

Effects of maternal ethanol exposure during pregnancy and lactation periods on anxiety- like behaviors and hippocampal brain-derived neurotrophic factor in rat offspring

Narges Isari¹, Iran Goudarzi², Taghi Lashkarbolouki³, Mahmoud Elahdadi Salmani⁴

1. MSc student, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2609-5357

2. Associate Professor, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-23-35220316, Email: irangoudarzi@du.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-6665-3202

3. Assistant Professor, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5145-3937

4. Associate Professor, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5237-3958

ABSTRACT

Background and Aim: The effects of maternal exposure to ethanol on anxiety-like behavior and hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression level in the offspring are controversial. The aim of this study was to investigate the effects of maternal ethanol exposure on anxiety-like behavior and changes in BDNF levels in the hippocampus of the rats off spring.

Material and Methods: 14 pregnant Wistar rats were divided into control and ethanol groups. The rats received ethanol (4 g/kg) or distilled water on the day 0 of gestation until weaning (28 days) by oral gavage. Elevated plus maze test was performed for measurement of anxiety profile on the 35th day of postnatal period. The BDNF and TrKB receptor protein levels in the hippocampus were evaluated using ELISA kits. Data were analyzed by independent- sample t test.

Results: Maternal ethanol administration reduced the percentage of time spent in the open arm of the EPM and the percentage of the number of entries in the open arm significantly in the offspring compared to those in the control group ($P < 0.001$). Also, the percentage of time spent in the closed arm and the percentage of the number of entries in the closed arm significantly increased following ethanol administration ($P < 0.001$). In addition, ethanol treatment significantly decreased hippocampal BDNF protein levels, but did not change the TrKB receptor level in the hippocampus of the rats offspring.

Conclusion: Maternal ethanol exposure during pregnancy and lactation induced anxiety-like behavior and decreased hippocampal BDNF protein level in the rats offspring. Present results suggested that alteration of BDNF expression in the hippocampus of the rats exposed to ethanol during prenatal period may be involved in anxiety-like behavior.

Keywords: Ethanol, Anxiety, Brain-derived neurotrophic factor, Rat offspring

Received: July 17, 2020

Accepted: April 4, 2021

How to cite the article: Narges Isari, Iran Goudarzi, Taghi Lashkarbolouki, Mahmoud Elahdadi Salmani Effects of maternal ethanol exposure during pregnancy and lactation periods on anxiety- like behaviors and hippocampal brain-derived neurotrophic factor in rat offspring. *SJKU* 2022;27(1):1-12.

بررسی اثر در معرض قرارگیری مادر با اتانول در طول دوره بارداری و شیردهی بر رفتارهای شبه اضطرابی و فاکتور رشد مشتق از مغز هیپوکامپ در فرزندان موش

صحرائی

نرگس ایثاری^۱، ایران گودرزی^۲، تقی لشکریلوکی^۳، محمود اله دادی سلمانی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران. کد ارکید: ۵۳۵۷-۲۶۰۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. دانشیار، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران، پست الکترونیک: irangoudarzi@du.ac.ir، تلفن: ۰۲۳-۳۵۲۲۰۳۱۶، کد ارکید: ۰۰۰۰۲-۰۰۰۰-۳۲۰۲-۶۶۶۵

۳. استادیار، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران. کد ارکید: ۳۹۳۷-۵۱۴۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۴. دانشیار، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران. کد ارکید: ۳۹۵۸-۵۲۳۷-۰۰۰۱-۰۰۰۰

زمینه و هدف: در مورد اثرات در معرض قرارگیری مادران باردار با اتانول بر رفتار شبه اضطراب و میزان بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) در هیپوکامپ فرزندان نتایج متناقضی وجود دارد. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات سوء مصرف اتانول توسط مادر بر رفتار شبه اضطراب و تغییرات سطح BDNF در هیپوکامپ فرزندان موش های صحرائی در دوران جوانی است.

مواد و روش ها: ۱۴ سر موش های صحرائی ماده ی باردار نژاد ویستار به ۲ گروه کنترل و اتانول تقسیم شدند. موش ها از روز صفر بارداری تا پایان دوره ی شیردهی اتانول (4g/kg) یا آب مقطر را توسط گاواژ دهانی دریافت کردند. در روز ۳۵ بعد از تولد، سنجش میزان اضطراب با استفاده از ماز بعلاوه شکل مرتفع (EPM) انجام شد. همچنین میزان بیان پروتئین BDNF و گیرنده ی TrkB در هیپوکامپ با استفاده از کیت های الایزا مورد سنجش قرار گرفت. داده ها با آزمون t مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: تجویز اتانول درصد مدت زمان حضور در بازوی باز و درصد تعداد ورود به بازوی باز را در ماز بعلاوه شکل مرتفع نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داد ($P<0.001$). همچنین درصد مدت زمان حضور در بازوی بسته و درصد تعداد ورود به بازوی بسته بدنال تجویز الکل افزایش معناداری داشت ($P<0.001$). بعلاوه، در گروه تحت تیمار اتانول میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ کاهش معنی داری نشان داد، در حالیکه تغییر معنی داری در بیان پروتئین گیرنده ی TrkB مشاهده نشد.

نتیجه گیری: تجویز اتانول در دوران بارداری و شیردهی، اضطراب در فرزندان القا کرد و میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ را کاهش داد. نتایج حاضر پیشنهاد می کند که تغییرات پروتئین BDNF در هیپوکامپ نوزادان در طول تکوین احتمالا می تواند در این اختلال مشارکت داشته باشد.

