Journal of Animal Biology, Autumn 2024; 17(1): 213-227

Research Article

The Effects of Stress during Pregnancy on Anxiety-like Behaviors, Spatial memory, Plasma and Hippocampal Leptin Levels, and Leptin Receptor Gene Expression in the Hippocampus of Small Mice

Masoomeh Mohammadi[1], Ali Haeri-Rohani[1], Hedayat Sahraei[2*], Parichehreh Yaghmaei[1]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
*Corresponding author: hsahraei1343@gmail.com

Received: 4 October 2024 Accepted: 24 November 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.1189361

Abstract

One of the possible reasons for the decrease in cognitive abilities and spatial memory in offspring is the decrease in leptin receptor gene expression in the hippocampus. In the present study, pregnant NMRI rats were divieded into four groups of eight: 1- male control group: male offspring of mothers who did not receive electric shock during pregnancy 2- Female control group: female offspring of mothers who did not receive electric shock during pregnancy 3- Male stress group: female offspring of mothers who received electric shock during pregnancy, and 4- female stress group: female offspring of mothers who received electric shock during pregnancy. To evaluate the effect of stress on intrinsic anxiety, the open field device was used, and for induced anxiety, an elevated plus maze was used. Leptin plasma concentration and leptin receptor gene expression in the hippocampus were measured. The results showed that plantar electric shock stress in the first half of pregnancy can reduce leptin plasma levels in offspring. The incidence of anxiety-like behaviors in male and female offspring of mothers who received shocks increased significantly ($p < 0.05$ and $p < 0.01$). Also, the studies showed that male and female offspring of stressed mothers traveled more time and distance to reach the target chamber in the Barnes Maze (memory test). Prenatal stress will reduce the plasma concentration of leptin and hippocampal leptin in male and female offspring. Leptin receptor gene expression in the hippocampus of male and female offspring of stressed mothers was significantly lower than that of control group offspring. Exposure of pregnant mothers to electric shock led to a decrease in leptin hormone levels in offspring, which was associated with anxiety-like behaviors and impaired memory and spatial learning. Considering the existence of various types of environmental stress in today's life, leptin measurement and evaluation may play a decisive role in predicting the treatment of patients with anxiety and cognitive disorders.

Keywords: Pregnancy stress, Anxiety, Spatial memory, Leptin receptor.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۲۲۷-۲۱۳

مقاله پژوهشی

اثرات استرس دوران بارداری بر رفتارهای شبه اضطرابی، حافظه فضایی، سطح پلاسمایی و هیپوکمپی لپتین و بیان ژن گیرنده لپتین در هیپوکمپ موش‌های کوچک

معصومه محمدی[۱]، علی حائری روحانی[۱]، هدایت صحرائی[۲*]، پریچهره یغمائی[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.

* مسئول مکاتبات: hsahraei1343@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۴

DOI: 10.60833/ascij.2024.1189361

چکیده

یکی از دلایل احتمالی کاهش توانائی‌های شناختی و حافظه فضایی در زاده‌ها، کاهش میزان بیان ژن گیرنده‌های لپتین در هیپوکمپ است. در مطالعه حاضر، موش‌های باردار نژاد NMRI به چهار گروه هشت‌تایی تقسیم‌بندی شدند: ۱- گروه کنترل نر: زاده‌های نر مادرانی که در دوران بارداری شوک الکتریکی دریافت نکردند ۲- گروه کنترل ماده: زاده‌های ماده مادرانی که در دوران بارداری شوک الکتریکی دریافت نکردند ۳- گروه استرس نر: زاده‌های ماده مادرانی که در دوران بارداری شوک الکتریکی دریافت کردند و ٤- گروه استرس ماده: زاده‌های ماده مادرانی که در دوران بارداری شوک الکتریکی دریافت کردند. برای ارزیابی برای ارزیابی اثر استرس بر اضطراب ذاتی، از دستگاه میدان باز و برای اضطراب القا شده از ماز مرتفع بعلاوه‌ای استفاده شد. غلظت پلاسمایی لپتین و بیان ژن گیرنده لپتین در هیپوکامپ اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد استرس شوک الکتریکی کف پایی در نیمه اول بارداری می‌تواند سبب کاهش سطوح پلاسمایی لپتین، در زاده‌ها شود. بروز رفتارهای شبه اضطرابی در زاده‌های نر و ماده مادرانی که شوک دریافت کردند به طور معنی‌داری افزایش داشت ($p < ۰/۰۱$). همچنین بررسی ها نشان داد که زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده زمان و مسافت بیشتری را جهت رسیدن به اتاقک هدف در ماز بارنز (آزمون حافظه) طی کردند. استرس دوران بارداری سبب کاهش غلظت پلاسمایی لپتین و هیپوکمپی لپتین در زاده‌های نر و ماده خواهد شد. بیان ژن گیرنده لپتین در هیپوکامپ زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده نیز به طور معنی‌داری بسیار کمتر از زاده‌های گروه کنترل بود. قرارگرفتن مادران باردار در معرض شوک الکتریکی، منجر به کاهش میزان هورمون لپتین در زاده‌ها شد که با بروز رفتارهای شبه اضطرابی و اختلال در حافظه و یادگیری فضایی همراه بود. با توجه به وجود انواع استرس‌های محیطی در زندگی امروزه، سنجش و ارزیابی لپتین ممکن است نقش تعیین‌کننده‌ای در درمان بیماران مبتلا به اضطراب و اختلالات شناختی را پیش‌بینی کند.

کلمات کلیدی: استرس بارداری، اضطراب ، حافظه فضایی، گیرنده لپتین.

مقدمه

در هنگام بارداری هورمون‌های استرس که مهمترین بخش مسئول حفظ زندگی مادر در واکنش به تغییرات محیط اطراف هستند، از طریق جفت به جنین رسیده و ممکن است با اثر بر ژنوم سلول‌های جنین، رشد و مسیر تکاملی آن‌ها را تغییر دهند و به عوامل خطرساز و بالقوه در ایجاد برخی از بیماری‌های عصبی همچون

