

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۶، شهریور ۱۳۹۶، ۵۵۲-۵۴۱

اثر فرولیک اسید بر اختلال عملکرد شناختی و نقص ساختاری مغز در موش‌های مبتلا به مولتیپل اسکروزیس ناشی از کوپریزون

مجتبی قبادی^۱، بابک ازجی رودسری^۲، مریم یادگاری^۳، فرشاد همایونی مقدم^۴، محمدابراهیم رضوانی^۵

دریافت مقاله: ۹۶/۲/۱۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۳/۱۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۶/۴/۱۴ پذیرش مقاله: ۹۶/۴/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: فرولیک اسید ترکیبی فنولی است که در غلات مختلف یافت می‌گردد و مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهند که این ترکیب دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدآپوپتوزی و تمایزدهندگی در سلول‌های عصبی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر فرولیک اسید بر پیشگیری از اختلال حافظه ناشی از کوپریزون در مدل مولتیپل اسکروزیس ناشی از کوپریزون در موش‌های نر نژاد C57B6/J بود.

روش بررسی: دمی‌لیناسیون به وسیله افزودن کوپریزون به میزان ۰/۲٪ به غذای معمول حیوانات به مدت ۶ هفته القا شد. فرولیک اسید با ۱۰ میلی گرم به ازای وزن بدن یا ۱۰۰ میلی گرم به ازای وزن بدن روزانه به حیوانات خورانده شد. در پایان هفته ششم آزمون رفتاری ماز Y و شاتل باکس جهت ارزیابی اختلال رفتاری و حافظه ناشی از دمی‌لیناسیون نوروئی و بررسی‌های بافت‌شناسی با رنگ‌آمیزی‌های لوکسال فاست بلو انجام شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که فرولیک اسید در دو دوز از میزان ورود تصادفی حیوانات به بازوهای ماز Y نسبت به گروه کنترل می‌کاهد ($P < 0/01$)، ولی میزان ورود تربیتی حیوانات را افزایش داد ($P < 0/05$). همچنین، فرولیک اسید با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای وزن بدن توانست زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک را افزایش دهد. در برش‌های بافتی، افزایش دمی‌لیناسیون در گروه کوپریزون و کاهش میزان دمی‌لیناسیون در گروه فرولیک اسید دیده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که فرولیک اسید با کاهش میزان دمی‌لیناسیون و مرگومیر الیگودندروسیتی، از اختلال حافظه فعال و احترازی غیرفعال ناشی از کوپریزون پیشگیری کرده است.

واژگان کلیدی: فرولیک اسید، دمی‌لیناسیون، حافظه، کوپریزون، موش

۱ - کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

۲ - کارشناسی ارشد علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

۳ - استادیار آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

۴ - استادیار فیزیولوژی، گروه بیوتکنولوژی سلولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

۵ - (نویسنده مسئول) استاد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

تلفن: ۰۳۵-۳۸۲۰۳۴۱۱، دورنگار: ۰۳۵-۳۸۲۰۳۴۱۱، پست الکترونیکی: erezvani@yahoo.com

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis, MS) بیماری التهابی از بین‌برنده غلاف میلین در دستگاه عصبی مرکزی است که شمار مبتلایان به آن را در جهان تا بیش از ۲ میلیون نفر تخمین زده‌اند [۱-۲]. اختلالات شناختی جزئی از این بیماری است که هم در مراحل ابتدایی و هم انتهایی بیماری رخ می‌دهد و حدود ۴۰-۶۵ درصد از بیماران دچار اختلالات شناختی شدید نظیر اختلال در پردازش اطلاعات و اختلال حافظه می‌شوند. اختلال یادگیری و حافظه در بین مبتلایان به MS شیوع بالایی دارد که باعث افت کیفیت زندگی این افراد می‌شود [۳-۶].

فرولیک اسید (۴-هیدروکسی-۳-متوکسی سینامیک اسید) ترکیبی فنولی است که در دانه غلاتی مانند برنج، گندم، جو، در سبزی‌هایی از قبیل گوجه‌فرنگی و هویج، در میوه‌هایی مانند آناناس و پرتقال و در داروهای مورد استفاده در طب سنتی چین یافت می‌شود. علاوه بر این، فرولیک اسید به‌عنوان ماده‌ای افزودنی به مواد غذایی که از اکسیداسیون جلوگیری می‌کند، مورد تأیید قرار گرفته است [۷-۸]. فرولیک اسید نخستین بار در سال ۱۸۶۶ میلادی از صمغ تجاری جداسازی گردید و در سال ۱۹۲۵ به‌صورت شیمیایی ساخته شد. هرچند خواص بیولوژیک آن در دهه ۷۰ میلادی و با توجه به پژوهش محققین ژاپنی و کشف خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره فرولیک استرایل استر برگرفته از روغن برنج آغاز گردید [۹].

