

## Evaluation of brain-derived neurotrophic factor expression and spatial memory after valproic acid administration in animal model of hippocampal degeneration

Edalatmanesh MA<sup>1\*</sup>, Sheikholeslami M<sup>1</sup>, Rafiei S<sup>2</sup>

1- Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, I. R. Iran.

2- Department of Exercise Physiology, Kish International Campus, Tehran University, Kish, I. R. Iran.

Received: 2017/12/4 | Accepted: 2018/07/22

### Abstract:

**Background:** Hippocampal neurodegeneration caused the incidence of cognitive deficits, along with a possible decrease of neurotrophins. Valproic acid (VPA) is a histone deacetylase inhibitor, which could protect the nervous system from neuronal degeneration through neurotrophic modifications. This study aimed to investigate the effect of different doses of VPA on a hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) level, CA1 area of hippocampal histopathology, and spatial memory assessment in animal models of hippocampal degeneration.

**Materials and Methods:** To induce hippocampal degeneration, rats were injected intraperitoneally with trimethyltin (TMT). Three test groups (TMT+VPA) received 100, 200 and 400 mg/kg of VPA, respectively, and the TMT+Saline group received normal saline for 14 days after TMT intoxication. To investigate the spatial memory, the Morris water maze was used. Then, the BDNF hippocampal level was evaluated using the ELISA technique and histopathological evaluation of hippocampus was also done.

**Results:** Valproic acid decreased the distance and latency time to arrive the hidden platform in learning blocks and increased the spent time in the target quadrant in a probe test following TMT intoxication. Also, the BDNF hippocampal level and amelioration of cell damage in the CA1 area of the hippocampus significantly increased in VPA-treated groups compared with the TMT+Saline group.

**Conclusion:** Valproic acid has neuroprotective effects, which can decrease cognitive deficits due to TMT intoxication in rats.

**Keywords:** Brain-derived neurotrophic factor, Trimethyltin, Valproic acid, Spatial memory, Hippocampus, Rat

\* Corresponding Author.

**Email:** amin.edalatmanesh@gmail.com

**Tel:** 0098 939 633 5040

**Fax:** 0098 71 364 10059

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2018; Vol. 22, No 3, Pages 283-291*

Please cite this article as: Edalatmanesh MA, Sheikholeslami M, Rafiei S. Evaluation of brain-derived neurotrophic factor expression and spatial memory after valproic acid administration in animal model of hippocampal degeneration. *Feyz* 2018; 22(3): 283-91.

# ارزیابی بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز و حافظه فضایی به دنبال تجویز والپروئیک اسید در مدل حیوانی دژنراسیون هیپوکامپ

محمد امین عدالت‌منش<sup>۱\*</sup>، مهتاب شیخ‌الاسلامی<sup>۲</sup>، سمانه رفیعی<sup>۳</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** نورودژنراسیون هیپوکامپ سبب بروز اختلالات شناختی همراه با کاهش احتمالی نوروتروفین‌ها می‌شود. والپروئیک اسید (VPA) یک مهارکننده هیستون داستیلازی است که با تعدیلات نوروتروفینی می‌تواند سیستم عصبی را از دژنراسیون نورونی محافظت کند. این تحقیق به بررسی اثرات دوزهای مختلف VPA بر سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)، هیستون-پاتولوژی ناحیه CA1 هیپوکامپ و ارزیابی حافظه فضایی در مدل حیوانی دژنراسیون هیپوکامپ می‌پردازد.

**مواد و روش‌ها:** جهت القای دژنراسیون هیپوکامپ در موش‌های صحرایی تری متیل تین کلراید (TMT) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. سه گروه آزمون (TMT+VPA) به ترتیب دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن والپروئیک اسید و گروه TMT+Saline نرمال سالین را به مدت ۱۴ روز متعاقب مسمومیت تری متیل تینی دریافت کردند. به منظور بررسی حافظه فضایی از ماز آبی موریس (MWM) استفاده شد. سپس، سطح هیپوکامپی BDNF به روش الایزا بررسی گردید و ارزیابی هیستوپاتولوژیکی هیپوکامپ نیز انجام شد.

**نتایج:** VPA سبب کاهش مسافت و مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی در بلوک‌های یادگیری و افزایش زمان باقی ماندن در ربع هدف در آزمون پروب به دنبال مسمومیت تری متیل تینی گردید. همچنین، سطح هیپوکامپی BDNF و بهبود آسیب سلولی ناحیه CA1 هیپوکامپ به طور معنی‌داری در گروه‌های تحت تیمار با VPA نسبت به گروه TMT+Saline افزایش داشت.

**نتیجه‌گیری:** والپروئیک اسید با دارا بودن اثرات حمایت‌کننده عصبی می‌تواند اختلالات شناختی ناشی از مسمومیت با تری متیل تین را در موش‌های صحرایی کاهش دهد.

