

بررسی اثرات محافظتی ملاتونین بر اختلال حافظه ناشی از استرس قبل از تولد در نوزادان رات

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱/۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۳

مینا کیاروستا^۱، علی حسینی شریف^۲
آباد^{۳*}، محمد ربانی^۲

^۱ دکترای عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
^۲ دانشکده فارماکولوژی- سسم شناسی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
^۳ استاد گروه فارماکولوژی - سسم شناسی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: زنان باردار انواع مختلفی از استرس را تجربه می‌کنند که بر پرورش‌های فیزیولوژیکی مغز جنین نظیر حافظه تاثیر می‌گذارند. بنابراین استفاده از ترکیبات ایمن در دوران بارداری جهت مقابله با آسیب‌های رفتاری در دوران پس از تولد اهمیت بسزایی دارد. در این مطالعه اثرات تجویز ملاتونین در دوران بارداری بر آسیب حافظه ناشی از استرس دوران بارداری در نوزادان رات بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی رات‌های ماده باردار بصورت تصادفی در گروه کنترل، گروه تحت استرس، و چهار گروه دریافت کننده ملاتونین بترتیب دوزهای ۵، ۱۰ و ۵۰ میلیگرم/کیلوگرم بهمراه استرس محدود کننده قرار گرفتند. گروه‌های تحت استرس محدود کننده حرکتی از روز ۱۰ آم تا ۲۱ م بارداری روزانه متحمل استرس می‌شدند. ملاتونین در این دوره، روزانه به شکل داخل صفاقی، قبل از تحمیل استرس تزریق می‌شد. یک ماه پس از تولد نوزادان، حافظه آنها به روش تست تشخیص شی جدید و با اندازه گیری فاکتورهای "تمایز" و "تشخیص" بررسی گردید.

یافته‌ها: دوزهای ۵ و ۱۰ میلیگرم/کیلوگرم ملاتونین تفاوت معنی داری در فاکتورهای تمایز و تشخیص در مقایسه با گروه تحت استرس نشان نداد لیکن دوزهای ۵۰ میلیگرم/کیلوگرم ملاتونین این فاکتورها را بمیزان قابل توجهی افزایش دادند ($P<0.001$). بین دوزهای ۱۰ و ۵۰ از این نظر اختلاف معنی داری وجود نداشت.

نتیجه گیری: اگرچه استرس محدود کننده حرکتی در دوران بارداری منجر به اختلال حافظه در نوزادان یک ماهه شد ولی دوزهای بالای ملاتونین به خوبی از ایجاد این آسیب جلوگیری کرد.

*نویسنده مسئول:

دانشکده فارماکولوژی- سسم شناسی،
دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان،
اصفهان، ایران

۰۹۱۲۲۵۱۴۴۷۳
Email:hosseini_a@pharm.mui.ac.ir

مقدمه

آپوپتوز و از بین رفتن نورون ها را بدنبال دارد.^{۱۰-۱۱}

حافظه و یادگیری دو مورد از پروسه های مهم مغزی هستند که در نوزادان مورد توجه می باشد و شکل گیری صحیح آنها می تواند روی بقیه فعالیت های فرد و مهارت انجام کارها نیز تاثیر بگذارد. اهمیت این فرایندها بحدی است که حتی در صورت عملکرد نرمال کودک در این موارد، والدین در صدد تجویز موادی جهت تقویت یادگیری و حافظه فرزند خود برمی آیند. از مراکزی که در یادگیری و حافظه فرد نقش دارد، هیپوکامپ و قشر معز می باشد. این دو مرکز می توانند شدیداً متأثر از میزان کورتیکواستروئیدهای سرمی قرار گیرند.^{۱۲}

با توجه به نکات ذکر شده فوق مبنی بر شیوع استرس دوران بارداری، تاثیر شدت یافته آن در این دوران بر مغز جنین، اختلال فعالیت های رفتاری این نوزادان، اگر بتوان دارویی ایمن برای مادر و جنین را یافت که از عوارض بی بدیل استرس در دوران بارداری بکاهد، اهمیت ویژه و کاربردی دارد.

ملاتونین (۵-متوكسی-N-استیل تریپتامین) یک هورمون عصبی چربی دوست می باشد که توسط غده پینه ال در طول شب سنتز و ترشح می شود^{۱۳}. ملاتونین نخستین بار توسط Aaron Lener در اوخر سال ۱۹۵۰ شناخته شد، که در بیشتر مهره داران بصورت ریتمیک سطح و فعالیت آن در شب افزایش می یابد، به همین دلیل به آن «هورمون شبانه» می گویند. این هورمون نقش خواب آوری و ضد اضطرابی را در بدن ایفا می کند^{۱۴} و اثرات خود را با تحریک گیرنده های مخصوص به خود که شامل MT1 و MT2 می باشد، بر جای می گذارد.^{۱۵} در کنار این عمل ملاتونین، اثرات بارز آنتی اکسیدانی و ضد رادیکال آزاد برای آن متصور هستند که میتواند به عملکرد نوروپروتکتیو منجر شود^{۱۶}. ملاتونین به راحتی از جفت عبور می کند^{۱۷}. لیکن اثرات منفی بر جنین بر جای نمی گذارد و به عنوان ماده ای ایمن در بارداری به حساب می آید.^{۱۸} اگرچه مطالعات وجود دارد که اثرات محافظتی ملاتونین را در مقابل نورو توکسیکانت های مختلف نظیر سرب به اثبات رسانیده است^{۱۹}، ولی شواهدی مبنی بر اثرات مفید آن در دوران بارداری بر عملکرد رفتاری نوزادانی که در دوران جنینی خود در معرض استرس بوده اند، وجود ندارد.

