فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال یازدهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۸ ص ۵۲-۴۳

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر داروی کلردیازپوکساید در زمان بارداری بر بیان ژنbad در هیپوکمپ نوزادان موش

امین دیناروند[۱]، مهرداد هاشمی [۲*]، رسول دیناروند[۳]، شبنم موثقی[۴]، مجتبی جعفری نیا[۱]

[۱] گروه ژنتیک،دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، مرودشت، ایران
[۲] گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۳] گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴] گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[*] Email: mhashemi@iautmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۶

چکیده

کلرودیازپوکساید یک داروی ضد اضطراب است که معمولا توسط جوانان و زنان باردار برای کاهش اضطراب و کنترل پره اکلامپسی و اکلامپسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. برخی مطالعات نشان داده که این دارو باعث اختلال در عملکرد سیستم عصبی کولینرژیک می‌شود. با توجه افزایش بیان ژن bad متعاقب آسیب سلولی در این مطالعه اثر مصرف کلرودیازپوکساید در دوران بارداری بر روی بیان ژن bad در هیپوکمپ نوزادان موش صحرایی بررسی شد. در این مطالعه ۹ رأس موش ماده نژاد ویستار باردار شده و به طور تصادفی به سه گروه: کنترل، آزمایشی (تزریق داخل صفاقی روزانه کلردیازپوکساید با دوز 10 mg/kg به مدت ۲۱ روز) و حامل (سالین) تقسیم شدند. ۲ هفته پس از تولد، مغز نوزادان از جمجمه خارج و بیان ژن پروآپوپتوتیک badمورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان ژن با استفاده از نرم افزار آماری Rest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و سطح معنی‌داری $P<0.05$ در نظر گرفته شد. بیان ژن پروآپوپتوتیک bad در گروه آزمایشی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. نتایج مطالعه حاکی از آن بود که دریافت کلرودیازپوکساید در دوران بارداری می‌تواند موجب آسیب نورونی در هیپوکمپ نوزادان موش صحرایی نژاد ویستار گردد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، کلرودیازپوکساید، موش صحرایی، هیپوکمپ، ژن bad.

مقدمه

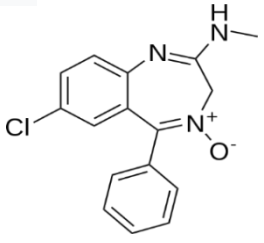
کلردیازپوکساید از گروه بنزودیازپاین‌ها و جزء داروهای مسکن و خواب‌آور می‌باشد که تحت نام‌های مختلف تجاری (لیبریوم، لیبراکس، سیلیبرین و ...) به فروش می‌رسد (شکل ۱). بنزودیازپین‌ها یکی از شایع‌ترین داروهای ضد اضطراب هستند که

در ایالات متحده آمریکا توسط زنان در سن باروری و زنان باردار برای کاهش اضطراب و کنترل پره اکلامپسی و اکلامپسی در سه ماهه آخر بارداری تجویز می‌شوند [۱,۴]. ترکیبات بنزودیازپین به سه دسته عمده تقسیم می‌شوند: طولانی اثر، نظیر ترکیبات دیازپام، کلردیازپوکساید، فلورازپام، هالازپام، و پارازپام، متوسط اثر، مانند ترکیبات کلونازپام، لورازپام و کوازپام و کوتاه اثر شامل ترکیبات آلپرازولام، اگزازپام ومیدازولام. شایع‌ترین بنزودیازپین‌های مورد استفاده در ایالات متحده دیازپام، کلردیازپوکساید، کلونازپام، لورازپام، آلپرازولام می باشد [۱۲].

این داروها در سطح لیمبیک، تالاموس و هیپوتالاموس از سیستم عصبی مرکزی تأثیر می‌گذارند تا اثرات آرام بخش و خواب آور، کاهش اضطراب، ضدتشنج و شل کردن ماهیچه‌های اسکلتی را ایجاد کنند. هیپوکمپ متعلق به سیستم لیمبیک بوده و نقش مهمی در ثبات اطلاعات از حالت حافظه کوتاه مدت به حافظه بلندمدت و مسیریابی فضایی دارد. سایت‌های اتصال خاص با میل ترکیبی بالا برای بنزودیازپین‌ها در سیستم اعصاب مرکزی تشخیص داده شده است. با اتصال بنزودیازپاین‌ها به این گیرنده‌ها، در نتیجه‌ی افزایش جریان یون کلر، اثرات مهاری گابا تسهیل می‌شود [۳].

