

Research Paper

Effect of Sumac Nano-phytosome on Memory and Oxidative Stress in Valproic Acid-induced Rat Model of Autism Spectrum Disorder



\*Akbar Hajizadeh Moghaddam<sup>1</sup>, Haniyeh Abbasalipour<sup>1</sup>, Mojtaba Ranjbar<sup>2</sup>, Sedigheh Khanjani Jelodar<sup>3</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2. Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
3. Faculty of Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.



**Citation** Hajizadeh Moghaddam A, Abbasalipour H, Ranjbar M, Khanjani Jelodar S. Effect of Sumac Nano-phytosome on Memory and Oxidative Stress in Valproic Acid-induced Rat Model of Autism Spectrum Disorder. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2021; 29(4):102-113. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.29.4.950.1>

<https://doi.org/10.32598/JGUMS.29.4.950.1>



Received: 08 Jul 2020

Accepted: 30 Nov 2020

Available Online: 01 Jan 2021

**ABSTRACT**

**Background** Autism Spectrum Disorder (ASD) is an advanced neurological disorder characterized by symptoms such as deficits in social interaction, communication, and cognition. Although sumac fruit contains compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties, its effectiveness is limited due to its low bioavailability.

**Objective** This study aims to investigate the neuroprotective effect of sumac extract and sumac nano-phytosome on memory and oxidative stress in the hippocampal area of ASD rats.

**Materials and Methods** In this experimental study, pregnant female rats were first divided into healthy and patient groups. In the patient group, 500 mg/kg body weight valproic acid was injected intraperitoneally on day 12.5 of pregnancy. Male rats born in the healthy group were further divided into two healthy control and positive control groups, and those in the patient group were divided into two treatment groups of Sumac Extract (n=6) and Sumac Nano-Phytosome (n=6) 21 days after birth. The control groups received only saline, while treatment groups received SE and SNP (40 mg/kg/PO) for 4 weeks. Novel object recognition test was performed to assess recognition memory of rats on day 49 after birth. Finally, Total Antioxidant Capacity (TAC), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Reductase (GRx) and Catalase (CAT) were measured in the hippocampus of rats.

**Results** Valproic acid significantly decreased the discrimination index in novel object recognition test as well as GPx, GRx and CAT, and TAC levels in the hippocampus (P<0.001). Treatment with sumac nano-phytosome significantly improved the memory and the activity of antioxidant enzymes (GPx, GRx and CAT) and TAC (P<0.001).

**Conclusion** Sumac nano-phytosome can improve memory deficits and oxidative stress more compared to sumac extract in ASD rats due to increased bioavailability.

**Keywords:**

Autism, Sumac nano-phytosome, Valproic acid, Oxidative stress, Rat

**\* Corresponding Author:**

Akbar Hajizadeh Moghaddam, PhD.

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

Tel: +98 (11) 35302453

E-Mail: a.hajizadeh@umz.ac.ir

## Extended Abstract

### 1. Introduction

**A**utism Spectrum Disorders (ASD) is an advanced neurological disorder characterized by symptoms such as impaired social interaction, communication, and cognition by the presence of repetitive patterns of behavior [1]. The main cause of this disorder is the interaction between genetic and environmental factors. Several studies have shown the increased oxidative stress in ASD patients that may contribute to the development of this disorder [2]. Although *Rhus Coriaria L.* (Sumac) contains compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties, the therapeutic use of its extract is limited due to its low bioavailability and biological absorption [3, 4]. Various approaches including the use of natural compounds in the form of nanoparticles such as nano-phytosome have been proposed to improve its effectiveness [5]. This study aims to compare the neuroprotective effects of sumac extract and its nano-phytosome form on memory impairment and oxidative stress in the hippocampus of rats with ASD.

### 2. Materials and Methods

In this experimental study, pregnant female rats were divided into healthy and patient groups. In the patient group, 500 mg/kg body weight valproic acid (VPA) was injected intraperitoneally on day 12.5 of pregnancy. Male rats born in the healthy group were further divided into two healthy control and positive control groups, and those in the patient group were divided into two treatment groups of Sumac Extract (SE, n=6) and Sumac Nano-Phytosome (SNP, n=6) 21 days after birth. The control groups received only saline, while treatment groups received SE and SNP (40 mg/kg/PO) for 4 weeks. Novel Object Recognition (NOR) test was performed to assess recognition memory of rats on day 49 after birth. The NOR task was performed in the Plexiglas open box (40×40×60 cm) with sawdust covering the floor. The Discrimination Index (DI) was defined as the difference between the time spent exploring novel and familiar objects and the total exploring time [6]. Finally, total Antioxidant Capacity (TAC), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Reductase (GRx) and Catalase (CAT) levels were measured. The CAT, GPx, GRx, and TAC levels were assessed using the methods proposed by Aebi [7], Rotruck [8], Pinto [9], and Benzie [10], respectively. All statistical analyses were carried out in GraphPad Prism version 8.0.2 software. The data were expressed as Mean±Standard Deviation (SD). Comparisons were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. P<0.05 was considered as the significance level.

### 3. Results

The induction of ASD model resulted in a significant decrease in DI in the patient group compared to the control group (P<0.001). Treatment with SE and SNP significantly increased the DI during NOR test. The levels of CAT, GPx, GRx, and TAC in the patient group were significantly decreased compared to the control group (P<0.001). Treatment with SE significantly increased the levels of CAT (P<0.05), GPx (P<0.001), and GRx (P<0.01), while treatment with SNP significantly increased CAT (P<0.05), GPx (P<0.001), GRx (P<0.01), and TAC (P<0.01) levels.