این ترکیب دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و به‌عنوان مهارگر قوی رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شود. همچنین گزارش شده است که این ماده دارای اثرات داروشناسی متعدد از قبیل ضدالتهاب، ضدسرطان، محافظ قلب، مهار تجمع پلاکتی، ضد دیابت و محافظ اعصاب است؛ اما

فعالیت آن در دستگاه عصبی مرکزی کمتر شناخته شده است [۱۰-۱۱].

از آنجایی که مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فرولیک اسید نقش مهمی در محافظت عصبی و همچنین بهبود علائم شناختی داشته است [۱۲] و همچنین با توجه به مشاهده نقص حافظه در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس به‌عنوان یکی از عوارض شایع این بیماری [۶]، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر این ترکیب بر پیشگیری از نقص حافظه و تغییرات ساختاری جسم پینه‌ای (Corpus Callosum, CC) متعاقب دمی‌لیناسیون ناشی از کوپریزون در مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌صورت بنیادی-کارآزمایی آزمایشگاهی در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی شهید صدوقی یزد انجام شد. در این مطالعه از تعداد ۳۲ موش نر نژاد C57B6/J با وزن تقریبی ۲۰-۳۰ گرم و سن ۸ هفته استفاده گردید [۱۳]. حیوانات پس از تهیه از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه شیراز، در قفس‌های ۴ تایی و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با چرخه روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته بر طبق دستورالعمل استاندارد کار با حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد نگهداری و به‌طور تصادفی در ۴ گروه آزمایشی ۸ تایی شامل گروه سالم بدون مداخله، گروه کنترل دریافت‌کننده کوپریزون و حلال دارو، گروه تیمار شده با کوپریزون و دریافت‌کننده فرولیک اسید [Austria-Sigma] با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن و گروه تیمار شده با کوپریزون و دریافت‌کننده فرولیک اسید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن تقسیم شدند. جهت القاء دمی‌لیناسیون، کوپریزون [Austria-Sigma] با نسبت وزنی ۰/۲٪ به پودر غذای مخصوص جوندگان اضافه

و با دقت فراوان و به مدت ۴۵ دقیقه مخلوط گردید و پس از اضافه کردن آب و تبدیل مجدد خمیر حاصل به پلت غذایی، به مدت ۶ هفته و به صورت روزانه و با دسترسی آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت تا دمیلینه شدن به صورت اختصاصی در جسم پینه‌ای حیوان القاء گردد [۱۴]. جهت اطمینان از دمیلینه شدن جسم پینه‌ای تمام حیوانات، در ابتدا به صورت آزمایشی تعداد ۵ موش به مدت ۶ هفته تحت تغذیه با غذای حاوی کوپریزون قرار گرفتند و پس از جداسازی مغز و رنگ‌آمیزی اختصاصی، از دمیلیناسیون اطمینان حاصل گشت.

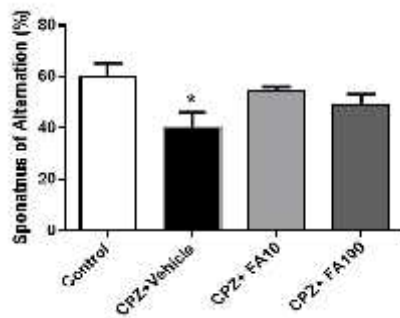
به منظور پیشگیری از دمیلیناسیون، فرولیک اسید به صورت روزانه و با دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم به ازای وزن بدن در آب مقطر به صورت سوسپانسیون درآورده شده و با استفاده از لوله گاوژ مخصوص موش روزانه با دوزهای معین به حیوانات گروه تیمار خوراند.

در انتهای هفته ۶ و جهت ارزیابی اختلال یادگیری و حافظه، از آزمون ماز Y برای بررسی جابجایی خودبه‌خودی و تصادفی حیوان و بررسی رفتار کاوشگری آن استفاده شد. ماز دارای سه بازو با اندازه $40 \times 8 \times 15$ بود که با زاویه 120° درجه و به شکل Y در کنار هم قرار گرفته بودند. حیوان در مرکز ماز (نقطه تلاقی سه بازو) قرار داده شد و حرکات حیوان به مدت ۸ دقیقه ثبت گردید. نحوه امتیازدهی شامل ثبت تعداد ورود حیوان به بازوهاست که به دو صورت زیر انجام شد: تعداد کل ورود به بازوهای ماز درصد تعداد ورود ترتیبی در ماز در مدت ۸ دقیقه (2×100) - تعداد ورود به هر سه بازوی ماز به شکل ترتیبی (ABC, BCA, CBA, CAB, ...) / تعداد جابجایی [۱۵]