شکل ۱. مشخصات شیمیایی کلردیازپوکساید

فرمول شیمیایی	$C_{16}H_{14}ClN_3O$
وزن مولکولی	299.75 g/mol



این دارو در زمان بارداری تنها زمانی باید مصرف شود که فوایدش بر عوارضش غالب باشد. در صورتی که با پایین‌ترین دوز موثر و کوتاه‌ترین طول درمان مصرف شود به طور قابل توجهی باعث کاهش عوارض دارو می‌شود. از مصرف بنزودیازپاین‌ها در ۳ ماهه اول بارداری باید اجتناب شود. مصرف کلردیازپوکساید و دیازپام نسبت به سایر بنزودیازپاین‌ها در دوران بارداری بی‌خطرتراست. تمام دسته‌بندی‌های مهم ترکیبات بنزودیازپین می‌توانند در شیر ترشح شوند و یا به راحتی از جفت عبور کنند. مقدار ترشح دارو بستگی به ویژگی‌های خاص دارو، پروتئین اتصالی پلاسما، یونیزاسیون، درجه چربی دوستی، وزن مولکولی، نیمه عمر، غلظت دارو در خون مادر، فراهمی زیستی خوراکی، و فارماکوکینتیک دارد. خطرات احتمالی بسیاری برای جنین در زمان مصرف داروهای ضد اضطراب توسط زنان باردار به خصوص در ٤٢ روز اول دوران بارداری وجود دارد. شروع اثرات تراتوژن ممکن است بلافاصله و یا با تاخیر باشد و علایم ممکن است در عرض چند روز یا ۳ هفته بعد از تولد ظاهر شوند و تا چندین ماه باقی بمانند. بیشترین خطر ابتلا به ناهنجاری زمانی است که جنین بین دو تا هشت هفته پس از لقاح قرار گرفته است [۱۳,۲].

اگر چه هدف اصلی داروهایی که در طی دوران بارداری استفاده می‌شوند مادر است با این وجود جنین یک دریافت کننده ناخواسته است و تأثیرات منفی بعضی از این داروها بر روی جنین از مشکلات اصلی بارداری‌ها می‌باشد. در مورد اختلالات عصبی ناشی از مصرف داروهای گروه بنزودیازپاین‌ها در دوران بارداری مطالعات کمی وجود دارد و اثر آن‌ها بر روی رشد و نمو کودکانی که در دوران جنینی در

معرض دارویی از جمله کلردیازپوکساید قرار گرفته‌اند همچنان نامشخص می‌باشد. با این حال طبق مدل‌های حیوانی تا حدودی مشخص می‌باشد که در صورت در معرض قرار گرفتن جنین در برابر بنزودیازپاین‌ها احتمال اثرات طولانی مدت بر روی سیستم عصبی و عملکرد آن‌ها وجود دارد [۸]. از ژن‌های مهم پیش برنده آپوپتوز می‌توان بهbad اشاره کرد[۸,۷]. هدف این تحقیق بررسی تغییر بیان ژن bad ناشی داروی کلردیازپوکساید در زمان بارداری در هیپوکمپ نوزادان موش می باشد.

مواد و روش‌ها

گروه‌های حیوانات

حیوانات ماده مرتب با تهیه واژینال اسمیر بررسی شده و در فاز استروس در قفس‌های جداگانه جفت‌گیری انجام شده و پس از مشاهده واژینال پلاک حیوان بمدت ۲۱ روز نگهداری شد.

- گروه شاهد: هیچ تیماری برای حیوان انجام نشد.
- گروه آزمایشی: داروی کلردیازپوکساید با دوز انتخابی 10 mg/kg هر روز در طول بارداری (۲۱ روز) بصورت داخل صفاقی IP به حیوان تزریق شد.
- گروه حامل: نرمال سالین(1cc) هر روز در طی دوره بارداری به حیوان تزریق شد.