کلمات کلیدی: اتانول، اضطراب، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز، نوزادان موش صحرائی

وصول مقاله: ۹۹/۴/۲۷ اصلاحیه نهایی ۱۴۰۰/۱/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۵

اتانول پس از مصرف توسط مادر از جفت عبور نموده (۱۰) و وارد جریان خون جنین می گردد. همچنین هنگامی که مادر شیرده الکل مصرف می کند الکل وارد شیر شده و با همان غلظت موجود در خون در شیر مادر نیز یافت می گردد (۱۱). با توجه به اینکه بسیاری از مادران الکلی به مصرف الکل در دوران شیردهی هم ادامه می دهند و همچنین با توجه به اینکه فاز معنادار تکوین مغز جنین در پس از تولد رخ می دهد (۱۲) و الکل موجب کاهش عواطف مادری و در نتیجه استرس روانی در فرزندان و این خود سبب اختلالات رفتاری و شبه اضطرابی در فرزندان می شود (۱۳، ۱۴)، لذا برای تقلید از مدل انسانی و همچنین به دلیل نتایج متناقض های موجود در خصوص اثرات در معرض قرارگیری با اتانول در دوره تکوین بر رفتار های شبه اضطرابی، در بخشی از این مطالعه اثر تجویز اتانول در دوران بارداری و دوره شیردهی بر رفتار های شبه اضطرابی فرزندان مورد بررسی قرار گرفت.

بطور کلی مطالعات قبلی مواردی از مکانیسم های درگیر در آسیب سیستم عصبی مرکزی با واسطه الکل را پیشنهاد نموده اند که شامل ۱- تغییرات در سنتز و فراهمی فاکتورهای نوروتروفیک ضروری، رسپتور های آنها و یا هر دو، ۲- استرس اکسیداتیو، تهی شدن آنتی اکسیدانت محافظتی و یا هر دو ۳- تغییرات در عوامل آبشار آپوپتوز که بقای نورون ها را تحت تأثیر قرار می دهند، می باشد (۱۵). بنظر می رسد که این مکانیسم ها با هم احتمالاً در آسیب های ناشی از الکل مشارکت نمایند.

BDNF یک عضو از خانواده فاکتور های رشد عصبی است که بطور وسیع در نواحی مختلف مغز شامل آمیگدال، هیپوکامپ و نئوکورتکس بیان می شود (۱۶). گزارش شده که BDNF در مدل های مختلف تجربی اثرات ضدافسردگی اعمال می کند (۱۷، ۱۸).

تغییرات BDNF و در نتیجه شکل پذیری سیناپسی و دینامیک سیناپسی در اختلالات اضطراب-افسردگی دخالت دارد. مطالعات بالینی پیشنهاد کرده اند که سطوح پایین BDNF حجم هیپوکامپ را کاهش می دهد و نقص های

مصرف الکل در طول دوره بارداری می تواند برای تکوین جنین، ادامه رشد و تکوین پس از تولد مضر باشد. سیستم عصبی مرکزی نسبت به صدمات ناشی از الکل آسیب پذیری ویژه دارد (۱). مصرف مقادیر زیاد الکل در دوران بارداری اغلب سبب الگوی خاصی از ناهنجاری در صورت، جمجمه، مغز و عقب ماندگی در فرزند می گردد که به عنوان سندرم الکل جنین (Fetal Alcohol Syndrome, FAS) شناخته می شود (۲). سندرم الکل جنین یک طیف وسیع از اثرات رفتاری و شناختی ناشی از در معرض قرارگیری جنین با الکل می باشد که مجموعاً به آن اختلالات طیف الکل جنین (Fetal Alcohol Syndrome Disorder, FASD) اطلاق می گردد (۳). نقص های شناختی شامل اختلالات یادگیری و حافظه (۴)، مشکلات تعاملات اجتماعی (۵)، تحرک زیاد و اختلال توجه (۳) می باشد. بسیاری از این مشکلات در دوران مدرسه برجسته تر بوده و اغلب تا دوران بزرگسالی باقی می ماند (۶).

در حالیکه تحقیقات تجربی و بالینی به میزان زیادی بر یادگیری، حافظه و مشکلات توجه تمرکز نمود ه اند، مطالعات بالینی بین در معرض قرارگیری با الکل در دوران قبل از تولد و شیوع اختلالات مرتبط با اضطراب در دوران جوانی و بزرگسالی همبستگی زیادی را نشان داده اند (۶). بسیاری از مطالعات انجام شده یک فنوتیپ مشابه اضطراب را در نتیجه سطوح بالای الکل در دوران پری ناتال گزارش نموده اند (۷، ۸).

دورسون و همکاران نشان دادند که فرزندان موش های تیمار شده با اتانول که اتانول را از طریق گاواژ دهانی روزانه از روز ۷ تا ۲۰ بارداری با دوز ۶ گرم برکیلوگرم دریافت نمودند، یک کاهش معنی دار در جستجوی بازوی باز در ماز بعلاوه مرتفع داشتند (۷). در مقابل، اوسبورن و همکاران گزارش نمودند مادرانی که با رژیم مایع حاوی اتانول ۳۶٪ تغذیه شدند، هیچگونه رفتارهای شبیه اضطراب را نشان ندادند (۹).