اختلالات شدید در یادگیری، حافظه و اختلالات رفتاری از قبیل کاهش رفتارهای اکتشافی در محیط جدید، اضطراب و افسردگی فرزندان تبدیل شوند. بنابراین به دلیل استقرار جنین در رحم و وابستگی به شرایط فیزیولوژیک مادر، حفظ ثبات و پایداری آن برای سلامت و رشد طبیعی جنین بسیار ضروری است. مطالعات نشان داده‌اند که استرس در دوران بارداری می‌تواند خطرساز و یک عامل بالقوه در ایجاد بعضی از بیماری‌های عصبی باشد (۱۲). فرآیندهای ذهنی و روانی در مادر، سیستم اتونوم، اعصاب، غدد و سیستم ایمنی جنین را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۷). اثرات استرس در دوران بارداری به خصوص در مراحل بحرانی تکامل سیستم عصبی بر روی مغز و رفتار ممکن است طولانی مدت باشد (۱۶). استرس، می‌تواند نوروژنز هیپوکامپ را کاهش داده و موجب اختلال در تقویت طولانی مدت در هیپوکامپ و آشفتگی حافظه فضایی گردد (۲۵). زاده‌های موش-هایی که در دوران بارداری در معرض یک استرسور واقع شده‌اند تغییرات قابل توجهی در ساختار و پلاستی‌سیتی سیناپسی هیپوکامپ نشان داده‌اند (٤). همچنین استرس‌های دوران بارداری ممکن است با تغییر ساختار هیپوکامپ و جسم مخطط سیستم‌های حافظه مبتنی بررفتار را به شدت تحت تاثیر قرار دهد. حتی آشفتگی‌های ظریف توسط استرس‌های زیست محیطی در دوران بارداری اختلالات شناختی و حافظه را به دنبال خواهد داشت (۲). مطالعات تجربی بر روی جوندگان نشان داده است که استرس قبل از تولد می‌تواند منجر به اختلالات شدید در رشد و یادگیری و حافظه فرزندان، اختلالات رفتاری از قبیل تهییج پذیری بالا، کندی حرکات و کاهش رفتارهای اکتشافی در محیط جدید شود (۹). مطالعات حیوانی و انسانی نشان داده است که لپتین اثرات قابل توجهی در شکل پذیری عصبی و شناختی اعمال می‌کند (۱۳). لپتین محرک نوروژنزیز، رشد آکسون، سیناپتوژنزیز و مورفولوژی دندریتیک قبل و پس از تولد می‌باشد (۳). گیرنده لپتین از خانواده سایتوکاین‌های کلاس یک می‌باشد و حضور آن در نواحی مختلف مغزی به اثبات رسیده است. نواحی CA1، CA3 و شکنج دندانه‌دار در تشکیلات هیپوکامپ مناطقی هستندکه گیرنده لپتین در آنها به وفور یافت شده است (۱۵). لپتین همچنین دارای عملکرد محافظت نورونی است که این نقش را با مهار آپوپتوز و تداوم بقای سلول از طریق تنظیم آنزیم‌های آپوپتوتیک، سنتز فاکتورهای نوروتروفیک مانند BDNF، محافظت در برابر سمّیت سلولی گلوتاماترژیک، حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو توسط بیان آنتی‌اکسیدانت غشایی، تثبیت غشاهای میتوکندریایی و تکثیر سلول‌های پیش ساز هیپوکامپ به ثمر می‌رساند (۲۱). لپتین اثر مهاری گلوکوکورتیکوئیدها بر روی نوروژنز ناحیه هیپوکامپ را خنثی کرده و نقش مهمی در رشد و فعالیت‌های مغزی دارد (٦). از آنجایی که با افزایش ترشح گلوکوکورتیکوئیدهای مادری به دنبال مواجهه با استرس، تغییراتی در الگوی ترشحی هورمون‌ها از قبیل لپتین که نقش مهمی در محافظت نورونی و فرآیندهای شناختی دارد رخ می‌دهد، لذا هدف از مطالعه حاضر، یافتن پاسخ به این پرسش است: آیا استرس در دوران بارداری مادر بر تغییرات هورمون لپتین و توانایی های شناختی مانند یادگیری و حافظه فضایی و تغییر در رفتارهای شبه اضطرابی نوزاد اثرگذار است؟

مواد و روش‌ها

مدل بیولوژیک: در مطالعه تجربی حاضر از ۲۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده و ۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI بالغ خریداری شده از انستیتو پاستور ایران در محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم

استفاده شد. موش‌ها تحت سیکل ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی در شرایط دمایی کنترل شده (۲±۲۱ سانتیگراد) نگهداری شدند و همگی حیوانات به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. دوره جنسی حیوانات قبل از شروع آزمایش و انجام عمل لقاح، بررسی و همه حیوانات وارد فاز استروس شدند (با قرار دادن آن‌ها در کنار قفس موش‌های نر به مدت ۷ روز به یک فاز رسیدند و به بیان دیگر هم فاز شدند). بعد از سازش حیوانات با محیط، ۲۰ موش ماده را به ۵ گروه چهار تایی تقسیم کرده و هر گروه را به مدت ۲٤ ساعت با یک موش نر در یک قفس گذاشته تا عمل لقاح صورت گیرد.

گروه‌بندی حیوانات: گروه کنترل باردار از روز اول بارداری به مدت ۱۰روز متوالی ۳۰ دقیقه در دستگاه القاء استرس شوک الکتریکی کف پایی در حالت خاموش قرار می‌گرفتند. گروه تجربی نیز از روز اول بارداری به مدت ۱۰ روز متوالی ۳۰ دقیقه به منظور آشنایی با دستگاه در حالت خاموش قرار داده، سپس تحت استرس شوک الکتریکی کف پایی (فرکانس ۱۰ هرتز، ولتاژ٤۰ میلی ولت، زمان ٦۰ ثانیه) قرار گرفتند و در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه درحالت خاموش قرار داده شدند. بعد از ۱۰ روز موش‌ها در هر دو گروه در حالت استراحت و شرایط مناسب تا زمان به دنیا آمدن نوزادان نگه‌داری شدند. در روز ۲۱ نوزادان در هر دو گروه متولد شدند. پس از سه هفته، نوزادان نر و ماده در هر دو گروه کنترل و تجربی جدا و بعد از این که به محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم رسیدند در چهار گروه هشت‌تایی گروه بندی شدند: ۱- گروه کنترل نر: زاده‌های نر مادرانی که در دوران بارداری شوک الکتریکی دریافت نکردند. ۲- گروه کنترل ماده: زاده‌های ماده مادرانی که در دوران بارداری شوک الکتریکی دریافت نکردند. ۳- گروه استرس نر: زاده‌های ماده مادرانی که در دوران بارداری شوک الکتریکی دریافت کردند. ٤- گروه استرس ماده: زاده-های ماده مادرانی که در دوران بارداری شوک الکتریکی دریافت کردند.

جهت ارزیابی حافظه فضایی از ماز بارنز، رفتارهای شبه اضطرابی از ماز بعلاوه‌ای مرتفع و بررسی اضطراب ذاتی از دستگاه میدان باز استفاده شد. در نهایت تغییرات میزان لپتین در پلاسما و هیپوکمپ و میزان بیان گیرنده ژن لپتین در هیپوکمپ زاده‌ها ارزیابی شد. این تحقیق تجربی در مرکز علوم و اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران انجام شد.

نحوه القاء استرس در مادران باردار: برای القا استرس در مادران باردار، از جعبه القا استرس (Stress box) استفاده شد. این دستگاه از جنس پلکسی گلاس بود که کاملاً شفاف و دارای ۹ قسمت برای ۹ موش آزمایشگاهی بود. دستگاه دارای سیم‌های استیل زنگ نزن است که به دستگاه الکتروشوکی که توسط رایانه کنترل می‌شد مرتبط بود. در این مطالعه، دستگاه بر روی فرکانس ۱۰ هرتز، ولتاژ٤۰ میلی ولت و زمان القاء شوک ٦۰ ثانیه تنظیم گردید.

ارزیابی حافظه فضایی در زاده‌های نر و ماده: برای ارزیابی اثر استرس بر حافظه فضایی از ماز بارنز استفاده گردید. ماز بارنز از یک صفحه‌ی مدور از جنس پلاکسی گلاس شیری رنگ ساخته شده که ۹۲ سانتیمتر قطر دارد. در اطراف این ماز به فاصله‌ی ۲ سانتیمتر از لبه ۱۲ سوراخ به قطر ۸ سانتیمتر تعبیه شده است. در زیر یکی از این سوراخ‌ها (سوراخ هدف) یک اتاقک از جنس پلاکسی گلاس تیره به ابعاد۲۰×۲۰ سانتیمتر قرار دارد. در روز آشنایی برای آموزش حیوانات، هر حیوان (زاده‌های نر و ماده) به مدت ۳۰ دقیقه بر روی صفحه ماز قرار گرفت. پس از آشنایی، به حیوان ۹۰ ثانیه زمان داده شد تا اتاقک هدف را بر روی صفحه ماز پیدا کند. این کار ٤ بار در

هر روز برای هر حیوان انجام شد. در روز پنجم که روز آزمون حافظه نامیده می‌شود هر حیوان فقط یک بار بر روی صفحه رفت و نتیجه ثبت گردید. مسافت طی شده توسط حیوان و زمان رسیدن به اتاقک هدف مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