۲ هفته پس از بدنیا آمدن نوزادان، حیوانات توسط پنتوباربیتال سدیم (40mg/kg) بیهوش و ذبح شده و هیپوکامپ برای بررسی‌های مولکولی از سایر بافت‌های مغزی جداشد.

استخراج RNAو سنتز cDNA

پس از برداشت بافت موردنظر از هیپوکامپ رت و نگهداری در ۷۰- درجه سانتی‌گراد، ابتداRVA و دیگر اجزای سلولی از محاصره غشایی خارج شد و سپس به روش ترایزول RNA استخراج و برای صحت استخراج RNA از طریق اسپکتروسکوپی کمیت RNA مورد ارزیابی قرار گرفته شد. غلظت RNA توسط دستگاه Nanodrop در طول موج ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. طیف جذبی 260/280 A خلوص (عدم آلودگی با پروتئین) و 260/230 A خلوص (عدم آلودگی با فنل و کلروفرم) نمونه‌هایی که 260/280 A نمونه‌هایی که $260/280 \geq 1/8$ بود برای سنتز cDNA انتخاب به فریزر ۸۰- انتقال داده شدند .

برای ساخت مستر جهت سنتز cDNA طبق دستور کیت از مواد با غلظت‌های ذکر شده مطابق جدول ۱ استفاده شد:

پرایمرها به کمک نرم‌افزار Gene runner و Primer 3 طراحی شده و در Ncbi , BLAST شد و از نظر اختصاصی بودن چک شدند (جدول **۲**).

RT-PCR

- ابتدا cDNA با نسبت ۱/۵ با DDW به غلظت ۰/۲ $P\,mol/\mu L$ رقیق شد. Master mix به cDNA و پرایمر مطابق جدول ۳ اضافه شدند. پلیت مورد نظر را در دستگاهstep one plus Real Time قـرار داده شد. عملکرد و اختصاصت پرایمرها چک شدند. ژن bad به عنوان ژن هدف و gapdh به عنوان ژن مرجع انتخاب شدند. واکنش RT-PCR برای ژن هدف و مرجع در نمونه‌های کنترل وتست به صورت سه تایی در پلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد .

برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR Real Time مطابق جدول ٤ انجام گرفت.

جدول ۱: مواد وحجم لازم جهت سنتزcDNA (Takara)

ماده	مقدار	غلظت نهایی
5X Primescript^{TM} Buffer (for Real time)	۲ μl	۱X
Prime ScriptTM RT Enzyme Mixl	۰/۵ μl	
Oligo dT primer (50 μM)	۰/۵ μl	۲۵Pmol
Random 6 mers (100 μM)	۰/۵ μl	۵۰Pmol
Total RNA		
Rnase Free H_2o		
Total	۱۰ μl	

جدول ۲: توالی پرایمر طراحی شده bad و gapdh

ژن	توالی پرایمر	دمای ذوب	درصدCG
bad-F	GGAGCATCGTTCAGCAGCAG	58.0	**60.0**
bad-R	CCATCCCTTCATCTTCCTCAGTC	57.6	**52.2**
gapgh F	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	57.8	**50.0**
gapdh R	CATACTCAGCACCAGCATCACC	56.7	**54.6**

جدول۳. اجزای لازم برای واکنش Real time PCR (takara) (برای دو واکنش)

ماده	مقدار	غلظت نهایی
SYBR premix EX Taq^{TM} 11(2X)	۲۵ μl	۱X
PCR Forward primer (10 μM)	۲ μl	۰/٤ μM
PCR Reverse primer (10 μM)	۲ μl	۰/٤ μM
Rox Reference Dye or Dye 11 (50 X)	۱ μl	۱X
RT reaction solution (cDNA solution)	٤ μl	۲
dH_2o (Sterillized distilled water)	۱٦ μl	
Total	۵۰ μl	

جدول٤: برنامه زمانی ودمایی PCR

مرحله اول

دما	زمان	چرخه
۹۵°	۱۵′	۱
۹۵°	۱۵″	۴۰ تا ۲
۶۴	۶۰″	

مرحله دوم

دما °C	زمان (ثانیه)
۹۵	۱۵
٦۰	٦۰
۹۵	۱۵

در مرحله دوم منحنی ذوب تشکیل شد. مراحل فوق برای عدم آلودگی و سنجش عملکرد صحیح پرایمرها انجام شد و پس از اطمینان از مواد مذکور هر کدام از نمونه‌ها به صورت جداگانه با پرایمر جهت بررسی بیان ژن در چاهک‌ها در دستگاه قرار گرفتند. از NTC[1] (کنترل منفی) برای تائید عدم آلودگی درحین انجام آزمایش استفاده شد. کنترل منفی فاقدcDNA بود.

