مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v14i4.2310

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تجویز آبستاتین بر بهبود اضطراب، مرگ سلولی نکروز و آپوپتوزیس در ناحیه هیپوکامپ در مدل سندرم جنین الکلی در موش‌های صحرایی نر

آزاده طوسی[۱]، هومن شجیعی[۲]، مهدی خاکساری*[۳]، ویدا حجتی[۴]، غلامحسن واعظی[۵]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی- گروه زیست‌شناسی- واحد دامغان- دانشگاه آزاد اسلامی- دامغان- ایران.
۲- استادیار-گروه زیست‌شناسی- واحد دامغان- دانشگاه آزاد اسلامی- دامغان- ایران.
۳- دانشیار- گروه فیزیولوژی- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- شاهرود- ایران
۴- استادیار- گروه زیست‌شناسی- واحد دامغان- دانشگاه آزاد اسلامی- دامغان- ایران.
۵- استاد- گروه زیست‌شناسی- واحد دامغان- دانشگاه آزاد اسلامی- دامغان- ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۰۸، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۱۱/۰۸

چکیده

مقدمه: *ازجمله عواقب بی‌شمار مواجهه با الکل در دوران بارداری افزایش رفتارهایی مانند اضطراب است که می‌تواند باعث کاهش در عملکرد روزانه شود. شواهد بالینی و تجربی نشان داده است که قرار گرفتن در معرض الکل پس از تولد باعث التهاب در هیپوکامپ و کاهش نورون‌زایی در بین سایر مناطق مغزی می‌شود. این قضیه می‌تواند در طی رشد اولیه به دلیل سطوح کم آنتی‌اکسیدان‌ها در مغز مضر و خطرناک باشد. آبستاتین یک پپتید تازه کشف‌شده با فعالیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، در مدل‌های حیوانی مختلف است.*

مواد و روش‌ها: *برای انجام این مطالعه تعداد ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار و Inbreed با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و تحت شرایط استاندارد و بعد از گذراندن دوره سازگاری استفاده شد. از طریق لوله‌گذاری داخل عضلانی (گاواژ)، اتانول (۵/۲۷ گرم در کیلوگرم در روز) در موش‌ها در روزهای ۲ الی ۱۰ (سه ماهه سوم در انسان) تجویز شد. سپس حیوانات، آبستاتین (۱ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم) در روزهای ۱۰-۲ پس از زایمان دریافت کردند. سی‌وشش روز پس از تولد، برای ارزیابی رفتارهای شبه اضطرابی در موش‌های صحرایی آزمون مدل ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع (EPM) انجام شد. تعداد ورود به بازوهای باز، مدت زمان ماندن در بازوهای باز ارزیابی و ثبت گردید همچنین میزان سلول‌های نکروز شده از طریق رنگ‌آمیزی نیسل و آپوپتوز نیز توسط روش TUNEL بررسی شد.*

نتایج: *داده‌های رفتاری نشان داد که در گروه‌های تیمار شده با آبستاتین میزان اضطراب نسبت به گروه اتانول کاهش‌یافته ($P<۰/۰۵$) به‌علاوه در گروه اتانول افزایش مرگ سلولی نکروز در ناحیه CA1 هیپوکامپ مشاهده گردید که تیمار با آبستاتین کاهش معناداری در میزان سلول‌های نکروتیک نشان داد ($P<۰/۰۱$).*

نتیجه‌گیری: *بر اساس یافته‌های این مطالعه نشان داد که آبستاتین اثر محافظتی بر نقص‌های عصبی، رفتاری مرتبط با الکل دارد، هرچند که تحقیقات بیشتر در آینده موردنیاز است.*

واژه‌های کلیدی: آبستاتین، اتانول، اضطراب، مرگ سلولی نکروز.

نویسنده مسئول: شاهرود-میدان هفت تیر-دانشگاه علوم پزشکی-دانشکده پزشکی. **تلفن:** ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴، **نمابر:** ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴، **Email:** khaksari417@yahoo.com

ارجاع: طوسی آزاده، شجیعی هومن، خاکساری مهدی، حجتی ویدا، واعظی غلامحسن. بررسی اثر تجویز آبستاتین بر بهبود اضطراب، مرگ سلولی نکروز و آپوپتوزیس در ناحیه هیپوکامپ در مدل سندرم جنین الکلی در موش‌های صحرایی نر. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۸؛۱۴(۴):۳۰-۳۹.

مقدمه

اتانول (EtOH) با فرمول شیمیایی (C_2H_5OH) دارویی روان‌گردان (Psychotropic) و ازنظر ساختاری مولکولی ساده است که به شکل آشامیدنی در سراسر جهان مورد سوءمصرف قرار می‌گیرد (۱). اتانول توانایی عبور از سد خونی مغزی، جفت و سایر غشاهای زیستی را دارد (۲). اگرچه مصرف بیش‌ازحد اتانول توسط افراد بالغ علاوه بر سیستم عصبی مرکزی، سیستم عصبی محیطی این افراد را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد اما مغز مهم‌ترین هدف برای عملکرد اتانول می‌باشد (۳). مصرف بیش‌ازحد اتانول به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر مغز در حال تکوین و مغز تکوین‌یافته اثر می‌گذارد و عوارض حاد و مزمن ایجاد می‌کند (۴). همچنین مصرف اتانول در دوران بارداری آسیب مغز در حال تکوین جنین را در پی دارد (۲).

الکل دارای اثرات سمی بر تکوین سیستم عصبی مرکزی می‌باشد لذا مصرف آن در طی دوران بارداری می‌تواند طیف وسیعی از اختلالات شناختی و رفتاری و همچنین تغییرات غیرطبیعی فیزیکی را برای جنین ایجاد نماید که به مجموعه آن‌ها سندرم جنین الکلی (FASD) اطلاق می‌گردد (۵). داده‌های کلینیکی حاکی از این است که محدوده و شدت اثرات وابسته به الکل در جنین پیش از تولد، بسیار متفاوت است و فاکتورهای محیطی و بیولوژیکی مختلف می‌توانند روی مغز در حال تکوین اثرگذار باشند. مهمترین این فاکتورها دوز مصرفی، الگوی در معرض الکل قرارگرفتن جنین، مرحله تکوینی، پیشینه ژنتیکی مادر و جنین ازنظر توانایی آنزیمی و... می‌باشد. صرف الکل در جهان از ده سال گذشته تا به حال رشد فزاینده‌ای داشته است که سالانه به‌طور متوسط عامل مرگ نیم میلیون نفر در جهان بوده است. وابستگی به الکل وضعیتی است که می‌تواند منجر به اختلالات خطرناکی همچون سندروم ورنیکه کورساکوف، هپاتیت کبدی و ابتلا به انواع سرطان شود (۲ و ۳). یکی از اختلالات که در سال‌های اخیر در جهان شیوع فزاینده‌ای داشته است ایجاد وضعیتی به نام سندروم جنین الکلی (FASD) به‌دلیل مصرف الکل توسط مادر باردار می‌باشد (۴). زمانی که مادر اقدام به مصرف الکل می‌نماید الکل مستقیماً وارد جریان خون مادر شده و از آنجا به‌واسطه تبادل خونی مادر و جنین توسط جفت الکل به جنین نیز منتقل می‌شود و به این خاطر که سرعت متابولیزه شدن الکل در بدن جنین کمتر از سرعت آن در بدن بزرگ‌سالان است بنابراین غلظت الکل در جریان خون جنین به‌مراتب بیشتر از غلظت آن در بدن مادر می‌شود (۵). وجود الکل در بدن ممکن است باعث تداخل در تغذیه مطلوب جنین به‌منظور استفاده برای بافت‌های در حال تکامل جنین شده و علاوه بر مشکلات جسمی باعث آسیب به سلول‌های مغزی جنین گردد (۶).