ارزیابی رفتارهای شبه اضطرابی در زاده‌های نر و ماده: برای ارزیابی اثر استرس بر اضطراب القا شده از ماز مرتفع بعلاوه ای (Elevated Plus Maze) استفاده شد. این دستگاه شامل دو بازوی باز هر یک ۵۰ الی ۱۰۰ سانتیمتر و دو بازوی بسته ۵۰ سانتی متری و یک کفه مرکزی۱۰×۴۰ می‌باشد. بازوهای باز و بسته هر کدام مقابل یکدیگر قرار دارند. این دستگاه حدود ۸۰ سانتیمتر از کف اتاق بالاتر قرار می‌گیرد. ابتدا هر حیوان جداگانه بر روی صفحه ماز به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته شد تا با محیط آشنا شوند، سپس هر حیوان را در بازوی بسته قرار گرفت و به مدت ۵ دقیقه اجازه داده شد که بین بازوها رفت و آمد کند. سپس رفتار حیوان مورد آزمایش توسط یک دوربین فیلمبرداری که در بالای دستگاه نصب شده بود ثبت و توسط سیستم ردیابی ویدئویی آنالیز شد. شاخص‌های استاندارد ارزیابی اضطراب شامل: الف) درصد زمانی که هر حیوان در بازوهای بسته و یا باز سپری کرد و ب) درصد تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و بسته بود.

ارزیابی اضطراب ذاتی در زاده‌های نر و ماده: برای ارزیابی اثر استرس بر اضطراب ذاتی، از دستگاه میدان باز استفاده شد. جعبه میدان باز از جنس ماده ای غیر شفاف به ابعاد ۳۵×۴۵×۴۵ سانتیمتر می‌باشد. سطح داخلی کف محفظه بوسیله خطوط مشکی به ۹ خانه مربعی ۱۵×۱۵ تقسیم شده است. عبور هر حیوان با هر چهار عضو حرکتی از یک خانه به خانه دیگر به عنوان یک واحد حرکتی تلقی می‌شود. در روز اول زاده‌های گروه های کنترل و تجربی را جداگانه در دستگاه میدان باز به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته که با محیط آشنا شوند. سپس هر حیوان به مدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار داده اجازه داده شد که در محیط آزادانه گردش کند. رفتار حیوان مورد آزمایش توسط یک دوربین فیلمبرداری که در بالای دستگاه نصب شده است ثبت و توسط سیستم ردیابی ویدئویی آنالیز شد. سپس مجموع تعداد حرکات هر حیوان در محفظه در مدت زمان ۵ دقیقه محاسبه شد.

ارزیابی غلظت پلاسمایی لپتین در زاده‌های نر و ماده: پس از ارزیابی‌های رفتاری، زاده‌های نر وماده از هر دو گروه با کتامین و زابلازین بیهوش شدند و سپس از گوشه‌ی داخلی چشم (سینوس رترو اوربیتال) به میزان ۰/۵ میلی‌لیترخون‌گیری انجام شد. سپس با استفاده از دستورالعمل کیت الایزا (Mouse Leptin ELISA kit , ZB- 10652- M9648, Germany)، میزان غلظت پلاسمایی لپتین اندازه گیری شد.

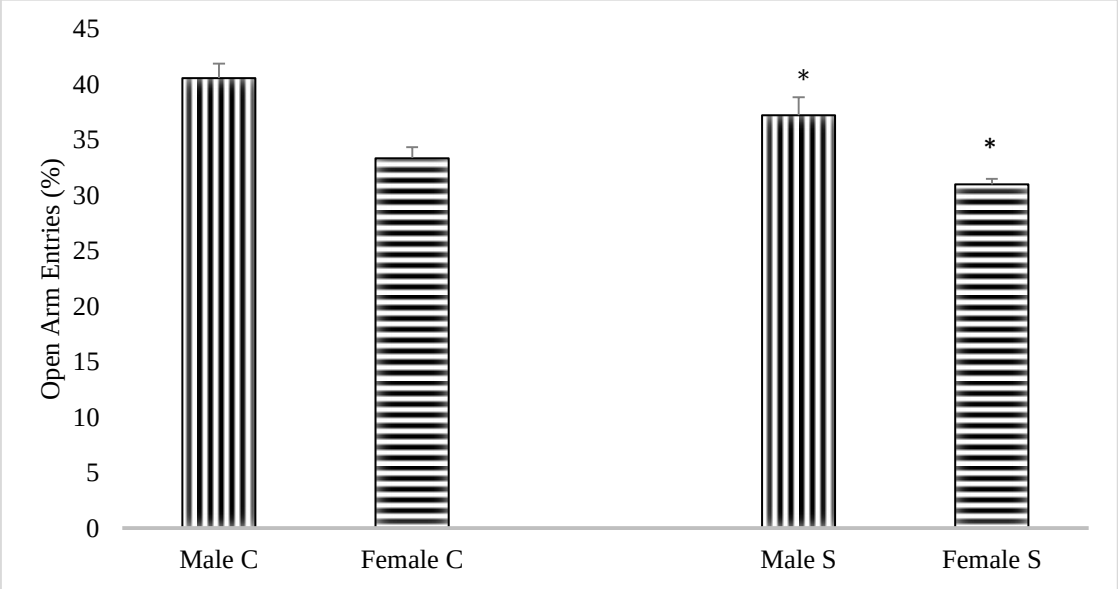
ارزیابی میزان لپتین و بیان ژن گیرنده لپتین در هیپوکامپ زاده‌های نر و ماده: در این بخش از تحقیق، پس از عمل جراحی و استخراج مغز، با استفاده از دستورالعمل کیت الایزا (Mouse Leptin ELISA kit, ZB- 10652- M9648, Germany)، میزان غلظت لپتین هیپوکمپ اندازه گیری شد. برای بررسی تغییرات بیان ژن لپتین، RNA بافت هیپوکامپ استخراج و با استفاده ازدستگاه اسپکتروفتومتر نانو دراپ، غلظت RNA را تعیین و درمرحله بعد با بهره-گیری از روش نسخه برداری معکوس(Reverse transcriptase) نسخه هایی از DNA به تعداد زیادی تهیه شد. سپس کیفیت RNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی و با استفاده از PCR میزان بیان ژن گیرنده لپتین در هر نمونه ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد بیان شد. جهت مقایسه بین گروه‌های مورد آزمایش، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و تست توکی استفاده گردید. برای بررسی دو فاکتور استرس و جنسیت از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه استفاده شد. در تمامی موارد $p < ۰/۰۵$ به عنوان مرز معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شد. در محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه 2017 استفاده گردید.