مواد و روش ها

استرس و اختلالات مرتبط با آن، شایع ترین مشکل روانی زنان در دوران بارداری می باشد^{۲۰}. زنان باردار بویژه در جوامع در حال توسعه، تحت تاثیر انواع مختلفی از استرس قرار می گیرند. استرس های درازمدت چه در زنان غیر باردار و چه در زنان باردار باعث اختلالات سیستمیک متنوعی در خود فرد می شود. بعلاوه استرس در دوران بارداری می تواند منجر به اثرات منفی در نوزادان گردد، که برخی از این عوارض مانند کاهش وزن نوزادان، قابل برگشت و برخی همچون اختلالات رفتاری و روانی، ماندگار خواهد بود.^{۲۱} اختلالات بوجود آمده از استرس مزمن می تواند تمام ارگان ها را درگیر کند و منجر به واقعی همچون زخم های گوارشی، سوء هاضمه، افسردگی، تغییرات فشار خون و آریتمی های قلبی، نارسایی کبدی و کلیوی، اختلالات هورمونی و... شود^{۲۲}. یکی از مهمترین تظاهرات ایجاد شده توسط استرس، اثرات مخرب آن بر سیستم عصبی مرکزی و پروسه های فیزیولوژیک آن می باشد که منجر به اختلالات روانی و رفتاری خواهد شد^{۲۳}. این مشکلات اگر چه هم مادر و هم نوزاد را درگیر می کنند، لیکن بدلیل اینکه مغز جنین فعالانه در حال رشد است و در برگیرنده تقسیم و رشد نورون هاست، می تواند تاثیر بیشتری را بپذیرد. این اثرات ممکن است در همان ابتدای تولد قابل رویت باشد و یا اینکه برای تشخیص آن لازم است مدت زمانی سپری شود تا بتوان از روی عدم انطباق فعالیت های نوزاد با الگوی طبیعی، آنها را تشخیص داد. نشان داده شده است که استرس مزمن باعث کاهش تعداد نورون ها، زواید و چین های آنها، سینپاس ها یا به عبارتی کاهش نوروپلاستیستی و همچنین تحلیل بخش هایی از مغز، نظیر هیپوکامپ می شود^{۲۴}. اما این اختلالات می توانند در برگیرنده عملکرد رفتاری و روانی نیز شوند. یکی از پروسه های بسیار مهم که می تواند متأثر از استرس در دوران بارداری شود، قدرت یادگیری و حافظه نوزاد است.^{۲۵} تغییر در میزان هورمون های گلوکوکورتیکوئیدی مادر، اختلال در عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال و بدنبال آن به هم خوردن خواب طبیعی مادر، برخی از علت های اثر منفی استرس بر حافظه نوزاد می باشد.^{۲۶-۲۷} همچنین استرس مزمن می تواند باعث افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیدان و القای استرس اکسیداتیو شود که در صورت عدم درمان، نهایتا

تجمیع شدند. از این نوزادان، ۱۲ نوزاد نر بصورت تصادفی انتخاب گردید و در گروه های مربوطه قرار گرفتند. بدین ترتیب ۶ گروه ۱۲ تایی از نوزادان رات حاصل شد که بترتیب مادران آنها در دوران بارداری در گروه های کترل، استرس و یا دریافت کننده دوزهای ملاتونین بر اساس آنچه در بالا توضیح داده شد، قرار می گرفتند. استرس محدود کننده حرکتی، با استفاده از وسیله محدود کننده مخصوص رات که بشکل یک لوله هست، صورت گرفت. این لوله در قسمت جلویی جهت تهویه و تنفس راحت رات بصورت مشبك است و در قسمت خلفی جهت تنظیم طول با توجه به اندازه رات، دارای تیغه ای متحرک است. در این مطالعه جهت القای استرس، رات ها روزانه برای سه دوره ۴۵ دقیقه ای با فواصل ۱۵ دقیقه، در لوله محدود کننده قرار می گرفتند.

تصورت تکمیلی، یک گروه ۶ تایی از رات های ۱ ماهه سالم بعنوان گروه کترل منفی در نظر گرفته شدند و به آنها نیم ساعت قبل از انجام تست ارزیابی حافظه، ۱ میلیگرم بر کیلوگرم اسکوپولامین بصورت داخل صفاقی تزریق شد. این گروه جهت اعتبار سنجی روش بررسی حافظه، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. جهت ارزیابی حافظه و عملکرد شناختی نوزادان ۱ ماهه از روش تست تشخیص شیء جدید (Object Recognition Task) استفاده شد. این روش بر مبنای تمایل حیوان جهت اکتشاف شیء جدید نسبت به شیء آشنا می باشد.

تست تشخیص شیء جدید در یک عرصه دایره ای به قطر ۸۳ سانتیمتر انجام می پذیرد که دیواری با ارتفاع ۴۰ سانتی متر دارد. در قسمت فوقانی مرکز این دایره دوربینی نصب شده است که به کامپیوتر متصل می باشد. کالیه حرکات حیوان توسط این دوربین ضبط می شود تا بعدا مورد آنالیز قرار گیرد. در این تست از دو سری متفاوت اشیاء استفاده می شود که از هر سری ۳ کپی وجود دارد. اشیاء به گونه ای هستند که حیوان قادر به حرکت دادن آنها نیست. در کف عرصه دو محل فرضی بصورت متقاضان و هر کدام در فاصله ۱۰ سانتی متری از دیواره وجود دارد که هر کدام محل قرار گیری یک شیء می باشد^{۱۹}.

یک هفته قبل از انجام تست، جهت آشنایی حیوانات با محیط عرصه آزمایش به آنها اجازه داده می شود روزانه ۲ مرتبه و هر مرتبه به مدت ۳ دقیقه در دستگاه بدون شیء جستجو کنند.