برای سنجش پرایمرها هر کدام از آن ها با یک نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند و پس از اتمام واکنش Real Time PCR برای اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها و نمایش طول قطعات تکثیر شده، نمونه‌ها به ژل پلی‌آکریل آمید منتقل شدند.

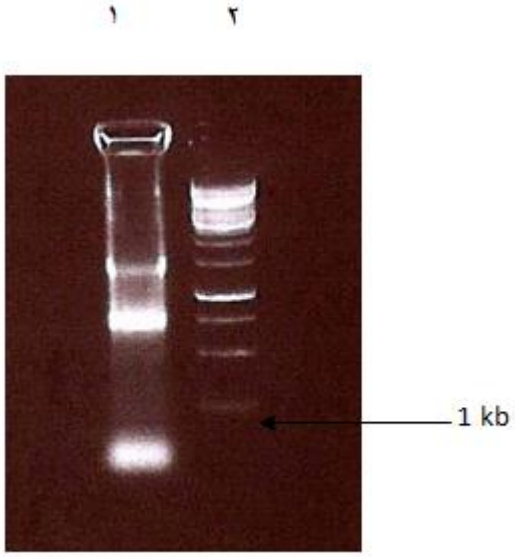
تحلیل آماری داده‌ها

تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری rest جهت مقایسه بیان و نسبت‌ها انجام شد.

نتایج

تایید استخراج RNA

شکل۲ نشان دهنده الکتروفورز از RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ می‌باشد.



شکل ۲. الکتروفورز از RNA استخراج شده ۱= RNA ۲= مارکر 1kb

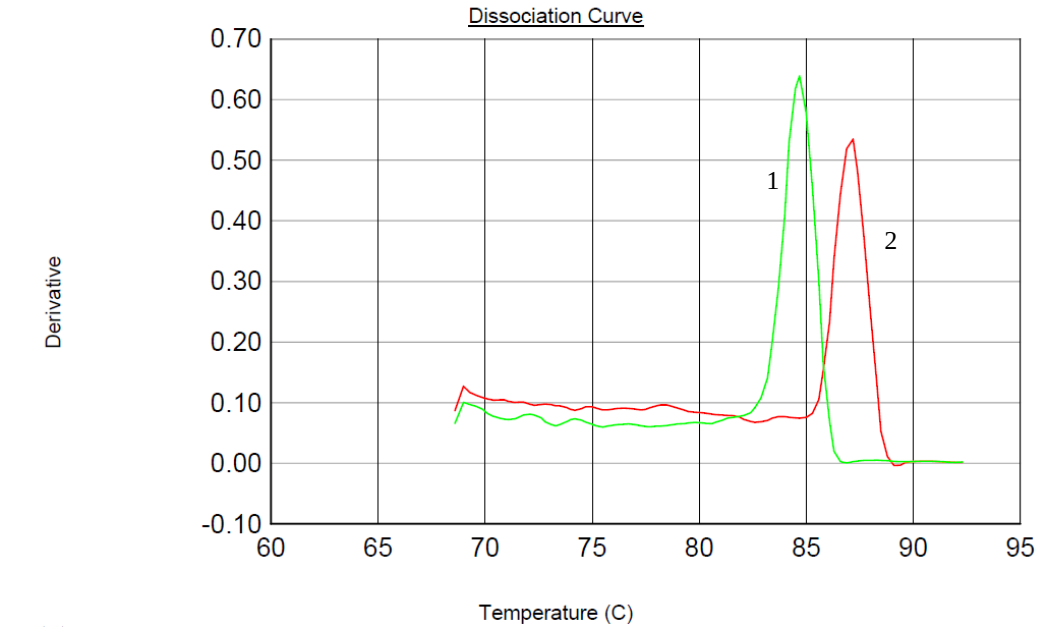
آنالیز منحنی ذوب (تفکیک)

منحنی ذوب بیانگر محصولاتی است که طی واکنش PCR تکثیر می‌شوند. بدلیل تک قله ای بودن تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب (تفکیک) تعیین شد (نمودار ۱).

