعالیت ضد اضطراب گالیک اسید در موش‌های دچار استرس ممکن است که از طریق مهار نیتریک اکسید سنتاز القایی و کاهش سطوح پلاسمایی کورتیکوسترون اعمال شود.^{۳۹}

علاوه بر این Mansouri و همکاران در سال ۲۰۱۴ مکانیزم‌های اثرات شبه ضد اضطرابی گالیک اسید را در تست ماز صلیبی مرتفع در موش‌های صحرایی بررسی کردند. در این مطالعه پیشنهاد گردید که فعالیت شبه ضد اضطرابی گالیک اسید بطور اولیه توسط گیرنده‌های 5-HT1A و نه گیرنده‌های بنزودیازپینی واسطه‌گری می‌شود.^{۴۰} در مطالعه Corona و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص گردید که پلی فنول‌ها از جمله گالیک اسید باعث بهبود حافظه کاری فضایی از طریق تعدیل بیان پروتئین‌ها و پیام‌رسانی هیپوکامپی می‌گردند.^{۴۱}

همچنین در مطالعه Huang و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داده شد که گالیک اسید پاسخ‌های التهابی را در ماکروفاژهای RAW264.7 از طریق بلوکه کردن فعالیت TLR4/NF-kB القاشده توسط لیپوپلی ساکارید مهار می‌کند.^{۴۲}

به نظر می‌رسد که نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعات ذکر شده توسط سایر محققان همخوانی دارد. هرچند، هنوز مکانیسم دقیق اثر گالیک اسید بر استرس اکسیداتیو ناشی از IUGR یا اختلالات شناختی ناشی از آن مشخص نشده است ولی به نظر می‌رسد که احتمالاً گالیک اسید از طریق تحریک سیستم دفاع آنتی اکسیدانی، کاهش سیتوکاین‌های پیش التهابی مغزی، کاهش علائم التهاب، کاهش سطح سرمی NF-kB و خنثی کردن رادیکال‌های

References

- Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P. Intrauterine growth restriction - part 2. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016; 29(24):4037-48.
- Doyle, L.W. Long-term Neurologic Outcome for the Very Preterm Growth-Restricted Fetus. Pediatrics 2011; 127: 1048-1049.
- Jimenez-Chillaron JC, Hernandez-Valencia M, Reamer C. Beta-cell secretory dysfunction in the pathogenesis of low birth weight-associated diabetes: a murine model. Diabetes 2005; 54:702-711.
- Kadyrov M, Kingdom JCP, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. Am. J. Obstet. Gynecol. 2006; 194: 557-563.
- Geva R, Eshel R, Leitner Y, Valevski AF, Harel S. Neuropsychological Outcome of Children with Intrauterine Growth Restriction: A 9-Year Prospective Study. Pediatrics 2006;118 (1):91-100.
- Reamon-Buttner SM, Buschmann J, Lewin G. Identifying placenta epigenetic alteration in an Intrauterine Growth Restriction(IUGR) rat model induced by gestational protein deficiency. Reprod Toxicol.2014;45:117-24.