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۷ بر روی موش های صحرایی نژاد ویستان با وزن ۱۸۰-۲۲۰ گرم در آزمایشگاه گروه فارماکولوژی و سم شناسی دانشکده داروسازی اصفهان انجام شد. حیوانات در لانه مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده داروسازی اصفهان و در شرایط استاندارد اعم از دمای ۲۲-۲۹ درجه سانتیگراد، رطوبت ۲۵-۳۵ درصد و سیکل خاموشی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری می شدند.

آنها دسترسی کافی به غذای عادی و آب آشامیدنی داشتند. غذا و آب مصرفی برای تمام حیوانات مورد استفاده در این مطالعه یکسان بود. مطالعه با کد IR.MUI.REC.1396.3.771 انجام گرفت و در آن بر طبق اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان قرار گرفت و آن را با حیوانات آزمایشگاهی با حیوانات رفتار شد.

۲۴ رات ماده در سنین باروری بصورت تصادفی به ۶ گروه ۴ تایی تقسیم شدند و هر ۴ رات در یک قفس بزرگ نگهداری می شدند. پس از سه روز به هر قفس یک رات نر بالغ جهت جفت گیری وارد شد. با کمک کارشناس حرفه ای، بارداری رات های ماده تشخیص داده شد و روز مشاهده پلاک واژنال به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد.

گروه های رات های ماده شامل گروه کترل، استرس و گروه های دریافت کننده دوزهای مختلف ملاتونین می شدند که با آنها از روز ۱۱ تا ۲۱ ام بنحو زیر برخور德 شد:

گروه کترل: عدم مواجهه با استرس و دریافت حامل ملاتونین بصورت داخل صفاقی

گروه استرس محدود کننده حرکتی: دریافت روزانه حامل ملاتونین بصورت داخل صفاقی و سپس مواجهه با استرس گروه های دریافت کننده ملاتونین: چهار گروه از رات های ماده باردار بترتیب دریافت روزانه ملاتونین با دوزهای ۳، ۵، ۱۰ و یا ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم داخل صفاقی و سپس مواجهه با استرس محدود کننده حرکتی

در روز آخر بارداری، هر رات باردار در یک قفس جدا قرار داده شد. مادر و نوزادان پس از تولد به خوبی مورد ارزیابی قرار گرفتند و تعداد کل نوزادان، نوزادان مرده و زنده ثبت شد. پس از گذشت ۱ ماه از تولد، نوزادان نر از مادرانی که در گروه یکسان قرار داشتند،

شوند تا عملکرد حافظه حیوان بررسی شود.

مقادیر مربوط به هر کدام از شاخص‌های بررسی شده بصورت میانگین \pm SEM در نمودارهای ستونی بیان شدند. جهت مقایسه مقادیر هر کدام از شاخص‌ها در بین گروه‌های مختلف از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و در صورت وجود تفاوت با استفاده از آزمون تعقیبی Tukey میزان این تفاوت بین تمام گروه‌ها مشخص شد. تفاوت با $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. جهت رسم نمودارها از برنامه Graphpad Prism V.5 استفاده شد.

یافته‌ها

همانطور که از نمودارها مشخص است، نوزادانی که مادران آنها در دوران بارداری در مواجهه با استرس بوده‌اند، در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری را در شاخص‌های d2 ($P < 0.001$) و R ($P < 0.001$) در مرحله T2 نشان دادند. مقدار این شاخص‌ها در نوزادان گروه متحمل استرس بترتیب $-0/66$ و $-0/27$ است درحالی که این مقدار برای نوزادان گروه کنترل بترتیب $0/39$ و $0/66$ است. تجویز داخل صفائی دوزهای ۳ و ۵ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین به رات‌های باردار تحت استرس، تغییر قابل ملاحظه‌ای را در شاخص‌های d2 و R نوزادان آنها در مقایسه با نوزادان گروه در معرض استرس در مرحله T2 ایجاد نکرد.

تجویز دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین به صورت داخل صفائی، به رات‌های باردار تحت استرس، به طور قابل ملاحظه‌ای شاخص d2 ($P < 0.001$) و همچنین R ($P < 0.001$) را در نوزادان در مقایسه با نوزادان گروه در معرض استرس افزایش داد، لیکن تفاوت معنی داری را با نوزادان گروه کنترل نشان ندادند. به طوری که شاخص d2 در نوزادان مربوط به گروه دریافت کننده دوز ۱۰ و یا ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین به ترتیب برابر با $0/62$ و $0/55$ است که در مقایسه با شاخص d2 نوزادان گروه استرس که برابر با $0/66$ است به طور معنی داری افزایش یافته است. مقدار شاخص R برای نوزادان گروه در معرض استرس و دریافت کننده دوز ۱۰ و یا ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین بترتیب برابر با $0/81$ و $0/76$ است که در مقایسه با این شاخص در نوزادان گروه در معرض استرس که به میزان $0/27$ است، بطور قابل توجهی افزایش یافته است.