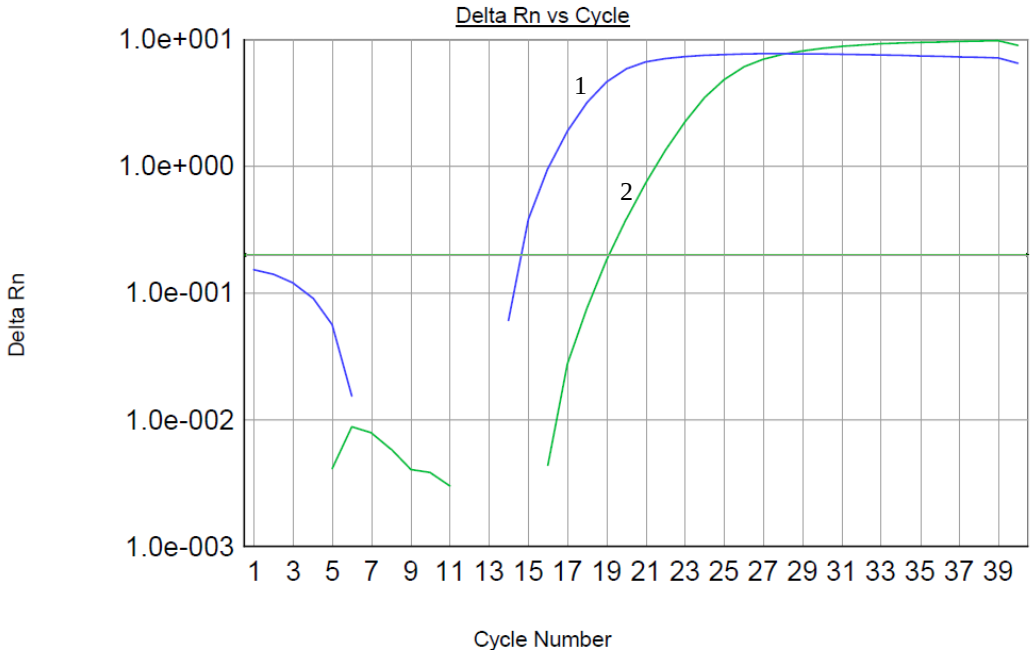
بیان ژن bad و آنالیزهای آماری

نمودار ۳ نتیجه بیان ژن‌های bad درگروه‌های مختلف نسبت به کنترل را نشان می دهد.

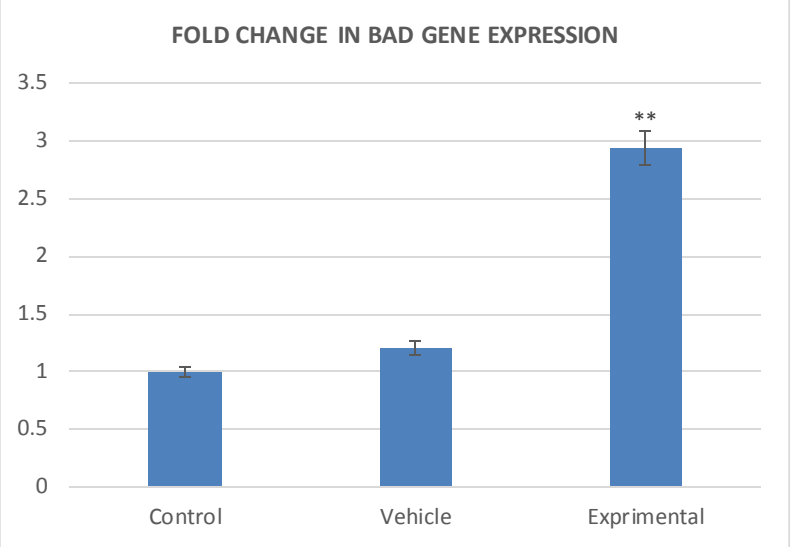
[1] Negative Test control



نمودار ۱: منحنی ذوب مربوط به ژن bad (۱) در مقایسه با ژن مرجع gapdh (۲)



