Archive of SID

IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
دوره ۳، شماره ۴، پیاپی ۱۲، صفحه ۲۹۷-۲۸۸

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر نانو کپسول اریتروپویتین بر اضطراب ناشی از اختلال استرس پس از سانحه

مسعود باقرپور زارچی[1*]، علی فلاحتی[1]، کتانه ابراری[2]، عادله دیوسالار[3]، علی باقرپور[4]

۱. گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران
۲. دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران
۳. گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۴. گروه ارتوپدی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

دریافت: ۱۵ مرداد ۱۳۹۹ پذیرش: ۲۷ مهر ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف: فشار روانی پس از سانحه (PTSD) یکی از بیماری‌های اضطرابی است. PTSD باعث تغییر در بیان ژن‌های خانواده *Bcl2* و در نتیجه باعث بروز آپوپتوز در هیپوکمپ می‌گردد. اریتروپویتین به عنوان یک فاکتور حفاظت عصبی می تواند از مرگ نورونی جلوگیری کند. اما این پروتئین توانایی عبور از سد خونی مغزی را ندارد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات ضدآپوپتوز نانوکپسول اریتروپویتین در PTSD و مقایسه آن با اریتروپویتین است.

روش‌ها: با استفاده از مدل تک استرس طولانی مدت، PTSD در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار القاء شد. حیوانات بلافاصله پس از القاء، نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین با دوز ۵۰۰۰ IU/kg را به ترتیب ۱ و ۳ بار به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. یک هفته بعد حیوانات مورد آزمون رفتاری، شمارش سلول‌های هیپوکامپ و بررسی سطوح بیان ژن‌های bcl_2 و *bax* قرار گرفتند.

یافته‌ها: مطالعات رفتاری نشان داد نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین، پاسخ‌های رفتاری اضطراب و ترس حساس شده را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش ($p < ۰/۰۰۱$) دادند. همچنین کاهش تعداد سلول‌های هیپوکامپ ناشی از مرگ سلولی بهبود یافت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که PTSD در هیپوکامپ میزان بیان ژن bcl_2 را کاهش و میزان بیان ژن *bax* را افزایش می‌دهد. تیمار دارویی این روند را معکوس نمود و به حالت طبیعی نزدیک کرد.

نتیجه‌گیری: هم اریتروپویتین و هم نانوکپسول اریتروپویتین دارای اثرات ضداضطراب و ضدآپوپتوزی در مدل حیوانی PTSD هستند. نانو کپسول اریتروپویتین در مقایسه با اریتروپویتین با دوز کمتری این اثرات را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، اریتروپویتین، نانو کپسول، هیپوکمپ، PTSD

مقدمه

اختلالات اضطرابی یکی از شایع‌ترین نوع اختلالات روانی است و انواع مختلفی دارد [۱]. یکی از آسیب‌های مغزی که باعث معلولیت‌های دراز مدت در جامعه می‌شود، فشار روانی پس از سانحه[1] است. مهمترین ویژگی PTSD بروز اختلالات حافظه است و یکی از نواحی مغزی درگیر در این نوع اختلال، هیپوکامپ است. فرد با قرارگرفتن در معرض یک محرک تنش‌زای به شدت آسیب‌رسان مانند مرگ یا تهدیدشدن به مرگ، آسیب‌های جدی بدنی یا سایر رویدادهایی که تمامیت جسمی فرد را تهدید می‌کنند، نشانه های PTSD را نشان می‌دهد [۲].

افراد مختلف به این محرک‌های تنش‌زا به اشکال متفاوتی شامل ترس شدید، درماندگی یا وحشت‌زدگی، بی‌قراری و آشفتگی پاسخ می‌دهند. فشاری که سبب PTSD می‌شود، معمولاً به قدری ناتوان‌کننده است که تقریباً هرکسی را از پای

[1] Post traumatic stress disorder (PTSD)

* نویسنده مسئول مکاتبات: M.bagherpoor@guest.yazd.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-5098-0105)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021

در می‌آورد. فرد به‌صورت ترس و درماندگی به این تجربه پاسخ می‌دهد به‌طوری‌که روابط بین فردی دچار آسیب می‌شود. علایم مزبور باید حداقل یک ماه طول کشیده باشد و بر حوزه‌های مهمی از زندگی بیمار نظیر خانواده و شغل او تأثیر گذاشته باشد تا بتواند به عنوان اختلال استرس پس از سانحه مطرح گردد [۳]. در PTSD، هیپوکمپ دچار آتروفی می‌گردد و حجم آن کاهش می‌یابد. مطالعات بر روی مدل‌های حیوانی تک استرس طولانی مدت نشان می‌دهد که کاهش حجم هیپوکمپ بر اثر آپوپتوز رخ می‌دهد [۴].