آزمون حافظه از ۲ مرحله تشکیل شده است که مدت زمان هر مرحله ۳ دقیقه و بین هر مرحله ۶۰ دقیقه فاصله است. در مرحله اول (T1) دو شیء یکسان در دستگاه قرار گرفته و به حیوان اجازه داده می‌شود که اشیاء را اکتشاف کند. اکتشاف شیء به این صورت تعریف می‌شود که رات شیء را با بینی خود لمس کند و یا بینی خود را به شیء نزدیک کند در حالیکه فاصله آن تا شیء کمتر یا برابر ۲ سانتی متر باشد. نشستن روی شیء یا بالارفتن از آن جزء رفتار اکتشافی محاسبه نمی‌شود. حیوان پس از کاوش اولیه به قفس بازگردانده می‌شود. پس از گذشت ۶۰ دقیقه از مرحله اول موش برای مرحله دوم (T2) وارد دستگاه می‌گردد. اما حالا با دو شیء متفاوت که یکی کپی سوم از شیء آشنا و دیگری شیء جدید است، مواجه می‌شود. به حیوان اجازه داده می‌شود که بار دیگر اشیاء را بمدت سه دقیقه کاوش کند. در مراحل T1 و T2، کل مدت زمان اکتشاف شیء قدیم و فرکانس لمس هر کدام از اشیاء توسط حیوان محاسبه می‌شود. در صورتی که مجموع مدت زمان اکتشاف برای ۲ شیء کمتر از ۵ ثانیه باشد، نتایج معتبر نخواهد بود و بنا بر این آن رات از روال آزمایش حذف خواهد شد.^{۱۹}

معیارهای مورد نظر در تست تشخیص شی جدید عبارتند از:
 (c1) : مجموع زمانی که صرف اکتشاف ۲ شیء مشابه (a) در T1 شده است که برابر است با $e_1 = a_1 + a_2$
 (c2) : مجموع زمان صرف شده برای اکتشاف شیء مشابه (a) و شیء جدید (b) در T2 که برابر است با $e_2 = a + b$
 (d2) : معیار تمایز است و یک اندازه گیری نسبی برای بررسی تفاوت در کاوش شیء جدید و شیء آشنا است که برابر با نسبت زمان صرف شده برای کاوش شیء جدید در T2 منهای زمان صرف شده برای کاوش شیء آشنا در T2 به مجموع زمان صرف شده برای اکتشاف هر دو شیء در T2 می‌باشد. $d_2 = (b-a)/e_2$
 (R) : معیار تشخیص است و یک اندازه گیری نسبی بر اساس زمان صرف شده برای کاوش شیء جدید در T2 نسبت به مجموع زمان صرف شده برای اکتشاف هر دو شیء در T2 می‌باشد. $R = b/e_2$
 Fb و Fa : بترتیب دفعات لمس شیء آشنا و شیء جدید در T2 می‌باشد.
 شاخص‌های d2 R و Fa محاسبه و با هم دیگر مقایسه می‌شوند.

حافظه رات های نوزاد، یک ماه پس از تولد با روش تشخیص افتراقی اشیاء بررسی شد. این روش یکی از روش های دقیق و حساس در سنجش حافظه حیوانات است.^{۲۰} نتایج نشان می دهد که نوزادان یک ماهه رات که مادران آنها در دوران بارداری در معرض استرس محدود کننده بوده اند، در فاکتورهای تشخیص و تمایز اشیاء، کاهش قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل خود که استرسی را متحمل نشده اند، بروز داده اند که دلیل بر آسیب به قدرت حافظه آنها است. این نتایج مبنی بر اختلال حافظه رات ها بدبناول القای استرس در راستای بسیاری از مطالعات قبلی است که اثرات تخریبی استرس را بر ساختار آناتومیکی و عملکرد فیزیولوژیکی مغز بویژه در پروسه هایی نظری حافظه و یادگیری نشان می دهند. Boersma و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که استرس در دوران بارداری باعث آسیب به حافظه رات های نوزاد و اختلالات رفتاری آنها می شود. آنها تغییر در میزان هورمون های گلوكورتیکوئیدی، تغییر در میزان فعالیت سیستم سمپاتیک، افزایش در میزان و عملکرد سیتوکاین ها در مادر و بالتبع آن در جنین را از علل مهم این آسیب ها بیان کردند. همچنین نشان دادند که کاهش رشد و تراکم نورونی و کاهش پلاستی سیتی و نوروژنز مرآکزی نظری آمیگدال، کورتکس و هیپوکامپ میتواند از علل دیگر تخریب پروسه های فیزیولوژیک مغزی، نظری حافظه باشد.^{۲۱} از طرفی Jafari و همکارانش در یک مطالعه تجزیی نشان دادند که استرس صوتی در دوران بارداری، شدت افت فعالیت های شناختی را تشدید می کند و همچنین شروع تجمع آمیلوبیڈ بتا را در موش های آزالیمری تسريع می نماید. آنها نیز افزایش میزان هورمون های گلوكورتیکوئیدی و اختلال در محور هیپوپalamوس-هیپوفیز-آدرنال را از مهمترین علل این وقایع می دانستند.^{۲۲} بنابراین از نتایج مطالعات متعدد در این زمینه چنین برداشت می شود که تحت شرایط استرس زاده سطح هورمون گلوكورتیکوئید در خون مادر، بشدت افزایش می یابد و بدبناول افزایش بیش از حد سطح این هورمون در خون مادر و کمبود آنزیم ۱۱-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در جنین که یک مهار کننده هومون گلوكورتیکوئید است، دسترسی این هورمون به جنین افزایش می یابد^{۲۳}. یکی از مهم ترین اهداف این هورمون، هیپوکامپ مغز می باشد که نقش مهمی در حافظه و یادگیری ایفا می کند. این ناحیه دارای تراکم بالایی از گیرنده های گلوكورتیکوئیدی می باشد و غلظت بالای گلوكورتیکوئید،

مقایسه مقدار شاخص d2 در نوزادان مادران دریافت کننده ۱۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین همزمان با مواجهه با استرس نسبت به نوزادان گروه دریافت کننده ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین، اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد.

