

بررسی استرس اکسیداتیو و ژن BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی باردار تیمار شده با اتانول و تاثیر آن بر تعداد و وزن فرزندان

موسی شعبانی قهرمانلو^۱، غلامحسن واعظی^۲، ویدا حجتی^۳، شهرام شرفی^۴

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲. استاد، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۳. دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۴. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: مصرف الکل در دوران بارداری باعث آسیب به مادر و جنین در حال تکامل بخصوص سیستم عصبی مرکزی می‌شود. ایجاد استرس اکسیداتیو، فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی و مداخله در بیان فاکتورهای نوروتروفیک جزو اختلالات حاصل از الکل می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین استرس اکسیداتیو و میزان بیان ژن BDNF هیپوکامپ موش‌های صحرایی باردار تیمار شده با اتانول و تاثیر آن بر تعداد و وزن فرزندان انجام شد.

روش‌ها: موش‌های صحرایی باردار به پنج گروه شش‌تایی تقسیم شدند: گروه کنترل (فقط آب مقطر) و چهار گروه تیمار که اتانول (۲۰ درصد، ۴/۵ گرم/کیلوگرم) را به صورت گاواژ دهانی به ترتیب در ۵ روز اول، دهه اول بارداری، دهه دوم بارداری و کل دوران بارداری، دریافت نمودند. مادران در دوران بارداری و فرزندان پس از تولد وزن شدند. مادران سه هفته پس از زایمان طبق اصول اخلاقی قربانی شدند و بافت هیپوکامپ مغز آنها استخراج شد. فعالیت گلوکوتائین پراکسیداز (GPx)، سوپراکسید دسموتاز (SOD) و مالون دی‌آلدئید (MDA) در هیپوکامپ نمونه‌ها از طریق اسپکتروفتومتری ارزیابی شد. میزان بیان ژن BDNF با روش RT-PCR اندازه‌گیری شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای SPSS، Excel و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی استفاده شد.

نتایج: تجویز اتانول به موش‌های باردار تاثیری بر وزن مادران نداشت، اما موجب کاهش تعداد و وزن فرزندان، افزایش میزان MDA، افزایش فعالیت SOD، کاهش فعالیت GPx و بیان BDNF در مقایسه با گروه کنترل شد.

نتیجه‌گیری: اتانول بیشترین اثرات نامطلوب خود را در گروه‌های تحت تیمار در دهه‌ی دوم بارداری و کل دوره‌ی بارداری موش‌های صحرایی مادر داشته است.

کلید واژه‌ها:

اتانول، استرس اکسیداتیو، فاکتور رشد مشتق از مغز، بارداری، موش صحرایی

تمامی حقوق نشر برای
دانشگاه علوم پزشکی
تربت حیدریه محفوظ
است.

مقدمه

تولد که از نظر مراحل رشد مغزی معادل با جنین سه‌ماهه انسان می‌باشد، سبب افزایش مرگ سلولی، اختلال در سیناپتوژنیز و نقص پایدار در پلاستیسیته نورون در هیپوکامپ می‌شود (۱۰، ۱۱). این تغییرات ساختاری، در مناطق مختلف هیپوکامپ با کاهش در تعداد سلول‌ها و کاهش نورون‌ها در بزرگسالی همراه است (۱۲). فاکتور رشد مشتق از مغز (BDNF) نوروتروفینی است که رشد و تمایز سلول و تغییرات سیناپسی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و به مقدار زیاد در هیپوکامپ جنین در حال تکوین و بزرگسالان بیان می‌شود. الکل اثرات جدی بر پردازش اطلاعات و حافظه بخصوص حافظه کوتاه‌مدت و حافظه فضایی مربوط به هیپوکامپ دارد (۱۳).

استرس اکسیداتیو به عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید و میزان دفاع آنتی‌اکسیدانی برای خنثی کردن آنها گفته می‌شود. منابع خارجی تولید ROS شامل تشعشعات، اشعه فرابنفش، واکنشگرهای شیمیایی، آلودگی، استعمال دخانیات، مواد مخدر و اتانول می‌باشند (۱۴). ROS می‌توانند نقش‌های فیزیولوژیکی در انتقال پیام سلولی داشته باشند اما در مقادیر اضافی باعث اختلال در بسیاری از مسیرهای سلولی و تغییرات ژنتیکی می‌شوند. سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، یکی از آنزیم‌های مهم سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن است که باعث تجزیه سوپراکسیدها و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌شود. مالون‌دی‌آلدید (MDA) یک نشانگر استرس اکسیداتیو است. گلوکاتایون پراکسیدازها (GPx) خانواده‌ای از آنزیم‌ها با فعالیت پراکسیدازی هستند که نقش بیولوژیکی اصلی آنها محافظت ارگانیزم‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد و غشای سلولی را از پراکسیداسیون لیپیدها محافظت می‌نماید (۱۵). پژوهش حاضر با هدف بررسی استرس اکسیداتیو و بیان ژن BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی ماده تیمار شده با اتانول در طول بارداری و تاثیر آن بر تعداد و وزن نوزادان می‌باشد.