اریتروپویتین[2] گلیکوپروتئینی است که ابتدا به عنوان یک داروی موثر در درمان آنمی شناخته شد. درحالی‌که مطالعات بعدی نشان داد اریتروپویتین یک محافظ عصبی قوی نیز هست و بقای سلول‌ها را در آسیب‌های سیستم عصبی بالا می‌برد [۵]. گزارش شده است که کاربرد سیستمیک اریتروپویتین می‌تواند پیامدهای عملکردی مضر بعد از آسیب‌های مغزی را بهبود ببخشد و باعث کاهش مرگ سلولی طی صدمه به نخاع، ادم مغزی تروماتیک، ترومای قشر مغز و صرع شود [۶]. تنظیم بیان ژن‌های خانواده bcl_2 یکی از مهمترین مکانیسم‌های بررسی‌شده در خواص ضد آپوپتوز اریتروپویتین است به‌طوری‌که بیان ژن ضد آپوپتوز Bcl_2 را افزایش و بیان ژن پیش مرگ bax را کاهش می‌دهد [۷]. با وجود نقش حفاظت عصبی اریتروپویتین ، نکته قابل‌توجه عدم عبور آن از سد خونی مغزی است. سد خونی مغزی مانع از عبور پروتئین‌های بزرگ از جمله اریتروپویتین به سیستم عصبی مرکزی می‌شود [۸]. همچنین نیمه عمر اریتروپویتین کوتاه و حدود ۶-۴ ساعت می‌باشد [۹]. با این شرایط تحویل دارو به مغز چالش برانگیز است چرا که تحویل سیستمیک نیاز به دوزهای بالا برای دستیابی به انتشار در سراسر سد خونی مغزی دارد و اغلب منجر به سمیت سیستمیک می‌شود.

نانوکپسول‌ها امروزه به عنوان حامل‌های کوچک مقیاس برای تشخیص، جلوگیری و درمان بیماری‌ها مطرح هستند. این نانوکپسول‌ها قادر به هدایت یک مولکول بیواکتیو به محل اختصاصی خودش و نیز کنترل رهایش دارو برای اطمینان از یک غلظت ایده‌آل در محل هدف می‌باشند. اغلب نانو سیستم‌های تحویل دارو در درمان‌های بالینی، بر روی هدف‌گیری نانوکپسول در مکان موردنظر و درواقع افزایش رهایش و غلظت دارو در آن مکان متمرکز شده‌اند. در نتیجه تعداد دفعات تزریق دارو کاهش می‌یابد [۱۰].

هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد آپوپتوز اریتروپویتین در موش‌های صحرایی با القاء PTSD است [۱۱]. همچنین در این پژوهش اثرات ضد آپوپتوز یک نوع نانوکپسول اریتروپویتین[3] نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد و با اثرات اریتروپویتین مقایسه می‌شود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

حیوانات مورد آزمایش موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن ۲۰ ± ۲۰۰ گرم بودند. حیوانات از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و سپس به حیوان‌خانه جهت سازش با محیط جدید انتقال یافتند و به مدت یک هفته در شرایط سیکل تاریکی و روشنی به صورت ۱۲ ساعته و غذا و آب بدون هیچ محدودیتی نگهداری شدند. این مطالعه مطابق با موازین کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه دامغان انجام شده است.

داروهای مورد استفاده و روش تزریق آن‌ها

اریتروپویتین از شرکت سیناژن (ایران) تهیه شد. نانو کپسول اریتروپویتین بر اساس روش ذکر شده در مطالعه قبلی ساخته شد [۱۲]. این نانوکپسول دارای دو جایگاه اتصال برای پروتئین اریتروپویتین است. برهمکنش نانوذره و پروتئین اریتروپویتین از نوع خاموشی استاتیکی بوده به‌طوری‌که نیروی غالب در این برهمکنش از نوع هیدروفوب و غیرخودبخودی است. همچنین تغییر قابل‌توجهی در ساختار پروتئین اریتروپویتین پس از برهمکنش با نانوکپسول اتفاق نمی‌افتد و قطر نانو کپسول‌های حاوی داروی اریتروپویتین حدود ۱۱۴ نانومتر بودند [۱۲].

بلافاصله پس از القاء PTSD، یک گروه از موش‌های صحرایی اریتروپویتین را ۳ بار و هر ۶ ساعت یک بار و گروه دیگر بلافاصله پس از القاء، نانو کپسول اریتروپویتین را یکبار و به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. سپس حیوانات به مدت

[2] Erythropoietin (EPO)

[3] n-erythropoietin (n-EPO)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021

یک هفته در محیط حیوان خانه نگهداری شدند. پس از یک هفته آزمون‌های رفتاری، رنگ‌آمیزی بافتی و مولکولی انجام شد.

آزمون‌های رفتاری

به منظور القاء PTSD از مدل تک استرس طولانی مدت[4] استفاده شد. بدین‌منظور موش صحرایی به مدت دو ساعت درون مقیدکننده[5] قرار داده شد. بلافاصله بعد از این مرحله موش‌ها به مدت ۲۰ دقیقه شنای اجباری انجام دادند [۱۱].

از آزمون زمینه باز[6] برای ارزیابی پاسخ‌های رفتاری مانند فعالیت حرکتی، بیش‌فعالی و رفتار جستجوگرانه و همچنین اندازه‌گیری اضطراب استفاده شد. زمانی که حیوان مضطرب است گرایش به کنار دیواره‌های بلند محیط دارد و از رفتن به مرکز محیط و جستجو در آنجا خودداری می‌کند و زمانی که اضطرابش از بین برود برای شناخت بیشتر دنیای پیرامون خود به هر طرف قدم می‌گذارد. برای انجام آزمون، حیوانات به مدت پنج دقیقه در دستگاه قرار گرفتند و اجازه حرکت آزادانه به آن‌ها داده می‌شد. در نهایت، تعداد دفعات عبور حیوان از خطوط محیطی و نیز عبور از مربع مرکزی سنجیده شد [۱۳].