تزریق اسکوپولامین با دوز ۱ میلیگرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی به رات های یک ماهه، ۳۰ دقیقه قبل از فاز T1 بطور قابل توجهی شاخص d2 (P<0.001) و R (P<0.001) را در مقایسه با نوزادان گروه کنترل کاهش داد. این مقادیر برای d2 و R در گروه دریافت کننده اسکوپولامین بترتیب برابر ۰/۵۲ و ۰/۲۲ و در نوزادان گروه کنترل بترتیب برابر ۰/۳۹ و ۰/۶۶ بود.

نوزادان گروه کنترل در فاز T2 بطور معنی داری با دفعات بیشتر، شیء جدید را نسبت به شیء آشنا اکتشاف کردند. القای استرس محدود کننده به مادران باردار موجب شد که این الگوی دفعات اکتشاف در نوزادان این مادران نسبت به گروه کنترل تغییر کند. به طوری که آنها شیء آشنا را بطور قابل توجهی بیشتر از شیء جدید اکتشاف کردند. تجویز ۳ و ۵ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین به مادران باردار در معرض استرس، تغییری را در الگوی اکتشاف اشیاء توسط نوزادان آنها نسبت به نوزادان گروه استرس ایجاد نکرد، به طوری که آنها نیز شیء آشنا را بیشتر از شیء جدید اکتشاف کردند. اما تجویز دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین به مادران باردار در معرض استرس باعث معکوس شدن الگوی اکتشاف اشیاء توسط نوزادان آنها نسبت به نوزادان گروه استرس شد. بعبارتی آنها شیء جدید را بطور قابل ملاحظه ای بیشتر از شیء آشنا اکتشاف کردند که این الگو شبیه الگوی نوزادان گروه کنترل بود.

تزریق داخل صفاقی ۱ میلیگرم بر کیلوگرم اسکوپولامین به رات های یک ماهه، ۳۰ دقیقه قبل از فاز T1 باعث شد که آنها در فاز T2، شیء آشنا را بطور معنی داری بیشتر از شیء جدید اکتشاف کنند که این الگو با الگوی اکتشاف نوزادان گروه کنترل کاملاً متفاوت است.

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر دوزهای مختلف ملاتونین تجویز شده در دوران بارداری، بر عملکرد حافظه رات های نوزاد که در دوره جنینی خود تحت استرس قرار گرفته اند، انجام شده است.

در دوزهای بالای ملاتونین اتفاق افتاد، تایید کننده نتایج مطالعات متعددی است که اثرات محافظتی و درمانی ملاتونین را در بسیاری از آسیب‌های ناشی از انواع استرس نشان داده اند. Rajput و همکارانش طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که ملاتونین در دوز ۲۰ میلیگرم بر کیلوگرم میتواند آسیب شناختی و سمیت نورون های هیپوکامپ ناشی از استرس محدود کننده حرکتی را که با مصرف الكل همراه شده است از طریق مقابله با افزایش استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی معکوس نماید.^{۲۶} در سال ۲۰۱۷ در مطالعه‌ای دیگر Guo و همکاران نشان دادند که دوز ۱۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین در موش سوری میتواند استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از استرس محدود کننده حرکتی را در سلول‌های بیضه کاهش دهد.^{۲۷}

امروزه ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی معرفی شده است. از نتایج مطالعه حاضر و مستندات علمی دیگر بدین گونه برداشت می‌شود که ملاتونین می‌تواند اختلالات حافظه را بازیابی کند. اثرات قابل توجهی از ملاتونین بر بهبود حافظه با تعديل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال و همچنین حذف رادیکال‌های آزاد در هیپوکمپ وجود دارد. همانطور که در مقدمه ذکر شد ملاتونین هورمونی است که می‌تواند از جفت عبور کند و وارد جنین شود و به دلیل خاصیت چربی دوستی به سادگی از سد خونی-معزز عبور کرده و به دلیل داشتن ساختمان غنی از الکترون، قابلیت جمع آوری و حذف رادیکال‌های آزاد مغز را داشته باشد.^{۱۸}

براساس مطالعات پیشین، ملاتونین سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند TNF- α و ایترولوکین-۱ بتا را کاهش می‌دهد و با این روند از ادامه یافتن واکنش‌های التهابی درون مغز جنین بدنیال استرس مادر و آسیب‌های بیشتر نواحی مختلف مغز خصوصا هیپوکمپ توسط رادیکال‌های آزاد، جلوگیری می‌کند.^{۲۸} از سوی دیگر ملاتونین باعث افزایش سطح آنتی اکسیدان‌هایی منجمله سوپراکساید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون می‌شود که به طور طبیعی در بدن رادیکال‌های آزاد را جمع آوری می‌کنند.^{۲۹} بر اساس مطالعات George Anderson و همکارانش در سال ۲۰۱۲، ملاتونین بر روی هورمون گلوکورتیکوئید اثر کرده و باعث مهار انتقال هسته ای رسپتور گلوکورتیکوئید می‌شود، در نتیجه از عوارض مربوط به افزایش گلوکورتیکوئید در شرایط استرس زا، بر روی مغز

باعث افزایش تراکم گیرنده ان-متیل-دی-آسپارتات می‌شود. در نتیجه ورود کلسیم به داخل سلول از طریق این گیرنده، افزایش یافته و مقادیر بالای کلسیم در هیپوکمپ، باعث فعال شدن مکانیسم‌های مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌شود.^{۲۰} افزایش گلوکورتیکوئیدها مستقیماً و یا با افزایش کلسیم داخل سلولی می‌تواند واکنش‌های استرس اکسیداتیو را در سلول‌های مغزی افزایش دهد و نهایتاً منجر به نورودژنرasiون و کاهش زواید و سیناپس‌های نورونی بویژه در هیپوکامپ شود.^{۲۵ و ۲۶}