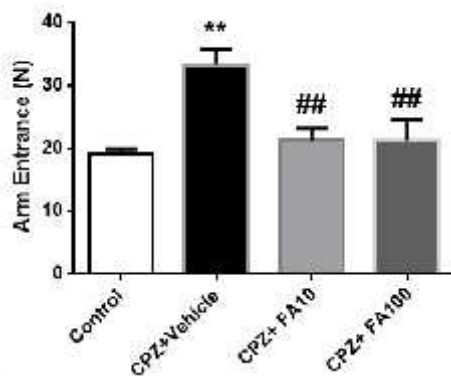
همچنین جهت بررسی حافظه احترازی غیرفعال جوندگان آزمون شاتل باکس انجام گردید. دستگاه شاتل باکس محفظه‌ای شیشه‌ای متشکل از دو بخش تاریک و روشن (اندازه هر بخش $20 \times 40 \times 20$) است که توسط یک

دریچه گیوتینی از هم جدا می‌گردند. در کف هر بخش میله‌های فلزی بافاصله ۱ cm از هم قرار گرفته‌اند و شوک الکتریکی را به پای حیوان منتقل می‌کنند. نخست، حیوانات به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه قرار داده شدند تا با شرایط انطباق بیابند و سپس به قفس بازگردانده شد. پس از ۳۰ دقیقه حیوان در قسمت روشن قرار داده و در گیوتینی بین دو محفظه برداشته شد و به مدت ۱۰ ثانیه به حیوان زمان داده شد تا وارد محفظه تاریک دستگاه گردد و بلافاصله پس از ورود حیوان به بخش تاریک، شوک الکتریکی به مدت $1/5$ ثانیه و با شدت $1/2$ میلی‌آمپر به عنوان محرک غیرشرطی برقرار گردید تا بالاجبار محفظه را ترک کند و پس‌از آن، حیوان به قفس منتقل گردید. پس از ۲ دقیقه موش مجدداً در دستگاه قرار گرفت و مدت‌زمان سپری‌شده جهت ورود حیوان به بخش تاریک جهت بررسی یادگیری حیوانات ثبت گردید. پس از ۲۴ ساعت، آزمون جهت بررسی حافظه احترازی تکرار گردید و زمان ورود حیوانات به محفظه تاریک ثبت شد [۱۶]. به منظور مشاهده نواحی دمیلیناسیون در جسم پینه‌ای حیوانات آزمایش، از رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین Luxol Fast Blue استفاده گردید. به این منظور حیوانات پس از بی‌هوشی عمیق با کتامین و زایلازین، تحت پرفیوژن بافتی فرمالین (۱۰ درصد) از راه قلب قرار گرفتند و پس‌از آن، مغز آنها جدا و بعد از آب‌گیری در دستگاه Tissue processor، بلوک‌های پارافینی تهیه گردید. پس از مقطع‌گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم و قرارگیری مقاطع بر روی لام، رنگ‌آمیزی با استفاده از دستورالعمل انجام گردید.

در انتها نیز بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Prism7 انجام گرفت. داده‌های آزمون رفتاری ماز Y و شاتل باکس در نرم‌افزار قرار داده شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها صورت گرفت و نمودارهای مربوطه با محاسبه



نمودار ۲- اثر دوزهای مختلف فرولیک اسید بر درصد جابجایی‌های متوالی در ماز Y. $P < 0.05$, $Mean \pm SEM$



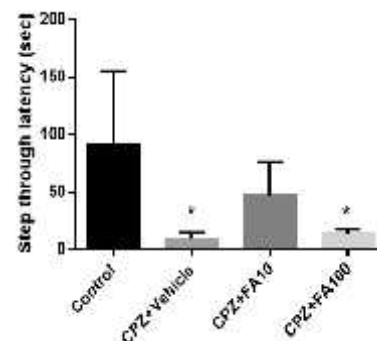
نمودار ۳- اثر دوزهای مختلف فرولیک اسید بر میزان تأخیر به محفظه تاریک در آزمون شاتل باکس. فرولیک اسید با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای وزن بدن باعث افزایش در زمان تأخیر ورود به محفظه نسبت به گروه دریافت کننده کوپریزون شد. CPZ: $P < 0.05$, FA: Ferulic Acid, Cuprizone treated Group $Mean \pm SEM$

مطالعه برش‌های جسم پینه‌ای با رنگ آمیزی لوکسال فاست بلو نشان داد که جسم پینه‌ای در گروه کنترل نمای طبیعی داشت و تعداد الیگودندروسیت‌ها و تراکم میلین طبیعی بوده است. در گروه دریافت کننده کوپریزون مناطق فاقد میلین و نیز تعداد الیگودندروسیت‌های کمتری قابل مشاهده بود. همچنین در موش‌های تیمار شده با فرولیک اسید با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای وزن بدن میلین افزایش محسوسی نشان داد و تعداد بیشتر الیگودندروسیت‌ها در نواحی دمیینه شده برش‌های بافتی کاملاً مشهود بود.