ماز بعلاوه مرتفع[7] برای سنجش ترس حساس شده مورد استفاده قرار گرفت. این ابزار دارای چهار بازو به شکل بعلاوه است و دارای دو بازوی باز و دو بازوی دارای دیواره‌های بلند می‌باشد. برای انجام این آزمون، حیوانات درون محدوده مرکزی ماز قرار داده شدند. سپس به مدت پنج دقیقه تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و زمان حضور در بازوهای باز ثبت شد [۱۴].

بلافاصله پس از اتمام آزمون‌های رفتاری، موش‌ها با دی‌اتیل اتر بیهوش شدند و با پارافرمالدئید ۴٪ پرفیوز شدند. پس از جداکردن مغز موش‌ها یک نیمکره جهت مطالعات بافت شناسی و نیمکره دیگر جهت اندازه‌گیری بیان ژن استفاده شد.

رنگ‌آمیزی با هماتوکسلین و ائوزین

از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین برای رنگ‌آمیزی سلولهای عصبی و شمارش سلولی استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی، از هر نمونه پنج برش بافتی انتخاب شد و با استفاده از بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری تعداد نورون‌های سالم با هسته‌های قابل‌مشاهده در ناحیه شکنج دندانه‌ای (DG)، CA1 و CA3 هیپوکامپ شمارش گردید [۱۵].

بررسی مولکولی بیان ژن‌ها به روش PCR

مغز نیمی از همه گروه‌ها خارج و هیپوکمپ آن‌ها جدا شد. سپس هیپوکمپ‌ها برای استخراج RNA و سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند [۱۶]. پس از سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای پیشرو و معکوس (جدول ۱) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) انجام و محصول روی ژل برده شد. نتایج توسط نرم‌افزار Gel Quant Net به صورت کمی مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان دو ژن ضد آپوپتوزی *bcl-2* و ژن آپوپتوز اندازه‌گیری شد.

گروه های آزمایشی

حیوانات به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. ۱- گروه شاهد (موش‌های سالم دریافت‌کننده سالین)، ۲- گروه کنترل (موش‌هایی که در آنها PTSD القاء شد)، ۳- گروه ۵۰۰۰ PTSD-EPO (موش‌های دارای PTSD دریافت‌کننده اریتروپویتین بادوز ۵۰۰۰ IU/kg)، ۴- گروه ۵۰۰۰ PTSD-nEPO (موش‌های دارای PTSD دریافت‌کننده نانو کپسول اریتروپویتین با دوز ۵۰۰۰IU/kg).

آزمون‌های آماری

در این تحقیق داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین ارائه شده اند. آنالیز داده‌های آماری به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای بررسی وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایشی استفاده شد. همچنین از آزمون تکمیلی توکی برای تعیین تفاوت بین هر کدام از گروه‌ها استفاده شد. $p < ۰/۰۵$ به‌عنوان مرز استنتاج آماری و اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایشی بوده است.

یافته‌ها

اضطراب

آزمون ماز بعلاوه مرتفع به منظور سنجش مقدار اضطراب انجام گرفت. زمان گذرانده شده در بازوهای باز و همینطور

[4] Single-prolonged stress (SPS)
[5] Restrainter
[6] Open field
[7] Elevated plus-maze

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021

جدول ۱- توالی پرایمرهای پیشرو و معکوس استفاده‌شده در این مطالعه.

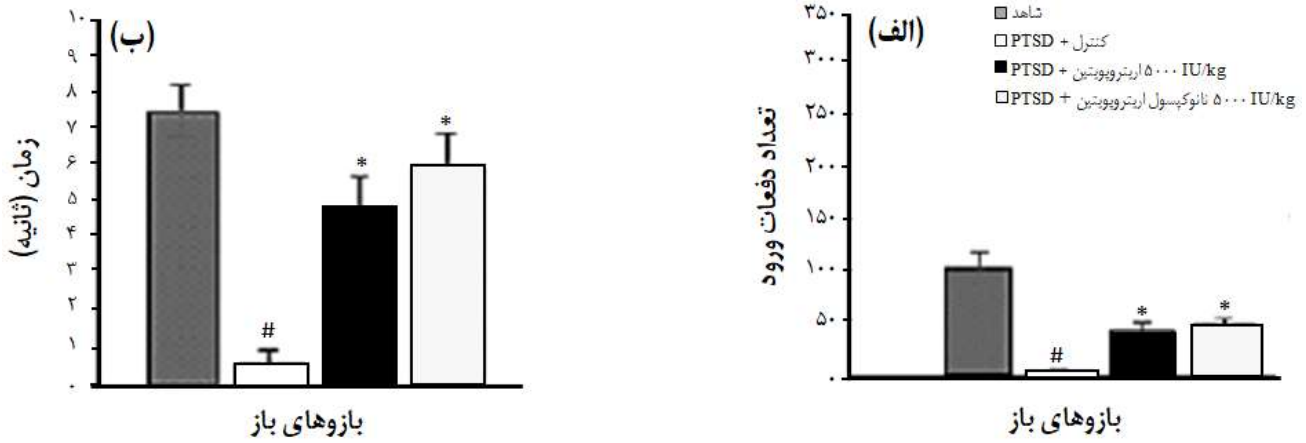
ژن مورد نظر	توالی	تعداد جفت باز (bp)
GAPDH	FW: 5´-TCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3´ RV: 5´-AGTGGCAGTGATGGCATGGCT-3´	۱۰۲
Bcl2	FW: 5´-CTGAGTACCTGAACCGGCATC-3´ RV: 5´-GAGCAGCGTCTTCAGAGACAG-3´	۱۳۱
Bax	FW: 5´-GTGGTTGCCCTTTTCTACTTTGC-3´ RV: 5´-GAGGACTCCAGCCACAAAGATG-3´	۲۱۶