شناختی مرتبط با سن را میانجی گری می نماید، در حالیکه افزایش میزان BDNF سبب بهبود حجم هیپوکامپ و عملکرد حافظه می گردد (۱۹). در حالیکه هیپوکامپ برای فرایندهای شناختی مثل حافظه اپیزودیک و جهت یابی فضایی حیاتی می باشد، آن همچنین در پاتورنز اختلالات خلق (Mood) و اضطرابی دخالت دارد. فنوتیپ های شبه اضطرابی که ممکن است با فنوتیپ های شبیه افسردگی با هم بروز کنند، نشان داده شده که با کاهش میزان BDNF در هیپوکامپ در ارتباط می باشند (۲۰).

لذا در پژوهش حاضر با توجه به نتایج متناقض موجود، رفتار های شبه اضطرابی، میزان بیان BDNF و گیرنده آن (TrkB) را در هیپوکامپ فرزندان موش های تحت تیمار اتانول در طول بارداری و شیردهی مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها

کلیه مراحل آزمایش و معدوم کردن حیوانات با رعایت حقوق حمایت از حیوانات آزمایشگاهی بر اساس قوانین کار با حیوانات صورت گرفت. موش های صحرایی نر و ماده بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خریداری گردیدند. حیوانات پس از خریداری و انتقال به حیوانخانه در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای محیطی کنترل شده (۲۲-۲۰) درجه سانتیگراد در حیوانخانه نگهداری شدند. آنها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. یک هفته بعد از خوگیری با شرایط آزمایشگاهی، موش های ماده با موش های نر برای جفتگیری در طول شب در یک قفس قرار داده شدند و صبح روز بعد برای یافتن پلاک واژینال بررسی گردیدند. حضور این پلاک نشان دهنده بارداری بوده و روز یافتن پلاک روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. در روز صفر بارداری، موش های باردار بطور تصادفی در ۲ گروه آزمایشی کنترل و اتانول قرار گرفتند.

گروه کنترل: موش های باردار در این گروه از روز شروع بارداری تا پایان دوران شیردهی آب مقطر را به صورت گاواژ دهانی و یک بار در روز دریافت کردند. فرزندان این موش ها

به ۲ گروه تقسیم شدند. گروه اول در روز 28 پس از تولد بیهوش شده سپس نمونه خون از موش جهت اندازه گیری غلظت الکل خون تهیه گردید و پلاسمای آن تا زمان اندازه گیری در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد، همچنین هیپوکامپ موش ها جهت اندازه گیری میزان پروتئین BDNF و TrkB خارج گردید. گروه دوم سنجش اضطراب با استفاده از ماز بعلاوه مرتفع در روز ۳۵ پس از تولد صورت گرفت.

گروه اتانول: موش های صحرایی ماده در گروه اتانول از روز شروع بارداری (روز صفر بارداری) تا پایان دوران شیردهی (۲۸ روز پس از زایمان) محلول اتانول در آب مقطر (۴۰۷/۷٪) با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم را یک بار در روز به صورت گاواژ دهانی دریافت کردند (۲۱). کلیه بررسی های ذکر شده در گروه کنترل نیز برای فرزندان در این گروه انجام شد.

مطالعه رفتاری:

برای سنجش اضطراب از مدل رفتاری ماز بعلاوه ی مرتفع (Elevated plus-maze) استفاده شد. این ماز از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت (+) می باشد. اندازه دو بازوی باز (هر یک ۱۰×۵۰ سانتیمتر) و بازوی بسته (هر یک ۵×۵ سانتیمتر) است و از کف زمین ۵۰ سانتیمتر فاصله دارد. موش ها درون محدوده مرکزی ماز قرار داده شده، به طوری که رو به یک راهروی باز قرار گرفتند. حیوان آزادانه به مدت ۵ دقیقه در قسمت های مختلف ماز حرکت و دفعات ورود به بازوهای باز و بسته شمارش و همچنین زمان حضور حیوان در بازوهای باز و بسته با استفاده از کورنومتر اندازه گیری گردید. سپس درصد زمان گذرانده شده در بازوهای باز، بسته، درصد ورود به بازوهای باز و بسته محاسبه گردید. درصد ورود به بازوی باز به صورت درصد نسبت ورود به بازوی باز به مجموع ورود به بازوی باز و بسته محاسبه شد و درصد زمان سپری شده در بازوی باز نیز به صورت درصد نسبت زمان سپری شده در بازوی باز به مجموع ورود به بازوی باز و بسته محاسبه گردید. افزایش زمان سپری شده در بازوی باز و افزایش دفعات ورود به بازوی باز بعنوان

ملاک های کاهش اضطراب در موش تلقی می شوند. ورود به راهروی باز یا بسته هنگامی است که هر چهار پای حیوان در راهروی مذکور قرار گیرد (۲۲). پس از هر بار آزمایش بازوها توسط اتانول ۷۰٪ تمیز می گشت. در این مطالعه از ۶ سر موش برای سنجش اضطراب استفاده شد.

تعیین غلظت اتانول پلاسما:

در روز ۲۸ بعد از تولد، فرزندان بیهوش شده، حفره قفسه سینه باز و نمونه های خون بطور مستقیم از قلب توسط سرنگ جمع آوری شد. سپس با EDTA مخلوط و سانتریفوژ گردید و پلاسما تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- نگهداری شد. میزان غلظت الکل پلاسما با استفاده از دستگاه GC اندازه گیری شد (۲۳).