استفاده روزافزون از الکل (اتانول) به عنوان یک نوشیدنی در جوامع مختلف به تدریج آثار زیان‌آور خود را آشکار نموده و امروزه تحقیقات گسترده‌ای پیرامون اثرات منفی الکل صورت می‌گیرد (۱). اتانول از نظر فارماکولوژیکی جزء مواد مخدر روان گردان محسوب می‌شود که دارای اثر عمده سستی‌زا و سرکوب‌کننده بر روی سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. همچنین این ماده مخدر به دلیل فعالیتش بر مدار پاداش مغز دارای اثرات پاداش دهنده می‌باشد که همین عامل موجب اعتیاد و وابستگی به الکل می‌شود. اتانول به راحتی از اکثر غشاهای سلولی بدن عبور می‌کند و هیچ سد بیولوژیکی در بدن ندارد و زمانی که توسط مادر باردار مصرف می‌شود به راحتی از جفت عبور کرده و به جنین می‌رسد (۲، ۳). در این مرحله از تکوین به دلیل اینکه جنین دارای آنزیم متابولیزه کننده بالغ یا فعال اتانول یعنی الکل دهیدروژناز نمی‌باشد، فعالیت و اثر اتانول در جنین بیشتر از بدن مادر طول می‌کشد (۴).

در سراسر جهان، حدود ۱۰٪ از زنان در طول بارداری الکل مصرف می‌کنند و از هر ۶۷ نفر از این زنان، یک نفر فرزند مبتلا به سندرم الکی جنینی (FAS) به دنیا می‌آورد. کودکان مبتلا به این سندرم دارای اختلالات وابسته به الکل (FASD) مانند تاخیر در رشد، بدشکلی در صورت، اختلالات سیستم عصبی، عقب ماندگی ذهنی، مشکلات حافظه و یادگیری و افزایش تحریک‌پذیری هستند (۵، ۶). اتانول بر سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف اثر دارد؛ برای مثال، گیرنده‌های تحریکی گلوتامات را مهار و گیرنده‌های مهاری گابا را فعال می‌کند (۷). سایر عوامل ایجاد کننده تغییرات روانی در معتادان الکی شامل ترومای مغزی، مننژیت، هیپوگلیسمیا، انسفالوپاتی ناشی از کبد، کتواسیدوز ناشی از الکل می‌باشد (۸، ۹).

هیپوکامپ که در فرآیندهای یادگیری و حافظه دخیل است، به عنوان قسمتی از مغز که نسبت به اثرات توکسیک اتانول در طی دوران تکوین بسیار آسیب‌پذیر و حساس است، شناخته شده به طوری که تجویز الکل به نوزاد موش صحرایی در ده روز ابتدای

روش‌ها

دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتیفریژ شده و از سوپرناتانت (فاز رویی) بافت برای سنجش‌ها استفاده شد.

سنجش میزان مالون‌دی‌آلدید (MDA): اندازه‌گیری MDA شاخص مناسبی برای لیپید پراکسیداسیون می‌باشد. در این روش MDA با تیوباربیتریک اسید (TBA) در محیط اسیدی واکنش می‌دهد و رنگ صورتی ایجاد می‌کند که رنگ صورتی تولید شده در طول موج ۵۲۲ نانومتر دارای جذب بوده و شدت جذب به دست آمده در این طول موج متناسب با تشکیل کمپلکس TBA-MDA می‌باشد. میزان MDA بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): سنجش بر اساس مهار احیای فتوشیمیایی نیتروبلو ترانزولیم کلراید (NBT) توسط نمونه‌ها سنجش شد. میزان جذب گروه‌های مختلف مورد آزمایش در طول موج ۵۶۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد (U) SOD به عنوان مقداری از آنزیم که ۵۰٪ مانع از احیاء NBT تحت شرایط سنجش می‌شود، تعیین شد. فعالیت بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز (GPx): فعالیت GPx با استفاده از tert-butyl hydroperoxide به عنوان سوستر و مصرف NADPH توسط گلوکوتایون ردوکتاز (GRd) در طول موج ۳۴۰ نانومتر، به مدت ۲ دقیقه و در ۳۷ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد. جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه خوانده شد. فعالیت بر حسب تغییرات جذب بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌گردد.

روش مولکولی: برای اندازه‌گیری بیان ژن از روش RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) استفاده شد. برای سنتز cDNA، مخلوط ۱ میکروگرم RNA و ۱ میکرولیتر پرایمر سنتز cDNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه انکوبه شد (از کیت شرکت سیناکلون برای سنتز cDNA استفاده شد). سپس ۲ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدها، ۴ میکرولیتر بافر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، ۱ میکرولیتر آنزیم

گروه بندی و تیمار حیوانات: موش‌های صحرایی نر و ماده بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم تهیه و به حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان منتقل شدند. تعداد ۶ موش در هر قفس در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی/۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شده و دسترس آزاد به آب و غذا داشتند. یک هفته بعد از خوگیری و سازش حیوانات با محیط جدید، آزمایش‌ها آغاز شد. کلیه عملیات آزمایشگاهی با رعایت اصول اخلاق کار با حیوانات با شناسه‌ی کد اخلاق IR.IAU.DAMGHAN.REC.1401.016 صورت گرفت.

موش‌های صحرایی باردار از روز شروع بارداری (روز صفر بارداری) بطور تصادفی در ۵ گروه ۸ تایی به صورت زیر تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل: بارداری طبیعی و بدون دریافت اتانول (دریافت آب مقطر بصورت گاواژ). موش‌های گروه‌های تیمار روزانه (صبح) ۴/۵ گرم اتانول به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به صورت محلول در آب مقطر ۲۰ در صد وزن به حجم را بصورت گاواژ دهانی دریافت می‌کنند. ۲- گروهی که پنج روز اول بارداری، تحت تیمار اتانول بودند. ۳- گروهی که در دهه اول بارداری (روز صفر تا دهم)، تحت تیمار اتانول بودند. ۴- گروهی که در دهه دوم بارداری (روز دهم تا روز بیستم)، تحت تیمار اتانول بودند. ۵- گروهی که در کل دوران بارداری، تحت تیمار اتانول بودند. موش‌های نر و ماده برای جفتگیری در قفس‌های جداگانه‌ای در طول شب قرار داده شدند. نمونه‌ها در روز ۳۰ بعد از تولد، قربانی شدند و بافت هیپوکامپ مغز استخراج شد.