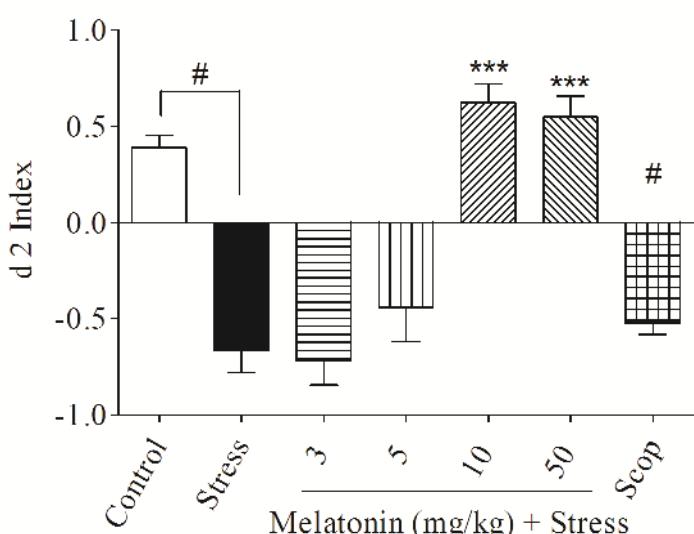
نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تجویز ملاتونین در دوران بارداری همزمان با دورانی که مادران باردار در معرض استرس محدود کننده قرار گرفته، می‌تواند اثر استرس بر روی فاکتورهای تشخیص و تمایز در تست تشخیص اشیاء برای رات‌های نوزاد یک ماهه را تعدیل نماید. بعبارتی مدت زمان صرف شده جهت تشخیص و تمایز شیء جدید در گروه‌های دریافت کننده ملاتونین افزایش یافته است. پیامد این اثر، بهبود عملکرد شناختی در رات‌های یک ماهه ای است که در دوران جینی در معرض استرس محدود کننده حرکتی بوده اند. اگر چه این تغییرات در دوزهای پایین ملاتونین بکار رفته در این مطالعه، یعنی دوزهای ۳ و ۵ میلیگرم بر کیلوگرم چندان قابل توجه نبوده است، ولی دوزهای بالاتر ملاتونین در مادران باردار یعنی دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم باعث مقابله با آسیب‌های ناشی از استرس بر روی حافظه در نوزادان یک ماهه شده است. اگر چه برخلاف دوزهای پایین ملاتونین، مقادیر بالای آن، اثرات مغاید قابل توجهی را در مقابله با استرس از خود نشان می‌دهند اما این اثر بین دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلیگرم ملاتونین تفاوت قابل توجهی را نشان نمی‌دهد. این اتفاق بیان می‌کند که در مطالعه حاضر اثرات مغاید ملاتونین بر حافظه اثری وابسته به دوز نیست و اگرچه در دوزهای پایین این اثر دیده نمی‌شود ولی در دوزهای بالا نیز به اشباع می‌رسد. عدم دستیابی کافی ملاتونین به جنین و پس از آن به مغز جنین و یا مقادیر ناکافی آن جهت مقابله با مکانیسم‌های تخریبی استرس می‌تواند از علل احتمالی عدم اثربخشی ملاتونین در دوزهای پایین باشد. ظرفیت محدود مکانیسم‌های بکار گرفته شده توسط ملاتونین ملاتونین در دوزهای بالا در نظر گرفته شود.

اما اثرات مقابله‌ای ملاتونین در برابر استرس که در این مطالعه

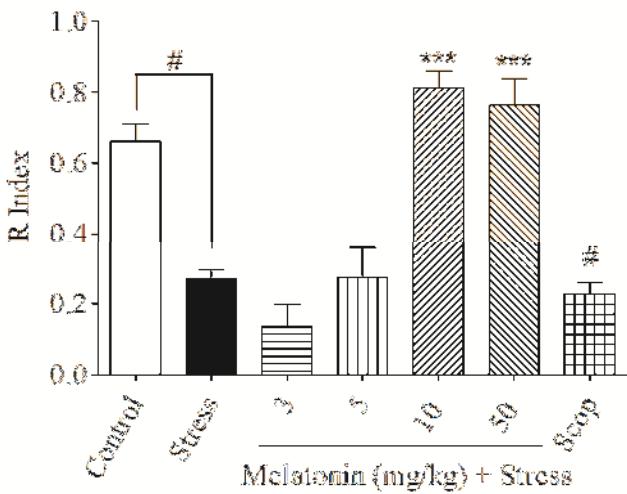
نظیر هیپوکامپ بیشتر باشد و این دسته از گیرنده های ملاتونین نقش مهمتری در شکل گیری و تقویت حافظه داشته باشد. این واقعیت که گیرنده MI2 گیرنده ای با میل ترکیبی پایین برای ملاتونین است میتواند دلیل اثربخشی ملاتونین در دوزهای بالا در این مطالعه را توجیه نماید و بدلیل اشباع شدن گیرنده، تفاوت اثری در دوز ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم نسبت به دوز ۱۰ میلیگرم بر کیلوگرم مشاهده نشد. بهر حال جهت تعیین علل اثرات مشاهده شده از ملاتونین در این مطالعه، بررسی های بیوشیمیایی و ملکولار عمیق هم در مغز و خون مادر و هم نوزاد لازم است که میتواند نقشه راهی برای مطالعات آینده باشد.

