DOI: 10.22100/jkh.v10i1.513

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

تأثیر بتا استرادیول بر نسبت Bcl2/BAX نورون‌های هیپوکمپ موش‌های صحرایی متعاقب القای فشار روانی پس از سانحه (PTSD)

شقایق صفاری[۱]، کتانه ابراری*[۲]، ایران گودرزی[۲]، آرزو رضایی[۲]، علی رشیدی‌پور[۳]، محمود الهدادی‌سلمانی[۲]

۱- دانشگاه دامغان- دانشکده زیست‌شناسی- گروه زیست عمومی- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری.

۲- دانشگاه دامغان- دانشکده زیست‌شناسی- گروه زیست عمومی- استادیار.

۳- دانشگاه علوم پزشکی سمنان- دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی- استاد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۶، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۳/۴/۱

چکیده

مقدمه: *فشار روانی پس از سانحه (PTSD) نوعی اختلال روانی است که در پی مواجه با سوانح شدید بروز می‌کند. در PTSD حجم هیپوکامپ متناسب با شدت بیماری، کاهش پیدا می‌کند. هدف مطالعه القای PTSD و ارزیابی شاخص‌های آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی در هیپوکمپ و متعاقب آن بررسی آثار تزریق مکرر بتا استرادیول بر شاخص‌های مذکور می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *از مدل SPS برای القای بیماری استفاده شد. به این ترتیب که موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار ۲ ساعت در مقیدکننده نگهداری شده و سپس ۲۰ دقیقه جهت شنای اجباری در آب قرار گرفتند. ۱۵ دقیقه بعد با اتر بیهوش شدند. یک روز بعد حیوانات در دستگاه ترس شرطی قرار گرفته و شوک الکتریکی دریافت کردند. ۷ روز بعد حیوانات بدون دریافت شوک مجدداً در دستگاه قرار گرفتند و میزان بی‌حرکتی آنها سنجیده شد. آزمون رفتاری دوم، ۴ روز بعد صورت گرفت. تزریق β-استرادیول (دوز ۴۵ µg/kg) یا روغن کنجد بلافاصله پس از شوک و در طول یک هفته روزانه یک‌بار صورت گرفت. سطوح پروتئین‌های Bcl2 و BAX هیپوکمپ با روش ایمنوهیستوشیمی بررسی شد.*

نتایج: *ترس شرطی شده در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری تشدید یافت. تزریق زیر جلدی β-استرادیول پاسخ‌های رفتاری ناشی از القاء PTSD را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در گروه بیمار، نسبت Bcl-2/Bax در هیپوکامپ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این اثر در گروه تیمار شده با β-استرادیول به‌طور معنی‌داری معکوس شد.*

نتیجه‌گیری: *β-استرادیول (دوز ۴۵ µg/kg) با افزودن نسبت Bcl-2/Bax در هیپوکامپ می‌تواند از آپوپتوز القا شده توسط مدل SPS جلوگیری کند.*

واژه‌های کلیدی: فشار روانی پس از سانحه، آپوپتوز، β-استرادیول، هیپوکمپ.

* **نویسنده مسئول:** دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، کدپستی: ۳۶۷۱۶-۴۱۱۶۷، **نمابر:** ۳۵۲۲۰۲۳۷- ۰۲۳، **E-mail:** Abrari@du.ac.ir

ارجاع: شقایق صفاری، کتانه ابراری، ایران گودرزی، آرزو رضایی، علی رشیدی‌پور، محمود الهدادی‌سلمانی. تأثیر بتا استرادیول بر نسبت Bcl2/BAX نورون‌های هیپوکمپ موش‌های صحرایی متعاقب القای فشار روانی پس از سانحه (PTSD). مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛۱۰(۱):۱-۱۰.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

فشار روانی پس از سانحه (PTSD) نوعی اختلال روانی است که افراد پس از مشاهده یا تجربه حوادثی دردناک از قبیل جنگ، بلایای طبیعی (سیل و زلزله و...)، تجاوز جنسی به آن مبتلا می‌شوند. برخی رویدادهای آسیب‌زا به‌طور مستقیم تجربه می‌شوند به‌عنوان مثال: جنگ، مورد حمله واقع شدن (تجاوز جنسی، حمله‌ی بدنی، غارت شدن و غیره)، ربوده شدن، به گروگان گرفته شدن، فجایع طبیعی یا ساخته‌ی خود انسان، سوانح شدید اتومبیل یا تشخیص ابتلا به یک بیماری خطرناک. برخی دیگر رویدادهای مشاهده شده هستند مثل مشاهده‌ی آسیب جدی یا مرگ غیرطبیعی شخصی دیگر در اثر حمله‌ی خشونت‌بار، تصادف، جنگ یا مشاهده‌ی غیرمنتظره‌ی یک جسد یا اعضای بدن مرده. رویدادهایی که توسط دیگران تجربه می‌شود و فرد از آنها اطلاع می‌یابد شامل حمله‌ی خشونت بار شخصی، سانحه‌ی شدید یا آسیب جدی برای یکی از اعضای خانواده یا دوست نزدیک، یا آگاهی از اینکه فرزند فرد به بیماری خطرناکی مبتلا است. این بیماری در جوامع بین‌المللی پس از جنگ ویتنام مورد توجه بسیاری قرار گرفت. در ایران نیز با عنوان موج انفجار بعد از جنگ عراق علیه ایران و بروز این اختلال در سربازان شرکت‌کننده در جنگ، شناخته شد (۱-۳).

علایم این بیماری شامل تداعی ذهنی، خواب‌های آشفته، بیش برانگیختگی، کابوس‌های شبانه، ترس، اجتناب از مکان‌های یادآوری‌کننده فشار روانی، گوش به زنگ بودن و پایداری تجربه ترومایی افراد می‌باشد (۲-۶). اختلالات حافظه در PTSD از ویژگی‌های برجسته‌ی این بیماری است که به‌عنوان علامت تشخیصی نیز به‌کار برده می‌شود. مطالعات بالینی بیماران مبتلابه PTSD نشان داد که این بیماران دو اختلال مهم در رابطه با حافظه دارند: اول تجربه‌ی مجدد و مداوم (Long-Lasting Re-experience) وقایع ترومایی و دوم اجتناب (Avoidance) از محرک‌هایی که موجب تروما شده‌اند، حتی در صورتی‌که بیماران به این تشخیص رسیده باشند که واقعه‌ی ترومایی تکرار نخواهد شد. بیماران خاطرات ناخوانده‌ی حادثه‌ی ترومایی را دائماً یادآوری می‌کنند و در عین حال توانایی به‌خاطر آوردن جنبه‌های مهمی از خاطرات مربوط‌به تروما را ندارند. این عدم فراموشی ترس و یا به عبارت دیگر تثبیت مجدد خاطرات نقش مهمی در گسترش علایم بیماری دارد (۷، ۱۸ و ۲۱).

