

مقاله تحقیقی

اثرات استرس حاد حرکتی بر بیان ژن های *Znt1*, *Znt2*, *Znt3* و *Znt4* در هیپوکامپ موش های صحرائی نر

مائه نیله چی^۱، اکرم عیدی^۱، حمید گله داری^{۲*}، مهناز کسیمی^۲

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

۲. دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه زیست شناسی، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: galehdari@scu.ac.ir

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۱/۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۴

چکیده

امروزه از استرس به عنوان مسئله‌ای رایج در زندگی روزمره یاد می‌شود. استرس می‌تواند با ایجاد اختلال در هموستازی عناصر فلزی مانند روی در سیستم عصبی مرکزی موجب بروز بیماری‌ها یا اختلال در عملکرد بافت‌های مختلف گردد. در این میان عنصر روی نقش مهمی در کارکرد ارگان‌های حیاتی به ویژه سیستم عصبی مرکزی ایفا می‌نماید. اختلال در هموستازی روی به نوبه خود موجب ایجاد و یا پیشرفت بیماری‌هایی نظیر آلزایمر، افسردگی، اختلال در یادگیری و ایسکمی می‌گردد. هموستازی روی در بدن توسط پروتئین‌های ZnT و ZIP صورت می‌پذیرد. هدف از این مطالعه بررسی اثر استرس حاد حرکتی در بیان ژن‌های انتقال دهنده روی ۱-۴ موسوم به *Znt1*, *Znt2*, *Znt3* و *Znt4* در بافت هیپوکامپ موش صحرائی به عنوان یکی از بافت‌هایی که تراکم بالایی از روی را در خود جای داده، می‌باشد. موش‌های صحرائی به دو گروه استرس و کنترل تقسیم بندی شدند. از بافت هیپوکامپ RNA استخراج گردید و تغییرات بیان ژن‌های *Znt1*, *Znt2*, *Znt3* و *Znt4* به وسیله ریل تایم پی سی آر بررسی شد. نتایج نشان داد که بر اثر القای استرس بیان ژن *Znt1* افزایش بیان معنی‌دار داشته و در بیان ژن‌های مورد بررسی دیگر تغییر بیان معنی‌دار مشاهده نگردید. شناخت آن دسته از ژن‌های انتقال دهنده روی که بر اثر استرس بیان آن‌ها دستخوش تغییر می‌شود، می‌تواند مسیر یافتن درمان این بیماری را به کمک تنظیم سطح روی در بدن از طریق داروهای حاوی این عنصر ممکن سازد.

واژه های کلیدی: استرس، ژن انتقال دهنده روی، ریل تایم پی سی آر، موش صحرائی.

مقدمه

و هورمون‌های ناشی از استرس از محور آدرنال هیپوفیز هیپوتالاموس ترشح می‌گردند (۱). اگرچه استرس به عنوان بخشی از مکانیسم خود مراقبتی بدن، یک واکنش طبیعی محسوب می‌شود با این حال واکنش استرسی شدید و یا طولانی مدت می‌تواند برای بدن مضر باشد چرا که در عملکرد سیستم ایمنی، عصبی و غدد درون‌ریز اختلال ایجاد نموده (۲،۳) و باعث بروز عفونت‌ها، تومورها و یا پیشرفت بیماری‌هایی نظیر آسم و ماستوسیتوز می‌گردد (۴،۵). یک محرک پراسترس بسته به شدت آن

استرس به عنوان یک پدیده‌ی رفتاری معمول در بین جمعیت‌های انسانی به شمار می‌رود که می‌تواند سلامت افراد را به مخاطره بیاورد و از آن به عنوان مجموعه‌ای از عکس‌العمل‌های فیزیکی و روانی در برابر رخداد‌های غیر منتظره یاد می‌شود. فشارهای روانی، عفونت‌های باکتریایی و ویروسی، فشارهای کاری و بسیاری از عوامل دیگر می‌تواند موجب ایجاد واکنش استرسی در بدن گردد. استرس عمده‌تاً از طریق سیستم عصبی خود مختار تنظیم می‌شود