**واژگان کلیدی:** فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، تری متیل تین، والپروئیک اسید، حافظه فضایی، هیپوکامپ، موش صحرایی

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۷، صفحات ۲۹۱-۲۸۳

## مقدمه

فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و گیرنده‌اش، تیروزین کیناز B، برای یادگیری و حافظه وابسته به هیپوکامپ ضروری هستند. در میان فاکتورهای نوروتروفیک نام برده شده BDNF در فرآیندهای یادگیری و حافظه و انعطاف پذیری سیناپسی بیشترین نقش را دارا است [۲]. مطالعات نشان می‌دهند که وقفه در بیان BDNF یا تغییر در بیان تیروزین کیناز B ممکن است منجر به اختلال در شکل‌گیری حافظه و دژنراسیون نورون‌ها شود. در واقع، بیان BDNF و گیرنده‌اش در مراحل اولیه بیماری آلزایمر تغییر می‌کند. بنابراین، مطالعه روی این نوروتروفین می‌تواند یک راه‌حل درمانی مناسب برای این‌گونه بیماری‌ها فراهم آورد [۳]. تری متیل تین کلراید (TMT) یک ترکیب آلی با اثرات نوروتوکسیک قوی است که با تخریب نورونی در مناطق انتخابی از مغز شامل سیستم لیمبیک و به‌ویژه هیپوکامپ شناخته می‌شود [۴]. انسان‌هایی که به‌طور تصادفی در معرض TMT قرار می‌گیرند دچار یک سندروم با مشخصات تشنج، سرگیجه، کاهش حافظه و پرخاش‌گری می‌شوند [۵]. شواهد نشان می‌دهد که TMT غلظت میانجی‌های عصبی دخیل در حافظه از قبیل استیل کولین و گلوتامات را تغییر می‌دهد [۶]. تزریق درون‌صفاقی تری متیل تین

نوروتروفین‌ها فاکتورهای رشدی هستند که نقش‌های حیاتی در تشکیل و انعطاف‌پذیری شبکه‌های عصبی دارند. خانواده نوروتروفین‌ها شامل پروتئین‌های شبیه به هم مانند Nerve growth factor (NGF)، Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)، Neurotrophin-4 (NT-4) و NT-3 می‌باشند و در سیستم عصبی مرکزی پستانداران بیان می‌شوند [۱].

<sup>۱</sup> استادیار فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

<sup>۳</sup> دانشجوی دکتری بیوشیمی و متابولیسم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، پردیس بین‌المللی کیش، دانشگاه تهران، کیش، ایران

## \* نشانی نویسنده مسئول:

شیراز، پردیس دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۳۹۶۳۳۵۰۴۰ | دونه‌پس: ۰۷۱ ۳۶۴۱۰۰۵۹

پست الکترونیک: amin.edalatmanesh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۳ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۴/۳۱

گرم/کیلوگرم وزن بدن والپروئیک اسید (Sigma, Germany) را به صورت درون‌صفافی دریافت نمودند.

#### آزمون ماز آبی موریس (MWM)

ماز حوضچه‌ای سیاه‌رنگ با قطر ۱۵۰ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر بود که تقریباً تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری آن با آبی با درجه حرارت  $22 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد پر شده بود. یک سکو با قطر ۱۰ سانتی‌متر در حدود ۲ سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز یکی از ربع‌های ماز قرار داشت. در هر بلوک آزمایش (تعداد دفعات آزمون‌های یادگیری در کل دوره آزمایش) هر حیوان چهار بار مورد آزمایش قرار گرفت. مدت زمان هر بار یک دقیقه در نظر گرفته شد. موقعیت سکو و مختصات آن در همان روز برای همه گروه‌های آزمایشی یکسان بود، اما نقطه شروع در هر بار آزمایش می‌توانست یکی از چهار جهت شمال، جنوب، شرق و یا غرب باشد که به‌طور تصادفی توسط نرم‌افزار ردیاب تعیین می‌شد. تمام مسیرهای پیموده شده توسط دوربین و نرم افزار کامپیوتری ثبت شده و مورد پردازش قرار می‌گرفت. شاخص‌های مدت زمان تأخیر در یافتن سکو و سرعت پیمایش مسیر برای همه گروه‌ها محاسبه شد. به‌منظور بررسی تثبیت یادگیری و آموزش، ۴ بلوک متوالی انجام شده و سپس در روز بعد آزمون به‌خاطرآوری (Probe Test) انجام شد. در این آزمون سکویی که طی ۴ بلاک آزمون یادگیری به‌طور ثابت در یکی از ربع‌های حوضچه قرار داشت، برداشته شده و مدت زمانی که موش در ربع موقعیت قبلی سکو یا هدف (Q1) شنا می‌کرد، به‌عنوان شاخص به‌خاطرآوری در نظر گرفته شد. مدت زمان شنا برای هر حیوان در هر دو مرحله یادگیری و به‌خاطر آوری ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد [۱۵].

