

Effects of trichostatin A on pre- and anti-inflammatory cytokines of the hippocampus in rats of the prenatally restraint stressed model

Samireh Nemati¹, Mohammad Amin Edalatmanesh²

¹ MSc in Cell and Developmental Biology, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

²Associate Professor of Physiology, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Abstract

Background: Prenatal Restraint stress (PRS) leads to cognitive-behavioral disorders and neuro-pathological deficits in children. The present study evaluated the effect of trichostatin A (TSA) on hippocampal level of pro- and anti-inflammatory cytokines in rat model of prenatal restraint stress.

Materials and methods: In this experimental study, 20 pregnant Wistar rats were randomly divided into 4 groups, including control, PRS+NS, PRS+TSA5, and PRS+TSA10. PRS was induced from 13 embryonic day, one hour per day during seven days. Two hours before PRS, administration of TSA was intraperitoneally performed. At the end of one month, the hippocampal levels of pro-inflammatory cytokines such as interleukine-1 β (IL-1 β), interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and anti-inflammatory cytokine (interleukine-10; IL-10) were measured by ELISA technique. Statistical differences between groups were analyzed by ANOVA and Tukey post hoc test and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: A significant increase in pro-inflammatory cytokines content and decrease level of IL-10 in hippocampus were observed in PRS+NS group compared to the control ($p < 0.05$). However, TSA treatment was significantly decreased IL-1 β , IL-6 and TNF- α and increased IL-10 compared to the PRS+NS group in dose manner ($p < 0.05$).

Conclusion: It seems that TSA with anti-inflammatory effects leads to the modification of hippocampal inflammatory cytokines and reduces inflammation in offspring's hippocampus who exposed to stress in the prenatal period.

Keywords: Restraint stress, Pregnancy, Inflammatory cytokine, Hippocampus, Rat.

Cited as: Nemati S, Edalatmanesh MA. Effects of trichostatin A on pre- and anti-inflammatory cytokines of the hippocampus in rats of the prenatally restraint stressed model. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(3): 244-252.

Correspondence to: MohamadAmin Edalatmanesh

Tel: +98 71-36410041

E-mail: amin.edalatmanesh@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7936-1145

Received: 22 Jun 2019; **Accepted:** 4 Sep 2019

اثر تریکوستاتین A بر سایتوکاین‌های پیش و ضد التهابی هیپوکامپ در موش‌های صحرایی مدل استرس بی‌حرکتی بارداری

سمیره نعمتی^۱، محمد امین عدالت منش^۲

^۱ کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی-تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
^۲ دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استرس بی‌حرکتی بارداری (Prenatal Restraint Stress; PRS) ناهنجاری‌های شناختی-رفتاری و اختلالات نوروپاتولوژیک در نوزادان را به دنبال دارد. مطالعه حاضر به ارزیابی اثر تریکوستاتین A (Trichostatin A; TSA) بر سطح سایتوکاین‌های التهابی و ضد التهابی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی مدل استرس بی‌حرکتی بارداری پرداخت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۰ سر موش صحرایی ماده بارداری نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۴ گروه کنترل، PRS+NS، PRS+TSA5 و PRS+TSA10 تقسیم شدند. القاء PRS از روز ۱۳ بارداری، روزانه یک ساعت و به مدت ۷ روز اعمال شد. تجویز درون صفاقی TSA دو ساعت قبل از PRS صورت گرفت. در پایان یک ماهگی، سطح هیپوکامپی سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر اینترلوکین-۱ (IL-1 β)، اینترلوکین-۶ (IL-6)، فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا (TNF- α) و سایتوکاین ضد التهابی اینترلوکین-۱۰ (IL-10) با تکنیک الایزا سنجیده شدند. تحلیل آماری با آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: افزایش معنی‌دار سایتوکاین‌های پیش التهابی و کاهش بیان IL-10 در هیپوکامپ گروه PRS+NS در مقایسه با گروه کنترل دیده شد ($p < 0.05$). در حالی که تیمار با TSA سطح IL-1 β ، IL-6 و TNF- α را نسبت به گروه PRS+NS کاهش و بیان IL-10 را به طور معنی‌دار و وابسته به دوز افزایش داد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد TSA با اثرات ضد التهابی خود سبب تعدیل سطح سایتوکاین‌های التهابی و کاهش میزان التهاب در هیپوکامپ نوزادانی که در دوران جنینی در معرض استرس بوده‌اند، می‌شود.

واژگان کلیدی: استرس بی‌حرکتی، بارداری، سایتوکاین‌های التهابی، هیپوکامپ، موش صحرایی.

مقدمه

مادری با افزایش سطح هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی گردش خون مادر، تأخیر در تکامل عصبی جنین، التهاب عصبی و بروز اختلالات شناختی-رفتاری نوزادان را به دنبال دارد (۲).