7. Fukami E, Nakayama A, Sasaki J, Mimura S, Mori N, Watanabe K. Under expression of neural cell adhesion molecule and neurotrophic factors in rat brain following thromboxane A2-induced intrauterine growth retardation. *Early. Hum. Dev.* 2000; 58: 101–110.
8. Mansouri MT, Fabood Y, Sameri MJ, et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chem.* 2013;138(2-3):1028-33.
9. Sourani Z, Pourghesyar B, Beshkar P, et al. Gallic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in lymphoblastic leukemia cell line (C121). *Iran J Med Sci.* 2016;41(6):525-530.
10. Goubey S, Varughese LR, Kumar V, Beniwal V. Medical importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharm Pat Anal.* 2015;4(4):305-15.
11. Manshare K, Anand A, Mahajan S, et al. Evaluation of nephroprotective activity of gallic acid in gentamicin-induced rat model of nephrotoxicity. *International Journal of Green Pharmacy.* 2018;48-52.
12. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001; 36(1): 60-90.
13. Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. Fear memory. *Physiological Reviews.* 2016; 96(2): 695-750.
14. Saffarzadeh F, Eslamizade MJ, Hosseini M. The effect of L-Arginine on spatial memory in ovariectomized rats. *Shefaye Khatam.* 2013; 1(1): 13-8.
15. Haram K, Søfteland E, Bukowski R. Intrauterine Growth Restriction: Effects of Physiological Fetal Growth Determinants on Diagnosis. *Obstetrics and Gynecology International.* 2013;9.
16. Sharma D, Sharma P, Shastri S. Genetic, metabolic and endocrine aspect of Intrauterine growth restriction: an update. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 9:1-45.
17. Akitake Y, Katsuragi S, Hosokawa M, Mishima K, Ikeda T, Miyazato M, Hosoda H. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. *Nutr Res.* 2015 ; 35(1):76-87.
18. Gay NH, Phopin K, Suwanjang W, et al. Neuroprotective effects of phenolic and carboxylic acids induced on oxidative stress-induced in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Res.* 2018;43(3):619-636.
19. Inoue M, Suzuki R, Sakaguchi N, et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Bio Pharm Bull.* 1995;18(11):1526-30.
20. Garcia T, Lafuente D, Blanco J, Sanchez DJ, Sirvent JJ, Domingo GL, Gomez M. Oral subchronic exposure to silver nanoparticles in rats. *Food Chem Toxicol.* 2016;92:177-87.
21. Karimi-Khouzani O, Heidarian E, Amini SA. Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats. *Pharmacol Rep.* 2017;69(4):830-835.
22. Asci H, Ozmen O, Ellidag HY. The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. *Journal of Food and Drug Analysis* 2017;890-897.
23. Hajipour S, Sarkaki A, Farbood Y, et al. Effects of gallic acid on dementia type of Alzheimer disease in rats: electrophysiological and histological studies. *Basic Clin Neurosci.* 2016;7(2):97-106.
24. Yen GC, Duh PD, Tsai HL. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry.* 2002;307-313.
25. Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. 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.
26. Sarkaki A, Fathimoghaddam H, Mansouri SM, et al. Gallic acid improves cognitive, hippocampal long-term potentiation deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pak J Biol Sci.* 2014;17(8):978-90.
27. Sarkaki A, Farbood Y, Gharib-Naseri MK, et al. Gallic acid improved behavior, brain electrophysiology, and inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2014;93(8):687-694.
28. Mirshekar MA, Sarkaki A, Farbood Y, et al. Neuroprotective effects of gallic acid in a rat model of traumatic brain injury: behavior, electrophysiological and molecular studies. *IJBMS.* 2018;21(1):1056-1063.
29. Farbood Y, Sarkaki A, Hashemi S, et al. The effects of gallic acid on pain and memory following transient global ischemia/reperfusion in wistar rats. *Avicenna J Phytomed.* 2013;3(4):329-340.
30. Ban JY, Nguyen HT, Lee HJ, et al. Neuroprotective properties of gallic acid from *Sanguisorba radix* on amyloid beta protein(25--35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Bio Pharm Bull.* 2008;31(1):149-53.
31. Maya S, Pakash T, Goli D. Evaluation of neuroprotective effects of wedelolactone and gallic acid on aluminum-induced neurodegeneration: Relevance to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Euro J Pharmacol.* 2018;835:41-51.
32. Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B, et al. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;111:90-6.
33. Yadav M, Jindal DK, Dhingra MS, et al. Protective effect of gallic acid in experimental model of ketamine-induced psychosis: possible behavior, biochemical, neurochemical and cellular alteration. *Inflammopharmacology.* 2018; 26(2) :413-424.