### 4. Discussion and Conclusion

Under the NOR test, a decrease in the DI was observed in ASD rats, indicating learning and memory impairment. Treatment by SE and SNP increased the DI, where SNP had a higher effect on VAP-induced learning and memory impairment. The results of this study revealed that SNP was more effective than SE. The effect of SNP was significantly higher than that of SE on cognitive function, enzymatic activities, and TAC. Natural products of sumac make treatment of neurodegenerative diseases difficult due to low bioavailability and absorption, caused by poor fat solubility and stability and rapid degradation after intestinal absorption. SNP has greater permeability into neurons in the brain than SE. In agreement with our findings, Nazari et al. reported that nano-phytosome of garlic essential oil increased bioavailability and stability [11]. Khalaj et al. [12] reported that the effect of treatment by nano-hesperetin was higher compared to hesperetin on antioxidant activities and behavioral disorders in ASD rats. Molaveisi et al. [13] reported that oral bioavailability was improved by echinacea extract phytosome developed for oral consumption. In conclusion, SNP has promising effects on neuropathological disorders such as ASD.

### Ethical Considerations

#### Compliance with ethical guidelines

All procedures were according to ethical guidelines for the use of animals in research of the University of Mazandaran (Code: IR.UMZ.REC.1397.021).

#### Funding

This study was supported by the Cognitive Science and Technologies Council of Vice Presidency for Science and Technology (Grant Number: 0786).

#### **Authors' contributions**

Conceptualization, supervision, editing & review: Akbar Hajizadeh Moghaddam; Data collection: Haniyeh Abbasalipour; Data analysis: Mojtaba Ranjbar and Sedigheh Khanjani Jelodar.

#### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest.

#### **Acknowledgements**

The authors would like to thank the Deputy for Research of the University of Mazandaran for their cooperation.

مقاله پژوهشی

اثر نانوفیتوزوم سماق بر اختلالات شناختی و استرس اکسیداتیو القا شده با آلپروئیک اسید در مدل اتیسمی موش صحرایی

\* اکبر حاجی زاده مقدم<sup>۱</sup>، هانیه عباسعلی پور<sup>۱</sup>، مجتبی رنجبر<sup>۲</sup>، صدیقه خانجانی جلودار<sup>۳</sup>

۱. گروه زیست جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
۲. دانشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
۳. گروه زیست جانوری، دانشکده علوم و زیست فناوری، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۸ تیر ۱۳۹۹  
تاریخ پذیرش: ۱۰ آذر ۱۳۹۹  
تاریخ انتشار: ۱۲ دی ۱۳۹۹

**زمینه:** اختلالات طیف اتیسم گستره وسیعی از اختلالات عصبی پیشرفته را نشان می‌دهد که با علائم گسترده‌ای شامل نقص تعامل اجتماعی، ارتباطات و نقص‌های شناختی مشخص می‌شوند. اگرچه میوه سماق حاوی ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است، به دلیل پایین بودن دسترسی زیستی و فراهمی زیستی کارایی آن محدود است.

**هدف:** هدف از این پژوهش بررسی اثر حفاظت نورونی سماق و نانوفیتوزوم سماق بر اختلال حافظه و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در ناحیه هیپوکامپ مغز موش‌های مدل اتیسمی است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، موش‌های ماده باردار به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند. در گروه آزمایش اسید آلپروئیک (VPA) با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روز ۱۲/۵ حاملگی به صورت درون‌صفافی تزریق شد. نوزادان نر هر دو گروه ۲۱ روز بعد از تولد تقسیم‌بندی شدند. حیوانات سالم به دو گروه کنترل سالمین و کنترل نانوفیتوزوم سماق تقسیم شدند که به ترتیب سالمین و نانوفیتوزوم عصاره سماق (SNP) را با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت چهار هفته به صورت گاوژ دریافت کردند. همچنین نوزادان گروه آزمایش نیز به سه گروه آزمایش، آزمایش تیمار شده با عصاره سماق (SE) و آزمایش تیمار شده با نانوفیتوزوم عصاره سماق تقسیم شدند که به ترتیب سالمین، عصاره سماق و نانوفیتوزوم سماق را با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت چهار هفته به صورت خوراکی دریافت کردند. برای ارزیابی حافظه، آزمون شناسایی شیء جدید ۴۹ روز پس از تولد انجام شد. در پایان سطح آنتی‌اکسیدان تام (TAC) و فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPX)، گلوکوتاتیون ردوکتاز (GRX) و کاتالاز (CAT) در ناحیه هیپوکامپ اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج ماه اسید آلپروئیک به طور قابل توجهی ( $P > 0.001$ ) سبب کاهش شاخص تبعیض در آزمون تشخیص شیء جدید، فعالیت آنزیم‌های GPX، GRX و CAT و سطح TAC در هیپوکامپ شد. تیمار با نانوفیتوزوم سماق به طور معنی‌داری ( $P < 0.001$ ) باعث بهبود اختلال رفتاری و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (GPX، GRX و CAT) و سطح آنتی‌اکسیدان TAC شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که نانوفیتوزوم سماق در مقایسه با عصاره میوه سماق به دلیل افزایش فراهمی زیستی باعث بهبود مؤثرتر نقص حافظه و استرس اکسیداتیو در موش‌های مدل اتیسمی می‌شود.

کلیدواژه‌ها:

اتیسم، نانوفیتوزوم سماق، آلپروئیک اسید، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی نر

مقدمه

اتیسم اختلال تکوین عصبی است که با اختلال رفتارهای ارتباطی، کلامی و یادگیری همراه است. این اختلال که در سه سال اول زندگی ظاهر می‌شود و با شیوع بالای یک در هر ۶۸ نفر یکی از شایع‌ترین اختلالات روان‌پزشکی به شمار می‌آید. شیوع این اختلال در پسران بیشتر از دختران است. به علت طیف وسیع

علائم این بیماری به آن اختلال طیف اتیسم<sup>۱</sup> گفته می‌شود. علت عمده بروز این اختلال تعامل بین فاکتورهای ژنتیکی و محیطی است [۱، ۲].

هیپوکامپ یکی از نواحی مغز است که عملکردش در

1. Autism Spectrum Disorder (ASD)

\* نویسنده مسئول:

اکبر حاجی زاده مقدم

نشانی: بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست جانوری.