شواهد زیادی وجود دارند مبنی بر اینکه نواحی متعددی از مغز در اثر ابتلا به PTSD تخریب شده و موجب بروز علایم بیماری می‌گردند (۳ و ۱۱). مطالعات تصویربرداری مغزی در بیماران PTSD نشان داد که نواحی مغزی درگیر در شکل‌گیری و تجلی ترس مثل آمیگدال و قشر سینگولا افزایش فعالیت دارند. نواحی دیگر مرتبط با فراموشی خاطرات مانند قشر پیش‌پیشانی، هم در حین ترس شرطی و هم در پاسخ به محرک‌های وابسته به تروما کاهش فعالیت نشان می‌دهند. یک ارتباط معکوس بین اندازه‌ی هیپوکامپ (درگیر در حافظه‌ی ترس شرطی شده‌ی محیطی) و پیشرفت PTSD وجود دارد (۲۱).

به موازات تحقیقات کلینیکی مطالعات روی حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت و نتایج مشابهی به‌دست آمد به این معنی که مدل‌های آزمایشگاهی PTSD نیز نشان‌دهنده‌ی پاسخ ترس شرطی قوی به واقعه‌ی ترومایی و کاهش توانایی فرونشاندن این پاسخ بودند.

این بیماری همراه با تغییرات مورفولوژیکی و ساختاری در هیپوکامپ است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که در بیماری PTSD، هیپوکامپ دچار آتروفی می‌گردد و حجم آن کاهش می‌یابد، علت این آتروفی به وضوح مشخص نیست اما تحقیقاتی که در این زمینه به انجام رسیده حاکی از آن است که آپوپتوز سلول‌های هیپوکامپ می‌تواند یکی از دلایل اصلی این کاهش حجم باشد. مطالعه بر روی مدل‌های حیوانی PTSD شاهدی بر این قضیه هستند به‌طوری‌که گفته شده است که تک استرس طولانی مدت (یکی از انواع مدل‌های آزمایشگاهی القاکننده PTSD) سبب کاهش حجم هیپوکامپ می‌شود که بر اثر آپوپتوز رخ می‌دهد و مسیر میتوکندریایی در آپوپتوز القا شده در تک استرس طولانی مدت شرکت می‌کند (۱۹ و ۲۰).

آپوپتوز یا همان مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی فرآیندی پیچیده است که به‌طور ژنتیکی کنترل می‌شود و در تکوین، هومئوستازی و بیماری‌ها حائز اهمیت است. این فرآیند در پاسخ به سیگنال‌های محیطی و یا توسط عوامل درونی به راه می‌افتد و برای از بین بردن سلول‌های سرگردان به روشی منظم و پاک طراحی شده است (۱۹ و ۲۰).

آپوپتوز ازطریق مکانیسم‌های مجزایی، بر طبق تحریکات آپوپتوزی متنوع صورت می‌گیرد. با این وجود دو مسیر اصلی برای آپوپتوز در نظر گرفته شده است: مسیر درونی (مسیر وابسته به میتوکندری) و مسیر بیرونی (مسیر وابسته به گیرنده).

این مسیرها توسط خانواده‌ای از آنزیم‌ها با نام کاسپازها تنظیم می‌شود. کاسپازهای آغازکننده در ابتدای فرآیند آپوپتوز فعال می‌شوند و پروتئازهایی کاملاً تخصص یافته هستند. کاسپازهای اجراکننده مراحل بعدی آپوپتوز را پیش می‌برند. پیام مرگ منجر به تخریب میتوکندری و رهایش سیتوکروم C از این اندامک می‌شود، اتصال سیتوکروم C به Apaf-1 و سپس اتصال به پیش‌کاسپاز ۹ سبب فعال‌سازی این آنزیم و شروع آپوپتوز می‌گردد (۱۹ و ۲۰).

آپوپتوز توسط مولکول‌های اجرایی آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی تنظیم می‌شود. این عوامل شامل پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl2 هستند. در بین پروتئین‌های این خانواده Bcl2 و BAX به‌خوبی شناخته شده‌اند.

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش میزان بیان Bcl2 سبب مهار آپوپتوز و در مقابل افزایش BAX منجر به افزایش مرگ سلولی از طریق آپوپتوز می‌گردد. الیگومریزاسیون BAX در غشاء میتوکندری موجب القای رهایش سیتوکروم C می‌شود. Bcl2 می‌تواند با BAX واکنش دهد و هترودایمر BAX:Bcl2 را به‌وجود آورد که بر خلاف همودایمر BAX: BAX مرگ سلولی را کاهش می‌دهد. نسبت Bcl2/BAX در امر آپوپتوز بسیار مهم است زیرا تعیین‌کننده‌ی رخداد آپوپتوز یا عدم آن است. این نسبت می‌تواند یک عامل کلیدی در تعیین میزان رهایش سیتوکروم C، فعالیت کاسپازها و آغاز آپوپتوز باشد (۷ و ۸).

مطالعات نشان داده‌اند که استرادیول بقای نورونی بعد از استرس اکسیداتیو، مسمومیت سلولی و قرار گرفتن در معرض بتا آمیلوئید را افزایش می‌دهد (۸ و ۲۲-۲۴). بیشتر این مضرات سلولی می‌تواند به برهم خوردن همئوستازی کلسیم نسبت داده شود. استروژن محافظتی در برابر سمیت سلولی ناشی از گلوتامات توسط افزایش حاد و ناگهانی کلسیم داخل سلولی است و آن را کاهش می‌دهد. اندامی که برای بافر کردن کلسیم در نورون حیاتی است میتوکندری است که جایگاهی برای انباشتن کلسیم است. جذب کلسیم میتوکندریایی در بالای آستانه‌ی کلسیم سیتوزولی صورت می‌گیرد و به آهستگی رها می‌شود و مقداری از کلسیم ذخیره می‌شود. این ظرفیت بالای میتوکندری برای Ca2+ می‌تواند مکانیسمی محافظتی برای نورون فراهم کند. با این وجود مقدار زیاد کلسیم میتوکندریایی ممکن است اثرات مخربی مثل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، دپلاریزه شدن غشای میتوکندری و مرگ سلولی را ایجاد کند.

نورون‌های هیپوکامپی که از قبل با استروژن تیمار شده‌اند و سپس در برابر سمیت گلوتامات قرار گرفتند کلسیم داخل سلولی آنها کمتر افزایش پیدا می‌کند و بقای نورونی نسبت‌به نورون‌هایی که تیمار نشده‌اند افزایش می‌یابد. استروژن می‌تواند همئوستازی کلسیم داخل سلولی را ارتقا ببخشد و نیز سبب بقای سلولی در حضور عوامل سمی که از طریق بر هم خوردن همئوستازی کلسیم منجر به مرگ نورونی می‌شوند گردد.

