

Effect of Sodium Butyrate on Working Memory and Serum Level Expression of Neural Growth Factor in an Animal Model of Prenatal Stress

Forough Akrami^{1,2}, Mohammad Amin Edalatmanesh^{1*}

¹Department of Physiology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

²Department of Physiology, College of Sciences, Fars Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran

Received: 6 Dec 2015

Article Info:

Accepted: 23 Feb 2016

ABSTRACT

Introduction: Feeling stressed is common during pregnancy and some pregnant women experience some level of anxiety. Prenatal Stress alters the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of infants and affects glucocorticoid receptors in the hippocampus. Many researchers have described the deacetylase histone inhibitors as a new group of drugs that improve the long-term memory formation. These drugs can improve memory in normal animals as well as in animal with brain disorders. The objective of this study was to study the neuroprotective effects of sodium butyrate, as a histone deacetylase inhibitor, on improving cognitive functions in new born rats born of stressed mother. **Materials and Methods:** 15 pregnant female rats received foot shock (5 times per day and at the current intensity of 1 mA and frequency of 50 MHz with 3 Minutes intervals for 2 seconds) between day 12 to day 18 of pregnancy. Infants born to these mothers were classified in three treatment groups, including Shock, shock + sodium butyrate 0.35 grams per liter, and shock + sodium butyrate 3.5 grams per liter. Infants born to mothers who were not under any shock during their pregnancy were used as the control group. To assess the working memory, Y maze test was performed on postnatal 30 and 60 days. Then, serum level of neural growth factor was measured by ELISA. **Results:** Periodic behaviors were significantly decreased in shock group. A significant increase in the group receiving sodium butyrate was observed compared to the control group. Besides, sodium butyrate administration increased serum level of neural growth factor. Working memory and serum level of neural growth factor in foot shock stress model were decreased. **Conclusion:** Administration of sodium butyrate revealed a neuroprotective effect probably via increase of neural growth factor and may improve the cognitive function of infants with prenatal stress.

Key words:

1. Pregnancy
2. Butyric Acid
3. Memory, Short-Term
4. Nerve Growth Factor

*Corresponding Author: Mohammad Amin Edalatmanesh

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

اثر سدیم بوتیرات در حافظه کاری و سطح بیان سرمی فاکتور رشد عصبی در مدل حیوانی با استرس در دوران بارداری

فروغ اکرمی^{۱،۲}، محمد امین عدالت منش^{۱*}

^۱گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

^۲گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۴ اسفند ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۵ آذر ۱۳۹۴

چکیده

مقدمه: احساس استرس در طی بارداری شایع می‌باشد و برخی زنان باردار میزانی از سطح اضطراب را تجربه می‌کنند. استرس قبل از تولد، فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال در نوزادان و اثرات گیرنده‌های گلیکوکورتیکوئید در هیپوکامپ را تغییر می‌دهد. بسیاری از محققان مهارکننده‌های هیستون داستیلازی را به‌عنوان یک گروه جدیدی از داروها که شکل‌گیری حافظه بلندمدت را بهبود می‌بخشند، توصیف کرده‌اند. این داروها می‌توانند حافظه در حیوانات طبیعی همچنین در حیوانات با اختلالات مغزی را بهبود ببخشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظت‌کنندگی عصبی سدیم بوتیرات به‌عنوان یک مهارکننده هیستون داستیلازی بر بهبود عملکرد شناختی در نوزادان موش صحرایی تازه متولد شده از مادر تحت استرس بود. **مواد و روش‌ها:** ۱۵ موش صحرایی ماده بارداری، شوک کف پا را (۵ بار در روز و در شدت جریان ۱ میلی‌آمپر و فرکانس ۵۰ میلی‌هرتز با فواصل ۳ دقیقه به مدت ۲ ثانیه) بین روز ۱۲ تا ۱۸ از بارداری دریافت کردند. نوزادان متولد شده از این مادران در سه گروه درمان شامل شوک، شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ گرم در هر لیتر و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ گرم در هر لیتر طبقه‌بندی شدند. نوزادان متولد شده از مادرانی که تحت هیچ شوکی در دوران بارداریشان نبودند، به‌عنوان گروه کنترل استفاده شدند. برای ارزیابی حافظه کاری آزمون ماز Y در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از زایمان انجام شد. سپس سطح سرمی فاکتور رشد عصبی با ELISA اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** رفتارهای تناوبی در گروه شوک به طور معنی‌داری کاهش یافت. یک افزایش معنی‌داری در گروه دریافت‌کننده سدیم بوتیرات در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. به‌علاوه تجویز سدیم بوتیرات، سطح سرمی فاکتور رشد عصبی را افزایش داد. حافظه کاری و سطح سرمی فاکتور رشد عصبی در مدل استرس شوک کف پا کاهش یافت. **نتیجه‌گیری:** تجویز سدیم بوتیرات یک اثر محافظت‌کنندگی عصبی را احتمالاً از طریق افزایش فاکتور رشد عصبی نشان داد و ممکن است عملکرد شناختی نوزادان با استرس پیش از تولد را بهبود ببخشد.