تعداد دفعات ورود به بازوهای باز بررسی گردید. آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که گروه‌های مختلف ازنظر زمان گذرانده‌شده در بازوی باز بایکدیگر تفاوت معنادار دارند [$F(۵،۳۰) = ۲۰/۲۸۵، p = ۰/۰۰۰$]. آزمون تکمیلی توکی نشان داد که القاء بیماری PTSD منجر به کاهش معنی‌دار در زمان حضور در بازوی باز در مقایسه با گروه شاهد شده است ($p < ۰/۰۵$). نانو کپسول اریتروپویتین به طور معنی‌داری زمان گذرانده‌شده در بازوهای باز را در مقایسه با گروه PTSD، افزایش داد ($p < ۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری در شاخص مذکور بین دو گروه تیمار شده با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین وجود نداشت (نمودار ۱الف) .

از نظر تعداد دفعات ورود به بازوهای باز نیز بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود داشت [$F(۳۰،۵) = ۶/۲۱۲، p = ۰/۰۰۰$]. به‌طوری‌که حیوانات گروه PTSD در تعداد دفعات ورود به بازوهای باز در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < ۰/۰۵$). نانوکپسول اریتروپویتین به‌طور معنی‌داری تعداد دفعات ورود به بازوهای باز را در مقایسه با گروه PTSD ، افزایش داد ($p < ۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری در دو شاخص مذکور بین دو گروه تیمارشده با نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین وجود نداشت (شکل ۱ب).

سنجش ترس حساس‌شده توسط آزمون زمینه باز

آزمون زمینه باز وسیله‌ای برای ارزیابی میزان ترس حساس‌شده است. افزایش دو شاخص عبور از خطوط زمینه و همینطور عبور از مربع مرکزی نشان‌دهنده کاهش ترس حساس شده در حیوان است (نمودار ۲). آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در هر دو پارامتر مذکور به ترتیب با مقادیر معنی‌داری [$F(۳۰،۵) = ۵۷/۶۰۶، p=۰/۰۰۰$] و [$F(۳۰،۵) = ۹/۰۶۵، p=۰/۰۰۰$]

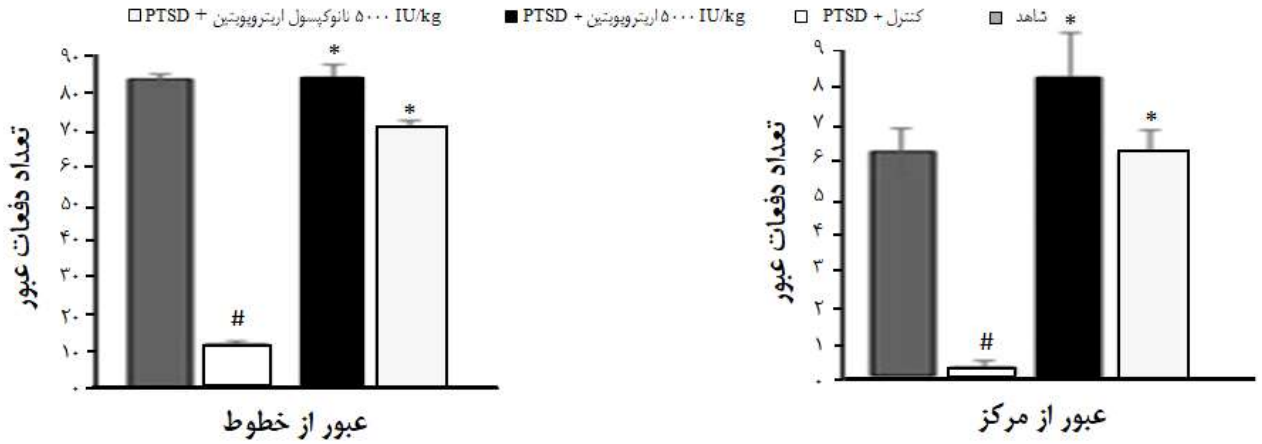


نمودار ۱- اثر نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین بر میزان اضطراب موش‌های دریافت‌کننده اریتروپویتین. (الف) زمان حضور در بازوهای باز ماز بعلاوه مرتفع. (ب) تعداد دفعات ورود به بازوهای باز ماز بعلاوه مرتفع. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین در ده موش نمایش داده شده‌اند. $^{\#}$: $p < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه شاهد. *: $p <۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل PTSD.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021