نمودار ۲: منحنی تکثیر ژن‌های bad[2] و gapdh[1]



نمودار ۳: نسبت بیان ژن bad درگروه های مختلف نسبت به کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

پدیده مرگ سلول با توجه به اهمیتی که در تکامل سیستم عصبی دارد در بسیاری از بیماری‌های نورو دژنراتیو موثر می‌باشد. بسیاری از بیماری‌های نورولوژیکی بوسیله کاهش تدریجی گروه خاصی از نورون‌ها ایجاد شده و اختلالاتی در حرکت و عمل سیستم CNS ایجاد نموده است و از آن جمله می‌توان بیماریهای مانند پارکینسون و آلزایمر را نام برد. فاکتورهای زیادی مانند اکسیداتیواسترس هموستازی نامناسب Ca^{2+}، عدم کارایی میتوکندری همچنین فقدان یا نقص واکنش‌های متقابل فاکتورهای نوروتروفیک بین نورون‌ها و بافت‌های هدفشان و یا ترکیبی از این عوامل در ایجاد بیماریهای فوق مؤثرند. [۸] آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هوموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های T خود واکنشگر نقش دارد هرگونه اختلال در روند آپوپتوز،می تواند منجر به بیماری می‌شود که ممکن است ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد و منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می‌گردد. بالعکس افزایش غیر طبیعی مرگ سلولی نیز در بیماری‌هایی نظیر اختلالات نورودژنراتیو و ایدز دیده می‌شود آپوپتوز دارای دو مسیر اصلی داخلی و خارجی است. مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوز از مسیرهای اصلی در القائ آپوپتوز می‌باشد. میتوکندری هم در حیات و هم در مرگ سلولی دخالت دارد. در پاسخ به سیگنال‌های مرگ سلولی، نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری باعث بیان متفاوت پروتین‌های خانواده Bcl-2 و آزاد شدن مولکول‌های پروآپوپتوتیک از قبیل فاکتور القاء کننده آپوپتوز(AIF)، سیتوکروم C، Smac/DIABLO و اندونوکلئاز G از فضای بین دو غشاء میتوکندری به داخل سیتوپلاسم می‌شوند

کلردیازپوکساید از نظر ساختمانی بسیار شبیه دیازپام است و طبق مطالعات دیازپام و اگزازپام باعث ایجاد آنومالی بر روی موش می‌شوند. با توجه به

شباهت‌های ساختمانی و عملکردی کلردیازپوکساید با دیازپام می‌توان به این نتیجه رسید که احتمالاً کلردیازپوکساید نیز از طریق نورورسپتورها می‌تواند باعث آسیب به مغز موش نوزاد شود [۱۰].

بنزودیازپاین‌ها از جمله کلردیازپوکساید به اجزاء مولکولی گیرنده $GABA_A$ که در غشاهای نورونی دستگاه عصبی مرکزی وجود دارند متصل می‌شوند و این گیرنده یونی به عنوان کانال یون کار عمل می‌کند و توسط GABA فعال می‌شود. طبق مطالعات الکتروفیزیولوژیک بنزودیازپاین‌ها باعث تقویت مهار به واسطه GABA در تمام سطوح محور عصبی شامل طناب نخاعی، هیپوتالاموس، هیپوکامپ، جسم سیاه، قشر مخچه و قشر مغز می‌گردند [۱۱]. طبق مطالعات انجام شده فعال شدن رسپتور GABA در ایجاد آپاپتوز نقش دارد (۱۲) پس می‌توان نتیجه گرفت که فعال شدن GABA توسط بنزودیازپاین‌ها از طریق ایجاد آپاپتوز در سلول‌های عصبی مغز موش نوزاد باعث آسیب نورونی می‌شود[۱۶].

بررسی‌ها نشان داده که مصرف بنزودیازپین‌ها در نوزاد انسان موجب بروز myoclonus، صرع و حرکات غیر طبیعی می‌گردد[۴] در مطالعه Hartz و همکاران که بصورت Cohort انجام شده بود از میان ۵۰۲۸۲ مادر بارداری که تحت بررسی و پیگیری بودند ۲۵۷ مادر باردار در طی ٤ ماه اول بارداری از کلردیازپوکساید استفاده کرده بودند و ٤۸۳ مادر در ماه‌های ۵ به بعد بارداری از این دارو استفاده کرده بوند. نتایج این مطالعه نشان داد که ریسک مالفورماسیون، مرده‌زایی و مرگ تا ٤ سالگی در نوزادان این مادران افزایش نیافته بود و همچنین طبق امتیازات ناشی از بررسی وضعیت موتور (در ۸ ماهگی) و IQ (در ٤ سالگی) هیچ گونه آسیب مغزی وجود نداشت[۶].