نتایج

در بخش رفتاری، نتایج بررسی‌های آماری در آزمون ماز بعلاوه‌ای مرتفع نشان داد که تعداد دفعات ورود به بازوی باز در زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده نسبت به زاده‌های نرو ماده مادران گروه فاقد استرس به طور معنی‌داری کمتر بود ($p < ۰/۰۵$) (نمودار ۱). همچنین مدت زمان سپری شده در بازوی باز نیز در زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده نسبت به زاده-های مادران گروه کنترل کمتر بود ($p < ۰/۰۵$ برای گروه ماده و $p < ۰/۰۱$ برای گروه نر مادران استرس دیده) (نمودار ۲). بنابراین زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده نسبت به زاده‌های نرو ماده مادران گروه کنترل رفتارهای شبه اضطرابی بیشتری از خود نشان دادند. در بررسی اضطراب ذاتی با استفاده از دستگاه میدان باز نیز مشخص گردید که میزان فعالیت حرکتی در زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده نسبت به زاده‌های نرو ماده مادران گروه فاقد استرس به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p < ۰/۰۱$) (نمودار ۳). بنابراین زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده، اضطراب ذاتی بیشتری را نسبت به زاده‌های نرو ماده گروه استرس ندیده از خود نشان دادند. بین فعالیت حرکتی زاده-های نر و ماده گروه کنترل نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با انجام آزمون بارنز که جهت ارزیابی حافظه و یادگیری فضایی انجام می‌شود، مشخص گردید که زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده به طور معنی‌داری نسبت به زاده‌های نر و ماده مادران استرس ندیده، مدت زمان بیشتری را جهت رسیدن به اتاقک هدف طی کردند ($p <۰/۰۰۱$ برای گروه نر و $p <۰/۰۱$ برای گروه ماده مادران استرس دیده) (نمودار ٤ و ٥). همچنین زاده‌های مادران استرس دیده در هر دو جنس مسافت بیشتری را جهت رسیدن به اتاقک هدف در ماز بارنز طی کردند ($p < ۰/۰۰۱$ برای گروه نر و $p < ۰/۰۱$ برای گروه ماده مادران استرس دیده) (نمودارهای ٦ و ٧). بنابراین زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده نسبت به دیگر زاده‌ها، از لحاظ رفتاری حافظه و یادگیری کمتری از خود نشان دادند. در بخش بیو شیمیایی نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل سرم حاصل از نمونه خون جمع آوری شده از گوشه‌ی داخلی چشم (سینوس رترو اوربیتال) زاده‌ها، به روش الایزا نشان داد که غلظت لپتین در نمونه‌های سرم زاده‌های نر و ماده مادران استرس دیده نسبت به زاده‌های نرو ماده مادران گروه فاقد استرس به طور معنی‌داری کمتر بود ($p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۰۱$) (نمودار ۸–A). همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل بر روی بافت هیپوکامپ به روش الایزا نشان داد که میزان لپتین هیپوکمپ در زاده‌های مادران استرس دیده بسیار کمتر از زاده‌های مادران استرس ندیده بود ($p < ۰/۰۵$ و$p < ۰/۰۱$) (نمودار ۸–B). نتایج حاصل از PCR بافت هیپوکامپ نیز نشان داد که میزان بیان ژن گیرنده لپتین در هیپوکامپ زاده‌های مادران استرس دیده به طور معنی‌داری بسیار کمتر از زاده‌های مادران استرس ندیده بود ($p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۰۱$)(نمودار ۸–C). جدول ۱ تجزیه و تحلیل همبستگی پیرسون یک ارتباط مثبت بین کاهش حافظه فضایی در زاده‌های

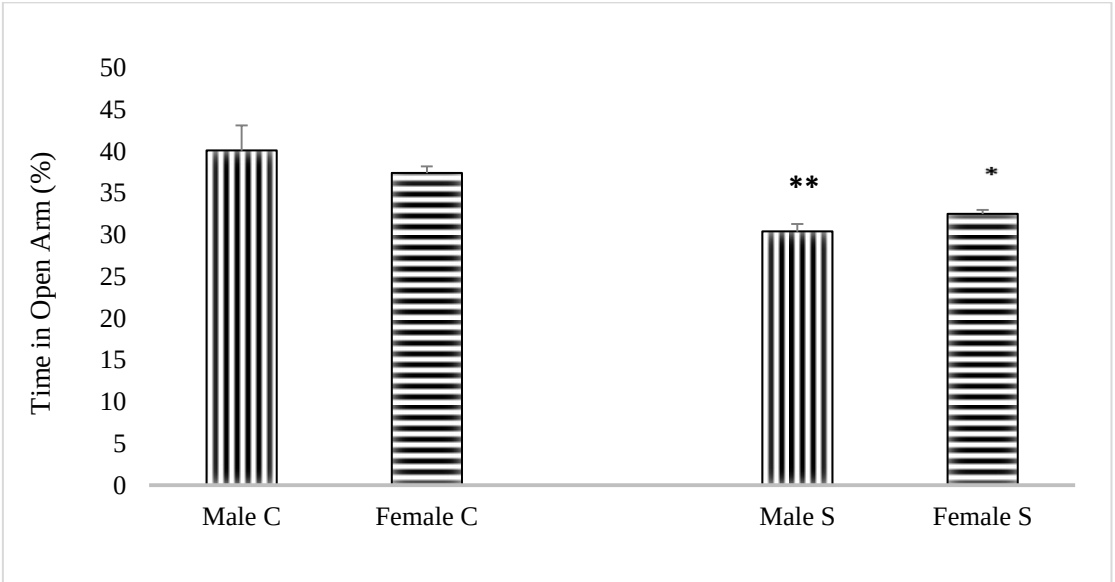
مادران استرس دیده و سطح لپتین پلاسما و هیپوکمپ
و گیرنده لپتین هیپوکمپ را به خوبی نشان می‌دهد.



نمودار ۱- اثر استرس دوران بارداری مادر بر بروز رفتارهای شبه اضطرابی در زاده‌های نر و ماده (تعداد دفعات ورود به بازوی باز ماز بعلاوه‌ای). داده‌ها بصورت میانگین± انحراف معیار استاندارد ارائه شده است. ۰/۰۵> p * در مقایسه با گروه کنترل.

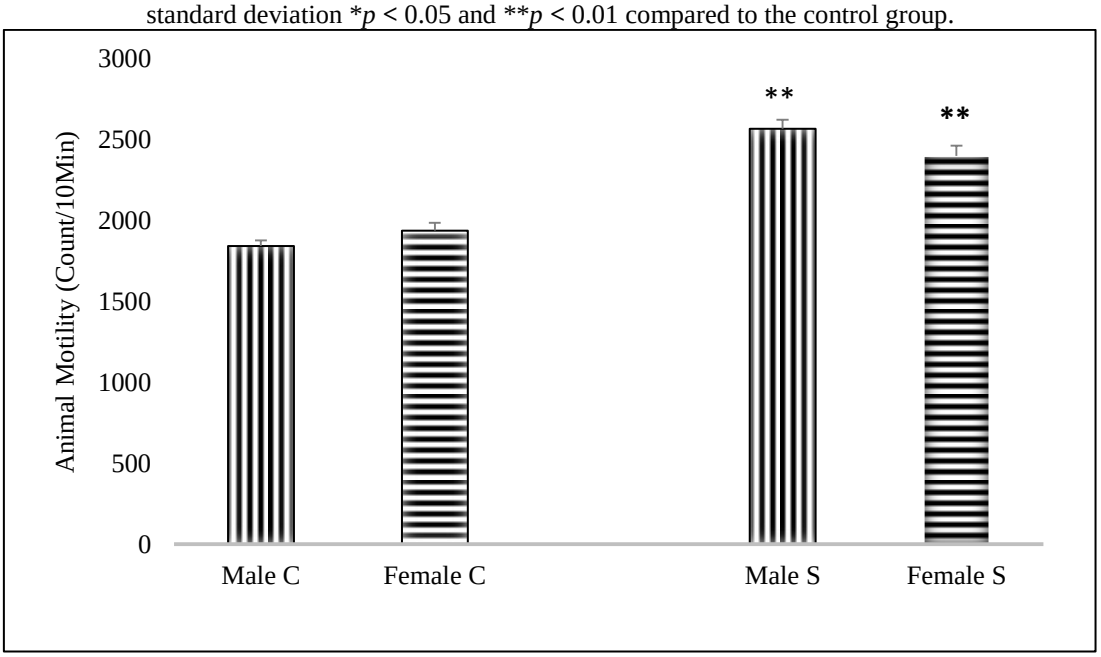
Figure 1. The effect of maternal stress during pregnancy on the occurrence of anxiety-like behaviors in male and female offspring (the number of times entering the open arm the plus maze). Data are presented as mean ± standard deviation.