کلید واژه‌ها:

۱. بارداری
۲. اسید بوتیریک
۳. حافظه کوتاه مدت
۴. فاکتور رشد عصبی

* نویسنده مسئول: محمد امین عدالت منش

آدرس الکترونیکی: amin.edalatmanesh@gmail.com

مقدمه

استرس، ترشحات هورمونی به‌ویژه ترشحات خاص غده هیپوفیز و غده فوق کلیوی را شدت می‌بخشد و موجب فعالیت سیستم عصبی خودکار می‌شود. گاهی نیز اضطراب یک فرد تنها روی خودش اثر ندارد، بلکه زندگی آینده یک کودک را نیز به خطر می‌اندازد (۱). وضع جسمی مادر در کنار تغییرات هورمونی و نگرانی‌های ناشی از پدیده‌های ناشناخته دوران بارداری، این دوران را به پراسترس‌ترین دوران زندگی زنان تبدیل می‌کند (۲). افزایش استرس مادری، با افزایش واضح در میزان هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی^۱ و نورآدرنالین گردش خون همراه است که این مهم، منجر به تحریک ترشح هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (CRH)^۲ جفتی شده که سبب اختلال در سیستم هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین جنین می‌شود و تکامل جنینی را به تأخیر می‌اندازد (۳).

استرس بارداری باعث تغییر در فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA)^۳ فرزندان شده و گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی هیپوکامپ را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تعامل بین محور HPA و هیپوکامپ در هیپوکامپ نقش مهمی را از طریق سیستم کولینرژیک^۴ در حافظه و یادگیری ایفاء می‌کند (۴). استرس بارداری، آزادسازی استیل کولین در هیپوکامپ را افزایش داده و باعث مهار نفوذ گیرنده‌های کولینرژیک در فعالیت محور HPA و در نتیجه، تنظیم کمتر گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی هیپوکامپ می‌شود (۵). استرس بارداری باعث کاهش محل‌های اتصال HT-5^۵ در هیپوکامپ و در نتیجه سرکوب فیدبک منفی از گیرنده‌های کورتیکواستروئید در هیپوکامپ می‌شود (۶). در شرایط استرس‌زا، غلظت کورتیزول مادر می‌تواند به صورت غیرطبیعی بالاتر رود. این افزایش بیش از حد کورتیزول مادر که بیشتر توسط جفت به فرم فعال (کورتیزون) تبدیل می‌شود و غلظت آن در جنین بالا می‌رود، می‌تواند رشد بالقوه جنین را تغییر دهد (۷).

بر اساس مطالعات حیوانی، قرار گرفتن در معرض سطوح بالای کورتیزول در جنین باعث تأخیر یا تغییر دادن رشد و توسعه سلول‌های عصبی در مغز و در نتیجه کوچک‌تر شدن اندازه هیپوکامپ می‌شود (۸). توانایی شناختی بزرگسالان تحت تأثیر استرس قبل از تولد است. هم استرس حاد و هم تکرار استرس مادران باعث کاهش یادگیری فرزندان در بزرگسالی می‌شود (۹). در این

فرزندان، سطح گیرنده‌های کورتیکواستروئید هیپوکامپ کاهش می‌یابد (۱۰). Sandi و همکارانش فرضیه آشکار گلوکوکورتیکوئید را مطرح و پیش‌بینی کردند که ناحیه هیپوکامپ، در نتیجه قرار گرفتن در معرض تجمعی از سطوح کورتیکوسترون، دچار آسیب شده است (۱۱). موش‌های صحرایی دریافت‌کننده کورتیکوسترون در آزمون‌های شناختی نسبت به گروه کنترل در ماز Y^۶ شرایط وخیم‌تری داشتند (۱۲). هیپوکامپ نقش بسیار مهمی در یادگیری و حافظه فضایی دارد. اعمال استرس در دوران بارداری، باعث تغییرات ریخت‌شناسی^۷ و پاتولوژیک در نورون‌های مغزی، به‌خصوص هیپوکامپ شده و این اختلال یادگیری وابسته به هیپوکامپ، با اختلال در عملکرد محور HPA نیز، مرتبط است. اعمال استرس در هفته نهایی حاملگی باعث عدم نورون‌زایی در هیپوکامپ جنین می‌شود؛ بنابراین، استرس، هم در اوایل و هم در مرحله بعد از زندگی جنینی، ممکن است باعث اختلالات شناختی در حیوانات شده و سطح NGF^۸، BDNF^۹ و GDNF^{۱۰} را کاهش دهد (۱۳).

نوروتروفین‌ها علاوه بر آنکه برای تکامل صحیح سیستم عصبی در مهره‌داران لازم می‌باشند برای بقاء (نگهداری و ترمیم) نورون‌ها نیز ضروری‌اند؛ همچنین در روند بیماری‌های تحلیل برنده عصبی^{۱۱} نیز دخالت دارند و ممکن است باعث درمان برخی از آن‌ها گردند (۱۴).

خانواده نوروتروفین‌ها شامل پروتئین‌های شبیه به هم مثل NGF، BDNF، NT-3^{۱۲} و NT-4، 5^{۱۳} می‌باشند که هر کدام به گیرنده‌های تیروزین کیناز باند می‌شوند. مثل NGF که به TrkA^{۱۴} باند می‌شود. وقفه در بیان BDNF، NGF و یا تغییر در سطح گیرنده‌های آن‌ها ممکن است باعث آسیب به تشکیل حافظه و تحلیل رفتن نورون‌ها شود. NGF فاکتور رونویسی است که در تکوین و ایجاد نورون‌های سیناپسی و حسی مؤثر است (۱۵). NGF در تمایز، رشد و بقای سلول‌های عصبی مرکزی و محیطی دخالت دارد که این فعالیت زیستی را از طریق اتصال به ۲ گیرنده TrkA (گیرنده تیروزین کیناز) و P75 (یک گیرنده با میل ترکیبی کم که می‌تواند به دیگر نوروتروفین‌ها متصل شود) اعمال می‌کند (۱۶).