Mean±SEM تهیه گردید. آنالیز آماری داده‌های با استفاده از آزمون One-Way ANOVA و پس‌آزمون مقایسه‌ای Tukey انجام شد. سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

نتایج

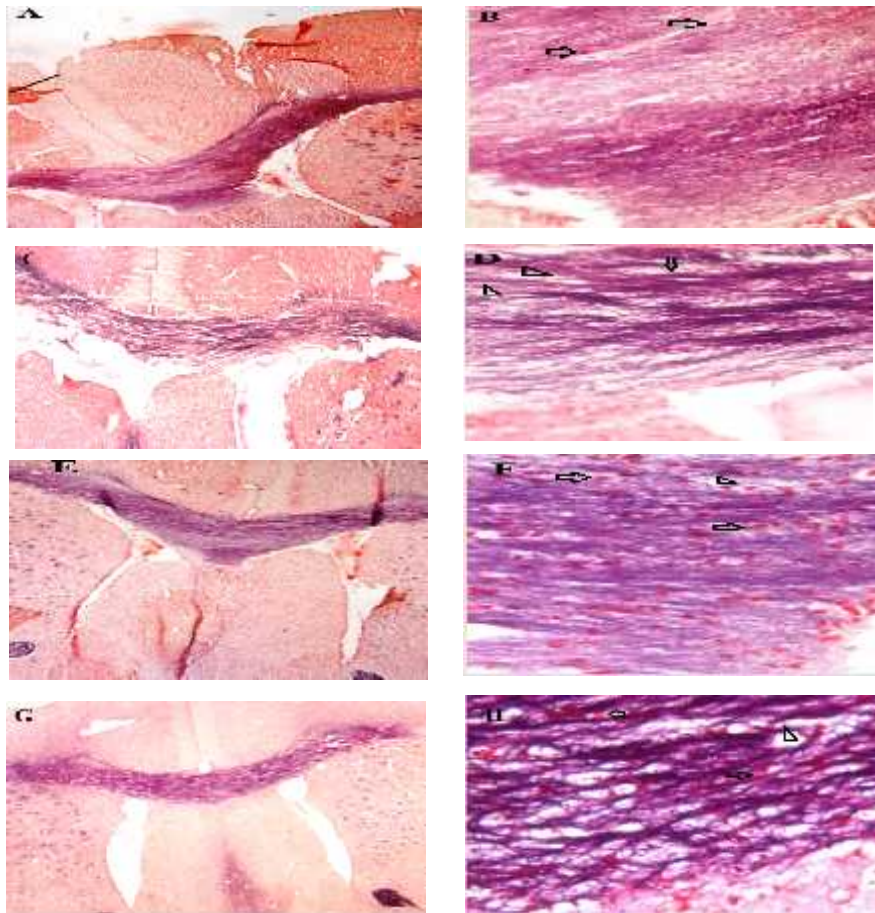
در تعداد ورود حیوانات گروه دریافت کننده کوپریزون نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دیده شد ($P < 0.01$)، درحالی‌که تیمار حیوانات با فرولیک اسید باعث شد که تعداد ورود حیوانات به بازوهای ماز Y نسبت به گروه کوپریزون کاهش یابد ($P < 0.05$) (نمودار ۱). همچنین دریافت کوپریزون منجر به کاهش معنادار در درصد ورود ترتیبی و افزایش ورود تصادفی حیوانات به بازوهای ماز شد ($P < 0.05$)، درحالی‌که میان گروه کنترل و گروه تیمار با فرولیک اسید تفاوتی مشاهده نشد (نمودار ۲).



نمودار ۱- اثر دوزهای مختلف فرولیک اسید بر تعداد ورود به بازوهای ماز. فرولیک اسید باعث کاهش در تعداد ورود به بازوهای ماز شد.

CPZ: Cuprizone treated Group, FA: Ferulic Acid $P < 0.01$, $Mean \pm SEM$

در زمان ورود حیوانات گروه‌های دریافت کننده کوپریزون و فرولیک اسید با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای وزن بدن نسبت به گروه کنترل به قسمت تاریک دستگاه تفاوت معنی‌داری دیده شد ($P < 0.05$)، درحالی‌که در زمان ورود حیوانات تیمار شده با فرولیک اسید با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای وزن بدن، تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نگردید (نمودار ۳).