خصوصا هیپوکامپ جلوگیری میکند.^۳

Bertaina-Anglade تجویز ملاتونین در موش سوری میتواند اختلال حافظه ناشی از اسکوپولامین را معکوس نماید. آنها همچنین گزارش کردند که آگوملاتین که یک آگونیست گیرنده های ملاتونین است با بکارگیری مکانیسم های متنوع از جمله تعديل واسطه های اکسایتو توکسیک نظیر گلوتامات، افزایش فاکتورهای نوروتروفیک میتواند اثرات مفیدی را در بهبود حافظه در موش های افسرده نشان دهد.^۳ ملاتونین دارای دو گیرنده MI1 با میل ترکیبی بالا و MI2 با میل ترکیبی پایین می باشد که گیرنده های متصل به پروتئین G می باشند. به نظر می رسد که تراکم گیرنده های MI2 در نواحی مرتبط با حافظه

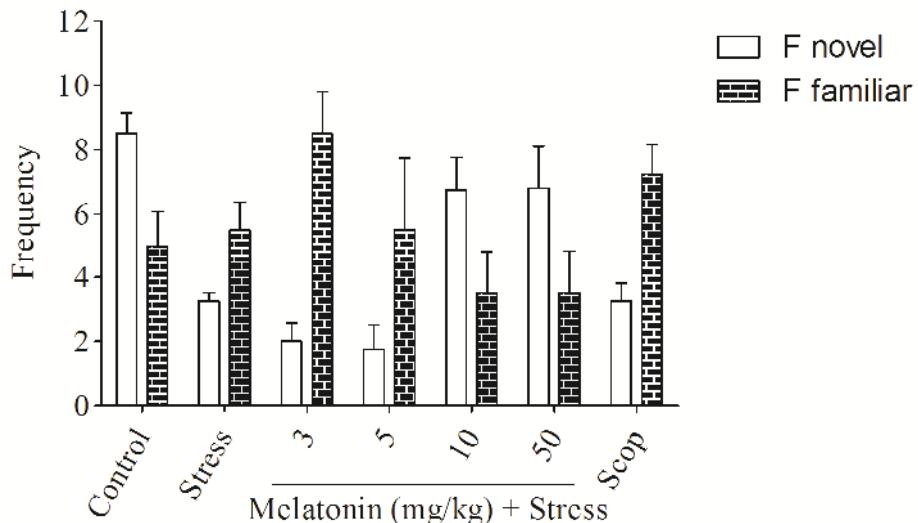


نمودار ۱: اثر تجویز همزمان دوزهای ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین با استرس محدود کننده حرکتی بر روی شاخص d2 در تست حافظه نوزادان رات. # اختلاف معنی دار بین گروه مشخص شده و گروه کنترل با $P<0.001$. *** اختلاف معنی دار بین گروه مشخص شده و گروه استرس محدود کننده با $P<0.001$. Scop: اسکوپولامین، Stress: استرس محدود کننده حرکتی، d2: معیار تمایز



نمودار ۲: اثر تجویز دوزهای دوزهای ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین با استرس محدود کننده حرکتی بر روی شاخص R در تست حافظه نوزادان رات. # اختلاف معنی دار بین گروه مشخص شده و گروه کنترل با $P<0.001$. *** اختلاف معنی دار بین گروه مشخص شده و گروه استرس محدود کننده با $P<0.001$.

Scop: اسکوپولامین، Stress: استرس محدود کننده حرکتی، R: معیار تشخیص



نمودار ۳: اثر تجویز دوزهای دوزهای ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم ملاتونین با استرس محدود کننده حرکتی بر روی تعداد دفعات اکشاف شیء در فاز T2

Scop: اسکوپولامین، Stress: استرس محدود کننده حرکتی، F novel: تعداد دفعات اکشاف شیء جدید، F familiar: تعداد دفعات اکشاف شیء اشنا

نتیجه گیری

سپاسگزاری

نویسندهای از معاونت پژوهشی دانشکده داروسازی و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بخاطر همکاری‌ها و حمایت مالی جهت انجام این تحقیق در قالب پایان نامه دکترای داروسازی با شماره ۳۹۶۷۷۱ تقدیر و تشکر می‌نمایند. همچنین از سرکار خانم مرادی و جناب آقای شریفی بخاطر کمک و همکاری در آزمایشگاه فارماکولوژی و لانه حیوانات دانشکده داروسازی اصفهان سپاسگزاری می‌شود.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که تجویز ملاتونین در دوزهای ۱۰ میلیگرم بر کیلوگرم و بیشتر در دوران بارداری میتواند از آسیب حافظه نوزادان یک ماهه رات که مادران آنها در دوران بارداری در معرض استرس محدود کننده بوده اند، جلوگیری کند. در دوزهای پایین تر این اثرات مشاهده نشد و در دوز بالاتر از ۱۰ میلیگرم بر کیلوگرم افزایشی در این اثر حاصل نشد. شناسایی مکانیسم‌های درگیر در اثرات مفید ملاتونین نیاز به مطالعات سلولی ملکولی بیشتر دارد.