اتانول (ET) به‌صورت نوروتراتوژن توصیف می‌شود که می‌تواند باعث از دست رفتن و صدمه به نورون در سیستم عصبی مرکزی (CNS) در حال رشد شود و علائم زیادی را در کودکانی که از FASD رنج می‌برند، ایجاد کند (۷). اختلالات متعدد بلندمدت رفتار عصبی، ازجمله ناتوانی در شناخت، رفتار، یادگیری و ناتوانی جسمی با قرار گرفتن در معرض الکل قبل از تولد ارتباط دارند (۳). بسیاری از مناطق مغزی، در سه‌ماهه سوم جنینی رشد می‌کنند و حساسیت خاصی را به قرار گرفتن در معرض الکل نشان می‌دهند (۸). در موش‌های خانگی و صحرایی، از روز اول تا دهم بارداری شبیه دوره سه‌ماهه اول جنینی می‌باشد. سه‌ماهه دوم شبیه به روز ۲۰-۱۰ بارداری است (درست قبل از تولد) و سه‌ماهه سوم در انسان معادل و «جهش ناگهانی رشد مغزی» در موش معادل روز اول تا دهم بعد از تولد (PND) می‌باشد، همچنین رشد کورتکس پیش‌پیشانی (قشر پیش‌پیشانی)، مخچه هیپوکامپ هم در دوره سه‌ماهه سوم اتفاق می‌افتد (۹). درنتیجه، مدل‌های FASD جوندگان می‌توانند در طی دوره پیش از تولد، دوره بعد از تولد یا ترکیبی از هر دو، در معرض الکل باشند. اما تجویز اتانول در دوره پیش از تولد، محدودیت دارد مثلاً الکل با آنزیم جفت، از طریق متابولیسم دگرگون می‌شود و سطوح خون الکلی در جنین کم‌تر از مادر است. در تجویز الکل پیش از تولد، رفتار مادر، غیرعادی است و این می‌تواند بر رشد جنین تأثیر گذارد، همچنین، الکل، شیردهی را در مادر تحت فشار قرار می‌دهد و متوقف می‌سازد (۱۰). طبق مطالعات مختلف، نکروز و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده با فشار اکسایشی حاصل از اتانول در سلول‌های عصبی مرتبط هستند (۵). به‌علاوه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ازجمله گلوتاتیون پروکسیداز و گلوتاتیون ردوکناز، با اتانول مهار می‌شوند (۸). از طرف دیگر، رشد مغز با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی کم‌تر که با مغز بزرگ‌سال و بالغ مقایسه می‌شود ممکن است آسیب‌پذیری بیشتری را نسبت به فشار اکسایشی و اثرات مخدر اعصابش نشان دهد (۱۱). نکروز پاسخ طبیعی سلول به صدمه‌های فیزیولوژیکی است که با برهم‌خوردگی توانایی سلول برای نگه‌داری هموئوستازی شروع می‌شود، با نفوذ آب و یون‌های خارج سلولی تمام اندامک‌های درون‌سلولی به‌خصوص میتوکندری متورم می‌شود و سپس با از هم پاشیدگی غشای سلولی و لیز سلولی تخریب صورت می‌گیرد و اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیم‌های لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها می‌شوند. بنابراین به علت پاسخ‌های التهابی، مرگ سلولی از طریق نکروز با تخریب گسترده‌ی بافتی همراه است (۱۲).

ترس یک واکنش طبیعی در مقابل خطر است که مهم‌ترین نشانه آن عدم تحرک و فقط تنفس است. هدف از پژوهش حاضر، شرطی شدن ترس رفتاری است که در تمام موجودات از حلزون تا انسان مورد مطالعه قرار گرفته است. این رفتار نوعی رفتار دفاعی است که هم به‌صورت غریزی و هم اکتسابی در هنگام خطر اتفاق می‌افتد. به‌عنوان مثال در

حیات وحش در روبرو شدن یک حیوان با حیوان درنده، ممکن است فرار، بی‌حرکت شدن و یا حمله رخ دهد. حیوانات با نشانه‌هایی مثل بو یا صدا خطر را احساس می‌نمایند. در آزمایشگاه از دستگاه ماز به علاوه مرتفع برای سنجش اضطراب استفاده می‌شود. طبق تحقیقات انجام شده، عمده‌ترین نشانه ترس Freezing (عدم‌تحرک و فقط تنفس)، مهم‌ترین منطقه برای ترس و اضطراب آمیگدال بوده که اختلال و یا تخریب این ناحیه سبب عدم یادگیری و بیان ترس می‌گردد (۲). راهی که در آن احتمال کاهش و کنترل ترس وجود داشته باشد حایز اهمیت است. نکته قابل توجه، ۲۱٪ از کودک مبتلابه FASD معیارهای اختلالات اضطرابی را نشان داده‌اند (۱).

آبستاتین (Obestatin)، که با ژن گرلین (ghrelin) کدگذاری شده است، یک پپتید است که از ۲۳ آمینواسید تشکیل شده است. شکل‌گیری این پپتید با عمل‌آوری پس از انتقال پپتید پری پروگرلین همراه است. آبستاتین از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در دسته‌های سلولی پانکراس انسان‌ها و جوندگان جلوگیری می‌کند (۴). هم‌چنین در محافظت در برابر سکته قلبی میوکارد، کم‌خونی پیش‌شرطی و میوسیت‌های شکمی جدا شده، نقشی را ایفا می‌کند (۱). مطالعه قبلی، اثرات ضدالتهابی و حفاظتی تزریق دوره‌ای آبستاتین را در خونریزی نخاعی به‌دلیل آسیب مغزی نشان داد (۱۳). مطالعه دیگری نشان داد که تجویز دوره‌ای آبستاتین توانسته است وخامت حملات حاصل از پنتیلن تترازول را کاهش دهد. بد کار کردن حافظه را بهبود بخشد و آسیب عصبی را با محدود کردن آسیب اکسایشی کاهش دهد (۱۴).