در سیستم عصبی مرکزی، بالاترین مقدار NGF به ترتیب در قشر مغزی^{۱۴} و هیپوکامپ است که مناطق هدف اصلی برای سلول‌های عصبی کولینرژیک می‌باشند و سپس در هسته‌های قاعده‌ای و سپتوم میانی تولید می‌شود (۱۷). اثرات استرس‌های متنوع

¹ Glucocorticoids

² Corticotropin-releasing hormone

³ Hypothalamus-pituitary-adrenal

⁴ Cholinergic

⁵ 5-Hydroxytryptamin

⁶ Y maze

⁷ Morphology

⁸ Nerve growth factor

⁹ Brain derived neurotrophic factor

¹⁰ Glial cell line-derived neurotrophic factor

¹¹ Neurodegeneration

¹² Neurotrophin-3

¹³ Tropomyosin-related kinase A

¹⁴ Cortex

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق از زاده‌های نسل اول ۱۵ سر موش صحرایی ماده بالغ باکره نژاد اسپراگ داوولی با میانگین وزنی 10 ± 180 گرم و با محدوده سنی ۲ ماهه استفاده شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد دمایی 2 ± 23 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 10 ± 50 و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. کلیه مراحل کار با حیوانات، طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز انجام شد. به‌منظور جفت‌گیری ماده‌های باکره، در هر قفس یک موش صحرایی نر دو ماهه با میانگین وزنی 10 ± 220 گرم قرار داده شد.

پس از ۱۲ ساعت اولین نمونه واژینال از موش‌های صحرایی ماده جهت تعیین حضور اسپرماتوزوآ و روز صفر بارداری به دست آمد. در روز ۱۲ تا ۱۸ بارداری شوک کف پا، روزانه ۵ بار و در ساعت‌های مختلف و با شدت جریان ۱ میلی‌آمپر، فرکانس ۵۰ میلی‌هرتز، فواصل ۳ دقیقه‌ای و مدت‌زمان ۲ ثانیه القاء شد. نوزادان نر و ماده متولد شده از این مادران در ۳ گروه شوک، شوک + سدیم بوتیرات (۳۵/۰) (MERCK) و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ که به ترتیب سدیم بوتیرات را با غلظت‌های ۳۵/۰ و ۳/۵ گرم بر لیتر دریافت نمودند، قرار گرفتند. همچنین، نوزادان نر و ماده به دنیا آمده از مادران سالم که تحت هیچ‌گونه شوک در دوران بارداری نبودند، به‌عنوان گروه‌های کنترل استفاده شدند.

حیوانات تا روز زایمان در شرایط استاندارد نگهداری شدند. به‌منظور بررسی اثر حمایت‌کننده عصبی سدیم بوتیرات، تیمار نوزادان با سدیم بوتیرات بلافاصله بعد از تولد آغاز گردید و تا ۶۰ روزگی ادامه داشت. مقادیر ۳۵/۰ و ۳/۵ گرم بر لیتر سدیم بوتیرات به همراه آب آشامیدنی در اختیار نوزادان قرار گرفت (۲۴). به‌منظور سنجش حافظه کاری، در سنین ۳۰ و ۶۰ روزگی از آزمون ماز Y استفاده شد. سپس، سطح سرمی فاکتور رشد عصبی به روش الیزا ارزیابی گردید.

آزمون ماز Y (ارزیابی حافظه کاری)

این آزمون برای بررسی حافظه کاری حیوان در سطح ساده مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه آزمایشی ماز Y، از ۳ بازو از جنس پلکسی گلاس تشکیل شده است. هر

مصنوعی بر مادران باردار، جهت بررسی آثار آن در فرزندان، مانند بی‌حرکتی، شوک الکتریکی، PSD^{۱۵} و غوطه‌ور کردن در آب سرد، نیز متنوع بوده (۱۸) و به نوع، مدت‌زمان اعمال استرس و شدت آن بستگی دارد (۱۹). محققان متعددی مهارکننده‌های هیستون داستیلازی (HDACi)^{۱۶} را به‌عنوان یک رده از داروهایی که باعث بهبود شکل‌گیری حافظه بلندمدت می‌شود، توصیف کرده‌اند (۲۰). از آنجا که نقش احتمالی استیل‌اسیون هیستون در انواع رفتارها و بیماری‌ها و ارتباط آن‌ها با مهارکننده‌های هیستون داستیلازی در حیوانات مورد بررسی قرار گرفته است، بر اساس مطالعه‌ای، مهارکننده‌های هیستون داستیلازی می‌توانند اختلالات حافظه مربوط به پیری را در فاز تثبیت اولیه شکل‌گیری حافظه، بهبود بخشند (۲۱).