شکل ۳- تصویر میکروگراف نوری از بافت جسم پینه‌ای در گروه‌های تجربی و مقایسه آن‌ها با گروه کنترل با رنگ آمیزی لاکسال فاست بلو (بزرگنمایی ۴۰۰× و ۴۰×). سلول‌های الیگودندروسیت با فلش و فضاهای خالی میلین با سر فلش مشخص شده‌اند. A و B: بافت جسم پینه‌ای در گروه کنترل، سلول‌های الیگودندروسیت در بافت طبیعی (فلش). C و D: بافت جسم پینه‌ای در گروه کوپریزون، مناطق واکونله و اسفنجی فاقد میلین (فلش) نشان‌دهنده القای تخریب میلین است. تعداد سلول‌های الیگودندروسیت کاهش نشان می‌دهد. E و F: بافت جسم پینه‌ای در گروه فرولیک اسید ۱۰ میلی گرم به ازای وزن بدن، بازگشت سلول‌های الیگودندروسیت (فلش) و افزایش تعداد سلول‌ها. G و H: بافت جسم پینه‌ای در گروه فرولیک اسید ۱۰۰ میلی گرم به ازای وزن بدن، افزایش تعداد سلول‌های الیگودندروسیت نسبت به گروه کوپریزون مشاهده گردید.

به نظر می‌رسد که در گروه دریافت‌کننده فرولیک اسید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن، جسم پینه‌ای دارای تراکم بیشتر میلین و الیگودندروسیت‌ها نسبت به گروه کوپریزون است، اما این میزان در مقایسه با گروه فرولیک اسید ۱۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن کمتر است (شکل ۱).

بحث

این مطالعه در دو بخش آزمون‌های رفتاری و رنگ‌آمیزی‌های بافتی انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که کوپریزون می‌تواند شاخص رفتاری تعداد ورود به بازوهای ماز Y را افزایش دهد که بخش زیادی از این افزایش، با تیمار حیوانات با فرولیک اسید کاهش یافت. همچنین شاخص دیگر رفتاری در این مطالعه تعداد ورود ترتیبی به داخل بازوهای ماز بود که کوپریزون آن را کاهش داد و فرولیک اسید باعث بهبود ورود ترتیبی در بازوهای ماز شد. نتایج آزمون شاتل باکس نیز حاکی از کاهش معنی‌دار در زمان تأخیر ورود حیوانات گروه‌های دریافت‌کننده کوپریزون و تیمار با فرولیک اسید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن به محفظه تاریک دستگاه نسبت به گروه سالم بود اما در گروه دریافت‌کننده فرولیک اسید با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن نسبت به گروه سالم تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. همچنین در رابطه با شاخص‌های بافت‌شناسی، رنگ‌آمیزی لوکسال فاست بلو نشان داد که نمای جسم پینه‌ای، تراکم میلین و تعداد الیگودندروسیت‌ها در گروه سالم طبیعی بود، اما دریافت کوپریزون باعث افزایش تخریب میلین و کاهش الیگودندروسیت‌ها نسبت به گروه کنترل شد؛ درحالی‌که

هر دو دوز مصرفی فرولیک اسید باعث بهبود تراکم میلین و تعداد الیگودندروسیت‌ها نسبت به گروه کوپریزون شد که در این بین، اثر دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن اثر بهتری را نشان داد.

از ماز Y جهت اندازه‌گیری رفتار جستجوگرانه و حافظه فضایی و از شاتل باکس جهت بررسی حافظه احترازی غیرفعال حیوانات استفاده می‌شود [۱۷] تیمار با کوپریزون منجر به افزایش ورود حیوان به بازوهای ماز Y و کاهش تناوب خودبه‌خودی و همچنین نقص حافظه احترازی غیرفعال حیوانات می‌شود [۱۸] که حاکی از افزایش بی‌قراری، تخریب میلین، نقص حافظه و بروز رفتار شبه‌شیزوفرنی است [۱۹]. در مطالعات پیشین مشخص شد که فرولیک اسید باعث بهبود اختلال شناختی و آسیب حافظه حیوانات تحت تیمار می‌گردد [۱۲]. یافته‌های مطالعه ما نیز مشابه این نتایج بود، به‌طوری‌که تعداد ورود حیوانات گروه کوپریزون به بازوهای ماز افزایش و ورود ترتیبی آن‌ها کاهش یافت درحالی‌که فرولیک اسید در هر دو دوز مورد استفاده، از افزایش تعداد ورود به بازوهای ماز و کاهش ورود ترتیبی حیوانات جلوگیری کرد. جسم پینه‌ای دسته‌ای از نورون‌های میلینه ماده سفید مغز است که در انتقال اطلاعات بین دو نیمکره مغزی نقش دارد و در بخش عمده‌ای از فرایندهای شناختی دخیل است. آسیب این قسمت از مغز در بیماری MS بسیار شایع است و پژوهش‌ها حاکی از آن است که عامل اصلی اختلالات شناختی در بیماری MS، آسیب جسم پینه‌ای است [۲۰-۲۲].