سطوح بالای کورتیزول در دوران جنینی باعث تأخیر در رشد و تکامل نورون‌ها، کوچکتر شدن اندازه‌ی هیپوکامپ و تغییرات پاتولوژیک در نورون‌های هیپوکامپ می‌گردد که این امر منجر به اختلال در یادگیری وابسته به هیپوکامپ می‌شود. همچنین، استرس در هفته‌های پایانی حاملگی باعث عدم نورون‌زایی در هیپوکامپ جنین می‌شود (۳). هیپوکامپ،

افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (Hypothalamus- Pituitary gland-Adrenal; HPA) دوران جنینی سبب تغییر در بیان گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی هیپوکامپ در جنین می‌گردد (۱). استرس

آدرس نویسنده مسئول: شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دکتر محمد امین عدالت منش (email: amin.edalatmanesh@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-7936-1145

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۴/۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۶/۲۳

بخشی از قشر پره فرونتال در مغز پستانداران است که یکی از ساختارهای اصلی در یادگیری فضائی و تثبیت حافظه محسوب می‌شود و دارای عملکردهای متعدد حیاتی در فرایند حافظه شامل ذخیره سازی، تثبیت و بازیابی اطلاعات است. آسیب به هیپوکامپ، به میزان شدیدی باعث آسیب به حافظه فضایی می‌شود (۴).

از آنجایی که استرس‌های مادری منجر به تغییرات فیزیولوژیک و هورمونی در جنین می‌شود و تغییراتی مانند کاهش جریان خون جفتی و را به دنبال دارد (۵)، پیامدهای ناگواری مانند ابتلای فرزندان حاصل به انواع اختلالات روانی و رفتاری و نیز آسیب‌های پایدار مغزی را به دنبال خواهد داشت (۶). زایمان - های پیش از موعد و تولد نوزادان با وزن پایین در مادران تحت استرس شدید بارداری منجر به پیامدهای منفی در تحول شناختی (سلامت روانی) و فیزیکی کودکان می‌شود و احتمال ابتلای این نوزادان به فلج مغزی، ناتوانی‌های یادگیری و دیگر معلولیت‌ها را افزایش می‌دهد (۷). شواهد زیادی نشان می‌دهند که استرس در دوران بارداری می‌تواند منجر به اختلالات شدید رشدی و رفتاری فرزندان شود که شامل عقب افتادگی در رشد و نمو، تشدید واکنش‌های هیجانی و عاطفی، بی‌قراری، افزایش پاسخ‌های هورمونی به استرس و فعالیت سیستم سمپاتیکی، تغییر در ریتم‌های شبانه‌روزی و در نهایت اختلال در یادگیری و حافظه، حتی در دوران بلوغ فرزندان آنها است (۸). در حیوانات القاء استرس در هفته آخر یا یک سوم نهایی دوره بارداری، اختلالات شدید یادگیری را در ابتدای زندگی فرزندان به دنبال خواهد داشت که شامل اختلال در حافظه کوتاه‌مدت، حافظه بلندمدت، حافظه فضایی و غیر فضایی نیز خواهد بود (۹).

هر چند، علت ایجاد اختلالات شناختی و تکاملی - عصبی ناشی از استرس بارداری به خوبی شناخته نشده است، اما اخیراً سایتوکاین‌های پیش التهابی به عنوان یک عامل خطرآفرین مهم مطرح شده است (۱۰). استرس بارداری افزایش قابل توجهی در تراکم میکروگلیالی در مغز جنین ایجاد می‌کند (۱۱). افزایش تراکم میکروگلیاها همگام با فعال شدن سیستم ایمنی مادر طی بارداری، خطر ابتلاء به اختلالات شناختی - رفتاری را در نوزادان افزایش می‌دهد. سطوح افزایش یافته سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر اینترلوکین-۶ (IL-6) و فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا (TNF- α) در هیپوکامپ نوزادانی که در معرض استرس بارداری بوده‌اند، دیده شده است (۱۲).

صرف نظر از عوامل روانی مانند حمایت اجتماعی که در کاهش استرس مادران در دوران بارداری نقش پیشگیری کننده از اختلالات شناختی - رفتاری در نوزادان دارند، در برخی موارد برای بازگرداندن فعالیت محور HPA به حالت طبیعی درمان‌های دارویی پیشنهاد و ارائه شده است (۱۳). هرچند، در سه ماهه نخست دوران بارداری که جنین در مرحله ارگانوژنز و نوروژنز است، استفاده از هر دارویی می‌تواند خطرآفرین باشد، با این حال چندین داروی ضد افسردگی و ضد اضطراب برای کاهش اثرات استرس مادری بر جنین در دوران بارداری تجویز می‌شود که متأسفانه خود این داروها نیز اثرات سوئی بر جنین در حال تکوین داشته‌اند (۱۴). بنابراین، دستیابی به داروهایی که کمترین عوارض را بر جنین داشته باشد و در ضمن از بروز اختلالات شناختی و رفتاری در نوزادان مادران تحت استرس بارداری جلوگیری نماید، اهمیت قابل توجهی دارد.