#### سنجش سطح هیپوکامپی BDNF

در پایان آزمون حافظه فضایی نیمی از حیوانات در هر گروه با دوز کشنده کلروفورم بیهوش شده و بلافاصله سر حیوان با دستگاه گیوتین مخصوص جوندگان جدا گردید و مغز به‌طور کامل از جمجمه خارج شده و به‌سرعت روی یخ قرار داده شد. هیپوکامپ موش‌های صحرایی با دقت در زیر استریوسکوپ (Olympus, Japan) از بقیه قسمت‌های مغز جدا شد. پس از شستشو با محلول سالین به‌همراه بافر تریس (Sigma, Germany)، بافت مغز با استفاده از دستگاه هموژنایزر (IKA, Germany) با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه هموژنیزه شد. محلول هموژنیزه شده توسط دستگاه سانتریفوژ بیخچال‌دار (Germany) سانتریفوژ شد. جهت جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و

در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی باعث مرگ نورونی گسترده‌ای در سیستم لیمبیک و هیپوکامپ می‌شود [۷]. علاوه بر این، مطالعاتی که در مورد تحلیل عصبی ناشی از تری متیل تین انجام شده‌اند نشان داده‌اند که مسمومیت با آن سبب کاهش بیان BDNF در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی و از جمله هیپوکامپ می‌گردد [۷]. والپروئیک اسید (VPA) یک اسید چرب کوتاه زنجیر است که به‌عنوان داروی ضد تشنج و تثبیت‌کننده خلق‌وخو استفاده می‌شود [۹۸]. درمان با VPA سمیت القاء شده توسط گلوتامات را در محیط کشت سلول‌های عصبی موش صحرایی کاهش می‌دهد [۱۰]. همچنین، VPA مانع از مرگ نورون‌ها ناشی از کمبود اکسیژن-گلوکز در محیط کشت سلول‌های هیپوکامپ می‌شود [۱۱]. نتایج مطالعات نشان داده است که VPA مهارکننده تولید پپتیدهای بتا-آمیلوئیدی در مدل‌های ترانسژنیک بیماری آلزایمر در موش‌ها می‌باشد [۱۲]. همچنین، دیده شده است که VPA سبب مهار آپوپتوز و مرگ نورونی می‌گردد [۱۳]. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات دوزهای مختلف والپروئیک اسید بر بیان هیپوکامپی BDNF و همچنین حافظه فضایی در مدل حیوانی دژنراسیون هیپوکامپ در موش‌های صحرایی صورت گرفته است.

#### مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی از ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ-داولی با وزن  $250 \pm 10$  گرم و سن تقریبی دو ماه استفاده شد. موش‌های صحرایی در طول مدت آزمایش در شرایط استاندارد با چرخه ۱۲ ساعته روشنایی-تاریکی و دمای  $24 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت  $50 \pm 10$  درصد در خانه حیوانات آزمایشگاه تحقیقاتی علوم جانوری دانشگاه شیراز نگهداری شدند. تمام آزمایش‌ها مطابق با قوانین بین‌المللی نگهداری و مراقبت از حیوانات و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز (شماره مجوز: ۲۳۲۲-۱۸۴۶-۹۴) 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 نشد. گروه TMT+Saline: حیوانات این گروه دوز ۸ میلی‌گرم/کیلوگرم تری متیل تین (TMT; Sigma, Germany) را به صورت درون‌صفافی دریافت نمودند [۱۴] و سپس حلال سدیم والپروات یعنی نرمال سالین را به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. گروه‌های TMT+VPA100، TMT+VPA200 و TMT+VPA400: حیوانات این سه گروه ۲۴ ساعت پس از دریافت تری متیل تین به مدت ۱۴ روز به ترتیب دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی-

دوم ( $P < 0/001$ )، بلوک سوم ( $P < 0/001$ ) و بلوک چهارم ( $P < 0/0001$ ) دارد. در بین گروه‌های دریافت‌کننده VPA در بلوک اول و دوم هیچ اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل دیده نشد. در بلوک سوم و چهارم نیز تنها بین گروه TMT+VPA100 با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ). همچنین، در گروه‌های دریافت‌کننده VPA میانگین مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی در بلوک‌های دوم، سوم و چهارم یادگیری نسبت به گروه TMT+Saline کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد؛ به‌گونه‌ای که بین گروه TMT+Saline با هر سه گروه تیمار در بلوک ۲ اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0/05$ ). در بلوک سوم تنها بین گروه‌های TMT+VPA200 و TMT+VPA400 با گروه VPA+Saline اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0/01$ ). در چهارمین بلوک یادگیری بین گروه VPA+Saline و گروه TMT+VPA100 ( $P < 0/05$ ) و نیز گروه‌های TMT+VPA200 و TMT+VPA400 اختلاف معنی‌دار دیده شد ( $P < 0/0001$ ).

#### سرعت پیمایش مسیر

بررسی میانگین و انحراف معیار سرعت پیمایش مسیر (سرعت شنا کردن) بین گروه‌های دریافت‌کننده تری متیل تین و کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ). این نتیجه بیان‌گر عدم تاثیر تجویز تری متیل تین بر سرعت شنا کردن یا به عبارت دیگر القاء اختلال حرکتی در حیوان می‌باشد (نمودار شماره ۲).

#### مرحله آزمون (پروپ)

بررسی میانگین مدت زمان سپری شده در ربع هدف ماز آبی موريس اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (نمودار شماره ۳،  $F = 11/04$  و  $P < 0/0001$ )؛ به‌گونه‌ای که در گروه TMT+Saline کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل وجود داشت (نمودار شماره ۳،  $P < 0/0001$ ) و این امر نشان‌دهنده اثر تری متیل تین بر نقص حافظه و یادگیری در این گروه می‌باشد. هرچند هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده VPA در هر سه دوز مورد بررسی با گروه کنترل دیده نشد، اما با این حال، بین گروه TMT+Saline و گروه‌های تیمار با والپروئیک اسید اختلاف معنی‌دار دیده شد (نمودار شماره ۳،  $P < 0/0001$ ). این اختلاف در گروه دریافت‌کننده دوز ۲۰۰ میلی‌گرم والپروئیک اسید نسبت به گروه TMT+Saline از بقیه گروه‌های تیمار بیشتر بود (نمودار شماره ۳).

پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و از محلول ۰/۵ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (Sigma-Aldrich, Germany) به‌عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده شد [۱۶]. پس از سانتریفیوژ کردن، بخش رویی به کمک سمپلر برداشته شد و سپس میزان بافتی BDNF توسط روش ELISA و به کمک دستگاه الایزایدر مدل 2100 (Stat Fax, USA) و کیت شرکت باستر (Rat BDNF Picokine™, Boster, China) مورد سنجش قرار گرفت.

#### بافت‌شناسی

برای انجام مطالعات بافت‌شناسی در ناحیه CA1 هیپوکامپ، نیمی از حیوانات هر گروه ( $n=5$ ) با مخلوطی از کتامین هیدروکلراید (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شده و سپس پرفیوژن قلبی انجام شد. پس از اتمام پرفیوژن، مغز با دقت از جمجمه خارج شد. سپس، نمونه‌های مغز جهت مطالعات بافت‌شناسی با کمک دستگاه اتوتکنیکون پردازش بافتی شده و پس از تهیه بلوک‌های پارافینه، برش‌گیری از ناحیه هیپوکامپ طبق اطلس پاکسینوس و واتسون صورت گرفت. آنگاه، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین انجام شد و تصویربرداری‌های میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری (Olympus-BH2, Japan) انجام شد [۱۷].

#### آنالیز آماری:

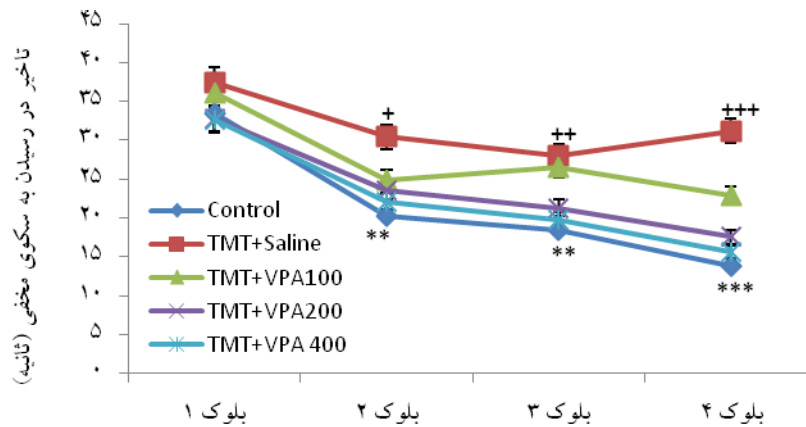
تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. نتایج مربوط به بلوک‌های یادگیری در ماز آبی موريس بر اساس آنالیزهای Repeated measures ANOVA و سایر نتایج به کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند. از نظر آماری مقادیر  $P < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### نتایج

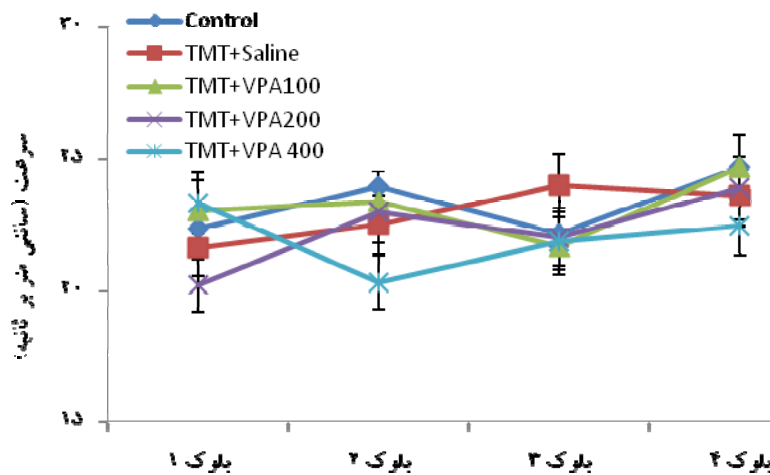
##### بررسی اثر VPA بر حافظه فضایی با MWM

مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی در ماز آبی موريس

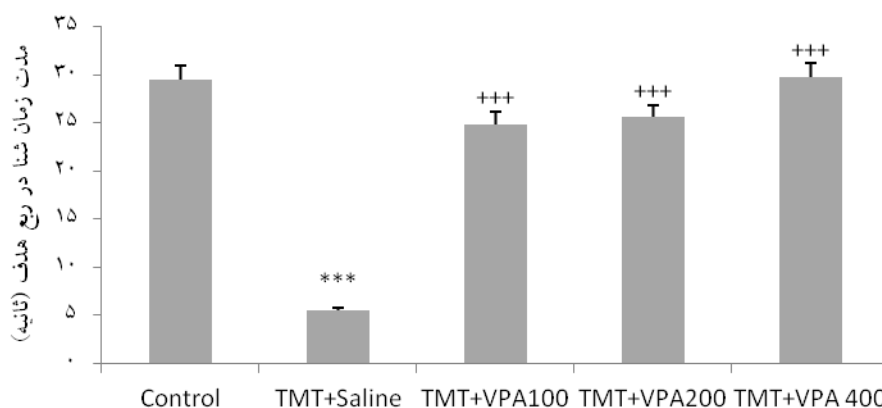
نتایج حاصل از آنالیز واریانس در مرحله یادگیری طی ۴ بلوک مختلف آزمایش نشان از کاهش پیش‌رونده در مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی و مسافت پیموده شده در گروه‌های کنترل و تیمار با والپروئیک اسید دارد (نمودار شماره ۱،  $F = 156/01$  و  $P < 0/0001$ ). مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی در گروه TMT+Saline افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل در بلوک



نمودار شماره ۱- میانگین  $\pm$  انحراف معیار مدت زمان رسیدن به سکوی ماز آبی موریس در چهار بلوک آزمایش. نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با گروه TMT+Saline ( $P < 0.001$  و  $P < 0.0001$ ) و گروه‌های تیمار با VPA و گروه TMT+Saline است ( $P < 0.05$ ),  $P < 0.01$  و  $P < 0.0001$ ).

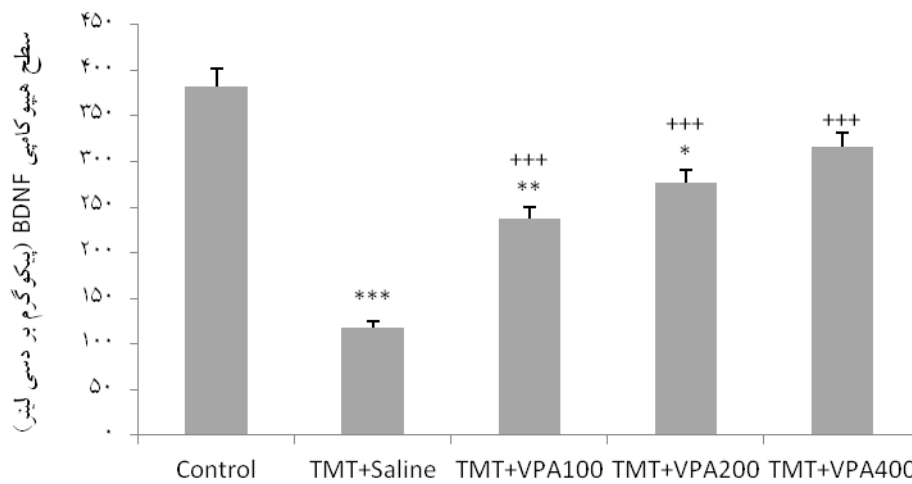


نمودار شماره ۲- میانگین  $\pm$  انحراف معیار سرعت پیمایش مسیر در ماز آبی موریس توسط گروه‌های مختلف. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف در مراحل مختلف مرحله آموزش دیده نشد.



نمودار شماره ۳- میانگین  $\pm$  انحراف معیار مدت زمان باقی ماندن در ربع هدف در مرحله آزمون (پروپ) در گروه‌های مختلف. بین گروه کنترل با گروه TMT+Saline اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.0001$ ). بین گروه‌های تیمار با والپروئیک اسید و گروه TMT+Saline نیز اختلاف معنی‌دار دیده شد ( $P < 0.0001$ ).

های TMT+VPA100 ( $P < 0.001$ ) و TMT+VPA200 ( $P < 0.05$ ) با گروه کنترل اختلاف معنی دار است. و این در حالی است که بین گروه TMT+VPA400 با گروه کنترل اختلاف معنی داری دیده نشد. تیمار با VPA سبب افزایش قابل توجهی در سطح هیپوکامپی BDNF در گروه‌های تیمار نسبت به گروه TMT+Saline گردید؛ بدین ترتیب که بین تمامی گروه‌های دریافت کننده VPA با گروه TMT+Saline اختلاف معنی دار دیده می‌شود ( $P < 0.001$ ).



نمودار شماره ۴- میانگین  $\pm$  انحراف معیار سطح هیپوکامپی BDNF در گروه‌های مختلف. اختلاف بین گروه کنترل و گروه‌های TMT+Saline، TMT+VPA100 و TMT+VPA200 معنی دار است ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.001$  و  $P < 0.0001$ ،  $P < 0.0001$ ). همچنین، اختلاف معنی داری بین گروه‌های دریافت کننده VPA و گروه TMT+Saline وجود دارد ( $P < 0.0001$ ).

گسترده در این گروه در مقایسه با گروه کنترل و گروه TMT+VPA400 دیده می‌شود.