تلفن: ۳۵۲۰۲۴۵۳ (۱۱) ۰۹۸+

رایانامه: a.hajzadeh@umz.ac.ir

و فرم نانوفیتوزوم آن بر اختلال یادگیری و استرس اکسیدانی هیپوکامپ موش‌هایی است که در دوران بارداری در معرض VPA قرار گرفتند.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی ماده باردار نژاد ویستار از پژوهشکده انستیتو پاستور آمل خریداری شدند و در اتاق حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی گروه علوم جانوری دانشگاه مازندران نگه‌داری شدند. غذای مخصوص حیوانات به میزان کافی در دسترس بود. موش‌های نر و ماده به مدت ۲۴ ساعت برای آمیزش در کنار هم قرار گرفتند. روز اول بارداری بعد از مشاهده پلاک واژینال در نظر گرفته شد. ابتدا موش‌های ماده باردار به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند. موش‌های باردار گروه آزمایش ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن والپروئیک اسید (سیگما، آمریکا) را در روز ۱۲/۵ بارداری به صورت درون‌صفاقی دریافت کردند و موش‌های باردار گروه کنترل در همان روز سالیین دریافت کردند. در ادامه موش‌های نر متولد شده از مادران گروه کنترل، به دو گروه کنترل سالم و کنترل مثبت تقسیم شدند که ۲۱ روز بعد از تولد به ترتیب سالیین و نانوفیتوزوم عصاره سماق با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به مدت چهار هفته به صورت گاوژ دریافت کردند. همچنین موش‌های نر متولد شده از گروه آزمایش نیز ۲۱ روز بعد از تولد به سه گروه آزمایش، آزمایش تیمار شده با عصاره سماق<sup>۴</sup> و آزمایش تیمار شده با نانوفیتوزوم عصاره سماق<sup>۵</sup> تقسیم شدند. عصاره سماق و نانوفیتوزوم آن با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت چهار هفته به صورت خوراکی دریافت کردند. در تمامی گروه‌ها از ۶ سر موش صحرایی نر استفاده شده است.

### روش تهیه نانوفیتوزوم سماق

میوه سماق<sup>۶</sup> از منطقه لاریجان آمل (مازندران) جمع‌آوری شد و در گروه علوم گیاهی دانشگاه مازندران از نظر علمی با کد هرباریومی ۱۱۵۲۶ تأیید شد. میوه‌ها به مدت ۲ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و پودر شدند. سپس مقدار ۱۰۰ گرم از پودر میوه با ۲۰۰ سی‌سی اتانول (۹۶ درصد) به مدت ۳ روز در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شد. در پایان از طریق کاغذ صافی فیلتر و با استفاده از دستگاه روتاری، الکل عصاره حذف شد. عصاره نهایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد. نانوفیتوزوم سماق به روش اتانولی تهیه شده است [۱۲].

به طور خلاصه عصاره سماق در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد در ۳ گرم فسفاتیدیل کولین و ۲/۱۶ گرم توپین ۸۰ حل شده و سپس محلول فوق همراه با ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به بافر

بیماری اُتیسم دچار آسیب می‌شود. مطالعات متعددی نشان داد که اختلال یادگیری، حافظه، زبان و عملکرد شناختی از جمله مشکلات افراد اُتیسمی است که احتمالاً ناشی از نقص در عملکرد ناحیه هیپوکامپ است [۳]. برای بررسی اختلالات طیف اُتیسم از مدل‌های حیوانی متعددی استفاده می‌شود. از متداول‌ترین روش‌های القا مدل حیوانی اُتیسم، تزریق والپروئیک اسید<sup>۲</sup> در دوران بارداری است. امروزه مطالعات گسترده نشان داده‌اند که تزریق والپروئیک اسید در دوران بارداری می‌تواند سبب القا اختلال شبه‌اُتیسمی شود. والپروئیک اسید با نام‌های تجاری دپاکین و والپاکین از داروهای ضدصرع و ضد تشنج است. والپروئیک اسید از طریق کاهش سطح گلووتامین احیاء شده، افزایش گونه اکسیژن فعال و غیرفعال‌سازی میتوکندری سبب افزایش استرس اکسیداتیو و التهابی در سیستم عصبی می‌شود [۴، ۵].

عدم تعادل میان گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۳</sup> و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌های عصبی از جمله اُتیسم دارد. کنش رادیکال‌های آزاد با ترکیبات لیپیدی، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها منجر به تغییر ساختار آن‌ها و نهایتاً اختلال عملکرد میتوکندریایی و مرگ برنامه‌ریزی‌شده نورون‌ها می‌شود. در مراحل اولیه تکوین سیستم عصبی، نورون‌ها به استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر هستند، به طوری که منجر به بروز اختلالات رفتاری از جمله نقص شناختی، افسردگی، اضطراب در بیماری اسکیزوفرنی و اُتیسم می‌شود [۶، ۷].

اگرچه درمان قطعی بیماری اُتیسم تاکنون دقیقاً مشخص نشده است اما استفاده از ترکیبات دارویی طبیعی می‌تواند تا حدودی علائم بیماری را، بدون ظهور عوارض جانبی، کاهش دهد. امروزه به دلیل اثرات سوء داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی با اقبال بیشتری مواجه شده است.

میوه سماق به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و آنتی‌باکتریایی در طب سنتی گیاهی برای درمان بیماری دیابت، سکت، سرطان و بیماری‌های عصبی شناخته شده است. عصاره میوه این گیاه غنی از تانین، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها مانند گالیک اسید، متیل گالات، کوئرستین و آنتوسیانین و اسید چرب است [۷-۹]. علی‌رغم اثرات دارویی فراوان، کاربرد درمانی عصاره میوه سماق به دلیل جذب و دسترسی زیستی اندک با محدودیت روبه‌رو است. در سال‌های اخیر برای افزایش کارایی و اثربخشی گیاهان دارویی رویکرد مختلفی از قبیل استفاده از ترکیبات طبیعی به فرم نانو و حامل‌های دارویی همچون لیپوزوم و فیتوزوم مدنظر محققین قرار گرفته [۱۰]. نانوفیتوزوم از جمله نانوحامل دارویی نوین است که در سیستم انتقال دارو استفاده می‌شود [۱۱]. هدف ما از این مطالعه بررسی اثرات عصاره میوه سماق