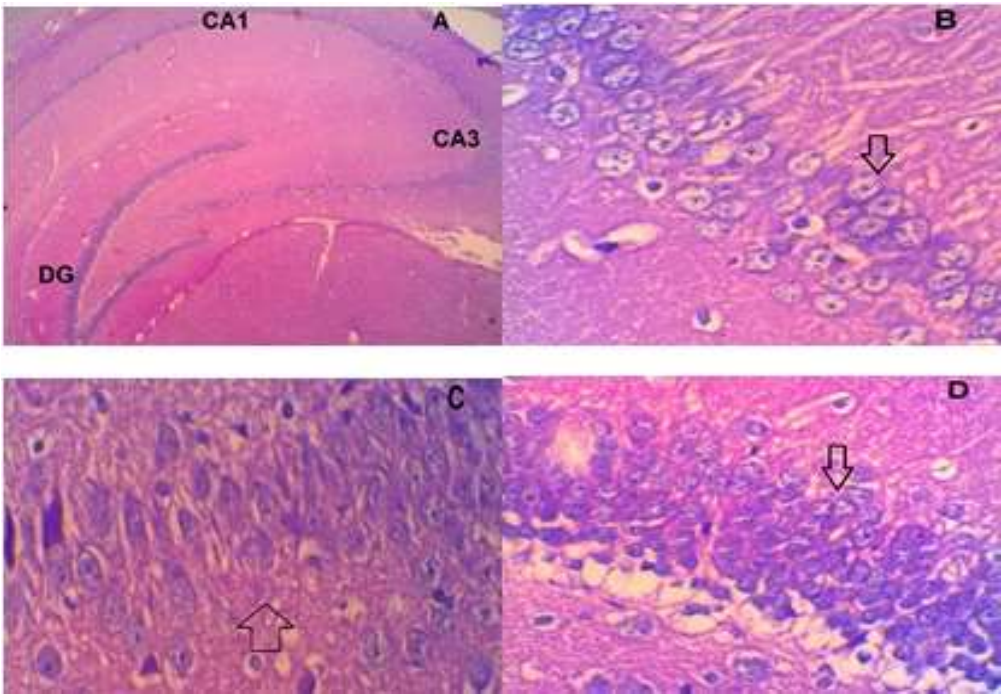


نمودار ۲- اثر نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین بر فعالیت‌های عبور از خطوط و تعداد دفعات عبور از مربع مرکزی آزمون زمینه باز. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار در ۱۰ موش نمایش داده شده‌اند. #: $p < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه شاهد. *: $p < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل PTSD.

بین گروه‌ها وجود دارد. آزمون تکمیلی توکی افزایش معنی‌داری را در مقدار عبور خطوط زمینه‌ای و عبور از مربع مرکزی در تمام گروه های تیمار در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p < ۰/۰۵$). القاء PTSD سبب کاهش معنی‌دار در شاخص‌های بالا در مقایسه با گروه شاهد شد ($p < ۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری درشاخص‌های مذکور بین گروه‌های تیمار شده با نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین وجود نداشت (نمودار ۲).

مطالعات بافتی

پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین تعداد نورون‌های سالم با استفاده از بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری در ناحیه CA1،DG و CA3 هیپوکامپ شمارش گردید (شکل ۱). نمودار ۳ میانگین سلول‌های گرانولی شکنج دندانه‌دار و سلول‌های هرمی CA1 و CA3 را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تعداد سلول‌ها در ناحیه CA1

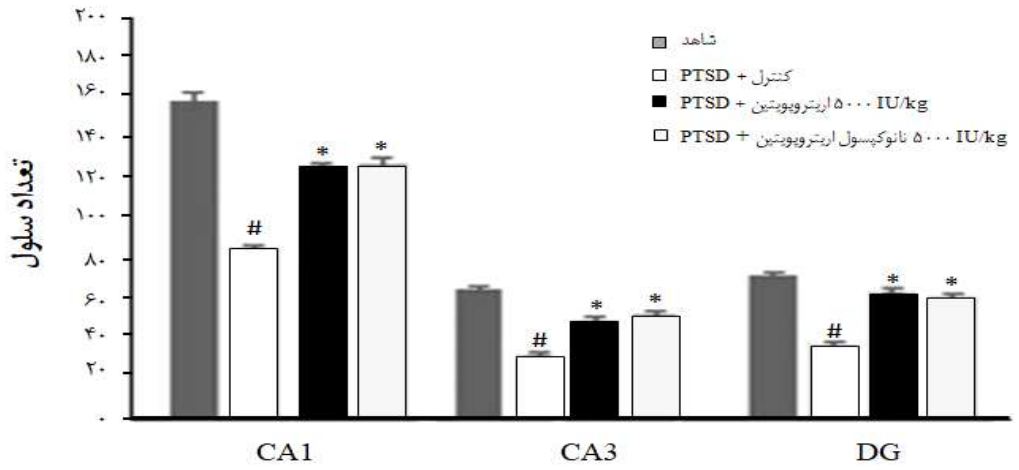


شکل ۱- اثر اریتروپویتین بر تعداد سلول‌ها در هیپوکمپ. A: هیپوکمپ (با بزرگنمایی ×۱۰) B: ناحیهCA1، C: ناحیه CA3 و D: سلول‌های DG (با بزرگنمایی ×۴۰). فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌ها هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021



نمودار ۳- مقایسه تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکمپ در موش‌های دریافت‌کننده اریتروپویتین. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار در ۱۰ موش نمایش داده شده‌اند. #: $p < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه شاهد. *: $p < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل PTSD .

نشان‌دهنده افزایش تعداد سلول‌ها متعاقب تیمار با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین و تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف آزمایشی است [$F(۳۰،۵) = ۱۶۰/۰۷۵، p = ۰/۰۰۰$]. آزمون تکمیلی توکی نشان داد معنی‌داری نسبت به گروه PTSD یافته است ($p < ۰/۰۵$) و گروه PTSD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری از لحاظ تعداد سلول نشان داد ($p < ۰/۰۵$). آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تعداد سلول‌ها در ناحیه CA3 نیز نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف آزمایشی است [$F(۳۰،۵) = ۷۴/۲۲۸، p = ۰/۰۰۰$]. آزمون تکمیلی نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌ها در تمام گروه‌ها نسبت به گروه PTSD است ($p < ۰/۰۵$) و گروه PTSD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری از لحاظ تعداد سلول نشان داده است ($p < ۰/۰۵$).

آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تعداد سلول‌ها در ناحیه DG نمایانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است [$F(۳۰،۵) = ۵۹/۹۸۴، p = ۰/۰۰۰$]. نتایج آنالیز تکمیلی مشابه سایر نواحی هیپوکمپ است یعنی تعداد سلول‌ها در گروه‌های تیمارشده با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه PTSD یافته است ($p < ۰/۰۵$) و گروه PTSD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری از لحاظ تعداد سلول نشان داد ($p < ۰/۰۵$).

نتایج مولکولی

آنالیز واریانس یک‌طرفه برای ژن *bcl2* نمایانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است [$F(۶،۵) = ۱۵۸۹/۸۱۱، p = ۰/۰۰۰$]. با توجه به نمودار ۴، نتایج آنالیز تکمیلی نیز نشان داد که گروه PTSD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری از لحاظ بیان دارد ($p < ۰/۰۵$). بیان ژن *bcl2* در گروه‌های تیمارشده با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه PTSD یافته است ($p < ۰/۰۵$). آنالیز واریانس یک‌طرفه برای بیان ژن *bax* نیز نمایانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است [$F(۶،۵) = ۲۱۶/۵۵۱، p = ۰/۰۰۰$]. نتایج آنالیز تکمیلی نیز نشان داد که گروه PTSD نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری از لحاظ بیان دارد ($p < ۰/۰۵$). بیان ژن *bax* در گروه‌های تیمارشده با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین ، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه PTSD یافته است ($p < ۰/۰۵$).

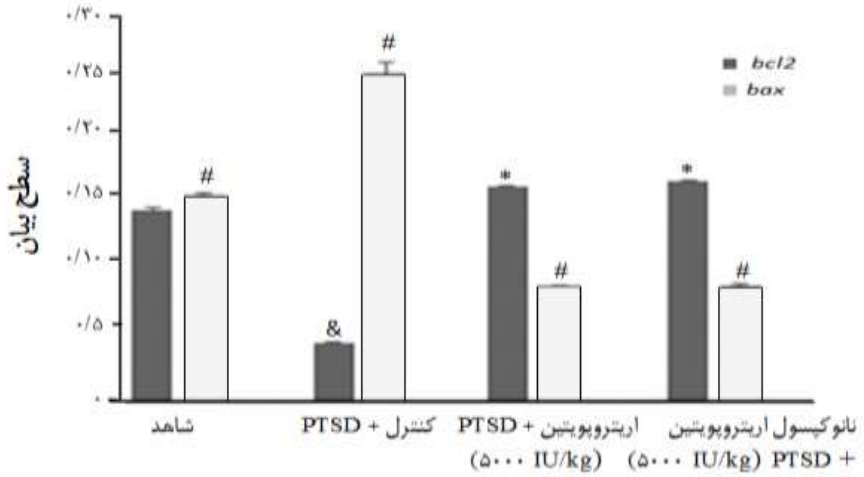
بحث

نتایج مطالعات ما نشان داد میزان اضطراب و ترس حساس‌شده در گروه PTSD به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ایت یافته مطابق با نتایج سایر مطالعه مشابه می‌باشد. [۱۱]. از طرفی میزان اضطراب و ترس حساس‌شده در گروه های ۵۰۰۰ IU/kg اریتروپویتین و ۵۰۰۰ IU/kg نانوکپسول اریتروپویتین کاهش پیدا کرد و همچنین این دو گروه نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً نانوکپسول سنتزشده بدون تغییر در ساختار

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021



نمودار ۴- اثر نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین بر بیان ژن‌های *bcl2* و *bax* . داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار در ۵ موش نمایش داده شده‌اند. $ و &: تفاوت معنی دار با گروه شاهد معادل خود با $p< ۰/۰۵$، # و *: تفاوت معنی دار با گروه PTSD معادل خود با $p< ۰/۰۵$.

اریتروپویتین توانسته است دارو را از سدخونی مغزی عبور دهد و اریتروپویتین را در مغز رها کند. از طرفی در مطالعات گذشته به نقش پیشگیرانه نانو حامل‌های سورفاکتانت در آسیب مغزی اشاره شده و این‌که حامل بدون تغییر در ساختار دارو آن را به مغز تحویل داده است [۱۷].

مطالعات گذشته کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های آسیب مغزی مانند آلزایمر و سکته‌های مغزی را توسط اریتروپویتین نشان داده است. اریتروپویتین به عنوان فاکتور محافظ نورونی از طریق تاثیر بر روی بیان فاکتورهای آپوپتوزی خانواده *bcl2* باعث کاهش مرگ نورونی می‌شود. به‌طوری‌که تیمار دارویی با اریتروپویتین سبب افزایش سطح پروتئین *bcl2* و کاهش سطح پروتئین *bax* در سلول‌های عصبی می‌شود [۱۸].

مطالعات پیشین نشان داده است که بیماری PTSD باعث کاهش حجم هیپوکامپ وآتروفی بافت هیپوکامپ می‌شود [۱۹]. در پژوهش حاضر هر چند حجم کلی هیپوکامپ اندازه‌گیری نشد ولی تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ شمارش گردید. همانطور که در نتایج مشاهده شد، القای PTSD منجر به کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌ها در هر سه ناحیه CA1، CA3 و DG نسبت به گروه شاهد و در نتیجه آتروفی هیپوکمپ شده است. این نتیجه در راستای نتایج دیگر مطالعات است و حاکی از کاهش تراکم سلولی در اثر ایجاد مدل SPS و القاء آپوپتوز توسط این مدل است [۲۰].