گفته شده که این اثر استروژن از طریق توانایی بافر کردن کلسیم میتوکندریایی اعمال می‌شود. Bcl2 نیز نقشی کلیدی در تنظیم کلسیم میتوکندریایی دارد. مطالعه بر روی این اندامک نشان داده‌اند که محافظت نورونی ایجاد شده توسط استروژن از طریق افزایش جداسازی کلسیم اضافی و نیز افزایش بیان Bcl2 اتفاق می‌افتد و توان میتوکندری را برای افزایش بار کلسیم ارتقاء می‌بخشد (۸).

استروژن آثارعمیقی روی ساختار و عملکرد هیپوکامپ دارد. این آثار به‌طور عمده از طریق گیرنده‌های هسته‌ای استروژن میانجیگری می‌شوند، این گیرنده‌ها ERα و ERβ هستند که با اجزاء کروماتین برهمکنش می‌دهند و رونویسی از ژن‌های هدف استروژن را تنظیم می‌کنند. علاوه‌براین استروژن ممکن است با اثر بر روی پروتئین‌های غشایی که مشابه گیرنده‌های استروژنی هستند برهم‌کنش دهد. به‌نظر می‌رسد برخی از گیرنده‌های غشایی در هیپوکامپ وجود دارد و می‌تواند در اثرات ژنومیک استرادیول روی عملکرد هیپوکامپ درگیر باشد (۲۵ و ۲۶).

مواد و روش‌ها

باتوجه به شیوع بالا PTSD در جوامع بشری و همچنین پایداری اختلالات فیزیولوژیکی و روان شناختی در افراد مبتلا، در دهه‌ی اخیر تلاش‌های بسیاری برای درمان بیماری PTSD صورت گرفته است. محور عمده‌ی این فعالیت‌های تحقیقاتی بر روی درمان عوارض ناشی از بیماری بوده است. پژوهش‌های کمتری بر روی جنبه‌های پیشگیرانه و نحوه‌ی جلوگیری از بروز بیماری PTSD پرداخته‌اند. همان‌طورکه گفته شد متعاقب القای PTSD در موش صحرایی نر، انتظار تشدید میزان حافظه‌ی ترس شرطی شده را در حیوان داریم. این افزایش ترس با مکانیسم‌هایی از قبیل تأثیر روی حیات سلول‌های هیپوکامپی و مرگ سلولی در این ناحیه می‌تواند صورت بگیرد. هدف از تحقیق حاضر این است که ضمن بررسی تراکم سلولی در هیپوکامپ در حیوانات دچار PTSD، اثر تزریق مکرر زیر جلدی استرادیول را مطالعه کنیم.

در این تحقیق از موش صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) تهیه شده از مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج، ایران) استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و با دسترسی آزاد به آب و غذای آماده (به‌صورت پلت) نگهداری شدند. در همه گروه‌های آزمایشی حیوانات ۲ ساعت قبل از آموزش در محیط آزمایشگاه قرار می‌گرفتند. اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات براساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان رعایت شد.

روش القا PTSD با استفاده از مدل تک استرس طولانی مدت (SPS): این مدل شامل سه مرحله است که در طی آن حیوانات سه نوع استرس قرارگیری در مقیدکننده (Restrainer)، شنای اجباری و بیهوشی با دی اتیل اتر را تجربه می‌کنند. به این ترتیب که حیوانات به مدت ۲ ساعت در مقیدکننده به‌صورت کاملاً بی‌حرکت قرار داده شدند. تنفس حیوانات از طریق سوراخ‌های کوچک تعبیه‌شده در مقیدکننده امکان‌پذیر بود. سپس بلافاصله به مدت ۲۰ دقیقه در ظرفی استوانه‌ای (به ابعاد ۲۴۰× ۵۰۰ برحسب میلی‌متر) که دو سوم آن از آب (۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد) پرشده بود، جهت شنای اجباری قرار گرفتند. حیوانات ۱۵ دقیقه بعد با دی اتیل اتر (Merck، آلمان) بیهوش شدند (۱۷ و ۲۷).

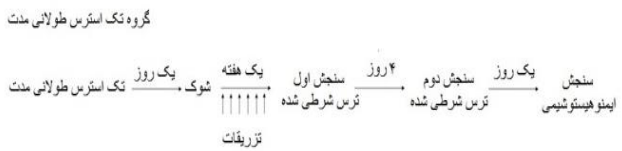
Archive of SID
www.SID.ir

القای شوک به‌وسیله دستگاه ترس شرطی (CFS): القای شوک به حیوان به‌منظور بررسی میزان شرطی شدن و پاسخ ترس صورت گرفت. در این پژوهش به‌منظور القاء شوک، یک روز بعد از ایجاد مدل SPS حیوانات به مدت ۴ دقیقه و ۴ ثانیه در CFS قرار گرفتند. به‌طوری‌که پس از ۱۸۰ ثانیه یک شوک الکتریکی ۱ میلی‌آمپری به مدت ۴ ثانیه دریافت وی دقیقه بعد از دستگاه خارج شدند.دستگاه ترس شرطی (Nuldos، هلند) به‌منظور اعمال شوک الکتریکی و ارزیابی میزان حافظه ترومایی مورداستفاده قرار گرفت. این دستگاه شامل محفظه مکعب مستطیل شکل از جنس پلاستیک شفاف به ابعاد cm ۴۵×۴۵×۴۷ است. ثبت میزان بی‌حرکتی حیوان یا Freezing (حذف همه اعمال حرکتی به‌جز حرکات تنفسی) با کمک دوربین به‌کاررفته در سقف این دستگاه انجام گرفت. افزایش میزان بی‌حرکتی نشان‌دهنده تشکیل حافظه ترومایی است. مدت‌زمانی که حیوان بی‌حرکت است نسبت‌به‌کل زمان قرارگیری در دستگاه، به‌صورت درصد توسط نرم‌افزار EthoVision (Version 3) متصل به دستگاه محاسبه می‌شود.

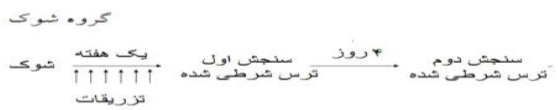
حیوانات به‌طور تصادفی به گروه‌هایی به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه‌های SPS: یک روز بعد از ایجاد مدل SPS (روز صفر آزمایش) به حیوانات شوک اعمال شد. بلافاصله بعد از شوک به نیمی از حیوانات روغن کنجد (گروه SPS + روغن کنجد) و به نیم دیگر بتا استرادیول (۹۰mg/kg) به‌صورت زیر جلدی تزریق شد (گروه SPS + بتا استرادیول). تزریق به‌صورت روزانه، در ۵ روز بعدی تکرار شد(روز اول تا ششم). تزریقات بین ساعات ۸ صبح تا ۱۲ هرروز انجام می‌گردید (شکل ۱).