می‌نماید و در شرایط مختلف فیزیولوژیکی از انباشت روی در سیتوپلاسم جلوگیری می‌کند (۲۰). پروتئین ZnT2 نقش مهمی در انتقال روی به شیر مادر داشته و به طور عمده در روده، کلیه و بیضه موش صحرایی بیان شده و به ندرت در مغز بیان می‌شود (۲۱). پروتئین ZnT3 نقش اساسی در چندین مسیر سیگنالینگ عصبی در هیپوکامپ ایفا می‌کند (۲۲). هردو پروتئین ZnT2 و ZnT3 روی سیتوپلاسمی را به اجزای ویزیکولار منتقل نموده و باعث کاهش روی درون سلولی می‌شوند (۲۳). پروتئین ZnT4 با انتقال روی به دستگاه گلژی، وظیفه حفظ هموستازی روی در اندامک‌های درون سلولی مختلف در انواع بافت‌ها از جمله مغز را بر عهده دارد. همچنین در خلال فرآیند شیردهی، این پروتئین یون‌های روی را به شیر مادر منتقل می‌نماید (۲۴). با وجود مطالعات صورت گرفته در زمینه اثرات استرس بر مکانیسم‌های مختلف جانداران و نیز تاثیر قابل توجه عنصر روی در پیشگیری از اختلالات سیستم عصبی، تاکنون تأثیر بروز استرس بر بیان ژن‌های انتقال دهنده روی در سلول‌های هیپوکامپ مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین ما تغییرات بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* بر اثر دریافت استرس در بافت هیپوکامپ موش صحرایی نر را مورد مطالعه قرار داده‌ایم.

مواد و روش‌ها

حیوانات و گروه‌های مورد مطالعه

در این تحقیق، تعداد ۲۴ سر موش صحرایی سفید نر بالغ ویستار با میانگین وزنی 20 ± 25 گرم که از مرکز تکثیر حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه شد؛ مورد استفاده قرار گرفت. جهت سازگاری با محیط، حیوانات به مدت یک هفته قبل از شروع تحقیق به خانه‌ی حیوانات گروه زیست‌شناسی منتقل شدند. قبل و بعد از جراحی، حیوانات در قفس‌های انفرادی و با درجه‌ی حرارت 22 ± 23 درجه سانتیگراد، سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شده و هیچ‌گونه محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا نداشتند. حیوانات به صورت تصادفی به دو گروه (N=۶) شامل گروه کنترل (دریافت کننده سالین ۰/۹٪) و گروه دریافت کننده استرس به مدت ۹۰ دقیقه تقسیم بندی شدند. تمامی مراحل مطالعه حاضر با رعایت نمودن قوانین مربوط به نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت و با کد

و یا پیشرفت بیماری‌هایی نظیر آسم و ماستوسیتوز می‌گردد (۴،۵). یک محرک پراسترس بسته به شدت آن موجب ایجاد اختلال در سیستم‌های فیزیولوژیک ارگان‌های متعدد در بدن می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد که استرس نقش انکارناپذیری در بروز و یا تشدید بیماری‌هایی از قبیل فشار خون، بیماری‌های قلبی و عروقی، زخم معده، دیابت، سرکوب سیستم ایمنی بدن، افسردگی و فراموشی دارد (۱۰-۶).

یکی از ارگان‌هایی که بر اثر استرس تحت تأثیر قرار می‌گیرد هیپوکامپ است به گونه‌ای که سیستم‌های آدرنرژیک (۱۱)، کولینرژیک (۱۲) و برخی آمینو اسیدها (۱۳) در هیپوکامپ فعال می‌شوند. استرس، اضطراب، افسردگی و پریشانی به عنوان علل و نیز پیامدهای اختلال در عملکرد هیپوکامپ شناخته می‌شوند (۱۴،۱۵).