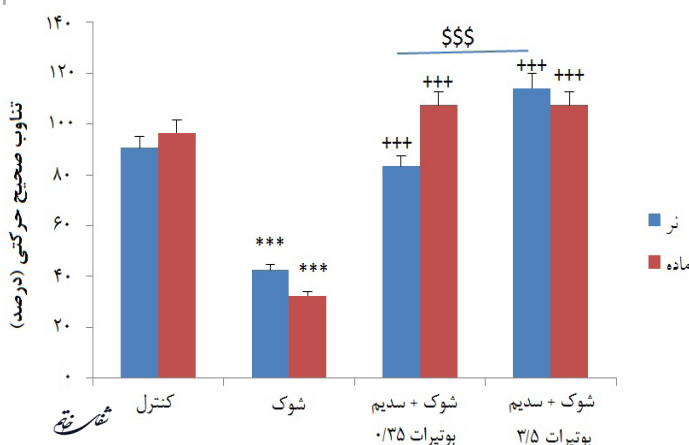
شکل‌گیری حافظه شامل تغییر در بیان ژن‌های عصبی است. هیستون استیل ترانسفرازها (HATs)^{۱۷} و هیستون داستیل‌ازها (HDACs)^{۱۸} نقش مخالف هم را در اصلاح کروماتین ایفاء می‌کنند. به‌طور کلی HDACi ها باعث تعدیل و تنظیم فعالیت‌های رونویسی از طریق سست کردن ساختار DNA می‌شوند؛ و در این حالت ۵-۲٪ از ژن‌ها به صورت انتخابی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۲۲). HDACi ها به ۴ گروه تقسیم می‌شوند: (۱) اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه: سدیم بوتیرات (SB)^{۱۹} و والپروئیک اسید (VPA)^{۲۰} (۲) هیدروکسامیک اسیدها^{۲۱}، تریکوستاتین A (TSA)^{۲۲} و SAHA^{۲۳} (۳) تتراپتیدهای حلقوی^{۲۴} (۴) بنزآمیدها^{۲۵} (۲۳).

بوتیرات سدیم ترکیبی با فرمول C_3H_7COO می‌باشد. تیمار سلول‌ها با سدیم بوتیرات باعث افزایش استیل‌اسیون هیستون شده و بوتیرات به‌تنهایی از فعالیت HDAC بازداری می‌کند. سدیم بوتیرات در فاز ۲ مطالعات بالینی قرار دارد که اولین بار در سال ۱۹۴۹ ساخته شد و به همراه VPA به‌عنوان یک داروی ضد صرع شناخته شد. اولین HDACi شناخته شده به همراه TSA بود که با هم به‌تازگی به‌عنوان یک داروی بالقوه در محافظت نورونی، نظر محققان را به خود جلب کرده‌اند (۲۳). از این رو تحقیق حاضر به بررسی اثرات حفاظت عصبی و نوروتروفیک سدیم بوتیرات بر اساس مداخله در مدل استرس قبل از تولد^{۲۶} با دستگاه استیمولاتور^{۲۷} و همچنین تأثیر آن بر افزایش سطح نوروتروفین‌ها و کاهش اختلالات حافظه کاری^{۲۸} به‌عنوان مکانیسم‌هایی در بهبود علایم شناختی می‌پردازد.

¹⁵ Paradoxical sleep deprivation¹⁶ Histone deacetylase inhibitor¹⁷ Histone acetyl transferases¹⁸ Histone deacetylases¹⁹ Sodium butyrate²⁰ Valproic acid²¹ Hydroxamic acids²² Trichostatin A²³ Suberoylanilide hydroxamic acid²⁴ Cyclic tetrapeptides²⁵ Benzamides²⁶ Prenatal²⁷ Stimulator²⁸ Working memory

توکی، افزایش معنی‌داری را در درصد تناوب بین گروه‌های کنترل و شوک در ۳۰ روزگی نشان می‌دهد ($F_{3,36}=66/843$ در جنس نر و $F_{3,36}=89/415$ در جنس ماده). بین این دو گروه اختلاف معنی‌دار در هر دو جنس مشاهده شد ($P<0/001$)؛ بنابراین نوزادان گروه شوک که مادرانشان در دوران بارداری در معرض استرس قرار گرفته‌اند، درصد تناوب کمتری را در ۳۰ روزگی نشان می‌دهند. ولی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل با گروه‌های شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ (در جنس نر $P=0/602$ و در جنس ماده $P=0/432$) و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ (در جنس نر $P=0/536$ و در جنس ماده $P=0/503$) دیده نشد. در حالی که بین گروه شوک و گروه‌های شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/001$). از طرفی، مقایسه دو گروه تیمار با هم نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ و گروه شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ در جنس نر بوده است ($P<0/001$) - (نمودار ۱).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد که درصد تناوب در ۶۰ روزگی و در گروه کنترل نسبت به گروه شوک ($F_{3,36}=41/874$ در جنس نر و $F_{3,36}=34/901$ در جنس ماده) دارای اختلاف معنی‌دار در هر دو جنس بوده است ($P<0/001$). همچنین، بین گروه شوک با گروه‌های شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ نیز در هر دو جنس اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($P<0/001$). ولی بررسی‌ها نشان می‌دهد که با افزایش دوز تا ۶۰ روزگی اختلاف معنی‌داری بین دو گروه دریافت‌کننده سدیم بوتیرات مشاهده نشد (نمودار ۲).



نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد تناوب در گروه‌های مختلف در ۳۰ روزگی: بین گروه کنترل و شوک اختلاف معنی‌دار در سطح ($***P<0/001$) در هر دو جنس نر و ماده وجود دارد. همچنین بین گروه شوک با گروه‌های تیمار اختلاف معنی‌دار در هر دو جنس در سطح ($***P<0/001$) مشاهده شد و نیز بین گروه‌های شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ اختلاف معنی‌دار در جنس نر و در سطح ($***P<0/001$) دیده شده است.