با اینکه مهارکننده‌های هیستون داستیلازی (Histone Deacetylase Inhibitors; HDACi) به عنوان یک رده از داروهایی که سبب بهبود شکل‌گیری حافظه بلندمدت می‌شود، توصیف شده‌اند (۱۵)، با این حال اثرات ضد التهابی آنها در اختلالات تکاملی روشن نشده است. به طور کلی، این ترکیبات باعث تعدیل و تنظیم افزایشی رونویسی از ژنوم می‌شوند. در این میان، هیدروکسامیک‌اسیدها مانند تریکوستاتین A (TSA)، در بهبود آسیب شناختی ناشی از پیری و درمان بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نظیر بیماری آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون نیز موثر واقع شده‌اند (۱۶). این دارو مهار کننده هیستون داستیلاز کلاس یک و دو است و القاء استیلایسون هیستونی را به دنبال دارد و دیده شده است که در پاسخ‌های التهابی سبب تنظیم بیان سایتوکاین‌ها می‌شود (۱۷). همچنین با فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT اثرات بهبود دهنده و ترمیم در بافت مغز متعاقب آسیب‌های ایسکمیک داشته است (۱۸).

در طی ۲۰ سال اخیر پیشرفت‌های زیادی صرف درک آثار و نتایج استرس دوران بارداری و عدم تحرک مادران بر عملکرد شناختی نوزادان شده است. هرچند، با توجه به نتایج ناامیدکننده درمان‌های دارویی کنونی برای اختلالات شناختی و رفتاری در کودکان، یافتن ترکیبات بهتر و مؤثرتر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر استرس بی‌حرکتی مادری بر سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی شامل اینترلوکین ۱- β (IL-1 β)، IL-6، TNF- α و سایتوکاین ضد التهابی اینترلوکین-۱۰ (IL-10) در هیپوکامپ

و ارزیابی اثر حفاظتی و ضد التهاب عصبی TSA در موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روشها

در تحقیق تجربی حاضر، از زاده‌های نر حاصل از هم‌آوری ۲۰ سر موش صحرایی ماده بالغ و باکره از نژاد ویستار با میانگین وزنی 180 ± 10 گرم و ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با میانگین وزنی 240 ± 10 گرم استفاده شد. حیوانات از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه تخصصی علوم جانوری دانشگاه آزاد اسلامی شیراز به مدت ۷ روز جهت سازگاری با شرایط جدید، در محیط نگهداری شدند. حیوانات تحت شرایط استاندارد دما (25 ± 2 درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (50 ± 10 درصد) و چرخه روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته (۶ صبح تا ۶ عصر) قرار داده شدند. در این پژوهش از غذای مخصوص موش صحرایی با فرمولاسیون استاندارد (شرکت ۱۱۰ فارس) استفاده شد و به همراه آب آشامیدنی به صورت نامحدود در اختیار حیوانات قرار گرفت. رعایت اصول اخلاقی طبق قوانین بین‌المللی و ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز و با کد اخلاق IR-iaushiraz-96-4517-3728 صورت گرفت.

در پایان دوره سازش‌پذیری، هر یک از موش‌های صحرایی ماده با یک موش صحرایی نر جهت بارداری هم‌قفس شدند. قبل از جفت‌گیری، از موش‌های صحرایی ماده نمونه واژینال تهیه شد و حیواناتی که در سیکل استروس قرار داشتند، جهت جفت‌گیری انتخاب شدند. ۸ ساعت پس از هم‌قفس شدن، در ساعات اولیه صبح، نمونه واژینال از موش‌های صحرایی ماده جهت تعیین حضور اسپرماتوزوآ و تعیین روز صفر بارداری به دست آمد. موش‌های صحرایی باردار، بعد از توزین اولیه، به صورت تصادفی در ۴ گروه ($n=5$) تقسیم شدند: گروه کنترل سالم، گروه PRS+NS (استرس بی‌حرکتی مادری و دریافت‌کننده نرمال سالین، درون صفاقی)، گروه PRS+TSA5 (استرس بی‌حرکتی و دریافت‌کننده دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن TSA، درون صفاقی)، و گروه PRS+TSA10 (استرس بی‌حرکتی و دریافت‌کننده دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن TSA، درون صفاقی).

به مدت یک هفته و از روز ۱۳ بارداری، موش‌های صحرایی باردار در محفظه محدود کننده حرکت (Restrainer tube) روزانه به مدت یک ساعت قرار گرفتند (۱۹). جهت جلوگیری از سازگاری نسبت به استرس، زمان اعمال استرس بی‌حرکتی ساعت‌های

مختلفی از روز بین ساعت ۱۰ صبح تا ۵ عصر در نظر گرفته شد. گروه‌های دریافت‌کننده TSA، دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۲۰) را به همراه نرمال سالین از روز ۱۳ بارداری و ۲ ساعت قبل از القاء استرس بی‌حرکتی با تزریق درون صفاقی دریافت کردند. به گروه TSA+NS، تنها نرمال سالین به صورت درون صفاقی تزریق شد. به دنبال زایمان طبیعی مادران، نوزادان حاصل در شرایط استاندارد تا ۲۴ روزگی در کنار مادر نگهداری شدند. سپس، با تعیین جنسیت در ۳۰ روزگی تعداد ۴۰ سر نوزاد نر ($n=10$) به طور متوسط ۲ نوزاد از هر مادر جهت مطالعه بیوشیمیایی سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی در هیپوکامپ مورد استفاده قرار گرفتند.