عنصر روی در بسیاری از فرآیندهای اصلی بیولوژیک مانند عملکرد سیستم‌های مربوط به ایمنی، رشد و بازسازی بدن نقش کلیدی دارد (۱۶). از این رو وجود میزان کافی روی درون سلولی برای ارگانیسم‌های حیاتی انسان ضروری می‌باشد. در پستانداران دو خانواده پروتئین انتقال دهنده‌ی روی *Znt* و *ZIP* سطح روی سلولی را در یک بازه‌ی محدود فیزیولوژیک کنترل می‌نمایند. این دو خانواده در خلاف جهت یکدیگر عمل می‌نمایند تا تردد روی را در ورود و خروج از سلول یا بخش‌های درون سلولی نظیر شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی، میتوکندری و وزیکول کنترل نمایند. از پروتئین‌های *Znt* تاکنون ده عضو شناخته شده که این وظایف را بر عهده دارند: اول- جابجایی روی از سیتوپلاسم به بخش‌های درون سلولی به منظور تامین روی مورد نیاز پروتئین‌های حاوی روی و ذخیره‌سازی روی درون سلولی. دوم- حرکت دادن روی سیتوپلاسمی به سمت فضای خارج سلول برای جلوگیری از مسمومیت ناشی از روی (۱۷). پروتئین‌های *ZIP* وظیفه‌ی انتقال روی از فضای خارج سلول به سیتوپلاسم یا در مواقعی که سطح روی سیتوپلاسمی پایین است از بخش‌های ذخیره‌سازی درون سلولی را به عهده دارد (۱۸). عملکرد مخالف این دو خانواده باعث ثبات همئوستازی روی در سلول می‌شود. اولین پروتئین خانواده *Znt* موسوم به *Znt1*، در غشای پلاسمای بافت‌های مختلف از جمله مغز قرار دارد (۱۹). این پروتئین یون‌های روی سیتوزولی را به فضای خارج سلولی منتقل

EE/96.24.3.88369/SCU.AC.IR توسط کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز مورد تایید قرار گرفته است.

القای استرس حاد حرکتی

برای القای استرس موش‌ها درون شبکه‌ای از لوله‌های درهم تنیده با اندازه $6 \times 4/5 \times 19/5$ سانتیمتر که توانایی حرکت نداشتند قرار داده شدند (دستگاه رسترینر). پس از ۹۰ دقیقه موش‌ها به ففس‌هایشان منتقل شدند. برای اطمینان از دریافت استرس در گروه مورد مطالعه، سطح هورمون کورتیزول در سرم موش‌ها قبل و بعد از استرس اندازه‌گیری گردید. به منظور تهیه سرم، موش‌ها با اتر بیهوش شده و خون‌گیری از قلب انجام گرفت. سپس نمونه خون را با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده تا سرم جدا شده و از آن برای اندازه‌گیری هورمون کورتیزول استفاده گردید. سطح هورمون کورتیزول توسط کیت EIA-36K3A3 ساخت شرکت Mono Bind آمریکا، در سرم اندازه‌گیری شد.

جمع آوری بافت و بررسی بیان ژن

دو ساعت پس از القای استرس، تمام موش‌ها با اتر بیهوش شده و بافت هیپوکامپ مغز استخراج گردید. مطابق پروتکل سازنده و به منظور استخراج RNA معرف ترایزول (شرکت Thermo Fisher Scientific، آمریکا) استفاده و RNA استخراج شده در دمای -80°C درجه سانتیگراد نگهداری گردید. اندازه‌گیری غلظت RNA برای هر نمونه با دستگاه نانودراپ 2000°C انجام پذیرفت. همچنین کیفیت RNA به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی واقع شد و باندهای ۲۸s، ۱۸s و ۵s مشاهده گردید. سپس RNA های استخراج با استفاده از DNaseI (شرکت Takara Bio، ژاپن) تیمار شد. علاوه بر