4. Sumac Extract (SE)

5. Sumac Nanophytosome (SNP)

6. R. coriaria

2. Valproic Acid (VPA)

3. Reactive Oxygen Species (ROS)

مولار، گلوکاتایون کاهیده ۴ میلی مولار، سدیم فسفات ۰/۴ مولار با pH=7 که ۰/۴ میلی مولار EDTA و ۰/۱ میلی مولار NADPH در آن حل شده است. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول رویی بافت هموزن شده به مخلوط واکنش اضافه شد و اجازه داده شد به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شود و در نهایت پراکسید هیدروژن ۴ میلی مولار به مخلوط اضافه شد و جذب محلول در طول موج ۳۴۰ نانومتر و به مدت ۲ دقیقه خوانده شد [۱۶]. فعالیت آنزیم گلوکاتایونردوکتاز<sup>۱</sup> به روش رومرو و براساس اکسیداسیون NADPH محاسبه شد [۱۷]. مخلوط واکنش حاوی بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با pH=7 به همراه ۲/۵ میلی مولار GSSG و ۰/۱ میلی مولار NADPH است. سپس ۶۰ میکرولیتر محلول رویی از بافت هموزن شده و ۷۴۰ میکرولیتر محلول واکنش اضافه شد. تغییرات جذب نوری مربوط به فعالیت این آنزیم در طول موج ۳۴۰ نانومتر و طی ۳ دقیقه اندازه گیری شد.

#### سنجش سطح آنتی اکسیدان تام

برای سنجش سطح آنتی اکسیدان تام (TAC) ۵۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۱/۵ میلی لیتر معرف FRAP افزوده شد و بعد از ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه بن ماری، در طول موج ۵۹۳ نانومتر جذب اندازه گیری شد. برای صفر کردن دستگاه از مخلوط ۲۰ میکرولیتر آب مقطر در ۱/۵ میلی لیتر محلول FRAP، به عنوان بلانک، استفاده شد. با استفاده از منحنی استانداردها و معادله خط به دست آمده از FeSO<sub>4</sub> غلظت آنتی اکسیدان تام نمونه ها محاسبه شد. غلظت آنتی اکسیدان بر حسب  $\mu\text{M/g Tissue}$  گزارش شد [۱۸].

#### آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه بین گروه ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه<sup>۱</sup> و در صورت معنی دار شدن از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و Prism نسخه ۸ انجام شده و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Prism استفاده شد.

#### نتایج

بررسی اثر عصاره سماق و نانو فیتوزوم سماق بر شاخص تبعیض در آزمون شناسایی شی جدید

نتایج آزمون شناسایی شی جدید نشان داد که شاخص تبعیض در گروه بیمار کاهش معنی دار ( $P > 0.001$ ) یافت. این شاخص در گروه آزمایش تیمار شده با غلظت ۴۰ میلی گرم بر کیلو گرم سماق نسبت به گروه آزمایش معنی داری ( $P > 0.001$ ) نشان داده است؛ همچنین شاخص تبعیض در گروه آزمایش تیمار شده با نانو فیتوزوم سماق با دوز ۴۰ میلی گرم به کیلو گرم نیز افزایش معنی داری

هیدراتاسیون (محلول بافر فسفات ۰/۰۱ مولار، ۱۵۰ میلی مولار NaCl، pH 4.7) در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد اضافه شد. برای حذف اتانول، محلول نهایی با همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه درون حمام آب در تبخیر کننده روتاری در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در پایان برای تشکیل نانوفیتوزوم و تولید ذرات کوچک تر از صد نانومتر، محلول نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

#### تست شناسایی شیء جدید

آزمون شناسایی شی جدید برای ارزیابی میزان اختلال حافظه انجام شد. این آزمون شامل سه مرحله است. مرحله اول (عادت) در مدت ۳ تا ۵ دقیقه انجام شد. در مرحله دوم یا مرحله آموزش دو شی کاملاً یکسان در کف اتاقک قرار گرفت و موش به مدت ۱۰ دقیقه در اتاقک به صورت آزادانه قرار داده شد. در مرحله سوم که مرحله آزمون حافظه حیوان است، شی جدیدی که از نظر مورفولوژی متفاوت با دو شی قبلی بود، جایگزین یکی از اشیا شده و موش به مدت ۵ دقیقه در اتاقک قرار گرفت. در پایان با تقسیم زمان بررسی شی جدید بر مجموع مدت زمان بررسی شی آشنا و جدید، شاخص زمانی تشخیص شیء جدید محاسبه شد [۱۳].

#### نمونه برداری

پس از ارزیابی اختلالات شناختی، حیوانات با کلروفورم بی هوش شدند و برای خارج شدن خون از بدن رپر فیوژن قلبی انجام شد. در ادامه به کمک ماتریکس مغزی ناحیه هیپوکامپ جدا شده و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت. بافت هموزن شده هیپوکامپ با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴+ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول شفاف رویی آن برای سنجش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی استفاده شد.

#### تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد

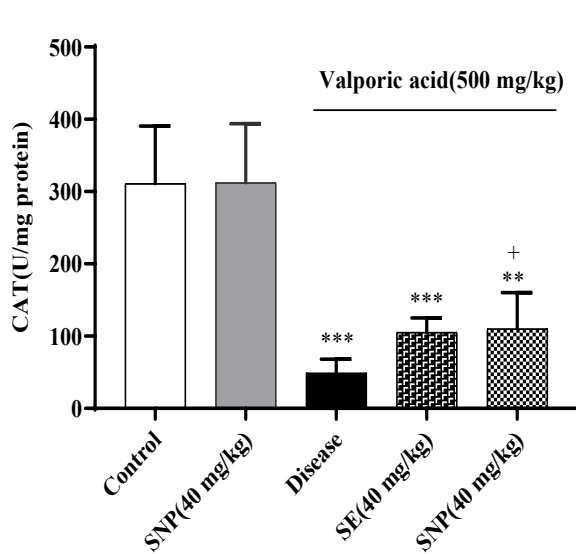
برای تعیین غلظت پروتئین نمونه ها از روش برادفورد استفاده شد و جذب هر نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. هر چه غلظت پروتئین حل شده بیشتر باشد، میزان رنگ آبی حاصل و جذب نوری آن افزایش می یابد [۱۴].