34. Korani MS, Farbood Y, Sarkaki A, et al. Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive and brain oxidative damage in rats. *Eur J Pharmacol.* 2014;733:62-7.
35. Kim MJ, Seong AR, Yoo JY, et al. Gallic acid, a histone acetyltransferase inhibitor, suppresses B-amyloid neurotoxicity by inhibiting microglial-mediated neuroinflammation. *Mol Nutr Food Res.* 2011; 55(12):1798-808.
36. S M, T P, Goli D. Effects of wedelolactone and gallic acid on quinolinic acid-induced neurotoxicity and impaired motor function: significance to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology* 2018;68:1-12.
37. Mansouri MT, Farbood Y, Sameri MJ, et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chem.* 2013;138(2-3):1028-33.
38. Pereira MM, de Morais H, Dos Santos Silva, et al. The antioxidant gallic acid induces anxiolytic-but not antidepressant-like effect, in streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis.* 2018;doi:10.1007/s11011-018-0264-9.
39. Dhingra D, Chhillar R, Gupta A. Antianxiety-like activity of gallic acid in unstressed and stressed mice: possible involvement of nitriergic system. *Neurochem Res.* 2012;37(3):487-94.
40. Mansouri MT, Solltani M, Nighizadeh B. A possible mechanism for the antianxiety-like effects of gallic acid in the rat elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behave.* 2014;117:40-6.
41. Corona G, Vauzour D, Hercelin J, et al. Phenolic acid intake, delivered via moderate wine consumption, improves spatial working memory via modulation of hippocampal and cortical protein expression/activation. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(14):1676-89.
42. Huang L, Hou L, Xue H, Wang C. [Gallic acid inhibits inflammatory response of RAW264.7 macrophages by blocking the activation of TLR4/NF-kB induced by LPS]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2016.32(12):1610-1614.

Zohreh Saberi¹, Mohammad Amin Edalatmanesh^{*2}

¹ M.Sc, Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

The Effect of Gallic Acid on Cognitive Dysfunctions with Intrauterine Growth Restriction in Rats

Received: 19 Sept. 2018; Accepted: 18 Mar. 2019

Abstract

Background: Intrauterine growth restriction (IUGR) lead to abnormalities in fetal central nervous system, till hippocampal and cortical cells became apoptotic. The goal of this research is investigating the effects of Gallic acid on improvement of cognitive impairments and nuclear factor kappa B (NFκB) in animal model of IUGR.

Material and Methods: In this experimental study, 32 female rats from wistar race with weighing approximately 180±25g were divided into 4 groups of 7. Control group: that did not receive any treatment. IUGR group: To induce IUGR of pregnant rats were under 50 % restricted diet from the 14th day of pregnancy to childbirth. Experimental groups 1 and 2: pregnant rats subjected to a 50 % dietary restriction for induction IUGR from 14th day of pregnancy to childbirth and from 12th day of pregnancy to the birth of newborns, received 200 and 400 mg/kg gallic acid doses daily by gavage method. After the birth of pups, morphological evaluations were checked. Then, in 30 postnatal days working and passive avoidance tests and anxiety test were assessed. The serum level of NFκB was analyzed by ELISA.

Results: The working memory and fear-based memory of IUGR rats was reduced significantly compared to the controls. In addition restricted diet leads to increase in NFκB and anxiety levels. Gallic acid was ameliorated working and fear-based memories and reduced serum level of NFκB and anxiety in treated rats.

Conclusion: The findings suggest that restricted diet during pregnancy can cause behavioral cognitive disorders in rats. This is likely due to increased levels of pro-apoptic cytokine such as NFκB. The results also suggest that the neuroprotective effect of Gallic acid is likely to improve memory disorders in IUGR rat model.

Keywords: Gallic acid, Cognitive Disorders, Intrauterine Growth Restriction, NFκB, Rat

***Corresponding Author:**

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

Tel: 09396335040

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com