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، یک فرآیند فیزیولوژیک پیچیده می‌باشد که با القای استرس‌های درون سلولی می‌تواند ایجاد شود. .خانواده پروتئینی Bcl-2 یک تنظیم‌کننده مهم در این فرآیند می‌باشدکه خود از دو گروه پروتئین‌های آنتی و پروآپوپتوتیک تشکیل می‌شود. در بین اعضاء خانواده پروتئینی Bcl-2، مولکول Bad جزء اعضاء پروآپوپتوتیک این خانواده پروتئینی به حساب که با توجه به نقش کلیدی فرآیند آپوپتوز، فعالیت صحیح و تنظیم شده آن برای عملکرد بسیاری از ارگان‌های بدن و به خصوص جهت حفظ تعامل بین مغز و کبد ضروری می‌باشد. مطالعات نشان داده است که کبد نقش مهمی در فراهم آوردن مواد غذایی و از بین بردن مواد سمی مانند نوروتوکسین دارد [۵].

در مطالعه حاضر روزانه ۱۰ mg/kg داروی کلردیازپوکساید در طی تمام طول بارداری به موش صحرایی داده شد و یافته ها افزایش بیان ژن Bad در هیپوکامپ این نوزادان نسبت به گروه شاهد و حامل را نشان داد در نتیجه مصرف این دارو در طی بارداری می‌تواند باعث آسیب نورونی در نوزادان شود. با توجه به‌مطالب فوق‌الذکر احتمالاً کلردیازپوکساید از طریق تأثیر بر روی رسپتورهای خاص و تغییرات در سطح کورتیکواسترون‌ها و نوراپی نفرین طی دوران رشد عصبی باعث تخریب نورونی می‌شود همچنین فعال شدن رسپتور GABA توسط کلردیازپوکساید و نقش ثابت شده GABA در آپاپتوز را می‌توان به عنوان مکانیسم دیگری در نحوه تأثیر داروی کلردیازپوکساید بر روی مغز موش نوزاد در نظر گرفت.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق روزانه یک دوز کلردیازپوکساید به میزان 10 mg/kg طی دوران بارداری با افزایش ژن bad می‌تواند موجب آسیب نورونی در هیپوکامپ نوزادان که نقش به سزایی در برنامه ریزی شناختی رفتاری پیچیده و حافظه دارد، گردد.بنابراین پیشنهاد می‌شود در مورد مصرف این دارو جهت کاهش اضطراب دوران بارداری بررسی‌های بیشتری به عمل آید زیرا به نظر می‌رسد استفاده از این دارو در دوران بارداری موجب ایجاد صدمات نورونی به مغز نوزاد می‌شود.

منابع

[1] Alvarez J.A., Emory E. 2006,Executive function and the frontal lobes: a meta-analytic review. Neuropsychology review, 16 (1):17-42.

[2] Cecil K.M., Brubaker C.J., Adler C.M., Dietrich K.N., Altaye M., Egelhoff J.C., et al. 2008,Decreased Brain Volume in Adults with Childhood Lead Exposure. PLoS Med, 5 (5): e112.

[3] Dorph-Petersen K., Pierri J., Perel J., Sun Z., Sampson A., Lewis D. 2005,The influence of chronic exposure to antipsychotic medications on brain size before and after tissue fixation: a comparison of haloperidol and olanzapine in macaque monkeys. Neuropsychopharmacology, 30 (9):1649-1661.

[4] Glykys J., Staley K.J. 2015,Diazepam effect during early neonatal development correlates with neuronal Cl^- . Annals of Clinical and Translational Neurology, 2 (12): 1055-1070.