بازوی ماز Y، ۶۰ سانتی‌متر طول، ۱۵ سانتی‌متر پهنا و ۱۵ سانتی‌متر ارتفاع دارد. بازوها به صورت زاویه‌دار نسبت به یکدیگر به گونه‌ای قرار گرفته‌اند که در وسط، تشکیل یک مثلث متساوی‌الاضلاع می‌دهند. ماز Y برای سنجش حافظه کاری و اندازه‌گیری تمایل موش‌های صحرایی برای کشف محیط‌های جدید، در نوزادان نر و ماده گروه‌های مختلف (در ۳۰ و ۶۰ روزگی) استفاده گردید.

موش‌های صحرایی به طور معمول ترجیح می‌دهند به بررسی بازوی جدید بپردازند و تمایلی برای بازگشت به بازویی که قبلاً بازدید کرده‌اند ندارند، مگر آنکه فراموش کرده باشند. بازوهای ماز با حروف A، B و C نشانه‌گذاری شدند. برای انجام این آزمون موش صحرایی در قسمت انتهایی یکی از بازوها قرار داده و به حیوان اجازه داده شد در بازه زمانی ۵ دقیقه در بازوها جا به جا شود. ورود حیوان به بازو، زمانی است که نیمه بدن او به طور کامل در آن بازو قرار گیرد. رفتار تناوبی به عنوان ورودهای موفق و پشت سر هم به داخل همه بازوها در نظر گرفته شد (۲۵).

سنجش سطح سرمی فاکتور رشد عصبی

پس از به اتمام رسیدن مطالعات رفتاری در پایان ۶۰ روزگی، جهت تهیه نمونه سرم خون، حیوانات با تزریق درون صفاقی مخلوطی از دو داروی کتامین هیدروکلراید (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. خون‌گیری به طور مستقیم از قلب انجام شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه، از نمونه سرم‌های آماده شده در سنجش میزان نوروتروفین NGF استفاده شد. سنجش میزان سرمی NGF به روش الایزا و به کمک کیت شرکت Shanghai Crystal Day Biotech کشور چین (CAT.NO:E0539Ra) انجام گردید.

محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و پیرایش ۲۲ انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش داده شدند. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد نظر از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی و جهت مقایسه اثر جنسیت از روش T-test مستقل استفاده شد. از نظر آماری مقادیر $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آزمون ماز Y

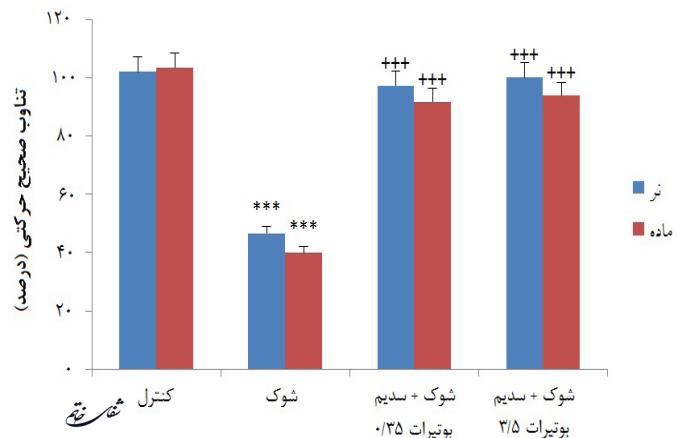
نتایج حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر از سدیم بوتیرات به منظور درمان اختلالات ایجاد شده به دنبال استرس مادری استفاده گردید، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تیمار با سدیم بوتیرات باعث بهبود اختلالات حافظه ناشی از استرس مادری می‌شود. استرس قبل از تولد در جوندگان و انسان منجر به بروز پاسخ‌های رفتاری و تغییر غدد درون‌ریز می‌شود (۲۶). استرس شوک کف پا به موش‌های صحرایی باردار که در معرض طولانی‌مدت کورتیکوسترون قرار گرفتند منجر به افزایش فعالیت عملکردی مغزی آن‌ها در مناطق لیمبیک و پارالیمبیک (آمیگدال، هیپوکامپ شکمی، اینسولا و جسم مخطط شکمی، هسته اکومبیس)، هسته لوکوس سرولئوس و ماده سفید می‌شود (۲۷). مناطق مختلف که مستعد ابتلاء به استرس بارداری هستند شامل: هیپوکامپ، آمیگدال، جسم پینه‌ای، بخش قدامی و قشر مغز، مخچه و هیپوتالاموس می‌باشد. رستم خانی و همکارانش در مطالعه‌ای برای اعمال استرس به مادران از این روش استفاده نمودند و نتایج به دست آمده مبنی بر این بود که استرس مزمن حاملگی شوک پا، باعث افزایش غلظت کورتیکوسترون پلاسما مادر و کاهش وزن فرزندان هنگام تولد می‌شود (۲۸).