#### سنجش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز<sup>۲</sup> از روش ایبی استفاده شد [۱۵]. محلول نهایی واکنش شامل بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار در pH=7 است که حاوی ۱۰ میلی مولار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> است. ۶۰ میکرولیتر از محلول رویی بافت هیپوکامپ هموزن شده به ۷۴۰ میکرولیتر مخلوط واکنش اضافه شد. جذب محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد خوانده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز<sup>۳</sup> در هر نمونه از مخلوط واکنشی که شامل سدیم آزید ۵ میلی-

9. Glutathione Reductase (GRx)  
10. ANOVA

7. Catalase (CAT)  
8. Glutathione Peroxidase (GPx)

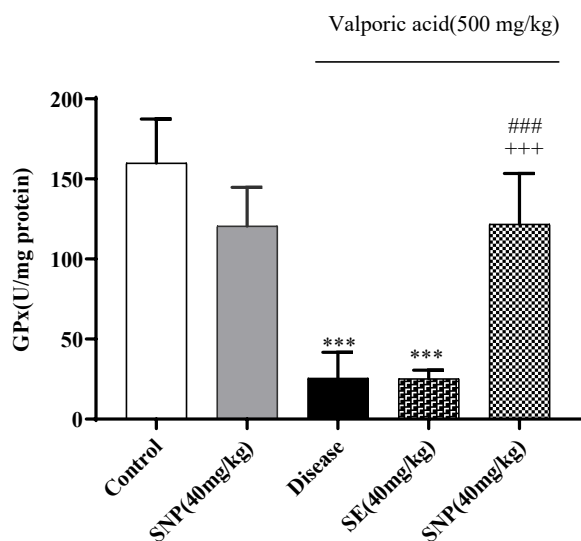


مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۲. بررسی اثر عصاره سماق و نانوفیتوزوم سماق بر فعالیت آنزیم کاتالاز در هیپوکامپ (Mean±SEM و n=6). عصاره میوه سماق: SE و نانو فیتوزوم سماق: SNP.  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه بیمار.

بررسی اثر عصاره سماق و نانو فیتوزوم سماق بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

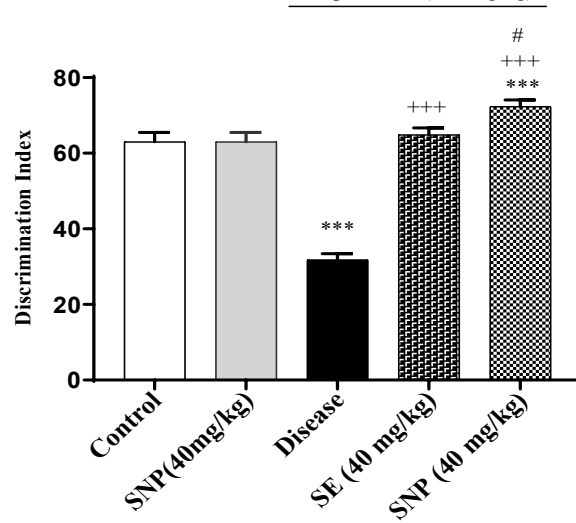
با توجه به تصویر شماره ۲، فعالیت آنزیم کاتالاز هیپوکامپی در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۴. بررسی اثر عصاره سماق و نانوفیتوزوم سماق بر فعالیت گلوکاتیون پراکسیداز در هیپوکامپ مغز (n=6, Mean±SEM). عصاره میوه سماق: SE و نانو فیتوزوم سماق: SNP.  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه آزمایش و  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه SE.

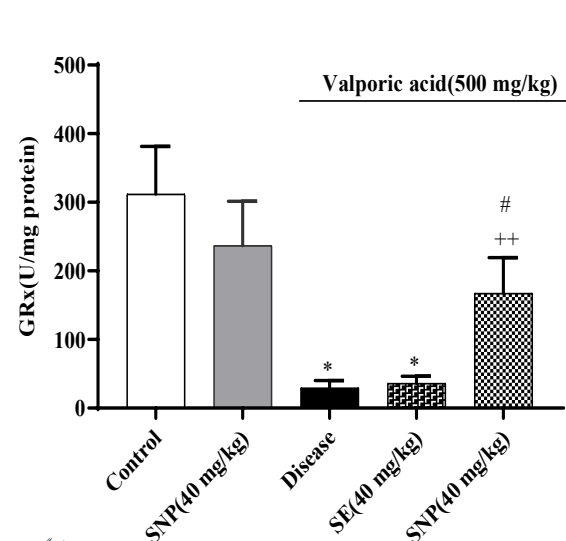
Valporic acid(500 mg/kg)



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

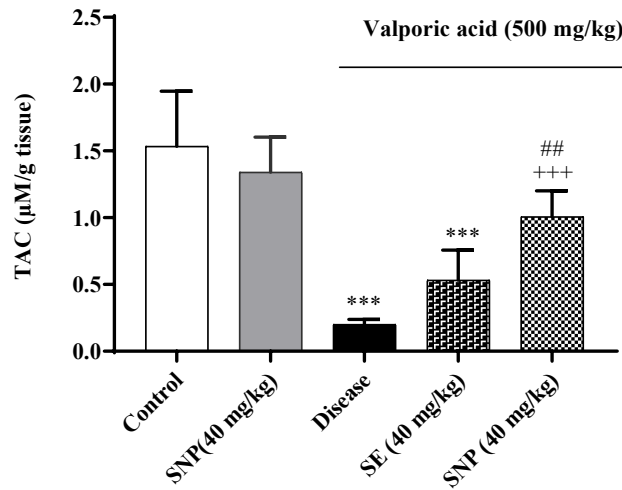
تصویر ۱. بررسی اثر عصاره سماق و نانوفیتوزوم سماق بر مدت زمان صرف‌شده برای شی جدید (Mean±SEM و n=6). عصاره میوه سماق: SE و نانو فیتوزوم سماق: SNP.  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه آزمایش و  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه SE.