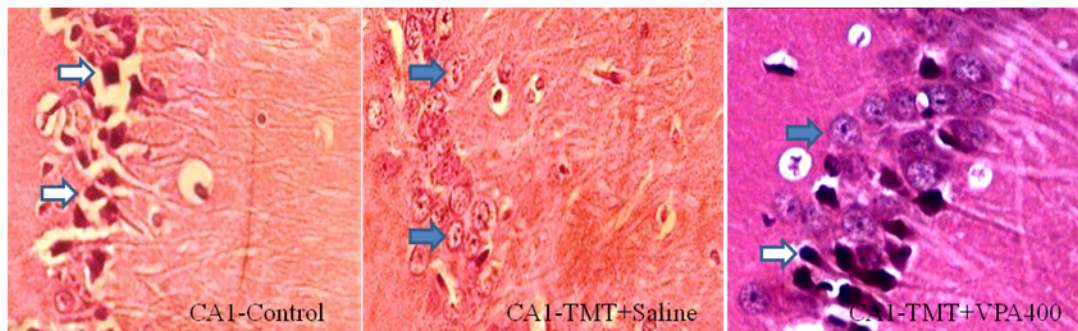
#### بحث

TMT به طور گسترده‌ای برای مطالعه مدل‌های آزمایشگاهی نورودژنراسیون هیپوکامپ و اختلالات حافظه مورد استفاده قرار گرفته است [۱۸]. در مطالعه حاضر به دنبال تجویز تری متیل تین با دوز ۸ mg/kg اختلال در حافظه فضایی در موش‌های صحرائی مشاهده گردید. در مطالعه Mignini و همکاران، اختلال در حافظه فضایی در گروه تحت درمان با TMT در مقایسه با گروه کنترل در آزمون ماز آبی موریس مشاهده شد. این محققان کاهش در توانایی زنده ماندن سلول‌های عصبی همراه با کاهش قابل توجه در بیان گیرنده‌های دوپامینی (D1 و D2) در هیپوکامپ گروه TMT را گزارش نموده‌اند.

بررسی اثر VPA بر بیان هیپوکامپی BDNF نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی داری را در سطح هیپوکامپی BDNF بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (نمودار شماره ۴،  $F=12/51$  و  $P < 0.0001$ ). مسمومیت با تری متیل تین سطح هیپوکامپی BDNF را در مقایسه با گروه کنترل به شدت کاهش داد؛ به گونه‌ای که میزان BDNF در عصاره هیپوکامپ گروه TMT+Saline بسیار کمتر از گروه کنترل می‌باشد ( $P < 0.0001$ ). بررسی اختلاف میانگین سطح هیپوکامپی BDNF بین گروه کنترل و گروه‌های تیمار نشان داد که بین گروه-

بررسی اثر هیستوپاتولوژیک مسمومیت با TMT و تیمار با VPA در ناحیه CA1 هیپوکامپ

مطالعه هیستوپاتولوژیک برش‌های به دست آمده از ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه TMT+Saline علاوه بر کاهش تعداد نورون‌های رنگ آمیزی شده و هسته‌های رنگ گرفته در رنگ آمیزی همتاکسیلین-انوزین، تغییرات محسوسی را نیز در مورفولوژی سلولی به دنبال مسمومیت تری متیل تینی نشان داد. پس از تیمار با تری متیل تین وجود هسته‌های آپوپتیک، استحاله‌های نورونی و از بین رفتن غشاء و قطعه‌قطعه شدن هسته‌های سلول در ناحیه CA1 مشاهده گردید. همان گونه که در شکل شماره ۱ می‌بینید، قطعه-قطعه شدن هسته، تخریب غشای سیتوپلاسمی، تراکم شدن بخش-های قطعه‌قطعه شده هسته‌ای و عدم رنگ‌پذیری در گروه TMT+Saline دیده می‌شود. از طرف دیگر، مرگ سلولی



شکل شماره ۱- میکروگراف برش‌های هیپوکامپ در ناحیه CA1 در گروه‌های کنترل، TMT+Saline و TMT+VPA400. پیکان‌های روشن نشان‌دهنده سلول‌های سالم و پیکان تیره نشان‌دهنده سلول‌های آسیب دیده، بزرگنمایی: X40.

از این رو، به نظر می‌رسد BDNF یک نشان‌گر بیولوژیکی نامشخص اختلالات عصبی است که با تغییرات نورودژنراتیو شناخته می‌شود [۲۲]. مطالعات گذشته نشان داده است که BDNF می‌تواند فنوتیپ بیماری آلزایمر را تعدیل نموده و سبب کاهش تجمع اجسام لوی گردد [۲۶]. در بررسی دیگر مشخص شد که مقادیر سرمی BDNF در مراحل اولیه بیماری آلزایمر افزایش می‌یابد که ممکن است منعکس‌کننده یک مکانیسم جبرانی در مراحل اولیه این بیماری باشد. در طول دوره این بیماری BDNF کاهش می‌یابد که منجر به زوال عقل شدید می‌شود. کاهش BDNF ممکن است باعث عدم حمایت تروفیک همراه با افزایش تجمع بت‌آمیلوئید و در نتیجه دژنراسیون تدریجی از مناطق خاصی در مغز بیمار آلزایمری شود [۲۷]. نورون‌ها پس از قرار گرفتن در معرض ارگانوتین‌ها به شدت آسیب می‌بینند [۲۸]. کاهش انتقال نوروترانسمیتری در سیناپس‌های نواحی CA3-CA1، کاهش تعداد سلول‌ها همراه با کاهش عرض ناحیه هرمی CA1 در مرحله تأخیری مسمومیت با TMT مشاهده شده است [۲۹]. فعال شدن کاسپاز ۳ پیش‌آپوپتوزی نشان‌دهنده دخالت آپوپتوز در مرگ سلول‌های عصبی در مرحله تأخیری مسمومیت با این ماده می‌باشد [۲۹]. مکانیسم‌های مولکولی این ماده شامل اضافه‌بار کلسیم داخل سلولی، اختلال در میتوکندری و استرس اکسیداتیو است که منجر به نورودژنراسیون هیپوکامپ می‌شود [۷]. در مطالعه حاضر دیده شد که ناحیه CA1 هیپوکامپ به دنبال مسمومیت با تری متیل تین به شدت آسیب می‌بیند. وجود هسته‌های آپوپتیک، نورون‌های تحلیل رفته و از بین رفتن غشاء سلولی و قطعه‌قطعه شدن هسته‌ها در ناحیه CA1 به وضوح به چشم می‌خورد (شکل شماره ۱). مطالعات قبلی به خوبی نشان داده‌اند که VPA می‌تواند سبب افزایش سطح نوروتروفین‌ها، بازآرایی مغزی و حفظ نورون‌ها در مقابل عوامل نورودژنراتیو گردد و از این رو اختلالات شناختی را بهبود بخشد [۳۰].