سنجش استرس اکسیداتیو: برای این منظور، سنجش میزان مالون‌دی‌آلدید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدها)، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتایون پراکسیداز انجام شد. ابتدا بافت هیپوکامپ با اضافه کردن بافر فسفات هموزنه گردید. برای این کار ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات بر روی بافت ریخته شده و سپس با استفاده از هموزنایزر دستی بافت به صورت کامل هموزن و لیز گردید. محلول لیز شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در

- فاز آبی (فاز بالایی) به میکروتیوب جدید منتقل شد.
 - هم حجم با مایع انتقال داده شده به تیوب جدید ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. سپس چند بار به آرامی میکروتیوب را سر و ته کرده و به مدت ۲۰ دقیقه تا ۱۲ ساعت در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد.
 - در پروتکل ارائه شده توسط شرکت، زمان مورد نیاز برای ماندن در ایزوپروپانول تنها ۱۵ دقیقه ذکر شده اما آزمایش‌ها نشان داد که قرار دادن میکروتیوب‌ها به مدت یک شبانه روز در ۲۰- درجه سانتیگراد تأثیر محسوس‌تری در افزایش کارایی استخراج RNA دارد.
 - به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm و در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد.
 - به آرامی سوپرناتانت دور ریخته شد.
 - ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ در صد جهت شدت شوی پلاک RNA اضافه شد و با چند ضربه پلاک RNA در آن شناور شد.
 - به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد.
 - به آرامی سوپرناتانت دور ریخته شد و اجازه داده شد تا پلاک RNA در زیر هود خشک شود. سپس ۴۰ میکرولیتر آب تزریق به پلاک موجود در میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت تا پلاک RNA در آب حل شود. کیفیت و کمیت RNA به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتوفوتومتر اندازه‌گیری شد. سپس بلافاصله RNA جهت نگهداری به ۸۰- درجه منتقل شد.
- الکتروفورز:**
- مخلوط ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر لودینگ بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد (بافر TBE غلظت نهایی ۰/۵X، ولتاژ ۱۰۰V، زمان ۳۰ دقیقه). ژل با دستگاه نمایشگر ژل (UVI doc) مشاهده شد. در این تحقیق از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شد. میزان نسبی تکثیر

ترانس‌کریپتاز معکوس، ۱ میکرولیتر پروتئین بازدارنده RNase اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه ۲۵ درجه، یک ساعت ۴۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۰ درجه انکوبه شد. جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش را نشان می‌دهد. مخلوط واکنش شامل ۲ cDNA میکرولیتر، ۰/۷۵ MgCl₂ میکرولیتر با غلظت نهایی ۰/۷۵ میلی‌مولار، بافر آنزیم DNA پلیمرز ۲/۵ میکرولیتر، آنزیم DNA پلیمرز ۰/۱۲۵ میکرولیتر، مخلوط نوکلئوتیدها ۰/۵ میکرولیتر و پرایمر سنس و آنتی سنس برای هر ژن با غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار بود. بعد از دناتوره شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت دو دقیقه PCR طبق برنامه زیر اجرا شد: دناتوره شدن در دمای ۹۴ درجه ۱۵ ثانیه، انلینگ (Annealing) در دمای ۶۰ درجه ۱ دقیقه و سنتز در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام شد. این برنامه در مجموع با ۲۹ چرخه انجام شد. پس از اتمام چرخه‌ها، واکنش نهایی سنتز به مدت ۲ دقیقه ۷۲ درجه انجام شد.

استخراج RNA

- بر اساس پروتکل ارائه شده توسط شرکت سیناژن بوده که اساس آن روش گوانیدینیوم-اسید-فنول و به شرح زیر می‌باشد:
- حدود ۳۰ میلی‌گرم از بافت جسم مخطط مغز موش صحرایی برای استخراج RNA نمونه‌برداری و در میکروتیوب قرار داده شد.
 - ۱ میلی‌لیتر محلول RNX-Plus روی بافت ریخته شد. سپس با استفاده از هموژنایزر دستی بافت هموژن گردید و ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد.
 - ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد به محتویات میکروتیوب اضافه شد. سپس حدود ۱۵ ثانیه، تیوب به شدت تکان داده شد و بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در این مرحله فاز آبی و فاز آلی به طور اولیه از هم جدا می‌شوند.
 - به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد.

۳- سنتز در دمای ۷۲ درجه ۱ دقیقه

۴- این برنامه در مجموع با ۳۰ چرخه انجام شد.

۵- بعد از اتمام چرخه‌ها، واکنش نهایی سنتز به مدت ۲ دقیقه ۷۲ درجه انجام شد.