این از کیت معرف Primescript™ RT (شرکت Takara Bio، ژاپن) برای رونویسی معکوس RNA به cDNA استفاده گردید. ترکیبی از $1 \mu\text{L}$ هگزامر تصادفی ($50 \mu\text{M}$) و $1 \mu\text{L}$ پرایمر oligo(dT) ($50 \mu\text{M}$) به $1 \mu\text{g}$ RNA تیمار شده با DNase افزوده شد و آب بدون RNase تا رسیدن به حجم $5 \mu\text{L}$ اضافه گردید و در دمای 65°C به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. در ادامه $1 \mu\text{L}$ آنزیم ترانسکریپت معکوس ($1 \text{ U}/\mu\text{L}$) و $4 \mu\text{L}$ محلول بافر $5\times$ افزوده شد و آب بدون RNase تا رسیدن به حجم $20 \mu\text{L}$ اضافه گردید و برای سنتز cDNA در دمای 37°C به مدت ۲۵ دقیقه و پس از آن به منظور غیرفعال نمودن آنزیم در دمای 80°C به مدت ۵ ثانیه انکوبه گردید. سپس cDNA در دمای 20°C نگهداری شد. برای real-time PCR معرف‌های زیر با هم آمیخته شدند: $8 \mu\text{L}$ معرف SYBR Green I (شرکت Takara Bio، ژاپن)، $1 \mu\text{L}$ از هر دو پرایمر، $2 \mu\text{L}$ از cDNA و $3 \mu\text{L}$ آب فاقد DNase. برای انجام real-time PCR از دستگاه مدل ABI 7900HT استفاده گردید. برنامه دمایی عبارت بود از: 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ سیکل 95°C به مدت ۵ ثانیه و 60°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تفکیک 95°C به مدت ۱۵ ثانیه، 60°C به مدت ۶۰ ثانیه و 95°C به مدت ۱ ثانیه. در این مطالعه از اکتین بتا ($act-\beta$) به عنوان ژن خانه دار برای نرمالیزه کردن آنالیز بیان ژن استفاده شد. پرایمرهای مربوط به ژن‌های $act-\beta$ ، $Znt1$ ، $Znt2$ ، $Znt3$ و $Znt4$ از نمونه cDNA با استفاده از پایگاه اطلاعاتی www.genscript.com طراحی گردید که در جدول ۱ آمده است. به منظور اطمینان یافتن از صحت نتایج real-time RT-PCR، منحنی‌های ذوب ترسیم شد و دقت منحنی‌ها برای هر ژن مورد مطالعه و عدم تشکیل پرایمر دایمر بررسی گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

ژن	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	طول محصول PCR
<i>act-β</i>	TATCGGCAATGAGCGGTTC	AGCACTGTGTTGGCATAGAGG	۱۵۰ (bp)
<i>Znt1</i>	ACCAGGAGGAGACCAACAC	CTCAACTTCTCTGGCTCTGC	۸۵ (bp)
<i>Znt2</i>	GCACCTTCTCTCTCCATC	GTAAGGCTTCCACCATCC	۱۵۰ (bp)
<i>Znt3</i>	TCAGCACCTTCTCTTCTC	GTGGTAAGTAAGCGTCAGC	۱۹۱ (bp)
<i>Znt4</i>	AGTCGTTGATGAAGATAGAAGATG	CGAATGTGTTCAAGAGAGG	۱۶۸ (bp)

آنالیز آماری

داده‌های این مطالعه در قالب میانگین \pm انحراف استاندارد بیان شده و نمودارها توسط نرم افزار اکسل ترسیم گردیده است. به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن-های مورد مطالعه، نتایج ریل تایم توسط نرم افزار REST 2009 مورد آنالیز قرار گرفت و معناداری وابسته به $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. تغییرات بیان ژن با انجام محاسبات fold change و بر اساس رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ میزان تغییرات بیان ژن *Znt1*، *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* اندازه‌گیری گردید و آنالیز بیان ژن برای هر نمونه سه بار صورت گرفت.

نتایج

نمودارهای منحنی ذوب به دست آمده از دستگاه ریل تایم در شکل ۱ نشان داده شده است.

داده‌های بدست آمده نشان می‌دهد که بر اثر اعمال استرس حاد حرکتی به مدت ۹۰ دقیقه و سالی، ژن *Znt1* در هیپوکامپ افزایش بیان معنی‌دار داشته ($p = 0.0009$)؛ اما در بیان ژن‌های *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* در شرایط استرس نسبت به گروه کنترل تغییر بیان معنی‌دار مشاهده نگردید ($p = 0.1446$ ، $p = 0.1517$ و $p = 0.1068$) (شکل ۲).