References

- Evans J, Heron J, Francomb H, Oke S, Golding J. Cohort study of depressed mood during pregnancy and after childbirth. *BMJ* 2001; 323: 257-60.
- Heron J, O'Connor TG, Evans J, Golding J, Glover V. The course of anxiety and depression through pregnancy and the postpartum in a community sample. *J Affect Disord*. 2004; 80(1): 65-73.
- Akbarnejad Z, Haghiri H, Moghimi A, Sazegarnia A, Motejedded F, Fazel AR. Synchronous Effects of Light and Noise Prenatal Stress on Birth Weight among Rat Neonates. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2010; 13(3): 31-36. [In Persian].
- Haji Khani NA, Ozgoli G, Taghi Pour E, Hamzeh Gardeshi Z. The relationship between mental stress and hypertensive disorders during pregnancy: A review article. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2017; 20(7): 61-70. [In Persian].
- Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. *Brain Res Rev* 2010; 65(1): 56-79.
- Wolf OT. HPA axis and memory. *Best Pract Clin Endocrinol Metab* 2003; 17(2): 287-99.
- Conrad CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34(5): 742-55.
- Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32(6): 1073-86.
- Ter Heegde F, De Rijk RH, Vinkers CH. The brain mineralocorticoid receptor and stressresilience. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 52: 92-110.
- Pilipovic K, Zupan Z, Dangubic B, Mrsic-Pelcic J, Zupan G. Oxidative stress parameters in different brain structures following lateral fluid percussion injury in the rat. *Neurochem Res* 2011; 36(5): 913-21.
- Wang C, Wu HM, Jing XR, Meng Q, Liu B, Zhang H, et al. Oxidative Parameters in the Rat Brain of Chronic Mild Stress Model for Depression: Relation to Anhedonia-Like Responses. *J Membr Biol* 2012; 245(11): 675-81.
- McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci* 2015; 18(10): 1353-63.
- Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin—a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 2011; 93(3): 350-84.
- Cao XJ, Wang M, Chen WH, Zhu DM, She JQ, Ruan DY. Effects of chronic administration of melatonin on spatial learning ability and long-term potentiation in lead-exposed and control rats. *Biomed Environ Sci* 2009; 22(1):70-5.
- Chan KH, Wong YH. A molecular and chemical perspective in defining melatonin receptor subtype selectivity. *Int J Mol Sci* 2013; 14(9):18385-406.
- Voiculescu SE, Zygouropoulos N, Zahiu CD, Zagrean AM. Role of melatonin in embryo fetal development. *J Med Life* 2014; 7(4): 488-92.
- Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Tamura S, Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res* 1998; 25(3): 129-134.
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J pineal Res* 2003; 34(1):1-10.
- Rutten K, Lieben C, Smits L, Blokland A. The PDE4 inhibitor rolipram reverse object memory impairment induced by acute tryptophan depletion in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2007; 192(2):275-82.

20. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 2012; 13(2): 93-110.
21. Boersma GJ, Tamashiro KL. Individual differences in the effects of prenatal stress exposure in rodents. *Neurobiol Stress* 2015; 1: 100-8.
22. Jafari Z, Mehla J, Kolb BE, Mohajerani MH. Prenatal noise stress impairs HPA axis and cognitive performance in mice. *Sci Rep* 2017; 7(1):10560.
23. 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.
24. Sato H, Takahashi T, Sumitani K, Takatsu H, Urano S. generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 47(3): 224-32.
25. Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 2003; 17(4): 879-86.
26. Rajput P, Jangra A, Kwatra M, Mishra A, Lahkar M. Alcohol aggravates stress-induced cognitive deficits and hippocampal neurotoxicity: Protective effect of melatonin. *Biomed Pharmacother* 2017; 91: 457-466.
27. Guo Y, Sun J, Li T, Zhang Q, Bu S, Wang Q, et al. Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells via NF-κB/iNOS and Nrf2/ HO-1 signaling pathway. *Sci Rep* 2017; 7(1): 9599.
28. Czechowska G, Celinski K, Korolczuk A, Wojcicka G, Dudka J, Bojarska A, et al. Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66(4): 567-79.
29. Rodrigues C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzyme: a significant role of melatonin. *J Pineal Res* 2004, 36: 1-9.
30. Anderson G, Maes M. Melatonin: an overlooked factor in schizophrenia and in the inhibition of anti-psychotic side effects. *Metab Brain Dis* 2012; 27(2): 113-9.
31. Bertaina-Anglade V, Drieu-La-Rochelle C, Mocaer E, Seguin L. Memory facilitating effects of agomelatine in the novel object recognition memory paradigm in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 98(4): 511-7.

Mina Kiarosta¹, Ali Hosseini-Sharifabad^{2*}, Mohammad Rabbani³

¹Pharm.D, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.IRAN

²Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.IRAN

³Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.IRAN

Protective Effects of Melatonin on Prenatal Restraint Stress-Induced Memory Impairment in Offspring Rats

Received: 22 Mar 2021 ; Accepted: 24 May 2022

Abstract

Background and purpose: Pregnant women experience different type of stresses which affect the fetus brain physiological processes like memory. Therefore, it is attractive to find the protective agents that are safe in the pregnancy and neutralize the stress induced manifestations. The aim of current study was to investigate the protective effects of melatonin on memory impairment induced by prenatal restraint stress in offspring rats.

Materials and methods: In this experimental study, pregnant rats were randomly assigned to control, restraint stress group and four melatonin treated groups that received 3, 5, 10, and 50 mg/kg of melatonin concomitant with restraint stress. Restraint stress daily induced from 10th to 21st day of pregnancy. Melatonin was daily injected intraperitoneally before the restraint stress. One month after the birth, the memory of offspring was evaluated by measurement of "Discrimination" and "Recognition" indices using Object Recognition Task.

Results: From the data, administration of 3 or 5 mg/kg melatonin did not show significant differences in Discrimination and Recognition indices compared to restraint stress group while injection of 10 or 50 mg/kg of melatonin significantly increased the above indices ($P < 0.001$). There is no significant difference in indices values for 10 or 50 mg/kg of melatonin.

Conclusion: The findings showed that prenatal restraint stress induced memory impairment in one month offspring rats. Administration of melatonin in high doses actively prevent restraint stress induced memory impairment.

Keywords: Melatonin, Restraint Stress, Memory, Offspring Rats, Object Recognition Task

***Corresponding Author:**
Associated Professor,
Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.IRAN

Tel: 09132514473
Email: hosseini_a@pharm.mui.ac.ir