سنجش میزان پروتئین BDNF با استفاده از کیت الایزا:

برای سنجش میزان پروتئین BDNF از کیت (Chemikine TM Brain Derived Neurophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit. Millipore. Cat. No. CYT306) استفاده و اندازه گیری بر اساس روش کار کیت انجام شد. بدین ترتیب که بافت هیپوکامپ با ۲۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCL به خوبی لیز و هموژن گردید. محلول هموژن شده سپس به مدت نیم ساعت در سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت محلول سانتریفوژ شده درون چاهک کیت قرار گرفت و به آن ۵۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده (Standard/Sample Diluent) اضافه گردید. به ۸ عدد از چاهک ها به عنوان محلول های استاندارد، نیز ۱۰۰ میکرولیتر از محلول های استاندارد اضافه گردید. پس از ریختن همه نمونه ها و استانداردها در چاهک های پلیت، روی چاهک ها نوار چسب زده شد و پلیت در طول شب در انکوباتور با دمای ۴ تا ۸ درجه سانتیگراد روی شیکر قرار گرفت. بعد از طی این زمان محلول های داخل چاهک ها خالی شده و سپس چاهک ها برای ۴ بار با محلول شستشو رقیق شده شسته شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی ثانویه به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۳ ساعت بر روی شیکر در دمای محیط قرار داده شد. بعد از انکوبه شدن با آنتی بادی ثانویه دوباره

چاهک ها برای ۴ بار با محلول شستشو شسته شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم Strep-HRP رقیق شده اضافه گردید و پلیت به مدت یک ساعت بر روی شیکر در دمای محیط قرار گرفت. دوباره ۴ بار شستشو همانند دفعات قبل انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای آنزیم TMB به هر چاهک اضافه گردید و پلیت برای مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر در دمای محیط قرار گرفت. در این مرحله تنها چاهک هایی که حاوی BDNF باشند به رنگ آبی درمی آیند و شدت رنگ آبی بیشتر نشان دهنده غلظت بیشتر BDNF می باشد. بعد از ۱۵ دقیقه برای توقف واکنش آنزیم و سوبسترا ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک اضافه گردید (با توقف واکنش، رنگ محلول های موجود در چاهک از زرد به آبی می گراید) و بلافاصله جذب محلول توسط دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار جذب متناسب با غلظت BDNF می باشد و غلظت BDNF در نمونه ها و پس از رسم منحنی استاندارد و با استفاده از معادله خط، محاسبه شد. همچنین میزان پروتئین نمونه با استفاده از روش لوری مورد سنجش قرار گرفته و میزان پروتئین BDNF بر میلی گرم پروتئین نمونه گزارش گردید. برای سنجش میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ از ۷ سر موش استفاده شد.

سنجش میزان پروتئین TrkB با استفاده از کیت الایزا:

برای سنجش میزان گیرنده TrkB در هیپوکامپ از کیت الایزای شرکت MyBiosource استفاده شد. Rat TRKB (Tyrosine receptor kinase B) ELISA Kit (Catalog No: MBS2512413). محلول هموژن شده هیپوکامپ به مدت نیم ساعت در سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت محلول سانتریفوژ شده هر یک از نمونه ها و همچنین محلول استاندارد با غلظت های متفاوت، در درون هر یک از چاهک های پلیت اضافه شد. سطح پلیت توسط کاور کیت پوشانده شد و برای ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس چاهک ها خالی شد. بلافاصله

بازوی باز در گروه دریافت کننده اتانول در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد (جدول ۱). ($P < 0.001$). همانطور که در جدول ۱ مشخص شده فاکتور درصد دفعات ورود به بازوی باز در گروه دریافت کننده اتانول در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار دارد ($P < 0.001$).

همچنین مقایسه داده های درصد زمان سپری شده در بازوی بسته نشان داد که تجویز اتانول افزایش معنادری نسبت به گروه کنترل در این فاکتور ایجاد نمود (جدول ۱). ($P < 0.001$). در معرض قرارگیری موش های باردار با اتانول سبب افزایش معنی داری در درصد تعداد ورود فرزندان به بازوی بسته در مقایسه با گروه کنترل گردید (جدول ۱). ($P < 0.001$).

۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی بادی اولیه بیوتینیل شده به هر چاهک اضافه گردید. دوباره پلیت با کاور دیگری پوشانده شد و برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از خالی کردن چاهک ها، ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو به هر چاهک اضافه شد و دوباره چاهک ها از بافر خالی و این مرحله شستشو برای سه بار تکرار شد. مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ثانویه متصل شده به HRP به هر چاهک اضافه گردید، پلیت با کاور پوشانده شد و برای ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس دوباره خالی کردن چاهک ها و شستشوی چاهک ها توسط بافر شستشو همانند مرحله سوم و برای پنج مرتبه انجام شد. در مرحله بعد ۹۰ میکرولیتر سوبسترا به چاهک ها اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. نهایتاً ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه شد و بلافاصله جذب محلول توسط دستگاه میکروپلیت اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار جذب متناسب با میزان پروتئین TrkB می باشد و میزان پروتئین TrkB در نمونه ها و پس از رسم منحنی استاندارد و با استفاده از معادله خط، محاسبه شد و میزان پروتئین TrkB بر میلی گرم پروتئین نمونه گزارش گردید. برای سنجش میزان پروتئین TrkB در هیپوکامپ از ۷ سر موش استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج و رسم هیستوگرام ها: سنجش های آماری بوسیله نسخه ۲۶ نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون t مستقل (Independent- samples T test) انجام شد. سطح معناداری داده ها در $P < 0.05$ بررسی گردید. هیستوگرام ها بوسیله نرم افزار Excel ترسیم گردید.