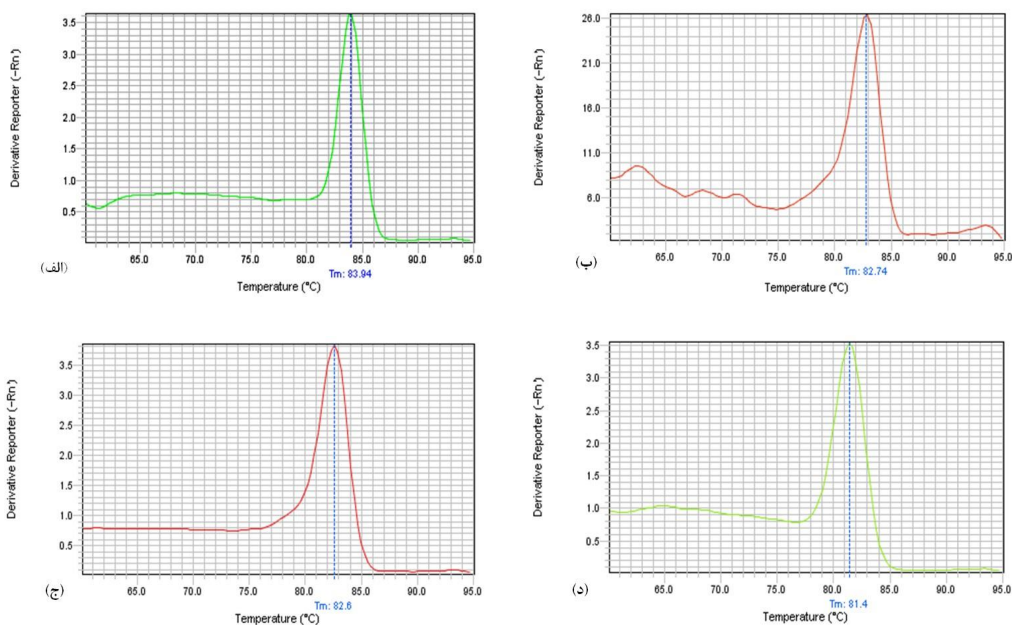
بحث

بیشترین مقدار عنصر روی در سیستم عصبی مرکزی در هیپوکامپ مغز وجود دارد (۲۵). بخش اعظمی از سیستم عصبی در هیپوکامپ بر اثر وقوع انواع استرس‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرد به گونه‌ای که میزان روی در این بافت دستخوش تغییر می‌گردد (۲۶). مطالعات نشان می‌دهد که استرس یکی از عوامل ایجاد یا پیشرفت بیماری‌هایی مانند سرطان، آسم، دیابت زخم معده و بروز انواع عفونت‌ها می‌باشد و مشکلاتی از قبیل اختلالات عصبی، افسردگی و اعتیاد با استرس در ارتباط هستند (۴، ۵، ۸، ۲۷ و ۲۸). از سوی دیگر بر اثر وقوع استرس حاد حرکتی میزان روی در سرم کاهش و در هیپوکامپ افزایش می‌یابد (۲۹). بر اثر دریافت داروی حاوی نانوذره روی اثرات مثبت