هیپوکامپ بخشی از ساختار عصبی است که با حافظه کاری در ارتباط است. حافظه کاری یک بخش بسیار مهم برای تمام کارهای شناختی است و امکان انجام عملکردهای شناختی بالاتر همچون زبان، فهم و استدلال را فراهم می‌کند (۲۷). لوب گیجگاهی^{۲۹} داخلی، در حافظه کاری درگیر است. شکنج دنداندار (DG)^{۳۰} که حاوی سلول‌های گرانولی است، منطقه خاصی در هیپوکامپ بوده که باعث فعال کردن و گسترش هسته‌های نورونی در بزرگسالی شده و در حافظه و یادگیری دخالت دارد. نورون‌زایی در مناطق CA1-3 هیپوکامپ در جوندگان در طول آخرین روزهای بارداری اتفاق می‌افتد (۲۹). عملکرد حافظه کاری با قشر پیشانی^{۳۱} مغز نیز مرتبط است. قشر پیشانی به‌عنوان جایگاهی برای میلین‌سازی و تراکم سیناپسی شناخته شده است (۳۰).

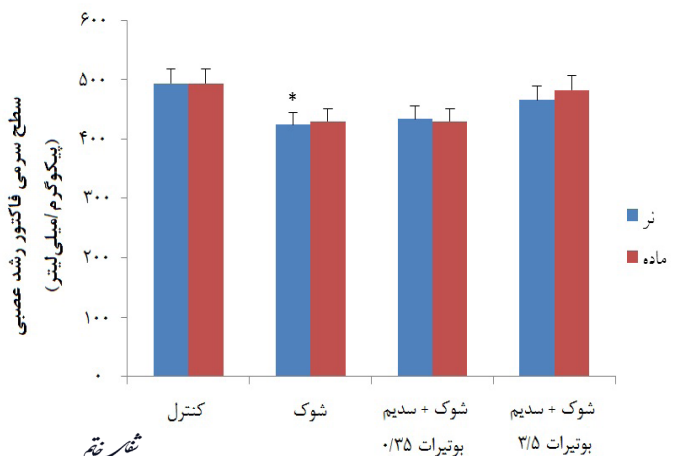
Segal و همکارانش نشان دادند استرس قبل از تولد، باعث افزایش پاسخ rCBF^{۳۲} در بخش شکمی هیپوکامپ که مربوط به پردازش عواطف و تعادل است می‌شود؛ درحالی‌که باعث کاهش در بخش پشتی هیپوکامپ که مربوط به عملکرد شناختی است می‌گردد. قرار گرفتن در معرض استرس بارداری، باعث کاهش پاسخ rCBF^{۳۲} در بخش پشتی هیپوکامپ و منطقه CA1 و DG می‌شود (۳۱). مطالعه Viltart و همکارانش بیان داشتند،



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد تناوب در گروه‌های مختلف در ۶۰ روزگی: بین گروه کنترل با شوک در هر دو جنس اختلاف معنی‌داری در سطح $P < 0.001$ (***) وجود دارد، همچنین بین گروه شوک با گروه‌های شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ اختلاف معنی‌داری در سطح $P < 0.001$ (***) مشاهده شد. ولی بین گروه‌های تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

سنجش سطح سرمی فاکتور رشد عصبی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین سطح سرمی فاکتور رشد عصبی نشان داد بین گروه کنترل و شوک $F_{3,36} = 34/857$ (اختلاف معنی‌دار، تنها در جنس نر وجود دارد $P < 0.05$). ولی در جنس ماده هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P = 0.62$). همچنین، بین گروه کنترل با گروه‌های شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ هیچ اختلاف معنی‌داری دیده نشد. مقایسه گروه شوک نیز با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد و در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده سدیم بوتیرات نیز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۳). در این بررسی بین جنس نر و ماده در هیچ یک از گروه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.



نمودار ۳- مقایسه میانگین سطح سرمی فاکتور رشد عصبی: بین گروه کنترل و گروه شوک در جنس نر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ وجود دارد. ولی در جنس ماده هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین، بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها هیچ اختلاف معنی‌داری دیده نشد. بین گروه شوک با گروه‌های شوک + سدیم بوتیرات ۰/۳۵ و شوک + سدیم بوتیرات ۳/۵ نیز اختلاف معنی‌دار وجود نداشت و گروه‌های آزمون هم اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند.

²⁹ Temporal

³⁰ Dentate gyrus

³¹ Frontal

³² Regional cerebral blood flow

ولی نسبت به گروه‌های آزمون، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. سلول‌های بنیادی عصبی در ناحیه SVZ^{۳۵} به طور بالقوه دارای توان تولید نورون‌های جدید و الیگودندروسیت‌ها می‌باشند. سدیم بوتیرات باعث تکثیر سلولی و نورون‌زایی در نیچ نورونی مانند ناحیه زیر بطنی و شکنج دنداندار در مناطقی مانند قشر و جسم مخطط می‌شود. (۲۶). عملکرد سدیم بوتیرات به‌عنوان یک داروی ضدافسردگی و بهبود شناخت، با افزایش در بیان نوروتروفیک در مدل محرومیت مادران و استرس‌های مزمن خفیف شناخته شده است (۳۶).

Lattal و همکارانش بیان کردند، SB قادر به بازگشت کاهش عوامل نوروتروفیک ناشی از استرس و بازگشت اختلال حافظه در سطوح هیپوکامپ از موش صحرایی می‌باشد همچنین قادر به جلوگیری در اختلال حافظه و برقراری مجدد بیان نوروتروفین‌های هیپوکامپ در مننژیت پنوموکوکی تجربی بوده است (۳۷).