یافته ها

اندازه گیری میزان الکل خون نوزادان مادران تحت تیمار اتانول در دوران بارداری و شیردهی نشان داد که میزان اتانول خون فرزندان 27.79 ± 1.99 میلی گرم بر دسی لیتر بود. مقایسه داده های درصد زمان سپری شده در بازوی باز نشان داد که کاهش معنی داری در درصد زمان سپری شده در

جدول ۱. تاثیر مصرف اتانول در دوران بارداری و شیردهی بر رفتارهای شبه اضطرابی در فرزندان

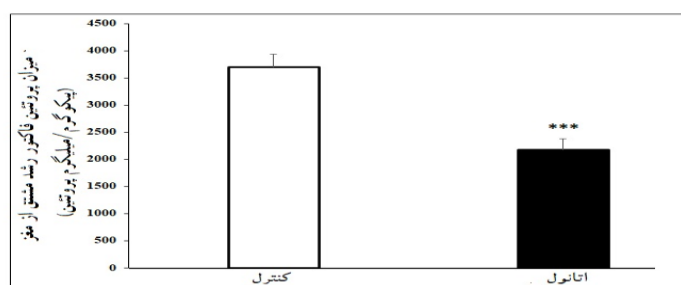
گروه	درصد زمان حضور در بازوی باز	درصد زمان حضور در بازوی بسته	درصد دفعات ورود به بازوی باز	درصد دفعات ورود به بازوی بسته
کنترل	۶۵/۳۷±۱/۹۶	۳۴/۶۲±۱/۶۷	۵۷/۰۷±۰/۹۲	۴۲/۹۲±۱
اتانول	۳۶/۰۴±۲/۵۸***	۶۳/۹۵±۲/۶۴***	۴۴/۰۸±۱/۷۲***	۵۵/۹۱±۱/۶۴***

اتانول فاکتور درصد زمان حضور در بازوی باز و فاکتور درصد ورود به بازوی باز را کاهش معنادار داد. همچنین فاکتور درصد زمان حضور در بازوی بسته و فاکتور درصد ورود به بازوی بسته بواسطه اتانول افزایش معناداری در مقایسه با کنترل نشان داد. داده ها به صورت میانگین \pm میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده اند (n=6).

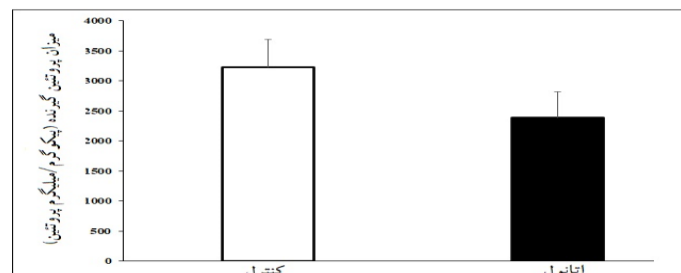
بوسیله تکنیک الایزا سنجش گردید. نتایج حاصل نشان دادند که بدنبال تیمار مادران با اتانول در دوران بارداری و شیردهی تغییر معناداری در میزان پروتئین گیرنده TrkB در هیپوکامپ فرزندان ایجاد نکردید (شکل اب).

میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ فرزندان با استفاده از تکنیک الایزا مورد سنجش قرار گرفت. مقایسه داده ها نشان داد که تجویز اتانول افزایش معناداری در میزان BDNF هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نمود (شکل الف). ($P<0.001$). بیان گیرنده BDNF در هیپوکامپ فرزندان نیز

الف



ب



الف- اتانول میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ را در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار داد. ب- تغییرات معناداری در میزان پروتئین گیرنده TrkB در هیپوکامپ در مقایسه با کنترل مشاهده نشد. داده ها به صورت میانگین \pm میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده اند (n=7).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در معرض قرارگیری با اتانول در دوران بارداری و شیردهی کاهش معنادار در درصد زمان سپری شده در بازوی باز و درصد دفعات ورود به بازوی باز ایجاد نمود. همچنین تیمار با اتانول سبب افزایش معنادار در درصد زمان سپری شده در بازوی بسته و درصد دفعات ورود به بازوی بسته گردید. در پژوهش حاضر از مدل رفتاری ماز بعلاوه ای شکل مرتفع برای سنجش اضطراب استفاده شد. این مدل یکی از مدل های غیرشرطی سنجش اضطراب بوده و در جانوران برای مطالعه اضطراب از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۲۴). همانطور که پیشتر ذکر گردید کاهش در درصد زمان سپری شده در بازوی باز و کاهش درصد دفعات ورود به بازوی باز از شاخص های تشخیص رفتار های اضطرابی می باشد.

یافته های ما در مورد اثرات اتانول بر رفتارهای اضطرابی در راستای نتایج گزارش شده توسط چندین محقق می باشد که نشان دادند در معرض قرارگیری جنین با اتانول سبب افزایش اضطراب می گردد (۷، ۹).

بنابر این مصرف اتانول در دوره بارداری و شیردهی سبب اضطراب در موش های جوان می گردد. این اثر را می توان توسط افزایش غلظت اتانول در خون موش های در معرض اتانول توجیه نمود. همانطور که یافته های این تحقیق نشان داد که غلظت اتانول خون موش های گروه اتانول $14 \pm$ میلی گرم در دسی لیتر است.