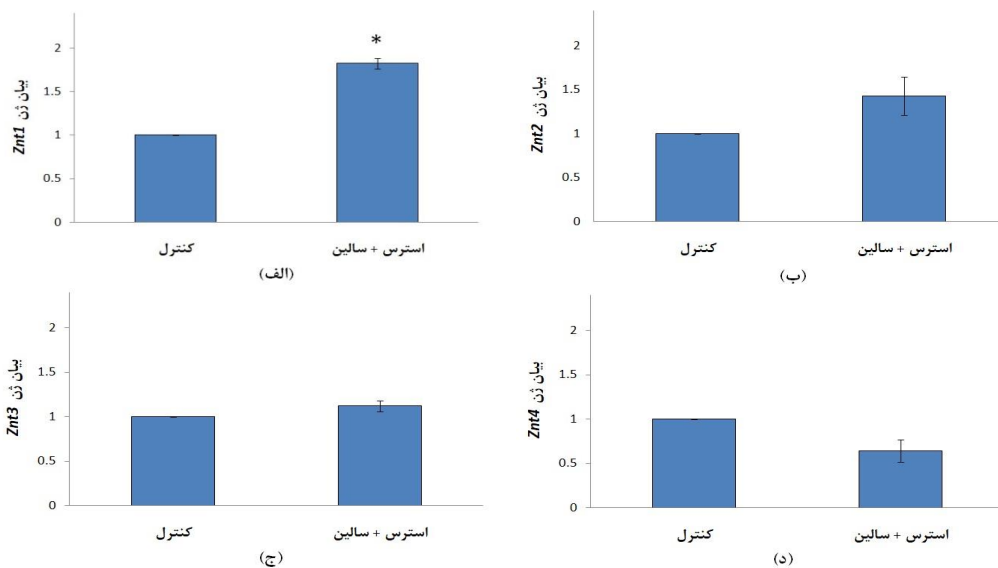
رفتاری در موش‌های صحرایی تحت استرس مشاهده گردیده است (۳۰). در این مطالعه اثرات اعمال استرس حاد حرکتی بر بیان چهار ژن انتقال دهنده روی در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که بر اثر استرس حاد حرکتی بیان ژن *Znt1* افزایش بیان داشته است. پیش از این کورتیکوسترون به عنوان عامل افزایش میزان روی در سلولی در هیپوکامپ شناخته شده که می‌تواند باعث تولید گونه‌ای اکسیژن غیرفعال در سلول‌های هیپوکامپ گردد (۳۱). با توجه به نقش پروتئین *Znt1* در پیشگیری از انباشت روی و انتقال آن از سیتوپلاسم به فضای خارج سلولی (۳۲)، بیان این ژن در شرایط استرس که قابل درک می‌باشد. به بیان دیگر سیستم عصبی مرکزی، در برابر افزایش میزان روی ناشی از القای استرس حاد حرکتی با افزایش بیان *Znt1* واکنش نشان داده تا از انباشت روی و بروز سمیت سلولی پیشگیری نماید.

همچنین بر اساس داده‌های این مطالعه بر اثر القای استرس حاد حرکتی، بیان ژن‌های *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* تغییر بیان معنی‌داری نداشته‌اند. در موش صحرایی، بیان ژن *Znt2* در مغز به ندرت گزارش شده است و بیشتر در اندام‌هایی نظیر روده، کلیه و بیضه بیان می‌شود (۲۱). مطالعه مشابهی نشان داد که بر اثر اعمال استرس فیزیکی ناشی از گرمایی بیان ژن *Znt3* در هیپوکامپ موش صحرایی تغییر نمی‌کند (۳۳)؛ در صورتی که برخی دیگر از اختلالات سیستم عصبی مرکزی نظیر آلزایمر با کاهش بیان ژن *Znt3* همراه می‌شود (۳۴). همچنین در بیماری ایسکمی گذرا، بیان ژن‌های *Znt1*، *Znt2* و *Znt4* در قشر مغز افزایش می‌یابد؛ در حالی که بیان ژن *Znt3* دستخوش تغییر معنی‌داری نمی‌شود (۳۵). در موش‌های تحت استرس، دریافت داروی حاوی روی موجب افزایش بیان ژن *Znt4* شده که در نتیجه آن بهبود رفتار استرسی مشاهده گردیده است (۳۶).



شکل ۱- منحنی‌های ذوب ترسیم شده که بیانگر عدم وجود پرایمر دایمر می‌باشد. الف) ژن *Znt1* با دمای ذوب °C ۸۳/۹۴، ب) ژن *Znt2* با دمای ذوب °C ۸۲/۷۴، ج) ژن *Znt3* با دمای ذوب °C ۸۲/۶۰، د) ژن *Znt4* با دمای ذوب °C ۸۱/۴۰.