نتایج مطالعات همچنین نشان می‌دهد که آبستاتین ممکن است فاکتور هسته‌ای کاپا–B (NF-κB) که وابسته به پاسخ‌های التهابی می‌باشد را مهار کند و به‌واسطه کاهش کاسپاز–۳ آپوپتوز سلول‌های عصبی را بعد از آسیب‌های مغزی در موش کاهش دهد (۳). همچنین در مطالعات پیشین مشخص گردیده به‌دنبال مصرف الکل کاهش بیان RNA پیک BDNF و نیز تنظیم کاهشی رسپتور مربوطه در منطقه هیپوکمپ مشاهده می‌شود (۸). هدف از این مطالعه بررسی حفاظت عصبی ابستاتین در مدل سندرم جنین الکلی می باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۶۰ سر موش صحرایی شامل ۳۰ موش صحرایی ماده و ۳۰ نر بالغ از نژاد ویستار و inbreed با وزن تقریبی ۲۵۰–۲۰۰ گرم از پژوهشکده رویان تهران خریداری شد و تحت شرایط استاندارد با دوره معکوس روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (۸ صبح تا ۸ شب) و دمای ۳ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد و دسترسی به آب آشامیدنی و غذای کافی نگهداری شدند. حیوانات برای سازگاری با محیط حداقل ۱۰ روز قبل از مطالعه به حیوانخانه منتقل شدند. رت‌ها سه بار در هفته وزن شدند. با بررسی لازم اطمینان حاصل گردید که هیچکدام از حیوانات واجد بیماری یا دارای شواهدی دال بر بیماری نیستند. سپس موش‌های صحرایی به شکل جفت (نر و ماده) و به‌منظور جفت‌گیری در یک قفس قرار داده می‌شوند. پس از تولد، نوزادان نر به شکل تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. تیمار از روز دوم تولد (PD2) تا روز دهم (PD10) تولد انجام شد. سپس رت‌ها به‌طور تصادفی در ۵ گروه ۱۲ تایی به‌صورت زیر تقسیم‌بندی شدند:

گروه (اول) گروه شم: (شیر مادر + شیر خشک با تزریق طبیعی سالین) سه مرتبه با فاصله زمانی دو ساعته در روزاز شیرخشک تغذیه می‌شود.

گروه (دوم) کنترل: نوزادان نر فقط از شیر مادر تغذیه می‌شود.

گروه سوم سندرم جنین الکلی: نوزادان این گروه از روز دوم تولد (PD2) تا روز دهم تولد (PD10) اتانول با دوز (۵/۲۷) g/kg، دو بار در روز به فاصله دو ساعت با روش گاواژ به‌منظور به حداقل رساندن تفاوت رشد بین گروه کنترل و گروه تیمار شده به نوزادان این گروه داده می‌شود، دو ساعت بعد نیز محلول شیر خشک similac فاقد اتانول به روش گاواژ ml/kg (۲۷/۸) به نوزادان این گروه داده می‌شود.

گروه (چهارم) گروه سندرم الکلی–آبستاتین با دوز ۱میکروگرم: آبستاتین با دوز ۱میکروگرم/ به ازای کیلوگرم وزن بدن از روز دوم تولد (PD2) تا روز دهم تولد (PD10) به شکل زیرجلدی تزریق می‌شود.

گروه (پنجم) گروه سندرم الکلی–آبستاتین با دوز ۵ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن با سرنگ انسولین به شکل زیرجلدی تزریق می‌شود.

همچنن بعد از گذشت ۳۶ روز به‌منظور بررسی رفتارهای شبه اضطرابی و دیگر پارامترهای مرتبط با آن، موش‌ها در دستگاه Elevated Plus Maze مورد سنجش قرار می‌گرفتند.

دستگاه Elevated Plus-Maze(EPM) موجود در آزمایشگاه از جنس فایبرگلاس، از چهار بازو به علامت مثبت (+) تشکیل می‌شود که طول و عرض هر کدام از بازوها۵۰ × ۱۰ و صفحه مرکزی ۱۰ ×۱۰ سانتیمتر می باشد. دو بازوی باز در مقابل هم، در انتها باز بوده و فقط دارای کی لبه یک سانتی‌متری در طول بازوها برای جلوگیری از افتادن جانور است. دو بازوی بسته دیگر با دیواره‌هایی به ارتفاع ۴۸ سانتی‌متر محدود شده‌اند، به گونه‌ای که موش قادر به دیدن روی دیوار با عمل روی دو پا ایستادن نباشد. کف بازوها از جنس پلاستیک می‌باشد و دستگاه توسط پایه‌ای با ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار دارد. نور مناسب اتاق تست توسط یک لامپ ۱۰۰ واتی واقع در ارتفاع ۱۲۰ سانتی‌متر در بالای دستگاه تأمین می‌گردد (۲۶ و ۳۵). پارامترهای زیر اندازه‌گیری شد. تعداد دفعاتی که موش وارد بازوهای باز می‌شد. تعداد دفعاتی که موش وارد بازوی بسته شد. مدت زمانی که موش در بازوی باز می‌ماند. مدت زمانی که موش در بازوی بسته می‌ماند. میزان حرکت جانور یا فعالیت حرکتی مبنای ورود و یا زمان سپری شده در هر بازو بر اساس قرارگرفتن هر چهار پای حیوان در راهروی موردنظر.

بر اساس بیشتر مطالعات و تحقیقات قبلی، آنچه که معیاری مناسب از رفتار شبه اضطرابی است و در نتایج آماری ذکر می‌شود عبارتند از:

۱- درصد تعداد ورود به بازوی باز ۴ (QAE٪)

این مقدار عبارت است از درصد تعداد ورود به بازوی باز تقسیم بر مجموع تعداد ورود به هر دو بازو.

درصد زمان سپری شده در بازوی باز ۵ (QAT٪) که عبارت است از درصد زمان سپری شده در بازوی باز تقسیم بر مجموع زمان سپری شده در هر دو بازو. افزایش معنی‌دار در این دو پارامتر نشان‌دهنده شده در هر دو بازو. افزایش معنی‌دار در این دو پارامتر نشان‌دهنده کاهش رفتار شبه اضطرابی در حیوان بوده و کاهش این پارامترها بیانگر افزایش رفتار شبه اضطرابی است.

البته پارامتر درصد تعداد ورود به بازوی باز نسبت به درصد زمان سپری شده در بازوی باز دارای حساسیت کمتری در ثبت رفتار شبه اضطرابی است. پارامتر مهم دیگری که مورد سنجش قرار می‌گیرد میزان حرکت جانور یا فعالیت حرکتی بود، که بیانگر مجموع تعداد ورود به بازوی باز و بسته در زمان ۵ دقیقه است. شاخص‌های ذکر شده به‌صورت دستی با استفاده از دستگاه کرونومتر، ثبت و با مشاهده فیلم ویدیویی ضبط شده توسط شاخص‌ها مقایسه گردید.

جهت ارزیابی میزان مرگ سلولی نکروزیس از تکنیک رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل) استفاده شد. رنگ‌آمیزی نیسل معمولاً برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود. در این تحقیق از سلول‌های ناحیه هیپوکمپ CA1 برداشت شد. بعد از انجام پرفیوژن از نمونه‌های فیکس شده قالب پارافینه تهیه شد و پس از قالب‌گیری با پارافین، با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاتوری مقاطع کرونال با ضخامت ۷ میکرون تهیه و سپس برش‌ها برروی لام‌های آلبومینه قرار داده شدند. بعد از شفاف‌سازی و آبدهی، لام‌ها با استفاده از کریزل ویوله یک‌درصد رنگ شدند و در نهایت مقاطع به‌وسیله چسب انتلان و لامل پوشانده شدند. لام‌های رنگ شده به روش نیسل توسط میکروسکوپ OLYMPUS, AX70 با بزرگنمایی X۴۰ بررسی و بعد از تهیه عکس توسط نرم‌افزار Image Tool 2 شمارش سلولی انجام شد. برای شمارش سلولی، ناحیه CA1 هیپوکامپ نیمکره راست در برش‌های کرونال انتخاب شد و تعداد نورون‌ها در این منطقه مشخص شده؛ شمارش گردید. دو مقطع ۳/۳ و ۴/۲ نسبت‌به برگما باتوجه به اطلس Paxinos انتخاب و شمارش برای هرمقطع در ۳ برش با حداقل فاصله ۷ میکرومتر انجام شد. برای شمارش نورون‌ها در هر گروه سطحی برابر با ۴۰۰ میکرومترمربع در نظر گرفته شد.