*$p < 0.05$ compared to the control group.



نمودار ۲- اثر استرس دوران بارداری مادر بر بروز رفتارهای شبه اضطرابی در زاده‌های نر و ماده (مدت زمان سپری شده در بازوی باز ماز بعلاوه‌ای). داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد، ۰/۰۵ > p * و ۰/۰۱ > p ** در مقایسه با گروه کنترل.

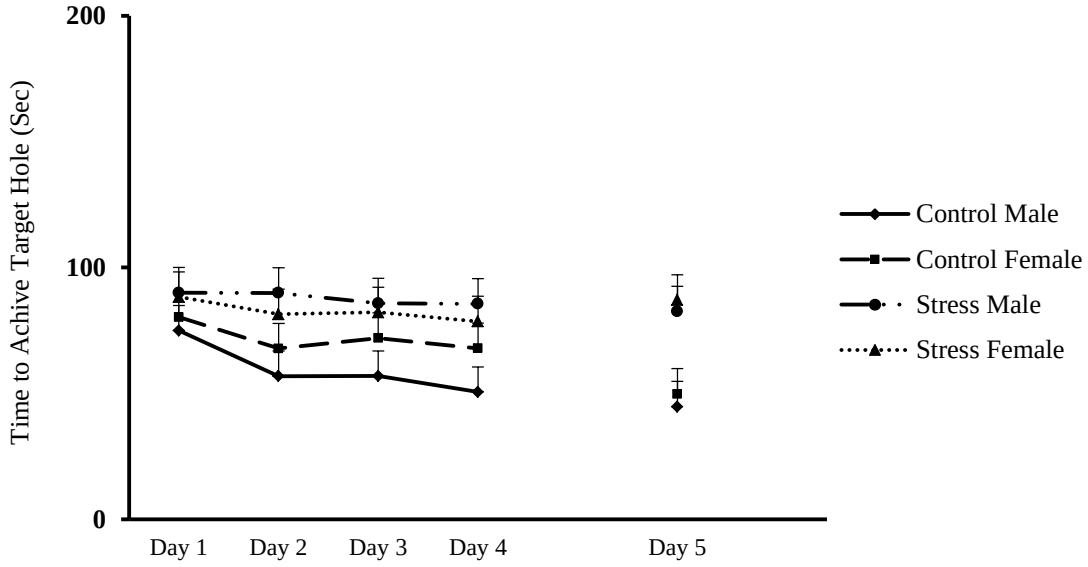
Figure 2. The effect of maternal stress during pregnancy on the occurrence of anxiety-like behaviors in male and female offspring (time spent in the open arm of the plus maze). Data are presented as mean ± standard deviation *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$ compared to the control group.



نمودار ۳- تاثیر استرس دوران بارداری بر میزان فعالیت‌های حرکتی در زاده‌های نر و ماده (اضطراب ذاتی) در دستگاه میدان باز.

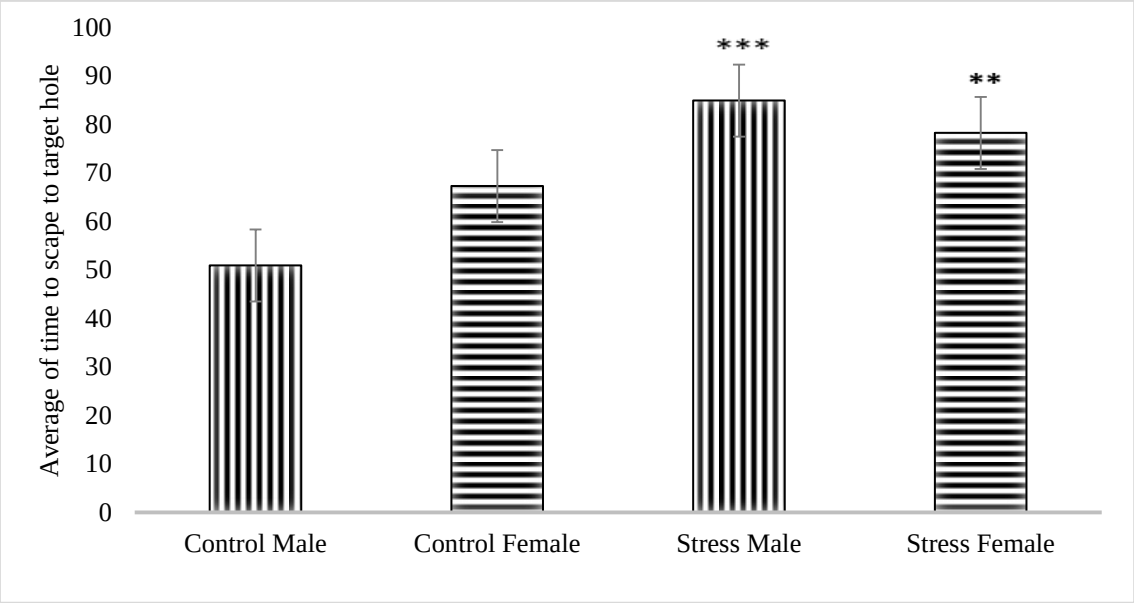
داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد ارائه شده است. ۰/۰۱ > p ** در مقایسه با گروه کنترل.

Figure 3. The effect of stress during pregnancy on the amount of motor activities in male and female offspring (inherent anxiety) in the open field apparatus. Data are presented as mean ± standard deviation. **$p < 0.01$ compared to the control group.



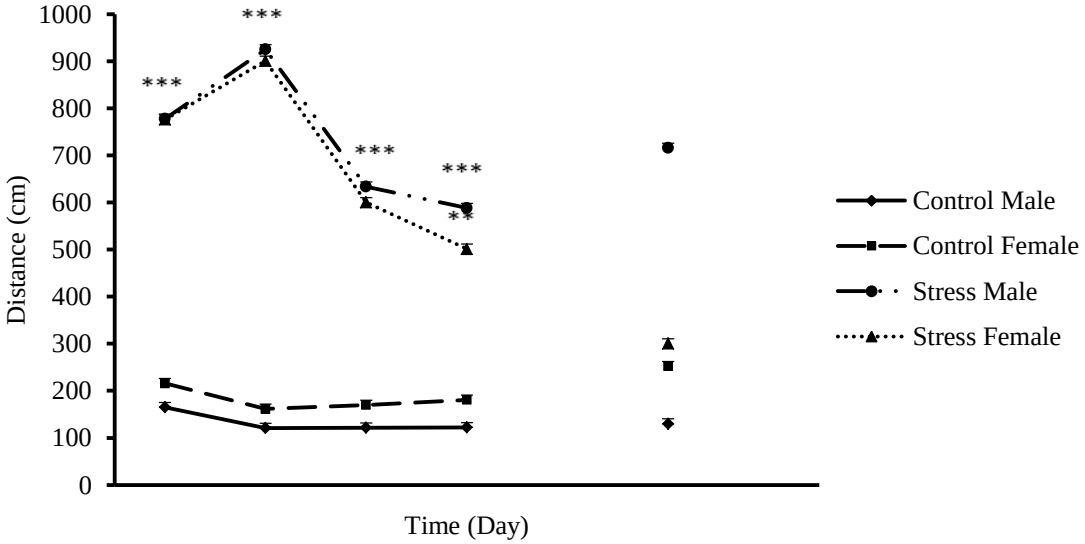
نمودار ٤- تاثیر استرس دوران بارداری بر حافظه فضایی زاده‌های نر و ماده در ماز بارنز. (مدت زمان رسیدن به اتاقک هدف).