گروه شوک: حیوانات این گروه بدون اینکه مراحل مدل SPS را تجربه کنند در روز صفر یک شوک الکتریکی دریافت کردند (با مشخصات عنوان‌شده در بالا). سپس در طی ۶ تزریق متوالی در ۶ روز روغن کنجد را به‌صورت زیر جلدی دریافت کردند (شکل ۲).



شکل ۱- زمان‌بندی آزمایش برای گروه‌های SPS



شکل ۲- زمان‌بندی آزمایش برای گروه‌های شوک

هفت روز پس از دریافت شوک، حیوانات به مدت ۵ دقیقه بدون دریافت شوک درون دستگاه ترس شرطی قرار گرفتند و درصد بی‌حرکتی آنها ثبت شد (آزمون شرطی اول) و چهار روز پس از آزمون رفتاری اول مجدداً آزمون رفتاری انجام شد تا دوام پاسخ رفتاری حیوانات بررسی گردد. بی‌حرکتی به معنی حذف کلیه فعالیت‌های حرکتی است به‌جز تنفس و درصد آن شاخصی است که با میزان ترس رابطه مستقیم دارد. ۲۴ ساعت بعد از به پایان رسیدن آزمون رفتاری مغز حیوانات برای پروسه‌ی بیوشیمیایی و بافت‌شناسی مورداستفاده قرار گرفت.

به‌منظور انجام ایمنوهیستوشیمی بافت‌ها پس از استخراج بین ۱ تا ۲ هفته در تثبیت‌کننده پارافرمالدهید ۴٪ ماندند، سپس مراحل آبگیری و پردازش روی آنها انجام گرفت. بافت‌ها در پارافین مذاب قالب‌گیری شدند. ۲۴ ساعت پس از قالب‌گیری و سرد شدن کامل، قالب‌ها آماده‌ی برش‌گیری شدند. برش‌گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم رفتاری با ضخامت ۵ میکرومتر انجام شد. برش‌ها پس از عبور از حمام آب گرم، زمانی که کاملاً بدون چروک بافتی بودند بر روی لام‌هایی که قبلاً آغشته به چسب پلی ال لایزین شدند قرار گرفتند. بعد از آماده شدن لام‌های حاوی برش‌های بافتی مراحل مطابق زیر انجام شد:

لام‌ها به‌منظور ثابت شدن کامل پارافین اطراف بافت، به مدت یک ساعت در فور ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس دو مرحله در زایلول و یک مرحله در محلول زایلول و اتانول قرار داده شدند. سپس در غلظت‌های کاهش یابنده‌ای از الکل و نهایتاً دو مرحله در آب مقطر قرار گرفتند.

سپس به‌منظور بازیابی آنتی‌ژن، لام‌ها درون ظرف حاوی بافر سیترات به مدت ۱۰ دقیقه بر روی گرم‌کننده قرار گرفتند. پس از اتمام این زمان لام‌ها درون بافر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط ماندند تا سرد شدند. لام‌ها پس از سرد شدن لازم است حداقل دو مرحله را در بافر TBS با PH = ۷/۴ هر بار حداقل به مدت ۵ دقیقه بگذرانند تا PH درون بافت به حالت طبیعی آن حفظ شود. مرحله‌ی بعد نیازمند ترکیبات غیرفعال‌کننده پروتئین (Protein blocker) است که به اشکال مختلفی پیشنهاد می‌شود. در تحقیق حاضر بافت‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با سرم NGS (Normal goat serum) با غلظت ۱۰ درصد در محیط مرطوب و تاریک انکوبه شدند. سپس آنتی‌بادی اولیه‌ی Bcl2 و BAXBAX Cat Number: ab7977) و (Bcl2 Cat Number: ab7973 استفاده شد.

آنتی‌بادی‌ها معمولاً با رقت ۰/۰۱ یا ۰/۰۲ در PBS یا NGS ساخته می‌شوند. از هر نمونه بافتی دو لام تهیه می‌گردد، یکی به‌عنوان نمونه اصلی و دیگری به‌عنوان کنترل منفی که تفاوت این دو فقط در

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده از آنتی‌بادی اولیه است به‌طوری‌که کنترل منفی فاقد آنتی‌بادی اولیه است.

به‌منظور انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه، نمونه‌ها یک شب در یخچال در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

روز بعد بافت‌ها با TBS شست‌وشو داده شدند (۲ یا ۳ مرحله، هرکدام حداقل ۵ دقیقه). پس از شست‌وشو آنتی‌بادی ثانویه فلوئورسنت (FITC) استفاده گردید. انکوباسیون با آنتی‌بادی ثانویه در فور ۳۷ درجه انجام شد. مقدار و زمان آنتی‌بادی مورد استفاده ۵۰ میکرولیتر و ۶۰ دقیقه بود. پس از این مجدداً شست‌وشو با PBS انجام شد. سپس با استفاده از چسب لامل روی لام قرار گرفته و با میکروسکوپ بررسی شدند (۴۹ و ۵۰).

آزمون‌های آماری

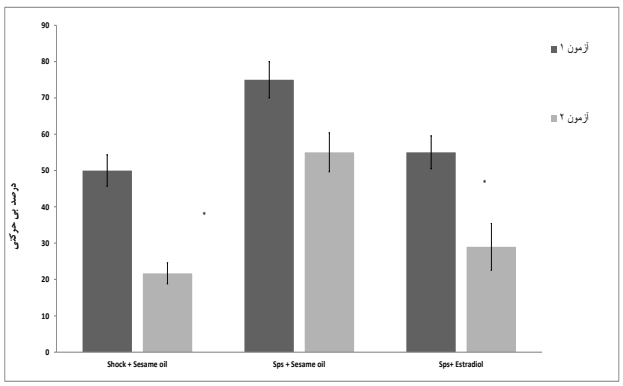
داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده است. آنالیز داده‌های آماری به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. ازآنالیز واریانس یک طرفه برای بررسی وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایشی استفاده شد. همچنین از آزمون تکمیلی توکی برای تعیین تفاوت بین هرکدام از گروه‌ها استفاده شد.

نتایج

پس از قرارگیری حیوانات در دستگاه ترس شرطی به مدت ۵ دقیقه، درصد بی‌حرکتی در سه گروه شوک + روغن کنجد به‌عنوان گروه شاهد، روغن کنجد SPS + به‌عنوان گروه بیمار و بتااسترادیول + SPS به‌عنوان گروه تیمار بررسی شد.

آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها وجود دارد. با آزمون تکمیلی توکی مشخص شد که میزان بی‌حرکتی گروه بیمار به‌طور معناداری ازگروه شاهد بیشتر است و از طرف دیگر، تزریق بتا استرادیول به میزان معنی‌داری سبب کاهش میزان بی‌حرکتی حیوانات SPS در مدل شد. به عبارت دیگر حیواناتی که مدل SPS را تجربه کرده‌اند در آزمون رفتاری که بعد از ایجاد مدل انجام شد میزان بی‌حرکتی بیشتری را نسبت‌به گروه شاهد نشان دادند و این به معنی افزایش حافظه‌ی ترس شرطی شده است. بنابراین اثر مداخله‌گر بتااسترادیول سبب جلوگیری از تشکیل حافظه‌ی ترس شد (شکل ۳).

مقایسه‌ی میزان بی‌حرکتی بین آزمون‌های رفتاری اول و دوم در هر سه گروه آزمایشی با کمک T-Test Paired انجام شد. نتایج نشان داد که در گروه شاهد کاهش معناداری در میزان بی‌حرکتی در آزمون دوم نسبت‌به آزمون اول صورت گرفته است (P=۰/۰۴) (شکل ۴). همچنین در گروه تیمار میزان بی‌حرکتی پس از دو آزمون کاهش معناداری پیدا کرد. اما در گروه بیمار تفاوت معنی‌داری بین آزمون اول و دوم مشاهده نشد که حاکی از پایداری حافظه‌ی ترس در این گروه است.



شکل ٤- مقایسه‌ی میزان پاسخ ترس شرطی. *P<۰/۰۵ در مقایسه با آزمون اول

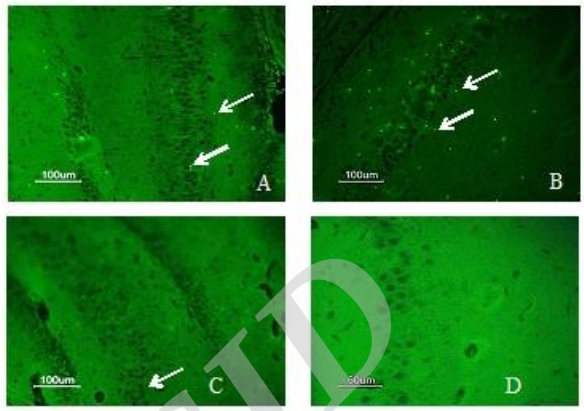
عامل ضد آپوپتوزی Bcl2 و عامل آپوپتوزی BAX نیز به‌روش ایمنوهیستوشیمی بررسی شدند. اجزای حساس و پاسخ‌دهنده به آنتی‌بادی اختصاصی Bcl2 و BAX در سیتوپلاسم سلول‌های هیپوکامپی به‌صورت نقاط درخشان مشاهده شدند. اشکال ۵ و ۶ میزان سطوح پروتئین‌های Bcl2 و BAX را به‌ترتیب در گروه‌های بیمار و تیمار نشان می‌دهند. در این اشکال، A و B مربوطبه بیان پروتئین BAX، C و D مربوطبه بیان پروتئین BCL2 می‌باشد. A و C مربوطبه ناحیه CA3، B و D مربوطبه ناحیه CA1 است. پیکان‌ها مورفولوژی سلول‌ها را نشان می‌دهد. مطالعه‌ی کیفی مقاطع نشان داد که در گروه بیمار میزان بیان پروتئین Bcl2 ناچیز و بالعکس بیان پروتئین BAX قابل توجه بود. در گروه تیمار میزان بیان پروتئین Bcl2 به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش و بالعکس میزان بیان پروتئین BAX کاهش پیدا کرد. به عبارت دیگر نسبت پروتئین‌های ضد آپوپتوزی به آپوپتوزی (Bcl2/BAX) در گروه تیمار به وضوح نسبت‌به گروه بیمار افزایش یافت.

بحث

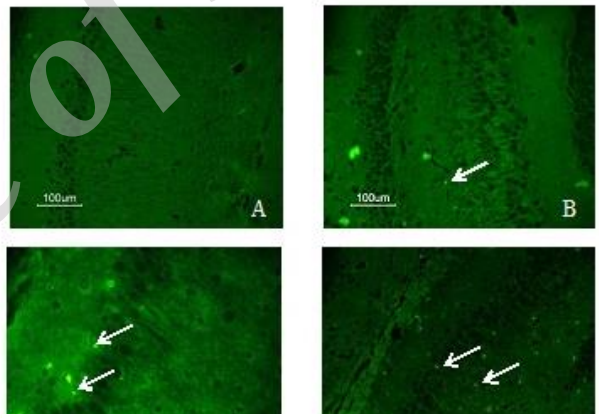
در این مطالعه ابتدا استفاده از مدل SPS به‌منظور القا PTSD و ۲۴ ساعت پس از SPS اعمال یک شوک الکتریکی ۴ ثانیه‌ای با هدف شکل‌گیری حافظه‌ی ترس شرطی در موش نر استفاده گردید. پس از

Archive of SID
www.SID.ir

یک هفته پاسخ ترس شرطی با اندازه‌گیری میزان بی‌حرکتی (حذف کلیه‌ی اعمال حرکتی به‌جز حرکات تنفسی) در دستگاه ترس شرطی سنجیده گردید و پایداری این پاسخ در دو آزمون متوالی بررسی شد.



شکل ۵- مقطع بافت هیپوکامپ در گروه SPS + روغن کنجد به روش ایمنوهیستوشیمی



شکل ٦- مقطع بافت هیپوکامپ در گروه SPS +بتا استرادیول به روش ایمنوهیستوشیمی

استفاده از مدل SPS پس ازیک هفته منجر به افزایش معنی‌دار در پاسخ ترس شرطی یا بی‌حرکتی، در موش نر گردید. میزان بی‌حرکتی گروه بیمار افزایش معنی‌داری را در آزمون اول در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. نتایج این مطالعه مؤید نتایج قبلی است که محققین نشان دادند مدل SPS، یک هفته پس از القا، منجر به افزایش پاسخ ترس شرطی می‌گردد (۱۵، ۱۶ و ۲۷).

مقایسه‌ی حافظه‌ی ترس شرطی در حیوانات گروه بیمار در آزمون اول و دوم نشان‌دهنده‌ی پایداری حافظه در حیوانات این گروه است. این نتیجه در راستای سایر مطالعاتی است که نشان می‌دهد حافظه‌ی حیوانات PTSD دچار اختلال می‌شود و فراموشی حافظه‌ی ترس حتی پس از آزمون‌های فراموشی مکرر رخ نمی‌دهد (۱). مقایسه‌ی حافظه‌ی ترس در طی دو آزمون در حیوانات گروه شاهد نشان داد که آزمون‌های فراموشی به‌طور معنی‌داری منجر به تضعیف حافظه‌ی ترس می‌شوند. این یافته نیز با سایر یافته‌ها در این زمینه انطباق دارد (۲۸- ۳۰).