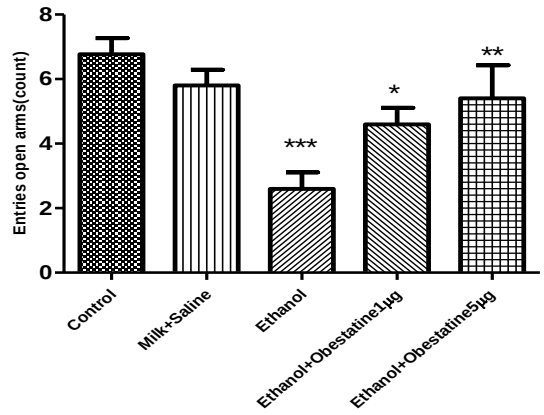
مطالعه میزان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول، با استفاده از کیت TUNEL (که در این روش میزان تخریب و قطعه قطعه شدن DNA بررسی می‌شود) انجام گرفت. کیت تانل، قطعات DNA در سلول‌های آپوپتوزی (سلول‌های تانل مثبت) را به‌طور اختصاصی شناسایی می‌کند. لام‌های رنگ شده به روش TUNEL توسط میکروسکوپ OLYMPUS, AX70 با بزرگنمایی X۴۰ بررسی و بعد از تهیه عکس توسط نرم‌افزار Image Tool 2 شمارش سلولی انجام شد. برای شمارش سلولی، ناحیه CA1 هیپوکامپ نیمکره راست در برش‌های کرونال انتخاب شد و تعداد نورون‌ها در این منطقه مشخص شده؛ شمارش گردید. دو مقطع ۳/۳ و ۴/۲ نسبت‌به برگما باتوجه به اطلس Paxinos انتخاب و شمارش برای هر مقطع در ۳ برش با حداقل فاصله ۷ میکرومتر انجام شد. برای شمارش نورون‌ها در هر گروه سطحی برابر با ۴۰۰ میکرومترمربع در نظر گرفته شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به‌صورت معنی S.E.M ± بیان می‌شوند و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

ماز به‌علاوه نحوه حرکت هر یک از موش‌های صحرایی گروه‌های کنترل و سندرم جنین الکلی و تیمار شده با آبستاتین توسط دوربین فیلمبرداری ردیابی و توسط نرم‌افزار کامپیوتری رسم شد.

نمودار ۱ نشان می‌دهد که ازنظر تعداد دفعات ورود به بازوی باز در روز ۳۶ کاهش معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۱) بین گروه الکل با گروه کنترل دارد و تیمار با ابستاتین باعث افزایش معنی‌داری ازنظر تعداد دفعات ورود به بازوی باز در سطح (P<۰/۰۵) می‌شود.



نمودار ۱- تعداد دفعات ورود به بازوی باز

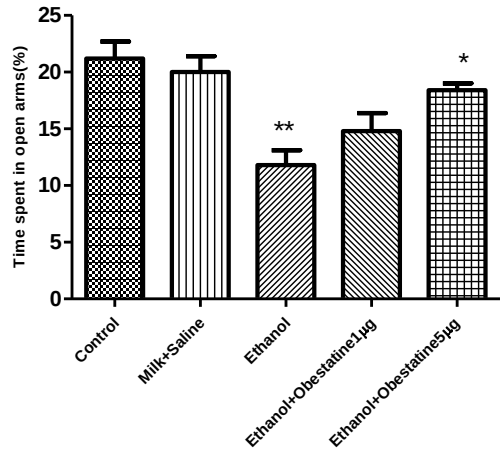
*تفاوت به‌طور معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده الکل (P<۰/۰۵).

**تفاوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده الکل (P<۰/۰۱).

***تفاوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱).

همچنین ازنظر زمان گذرانده شده در بازوی باز در روز ۳۶ مشاهده می‌شود که کاهش معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۱) بین گروه الکل با

گروه کنترل دارد و تیمار با ابستاتین باعث افزایش معنی‌داری ازنظر زمان گذرانده شده در بازوی باز در سطح (P<۰/۰۵) می‌شود (نمودار ۲).

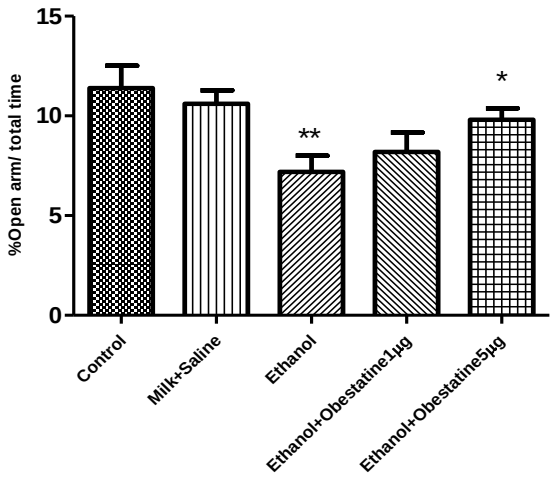


نمودار ۲- زمان گذرانده شده در بازوی باز

*تفاوت به‌طور معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده الکل (P<۰/۰۵).

**تفاوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۱).

نمودار ۳- ازنظر درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز نسبت‌به کل تردد آن در روز ۳۶ کاهش معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵) بین گروه الکل با گروه کنترل دارد دارد و تیمار با ابستاتین باعث افزایش معنی داری ازنظر درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز نسبت به کل تردد آن در سطح (P<۰/۰۵) می‌شود.



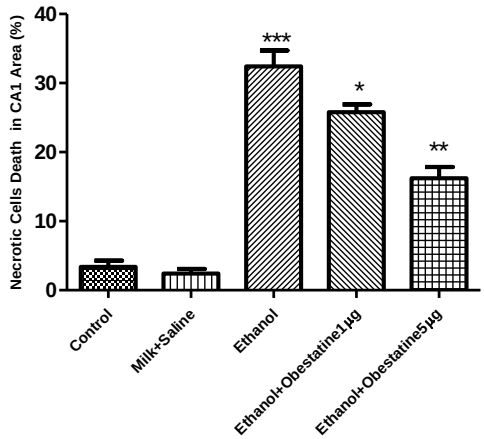
نمودار ۳- درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز نسبت‌به کل تردد

*تفاوت به‌طور معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده الکل (P<۰/۰۵).

**تفاوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۱).

تجویز آبستاتین نکروز نورونی ناشی از الکل را در هیپوکامپ تضعیف می‌کند.