( $P > 0.001$ ) نسبت به گروه آزمایش نشان داد و افزایش این شاخص در گروه تیمار شده با نانوفیتوزوم در مقایسه با گروه تیمار شده با عصاره سماق نیز چشمگیر بود ( $P > 0.05$ ) (تصویر شماره ۱).



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۳. بررسی اثر عصاره سماق و نانوفیتوزوم سماق بر فعالیت گلوکاتیون ردوکتاز در هیپوکامپ (n=6, Mean±SEM). عصاره میوه سماق: SE و نانو فیتوزوم سماق: SNP.  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه آزمایش و  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه SE.



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۵. بررسی اثر عصاره سماق و نانوفیتوزوم سماق بر سطح آنتی‌اکسیدان تام در هیپوکامپ مغز موش مدل اُتیسیم (n=6 Mean±SEM) عصاره میوه سماق: SE و نانو فیتوزوم سماق: SNP. P<0/001\*\*\* در مقایسه با گروه کنترل، P<0/001\*\*\* در مقایسه با گروه بیمار و P<0/001\*\*\* در مقایسه با گروه SE40.

### بحث و نتیجه گیری

اُتیسیم طیفی از اختلالات عصبی است که با اختلال در ارتباطات، حافظه و عملکرد شناختی همراه است. مطالعات قبلی نشان داده است که برهم کنش‌های ژنتیکی و محیطی در طی مراحل تکوین سیستم عصبی در بروز این اختلال مؤثر است [۱۹]. مصرف داروی ضدصرع والپروئیک اسید در اوایل دوران بارداری به عنوان یکی از فاکتورهای محیطی احتمال بروز اُتیسیم را در فرزندان افزایش می‌دهد. مطالعات متعددی نشان داده است که قرار گرفتن در معرض VPA در طول دوران بارداری در رت‌های نژاد ویستار سبب القا مدل اُتیسیم می‌شود [۲۰]. مطالعات نشان داده است یکی از مناطق درگیر در اُتیسیم ناحیه هیپوکامپ است [۴]. در مطالعه حاضر داده‌های آزمون رفتاری شناسایی شی جدید نشان داد که تزریق VPA در دوران بارداری موجب کاهش شاخص تبعیض می‌شود و این نتایج در راستای تأیید گزارش‌ها و همکاران است [۱۶]. مطالعه نیکولینی و همکاران نیز نشان داد تزریق VPA سبب القای رفتارهای شبه‌اُتیسیمی در جوندگان می‌شود [۲۱].

نتایج بیوشیمیایی پژوهش ما حاکی از آن است که تزریق VPA در دوران بارداری موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون پراکسیداز و همچنین باعث کاهش تغییرات سطوح آنتی‌اکسیدان تام در ناحیه هیپوکامپ مغز شده است. افزایش استرس اکسیداتیو در مغز افراد مبتلا به اُتیسیم عامل مهمی در پاتوفیزیولوژی اُتیسیم است. در پژوهش قبلی القای رفتارهای شبه‌اُتیسیمی ناشی از تزریق VPA و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است [۲۲]. پراگنیا و همکاران نشان دادند تزریق VPA موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود [۲۳]. گائو و همکارانش نیز

را نشان داده است و تنها تیمار با نانوفیتوزوم سماق (P>0/001) سبب افزایش معنی‌دار (P>0/05) فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه آزمایش شد. بر اساس تصویر شماره ۳، فعالیت آنزیم GRX در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار (P<0/05) داشته است. این در حالی است که فعالیت این آنزیم در گروه SNP نسبت به گروه آزمایش افزایش معنی‌دار (P>0/001) نشان داد. همچنین سطح فعالیت این آنزیم در گروه SNP نسبت به گروه SE نیز افزایش معنی‌داری نشان داده است (P>0/05).

با توجه به تصویر شماره ۴، فعالیت آنزیم GPX هیپوکامپ در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری (P>0/001) نشان داده است. تیمار با عصاره میوه سماق با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (SE40) بر فعالیت این آنزیم تأثیری ندارد و گروه آزمایش تیمار شده با SE کاهش معنی‌داری (P>0/001) در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. در حالی که فعالیت آنزیم GPX در گروه تیمار شده با SNP در مقایسه با گروه آزمایش افزایش معنی‌داری (P>0/001) نشان داد، به طوری که در گروه SNP40 نسبت به SE نیز افزایش معنی‌دار (P>0/001) مشاهده شد.

### بررسی اثر عصاره سماق و نانوفیتوزوم سماق بر سطح فعالیت آنتی‌اکسیدان تام

تصویر شماره ۵ نشان می‌دهد که سطح آنتی‌اکسیدان تام هیپوکامپ بین گروه کنترل و کنترل مثبت اختلاف معنی‌داری وجود ندارد اما در گروه آزمایش کاهش معنی‌دار (P>0/001) نسبت به گروه کنترل نشان داده است. این در حالی است که تنها تیمار با SNP سبب افزایش معنی‌دار (P>0/001) سطح آنتی‌اکسیدان تام نسبت به گروه آزمایش شده است. همچنین در گروه SNP نسبت به گروه SE نیز افزایش معنی‌داری (P>0/001) مشاهده شد.



همچون قابلیت زیستی و جذب پایین که ناشی از حل پذیری ضعیف در چربی و اندازه بزرگ آن هاست، درمان را تا حدودی دچار مشکل می کند [۷]. تکنولوژی نانو با افزایش قابلیت زیستی و جذب روده ای روش جدیدی برای حل این مشکل است. در میان ساختارهای مختلف نانوحامل، فیتوزوم کارآمدترین شکل نانوحامل است [۲۷].