مطالعات گذشته نشان داده است که استروژن در مراحل مختلف حافظه و نیز در انواع حافظه در انسان و حیوان نقش دارد (۳۱). عدم توانایی در خاموشی حافظه‌ی ترس یا به عبارتی فراموشی ترس شرطی شده، نقش مهمی در پاتولوژی اختلالات اضطرابی به‌ویژه PTSD دارد. همان‌طورکه قبلاً ذکر شد، نواحی مغزی مرتبط با یادگیری و تثبیت فراموشی ترس شرطی شده در این اختلالات درگیرمی باشند. این نواحی شامل هیپوکامپ، آمیگدال و قشر پیش پیشانی هستند (۱۰). محققین بر پایه‌ی مطالعات انجام شده بر این باورند که، در طی چرخه‌ی جنسی زنان، بین دوره‌های متفاوت از لحاظ سطح هورمون‌ها (یعنی تفاوت در سطح هورمون‌های جنسی در یک سیکل) تفاوت قابل‌توجهی در میزان ترس اضطراب و برانگیختگی مشاهده می‌شود (۳۲ و ۳۳). از سوی دیگر، نواحی مغزی درگیر در این فرآیندها حاوی تراکم بالایی از گیرنده هورمون‌های جنسی هستند (۳۴ و ۳۵). از این‌رو، تفاوت توزیع این گیرنده‌ها در دو جنس و اثر این هورمون‌ها روی اختلالات اضطرابی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است (۵، ۶، ۲۱، ۳۱، ۳۲ و ۳۶).

یافته‌های اخیر نیز نشان داد که تزریق استرادیول به حیوانات ماده و همچنین تزریق در ناحیه‌ی هیپوکامپ، فراموشی ترس شرطی شده‌ی زمینه و نیز تقویت طولانی مدت سیناپسی هیپوکامپی را تسهیل می‌کند (۲۱، ۳۶ و ۳۷).

تحقیقات مشابه در این زمینه نیز نشان داد که سطوح استروژن بالا مسئول فعالیت زیاد نواحی مغزی درگیر در فراموشی حافظه شامل هیپوکامپ و قشر پیش پیشانی است. استروژن ممکن است اثر مستقیم روی اجزای مولکولی شرکت‌کننده در شکل‌پذیری سیناپسی هیپوکامپ و قشر پیش پیشانی در طی فراموشی ترس داشته باشد. پیشنهاد شده است که استروژن نقش بسیار مهمی در تنظیم ترس دارد و سطح این هورمون اثر قابل‌توجهی در میزان توانایی فرد در مهار ترس ایفا می‌کند (۳۸ و ۳۹). یافته‌های این تحقیق نشان داد که تزریق بتا استرادیول بلافاصله پس از اعمال شوک (آموزش ترس شرطی) و طی پنج روز متعاقب آن از تشکیل حافظه‌ی ترس شرطی جلوگیری کرد. مقایسه‌ی میزان بی‌حرکتی گروه تیمار و بیمار در آزمون اول نشان داد که استرادیول به‌طورمعنی‌داری از تشکیل حافظه‌ی ترس شرطی در حیوانات PTSD جلوگیری کرد. این نتیجه با نتایج دیگران که مؤید اثر هورمون‌های جنسی زنانه بر تشکیل حافظه‌ی ترس است هم‌خوانی دارد (۶). حیواناتی که تزریق مکرر بتا استرادیول را تجربه کرده‌اند، اثر

Archive of SID
www.SID.ir

این هورمون را نه تنها حفظ کردند بلکه مقایسه‌ی نتایج آزمون اول و دوم نشان داد میزان بی‌حرکتی در حیوانات گروه تیمار در آزمون دوم نسبت‌به آزمون اول کاهش معناداری یافت. به عبارت دیگر روند بهبودی‌دهنده‌ی استرادیول نه تنها پایدار بوده بلکه تقویت نیز شده است. از آنجا که یکی از مشکلات اصلی بیماران مبتلابه PTSD اختلال در فراموشی حافظه‌ی ناشی از تروما است، به‌کار بردن بتااسترادیول پس از وقوع حوادث ترومایی در بهبود اختلال حافظه‌ی این بیماران می‌تواند نقش مؤثری داشته باشد.

شواهد زیادی درخصوص آثار گسترده‌ی استروژن بر انواع بافت‌ها و سیستم‌های موجودات زنده وجود دارد و بیانگر این واقعیت است که استروژن دارای فعالیتی ماورای عملکردهای تولیدمثلی است (۴۰ و ۴۱). کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های تخریب نورونی مانند آلزایمر و سکته‌های مغزی، تأثیر این هورمون روی سیستم عصبی را آشکار نمود. همچنین استرادیول که فرم فعال استروژن است، اخیراً به‌عنوان عامل محافظت‌کننده‌ی نورونی شناخته گردیده، مرگ نورونی را کاهش می‌دهد (۳۷، ۴۰، ۴۲ – ۴۴).

به‌نظر می‌رسد که استرادیول، اثر کاهش مرگ نورونی را از طریق تأثیر بر بیان عوامل آپوپتوزی خانواده‌ی Bcl2 اعمال می‌نماید. تحقیقات دیگری در این زمینه نیز نشان دادند که تیمار استرادیول سبب افزایش سطح پروتئین Bcl2 در سلول‌های عصبی می‌شود. همچنین این پروتئین با جلوگیری از فعالیت کاسپازها، مهار تشکیل رادیکال‌های آزاد، تنظیم جداسازی کلسیم و توقف فعالیت پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl2 مانند: BAX و Bad، سبب جلوگیری از مرگ نورونی می‌گردد. علاوه بر این استرادیول با تأثیر بر تعادل بین قابلیت زنده بودن سلول‌ها و آپوپتوز، آنها را در برابر مرگ سلولی محافظت می‌کند (۴۰ و ۴۵).

نتایج این مطالعه نیز نشان داد که در گروه بیمار، میزان بیان پروتئین Bcl2 ناچیز و بالعکس بیان پروتئین BAX به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد لیکن در گروه تیمار؛ میزان بیان پروتئین Bcl2 به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش و بالعکس میزان بیان پروتئین BAX کاهش یافت. به عبارت دیگر نسبت پروتئین‌های ضدآپوپتوزی به آپوپتوزی (Bcl2/ BAX) در گروه تیمار به وضوح نسبت‌به گروه بیمار افزایش یافت. یافته‌ی حاضر مؤید یافته‌های اخیر است که آثار ضد آپوپتوزی استرادیول را نشان می‌دهد.

مطالعات دیگری در این زمینه نشان داد که یکی از شاخصه‌های اصلی بیماری PTSD کاهش حجم هیپوکامپ وآتروفی بافت هیپوکامپ است (۴، ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴ و ۴۶). در مطالعه‌ی حاضر اگرچه حجم کلی هیپوکامپ اندازه‌گیری نشد ولی تعداد سلول‌های هیپوکامپ راست و چپ شمارش شد. به این ترتیب که پس از پایان آزمایشات رفتاری مغز حیوان به‌روش پرفیوژن تثبیت، برش‌های بافتی تهیه و تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ شمارش گردید.