نتایج رنگ‌آمیزی Nissl نشان داد که مرگ سلولی نکروزیس در ناحیه CA1 هیپوکامپ راست در گروه دریافت‌کننده آبستاتین افزایش معنادار نسبت به گروه شاهد داشت (P≤۰/۰۰۱). تعداد سلول‌های نکروتیک در گروه دریافت‌کننده اتانول از گروه کنترل بیشتر بود (P<۰/۰۰۱) در گروه آبستاتین، درصد سلول‌ها کم‌تر از گروه اتانول بود (P<۰/۰۱) (نمودار ۴ و شکل ۱).

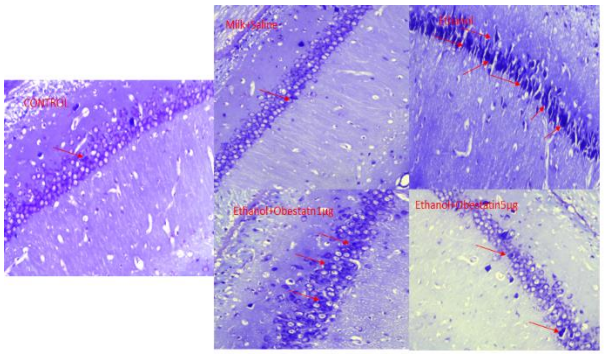


نمودار ٤- اثرات تجویزآبستاتین بر ارزیابی بیان سطح سلول‌های نکروتیک

* تفاوت به‌طور معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده الکل (P<۰/۰۵).

** تفاوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده الکل (P<۰/۰۱)

*** تفاوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)

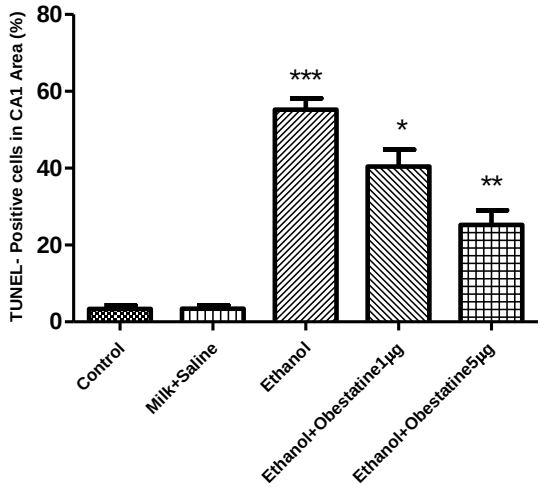


شکل ۱- اثرات آبستاتین بر مرگ سلول‌های نکروتیک ناشی از دریافت الکل در ناحیه هیپوکامپ CA1 موش صحرایی با استفاده از رنگ‌آمیزی Nissl

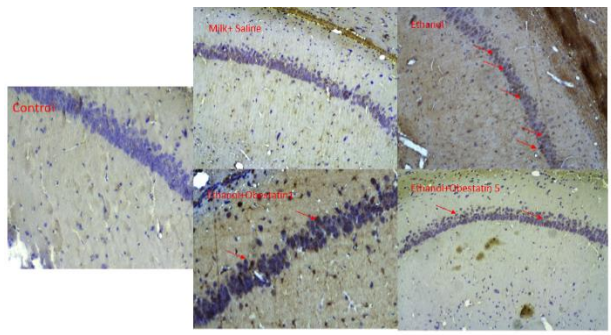
آبستاتین به‌طور قابل توجهی کاهش مرگ سلولی نکروتیک ناشی از دریافت آبستاتین در ناحیه CA1 (بزرگنمایی۴۰۰)

شکل ۲ و نمودار ۵ نشان می‌دهد که درمان با آبستاتین باعث کاهش مرگ سلولی آپوپتوزیس ناشی از اتانول می‌شود. نتایج رنگ‌آمیزی TUNEL نشان داد که درصد سلول‌های TUNEL مثبت در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه اتانول به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). همچنین در موش‌های دریافت‌کننده اتانول

تحت درمان با ابستاتین ۵، درصد سلول‌های TUNEL مثبت در مقایسه با گروه اتانول کاهش یافت (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۵- اثرات تجویز آبستاتین بر میزان سلول‌های اپوپتوزیس
*تفاوت به‌طور معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده الکل (P<۰/۰۵).
* * تفاوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده الکل (P<۰/۰۱).
***تفاوت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱).



شکل ۲- اثرات آبستاتین بر مرگ سلولی آپوپتوزیس ناشی از دریافت الکل در ناحیه هیپوکامپ CA1 موش صحرایی با استفاده از رنگ‌آمیزی TUNEL
آبستاتین به‌طور قابل توجهی کاهش مرگ سلولی ناشی از دریافت آبستاتین در ناحیه CA1 (بزرگنمایی۴۰۰) می‌شود.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز ابستاتین باعث کاهش اضطراب از طریق کاهش مرگ سلولی در مدل سندرم جنین الکلی می‌شود.

ترس ازجمله اختلالاتی است که با شدت‌های متفاوتی می‌تواند موجب بروز مشکلاتی در زندگی فردی و اجتماعی انسان گردد. ترس از مواجهه با دیگران و عدم اعتماد به نفس در برخوردها و تعامل اجتماعی موجب کارآیی کمتر و کاهش بازده فکری و عملی افراد می‌گردد، چه بسا افراد زیادی که به‌دلیل احساس عدم امنیت و ترس از صحبت کردن و گفتگو با دیگران پرهیز می‌نمایند (۱۷-۱۵). میانجی‌های عصبی مختلفی ازجمله دوپامین، سروتونین، کوله سیستو کنین، گابا، گلوتامات، در بروز رفتار ترس دخیل هستند. در این مطالعه به‌منظور بررسی رفتارهای شبه اضطرابی و دیگر پارامترهای مرتبط با آن، موش‌ها در دستگاه Elevated Plus Maze مورد سنجش قرار می‌گرفتند. یکی از معتبرترین آزمون های سنجش میزان اضطراب در جوندگان، آزمون ماز صلیبی مرتفع است که بر اساس مدت زمان باقی‌ماندن حیوان در یک محیط تاریک و قابل اطمینان می‌توان سطح اضطراب را اندازه‌گیری نمود (۱۸). همچنین، به‌منظور سنجش و مقایسه رفتارهای جستجوگری و میزان فعالیت حرکتی، می‌توان از آزمون محفظه باز استفاده کرد. شاخص‌های سنجش اضطراب مانند میزان دفع حیوان، رفتارهای جستجوگری مانند حرکت در اطراف و مرکز ماز و مدت زمان تحرک و بی‌حرکتی حیوان طی این آزمون ارزیابی می‌گردد (۱۹). ارزیابی پاسخ‌های شبیه اضطراب با استفاده از EPM نشان داد که مدت زمان ماندن در بازوی باز و تعداد ورود به بازوی باز در گروه تیمار با آبستاتین به‌طور معنی‌داری کوتاه‌تر از گروه دریافت‌کننده الکل بود. برای درک بهتر این الگو، فعالیت در مناطق باز نسبت به فعالیت کل برای هر موضوع ارزیابی شدند. نزدیک به ۵۰٪ از موش‌های گروه دریافت‌کننده الکل تمایل به حضور بیشتر در بازوهای باز را نشان دادند، که این یافته با مطالعات قبلی مطابقت دارد (۲۰ و ۲۱).