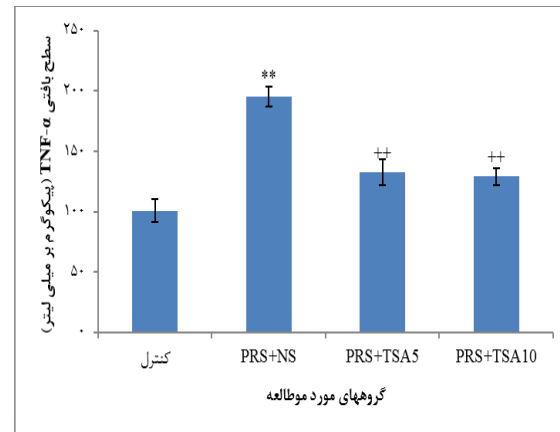
حیوانات به دنبال استنشاق خفیف گاز کلروفورم در دسیکاتور، سر آنها با گیوتین جدا شد (۲۱) و با جداکردن مغز به سرعت بر روی یخ قرار گرفت. سپس، در زیر استریوسکوپ (Olympus, Japan)، هیپوکامپ به دقت از بقیه قسمت‌ها جدا شد. از هر گروه حداقل تعداد ۱۰ نمونه هیپوکامپ استفاده شد. پس از شستشوی نمونه هیپوکامپ با محلول نرمال سالین به همراه بافر تریس (Sigma, Germany)، بافت به مدت ۵ دقیقه با دستگاه هموژنایزر (IKA, Germany) با ۵۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه و سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hermle, Germany) سانتریفیوژ شد. جهت جلوگیری از تخریب پروتئین‌های محلول حاصل، از فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (Sigma, Germany) با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به‌عنوان مهارکننده پروتئازای استفاده شد (۲۲). پس از سانتریفیوژ، محلول رویی به کمک سمپلر برداشته شد و سپس میزان بافتی $TNF-\alpha$ ، IL-6، IL-1 β و IL-10 با تکنیک الایزا و به کمک دستگاه الایزایدر مدل 2100 (Stat Fax, USA) و کیت‌های شرکت فاین تست (FineTest, China) مورد سنجش قرار گرفت. سطح بافتی $TNF-\alpha$ با حساسیت $<46/875$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده $5000-78/125$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، IL-6 با حساسیت $<18/75$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده $2000-31/25$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، IL-10 با حساسیت $<62/5$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده $2000-31/25$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر سنجش شد.

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد نظر از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. از نظر آماری مقادیر $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

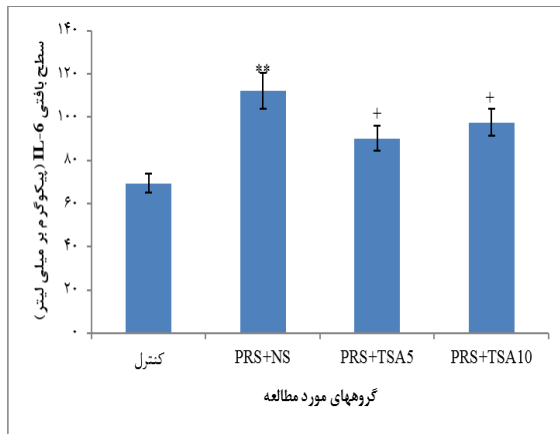
بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی ($TNF-\alpha$ ، IL-6 و IL-1 β) در هیپوکامپ موش‌های صحرایی که تحت استرس بی‌حرکتی در دوران جنینی بودند، در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

سطح بافتی $TNF-\alpha$ در گروه PRS+NS که در دوران بارداری تنها با نرمال سالین تیمار شده بودند، در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$). این در حالی است که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه‌های تیمار شده با TSA دیده نشد ($p > 0.05$). از طرف دیگر، بین گروه PRS+NS با هر دو گروه دریافت‌کننده TSA اختلاف معنی‌داری دیده شد. در واقع کاهش معنی‌داری در سطح سایتوکاین پیش التهابی $TNF-\alpha$ در گروه‌های PRS+TSA5 و PRS+TSA10 نسبت به گروه PRS+NS وجود داشت (نمودار ۱، $p < 0.001$).



نمودار ۱. میانگین ($\pm$ انحراف معیار) سطح هیپوکامپی $TNF-\alpha$ در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بین گروه کنترل با گروه PRS+NS اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.001$). همچنین، بین گروه‌های تیمار با TSA و گروه PRS+NS نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p < 0.001$).

در ارزیابی سطح هیپوکامپی IL-6، گروه PRS+NS افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد ($p < 0.001$). در حالی که بین گروه‌های تیمار شده با TSA و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p > 0.05$). بین گروه PRS+NS با گروه‌های PRS+TSA5 و PRS+TSA10 نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (نمودار ۲، $p < 0.05$). کاهش معنی‌دار سایتوکاین پیش التهابی IL-6 در گروه‌های تیمار شده با TSA نسبت به گروه PRS+NS نشانه اثر ضد التهابی TSA در هر دو دوز مورد بررسی بود (نمودار ۲).



نمودار ۲. میانگین ($\pm$ انحراف معیار) سطح هیپوکامپی IL-6 در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که در سطح بافتی IL-6 و در گروه PRS+NS افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل وجود دارد ($p < 0.001$). همچنین، بین گروه‌های PRS+TSA5 و PRS+TSA10 با گروه PRS+NS نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p < 0.001$).