در نتایج تحقیق حاضر اثرات بهبودی نانوفیتوزوم سماق با غلظت ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه دریافت کننده عصاره سماق با غلظت مشابه چشمگیرتر بود. به طوری که در شاخص تبعیض نسبت گروه سماق افزایش معنی داری مشاهده شد. بررسی مقایسه ای شاخص های آنژیومی و غیر آنژیومی آنتی اکسیدانی هیپوکامپ بیانگر اثرات بارز ساختار نانوفیتوزومی سماق با غلظت ۴۰ در مقایسه با عصاره با همین غلظت است. در همین راستا، مشاهده شد که نانوفیتوزوم سماق با خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و محافظ نرونی خود موجب افزایش معنی دار فعالیت آنژیومی آنتی اکسیدانی و سطح آنتی اکسیدان تام و بهبود رفتار یادگیری در رت های مدل اوتیستیک شده است. نانوفیتوزوم سماق احتمالاً با خاصیت آنتی اکسیدانی خود سبب حفاظت نرونی شده و از این رو توانسته است اثر مخرب VPA را در هیپوکامپ موش های آتیسمی مهار کند.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

در این مطالعه تمامی مراحل کار با حیوان آزمایشگاهی مطابق با منشور اخلاق زیستی دانشگاه مازندران با کد اخلاقی IR.UMZ. REC.1397.021 انجام شد.

#### حامی مالی

این مطالعه با حمایت مالی ستاد توسعه علوم و فناوری های شناختی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام گرفته است (طرح شماره: ۰۷۸۶).

#### مشارکت نویسندگان

مفهوم سازی، نظارت، ویراستاری و نهایی سازی نوشته: اکبر حاجی زاده مقدم؛ جمع آوری داده ها: هانیه عباسعلی پور، آنالیز و بررسی داده ها: صدیقه خانجانی جلودار و مجتبی رنجبر.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

گزارش کردند که تزریق VPA به موش های ماده باردار سبب کاهش فعالیت آنژیومی آنتی اکسیدانی در زاده ها می شود [۲۴].

از آنجایی که مطالعات متعدد نشان می دهد سطوح ترکیبات آنتی اکسیدانی در افراد مبتلا به آتیسم تغییر می کند، بنابراین اختلال در مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی نقش مهمی در بروز اختلال آتیسمی ایفا می کنند [۲۵]. علاوه بر این آنژیومی آنتی اکسیدانی از جمله GP-X مانع از آسیب رساندن سوپراکسیدها به DNA می شوند. GSH آنتی اکسیدان اندوژنی است که توسط سلول ها تولید می شود و نقش مهمی در خنثی کردن ROS، سم زدایی و حذف سموم زیست محیطی ایفا می کند. افزایش استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ افراد مبتلا به آتیسم نشان می دهد که استرس اکسیداتیو ممکن است عامل مهمی در پاتوفیزیولوژی آتیسم باشد [۲۶].

در این مطالعه اثر حفاظتی سماق و نانوفیتوزوم آن بر شاخص رفتار شناختی و همچنین بر میزان سطح آنتی اکسیدان تام و فعالیت آنژیومی آنتی اکسیدانی بافت هیپوکامپ در فرزندان آتیسمی که مادران آن ها در دوره بارداری در معرض VPA قرار گرفتند، بررسی شد. نتایج داده های رفتاری این پژوهش نشان داد که مصرف سماق و نانوفیتوزوم سماق سبب بهبود رفتارهای شناختی در فرزندان آتیسمی می شود. بررسی شاخص های آنتی اکسیدانی هیپوکامپ نشان داد که نانوفیتوزوم سماق موجب افزایش فعالیت آنژیومی آنتی اکسیدان، گلوکاتیون پراکسیداز، گلوکاتیون ردوکتاز و سطح آنتی اکسیدان تام می شود. همچنین نتایج این پژوهش حاکی از آن است که نانوفیتوزوم سماق احتمالاً به واسطه قابلیت زیستی بالاتر و جذب بهتر در لوله گوارش نسبت به عصاره خام سماق سبب بهبود اختلال شناختی و استرس اکسیداتیو هیپوکامپی القاشده با VPA در مدل آتیسم می شود.

آنتی اکسیدان ها نقش مهمی در کنترل یا درمان اختلالات تحلیل عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون، سکته و آتیسم ایفا می کنند. سماق نیز با روش های مختلفی به فعالیت آنتی اکسیدانی کمک می کند. مطالعات اخیر حضور آنتی اکسیدان های گوناگون شامل اسید گالیک، فنول ها و اسیدهای چرب را در سماق ثابت کرده اند [۱۵]. آنتوسیانین و تانن های هیدرولیز شده در سماق از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می کند. علاوه بر این گالیک اسید موجود در سماق از آسیب DNA در برابر ROS محافظت می کند و نیز رادیکال هیدروکسیل را مهار می کند [۷].

استرس اکسیداتیو منجر به افزایش  $H_2O_2$  و ROS می شود که ROS سبب پراکسیداسیون لیپید و آسیب سلولی و آسیب به DNA می شود. بنابراین درمان با سماق موجب کاهش  $H_2O_2$  می شود و در نتیجه می تواند از پراکسیداسیون لیپید و آسیب به DNA جلوگیری کند و نیز گالیک اسید موجود در سماق از DNA در برابر ROS محافظت می کند [۱۵]. هر چند سماق در درمان بیماری های مختلف استفاده می شود اما به دلیل داشتن مشکلاتی