نتایج مطالعه آن‌ها ارتباط بین دژنراسیون ناشی از TMT، بیان گیرنده‌های دوپامینی هیپوکامپ، حامل‌های دوپامینی و اختلال در حافظه فضایی را به وضوح نشان داد [۱۹]. همچنین، در مطالعه حاضر مشخص شد که درمان موش‌های صحرایی با والپروئیک اسید به مدت ۱۴ روز باعث کاهش زمان یافتن سکوی نجات در مرحله آموزش و افزایش مدت زمان باقی ماندن در ربع هدف طی آزمون ماز آبی موریس می‌شود. در واقع، والپروئیک اسید حافظه فضایی را در موش‌های صحرایی مسموم شده با TMT بهبود بخشیده است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که داروی ضد صرع سدیم والپروات باعث افزایش حافظه بلندمدت شناختی در موش‌های ترانس‌ژنیک حامل بیماری آلزایمر می‌شود [۲۰]. هرچند نتایج یک مطالعه دیگر نشان داده است که تجویز داخل صفاقی سدیم والپروات برای موش‌های صحرایی تکثیر سلولی را در منطقه ساب‌گرانولار شکنج دندان‌های هیپوکامپ کاهش داده و این امر منجر به اختلال قابل ملاحظه‌ای در توانایی شناختی موش‌های صحرایی و حافظه فضایی وابسته به هیپوکامپ می‌شود [۲۱]. VPA می‌تواند به طور قابل توجهی استیله شدن هیستون را از طریق مهار فعالیت هیستون داستیلاز (HDAC) بالا برده و بیان ژن‌های مرتبط با انعطاف‌پذیری سیناپسی را درون هیپوکامپ افزایش دهد. بنابراین VPA به عنوان یک مهارکننده HDAC می‌تواند یک ماده دارویی بالقوه برای بهبود اختلالات شناختی باشد [۲۰]. در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی TMT باعث کاهش معنی‌دار سطح BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی شده و تیمار با VPA توانست به صورت وابسته به دوز میانگین سطح هیپوکامپی BDNF را نسبت به گروه TMT افزایش دهد. دوز ۴۰۰ mg/kg والپروات تأثیر بیشتری بر افزایش بیان BDNF نشان داد. مطالعات اخیر تغییر سطح BDNF در گردش خون و نیز سطوح مغزی این فاکتور را در افراد مبتلا به افسردگی ماژور، اختلالات دوقطبی، بیماری آلزایمر، هانتینگتون و پارکینسون نشان می‌دهند [۲۵-۲۲].

## نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که والپروئیک اسید قادر است به صورت وابسته به دوز با تعدیل سطح BDNF و جلوگیری از دژنراسیون نورونی هیپوکامپ سبب بهبود اختلالات شناختی و حافظه فضایی در مدل دژنراسیون هیپوکامپ ایجاد شده با تری متیل تین گردد.

## تشکر و قدردانی

از زحمات مدیریت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز در اعطای تسهیلات لازم جهت اجرای این پروژه صمیمانه قدردانی می‌شود.