مشاهدات Ferrante و همکارانش، بیان داشت که سدیم بوتیرات و SAHA^{۳۶} باعث کاهش علایم بیماری هانتینگتون در مدل موش می‌شوند (۳۸). درمان دارویی وابسته به دوز با سدیم بوتیرات به طور قابل توجهی باعث تنظیم رونویسی و بقاء آن، بهبود وزن بدن، عملکرد موتور و تأخیر در عوارض نوروپاتولوژیک در مدل موش‌های تراریخته^{۳۷} از بیماری هانتینگتون می‌شود. مطالعات Li و همکارانش، حاکی از آن است که سطح بیان آلفا و بتا گلوبین و MAP کیناز فسفاتاز-۱ در درمان به وسیله SB در مدل هانتینگتون افزایش یافت که بیانگر بهبود فسفریلایسیون اکسیداتیو و تنظیم رونویسی بود (۳۹). استرس هم در اوایل زندگی و هم بعد از آن موجب اختلال شناختی در حیوانات و کاهش سطح NGF-BDNF-GDNF می‌شود (۱۳).

درمان با سدیم بوتیرات باعث بهبود حافظه در سطح هیپوکامپ و بهبود عوامل نوروتروفین و اثرات ضدافسردگی می‌گردد. بوتیرات به علت اینکه به آسانی قابل رسیدن به مغز است به‌عنوان بهترین ترکیب در مطالعات بالینی مد نظر قرار می‌گیرد (۲۳). مطالعه حاضر نشان داد که استفاده درازمدت از سدیم بوتیرات به‌عنوان یک مهارکننده هیستون داستیلازی می‌تواند به صورت وابسته به دوز، میزان اختلال در حافظه کاری ناشی از استرس دوران بارداری را کاهش دهد. هر چند تغییر معنی‌داری در سطح فاکتور رشد مغزی گروه‌های تیمار نسبت به گروه شوک دیده نشد.

استرس بارداری باعث مهار نورون‌زایی در DG و کاهش یادگیری و تغییر بیان c-fos می‌شود (۳۲، ۳۳). Sapolsky و همکارانش بیان کردند، غلظت بالای کورتیزول از رشد سیستم عصبی ممانعت می‌کند و گلوکوکورتیکوئیدها دارای اثرات نوروتوکسیک در سلول‌های منطقه CA3 هیپوکامپ می‌باشند و در نورون‌های ناحیه هیپوکامپ باعث مرگ نورونی می‌شوند (۳۴-۳۶) بنابراین استرس بارداری باعث کاهش تراکم گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید در هیپوکامپ و قشر پیش-پیشانی می‌شود که با کاهش حافظه کاری در ارتباط است.

در مطالعه حاضر نیز که از ماز Y برای ارزیابی حافظه کاری استفاده شد، بین گروه شم و کنترل هم در یک ماهگی و هم در دو ماهگی اختلاف معنی‌داری وجود داشت، همچنین بین گروه شم با گروه‌های دریافت کننده سدیم بوتیرات اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. نوروتروفین‌ها علاوه بر آنکه برای تکامل صحیح CNS^{۳۴} در مهره‌داران لازم می‌باشند، برای بقاء (نگهداری و ترمیم) نورون‌ها نیز ضروری‌اند، در بخش CNS، بالاترین مقدار NGF در بخش قشر مغزی و در هیپوکامپ (مناطق هدف اصلی برای سلول‌های عصبی کولینرژیک) یافت شده است و به ترتیب در هسته‌های قاعده‌ای و سپتوم میانی تولید می‌شود (۱۷).

Cui و همکارانش نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض آلودگی صوتی می‌تواند منجر به کاهش توانایی‌های شناختی (حافظه)، تغییر در انتقال دهنده‌های عصبی هیپوکامپ (استیل کولین) و کاهش فسفریلایسیون پروتئین تائو (Tau) در هیپوکامپ گردد. نتایج نشان داده شده حاکی از این است که استرس هم در اوایل و هم در مرحله بعد از زندگی جنینی ممکن است باعث اختلالات شناختی در حیوانات شود و سطح NGF، BDNF، GDNF را کاهش دهد (۱۳). یافته‌های حاصل از مطالعات حیوانی Haettig و همکارانش، بیان داشتند که عدم مراقبت کافی مادران در طول توسعه رشد فرزندان باعث تغییر وضعیت متیلاسیون در محل‌های اتصال NGF1-A در منطقه پروموتور Nr3cl (مسئول کنترل بیان گیرنده گلوکوکورتیکوئید هیپوکامپ) می‌شود، و از این فرضیه حمایت می‌کند که اثرات اپی‌ژنتیک به طور مستقیم مناطقی از سیستم عصبی که با رشد و توسعه روانی درگیر هستند را تحت تأثیر قرار دهد.