## References

- [1] Meguid NA, Dardir AA, Abdel-Raouf ER, Hashish A. Evaluation of oxidative stress in autism: Defective antioxidant enzymes and increased lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research*. 2011; 143(1):58-65. [DOI:10.1007/s12011-010-8840-9] [PMID]
- [2] Mousavinejad E, Ghaffari MA, Riahi F, Hajmohammadi M, Tiznobeyk Z, Mousavinejad M. Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activity in children with Autism Spectrum Disorders. *Psychiatry Research*. 2018; 265:62-9. [DOI:10.1016/j.psychres.2018.03.061] [PMID]
- [3] Cheaha D, Bumrungsri S, Chatpun S, Kumarnsit E. Characterization of in utero valproic acid mouse model of autism by local field potential in the hippocampus and the olfactory bulb. *Neuroscience Research*. 2015; 98:28-34. [DOI:10.1016/j.neures.2015.04.006] [PMID]
- [4] Silvestrin RB, Bambini-Junior V, Galland F, Bobermim LD, Quincozes-Santos A, Abib RT, et al. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Research*. 2013; 1495:52-60. [DOI:10.1016/j.brainres.2012.11.048] [PMID]
- [5] Kumaravel P, Melchias G, Vasanth N, Manivasagam T. Epigallocatechin gallate attenuates behavioral defects in sodium valproate induced autism rat model. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2017; 10:1477-80. [DOI:10.5958/0974-360X.2017.00260.8]
- [6] Fontella FU, Siqueira IR, Vasconcellos AP, Tabajara AS, Netto CA, Dalmaz C. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochemical Research*. 2005; 30(1):105-11. [DOI:10.1007/s11064-004-9691-6] [PMID]
- [7] Sağlam M, Köseoğlu S, Hatipoğlu M, Esen HH, Köksal E. Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of Applied Oral Science*. 2015; 23(1):33-41. [DOI:10.1590/1678-775720140288] [PMID] [PMCID]
- [8] Rajan VK, Muraleedharan K. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. *Food Chemistry*. 2017; 220:93-9. [DOI:10.1016/j.foodchem.2016.09.178] [PMID]
- [9] Peng Y, Zhang H, Liu R, Mine Y, McCallum J, Kirby C, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of pyranoanthocyanins and other polyphenols from staghorn sumac (*Rhus hirta* L.) in Caco-2 cell models. *Journal of Functional Foods*. 2016; 20:139-47. [DOI:10.1016/j.jff.2015.10.026]
- [10] Riaz H, Raza SA, Aslam MS, Ahmad MS, Ahmad MA, Maria P. An updated review of pharmacological, standardization methods and formulation development of rutin. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018; 12:127-32. [DOI:10.22207/JPAM.12.1.16]
- [11] Karimi N, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Keyvani F, Peshki A, Gholian MM. [Phytosome and liposome: The beneficial encapsulation systems in drug delivery and food application (Persian)]. *Applied Food Biotechnology*. 2015; 2(3), 17-27. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=466705>
- [12] Shin GH, Chung SK, Kim JT, Joung HJ, Park HJ. Preparation of chitosan-coated nanoliposomes for improving the mucoadhesive property of curcumin using the ethanol injection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61(46):11119-26. [DOI:10.1021/jf4035404] [PMID]
- [13] Zavvari F, Karimzadeh F. A review on the behavioral tests for learning and memory assessments in rat. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2017; 5(4):110-24. [DOI:10.18869/acadpub.shefa.5.4.110]
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1-2):248-54. [DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3]
- [15] Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984; 105:121-6. [DOI:10.1016/S0076-6879(84)05016-3]
- [16] Hara Y, Ago Y, Higuchi M, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, et al. Oxytocin attenuates deficits in social interaction but not recognition memory in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. *Hormones and Behavior*. 2017; 96:130-6. [DOI:10.1016/j.yhbeh.2017.09.013] [PMID]
- [17] Pinto RE, Bartley W. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochemical Journal*. 1969; 112(1):109-15. [DOI:10.1042/bj1120109] [PMID] [PMCID]
- [18] Benzie IF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239(1):70-6. [DOI:10.1006/abio.1996.0292] [PMID]
- [19] Wei H, Alberts I, Li X. The apoptotic perspective of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2014; 36:13-8. [DOI:10.1016/j.ijdevneu.2014.04.004] [PMID]
- [20] Cezar LC, Kirsten TB, da Fonseca CC, de Lima AP, Bernardi MM, Felicio LF. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018; 84:173-80. [DOI:10.1016/j.pnpbp.2018.02.008] [PMID]
- [21] Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*. 2018; 299:217-27. [DOI:10.1016/j.expneurol.2017.04.017] [PMID]
- [22] Khalaj R, Moghaddam AH, Zare M. Hesperetin and its nanocrystals ameliorate social behavior deficits and oxido-inflammatory stress in rat model of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2018; 69:80-7. [DOI:10.1016/j.ijdevneu.2018.06.009] [PMID]
- [23] Pragnya B, Kameshwari JS, Veeresh B. Ameliorating effect of piperine on behavioral abnormalities and oxidative markers in sodium valproate induced autism in BALB/C mice. *Behavioural Brain Research*. 2014; 270:86-94. [DOI:10.1016/j.bbr.2014.04.045] [PMID]
- [24] Gao J, Wang X, Sun H, Cao Y, Liang S, Wang H, et al. Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid-induced rat autism model. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2016; 49:67-78. [DOI:10.1016/j.ijdevneu.2015.11.006] [PMID]

- [25] Chakraborty A, Ferk F, Simić T, Brantner A, Dušinská M, Kundi M, et al. DNA-protective effects of sumach (*Rhus coriaria* L.), a common spice: Results of human and animal studies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009; 661(1-2):10-7. [DOI:10.1016/j.mrfmm.2008.10.009] [PMID]
- [26] Al-Amin MM, Rahman MM, Khan FR, Zaman F, Reza HM. Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism. *Behavioural Brain Research*. 2015; 286:112-21. [DOI:10.1016/j.bbr.2015.02.041] [PMID]
- [27] Shivanand P, Kinjal P. Phytosomes: Technical revolution in phytomedicine. *International Journal of PharmTech Research*. 2010; 2(1):627-31. [https://www.researchgate.net/publication/266065880\\_Phytosomes\\_Technical\\_Revolution\\_in\\_Phytomedicine](https://www.researchgate.net/publication/266065880_Phytosomes_Technical_Revolution_in_Phytomedicine)
- [28] Nazari M, Ghanbarzadeh B, Kafil HS, Zeinali M, Hamishehkar H. Garlic essential oil nanophytosomes as a natural food preservative: Its application in yogurt as food model. *Colloid and Interface Science Communications*. 2019; 30:100176. [DOI:10.1016/j.colcom.2019.100176]

This Page Intentionally Left Blank

---