همچنین تعداد Stretched attend posture(SAP) و تعداد دفع مدفوع در گروه دریافت‌کننده الکل به‌صورت معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. در حالی که فعالیت حرکتی کل ثبت شده در بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت.

در نتایج این مطالعه مشاهده شد که گروه وابسته به الکل با جستجوی بیشتر در داخل بازوی باز ماز اثرات شبه اضطرابی را نشان دادند. تعداد ورود به داخل بازوی باز ماز نشانه فعالیت عمومی حیوان می‌باشد (۲۲). هرچند در این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین دو گروه در فعالیت حرکتی حیوانات مشاهده نشد. به عبارتی دیگرالکل بی‌حرکتی (Immobility) را در موش‌های صحرایی وابسته کاهش داد. تعداد Stretched attend posture(SAP) ممکن است به رفتار تصمیم‌گیری برگردد (۲۳ و ۲۴). یعنی زمانی که حیوان تصمیم به رفتن به داخل بازوی باز ماز را می‌گیرد. لذا باتوجه به این که این تعداد SAP در موش‌های صحرایی وابسته به الکل بیشتر است، نشان‌دهنده حضور حیوان از جستجوی داخل بازوی باز می‌باشد. به عبارتی دیگر این یافته نیز به اثرات اضطراب‌زایی الکل برمی‌گردد. همچنین لازم به ذکر است که در مورد استفاده بسیاری از تست‌های استاندارد برای اضطراب EPM اختلاف نظر وجود دارد و بنابراین هر نتیجه‌گیری در مورد تغییر در اضطراب به‌عنوان یک نتیجه از یافته‌های فعلی نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

بنابراین دو نکته مهم در این یافته‌ها به چشم می‌خورد. اول این که در مقایسه با گروه کنترل، موش‌های صحرایی وابسته به الکل سریع‌تر رفتار

شبه اضطرابی را در شرایط پراسترس (مثل بازوی باز ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع) بروز می‌دهند و دوم این که تغییری در فعالیت حرکتی موش‌های صحرایی گروه کنترل مشاهده نشد و رفتار جستجوگری در محیط جدید را کاهش داد .

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تجویز آبستاتین اثرات مثبت و بهتری از خود نشان می‌دهد و می‌تواند در بهبود اضطراب و رفتارهای اکتشافی نقش داشته باشد. هرچند، باتوجه به اینکه همچنان مکانیسم تأثیر آبستاتین با ابهاماتی روبه رو است، بررسی‌های بیشتر در مورد مکانیسم تأثیر آن بر اختلالات اضطرابی لازم به نظر می‌رسد.

این مطالعه نشان داد که استعداد بروز اثرات شبه اضطرابی در شرایط پراسترس در موش‌های صحرایی وابسته به الکل ممکن است سریع‌تر رخ دهد، بدون این که بر فعالیت حرکتی آن‌ها تأثیری داشته باشد .همانند مطالعات گذشته تجویز الکل به روش گاواژ در موش‌های صحرایی نر موجب ترس و اظطراب گردید. مراکز اصلی که احساسات را مدیریت می‌کنند و تحت تأثیر الکل قرار می‌گیرند، هیپوکامپ و medial prefrontal cortex هستند. نشان داده شده است که رفتارهای جستجو برای الکل و برگشت به سو مصرف الکل توسط این مراکز میانجی‌گری می‌شوند (۲۵). در مطالعه دیگری، قرار گرفتن در معرض الکل قبل و بعد از تولد، در موش‌ها، تعداد نورون‌های هرمی در CA1 تقریباً ۲۰٪ کاهش داد (۲۶). مطالعات مختلفی برای شناسایی مناطق مغزی درگیر در اضطراب انجام شده است. به‌طور کلی، این یافته‌ها دخالت قشر اکسیپیتال کنج فوزیفرم، تالاموس و قشر پره فرونتال میانی (mPFc) را نشان داده‌اند. علاوه بر این، مناطقی مانند جسم مخطط آمیگدال اینسولاو قشر سینگولیت قدامی پشتیدارای ناهنجاری‌های ساختاری و فعالیت بیش از حد در اختلالات اضطرابی هستند. همچنین یکی دیگر از مناطق درگیر در اختلالات اضطرابی، هیپوکامپ است (۲۷ و ۲۸).

در یک مطالعه با استفاده از موش Sprague-Dawley، قرار گرفتن در معرض الکل در دوران بارداری فقط مشاهده استرس خفیف بود اما فقط در PAE مشاهده نگردید (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر علاوه بر این، قرار گرفتن در معرض اتانول در طول سه‌ماهه سوم بارداری در انسان باعث اظطراب و ترس بیشتر در دوران نوجوانی گشت که این اثرات در موش‌های Sprague-Dawley با سطح بالای الکل با استفاده از دستگاه پلاس میز نیز مشاهده گردید (۳۰) اما نه قرار گرفتن در معرض طولانی مدت و متوسط الکل (۳۱). این یافته‌ها حاکی از کارآیی EPM به‌عنوان معیار رفتار اضطراب در مدل‌های الکلی بسیار پیچیده می‌باشد. در مطالعات ما این اضطراب ناشی از مصرف الکل در موش‌های نر بود که خود را به شکلی وابسته نشان داد. به هر حال مطالعات بسیاری برای شناسایی مکانیسم‌های عصبی مرتبط، در طی دوره بارداری ضروری هستند (۳۲).

شایان ذکر است که یکی از محدودیت‌های استفاده از دستگاه پلاس میز به‌عنوان یک معیار رفتار شبیه اضطراب این است که اضطراب را به‌صورت تجربی اندازه‌گیری می‌کند (۳۳). تحقیقات انجام شده قبلی بر روی اثرات الکل بر اظطراب در حیوانات بالغ بارها و بارها افزایش قابل ملاحظه‌ای از اظطراب را نشان دادند (۳۴). با این حال، برخی مطالعات به‌دلیل مشاهده نشدن اظطراب (۳۱) یا مشاهده اثر رفتاری بسیار خفیف (۳۵)، با این گزارش‌ها مغایرت دارند. به‌طور کلی، به‌نظر می‌رسد در استفاده طولانی مدت از الکل عدم اطمینان وجود دارد (۳۲).

الکل یک اثر محرک با خواص عصبی مختلفی است. بسیاری از مکانیزم‌های پیچیده‌ای که به دنبال مصرف الکل رخ می‌دهد، به وضوح درک نمی‌شوند. با این حال، استرس اکسیداتیو، التهاب، کاهش کلسیم، تغییر در عملکرد گیرنده‌های ان–متیل– د آسپارتات NMDA، فعالسازی میکروگلیا، هیپرترمی و القای نکروز به‌عنوان مکانیسم‌های مربوط نوروتوکسیسیتی ناشی از الکل تعریف شده است (۱۱). اثرات عصبی پس از مصرف الکل از طریق سه مکانیسم ایجاد می‌شود: انتشار دوپامین و اکسیداسیون آنزیمی، اکسیداسیون دوپامین و اختلال در میتوکندری می‌باشد (۲۱).