با بررسی برش‌های بافتی در گروه‌های تیمار دارویی و مقایسه آن ها با یک دیگر دیده می‌شود که هر دو گروه IU/kg ۵۰۰۰ اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین، افزایش معنی‌داری در تعداد سلول ها در ناحیه‌های DG، CA1 وCA3 نسبت به گروه PTSD دارند ولی این دو گروه نسبت به هم تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند که این یافته منطبق با نتایج آزمون‌های رفتاری است و نشان می‌دهد که با دوز IU/kg ۵۰۰۰ نانوکپسول اریتروپویتین مانند دوز IU/kg ۵۰۰۰ اریتروپویتین باعث کاهش آتروفی هیپوکمپ و در نتیجه مهار القاء PTSD شده است.

مطالعات گذشته نشان داده است که القا PTSD میزان بیان ژن *bcl2* را کاهش و بالعکس بیان *bax* را افزایش می‌دهد [۲۲، ۲۱]. در مطالعه ما نیز در گروه PTSD میزان بیان ژن *bcl2* به‌طورقابل ملاحظه‌ای کاهش و بالعکس میزان بیان ژن *bax* افزایش پیدا کرد. به عبارت دیگر، نسبت بیان ژن ضدآپوپتوزی به آپوپتوزی (*bcl2/bax*) در گروه PTSD به وضوح نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است ولی این نسبت در گروه‌های IU/kg ۵۰۰۰ اریتروپویتین و IU/kg ۵۰۰۰ نانوکپسول اریتروپویتین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، درحالی‌که این شاخص در دو گروه ذکرشده با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً نانوکپسول بدون تغییر در عملکرد فیزیولوژیک دارو توانسته است آن را به مغز تحویل دهد و اثرات مشابهی مانند داروی اریتروپویتین داشته باشد. در نتیجه، همانطور که انتظار می‌رفت نانوکپسول اریتروپویتین احتمالاً به‌دلیل تحویل اریتروپویتین به مغز نقش موثری در کاهش دوز مصرفی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021

اریتروپویتین دارد زیرا اریتروپویتین توانایی عبور از سد خونی مغزی ندارد و باید با دوز بالا مصرف شود تا میزانی از آن از سد خونی مغزی عبور و وارد مغز شود. در نتیجه نانوکپسول اریتروپویتین توانسته است با دوز پایین‌تری نسبت به دوز ۵۰۰۰ IU/kg اریتروپوییتین نتایج مشابهی را به‌دست آورد. این نتیجه، منطبق با یافته‌های آزمون‌های رفتاری و بافتی می‌باشد و نشان می‌دهد که نانوکپسول اریتروپویتین سنتز شده با جلوگیری از فعالیت آپوپتوزی در هیپوکامپ بر تراکم سلولی در این ناحیه موثر بوده است.

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا نانوکپسول توانسته است به‌عنوان یک حامل، اریتروپویتین را به مغز تحویل دهد. در این شرایط با کاهش تعداد دفعات تزریق و دوز مصرفی دارو همان اثرات اریتروپویتین بدون کپسول مشاهده شد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری تخصصی رشته فیزیولوژی مسعود باقرپور می‌باشد. از همکاری گروه زیست‌شناسی دانشگاه دامغان و دانشگاه یزد تشکر می‌شود.

ملاحظات مالی

هزینه های مالی این پژوهش توسط دانشگاه دامغان پرداخت شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

م.ب: طراحی و ایده، انجام مطالعه، آنالیز آماری، نگارش مقاله; ع.ف: نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; ک.ا: نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; ع.د: نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; ع.ب: طراحی و ایده، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله.

فهرست منابع

[1] Halbreich U, Anxiety disorders in women: a developmental and lifecycle perspective. ***DepressAnexity*** 17 (2003) 107-110.

[2] Tanja Jovanovic T , Norrholm S.D, Fennell J.E, Keyes M, Fiallos A.M, Myers K.M, Davis M, Duncan E.J, Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. ***Psychiatry Res***, 167(2009), 151-160.

[3] Stretch R.H, Marlowe D.H, Wright K.M, Bliese P.D, Knudso K.H, Hoover C.H, Traumatic stress disorder symptoms among Gulf War veterans. ***Mil Med***, 161(1996), 407-410.

[4] Li X.M, Han F, Liu Dj, Shi Yx, Single-prolonged stress induced mitochondrial-dependent apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. ***J Chem Neuroanat*** 40 **(**2010) 248-255.

[5] Katakura F, Katzenback B.A, Belosevic M, Molecular and functional characterization of erythropoietin receptor of the goldfish (Carassius auratus L.). ***Dev Comp Immunol*** 45 (2014) 191-198.

[6] Maiese, K, Chong ZZ, Li F, Shang YC, Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. ***Pro Neurobiol*** 85 (2008) 194-213.

[7] Kumral A, Tuzun F, Gulfer Oner M, Genc S, Duman N, Ozkan H, Erythropoietin in neonatal brain protection: the past, the present and the future. ***Brain Dev*** 33 (2011) 632-643.