کد پرایمر: Gapdh mw 342530

تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 صورت گرفت. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مشخص گردید و به دنبال آن از آزمون Tukey برای مشخص کردن سطح معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد. سطوح معنی‌داری $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند. نتایج به صورت میانگین \pm میانگین خطای استاندارد (Mean \pm SEM) ارائه گردید.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش

Primer	Sequence	Primer size (bp)	Product size (bp)
GAPDH-F	5'-TGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3'	۲۱	۲۰۳
GAPDH-R	5'-CCCTGTTGCTGTAGGCGTATT-3'	۲۱	۲۰۳
BDNF-F[57]	5'-GCCCAACGAAGAAAACCATA-3'	۲۰	۴۰۵
BDNF-R	5'-GATTGGGTAGTTCGGCATTG-3'	۲۰	۴۰۵

تعداد فرزندان در گروه‌های مورد مطالعه: میانگین تعداد

فرزندان مادران گروه کنترل ($0.83 \pm 1.0/2$) به طور معنی‌داری نسبت به میانگین تعداد فرزندان مادران گروه‌های چهارم ($0.54 \pm 0.8/6$) و پنجم ($0.83 \pm 0.7/8$) بیشتر است. تفاوت معنی‌داری در میانگین تعداد فرزندان مادران گروه‌های دوم (0.7 ± 1.0) و سوم ($0.83 \pm 0.9/2$) در مقایسه با فرزندان مادران گروه کنترل مشاهده نشد (نمودار ۳).

میزان MDA در هیپوکامپ: تفاوت معنی‌داری در میزان MDA در میان گروه‌ها مشاهده شد. نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار میزان MDA در گروه‌های ۳ ($p < 0.05$) و ۵ ($p < 0.001$) نسبت

هر یک از ژن‌ها توسط نرم افزار Image J اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان نسبی تکثیر ژن‌ها، شدت باند هر یک از ژن‌ها نسبت به شدت باند ژن GAPDH سنجیده شد.

برنامه PCR برای ژن BDNF

۱- دناتوره شدن در دمای ۹۴ درجه ۱۵ ثانیه

۲- آنیلینگ (Annealing) در دمای ۶۰ درجه ۱ دقیقه

۳- سنتز در دمای ۷۲ درجه ۱ دقیقه

۴- این برنامه در مجموع با ۲۹ چرخه انجام شد.

۵- پس از اتمام چرخه‌ها، واکنش نهایی سنتز به مدت ۲ دقیقه ۷۲ درجه انجام شد.

کد پرایمر: Accession Number BDNF NM-012513

برنامه PCR برای ژن GAPDH

۱- دناتوره شدن در دمای ۹۴ درجه ۱۵ ثانیه

۲- آنیلینگ در دمای ۵۵ درجه ۳۰ ثانیه

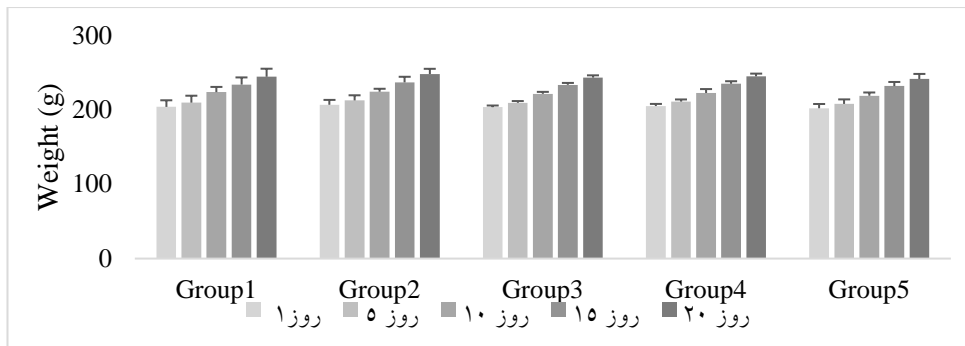
نتایج

تغییرات وزن مادران در دوران بارداری: وزن موش‌های باردار گروه‌های مختلف در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ بارداری تفاوت معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۱).

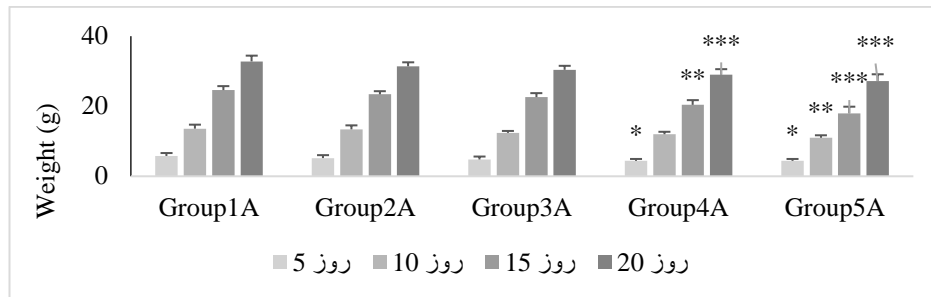
تغییرات وزن فرزندان از ۵ روزگی تا ۲۰ روزگی: وزن فرزندان در گروه ۴، به طور معنی‌داری نسبت به وزن فرزندان گروه کنترل در روزهای پنجم ($p < 0.05$)، پانزدهم ($p < 0.01$) و بیستم ($p < 0.001$) پس از تولد کمتر بود، همچنین وزن فرزندان در گروه ۵ به طور معنی‌دار نسبت به وزن فرزندان گروه کنترل در روزهای پنجم ($p < 0.05$)، دهم ($p < 0.01$)، پانزدهم ($p < 0.001$) و بیستم ($p < 0.001$) پس از تولد کمتر بود (نمودار ۲).