بیماری MS، یک بیماری خودایمن التهابی است که در دستگاه عصبی مرکزی اتفاق می‌افتد. مدل‌های حیوانی بیماری MS شامل تخریب میلین با ویروس، فعال کردن دستگاه ایمنی و تخریب میلین با پادتن و تخریب میلین با استفاده از مواد سمی نظیر کوپریزون است [۲۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که کوپریزون با اثر مستقیم بر الیگودندروسیت بالغ و مهار کمپلکس IV میتوکندری سبب افزایش آسیب اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید و مرگ در این سلول‌ها می‌شود [۲۴-۲۵]. به محض اختلال در الیگودندروسیت‌ها، توالی وقایع سلولی و التهابی منجر به آپوپتوز با واسطه پروتئین آپوپتوزی p53 (Tumor protein p53) و دمییلیناسیون می‌شود [۲۶]. این بیماری موجب بروز نقص‌های شناختی نظیر کاهش توجه، کاهش کارایی پردازش اطلاعات و سرعت پردازش و نقص حافظه و یادگیری می‌شود [۲۷-۲۸].

فرولیک اسید از مشتقات کافئیک اسید است که در سبزی‌ها، غلات و قهوه یافت می‌شود و یکی از ترکیبات گیاهانی نظیر *Angelica Sinensis* است که در طب چینی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۹]. از خواص درمانی اصلی فرولیک اسید می‌توان به آنتی‌اکسیدان بودن و محافظت عصبی نام برد [۳۰-۳۱]. پژوهش‌های پیشین نشان دادند که تجویز دهانی فرولیک اسید منجر به افزایش تقسیم سلول‌های پیش‌ساز عصبی بالغ در هیپوکمپ حیوانات می‌گردد [۱۰]. همچنین دریافت فرولیک اسید منجر به افزایش بازسازی اعصاب محیطی در مدل آسیب سیاتیک در موش صحرایی از طریق سرکوب ماکروفاژها در محل آسیب شده است [۳۲]. پژوهشی دیگر نیز نشان داد که فرولیک اسید دارای نقش محافظت

عصبی در ایسکمی موضعی مغز است و این اثر خود را از طریق تعدیل کاهشی یا افزایشی آنزیم‌های اختصاصی انجام می‌دهد [۳۳]. همچنین فرولیک اسید باعث افزایش اثر تمایزی فاکتور رشد عصبی bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) بر روی سلول‌های فنوکروموسایتوما PC12 و رشد نوریتی این سلول‌ها به‌وسیله مسیر وابسته به MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) می‌شود [۳۴]. همچنین پژوهشگران دریافته‌اند که اثر محافظتی فرولیک اسید در کاهش مرگ سلولی در آسیب ایسکمی ناشی از مهار مسیر سیگنالی Akt (Protein kinase B) است [۳۵]. همچنین در پژوهشی دیگر مشخص شد که اثر محافظتی فرولیک اسید از عصب، به علت کاهش سطح کلسیم داخل سلولی است و از این طریق باعث کاهش آسیب و مرگ سلول عصبی در ایسکمی مغزی شده است [۳۶]. از طرف دیگر، فرولیک اسید با کاهش فعالیت کاسپاز سه و بیان ژن‌های p53 (پروتئین دخیل در مرگ سلول آسیب‌دیده) و p21 (CDK-interacting protein 1) (تنظیم‌گر چرخه سلولی)، آسیب اکسیداتیو آپوپتوز ناشی از آهن را در سلول‌های گرانولار مخچه کاهش داد [۳۷]. همچنین فرولیک اسید توانسته است مرگ الیگودندروسیت‌ها را در مدل ویروسی MS کاهش دهد که مکانیسم آن مشخص نشده است [۳۸].

نتیجه‌گیری

فرولیک اسید با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و حفاظت عصبی منجر به حفظ تراکم میلین در جسم پینه‌ای گردید. به نظر می‌رسد که حفظ قابل توجه میلین،

نسبت به گروه سالم، نشان‌دهنده نقص در حافظه احترازی غیرفعال است؛ اما فرولیک اسید با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن، مانع از این نقص شده است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از سرکار خانم زینب حفیظی در آزمایشگاه مرکزی دانشکده که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر می‌نمایند.

منجر به سلامت حافظه کاری حیوان و عدم معنی‌داری نتایج گروه‌های فرولیک اسید در آزمون رفتاری ماز Y نسبت به گروه کنترل شده است؛ درحالی‌که نتایج گروه کوپریزون حاکی از افزایش بی‌قراری و اختلال حافظه حیوان بوده است. از طرفی کاهش معنی‌دار زمان تأخیر ورود حیوانات در گروه‌های دریافت‌کننده کوپریزون و فرولیک اسید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن

References

- [1] Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006; 52(1): 61-76.
- [2] Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994; 36(suppl:s6-11).Review.
- [3] Olivares T, Nieto A, Sanchez Mp, Wollmann T, Hernandez MA, Barroso J Pattern of neuropsychological impairment in the early phase of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11(2): 191-7.
- [4] Deloire M, Salort E, Bonnet M, Arimone Y, Boudineau M, Amiera H, et al. Cognitive impairment as marker of diffuse brain abnormalities in early relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76(4): 519-26.
- [5] Summers M, Fisuiukul L, Anderson V, Mikker D, Cipolotti L, Ron M. Cognitive impairment in relapsin-gremitting multiple sclerosis can be predicted by imaging performed several years earlier. *Mult Scler* 2008; 14(2): 197-204.
- [6] Chiaravalloti ND, DeLuca J. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7(12): 1139-51.
- [7] Xu T, Pan Z, Dong M, YuC, Niu Y., Ferulic acid suppresses activation of hepatic stellate cells through ERK1/2 and Smad signaling pathways in vitro. *Biochem Pharmacol* 2015; 93(1): 49-58.

- [8] Palacio L, Cantero JJ, Cusido RM, Goleniowski ME, Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Sci* 2012; 193-4: 1-7.
- [9] Zhao Z, Moghadasian MH. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry* 2008; 109(4): 691-702.
- [10] Yabe T, Hirahara H, Harada N, Ito N, Nagai T, Sanagi T, et al. Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation in vitro and in vivo. *Neuroscience* 2010; 165(2): 515-24.
- [11] Hou YZ. Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II. *Eur J Pharmacol* 2004; 499(1): 85-90.
- [12] Kim MJ, Choi SJ, Lim ST, Kim HK, Heo HJ, Kim EK, et al. Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Bioscience, Biotechnol Biochem* 2007; 71(4): 1063-68.
- [13] Mi G, Gao Y, Liu S, Ye E, Li Y, Jinx, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol promotes remyelination in a cuprizone induced demyelination model. *Cell Cycle* 2016; 15(20): 2780-91.
- [14] Zimmermann J, Emrich M, Krauthausen M, Saxe S, Nitsch L, Heneka MT, et al. IL-17A Promotes Granulocyte Infiltration, Myelin Loss, Microglia Activation, and Behavioral Deficits During Cuprizone-Induced Demyelination. *Mol Neurobiol* 2017; doi: 10.1007/s12035-016-0368-3.
- [15] Ghafouri S, Fathollahi Y, Javan M, Shojaei A, Asgari A, Mirnajafi-Zadeh J., Effect of low frequency stimulation on impaired spontaneous alternation behavior of kindled rats in Y-maze test. *Epilepsy Res* 2016; 126: 37-44.
- [16] Wang J, Ye E, Cheng X, Zhang X, Liu F, Liu G, et al. The effects of LW-AFC on intestinal microbiome in senescence-accelerated mouse prone 8 strain, a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 2016; 53(3): 907-19.
- [17] Shao Y, Peng H, Huang Q, Kong S, Xu H. Quetiapine mitigates the neuroinflammation and oligodendrocyte loss in the brain of C57BL/6 mouse following cuprizone exposure for one week. *Eur Pharmacol* 2015; 765: 249-57.
- [18] Fan HB, Chen LX, Qu XB, Ren CL, Wu XX, Dong FX, et al. Transplanted miR-219-overexpressing oligodendrocyte precursor cells promoted remyelination and improved

- functional recovery in a chronic demyelinated model. *Sci Rep* 2017; 7:41407.
- [19] Makinodan M, Yamauchi T, Tatsumi K, Okuda H, Takeda T, Kiuchi K, et al. Demyelination in the juvenile period, but not in adulthood, leads to long-lasting cognitive impairment and deficient social interaction in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33(6): 978-85.
- [20] Calabrese P, Penner IK. Cognitive dysfunctions in multiple sclerosis—a "multiple disconnection syndrome"? *J Neurol* 2007; 254: suppl 2: ll.18-21
- [21] Gadea M, Marti- Bonmati L, Arana E, Espert R, Casanova V, Pascull A. Dichotic listening and corpus callosum magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis with emphasis on sex differences. *Neuropsychology* 2002; 16(2):275-81.
- [22] Benavidez DA, Fletcher JM, Hannay HJ, Bland ST, Caudle SE, Mendelsohn DB, et al. Corpus callosum damage and interhemispheric transfer of information following closed head injury in children. *Cortex* 1999; 35(3): 315-36.
- [23] Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Vander Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 47: 485-505.
- [24] Pasquini L, Calatayud CA, Bertone Una AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res* 2007; 32(2): 279-92.
- [25] Acs P, Selak MA, Komoly S, Kalman B. Distribution of oligodendrocyte loss and mitochondrial toxicity in the cuprizone-induced experimental demyelination model. *J Neuroimmunol* 2013; 262(1-2): 128-31.
- [26] Hagemeyer K, Lurbke A, Hücke S, Albrecht S, Preisner A, Klassen E, et al. Puma, but not noxa is essential for oligodendroglial cell death. *Glia* 2013; 61(10): 1712-23.
- [27] Litvan I, Gtafman J, Vendrell P, Martinez JM. Slowed information processing in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1988; 45(3):281-5.
- [28] Rao SM Memory dysfunction in multiple sclerosis: Its relation to working memory, semantic encoding, and implicit learning. *Neuropsychology* 1993; 7(3): 364.
- [29] Ou S, Kwok KC. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci Food Agricul* 2004; 84(11): 1261-9.