## References:

- [1] Meldolesi J. Neurotrophin receptors in the pathogenesis, diagnosis and therapy of neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* 2017; 121: 129-37.
- [2] Boehme F, Gil-Mohapel J, Cox A, Patten A, Giles E, Brocardo PS, et al. Voluntary exercise induces adult hippocampal neurogenesis and BDNF expression in a rodent model of fetal alcohol spectrum disorders. *Eur J Neurosci* 2011; 33(10): 1799-811.
- [3] Allen SJ, Watson JJ, Dawbarn D. The Neurotrophins and Their Role in Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacology* 2011; 9(4): 559-73.
- [4] Geloso MC, Corvino V, Michetti F. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochem Int* 2011; 58(7): 729-38.
- [5] Corvino V, Marchese EL, Michetti FA, Geloso MC. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin. *Neurochem Res* 2013; 38(2): 240-53.
- [6] Park HJ, Shim HS, Ahn YH, Kim KS, Park KJ, Choi WK, et al. Tremella fuciformis enhances the neurite outgrowth of PC12 cells and restores trimethyltin-induced impairment of memory in rats via activation of CREB transcription and cholinergic systems. *Behav Brain Res* 2012; 229(1): 82-90.
- [7] Corvino V, Marchese E, Giannetti S, Lattanzi W, Bonvissuto D, Biamonte F, et al. The neuroprotective and neurogenic effects of neuropeptide Y administration in an animal model of hippocampal neurodegeneration and temporal lobe epilepsy induced by trimethyltin. *J Neurochem* 2012; 122(2): 415-26.
- [8] Monti B, Polazzi E, Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr Mol Pharmacol* 2009; 2(1): 95-109.
- [9] Zhu MM, Li HL, Shi LH, Chen XP, Luo J, Zhang ZL. The pharmacogenomics of valproic acid. *J Hum Genet* 2017; 62(12): 1009-14.
- [10] Kanai H, Sawa A, Chen RW, Leeds P, Chuang DM. Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neuron. *Pharmacogenomics J* 2004; 4(5): 336-344.
- [11] Rekling JC. Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. *Neurosci Lett* 2003; 335(3): 167-70.
- [12] Whittle N, Singewald N. HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand? *Biochem Soc Trans* 2014; 42(2): 569-81.
- [13] Jin G, Liu B, You Z, Bambakidis T, Dekker SE, Maxwell J, et al. Development of a novel neuroprotective strategy: combined treatment with hypothermia and valproic acid improves survival in hypoxic hippocampal cells. *Surgery* 2014; 156(2): 221-8.
- [14] Rafiei S, Baziyar Y, Edalatmanesh M A. Effect of Gallic Acid and Endurance Exercise Training on BDNF in a Model of Hippocampal Degeneration. *Shefaye Khatam* 2016; 4(1):1-6.
- [15] Yazdani M, Edalatmanesh M A, Rafiei S. Ameliorative effect of lithium chloride on working and spatial memory deficit in a PTZ-induced seizure model. *Feyz* 2017; 21(2): 110-7. [in Persian]
- [16] Moghadas M, Edalatmanesh M A. The Lithium Chloride Effect on Anxiety, Exploratory Activity, and Brain Derived Neurotrophic Factor Levels of the Hippocampus in a Rat Model of TMT Intoxication. *Shefaye Khatam* 2015; 3(2): 1-10.
- [17] Tehranipour M, Kehtarpour M. Effect of alcoholic extract of Cannabis sativa leave on neuronal density of CA1, CA2 and CA3 regions of rat hippocampus. *Feyz* 2012; 16 (4): 297-303. [in Persian]
- [18] Lattanzi W, Corvino V, Di Maria V, Michetti F, Geloso MC. Gene expression profiling as a tool to investigate the molecular machinery activated during hippocampal neurodegeneration induced by trimethyltin (TMT) administration. *Int J Mol Sci* 2013; 14(8): 16817-35.
- [19] Mignini F, Nasuti C, Artico M, Giovannetti F, Fabrizi C, Fumagalli L, Iannetti G, Pompili E. Effects of trimethyltin on hippocampal dopaminergic markers and cognitive behaviour. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012; 25(4): 1107-19.
- [20] Yao ZG, Liang L, Liu Y, Zhang L, Zhu H, Huang L, et al. Valproate improves memory deficits in an Alzheimer's disease mouse model: investigation of possible mechanisms of action. *Cell Mol Neurobiol* 2014; 34(6): 805-12.
- [21] Umka J, Mustafa S, ElBeltagy M, Thorpe A, Latif L, Bennett G, et al. Valproic acid reduces spatial working memory and cell proliferation in the hippocampus. Valproic acid reduces spatial working memory and cell proliferation in the hippocampus. *Neuroscience* 2010; 166(1): 15-22.
- [22] Teixeira AL, Barbosa IG, Diniz BS, Kummer A. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function. *Biomark Med* 2010; 4(6): 871-87.

- [23] Phillips C. Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection. *Neural Plast* 2017; 2017: 7260130.
- [24] Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in anti-depressant treatment. *Psychiatry Investig* 2010; 7(4): 231-5.
- [25] Diniz BS, Teixeira AL. Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond. *Neuromolecular Med* 2011; 13(4): 217-22.
- [26] Benussi L, Binetti G, Ghidoni R. Loss of Neuroprotective Factors in Neurodegenerative Dementias: The End or the Starting Point? *Front Neurosci* 2017; 11: 672.
- [27] Laske C, Stellos K, Hoffmann N, Stransky E, Straten G, Eschweiler GW, Leyhe T. Higher BDNF serum levels predict slower cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011; 14(3): 399-404.
- [28] 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.
- [29] Gasparova Z, Janega P, Stara V, Ujhazy E. Early and late stage of neurodegeneration induced by trimethyltin in hippocampus and cortex of male Wistar rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2012; 33(7): 689-96.
- [30] Harrison IF, Crum WR, Vernon AC, Dexter DT. Neurorestoration induced by the HDAC inhibitor sodium valproate in the lactacystin model of Parkinson's is associated with histone acetylation and up-regulation of neurotrophic factors. *Br J Pharmacol* 2015; 172(16): 4200-15.