در مقایسه سطح بافتی سایتوکاین پیش التهابی IL-1 β ، افزایش معنی‌داری در گروه PRS+NS نسبت به گروه کنترل دیده شد (نمودار ۳، $p < 0.001$). همچنین، بین گروه PRS+TSA5 و گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p < 0.001$)، در حالی که با گروه PRS+NS اختلاف معنی‌داری نداشت. این امر نشان‌دهنده عدم تأثیرگذاری این دوز از TSA در کاهش IL-1 β بود. با وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه PRA+TSA10 با گروه کنترل ($p < 0.001$)، کاهش معنی‌دار سطح هیپوکامپی IL-1 β در گروه دریافت‌کننده دوز ۱۰ میلی گرم TSA نسبت به گروه PRS+NS دیده شد ($p < 0.001$). همچنین، بین گروه PRS+TSA5 و PRS+TSA10 نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد (نمودار ۳، $p < 0.05$).

بررسی سطح هیپوکامپی سایتوکاین ضد التهابی IL-10 در گروه‌های مورد مطالعه (نمودار ۴) نشان داد که کاهش معنی‌داری در سطح این سایتوکاین ضد التهابی در گروه PRS+NS نسبت به گروه کنترل وجود دارد ($p < 0.001$). همچنین، بین گروه کنترل با گروه PRS+TSA5 نیز اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.001$). در حالی که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه PRS+TSA10 دیده نشد ($p = 0.055$). همچنین، افزایش معنی‌داری بین گروه PRS+TSA5 نسبت به گروه PRS+NS ($p < 0.05$) و نیز

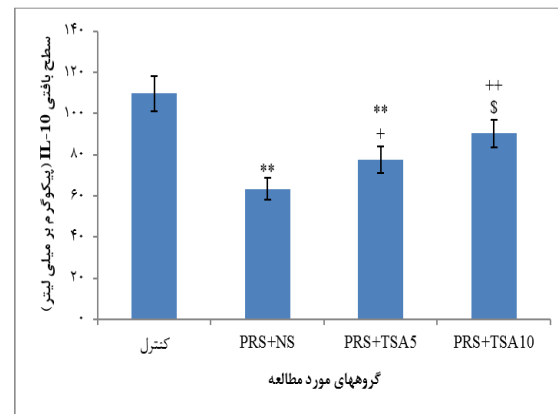
بحث

مطالعه حاضر به بررسی اثر TSA بر سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی در هیپوکامپ نوزادان موش‌های صحرایی که تحت تاثیر استرس بی‌حرکتی مادری در دوران جنینی بودند، پرداخت. نتایج نشان داد که استرس بی‌حرکتی مادری احتمالاً با القاء التهاب عصبی در هیپوکامپ نوزادان می‌تواند بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر $TNF-\alpha$ ، IL-6، IL-1 β را در هیپوکامپ به شدت افزایش دهد، در حالی که کاهش بیان IL-10 به عنوان یک سایتوکاین ضد التهابی به همراه دارد. از طرف دیگر، TSA توانست با کاهش معنی‌دار سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی و افزایش محتوای سایتوکاین ضد التهابی در هیپوکامپ، اثرات ضد التهابی خود را در مدل حاضر نشان دهد.

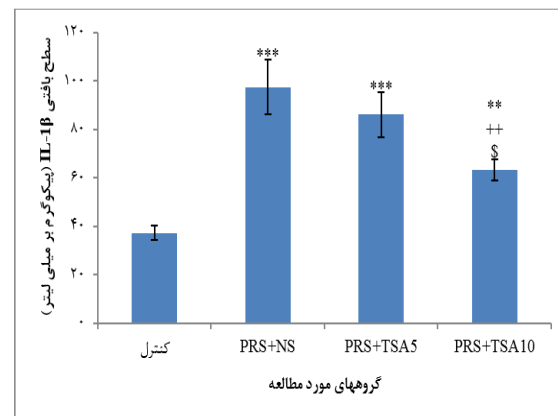
مطالعات گذشته نشان داده‌اند که استرس‌های مزمن در دوران بارداری با القاء اختلال در یادگیری، حافظه کوتاه‌مدت، بلندمدت، فضایی و غیر فضایی در فرزندان همراه است (۲۳). Schepanski و همکارانش نشان دادند که نوزادان در معرض استرس جنینی با عوارض نوروپاتولوژیکی مغزی همانند کاهش حجم قشر پره‌فرونتال، قشر پیش حرکتی، لوب تمپورال و مرگ نورونی وسیع در ناحیه CA3 هیپوکامپ مواجه می‌شوند (۲۴).