مطالعات ما حاکی از آن است که اتانول با کمبود مواد مغذی و تأثیرات دیگر می‌تواند تولید ROS را افزایش دهد که با کاهش سطوح دفاع آنتی‌اکسیدانی، عدم‌تعادل اکسایش کاهش و آسیب اکسایشی به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA جفت می‌شوند. این فشار اکسایشی می‌تواند به‌طور جزیی در اثرات نورودژنراسیون مشاهده شده در FASD سهیم باشد. آبستاتین در سال ۲۰۰۵ کشف گردید. این هورمون پپتیدی حاوی ۲۳ آمینو اسید می‌باشد در ابتدا از معده موش‌ها استخراج شد اما مشخص گردید در دوازدهه، مخاط معده، روده بزرگ، طحال، پانکراس، شیر مادر، غده‌های پستانی، پلاسما، بزاق و بیضه نیز وجود دارد. به‌نظر می‌رسد آبستاتین باعث کاهش سلول‌های نکروز شده، کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و نورونزایی در هیپوکامپ شده است که می‌تواند به ترمیم بافت عصبی پس FASD کمک کنند و عوارض ناشی از آن را کاهش دهند. هیپوکامپ و مخچه در حال رشد نسبت به نوروپاتولوژی الکل، آسیب‌پذیر هستند. همان‌طور که در مطالعات انسانی (۴) و در مدل‌های جونده آشکار شدند (۷ و ۱۰). سلول‌های پرکنژ، آسیب‌پذیرترین نورون‌ها در مخچه در حال رشد هستند (۱۸). به‌طور مثال، در موش صحرایی، تماس با دوز واحدی از اتانول در روز ۴ بارداری، باعث افزایش سلول‌های نکروزشده در نورون‌های پرکنژ می‌شود (۳). آسیب‌پذیری قابل توجه مخچه نابالغ نسبت به بیماری‌زایی الکل زمانی روی می‌دهد که تماس با الکل با دوره بحرانی رشد نورون پورکنژ مقارن می‌شود (۱۷). این دوره در سه‌ماهه سوم بارداری انسان قرار دارد که دو هفته اول بعد از تولد را درجوندگان دربرمی‌گیرد. اتانول دو تأثیر عمده در تکوین جنین دارد: تغییر در روند

تکثیر نورونی و مرگ نورون‌ها. رابطه‌ی مستقیمی بین نورون‌زایی و اختلالات اضطرابی وجود دارد. کاهش نورون‌زایی منجر به ایجاد یا افزایش اختلالات اضطرابی می‌شود. مصرف اتانول موجب استرس اکسیداتیو می‌گردد به‌طوری‌که مصرف حاد اتانول پراکسیداسیون لیپیدی که شاخصی از استرس اکسیداتیو است را در مغز افزایش می‌دهد (۱۳) شواهد نشان می‌دهد که الکل از طریق استرس نقش مهمی در تخریب نورونی ROS (Reactive oxygen species) اکسیداتیو و ایجاد و آسیب بافتی ایفاء می‌کند (۳). یکی از اولین وقایع بعد از مصرف الکل فعال شدن میکروگلیاها و بروز آسیب‌های نورودژنراتیو ناشی از عملکرد آن‌ها است. با وجود اینکه فعال شدن میکروگلیا برای ایجاد پاسخ ایمنی مناسب لازم است اما فعال شدن بیش از اندازه آن می‌تواند باعث آسیب‌های توکسیک شود. در مجموع، فعالیت بیش از اندازه میکروگلیا می‌تواند باعث تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و پروستاگلاندین شود و از طریق ایجاد واکنش‌های التهابی فرآیند نورودژنراسیون را پیش ببرد. اثرات آبستاتین بر مرگ سلول‌های نکروتیک ناشی از دریافت الکل در ناحیه هیپوکامپ CA1 موش صحرایی با استفاده از رنگ‌آمیزی Nissl نشان داد که آبستاتین به‌طور قابل توجهی کاهش مرگ سلولی نکروتیک ناشی از دریافت الکل در ناحیه CA1 می‌گردد. با در نظر گرفتن اثرات آبستاتین روی بیماری‌های آسیب‌شناسی، می‌توان آن را به‌صورت گزینه درمانی کارآمد برای بیماری‌هایی نظیر FASD در نظر گرفت. به هر حال، تحقیقات بیشتری در آینده لازم است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات سرکار خانم پیراسته نوروزی کارشناس مسئول آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شاهرود و سرکار خانم حدیثه ناصری و دیگر عزیزانی که ما را در این مطالعه یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Ahlgren SC, Thakur V, Bronner-Fraser M. Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:10476-81. doi: 10.1073/pnas.162356199
2. Akers KG, Kushner SA, Leslie AT, Clarke L, Van Der Kooy D, Lerch JP, et al. Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice. Mol Brain 2011;4:29.doi: 10.1186/1756-6606-4-29
3. Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Guerri C. Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. Frontiers in Cellular Neuroscience 2014;8:216. doi: 10.3389/fncel.2014.00216
4. Alloatti G, Arnoletti E, Bassino E, Penna C, Perrelli MG, GHÉ C, et al. Obestatin affords cardioprotection to the ischemic-reperfused isolated rat heart and inhibits apoptosis in cultures of similarly stressed cardiomyocytes. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2010;299:H470-81. doi:10.1152/ajpheart.00800.2009
5. Andrieu-Abadie N, Gouazé V, Salvayre R, Levade T. Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine 2001;31:717-28. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00655-4
6. Anthony B, Vinci-Booher S, Wetherill L, Ward R, Goodlett C, Zhou FC. Alcohol-induced facial dysmorphology in C57BL/6 mouse models of fetal alcohol spectrum disorder. Alcohol 2010;44:659-71. doi: 10.1016/j.alcohol.2010.04.002
7. Antonio AM, Gillespie RA, Druse-Manteuffel MJ. Effects of lipoic acid on antiapoptotic genes in control and ethanol-treated fetal rhombencephalic neurons. Brain Res 2011;1383:13-21. doi: 10.1016/j.brainres.2011.01.113
8. Arenzana FJ, Carvan MJ, Aijon J, Sanchez-Gonzalez R, Arevalo R, Porteros A. Teratogenic effects of ethanol exposure on zebrafish visual system development. Neurotoxicol Teratol 2006;28:342-8. doi: 10.1016/j.ntt.2006.02.001
9. Arrant AE, Schramm-Sapyta NL, Kuhn CM. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. Behav. Brain Res 2013;256:119-27. doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.035
10. Barak AJ, Beckenhauer HC, Junnila M, Tuma DJ. Dietary betaine promotes generation of hepatic S-adenosylmethionine and protects the liver from ethanol-induced fatty infiltration. Alcohol Clin Exp Res 1993;17:552-5. doi: 10.1111/j.1530-0277.1993.tb00798.x
11. Boehm SL, Moore EM, Walsh CD, Gross CD, Cavelli AM, Gigante E, et al. Using drinking in the dark to model prenatal binge-like exposure to ethanol in C57BL/6J mice. Dev Psychobiol 2008;50:566-78. doi: 10.1002/dev 20320
12. Byrnes EM. Transgenerational consequences of adolescent morphine exposure in female rats: effects on anxiety-like behaviors and morphine sensitization in adult offspring. Psychopharmacology (Berl) 2005;182:537-44. doi:10.1016/j.bbr.2010.11.059
13. Carneiro LM, Diogenes JP, Vasconcelos SM, Aragao GF, Noronha EC, Gomes PB, et al. Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. Neurotoxicol Teratol 2005;27:585-92. doi:10.1016/j.ntt.2005.06.006
14. Hellemans KG, Verma P, Yoon E, Yu WK, Young AH, Weinberg Jm. Prenatal alcohol exposure and chronic mild stressdifferentially alter depressive- and anxiety-like behaviors in male and female offspring. Alcohol. Clin Exp Res 2010;34:633-45. doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.01132.x
15. Hofmann CE, Patyk IA, Weinberg J. Prenatal ethanol exposure: sex differences in anxiety and anxiolytic response to a 5-HT1A agonist. Pharmacol Biochem Behav 2005;82:549-58. doi:10.1016/j.pbb.2005.10.010
16. Holmes A, Parmigiani S, Ferrari PF, Palanza P, Rodgers RJ. Behavioral profile of wild mice in the elevated plus maze test for anxiety. Physiol Behav 2000;71:509-16. doi: 10.1016/S0031-9384(00)00373-5
17. Hosseinzadeh H, Karimi GR, Rakhshanizadeh M. Anticonvulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of hypericum perforatum L in mice. J Med Plant 2004;3:4-6.[Persian].
18. Hunsberger J, Duman C. Animal models for depression-like and anxiety-like behavior. Protoc Exch 2007; doi:10.1038/nprot.2007.542
19. Hypericum Perforatum on fear behavior in presence pentylenetetrazole (PTZ) in adult male rat. Ilam Univ Med Sci 2009; 17:36-46.[Persian].
20. Kastenberger I, Lutsch C, Herzog H, Schwarzer C. Influence of sex genetic background on anxiety-related and stress-induced behavior of prodynorphin deficient mice. PLoS One 2012;7:e34251. doi: 10.1371/journal.pone.0034251
21. Leach G, Adidharma W, Yan L. Depression- like responses induced by daytime light deficiency in the diurnal grass rat (arvicanthis niloticus). Plos One 2013;8:e57115. doi:10.1371/journal.pone.0057115