مطالعات نشان داده اند که اتانول از طریق عبور از جفت وارد جریان خون جنین می گردد (۲۵). همچنین هنگامی که مادر شیرده الکل مصرف می کند الکل وارد شیر شده و با همان غلظت موجود در خون در شیر مادر نیز یافت می گردد (11). جنین به دلیل میزان کم آنزیم اصلی متابولیزه کننده الکل یعنی آنزیم الکل دهیدروژناز کبدی توانایی محدودی در متابولیزه کردن الکل دارد. بنابراین، حذف الکل از جنین از طریق انتشار غیرفعال از جفت بدنال حذف الکل از مادر خواهد بود. علاوه بر این، میزان حذف الکل از مایع آمنیوتیک تقریباً نصف دفع از طریق خون مادر است به همین

دلیل سبب غلظت نسبتاً بالای الکل در مایع آمنیوتیک می گردد، هنگامیکه سطوح الکل کم و از خون مادری دفع گردیده است. بنابر این مایع آمنیوتیک ممکن است بعنوان یک مخزن برای الکل عمل کند و واقعا جنین به مدت طولانی تری نسبت به پیش بینی بر اساس غلظت الکل خون مادر در معرض الکل قرار گیرد (26). الکل به راحتی از طریق لیپید دو لایه غشا به درون سلول منتشر شده و ۹۵٪ آن از طریق متابولیسم اکسیداتیو و مابقی از طریق غیراکسیداتیو متابولیزه می شود و دارای اثرات توکسیک بر تکوین سیستم عصبی مرکزی می باشد (۲۷)، لذا مصرف آن در طی دوران بارداری می تواند طیف وسیعی از اختلالات شناختی، رفتاری و همچنین تغییرات غیر طبیعی فیزیکی را برای جنین ایجاد نماید.

مطالعات قبلی تغییرات در سنتز و فراهمی فاکتورهای نوروتروفیک ضروری، گیرنده های آنها و یا هر دو را به عنوان یکی از مکانیسم های درگیر در آسیب سیستم عصبی مرکزی با واسطه الکل را پیشنهاد نموده اند (۱۵). یافته های این تحقیق نشان داد که تجویز اتانول میزان پروتئین BDNF هیپوکامپ را در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنا دار داد. BDNF یکی از اعضای خانواده فاکتورهای نوروتروفیک در سیستم عصبی مرکزی است. فاکتورهای نوروتروفیکی پروتئین های ترشحی هستند که نقش مهمی در تکوین و حفظ سیستم عصبی ایفا می کنند. شواهد نشان داده که در هنگام تکوین سیستم عصبی، مرگ سلولی بطور گسترده در نورون ها اتفاق می افتد و تنها سلول هایی که به میزان کافی از حمایت نوروتروفیکی برخوردار باشند قادر به زنده ماندن هستند. BDNF سبب زنده ماندن سلول عصبی از طریق تنظیم پلاستیسیته سیناپسی و مسیرهای سیگنالینگ PI3K/Akt و ERK و فسفولیپاز C می شود (۲۸). همچنین مطالعات نشان داده اند که BDNF نقش مهمی در انعطاف پذیری سیناپسی در هیپوکامپ، نورون زایی و یادگیری و حافظه بازی می کند (۲۹، ۳۰).

تنظیم بیان ژن BDNF بواسطه اتانول در هیپوکامپ می تواند با اثر مستقیم اتانول بر رسپتور های NMDA مرتبط باشد.

کاهش می دهد (۳۲). هر چند بعضی تناقضات در نتایج میزان BDNF هیپوکامپ موش های در معرض اتانول در دیگر مطالعات وجود دارد (۳۴, ۳۵) که احتمالا می تواند مرتبط با حیوان مورد آزمایش، زمان در معرض قرارگیری حیوانات با اتانول، سن و دوز اتانول باشد.

نتایج ما نشان داد که میزان پروتئین گیرنده BDNF (TrkB) در گروه اتانول تغییرات معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. این نتایج همسو با نتایج فنگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ و نتایج مور و همکاران در سال ۲۰۰۴ می باشد که نشان دادند در معرض قرارگیری با اتانول تغییرات معناداری به ترتیب در میزان بیان گیرنده TrkB در روز ۷-۸ و ۱۰ پس از تولد در هیپوکامپ ایجاد ننمود (۳۲, ۳۶). گزارش شده فعالیت مسیر BDNF/TrkB یک نقش مهم در حفظ متناسب فرایند های تمایز سلولی و بقا نورونی در سیستم عصبی مرکزی بویژه در هیپوکامپ و قشر بازی می کند. بنابر این تغییر ساختارهای هیپوکامپ و قشر بدنبال در معرض قرارگیری با اتانول در رحم مثل مرگ طبیعی سلول و نکروز سلولی در قشر (۳۷) و کاهش تعداد نورون های پیرامیدال در ناحیه CA1 هیپوکامپ (۳۸) ممکن است نتیجه قسمتی از عملکرد نارسا سیستم BDNF در این نواحی باشد (۳۹).

اسچیدت و همکاران در سال ۲۰۱۶ تاثیر در معرض قرارگیری با اتانول با دوزهای ۳ و ۱٫۵ گرم بر کیلوگرم را بر رفتارهای اضطرابی و بیان BDNF در هیپوکامپ را بررسی نمودند. تجویز اتانول از روز ۳۰ تا ۴۶ روزگی موش های صحرایی نر صورت گرفت. آنها نشان دادند که تجویز اتانول میزان بیان BDNF را در هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار داد اما سبب رفتارهای اضطرابی در موش ها نگردید (۴۰).