- [30] Trombino S, Cassano R, Ferrarelli T, Barone E, Picci N, Mancuso C. Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2013; 109: 273-9.
- [31] Mamiya T, Kise M, Morikawa K. Ferulic acid attenuated cognitive deficits and increase in carbonyl proteins induced by buthionine-sulfoximine in mice. *Neurosci lett* 2008; 430(2): 115-80.
- [32] Lee SC, Tsai CC, Yao CH, Chen Ys, Wu MC. Ferulic acid enhances peripheral nerve regeneration across long gaps. *EvidBased Complement Alternat Med* 2013; 2013:876327.
- [33] Sung JH, Cho EL, Cho JH, Won CK, Kim MO, Koh PO. Identification of proteins regulated by ferulic acid in a middle cerebral artery occlusion animal model-a proteomics approach. *J Vet Med Sci* 2012; 74(11): 1401-7.
- [34] Lin L, Xiao F, Lai YC, Su JN, Luo HM. Effects of ferulic acid on bFGF-treated PC12 cells. *Zhong Yao Cai*, 2011; 34(4): 572-5.
- [35] Koh PO. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. *Neurosci lett* 2012; 507(2): 156-60.
- [36] Sung JH, Kim MO, Koh PO. Ferulic acid attenuates the focal cerebral ischemic injury-induced decrease in parvalbumin expression. *Neurosci lett*, 2012; 516(1): 146-50.
- [37] Zhang Z, Wei T, Hou J, Li G, Yu S, Xin W, Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Eur J Pharmacol* 2003; 467(13): 41-7.
- [38] Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 2004; 7(10): 1088-95.

The Effect of Ferulic Acid on Cognitive Disorder And Brain Structural Deficit in Mice in Cuprizone Induced Animal Model of Multiple Sclerosis.

M. Ghobadi¹, B. Arji roodsari², M. Yadegari³, F. Homayouni-Moghadam⁴, M.E. Rezvani⁵

Received: 03/05/2017 Sent for Revision: 07/06/2017 Received Revised Manuscript: 05/07/2017 Accepted: 08/07/2017

Background and Objective: Ferulic acid is a polyphenolic compound derived from some fruit and different cereals. Previous studies have shown that this compound has antioxidant, anti-apoptosis, and differentiation properties in the nervous system. The aim of this study was to evaluate the effect of ferulic acid on the death of oligodendrocytes and demyelination in male C57B6 / J mice in cuprizone induced animal model of multiple sclerosis.

Material and methods: In this study, demyelination was induced by oral administration of rats with the 0.2% cuprizone that was added to the usual diet during 6 weeks. Animals were fed daily with ferulic acid at doses of 10 or 100 mg / kg of body weight. At the end of the sixth week, the passive avoidance and Y maze test were performed. Then, animal brains were removed and fixed to histological studies using Luxol-Fast-Blue staining

Results: The results of this study showed that ferulic acid reduced the random entry of animals into the arms of the Y maze in compared to the cuprizone treated group [$p < 0.01$], but the sequential entry of animals into the Y maze were significantly increased [$P < 0.05$]. A significant improvement in passive avoidance test was observed in the groups treated with ferulic acid at dose of 10 [$p < 0.05$]. Histological evaluations showed the lower demyelination in Luxol-Fast-Blue in the group treated with ferulic acid.

Conclusion: The results of this study showed that ferulic acid plays a neuroprotective role in cuprizone models of multiple sclerosis through reducing neuronal demyelination and oligodendrocytes death.

Key words: Ferulic acid, Demyelination, Memory, Cuprizone, Mice

Funding: This research was funded by Shahid Sadoughi University of Medical Sciences

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Ghobadi M, Arji roodsari B, Yadegari M, Homayouni-Moghadam F, Rezvani M.E. The Effect of Ferulic Acid on Cognitive Disorder And Brain Structural Deficit in Mice in Cuprizone Induced Animal Model of Multiple Sclerosis. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2017; 16(6): 541-52. [Farsi]

1- MSc in Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2- MSc in Anatomy, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

3- PhD in Anatomy, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

4- PhD in Physiology, Dept. of Cell Biotechnology, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, Isfahan, Iran

5- PhD in Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

(Corresponding Author) Tel: (035)38203411, Fax: (035)38203411, E-mail: erezvani@yahoo.com