[5] Hashemi I.,Entezari M.,Zarindast M.R. 2017, Investigating the gene expression level of Bad and Bcl-xl following cholestasis and curcumin treatment in the striatum area of male rat. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University Tehran medical branch, 27 (4): 244-251

[6] Hartz S. C., Heinonen O. P., Shapiro S., Siskind V., Slone D. 1975, Antenatal exposure to meprobamate and chlordiazepoxide in relation to malformations, mental development, and childhood mortality. New England Journal of Medicine,292(14):726-728.

[7] Hassanzadeh P., Hassanzadeh A. 2009, Effects of psychotropic drugs on nerve growth factor protein levels in the rat brain. Physiology and Pharmacology, 13 (3): 244-52.

[8] Iqbal M., Aneja A., Fremont W. 2003, Effects of chlordiazepoxide (Librium) during pregnancy and lactation. Conn Med, 67 (5): 259-262.

[9] Iqbal M., Sobhan T., Ryals T. 2002, Effects of commonly used benzodiazepines on the fetus, the neonate, and the nursing infant. Psychiatr Serv, 53 (1): 39-49.

[10] Mander B. A., Rao V., Lu B., Saletin J.M., Lindquist J. R., Ancoli-Israel S. 2013, Prefrontal atrophy, disrupted NREM slow waves and impaired hippocampal-dependent memory in aging. Nat Neurosci, 16 (3): 357-364.

[11] Katzung B. G., Masters S. B., Trevor A. J. 2012, Basic & clinical pharmacology: Lange Medical Books/McGraw-Hill New York, NY, USA.

[12] Kellogg C.K. 1988, Benzodiazepines: influence on the developing brain. Progress in brain research,73:207-28.

[13] Liston C., Miller M. M., Goldwater D. S., Radley J. J., Rocher A.B., Hof P.R. 2006, Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. The Journal of Neuroscience, 26 (30): 7870-7874.

[14] Yang Y., Raine A. 2009, Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis. Psychiatry Research: Neuroimaging, 174(2):81-88.

[15] Zhang T., Cao E. H., Li J. F. 2000, A laser scanning confocal microscopy method. Simultaneous detection of intracellular

ca2+ and apoptosis using Fluo- 3 and Hoechst 33342. Anal Quant Cytol Histol, 22(2): 93-97.

[16] Zhang F., Li C., Wang R., Han D., Zhang Q-G., Zhou C., et al. 2007, Activation of GABA receptors attenuates neuronal apoptosis through inhibiting the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src after cerebral ischemia and reperfusion. Neuroscience,150(4):938-949

The effect of chlordiazepoxide used during pregnancy on bad gene expression in the hippocampus of neonatal rats

Dinarvand A.[1], Hashemi M.[2*], Dinarvand R.[3], Movaseghi S.[4], Jafarinia M.[1]

1 Department of Genetics,Islamic Azad University,Marvdasht branch,Marvdasht,Iran
2 Department of Genetics,Faculty of advanced sciences and technology, Tehran medical sciences ,Islamic Azad University,Tehran,Iran
3 Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Tehran medical sciences University,Tehran,Iran
4 Department of Anatomy,Faculty of medicine, Tehran medical sciences ,Islamic Azad University,Tehran,Iran

[*] Email: mhashemi@iautmu.ac.ir

Received: 3 February 2019 Accepted: 19 March 2019

Abstract

Chlorodiazepoxide is an anxiolytic agent commonly used by young people and pregnant women to reduce anxiety and control preeclampsia and eclampsia. Some studies have shown that this medication disrupts the functioning of the cholinergic system. Due to the increased cellular damage of bad gene expression, the effect of cholorodiazepoxide used during pregnancy on bad gene expression in the hippocampus of neonatal rats was investigated. In this study, 9 female Wistar rats were pregnant and randomly divided into three groups: control, experimental (intraperitoneal injection of chlordiazoxoxide 10 mg / kg for 21 days) and carriers (saline). Two weeks after the birth, the brain of the neonates was removed from the skull and the expression of the propaoptotic gene of bad was investigated. The level of gene expression was analyzed by Rest software and a significant level of $P < 0.05$ was considered. Propoptotic gene, bad showed significant increase in experimental group compared to control group. The results of this study indicated that the administration of chlorodiazepoxide during pregnancy can cause neuronal damage in the hippocampus of Wistar rats.

Keywords: Gene expression, Chlorodiazepoxide, Rat, Hippocampus, bad gene.