شکل ۲- نمودار تغییر بیان ژن‌های الف) *Znt1*، ب) *Znt2*، ج) *Znt3* و د) *Znt4* در گروه استرس حاد حرکتی نسبت به گروه کنترل

استرس پیش از این گزارش شده اما در این بررسی بیان ژن‌های *Znt2*، *Znt3* و *Znt4* بر اثر استرس حاد حرکتی دستخوش تغییر معنی‌داری نگردیدند. گمان می‌رود بررسی اثرات استرس بر تغییر بیان ژن‌های انتقال دهنده

در مجموع نتایج به دست آمده بیان می‌دارد که استرس حاد حرکتی موجب تغییر بیان ژن *Znt1* در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر می‌شود. اگر چه اختلال در هموستازی روی در سیستم عصبی مرکزی ناشی از

نویسندگان این مقاله مراتب فدردانی خود را از مسئولین محترم آزمایشگاه ژنتیک و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز و نیز آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک نرگس اهواز اعلام می‌نمایند.

روی شامل تمامی اعضای خانواده Znt و ZIP. امکان درمان این بیماری را به وسیله داروهای حاوی روی فراهم می‌سازد.

تقدیر و تشکر

منابع مورد استفاده

- Turner, A. I., Smyth, N., Hall, S. J., Torres, S. J., Hussein, M., Jayasinghe, S. U., Ball, K., Clow, A. J., 2020. Psychological stress reactivity and future health and disease outcomes: A systematic review of prospective evidence. *Psychoneuroendocrinology* 114: 104599.
- Starkie, R. L., Hargreaves, M., Rolland, J., Febbraio, M.A., 2005. Heat stress, cytokines, and the immune response to exercise. *Brain Behav Immun* 19(5): 404-412.
- Bae, Y. S., Shin, E. C., Bae, Y. S., Eden, W. V., 2019. Stress and Immunity. *Front Immunol* 10: 245.
- Reiche, E. M., Morimoto, H. K., Nunes, S. M., 2005. Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and progression of cancer. *Int Rev Psychiatry* 17(6): 515-527.
- Theohardides, T. C., Phil, M., 2020. The impact of psychological stress on mast cells. *Ann Allergy Asthma Immunol* 125(4): 388-392.
- Roy, M. P., Kirschbaum, C., Steptoe, A., 2001. Psychological cardiovascular and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in young men. *Psychoneuroendocrinology* 26: 375-391.
- Yadin, E., Thomas, E., 1996. Stimulation of the lateral septum attenuates immobilization-induced stress ulcers. *Physiol Behav* 59(4-5): 883-886.
- Fitzpatrick, F., Christedd, N., Durant, S., Dardenne, M., Nunez, E. A., Homo-Delarche, F., 1992. Glucocorticoids in non obese diabetic (NOD) mouse Basal serum levels, effect of endocrine manipulation and immobilization stress. *Life Sci* 50(14): 1063-1069.
- Purret, S. B., 2001. Quantitative aspects of stress-induced immunomodulation. *Int J ImmunoPharmacol* 1(3): 507-520.
- Gareri, P., Falconi, U., Fazio, P., De Sarro, G., 2000. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Prog Neurobiol* 61(4): 353-396.
- Abercrombie, E. D., Keller, R. W., Zigmond, M. J., 1988. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience* 27(3): 897-904.
- Lai, H., Zabauska, J., Horita, A., 1986. Sodium-dependent, high-affinity choline uptake in hippocampus and frontal cortex of the rat affected by acute restraint stress. *Brain Res* 372(2): 366-369.
- Gilad, G. M., Gilad, V. H., Wyatt, R. J., Tizabi, Y., 1990. Regionselective stress-induced increase of glutamate uptake and release in rat forebrain. *Brain Res* 525(2): 335-338.
- Jankord, R., Herman, J. P., 2008. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann NY Acad Sci* 1148: 64-73.
- Barkus, C., McHugh, S. B., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N. P., Bannerman, D. M., 2010. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol* 626(1): 49-56.
- Vallee, B. L., Falchuk, K. H., 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73(1), 79-118.
- Palmiter, R. D., Huang, L., 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* 447(5), 744-751.
- Eide, D. J., 2004. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch* 447(5): 796-800.
- Downey, A. M., Hales, B. F., Robaire, B., 2006. Zinc transport differs in rat spermatogenic cell types and is affected by treatment with cyclophosphamide. *Biol Reprod* 95(1): 22.
- Jobarteh, M. L., Mearle, H. J., Holtrop, G., Sise, E. A., Prentice, A. M., Moor, S. E., 2017. mRNA levels of placental iron and zinc transporter genes are upregulated in gambian women with low iron and zinc status. *J Nutr* 147(7): 1401-1409.
- Lee, S., Hennigar, S. R., Alam, S., Nishida, K., Kelleher, S.L., 2015. Essential role for zinc transporter 2 (ZnT2)-mediated zinc transport in mammary gland development and function during lactation. *J Biol Chem* 290(21): 13064-13078.
- Lee, J. Y., Kim, J. S., Byun, H. R., Palmiter, R. D., Koh, J. Y., 2011. Dependence of the histofluorescently reactive zinc pool on zinc transporter-3 in the normal brain. *Brain Res* 1418: 12-22.
- Gower-Winter, S. D., Levenson, C. W., 2012. Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior. *Biofactors* 38(3): 186-193.
- McCormick, N. H., Kelleher, S. L., 2012. ZnT4 provides zinc to zinc-dependent proteins in the trans-Golgi network critical for cell function and Zn export in mammary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 303(3): 291-297.