جریان خون عامل تعیین کننده مهمی در عملکرد جفت و رشد جنین است که تحت تأثیر عوامل محیطی مانند استرس مادری قرار می‌گیرد و منجر به تغییراتی در اکسیژن‌رسانی به جنین می‌شود. کاتکول آمین‌ها به ویژه آدرنالین جریان خون جفت را از طریق تغییر در مقاومت عروقی تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۵). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که نوسانات اکسیژن به عنوان یک عامل القاء گر قدرتمند استرس اکسیداتیو جفتی منجر به فعال شدن مسیرهای استرس فعال مانند افزایش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌شوند (۲۶). از سوی دیگر، القاء التهاب عصبی متعاقب استرس‌های بارداری و فعالیت میکروگلیالی در نواحی مختلف مغز جنین یکی از مکانیسم‌های ارائه شده در توجیه اختلالات شناختی-رفتاری متعاقب استرس بارداری است (۲۷). در واقع، استرس مادری سبب افزایش ترشح CRH (Corticotropin releasing hormone) و کورتیزول مادری می‌شود که بیان و فعالیت آنزیم 11 β -HSD2 (11 β -dehydrogenase) را در جفت کاهش می‌دهد و می‌تواند منجر به تغییراتی در هیپوکامپ جنین شده و نیز فعالیت محور HPA جنین و متعاقب آن نوزاد را افزایش دهد (۲۸).

بین گروه PRS+TSA10 در مقایسه با گروه PRS+NS دیده شد ($p<0/001$). بین دو گروه PRS+TSA5 و PRS+TSA10 نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌دار وجود داشت (نمودار ۴، $p<0/05$).



نمودار ۳. میانگین ($\pm$ انحراف معیار) سطح هیپوکامپی IL-1 β در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با سایر گروه‌های مورد مطالعه داشت ($p<0/001$ و $p<0/001$). از طرف دیگر، کاهش معنی‌داری در سطح این سایتوکاین در گروه PRS+TSA10 نسبت به گروه PRS+NS دیده شد ($p<0/001$). همچنین، بین گروه PRS+TSA5 با گروه PRS+TSA10 نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p<0/05$).



نمودار ۴. میانگین ($\pm$ انحراف معیار) سطح هیپوکامپی IL-10 در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که کاهش معنی‌داری در گروه‌های PRS+NS و PRS+TSA10 نسبت به گروه کنترل وجود دارد ($p<0/001$). از طرف دیگر، سطح این سایتوکاین در هر دو گروه تیمار شده با TSA نسبت به گروه PRS+NS افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<0/001$ و $p<0/05$). همچنین، بین گروه PRS+TSA5 با گروه PRS+TSA10 نیز اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$).

دهنده التهاب پایدار سیستم عصبی در نوزادان تحت استرس دوران جنینی است که تا یک ماهگی پس از تولد در هیپوکامپ دیده می‌شود.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که مهار کننده‌های هیستون داستیلازی سبب سرکوب پاسخ‌های التهابی در مدل‌های مختلف بیماری‌های اتوایمیون و اختلالات التهابی عصبی می‌شوند (۳۴). تریکوستاتین A که در مطالعه حاضر به کار گرفته شد، مهار کننده کلاس ۱ و ۲ هیستون داستیلازها (HDAC) است که در پاسخ‌های التهابی سبب تنظیم بیان سایتوکاین‌ها می‌شود و بهبود اختلال شناختی و آسیب‌های عصبی در مدل‌های مختلف ضایعات عصبی جمله مدل بیماری آلزایمر و ایسکمی مغزی در جوندگان می‌شود (۳۵).

تغییرات پس ترجمه‌ای هیستون‌های مختلف منجر به تنظیم یا خاموشی بیان برخی از ژن‌ها می‌شود. استیل‌اسیون هیستونی که به وسیله هیستون استیل ترانسفرازها، فاکتورهای نسخه برداری عمومی و هیستون داستیلازها کنترل می‌شود، منجر به تنظیم بیان ژن می‌شود (۳۵). از آنجایی که کلاس ۱ و ۲ از هیستون داستیلازها در اختلالات متعدد مغزی درگیرند، از این رو مهارکننده‌های آنها مانند TSA اثرات بهبود بخش عصبی داشته‌اند (۳۶). در اختلالات تحلیل‌برنده عصبی و التهاب عصبی فعالیت میکروگلیالی افزایش می‌یابد و بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی نیز تشدید می‌شود (۳۷). در مطالعه حاضر، TSA با کاهش سطح بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی اثرات ضد التهابی از خود نشان داده است. مطالعات قبلی نشان داده است که TSA با کاهش بیان HDAC2 و HDAC5 و افزایش استیل‌اسیون هیستون ۳ در موش‌های تیمار شده با لیپوپلی ساکارید (القاه‌گر التهاب عصبی) سبب مهار التهاب عصبی شده است (۳۵). همچنین، تیمار با TSA سطح کورتیکوسترون پلازما و استیل‌اسیون هیستون H3 را در قشر Prelimbic و هیپوکامپ حیوانات تحت استرس بی‌حرکتی مزمن کاهش می‌دهد (۳۸).