شد. در گروه‌های ۴ و ۵ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/001$). اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت SOD بین گروه کنترل با گروه‌های ۲ و ۳ مشاهده نشد (نمودار ۶). **میزان بیان نسبی *BDNF mRNA* در هیپوکامپ:** اختلاف معنی‌داری در میزان نسبی بیان *BDNF mRNA* در گروه‌های مختلف وجود دارد. میزان بیان نسبی *BDNF mRNA* در گروه‌های ۴ و ۵ کاهش معنی‌داری ($p < 0/001$) نسبت به گروه کنترل داشت. همچنین میزان بیان نسبی *BDNF mRNA* در گروه‌های ۲ ($p < 0/05$) و ۳ ($p < 0/01$) کاهش چشمگیری نسبت به گروه کنترل نشان داد (نمودار ۷).

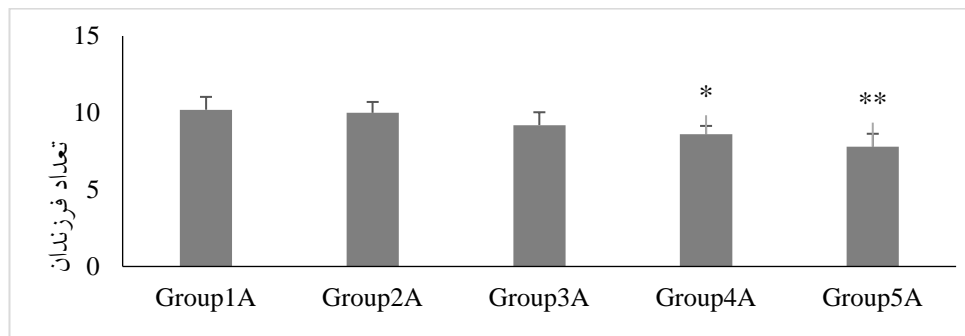
به گروه کنترل بود. همچنین، اختلاف معنی‌داری در میزان MDA هیپوکامپ گروه کنترل و گروه‌های ۲ و ۴ مشاهده نشد (نمودار ۴). **میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (*GPx*) در هیپوکامپ:** تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم GPx در میان گروه‌ها مشاهده شد. میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های ۴ و ۵ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت ($p < 0/001$). اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت GPx بین گروه کنترل و گروه‌های ۲ و ۳ مشاهده نشد (نمودار ۵). **آنزیم سوپراکسید دی‌سموتاز (*SOD*) در هیپوکامپ:** تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم SOD در میان گروه‌ها مشاهده



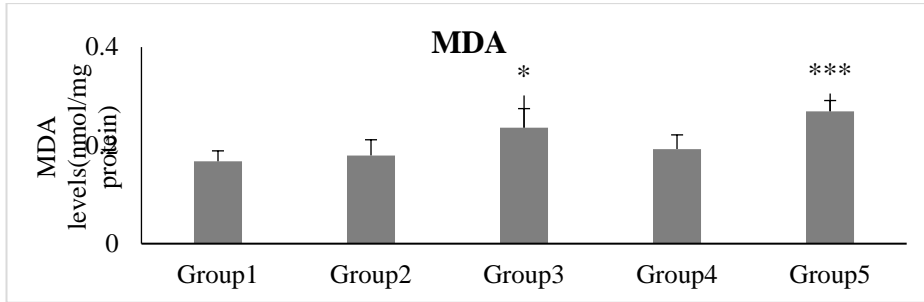
نمودار ۱- نتایج وزن مادران باردار در روزهای اول، پنجم، دهم، پانزدهم و بیستم بارداری در گروه‌ها.



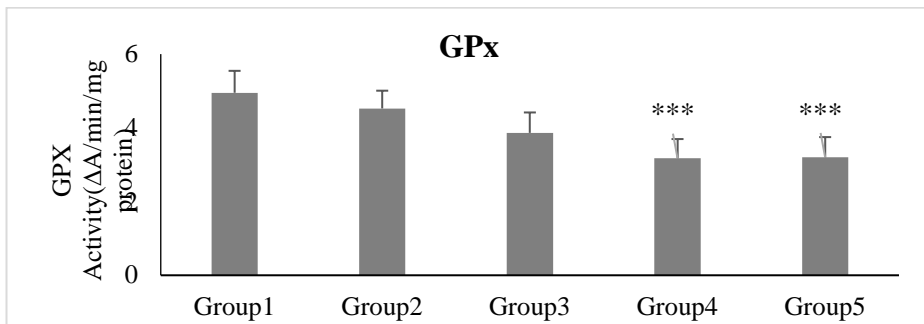
نمودار ۲- تغییرات وزن فرزندان در گروه‌ها. *: $p < 0/05$, **: $p < 0/01$, ***: $p < 0/001$ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل



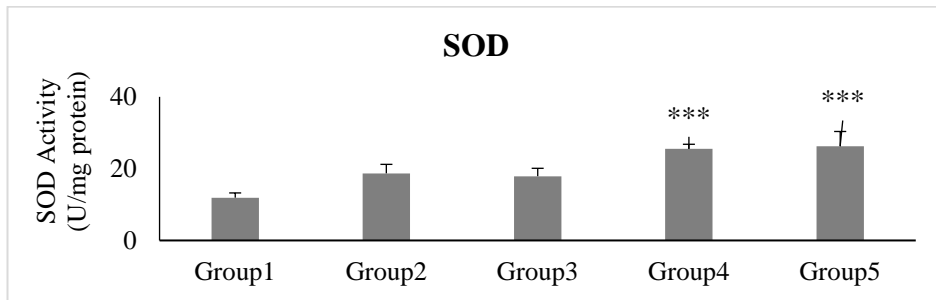
نمودار ۳- تغییرات میانگین تعداد فرزندان در گروه‌ها. *: $p < 0/05$ و **: $p < 0/001$ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل



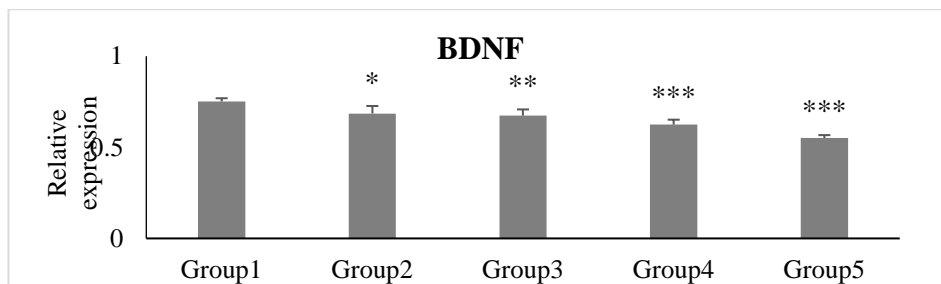
نمودار ۴- تغییرات میزان MDA در هیپوکامپ گروه‌ها. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل



نمودار ۵- فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز در هیپوکامپ گروه‌ها. ***: $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل



نمودار ۶- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هیپوکامپ گروه‌ها. ***: $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل



نمودار ۷- میزان بیان نسبی BDNF در هیپوکامپ گروه‌ها. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل

بحث

چهارم (در روزهای ۵، ۱۵ و ۲۰) و گروه پنجم (در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ بعد از تولد) در مقایسه با گروه کنترل داشت. همچنین تعداد فرزندان مادران گروه کنترل به طور معنی‌داری

در تحقیق حاضر مقایسه وزن مادران، تفاوت معنی‌داری در اثر مصرف الکل نشان نداد. وزن فرزندان، کاهش معنی‌داری در گروه

نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده‌ی کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم GPx در گروه‌های چهارم و پنجم، نسبت به گروه کنترل بود. همچنین افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم SOD در اثر اتانول در گروه‌های چهارم و پنجم مشاهده شد که می‌تواند در نتیجه افزایش بیش از حد استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در مجموع، نتایج بیانگر افزایش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در اثر مصرف اتانول در دوران بارداری بود.

یکی از مکانیسم‌های اثر اتانول بر مغز و مخصوصاً هیپوکامپ، القای استرس اکسیداتیو از طریق آپوپتوز، مرگ نورونی و آسیب به ماکرومولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک است که باعث صدمات و آسیب‌های جدی به سلول‌های مغزی می‌شود (۲۰). مقدار آنتی‌اکسیدان‌های سیستم عصبی مرکزی در مقایسه با بافت‌های دیگر بسیار کمتر می‌باشد و مقادیر بالای اسیدچرب اشباع نشده باعث آسیب‌پذیری بیشتر سیستم عصبی مرکزی در مقابل رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اتانول باعث کاهش معنی‌دار میزان mRNA ی BDNF، در هیپوکامپ مادران الکلی در مقایسه با کنترل شده است. تیمار با الکل در طول تکوین مغز باعث کاهش مقادیر فاکتور رشد مشتق از مغز (BDNF) و نیز تغییر در گیرنده آن یعنی تیروزین‌کیناز B (TrkB) می‌شود که این عمل را از طریق اختلال در مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی درگیر در بقای سلولی یعنی مسیرهای MAPK/ERK و PI3K/AKT انجام می‌دهد. این اثرات و اتفاقات منجر به افزایش مرگ سلولی در اثر آپوپتوز و نکروز در قشر مخچه می‌شود (۲۲).

BDNF و سایر نوروتروفین‌ها برای نوروژنایی در هیپوکامپ ضروری و حیاتی می‌باشند. در واقع BDNF یک تسهیل‌کننده سیناپسی قدرتمند می‌باشد و حیواناتی که دچار کمبود و نقص این پروتئین می‌باشند دچار اختلال در تقویت طولانی مدت و اختلال یادگیری و حافظه می‌باشند (۲۳). بعضی تناقضات در نتایج میزان BDNF هیپوکامپ موش‌های در معرض اتانول وجود دارد (۲۴، ۲۵) که احتمالاً می‌تواند مرتبط با حیوان مورد آزمایش،

نسبت به تعداد فرزندان مادران گروه ۴ و ۵ بیشتر بود. در واقع کاهش وزن و تعداد فرزندان گروه‌های چهارم و پنجم در مقایسه با گروه کنترل نشان‌دهنده‌ی تاثیر بیشتر مصرف اتانول در دهه‌ی دوم و کل دوره‌ی بارداری نسبت به گروه‌های کنترل، ۵ روزه و دهه‌ی اول بارداری می‌باشد. به نظر می‌رسد مصرف اتانول در دهه دوم بارداری می‌تواند باعث آسیب‌های بیشتری در موش صحرایی باشد. ممکن است کاهش وزن القا شده توسط اتانول در فرزندان به دلیل اثر الکل و استرس اکسیداتیو حاصل از آن بر تجزیه چربی‌ها باشد. در همین راستا، مطالعاتی مبنی بر اثر الکل بر کاهش توده چربی در جوندگان وجود دارد (۱۶).