نتایج نشان داد که با القای PTSD در گروه بیمار، نسبت‌به گروه شاهد، تعداد سلول‌ها (آتروفی بافت هیپوکامپ) در دو ناحیه‌ی CA1 و CA3 به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. همچنین در ناحیه‌ی شکنج دندانه‌ای اگرچه تعداد سلول‌ها کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود. این نتیجه مؤید نتایجی است که بیانگر کاهش تراکم سلولی در اثر ایجاد مدل SPS و القا آپوپتوز توسط این مدل است (۱۰، ۱۲ و ۱۳).

بتا استرادیول به‌عنوان یک محافظ نورونی قوی شناخته شده است و در نواحی متعددی از مغز از جمله هیپوکامپ گیرنده دارد (۳۷، ۴۶– ۴۸). اثرات بتا استرادیول بر تکثیر سلولی نیز از دیرباز مشخص شده است. در مطالعه‌ی حاضر از بررسی برش‌های بافتی گروه تیمار و مقایسه‌ی آن با گروه بیمار افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌ها در دو ناحیه‌ی CA1 و CA3 نتیجه شد. این اثر در ناحیه‌ی DG معنادار نبود. بررسی کیفی میزان پروتئین‌های Bcl2/BAX و انطباق آن با تراکم سلولی در هیپوکامپ، این ایده را تقویت می‌کند که استرادیول احتمالاً از طریق جلوگیری از فعالیت آپوپتوزی در هیپوکامپ بر تراکم سلولی در این ناحیه مؤثر بوده است.

ترس شرطی به‌صورت تشدید یافته در گروه بیمار مبتلابه PTSD در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. در حیوان نر تزریق مکرر زیر جلدی بتا استرادیول پس از شش بار تزریق با دوز ۴۵ µg/kg، پاسخ ترس شرطی را در مقایسه با گروه بیمار کاهش داد و سبب رفع اختلال در تشکیل حافظه‌ی ترومایی در طی آزمون‌های انجام گرفته شد. SPS نسبت عوامل Bcl2/BAX را در هیپوکامپ کاهش داد و نتایج نشان داد که آپوپتوز ناشی از SPS با تزریق بتا استرادیول معکوس شد. بنابراین اثرات نوروپروتکتیو β–استرادیول این امکان را فراهم می‌کند که از این دارو برای جلوگیری از اختلالات حافظه در PTSD استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم شقایق صفاری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی (فیزیولوژی) از دانشگاه دامغان بود. بدین‌وسیله از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی و از جناب آقایان دکتر قربانیان و دکتر لشکربلوکی به‌خاطر مشاوره علمی ارزنده‌شان تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Jovanovic T, Ressler KJ. How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. Am J Psychiatry 2010; 167:648-62.

Archive of SID
www.SID.ir

2. Li XH, Liu NB, Zhang MH, Zhou YL, Liao JW, Liu XQ. Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats. Chinese Medical Journal 2007;120:669-74.

3. Sherwin JE, Nemeroff CB. Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. Dialogues Clinical Neuroscience 2011;13:263-78.

4. Schuff N, Neylan TC, Lenoci MA, Du AT, Weiss DS, Marmar CR, et al. Stress disorder. Biol Psychiatry 2001;50:952-9.

5. Glover EM, Jovanovic T, Mercer KB, Kerley K, Bradley B, Ressler KJ, et al. Estrogen levels are associated with extinction deficits in women with posttraumatic stress disorder. Biol Psychiatry 2012;72:19-24.

6. Lebron-Milad K, Graham BM, Milad MR. Low estradiol levels: a vulnerability factor for the development of posttraumatic stress disorder. Biol Psychiatry 2012;72:6-7.

7. Bremner JD. Hypotheses and controversies related to effects of stress on the hippocampus: an argument for stress-induced damage to the hippocampus in patients with posttraumatic stress disorder. Hippocampus 2001;11:75-81.

8. Nilsen J, Diaz Brinton R. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:2842-7.

9. Bremner D, Elzinga B, Schmahl C, Vermetten E. Structural and functional plasticity of the human brain in posttraumatic stress disorder. Prog Brain Res 2008;167:171-86.

10. Shin LM, Rauch SL, Pitman RK. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. Ann N Y Acad Sci 2006;1071:67-79.

11. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM). American Psychiatric Press: The inststute;1994.

12. Samuelson KW. Post-traumatic stress disorder and declarative memory functioning: a review. Dialogues Clin Neurosci 2011;13:346-51.

13. Rao RP, Suvrathan A, editors. Post-traumatic stress disorder. 1th ed. New York: Humana Press;2009.p.151-184.

14. Bisson JI. Pharmacological treatment of post-traumatic stress disorder. Advances in Psychiatric Treatment 2007;13:119-26.

15. Wang H, Daiying Z, Bin H, Foxiao Q, Mingqi Zh, Yingliang W. Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: a new PTSD mouse model. Neurosci Res 2012;73:142-52.

16. Wang W, Liu Y, Zhenga H, Wang HN, Jin X, Chen YC, et al. A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. Neurosci Lett 2008;441:237-41.

17. Yamamoto Sh, Morinobu Sh, Takei Sh, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki Sh, et al. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. Depress Anxiety 2009;26:1110-7.

18. Yehuda R, Golier JA, Halligan SL, Harvey PD. Learning and memory in Holocaust survivors with posttraumatic stress disorder. Biol Psychiatry 2004;55:291-5.

19. Ding J, Han F, Shi Y. Single-prolonged stress induces apoptosis in the amygdala in a rat model of post-traumatic stress disorder. J Psychiatr Res 2010;44:48-55.

20. Li XM, 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 2010;40:248-55.

21. Lebron-Milad K, Milad MR. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. Biol Mood Anxiety Disord 2012;2:3.

22. McClure RE, Barha CK, Galea LA. 17 beta-Estradiol, but not estrone, increases the survival and activation of new neurons in the hippocampus in response to spatial memory in adult female rats. Horm Behav 2013;63:144-57.

23. Ormerod BK, Galea LA. Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. Neuroscience 2001;102:369-79.

24. Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. Neuroreport 2005;16:1599-603.

25. Cavus I, Duman RS. Influence of estradiol, stress, and 5-HT2A agonist treatment on brain-derived neurotrophic factor expression in female rats. Biol Psychiatry 2003;54:59-69.

26. Murphy DD, Cole NB, Greenberger V, Segal M. Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. J Neurosci 1998;18:2550-9.

27. Liberzon I, Krstov M, Young EA. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. Psychoneuroendocrinology 1997;22:443-53.