مطالعه حاضر نشان داد که TSA به طور معنی داری سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی را در هیپوکامپ مدل استرس بی‌حرکتی کاهش می‌دهد و از این رو، با القاء اثرات ضد التهابی در هیپوکامپ احتمالاً سبب کاهش اختلالات شناختی- رفتاری نوزادان می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد TSA به عنوان یک مهارکننده هیستون داستیلازی دارای اثرات ضد التهابی در سیستم عصبی است و سبب کاهش التهاب عصبی در هیپوکامپ نوزادان موش‌های صحرایی مدل استرس مزمن بی‌حرکتی در

التهاب، سبب ترشح مقادیر بالای سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و $IL-6$ می‌شود. تولید این سایتوکاین‌ها با کاهش نورونز، سرکوب سیستم نوروتروفیک و مرگ نورونی همراه است (۲۹). متعاقب افزایش سطح $IL-1\beta$ تکثیر لنفوسیت‌های B و T افزایش می‌یابد و تولید $TNF-\alpha$ و $IL-6$ القاء می‌شود. تولید این سایتوکاین‌ها در هیپوکامپ سبب کاهش بیان تعدیل‌کننده‌های حافظه مانند فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و پروتئین Arc (The immediate early gene activity-dependent cytoskeletal-associated protein) که در پایین دست $IL-1\beta$ قرار دارد، می‌شود. کاهش این عوامل تخریب حافظه بلند مدت و انعطاف پذیری هیپوکامپی را به دنبال دارد (۳۰).

در یک مطالعه تجربی، Bittle و Stevens نشان دادند که تزریق هورمون کورتیزول و سایتوکاین $IL-1\beta$ سبب تغییر در عملکرد سیستم میکروگلیالی مغز جنین و القاء شرایط سایکوپاتولوژیک در نوزادان موش‌های صحرایی می‌شود (۳۱). در واقع، هورمون کورتیزول و سایتوکاین $IL-1\beta$ با اثرگذاری بر صفحه قشری مغز در حال تشکیل جنین دقیقاً شرایطی را که مشابه استرس بارداری است، به وجود می‌آورد و تراکم سلولهای میکروگلیالی را در مغز جنین افزایش می‌دهد (۳۱). از این رو، می‌توان گفت که یکی از مهم‌ترین عوامل در ایجاد اختلالات نوروپاتولوژیک ناشی از استرس مادری، التهاب در سیستم عصبی جنین است که منجر به بروز اختلالات شناختی و رفتاری می‌شود. در مطالعه حاضر نیز دیده شد که متعاقب استرس مادری، سطح بیان سایتوکاین‌های التهابی در هیپوکامپ نوزادان افزایش قابل توجهی دارد که ممکن است منجر به بروز اختلالات شناختی شود و از این رو باید التهاب عصبی در دوران جنینی تعدیل شود. از طرفی، مطالعه Zhang و همکارانش نشان داده است که بروز رفتارهای شبه اضطرابی و افسردگی ناشی از استرس بارداری با افزایش میانجی‌گرهای التهابی هیپوکامپ وابسته است و تجویز داروی ضد افسردگی دلوکستین، سبب کاهش سطح $IL-6$ در هیپوکامپ نوزادان حاصل می‌شود (۳۲). Zhao و همکاران نیز نشان داده‌اند که محرومیت از خواب در دوران بارداری سبب کاهش معنی‌دار سطح هیپوکامپی $IL-10$ و افزایش محتوای مغزی سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در مغز جنین شده که سبب مهار نورونز هیپوکامپی نیز می‌شود (۳۳). در مطالعه حاضر نیز متعاقب استرس بی‌حرکتی مادری سطح $IL-1\beta$ ، $IL-6$ و $TNF-\alpha$ افزایش و سطح $IL-10$ در هیپوکامپ نوزادان کاهش معنی‌داری داشت. این امر نشان-

تشکر و قدردانی

از زحمات مدیریت محترم پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز در اعطای تسهیلات لازم جهت اجرای این پروژه صمیمانه قدردانی می‌شود. بخشی از منابع مالی این پژوهش از محل پژوهانه سال ۱۳۹۶ نویسنده مسئول تامین شده است.

دوران بارداری می‌شود. از این رو می‌تواند به عنوان یک رویکرد درمانی در درمان آسیب‌ها و التهاب مزمن عصبی مورد استفاده قرار گیرد.