25. Portbury, S. D., Adlard, P. A., 2017. Zinc signal in brain diseases. *Int J Mol Sci* 18(12): 2506.
26. Bafaro, E., Yuting, L., Yan, X., Dempski, R. E., 2017. The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2(1): 17029.
27. Olesen, R. H., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Smidt, K., Rungby, J., Larsen, A., 2016. Obesity and age-related alterations in the gene expression of zinc-transporter proteins in the human brain. *Transl Psychiatry* 6(6): e838.
28. Cieřlik, K., Sowa-Kucma, M., Ossowska, G., Legutko, B., Wolak, M., Opoka, W., Nowak, G., 2011. Chronic unpredictable stress-induced reduction in the hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is antagonized by zinc treatment. *Pharmacol Rep* 63(2): 537-543.
29. Kozłowska, K., 2017. A stress-system model for functional neurological symptoms. *J Neurol Sci* 383: : 151-152.
30. Torabi, M., Kesmati, M., Pourreza, N., Varzi, H. N., Galehdari, H., 2018. Neurobehavioral and biochemical modulation following administration of MgO and ZnO nanoparticles in the presence and absence of acute stress. *Life Sci* 203: 72-82.
31. Zheng, Y., Huang, J., Tao, L., Shen, Z., Li, H., Mo, F., Wang, X., Wang, S., Shen, H., 2015. Corticosterone increases intracellular Zn(2+) release in hippocampal HT-22 cells. *Neurosci Lett* 588: : 172-177.
32. Lehvy, A. I., Horev, G., Golan, Y., Shammai, Y., Assaraf, Y. G., 2019. Alterations in ZnT1 expression and function lead to impaired intracellular zinc homeostasis in cancer. *Cell Death Discov* 5: 144.
33. Ni, H., Shui, Q. X., 2008. Study of Fos, heat stress protein-70 and zinc transporter 3 mRNA expression in weanling rats following heat stress and febrile convulsion. *Chin J Emerg Med* 17(1): 41-44.
34. Adlard, P. A., Parncutt, J. M., Finkelstein, D. I., Bush, A. I., 2010. Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice. a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? *J Neurosci* 30(5): 1631-1636.
35. Aguilar-Alonso, P., Martinez-Fong, D., Pazos-Salazar, N. G., Brambila, E., Gonzalez-Barrios, J. A., Mejorada, A., Flores, G., Millan-Perezpeña, L., Rubio, H., Leon-Chavez, B. A., 2008. The increase in zinc levels and upregulation of zinc transporters are mediated by nitric oxide in the cerebral cortex after transient ischemia in the rat. *Brain Res* 1200: : 89-98.
36. Rafał-Ulinska, A., Poleszak, E., Szopa, A., Serefko, A., Rogowska, M., Sowa, I., 2020. Imipramine influences body distribution of supplemental zinc which may enhance antidepressant action. *Nutrients* 12(9): 2529.