بیشتر مطالعات بر روی جنین یا فرزندان مادران الکلی صورت گرفته و روی خود مادران باردار الکلی پژوهش‌چندانی صورت نگرفته است. برای مثال، در نوزادان موش‌های صحرایی ۲۵ روزه که از روز یک زایمان تا روز ۲۴ شیردهی آب آشامیدنی به همراه اتانول با غلظت حجمی ۲ و ۴٪ دریافت کرده بودند، میزان فعالیت سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، نیتروژن اوره خون، کراتین فسفوکیناز و آلکالین فسفاتاز، اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل (عدم دریافت اتانول) نشان ندادند اما فعالیت آنزیمی لاکتات دهیدروژناز و کراتینین در نوزادان مادرانی که اتانول ۴٪ دریافت می‌کردند بطور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (۱۷).

نتایج تحقیق حاضر حاکی از افزایش MDA در موش‌های باردار گروه‌های ۴ و ۵ است که می‌توان نتیجه گرفت که این بخش از سیستم عصبی طی مصرف الکل در دهه‌ی دوم بارداری یا کل دوره آسیب بیشتری را متحمل می‌شود. همچنین نشان داده شده تجویز اتانول با دوز ۴ گرم/کیلوگرم به موش‌های صحرایی در روزهای ۱۷ و ۱۸ بارداری باعث افزایش مقادیر MDA در مغز جنین‌های ۱۹ روزه می‌شود (۱۸). طی پژوهشی، تجویز اتانول با دوز ۹ گرم/کیلوگرم و ۶/۷٪ هم در دوران بارداری و شیردهی و هم تنها در دوران شیردهی باعث افزایش مقادیر MDA و پراکسیداسیون لیپیدها در هیپوکامپ، مخچه، قشر پیشانی و جسم مخطط شده است (۱۹).

نتیجه‌گیری

با توجه کاهش میزان گلوکوتایون پراکسیداز و BDNF و همچنین افزایش مالون‌دی‌آلدهید و سوپراکسید دیسموتاز بافت هیپوکامپ موش‌های باردار تحت تیمار با اتانول، می‌توان نتیجه گرفت که استرس اکسیداتیو حاصل از مصرف اتانول بخصوص در دهه دوم و تمام طول بارداری بارداری باعث اثرات نامطلوبی از جمله کاهش تعداد و وزن فرزندان می‌شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مستخرج از رساله دکترای فیزیولوژی می‌باشد و بدینوسیله پرسنل آزمایشگاه و حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان تشکر و قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

- (۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده‌ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: همه نویسندگان
- (۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: همه نویسندگان
- (۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله: همه نویسندگان

زمان در معرض قرارگیری حیوانات با اتانول، سن و دوز اتانول باشد (۲۶).

استرس اکسیداتیو القا شده توسط اتانول می‌تواند با مکانیسم‌های زیر باعث کاهش میزان BDNF شود: ۱- کاهش فعالیت پروتئین فعال‌کننده I (که یک پروتئین متصل شونده به DNA می‌باشد) و فاکتور رونویسی CREB که با کاهش بیان ژن BDNF مرتبط می‌باشد. ۲- تخلیه انرژی از طریق القای استرس اکسیداتیو و در نتیجه اختلال عملکرد کانال NMDA که با کاهش بیان ژن BDNF مرتبط می‌باشد. ۳- استرس اکسیداتیو با آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌ها از جمله اکسیده شدن اسیدهای نوکلئیک می‌تواند باعث اشتباه در رونویسی و ترجمه شود. در نتیجه آسیب به DNA و اختلال در سیستم ترمیم DNA می‌تواند منجر به کاهش BDNF mRNA و عوامل پایین دستش شود (۲۷).

آسیب ترومای مغزی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث کاهش BDNF و افکتورهای آن مانند سیناپسین I و CREB در هیپوکامپ موش‌های صحرایی شود که می‌تواند در اختلالات شناختی نقش داشته باشد (۲۸). در پژوهش حاضر مصرف اتانول منجر به افزایش استرس اکسیداتیو بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی مادر گردید که این می‌تواند در کاهش و بهبود اختلالات مربوط به یادگیری و حافظه در فرزندان متولد شده نیز موثر باشد.

References

- Pierrefiche O. Long term depression in rat hippocampus and the effect of ethanol during fetal life. *Brain Sciences*, 2017; 7(12):157.
- Farhadi L., Hojati V., Khaksari M., Vaezi G. The Effect of Crocin on Cognition and Necrosis Cell Death in the Hippocampus Area in the Model of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in Male Rats. *Journal of Animal Environment*, 2022; 14(3):103-110.
- Jafari M, Hojati V, Khaksari M, Vaezi G. Effect of simvastatin on memory disorders and Hippocampal cell death in the model of the fetal alcoholic syndrome in male rats. *Koomesh*, 2022; 24(6):826-834.
- Heller M, Burd L. Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2014; 100(4):277-283.
- Popova S, Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J. Global prevalence of alcohol use and binge drinking during pregnancy, and fetal alcohol spectrum disorder. *Biochemistry and Cell Biology*, 2018; 96(2):237-240.
- Popova S, Dozet D, Shield K, Rehm J, Burd L. Alcohol's Impact on the Fetus. *Nutrients*, 2021; 13(10):3452.
- Davis KM, Wu J-Y. Role of glutamatergic and GABAergic systems in alcoholism. *Journal of Biomedical Science*, 2001; 8(1):7-19.
- Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system-a review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1998; 22(9):1927-1942.
- Lizardi-Cervera J, Almeda P, Guevara L, Uribe M. Hepatic encephalopathy: a review *Annals of Hepatology*, 2003; 2(3):122-130.
- Farhadi L., Hojati V., Khaksari M., Vaezi G. Neuroprotective effects of crocin against ethanol neurotoxicity in the animal model of fetal alcohol spectrum disorders. *Neurochemical Research*, 2022; 47:1001-1011.
- Jafari M., Hojati V., Khaksari M., Vaezi G. Simvastatin attenuates spatial memory impairment via inhibiting microgliosis and apoptotic cell death against ethanol induced neurotoxicity in the developing rat hippocampus. *Brain Research*, 2021; 1758:1-9.
- Lee YJ, Kim, JY Lee DY, Park KJ, Kim GH, Kim JE, Roh GS, Lim JY, Koo S, Lim NK, Park HY, Kim WH. Alcohol consumption before pregnancy causes detrimental fetal development and maternal metabolic disorders. *Scientific Reports*, 2020; 10(1):10054.
- Brolese G, Lunardi P, Broetto N, Engelke D. S, Lirio F, Batassini C, Tramontina AC, Goncalves C. Moderate prenatal alcohol exposure alters behavior and neuroglial parameters in adolescent rats. *Behavioural Brain Research*, 2014; 269:175-184.
- Zadák Z, Hyspler R, Tichá A, Hronek M, Fikrová P, Rathouská J, Hrnčiariková D, Stetina R. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological Research*, 2009; 58(Suppl 1):S13-S17.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 2007; 35:1147-1150.
- Kang L, Chen X, Sebastian BM, Pratt BT, Bederman IR, Alexander JC, Previs SF, Nagy LE. Chronic ethanol and triglyceride turnover in white adipose tissue in rats inhibition of the anti-lipolytic action of insulin after chronic ethanol contributes to increased triglyceride degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(39):28465-28473.