BDNF نوروتروفینی است که رشد سلول، تمایز سلول و تغییرات سیناپسی را تحت تاثیر قرار می دهد (۴۱) و به میزان زیادی در هیپوکامپ در حال تکوین و بزرگسالان بیان می شود (۴۲). اخیرا، پلی مورفیسم تک نوکلئوتید (SNP) ناحیه کد کننده ژن BDNF (Val66Met) به عنوان ریسک

بهاوی و همکارانش بیان کردند که مهار بیان BDNF در سلول های گرانولی مخچه مربوط به مداخله الکل با عملکرد گیرنده های NMDA می باشد (۳۱).

فنگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که مصرف الکل در دوران بارداری در موش های صحرایی (از روز ۵ بارداری تا انتهای بارداری) باعث کاهش میزان بیان و پروتئین BDNF در قشر و هیپوکامپ فرزندان ۸ روزه شده و همچنین باعث مهار فسفریلاسیون گیرنده TrkB در هیپوکامپ می گردد اما تغییری در مقدار کل پروتئین TrkB ایجاد ننمود. آنها پیشنهاد نمودند که تغییرات در بیان و عملکرد BDNF می تواند در نقص های مربوط به الکل در فرزندان نقش داشته باشد (۳۲).

میکي و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات تجویز اتانول در دوران اولیه تولد بر بیان BDNF در هیپوکامپ موش های صحرایی را بررسی کردند و نشان دادند که قرارگیری در معرض اتانول در روزهای ۱۰ تا ۱۵ بعد از تولد باعث افزایش بیان BDNF در روز ۱۶ و ۲۰ و کاهش آن در روز ۶۰ بعد از تولد در مقایسه با گروه کنترل در هیپوکامپ می شود. این تغییرات غیرطبیعی در بیان BDNF می تواند منجر به ناهنجاری های ساختاری و عملکردی شود که در نهایت می تواند سبب اختلالات یادگیری و ناهنجاری های رفتاری مشاهده شده در بیماران مبتلا به FAS شود (۳۳).

هیتون و همکاران گزارش نمودند قرارگیری در معرض اتانول در دوران قبل از تولد تغییری در میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ، قشر/استریاتوم، سپتوم و مخچه ایجاد ننمود، اما در معرض قرارگیری در دوران اولیه بعد از تولد سبب افزایش میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ و قشر/استریاتوم در موش های ۱۰ روزه گردید که در روز ۲۱ بعد از تولد به مقادیر کنترل برگشت. بنظر می رسد این افزایش در دوره تکوین مغز می تواند در نوروپاتولوژی های مشاهده شده نقش داشته باشد (۳۴). در مجموع، مطالعه ما گزارشات قبلی را تایید می کند که نشان دادند در معرض قرارگیری با اتانول میزان بیان BDNF در هیپوکامپ را

جنس نر مورد بررسی قرار گرفت که احتمال دارد متفاوت با نتایج در جنس ماده باشد لذا نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

فاکتور برای اختلالات اضطرابی شامل اختلال استرس پس از سانحه (PTSD) شناخته شده است (۴۳).

نتیجه گیری

تجویز اتانول در دوران بارداری و شیردهی اضطراب در فرزندان ایجاد و میزان پروتئین BDNF در هیپوکامپ را کاهش داد. پیشنهاد می شود که تغییرات میزان BDNF در هیپوکامپ نوزادان در طول تکوین احتمالا می تواند در این اختلال مشارکت داشته باشد. در این تحقیق، تأثیر تجویز اتانول در دوران بارداری و شیردهی بر رفتارهای شبه اضطرابی، میزان BDNF و رسپتور آن در هیپوکامپ تنها در

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی با کد ۴۵۶۴ است که شامل پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه دامغان در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۷ و رساله دکتری تخصصی مصوب در تاریخ ۲۰/۰۴/۱۳۹۶ می باشد. بدینوسیله از حمایت مالی ستاد علوم و فناوریهای شناختی (گرنه با کد ۴۵۶۴) و از دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان تشکر و قدردانی می گردد. نویسندگان مقاله بیان می کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع

1. West JR, Chen WJ, Pantazis NJ. Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. *Metab Brain Dis.* 1994;9(4):291-322.
2. Elliott EJ, Payne J, Morris A, Haan E, Bower C. Fetal alcohol syndrome: a prospective national surveillance study. *Arch Dis Child.* 2008;93(9):732-7.
3. Sayal K, Heron J, Golding J, Alati R, Smith GD, Gray R, et al. Binge pattern of alcohol consumption during pregnancy and childhood mental health outcomes: longitudinal population-based study. *Pediatrics.* 2009;123(2):e289-96.
4. Burden MJ, Westerlund A, Muckle G, Dodge N, Dewailly E, Nelson CA, et al. The effects of maternal binge drinking during pregnancy on neural correlates of response inhibition and memory in childhood. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35(1):69-82.
5. Rasmussen C, Becker M, McLennan J, Urichuk L, Andrew G. An evaluation of social skills in children with and without prenatal alcohol exposure. *Child Care Health Dev.* 2011;37(5):711-8.
6. Barr HM, Bookstein FL, O'Malley KD, Connor PD, Huggins JE, Streissguth AP. Binge drinking during pregnancy as a predictor of psychiatric disorders on the Structured Clinical Interview for DSM-IV in young adult offspring. *Am J Psychiatry.* 2006;163(6):1061-5.
7. Dursun I, Jakubowska-Dogru E, Uzbay T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85(2):345-55.
8. Helleman KG, Sliwowska JH, Verma P, Weinberg J. Prenatal alcohol exposure: fetal programming and later life vulnerability to stress, depression and anxiety disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;34(6):791-807.
9. Osborn JA, Kim CK, Steiger J, Weinberg J. Prenatal ethanol exposure differentially alters behavior in males and females on the elevated plus maze. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998;22(3):685-96.
10. Brocardo PS, Gil-Mohapel J, Wortman R, Noonan A, McGinnis E, Patten AR, et al. The Effects of Ethanol Exposure During Distinct Periods of Brain Development on Oxidative Stress in the Adult Rat Brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 2017;41(1):26-37.
11. Guerri C, Sanchis R. Alcohol and acetaldehyde in rat's milk following ethanol administration. *Life Sci.* 1986;38(17):1543-56.