[8] Brasnjevic I, Steinbusch HW, Schmitz C, Martinez-Martinez P, Delivery of peptide and protein drugs over the blood–brain barrier. ***Prog Neurobiol*** 87 (2009) 212-251.

[9] Velly L, Pellegrini L, Guillet B, Bruder N, Pisano P, Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? ***Pharmacol Ther*** 128 (2010) 445-4.

[10] Crawford L, Rosch J, Putnam D, Concepts, technologies, and practices for drug delivery past the blood–brain barrier to the central nervous system. ***J Control Release*** 240 (2016) 251-266

[11] Yamamoto S, Morinob S,Takei S,Fuchikami M,Matsuki A,Yamawaki S,Liberzon I,Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder, ***Depress anxiety***, 26(2009), 1110-1117.

[12] Bagherpour Zarchi M, Divsalar A, Abrari K, Rezaei A, Multiple spectroscopic studies of the interaction between a quaternary ammonium-based cationic Gemini surfactant (as a carrier) and human

www.SID.ir

Archive of SID

erythropoietin. ***J Biomol Struct Dyn*** 36 (2018) 3479-3486.

[13] Habr S.F, Bernardi M.M, Conceição I.M, Freitas T.I, Felicio L.F, Open field behavior and intra-nucleus accumbens dopamine release in vivo in virgin and lactating rats. ***Psychol Neuro*** 4 (2011) 115.

[14] Rezayat M, Rohbakhsh A, Zarrindast M.R, Massoudi R, *Djahanguiri* B, Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. ***Physiol Behav*** 84 (2005) 775-782.

[15] Alijan-pour J, Abrari K, Ethanol disrupts reactivated contextual conditioned fear memory: behavioral and histological perspectives. ***Cell J***, (2012). **13**(4) 265.

[16] Garibyan L, Avashia N, Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). ***J Invest Dermatol***, (2013). **133**(3) 6.

[17] Marti H.H, Bernaudin M, Petit E, Bauer C, Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia. ***News Physiol Sci*** 15 (2000) 225-229.

[18] Moallem S.A, Mohamadpour A.H, Abnous K, Sankian M, Sadeghnia H.R, Tsatsakis A, Shahsavand Sh, Erythropoietin in the treatment of carbon monoxide neurotoxicity in rat. ***Food Chem Toxicol*** 86 (2015) 56-64.

[19] Jakovljević M, Brajković L, Jakšić N, Lončar M, Aukst-Margetić B, Lasić D, Postraumatic stress disorders (ptsd) from different perspectives: a transdisciplinary integrative approach. ***Psychiatr Danub***24 (2012) 246-255.

[20] Rao R.P, Suvrathan A, Miller M.M, McEwen B.S, Chattarji S, PTSD: From neurons to networks, in Post-traumatic stress disorder. ***Springer*** (2009) 151-184.

[21] Li Y, Han F, Shi Y, Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder. ***J Mol Neurosci*** 51 (2013) 127-137.

[22] Li X, Li X, Han F, Liu D, Shi Y, Changes of Bax, Bcl-2 and apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. ***Neurol Res*** 32 (2010) 579-586.

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:22 +0330 on Saturday March 13th 2021

Research paper

Effect of erythropoietin nano-capsules on anxiety caused by post-traumatic stress disorder (PTSD)

Masoud Bagherpour Zarchi[1], Ali Falahati[1], Kataneh Abrari[2], Adeleh Divsalar[3], Ali Bagherpour[4]

1. *Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran*
2. *Department of Biology, Damghan University, Damghan, Iran*
3. *Department of Cell & Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran*
4. *Orthopedics Department, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

Received: 5 August 2020 Accepted: 18 October 2020

Abstract

Background and aims: Post-traumatic stress disorder (PTSD) is one of the anxiety disorders. PTSD causes changes in the expression of the genes of the *Bcl2* family in hippocampus and, as a result, causes apoptosis. Erythropoietin, as a neuroprotective agent, can prevent neuronal death in brain damage. But this protein has no ability to across the blood-brain barrier. The aim of this study was to evaluate antiapoptotic effects of erythropoietin nano-capsules in PTSD and compare it with erythropoietin.

Methods: PTSD was induced in male Wistar rats using the long-term single stress model (Single-prolonged stress). Immediately after induction, the animals received erythropoietin Nano-capsules and erythropoietin at a dose of 5000 IU/kg intraperitoneally 1 and 3 times/day, respectively. One week later, the animals underwent behavioral testing, hippocampal cell counts, and measuring *Bcl2* and *bax* gene expression levels.

Results: Erythropoietin Nano-capsules and erythropoietin significantly reduced the anxiety and fear compared to the PTSD group. Furthermore, drug therapy increased number of hippocampal cells, which were decreased by PTSD. PTSD decreased *Bcl2* and increased *bax* hippocampal expression. However, these changes were reversed by drug treatment and reach the control level.

Conclusion: Both erythropoietin and erythropoietin Nano-capsules show anxiolytic anti-apoptotic effect in rat model of PTSD. Erythropoietin Nano-capsules showed these effects by lower doses than erythropoietin

Keywords: Apoptosis, Erythropoietin, Nano-capsules, hippocampus, PTSD

Please cite this article as follows:

Bagherpour Zarchi M, Falahati A, Abrari K, Divsalar A, Bagherpour A, Effect of erythropoietin nano-capsules on anxiety caused by post-traumatic stress disorder (PTSD). ***Iran J Physiol Pharmacol*** 3 (2019) 288-297.

*Corresponding author: M. bagherpoor@guest.yazd.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-5098-0105)

www.SID.ir