در مطالعه حاضر نیز سطح بیان NGF در گروه شم و فقط در جنس نر با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار دارد

^{۳۳} Cerebral blood flow

^{۳۴} Central nervous system

^{۳۵} Sub ventricular zone

^{۳۶} Suberoylanilide hydroxamic acid

^{۳۷} Transgenic

منابع

1. Fuchs E, Flügge G, Ohl F, Lucassen P, Vollmann-Honsdorf GK, Michaelis T. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alternation in the tree shrew hippocampus. *Physiol Behav.* 2001; 73(3): 285-91.
2. Corraze J, Mansour M, Dadsetan P. An outline of General Psychopathology (Mental Diseases). Tehran. ROSHD Editor. 2002.
3. Mclean M, Smith R. Corticotropin releasing hormone and human parturition. *Reproduction.* 2001; 16(8): 493-501.
4. Messer WSJ. Cholinergic agonists and the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2(4): 353-8.
5. Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ. Stressed-out or in (utero)? *Trends Neurosci.* 2002; 25(10): 518-24.
6. Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci.* 1998; 16(3-4): 209-16.
7. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007; 3(6): 479-88.
8. Coe CL, Kramer M, Czéh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, et al. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry.* 2003; 54(10): 1025-34.
9. Weller A, Glaubman H, Yehuda S, Caspy T, Benuria Y. Acute and repeated gestational stress affect offspring learning and activity in rats. *Physiol Behav.* 1988; 43(2): 139-43.
10. Henry C, Kabbaj M, Simon H, LeMoal M, Maccari S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol.* 1994; 6(3): 341-5.
11. Sandi C, Loscertales M, Guaza C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci.* 1997; 9(4): 637-42.
12. Vallée M, MacCari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, Mayo W. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci.* 1999; 11(8): 2906-16.
13. Cui B, Wu M, She X, Liu H. Impulse noise exposure in rats causes cognitive deficits and changes in hippocampal neurotransmitter signaling and tau phosphorylation. *Brain Res.* 2012; 1427: 35-43.
14. Friedman WJ. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci.* 2000; 20(17): 6340-6.
15. Gadiant RA, Cron KC, Otten U. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett.* 1990; 17: 335-40.
16. Chae CH, Jung SL, An SH, Jung CK, Nam SN, Kim HT. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 2011; 67(2): 235-41.
17. Cimino M, Cattabeni F, Di Luca M, Peruzzi G, Andena M, Tirassa P, et al. Levels of NGF, p75NGFR and ChAT immunoreactivity in brain of adult and aged microencephalic rats. *Neurobiol Aging.* 1996; 17(1): 137-42.
18. Velazquez-Moctezuma J, Dominguez Salazar E, Cruz Rueda ML. The effect of prenatal stress on adult sexual behavior in rats depends on the nature of the stressor. *Physiol Behav.* 1993; 53(3): 443-8.
19. Fujioka T, Fujioka A, Tan N, Chowdhury GM, Mouri H, Sakata Y, et al. Mild prenatal stress enhances learning performance in the non-adopted rat offspring. *Neurosci.* 2001; 103(2): 301-7.
20. Bilang-Bleue A, Ulbricht S, Chandramohan Y, DeCarli S, Droste SK, Reul JM. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. *Eur J Neurosci.* 2005; 22: 1691-700.
21. Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, et al. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science.* 2010; 328: 753-6.
22. Dash PK, Orsi SA, Moore AN. Histone deacetylase

inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. *Neuroscience*. 2009; 163(1): 1-8.

23. Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR. Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005; 4(1): 41-50.

24. Cummins CL. Characterizing the expression of CYP3A4 and efflux transporters (P-gp, MRP1, and MRP2) in CYP3A4-transfected Caco-2 cells after induction with sodium butyrate and the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Pharm Res*. 2001; 18(8): 1102-9.

25. Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, McEwen BS. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in the female rat. *Brain Res*. 1992; 595(2): 195-200.

26. Haettig J, Stefanko DP, Multani ML, Figueroa DX, McQuown SC, Wood MA. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learn Mem*. 2011; 18(2): 71-9.

27. Baddeley AD. Working memory. New York. Oxford University Press. 1986.

28. Rostamkhani F, Zardooz H, Parivar K, Hayati Roodbari M. Prenatal stress induces metabolic impairment in adolescent male Wistar rat. *Advances in BioResearch*. 2013; 4(1): 5-11.

29. Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol*. 1980; 190(1): 87-114.

30. Yakovlev PL, Lecours AR. The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. Oxford. Blackwell. 1967; p. 3-70.

31. Segal M, Richter-Levin G, Maggio N. Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity:

A hypothesis. *Hippocampus*. 2010; 20(12): 1332-8.

32. Viltart O, Mairesse J, Darnaudéry M, Louvart H, Vanbesien-Mailliot C, Catalani A, et al. Prenatal stress alters Fos protein expression in hippocampus and locus coeruleus stress-related brain structures. *Psychoneuroendocrinology*. 2006; 31(6): 769-80.

33. Connolly JD, Goodale MA, Menon RS, Munoz DP. Human fMRI evidence for the neural correlates of preparatory set. *Nat Neurosci*. 2002; 5(12): 1345-52.

34. Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*. 1990; 10(9): 2897-902.

35. Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC. Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. *J Neurosci Res*. 2006; 83: 787-800.

36. Poland RE, Cloak C, Lutchmansingh PJ, McCracken JT, Chang L, Ernst T. Brain N-acetyl aspartate concentrations measured by H MRS are reduced in adult male rats subjected to perinatal stress: preliminary observations and hypothetical implications for neurodevelopmental disorders. *J Psychiatr Res*. 1999; 33(1): 41-51.

37. Lattal KM, Barrett RM, Wood MA. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci*. 2007; 121(5): 1125-31.

38. Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 2000; 20: 4389-97.

39. Li J, Gorospe M, Hutter D, Barnes J, Keyse SM, Liu Y. Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(23): 8213-24.