REFERENCES

1. van den Bergh BRH, Dahnke R, Mennes M. Prenatal stress and the developing brain: Risks for neurodevelopmental disorders. *Dev Psychopathol* 2018; 30:743-62.
2. Soares-Cunha C, Coimbra B, Borges S, Domingues AV, Silva D, Sousa N, et al. Mild Prenatal Stress Causes Emotional and Brain Structural Modifications in Rats of Both Sexes. *Front Behav Neurosci* 2018; 12:129.
3. Miranda A, Sousa N. Maternal hormonal milieu influence on fetal brain development. *Brain Behav* 2018; 8:e00920.
4. Ortiz JB, Conrad CD. The impact from the aftermath of chronic stress on hippocampal structure and function: Is there a recovery? *Front Neuroendocrinol* 2018; 49:114-23.
5. McGowan PO, Matthews SG. Prenatal Stress, Glucocorticoids, and Developmental Programming of the Stress Response. *Endocrinology* 2018; 159:69-82.
6. Fatima M, Srivastav S, Mondal AC. Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates. *Int J Dev Neurosci* 2017; 60:1-7.
7. Glover V. Maternal depression, anxiety and stress during pregnancy and child outcome; what needs to be done. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2014;2 8:25-35. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2013.08.017.
8. Sobolewski M, Conrad K, Marvin E, Allen JL, Cory-Slechta DA. Endocrine active metals, prenatal stress and enhanced neurobehavioral disruption. *Horm Behav* 2018; 101:36-49.
9. Weinstock M. Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: an update. *Stress* 2011; 14:604-13.
10. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)* 2016; 233:1637-50.
11. Duthie L, Reynolds RM. Changes in the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and postpartum: influences on maternal and fetal outcomes. *Neuroendocrinology* 2013; 98:106-15.
12. Diz-Chaves Y, Pernía O, Carrero P, Garcia-Segura LM. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflammation* 2012; 9:71.
13. Pearlstein T. Depression during Pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015; 29:754-64.
14. Pawluski JL, Gemmel M. Perinatal SSRI medications and offspring hippocampal plasticity: interaction with maternal stress and sex. *Hormones (Athens)* 2018; 17:15-24.
15. Ganai SA, Ramadoss M, Mahadevan V. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors - emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration. *Curr Neuropharmacol* 2016;14:55-71.
16. Sharma S, Taliyan R, Ramagiri S. Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, improves learning and memory in high-fat diet-induced cognitive deficits in mice. *J Mol Neurosci* 2015; 56:1-11.
17. Zhang Q, Yang F, Li X, Wang L, Chu X, Zhang H, et al. Trichostatin A inhibits inflammation in phorbol myristate acetate-induced macrophages by regulating the acetylation of histone and/or non-histone proteins. *Mol Med Rep* 2016; 13:845-52.
18. Ma XH, Gao Q, Jia Z, Zhang ZW. Neuroprotective capabilities of TSA against cerebral ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt signaling pathway in rats. *Int J Neurosci* 2015; 125:140-6.
19. Wu J, Song TB, Li YJ, He KS, Ge L, Wang LR. Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKC β 1 expression and translocation in offspring rats. *Brain Res* 2007;1141:205-13.
20. Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, et al. Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 2007; 117:659-671.
21. Porterfield VM, Zimomra ZR, Caldwell EA, Camp RM, Gabella KM, Johnson JD. Rat strain differences in restraint stress induced brain cytokines. *Neuroscience* 2011; 188: 48-54.

22. Edalatmanesh MA, Shahsavan S, Rafiei S, Khodabandeh H. The effect of gallic acid on depression symptoms, oxidative stress markers and inflammatory cytokines in rats' hippocampus after TMT intoxication: an experimental study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17: 815-28. [In Persian]
23. Weinstock M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiol Stress* 2017; 6: 3-13.
24. Schepanski S, Buss C, Hanganu-Opatz IL, Arck PC. Prenatal Immune and Endocrine Modulators of Offspring's Brain Development and Cognitive Functions Later in Life. *Front Immunol* 2018; 9:2186.
25. Su Q, Zhang H, Zhang Y, Zhang H, Ding D, Zeng J, et al. maternal stress in gestation: birth outcomes and stress-related hormone response of the neonates. *Pediatr Neonatol* 2015; 56:376-81.
26. Myatt L, Thornburg KL. effects of prenatal nutrition and the role of the placenta in health and disease. *Methods Mol Biol* 2018; 1735:19-46.
27. Gumusoglu SB, Fine RS, Murray SJ, Bittle JL, Stevens HE. The role of IL-6 in neurodevelopment after prenatal stress. *Brain Behav Immun* 2017; 65:274-283.
28. Dahlerup BR, Egsmose EL, Siersma V, Mortensen EL, Hedegaard M, Knudsen LE, et al. Maternal stress and placental function, a study using questionnaires and biomarkers at birth. *PLoS One* 2018; 13:e0207184.
29. Wang B, Jin K. Current perspectives on the link between neuroinflammation and neurogenesis. *Metab Brain Dis* 2015; 30:355-65.
30. Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience* 2015; 309:84-99.
31. Bittle J, Stevens HE. The role of glucocorticoid, interleukin-1 β , and antioxidants in prenatal stress effects on embryonic microglia. *J Neuroinflammation* 2018; 15:44.
32. Zhang X, Wang Q, Wang Y, Hu J, Jiang H, Cheng W, et al. Duloxetine prevents the effects of prenatal stress on depressive-like and anxiety-like behavior and hippocampal expression of pro-inflammatory cytokines in adult male offspring rats. *J Neuroinflammation* 2012; 9:71.
33. Zhao Q, Peng C, Wu X, Chen Y, Wang C, You Z. Maternal sleep deprivation inhibits hippocampal neurogenesis associated with inflammatory response in young offspring rats. *Neurobiol Dis* 2014; 68:57-65.
34. Fleiss B, Nilsson MK, Blomgren K, Mallard C. Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitized neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *J Neuroinflammation* 2012; 9:70.
35. Hsing CH, Hung SK, Chen YC, Wei TS, Sun DP, Wang JJ, et al. Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Ameliorated Endotoxin-Induced Neuroinflammation and Cognitive Dysfunction. *Mediators Inflamm* 2015; 2015:163140.
36. Kannan V, Brouwer N, Hanisch UK, Regen T, Eggen BJ, Boddeke HW. Histone deacetylase inhibitors suppress immune activation in primary mouse microglia. *J Neurosci Res* 2013; 91:1133-42.
37. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012:756357.
38. Shein NA, Shohami E. Histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents for acute central nervous system injuries. *Mol Med* 2011; 17:448-56.