22. Naghdi Badi HA, Amin GH, Makkizadeh M, Ziai SA. St. John's wort (Hypericum perforatum). a review. J Plant Med 2005;4:1-14. [Persian].

23. Nater UM, Okere U, Stallkamp R, Moor C, Ehlert U, Kliegel M. Psychosocial stress benhances time- based prospective memory in healthy young men. Neurobiology o Learning and Memory 2006;86: 344-8. doi:10.1016/j.nlm.2006.04.006

24. Ookawa K, Mochizuki K, Shida E, Suzuki T, Suzuki T, Ooba T, et al. Anti-anxiety effect of ovary lipid extracted from Skipjack tuna (Katsuwonus pelamis) in rats. J Vet Med Sci 2007;69:633-6. doi:10.1292/jvms.69.593

25. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated Plus maze: a novel test of anxiety in rat. Pharmacol Biochem Behav 1986;24:525-9. doi:10.1016/0091-3057(86)90552-6

26. Pinheiro SH, Zangrossi H Jr, Del-Ben CM, Graeff FG. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. An Acad Bras Cienc 2007;79:71-85. doi: 10.1590/S0001-37652007000100010

27. Russell KH, Hagenmeyer-Houser SH, Sanberg PR. Haloperidol-induced emotional defecation: a possible model for neuroleptic anxiety syndrome. Psychopharmacology (Berl) 1987;91:45-9. doi: 10.1007/BF00690925

28. Saleem S, Ahmad M, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, et al. Effect of saffron (Crocus sativus) on neurobehavioral and neurochemical changes in cerebral ischemia in rats. J Med Food 2006;9:246-53. doi: 10.1089/jmf.2006.9.246

29. Sanchez Vega MC, Chong S, Burne TH. Early gestational exposure to moderate concentrations of ethanol alters adult behaviour in C57BL/6J mice. Behav. Brain Res 2013;252:326-33. doi: 10.1016/j.bbr.2013.06.003

30. Simon AB, Gorman JM. Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate. Neuro Rx 2006;3:57-68. doi:10.1016/j.nurx.2005.12.005

31. Smagin DA, Kudryavtseva NN. Anxiogenic and anxiolytic effects of lithium chloride under preventive and therapeutic treatments of male mice /with repeated experience of aggression. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova 2014;64:646-59. doi: 10.7868/S0044467714060124

32. Soetens E, Casaer SD, Hooge R, Hueting JE. Effect of amphetamine on long-term retention of verbal material. Psychopharmacology 1995;119:155-62. doi:10.1007/BF02246156

33. Sulik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: Embryogenesis in a mouse model. Science 1981;214:936-8. doi:10.1126/science.6795717

34. Takashi O, Hiroshi S, Ken-ichi M, Katsunori I, Michihiro F, Hiroyuki T, et al. Akihisa treatment: effect on behaviour and neurogenesis in a chronic stress model in mice. BMC Complement Altern Med 2011;11:7.

35. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat Protoc 2007;2:322-8.9. doi: 10.1096/fj.04-1815fje

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2020; Vol 14, No 4

DOI: 10.22100/jkh.v14i4.2310

Original Article

The Effect of Obstatin on Stress, Anxiety, Necrosis Cell Death and Apoptosis in the Hippocampus Area in the Model of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in Male Rats

Azadeh Toosi (Ph.D.)[1], Hooman Shajiee (Ph.D.)[1], Mehdi Khaksari (Ph.D.)[2*], Vida Hojati (Ph.D.)[1], Golamhassan Vaezi (Ph.D.)[1]

1- Dept. of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2- Addiction Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 30 October 2019**, Accepted:** 28 January 2020

Abstract:

Introduction: *Among the numerous consequences of prenatal alcohol exposure (PAE) is an increase in anxiety-like behavior that can prove debilitating to daily functioning. Clinical and experimental evidence has shown postnatal alcohol exposure causes inflammation in the hippocampus and reduced neurogenesis among other brain regions. This can occur during early growth due to the low levels of antioxidants in the brain can be harmful and dangerous. Obstatin is a newly discovered peptide with anti-inflammatory, antioxidant activity, in various animal models.*

Methods: *Through intragastric intubation, ethanol (5.27 g/kg/day) was administered in male Wistar rat pups on postnatal days 2-10 (third trimester in humans). The animals received obestatin (1 and 5 µg/kg, S.C.) on postnatal days 2-10. Thirty-six days after birth, the anexity test was performed using elevated plus maze test, and then. The level of necrotic and apoptosis cells death was determined via nissl and TUNEL staining after the behavioral test.*

Results: *Obestatin significantly improved anxiety behavioral deficits ($P<0.01$), and obestatin treatment could significantly and decreased nissl and tunnel positive cells in the hippocampus of ethanol-exposed rat pups ($P<0.01$).*

Conclusion: *The result of this study shows that abstatin had a protective effect on neurodegenerative, alcohol-related behaviors, although further research is needed in the future.*

Keywords: Obstatin, Ethanol, Anxiety, Necrosis cell death.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author**: M. Khaksari, **Email:** khaksari417@yahoo.com*

Citation: Toosi A, Shajiee H, Khaksari M, Vaezi G, Hojati V. The effect of obstatin on stress, anxiety, necrosis cell death and apoptosis in the hippocampus area in the model of fetal alcohol spectrum disorders in male rats. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2020;14(4):30-39.