Figure 4. The effect of stress during pregnancy on spatial l memory of male and female offspring in Barnes Maze (Duration of reaching the target room).



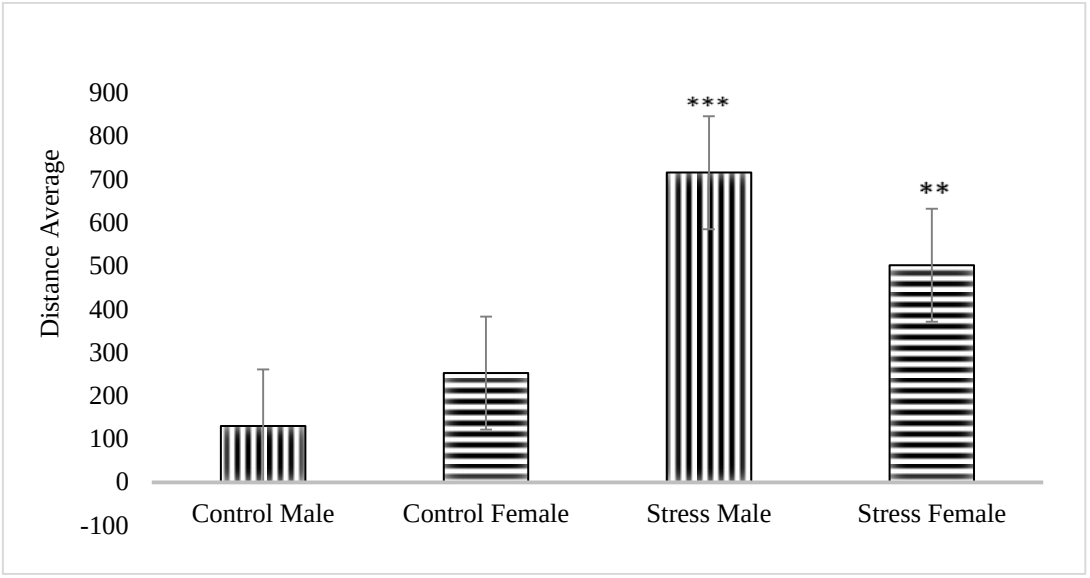
نمودار ۵- تاثیر استرس دوران بارداری بر حافظه فضایی زاده‌های نر و ماده در ماز بارنز. (میانگین مدت زمان رسیدن به اتاقک هدف). داده‌ها بصورت میانگین± انحراف معیار استاندارد ارائه شده است. ۰/۰۱ > p ** و ۰/۰۰۱ > p *** در مقایسه با گروه کنترل.

Figure 5. The effect of stress during pregnancy on spatial memory of male and female offspring in Barnes Maze. (Average duration of reaching the target room). Data are presented as mean ± standard deviation. $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.01$ compared to the control group.



نمودار ٦- اثر استرس دوران بارداری بر حافظه فضایی زاده‌های نر و ماده در ماز بارنز. (مسافت طی شده تا رسیدن به اتاقک هدف). داده‌ها بصورت میانگین± انحراف معیار استاندارد ارائه شده است. ۰/۰۱>P ** و ۰/۰۰۱>P *** در مقایسه با گروه کنترل.

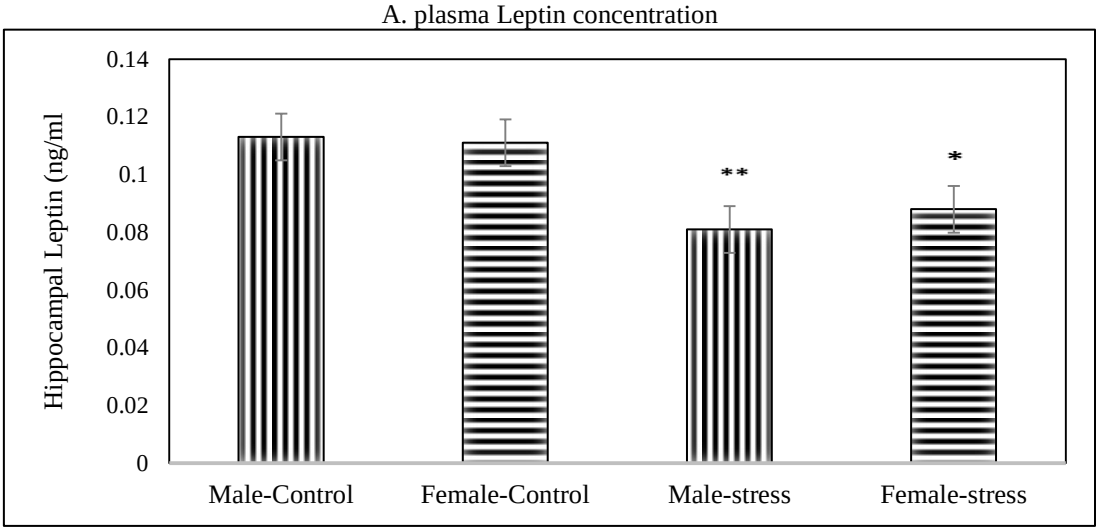
Figure 6. The effect of stress during pregnancy on spatial memory of male and female offspring in Barnes Maze. (Distance traveled to reach the target room). Data are presented as mean ± standard deviation. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.



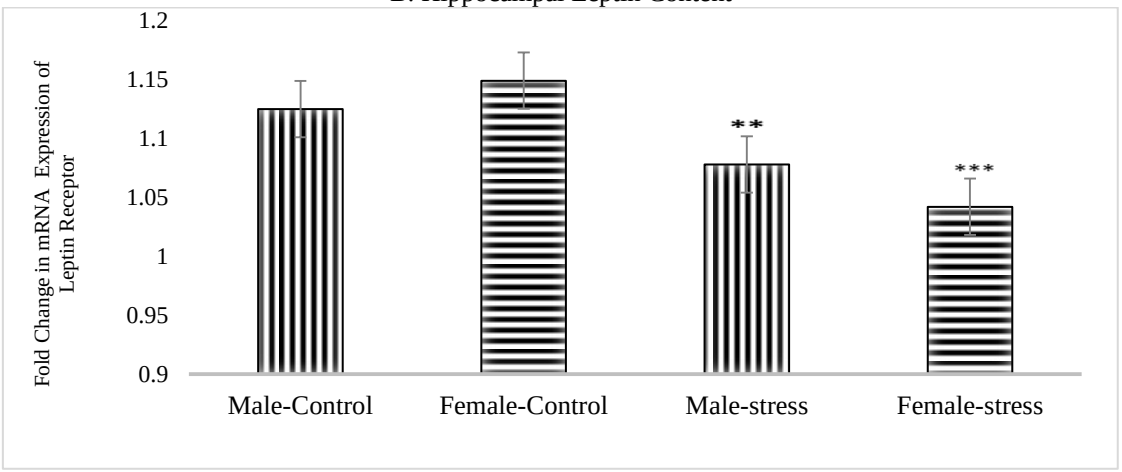
نمودار ۷- تاثیر استرس دوران بارداری بر حافظه فضایی زاده‌های نر و ماده در ماز بارنز. (میانگین مسافت طی شده تا رسیدن به اتاقک هدف). داده‌ها بصورت میانگین± انحراف معیار استاندارد ارائه شده است. ۰/۰۱ > p ** و ۰/۰۰۱ > p*** در مقایسه با گروه کنترل.

Figure 7. The effect of stress during pregnancy on spatial memory of male and female offspring in Barnes Maze. (Average distance traveled to reach the target room). Data are presented as mean ± standard deviation. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.01$ compared to the control group.