12. Patten AR, Fontaine CJ, Christie BR. A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors. *Frontiers in pediatrics*. 2014;2:93.
13. Nazeri M, Ebrahimi A, Aghaei I, Ghotbi Ravandi S, Shabani M. Psychological stress has a higher rate of developing addictive behaviors compared to physical stress in rat offspring. *EXCLI J*. 2017;16:903-13.
14. Jansson LM. Maternal Alcohol Use During Lactation and Child Development. *Pediatrics*. 2018;142(2).
15. Heaton MB, Moore DB, Paiva M, Madorsky I, Mayer J, Shaw G. The role of neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, and endogenous antioxidants in the differential temporal vulnerability of neonatal cerebellum to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(4):657-69.
16. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci*. 1997;17(7):2295-313.
17. Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. 2002;22(8):3251-61.
18. Schmidt HD, Duman RS. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(12):2378-91.
19. Zhang ZH, Wu LN, Song JG, Li WQ. Correlations between cognitive impairment and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of post-stroke depression rats. *Mol Med Rep*. 2012;6(4):889-93.
20. Miao Z, Zhang J, Li Y, Li X, Song W, Sun ZS, et al. Presence of the pregnant partner regulates microRNA-30a and BDNF levels and protects male mice from social defeat-induced abnormal behaviors. *Neuropharmacology*. 2019;159:107589.
21. Mahdini R, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, Salmani ME. Vitamin E attenuates alterations in learning, memory and BDNF levels caused by perinatal ethanol exposure. *Nutr Neurosci*. 2019;1-15.
22. Zarrindast MR, Solati J, Oryan S, Parivar K. Effect of intra-amygdala injection of nicotine and GABA receptor agents on anxiety-like behaviour in rats. *Pharmacology*. 2008;82(4):276-84.
23. Lee Y, Rowe J, Eskue K, West JR, Maier SE. Alcohol exposure on postnatal day 5 induces Purkinje cell loss and evidence of Purkinje cell degradation in lobule I of rat cerebellum. *Alcohol*. 2008;42(4):295-302.
24. Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(2):33-6.
25. Waltman R, Iniquez ES. Placental transfer of ethanol and its elimination at term. *Obstet Gynecol*. 1972;40(2):180-5.
26. Brien JF, Loomis CW, Tranmer J, McGrath M. Disposition of ethanol in human maternal venous blood and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 1983;146(2):181-6.
27. Liyanage VR, Curtis K, Zachariah RM, Chudley AE, Rastegar M. Overview of the Genetic Basis and Epigenetic Mechanisms that Contribute to FASD Pathobiology. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(7):808-28.
28. Climent E, Pascual M, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *Journal of neuroscience research*. 2002;68(2):213-25.

29. Shimazu K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, Jaenisch R, et al. NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem.* 2006;13(3):307-15.
30. Alonso M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol.* 20۰۶;۲۶(۱):۷۴-۸۶.
31. Bhavé SV, Ghoda L, Hoffman PL. Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci.* 1999;19(9):3277-86.
32. Feng M-J, Yan S-E, Yan Q-S. Effects of prenatal alcohol exposure on brain-derived neurotrophic factor and its receptor tyrosine kinase B in offspring. *Brain research.* 2005;1042(2):125-32.
33. Miki T, Kuma H, Yokoyama T, Sumitani K, Matsumoto Y, Kusaka T, et al. Early postnatal ethanol exposure induces fluctuation in the expression of BDNF mRNA in the developing rat hippocampus. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2008;68(4):484-93.
34. Heaton MB, Mitchell JJ, Paiva M, Walker DW. Ethanol-induced alterations in the expression of neurotrophic factors in the developing rat central nervous system. *Developmental Brain Research.* 2000;121(1):97-107.
35. Stragier E, Massart R, Salery M, Hamon M, Geny D, Martin V, et al. Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice. *Mol Psychiatry.* 2015;20(3):405-12.
36. Moore DB, Madorsky I, Paiva M, Barrow Heaton M. Ethanol exposure alters neurotrophin receptor expression in the rat central nervous system: Effects of neonatal exposure. *J Neurobiol.* 2004;60(1):۱۶-۲۴.
37. Climent E, Pascual M, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res.* 2002;68(2):213-25.
38. Bonthius DJ, West JR. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: Increased brain damage with binge exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 1990;14(1):107-18.
39. Scaccianoce S, Del Bianco P, Caricasole A, Nicoletti F, Catalani A. Relationship between learning, stress and hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience.* 2003;121(4):825-8.
40. Scheidt L, Fries GR, Stertz L, Cabral JC, Kapczinski F, de Almeida RM. Ethanol during adolescence decreased the BDNF levels in the hippocampus in adult male Wistar rats, but did not alter aggressive and anxiety-like behaviors. *Trends Psychiatry Psychother.* 2015;37(3):143-51.
41. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42.
42. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 1990;9(8):2459-64.
43. Frielingsdorf H, Bath KG, Soliman F, Difede J, Casey BJ, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met endophenotypes: implications for posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1208:150-7.