17. Abbasi M, Namjoo A. Low dose effects of ethanol on suckling rats: Enzymes activity, histological alterations and growth parameters. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 2014; 15(6):54-64.
18. Henderson G, Devi B, Perez A, Schenker S. In utero ethanol exposure elicits oxidative stress in the rat fetus. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1995; 19(3):714-720.
19. Petkov V, Stoianovski D, Petkov V, Vyglanova I. Lipid peroxidation changes in the brain in fetal alcohol syndrome. *Biulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, 1992; 113(5):500-502.
20. Cohen-Kerem R, Koren G. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity: I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicology and Teratology*, 2003; 25(1):1-9.
21. Cano M, Ayala A, Murillo M, Carreras O. Protective effect of folic acid against oxidative stress produced in 21-day postpartum rats by maternal-ethanol chronic consumption during pregnancy and lactation period. *Free Radical Research*, 2001; 34(1):1-8.
22. 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):213-225.
23. Boschen K, Klintsova A. Neurotrophins in the brain: interaction with alcohol exposure during development. *Vitamins and Hormones*, 2017; 104:197-242.
24. 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.
25. Stragier E, Massart R, Sallery M, Hamon M, Geny D, Martin V, et al. Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice. *Molecular Psychiatry*, 2015; 20(3):405-412.
26. Isari N, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, Elahdadi Salmani M. Effects of maternal ethanol exposure during pregnancy and lactation periods on anxiety-like behaviors and hippocampal brain-derived neurotrophic factor in rat offspring. *Kurdistan University of Medical Sciences*, 2022; 27(1):1-12.
27. Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, 2005; 28(8):436-45.
28. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, 2004; 19(7):1699-1707.

Investigation of Oxidative Stress and BDNF Gene in the Hippocampus of Pregnant Rats Treated with Ethanol and its Effect on the Number and Weight of Offspring

Mousa Shaabani Ghahremanloo¹, Gholamhassan Vaezi², Vida Hojati^{3*}, Shahram Sharafi⁴

1. PhD Student, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2. Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

3. Associate Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

4. Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Corresponding author: Damghan, Islamic Azad University, Damghan Branch, Department of Biology

Abstract

Background & Aim: alcohol consumption during pregnancy causes damage to the mother and the developing fetus, especially the central nervous system. Oxidative stress, activation of cell death pathways and intervention in the expression of neurotrophic factors are among the disorders caused by alcohol. The aim of this study is to investigate the relationship between oxidative stress and BDNF gene expression in pregnant rats treated with ethanol and its effect on the number and weight of offspring.

Methods: Pregnant rats were divided into five groups of six: control group (distilled water only) and four treatment groups that received ethanol (20%, 4.5 g/kg) by oral gavage, respectively. They received the first 5 days, the first decade of pregnancy, the second decade of pregnancy and the entire period of pregnancy. Mothers were weighed during pregnancy and children were weighed after birth. Mothers were ethically sacrificed after giving birth and their hippocampal brain tissue was extracted. The activities of glutathione peroxidase (GPx), superoxide desmutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the hippocampus of the samples were evaluated by spectrophotometry. BDNF gene expression was measured by RT-PCR method. SPSS, Excel and one-way analysis of variance and Tukey statistical tests were used for data analysis.

Results: The administration of ethanol to pregnant rats did not affect the weight of the mothers, but it caused a decrease in the number and weight of offspring, an increase in MDA, an increase in SOD activity, a decrease in GPx activity and a decrease in BDNF expression compared to the control group.

Conclusion: Ethanol had the most adverse effects in the treated groups in the second decade of pregnancy and the entire pregnancy period of mother rats.

Keywords:

Ethanol,
Oxidative
Stress,
BDGF,
Pregnancy,
Rat.

How to Cite this Article: Shaabani Ghahremanloo M, Vaezi Gh , Hojati V, Sharafi Sh . Investigation of Oxidative Stress and BDNF Gene in the Hippocampus of Pregnant Rats Treated with Ethanol and its Effect on the Number and Weight of Offspring. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2023;11(1):1-12.

noncommercial usages, provided the original work is properly cite.