A. plasma Leptin concentration



B. Hippocampal Leptin Content



C. Hippocampal Leptin Receptor Content

نمودار ۸- اثر استرس دوران بارداری بر غلظت لپتین پلاسما (A)، محتوای لپتین هیپوکامپ (B) و محتوای گیرنده لپتین هیپوکامپ (C) در زاده‌های نر وماده. داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد ارائه شده است.

** p<۰/۰۱ و *** p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل.

Figure 6. The effect of prenatal stress on plasma leptin concentration (A), hippocampal leptin content (B) and hippocampal leptin receptor content (C) in male and female offspring. Data are presented as mean ± standard deviation. ** p <0.01 and *** p <0.01 compared to the control group.

جدول ۱- تست همبستگی پیرسون به منظور بررسی وجود همبستگی بین حافظه فضایی، تغییرات غلظت لپتین هیپوکمپ، تغییرات غلظت پلاسما و تراکم گیرنده های لپتینی در هیپوکمپ (مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد برای ۸ موش نر یا ماده، * $p < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل).

Table1. Pearson's correlation test in order to investigate the existence of correlation between memory and spatial learning, changes in Leptin concentration in hippocampus, changes in plasma concentration and density of Leptin receptors in hippocampus (The values are the mean ± standard deviation for 8 male or female mice, * $p < 0.05$ compared to the control group).

Variables		Hippocampal leptin		Plasma leptin		Hippocampal leptin receptors		Spatial memory	
		Pearson's correlation	p	Pearson's correlation	p	Pearson's correlation	p	Pearson's correlation	p
Control	Male	0.351	0.61	0.41	0.31	0.158	0.18	0.356	0.39
	Female	0.284	0.34	0.19	0.28	0.216	0.29	0.332	0.325
Stress	Male	0.588	0.014*	0.66	0.034*	0.741	0.019*	0.831	0.0118*
	Female	0.352	0.092*	0.54	0.065*	0.42	0.059*	0.661	0.036*

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که قرار گرفتن مادران در دوران بارداری تحت استرس فیزیکی سبب بروز رفتارهای شبه اضطرابی و اختلال حافظه و یادگیری در زاده‌ها شد. همچنین سطح پلاسمایی و میزان بیان ژن گیرنده هورمون لپتین در هیپوکمپ زاده‌های مادران دریافت کننده شوک الکتریکی به طرز معنی‌داری کاهش یافت. مطالعات جدید نشان می‌دهند که دو عامل ژنتیک و محیط تعیین کنندگان میزان بروز یا عدم بروز یک رفتار در فرد هستند. عوامل محیطی با تحریک سیستم استرسی مغز باعث بروز تغییرات مهمی در نورون‌های بخش‌های مختلف مغز شده و در نهایت سازمان‌بندی بخش‌های مختلف مغز را برهم-می‌زنند. این برهم‌خوردگی موجبات ایجاد یک سازمان بندی جدید در مغز را فراهم کرده و ممکن است به بروز رفتارهای جدید یا شدت و ضعف در رفتارهای مختلف منجر شود. این سازمانبندی جدید، زمینه ایجاد بیماری‌های عصبی روانی مانند اختلال در یادگیری، اسکیزوفرنی، افسردگی، اضطراب، پارکینسون، آلزایمر و فراموشی را فراهم می‌نماید (۱۰). مطالعات بالینی و اپیدمیولوژیک، انواع مختلفی از بیماری‌ها و ناهنجاری‌های عصبی را در جوندگان و پستانداران نشان میدهد که ناشی از قرار گرفتن مادران باردار در معرض استرس‌های محیطی می‌باشد (۱۹). تحقیق حاضر نشان داد که زاده‌های مادران استرس دیده اضطراب بیشتری را نسبت به گروه کنترل داشتند. این امر هم در بررسی اضطراب القاء شده با استفاده از ماز مرتفع و هم در بررسی اضطراب ذاتی با استفاده از روش میدان باز مشاهده گردید. همخوان با یافته‌های ما، تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که استرس دوران بارداری و یا استرس‌های پس از تولد (استرس جداسازی از مادر) به راحتی می‌توانند باعث ایجاد اختلال در عملکرد سیستم استرسی زاده‌ها شده و این اختلال با بروز رفتارهای شبه‌اضطرابی همراه است (۱). تحقیقات قبلی بیان داشتند که استرس در مادران باردار، سبب تغییرات ساختاری در شبکه عصبی هیپوکامپ، قشر پره‌فرونتال و آمیگدال می‌شود (۲۲). آمیگدال یکی از مهمترین مناطق سیستم لیمبیک در تنظیم رفتارهای اضطرابی است (۲۳). همچنین استرس می‌تواند باعث کاهش حجم (اندازه) آمیگدال درزاده‌های مادران استرس دیده شود (۱۱). تحقیقات

متعدد نشان داده‌اند که کاهش اندازه آمیگدال به دنبال افزایش گلوکوکورتیکوئیدها با بروز رفتارهای شبه-اضطرابی و شبه‌افسردگی در حیوانات و انسان همراه است. وجود اضطراب در حیوانات مورد مطالعه، نشان دهنده تاثیر پذیری دستگاه عصبی زاده‌ها از استرس دوران بارداری است و اینکه در هر دو جنس این اضطراب دیده شد بیانگر آن است که تاثیر استرس دوران بارداری بر هر دو جنس وجود دارد (۱۱). وجود اضطراب ذاتی در زاده‌های مادران تحت استرس دوران بارداری، نشانگر بروز بیماریهای روانی در این زاده‌ها است که مسلما به دلیل قرار گرفتن مادران باردار در معرض استرس بوده است. در تحقیقات متعدد نشان داده شده است استرس در مادران رابطه معنی‌داری با افزایش فعالیت‌های حرکتی دارد (۲٤). همچنین افزایش فعالیت حرکتی در میدان باز به عنوان یکی از شاخص‌های اضطراب معرفی شده است (۲۰). در تحقیقات متعدد نشان داده شده است که این افزایش حرکت با تغییرات ساختاری در مغز حیوان بخصوص در آمیگدال و مناطقی از آن، که به عنوان حد فاصل عمل بین هیجان و حرکت قرار دارد میانجیگری می‌شود (۱۸). تحقیقات قبلی نشان داده اند که افزایش طولانی مدت و مزمن هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی سبب افزایش فعالیت در بخش-های خروجی آمیگدال شامل هسته قاعده‌ای- جانبی و هسته مرکزی شده و خروجی‌های این دو هسته به سمت بخش میانی قشر پره فرونتال و بخش قشری هسته اکومبنس موجب افزایش حرکت حیوانات در محیط‌های جدید خواهد شد (۵). در تحقیق ما نیز زاده‌های مادران استرس دیده نسبت به زاده‌های مادران استرس ندیده فعالیت حرکتی زیادی را در محیط جدید از خود نشان داده اند. قابل توجه است که در این تست تفاوت معنی‌داری بین زاده‌های نر و ماده در هر دو گروه وجود نداشت و این امر نشان-دهنده تاثیرپذیری هر دو جنس از تغییرات ناشی از استرس دوران جنینی می‌باشد. همچنین، نتایج حاصل از تحقیق حاضر به وضوح نشان می‌دهد که سطح لپتین در پلاسما و هیپوکمپ و بیان ژن گیرنده لپتین در هیپوکامپ زاده‌های مادرانی که در دوران بارداری در معرض شوک الکتریکی کف پایی قرار گرفتند کاهش معناداری داشته است. نواحی CA1، CA3 و شکنج دندانه‌دار در تشکیلات هیپوکامپ مناطقی هستندکه گیرنده لپتین در آنها به وفور یافت شده است (۱۵). از طرف دیگر به نظر می‌رسد استرس با تخریب گیرنده‌های لپتینی در هیپوکمپ موجب کاهش فعالیت گیرنده NMDA می‌گردد (۸). کاهش فعالیت گیرنده NMDA موجب کاهش کلسیم داخل سلولی و کاهش بیان CREB و اختلال در یادگیری فضایی و شکل‌گیری حافظه در موش‌های آزمایشگاهی می‌گردد (۱۷). از آنجا که نقش لپتین به عنوان محافظت کننده نورونی به اثبات رسیده لذا کاهش میزان این نوروپپتید در هیپوکمپ، تجمع نورونی تائو را افزایش و فعالیت α سکرتاز را کاهش می‌دهد (این آنزیم مانع از شکل-گیری بتاآمیلوئید می‌شود). همچنین بیان ژن APOE را در نورون‌های ناحیه هیپوکمپ کاهش داده و در نتیجه موجب اختلال شناختی و تضعیف یادگیری و حافظه فضایی می‌گردد (١٤). استرس مزمن در مادران باردار (القا شوک الکتریکی در نیمه اول بارداری) سبب افزایش نورواستروئیدهای مغزی در خون و مغز زاده‌ها می‌شود. از آنجا که لپتین اثر مهاری گلوکوکورتیکوئیدها بر روی نوروژنز ناحیه هیپوکامپ راختنی می‌کند (٦)، می‌توان نتیجه گرفت کاهش میزان بیان ژن گیرنده های لپتین در هیپوکمپ زاده، با حذف این اثر مهاری، زمینه را برای اختلالات شناختی و رفتاری فراهم کرده است. در مطالعه حاضر نیز استرس القا شده در دوران بارداری به مادران سبب