28. Golub Y, Maucha CP, Dahlhoffc M, Wotjaka CT. Consequences of extinction training on associative and non-associative fear in a mouse model of posttraumatic stress disorder PTSD. Behav Brain Res 2009;205:544-9.

29. Maren S, Chang CH. Recent fearis resistant to extinction. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:18020-5.

30. Pitman RK. Overview of biological themes in PTSD. Ann N Y Acad Sci 1997;821:1-9.

31. Kramar EA, Babayan AH, Gall CM, Lynch G. Estrogen promotes learning-related plasticity by modifying the synaptic cytoskeleton. Neurosci 2013;239:3-16.

32. Douma SL, Husband C, O'Donnell ME, Barwin BN, Woodend AK. Estrogen-related mood disorders: reproductive life cycle factors. ANS Adv Nurs Sci 2005;28:364-75.

33. Solomon MB, Herman JP. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. Physiol Behav 2009;97:250-8.

34. Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. Endocrinology 2003;144:2055-67.

35. McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, et al. Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:7093-100.

36. Milad MR, Zeidan MA, Contero A, Pitman RK, Klibanski A, Rauch SL, et al. The influence of gonadal hormones on conditioned fear extinction in healthy humans. Neuroscience 2010;168:652-8.

37. Bi R, Broutman G, Foy MR, Thompson RF, Baudry M. The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2000;97:3602-7.

38. Jovanovic T, Norrholm SD. Neural mechanisms of impaired fear inhibition in posttraumatic stress disorder. Front Behav Neurosci 2011;5:44.

39. Zeidan MA, Igoe SA, Linnman C, Vitalo A, Levine JB, Klibanski A, et al. Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. Biol Psychiatry 2011;70:920-7.

Archive of SID
www.SID.ir

40. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. J Neurosci 1999;19:6385-93.

41. Haraguchi Sh, Sasahara K, Shikimi H, Honda Sh, Harada N, Tsutsui K. Estradiol promotes purkinje dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis during neonatal life by inducing the expression of BDNF. Cerebellum 2012;11:416-7.

42. Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ. Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. Science 2010;328:1288-90.

43. Takuma K, Matsuo A, Himeno Y, Hoshina Y, Ohno Y, Funatsu Y, et al. 17 beta-estradiol attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress in ovariectomized rats. Neuroscience 2007;1469:60-8.

44. Inagaki T, Kaneko N, Zukin RS, Castillo PE, Etgen AM. Estradiol attenuates ischemia-induced death of hippocampal neurons and enhances synaptic transmission in aged, long-term hormone-deprived female rats. PLoS One2012;7:e38018.

45. Jakovljevic M, Brajkovic L, Jaksic N, Loncar M, Aukst-Margetić B, Lasić D. Posttraumatic stress disorders (PTSD) from different perspectives: a transdisciplinary integrative approach. Psychiatr Danub 2012;24:246-55.

46. De Nicola AF, Brocca ME, Pietranera L, Garcia-Segura LM. Neuroprotection and sex steroid hormones: evidence of estradiol-mediated protection in hypertensive encephalopathy. Mini Rev Med Chem 2012;12:1081-9.

47. Green PS, Simpkins JW. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. Int J Dev Neurosci 2000;18:347-58.

48. Hernández-Fonseca K, Massieu L, García de la Cadena S, Guzmán C, Camacho-Arroyo. Neuroprotective role of estradiol against neuronal death induced by glucose deprivation in cultured rat hippocampal neurons. Neuroendocrinology 2012;96:41-50.

49. Watson RE, Craven NM, Kang S, Jones CJ, Kielty CM, Griffiths CE. A short-term screening protocol, using fibrillin-1 as a reporter molecule, for photoaging repair agents. J Invest Dermatol 2001;116:672-678.

50. Nasiraei-Moghadam S, Kazeminezhad B, Dargahi L, Ahmadiani A. Maternal oral consumption of morphine increases Bax/Bcl-2ratio and caspase 3 activity during early neuralsystem development in rat. EmbryosJ Mol Neurosci 2010;41:156-164.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Knowledge & Health 2015; Vol 10, No 1
Shahroud University of Medical Sciences

DOI:10.22100/jkh.v10i1.513
Original Article

Effects of β-Estradiol on the level of Bcl2/BAX Expression in the Rat Hippocampus, after Induction of Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD)

Shaghayegh Saffari (M.Sc.)[1], Kataneh Abrari (Ph.D.)[2*], Iran Goudarzi (Ph.D.)[2], Arezu Rezaei (Ph.D.)[2], Ali Rashidy-Pour(Ph.D.)[3], Mahmoud Elahdadi Salmani (Ph.D.)[2]

1- Dept. of Physiology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
2- Dept. of Physiology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
3- Dept. of Physiology, Research Center Physiology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

Received: 26 March 2014**, Accepted:** 22 June 2014

Abstract:

Introduction: *Post-traumatic stress disorder (PTSD) is an anxiety disorder, that can occur in people who have experienced or witnessed a natural disaster, serious accident or other life-threatening events. It's most important characteristics are memory disorders and hippocampus is one of the essential structure in this relation. Traumatic events cause apoptosis and alter the expression of neurotrophic factors in hippocampus. Therefore, the aim of this study was the examination of the fear memory and evaluation the effects of multiple β-Estradiol injections on behavioral responses in the rat hippocampus, after induction of PTSD. Moreover, we evaluated, the biochemical and histological mechanisms of β-Estradiol on hippocampus.*

Methods: *We used single prolonged stress (SPS), for PTSD induction. One day after SPS, rats received electrical foot shock within shock chamber. To test the conditioned fear responses one week later, rats were placed back in the chamber without any shock, and freezing behavior was defined. Another fear test was done 4 days after the first test. Animals received multiple subcutaneous injections of β-estradiol (45µg/kg) or sesame oil, immediately after shock and in these 7 days, between shock and test. Bcl-2 and BAX were detected by immunohistochemistry.*

Results: *Main findings of the present study are: Exaggerated fear response was seen in PTSD group as compared with control group. Moreover, β-estradiol administration reduced behavioral responses, caused by PTSD induction. SPS decreased the Bcl2/BAX ratio and apoptosis induced by SPS in hippocampus. This effects reversed by β-estradiol injections.*

Conclusion: *β-estradiol could be useful for treating the memory disorders in PTSD.*

Keywords: Post-traumatic stress disorder, β-estradiol, BDNF, Apoptosis.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** K. Abrarii**, Email:** abrari@du.ac.ir*

Citation: Saffari Sh, Abrari K, Rezaei A, Rashidy-Pour A, Goudarzi I, Elahdadi Salmani M. Effects of β-estradiol on the level of bcl2/bax expression in rat hippocampus, after induction of post-traumatic stress disorder (PTSD). Journal of Knowledge & Health 2015;10(1):1-10.

Archive of SID

www.SID.ir