کاهش سطح هورمون لپتین در پلاسما و کاهش یافتن سطح بیان ژن لپتین در ناحیه هیپوکمپ شد.

نتیجه‌گیری

یکی از دلایل احتمالی کاهش توانائی های شناختی و حافظه فضایی در زاده‌ها، کاهش میزان بیان ژن گیرنده‌های لپتین در هیپوکمپ است. نتایج این تحقیق نشان داد استرس شوک الکتریکی کف پایی در نیمه اول بارداری می‌تواند سبب کاهش سطوح پلاسمایی لپتین، کاهش میزان بیان ژن گیرنده‌های لپتین در هیپوکمپ و در نتیجه اختلال در حافظه فضایی و افزایش اضطراب در زاده‌ها شود. سنجش و ارزیابی لپتین ممکن است نقش تعیین کننده‌ای در درمان بیماران مبتلا به اضطراب و اختلالات شناختی را پیش‌بینی کند و به عنوان یک شاخص غربالگری برای شناسایی افرادی که در معرض اختلالات مرتبط با استرس هستند باشد. با توجه به وجود انواع استرس‌های محیطی در زندگی امروزه، می‌توان از این یافته به منظور راهکارهایی (لپتین درمانی) برای پیشگیری از برخی بیماری‌های روانی بهره مند شد.

تشکر و قدر دانی

این تحقیق به طور مشترک در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام شده است. بدین‌وسیله از همه عزیزانی که در انجام این طرح یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Aliabadi N., Sahraei H., Bahari Z., Meftahi G. 2018. Effect of prenatal immobilization stress on spatial memory, anxiety-like behavior and brain BDNF concentration in the F1 generation male mice. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 23(3):73-84.

2. Arnsten A.F. 2009. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature Reviews. Neuroscencei*, 10(6):410-422.

3. Bouret S.G. 2010. Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain Research*, 1350:2-9.

4. Champagne D.L., Bagot R.C., van Hasselt F., Ramakers G., Meaney M.J., de Kloet E.R., Joëls M, Krugers H. 2008. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *Journal of Neuroscience*, 28(23):6037-6045.

5. Ehlers C.L., Koob G.F. 1985. Locomotor behavior following kindling in three different brain sites. *Brain Research*, 326(1):71-79.

6. Garza J.C., Guo M., Zhang W., Lu X.Y. 2012. Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3β/β-catenin signaling. *Molecular Psychiatry*, 17(8):790.808.

7. Glover V. 2015. Prenatal stress and its effects on the fetus and the child: possible underlying biological mechanisms. *Advances in Neurobiology*, 10:269-283.

8. Harvey J., Solovyova N., Irving A. 2006. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Progress in Lipid Research*, 45(5):369-378.

9. Huizink A.C., Mulder E.J., Buitelaar J.K. 2004. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility?. *Psychological Bulletin*, 130(1):115-142.

10. Ishii S., Hashimoto-Torii K. 2015. Impact of prenatal environmental stress on cortical development. *Frontiers in Cell Neuroscience*, 9:207-217.

11. Ko M.C., Hung Y.H., Ho P.Y., Yang Y.L., Lu K.T. 2014. Neonatal

18. Pothuizen H.H., Jongen-Rêlo A.L., Feldon J. 2005. The effects of temporary inactivation of the core and the shell subregions of the nucleus accumbens on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and activity in rats. *Neuropsychopharmacology*, 30(4):683-696.

19. Schmitt A., Malchow B., Hasan A., Falkai P. 2014. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 8:19-27.

20. Seibenhener M.L., Wooten M.C. 2015. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, (96):e52434.

21. Teryaeva N.B. 2015. Leptin as a neuroprotector and a central nervous system functional stability factor. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 45(6):612-618.

22. Valentino R.J., Bangasser D., Van Bockstaele E.J. 2013. Sex-biased stress signaling: the corticotropin-releasing factor receptor as a model. *Molecular Pharmacology*, 83(4):737-745.

23. Walker A.G., Wenthur C.J., Xiang Z., Rook J.M., Emmitte K.A., Niswender C.M., Lindsley C.W., Conn P.J. 2015. Metabotropic glutamate receptor 3 activation is required for long-term depression in medial prefrontal cortex and fear extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of America*, 112(4):1196-1201.

24. Wilson C.A., Terry A.V. 2013. Variable maternal stress in rats alters locomotor activity, social behavior, and recognition memory in the adult offspring. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 104:47-61.

25. Yaka R., Salomon S., Matzner H., Weinstock M. 2007. Effect of varied gestational stress on acquisition of spatial memory, hippocampal LTP and synaptic proteins in juvenile male rats. *Behavioral Brain Research*, 179(1):126-132.

glucocorticoid treatment increased depression-like behaviour in adult rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(12):1995-2004.

12. Maccari S., Morley-Fletcher S. 2007. Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology*, 1:S10-5.

13. Mainardi M., Pizzorusso T., Maffei M. 2013. Environment, leptin sensitivity, and hypothalamic plasticity. *Neural Plasticity*, 2013:438072.

14. Marwarha G., Dasari B., Prasanthi J.R., Schommer J., Ghribi O. 2010. Leptin reduces the accumulation of Aβ and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. *Alzheimers Disease*, 19(3):1007-1019.

15. Mercer J.G., Hoggard N., Williams L.M., Lawrence C.B., Hannah L.T., Trayhurn P. 1996. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Letters*, 387(2-3):113-116.

16. Oitzl M.S., Champagne D.L., van der Veen R., de Kloet E.R. 2010. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neuroscience and Behavioral Review*, 34(6):853-866.

17. Oomura Y., Hori N., Shiraishi T., Fukunaga K., Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T., Ishibashi M., Aou S., Li X.L., Kohno D., Uramura K., Sougawa H., Yada T., Wayner M.J., Sasaki K. 2006. Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides*, 27(11):2738-2749.