

مقاله پژوهشی

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

مسعود باقرپور زارچی^{۱*}، علی فلاحتی^۱، کتانه ابراری^۲، عادلہ دیوسالار^۳، علی باقرپور^۴

۱. گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۲. دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

۳. گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، 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 هیپوکامپ می‌گردد. اریتروپویتین به عنوان یک فاکتور حفاظت عصبی می‌تواند از مرگ نورونی جلوگیری کند. اما این پروتئین توانایی عبور از سد خونی مغزی را ندارد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات ضدآپوپتوز نانو کپسول 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، نانو کپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین با دوز ۵۰۰۰ IU/kg را به ترتیب ۱ و ۳ بار به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. یک هفته بعد حیوانات مورد آزمون رفتاری، شمارش سلول‌های هیپوکامپ و بررسی سطوح بیان ژن‌های *bcl2* و *bax* قرار گرفتند.

یافته‌ها: مطالعات رفتاری نشان داد نانو کپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین، پاسخ‌های رفتاری اضطراب و ترس حساس شده را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش ($p < 0.001$) دادند. همچنین کاهش تعداد سلول‌های هیپوکامپ ناشی از مرگ سلولی بهبود یافت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داد که PTSD در هیپوکامپ میزان بیان ژن *bcl2* 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 نانو کپسول اریتروپویتین دارای اثرات ضد اضطراب 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، هیپوکامپ، 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^۱ 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، نشانه‌های 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

^۱Post traumatic stress disorder (PTSD)

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^۲ 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 20 ± 200 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

در می‌آورد. فرد به‌صورت ترس و درماندگی به این تجربه پاسخ می‌دهد به‌طوری‌که روابط بین فردی دچار آسیب می‌شود. علائم 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^۲ 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 *bcl2* یکی از مهمترین مکانیسم‌های بررسی‌شده در خواص ضد آپوپتوز اریتروپویتین است به‌طوری‌که بیان ژن ضد آپوپتوز *Bcl2* 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 ۴-۶ 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

³ n-erythropoietin (n-EPO)

² Erythropoietin (EPO)

از رنگ‌آمیزی، از هر نمونه پنج برش بافتی انتخاب شد و با استفاده از بزرگمایي 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 هیپوکامپ آن‌ها جدا شد. سپس هیپوکامپ‌ها 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.

گروه‌های آزمایشی

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

آزمون‌های آماری

در این تحقیق داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ 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. $p < 0.05$ 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

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^۴ استفاده شد. بدین‌منظور موش صحرایی به مدت دو ساعت درون مقیدکننده^۵ قرار داده شد. بلافاصله بعد از این مرحله موش‌ها به مدت ۲۰ دقیقه شنای اجباری انجام دادند [۱۱].

از آزمون زمینه باز^۶ 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^۷ 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 همتوکسلین و ائوزین

از روش رنگ‌آمیزی همتوکسلین و ائوزین برای رنگ‌آمیزی سلولهای عصبی و شمارش سلولی استفاده شد. پس

⁴ Single-prolonged stress (SPS)

⁵ Restraint

⁶ Open field

⁷ Elevated plus-maze

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

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

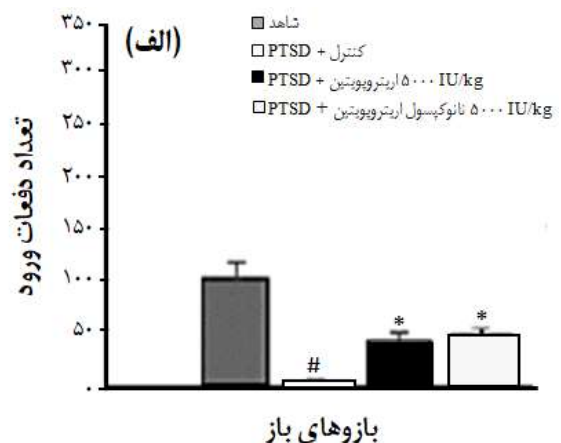
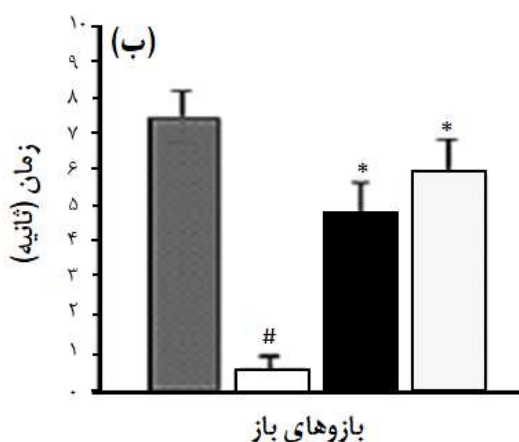
شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0/05$). نانوکپسول اریتروپویتین به‌طور معنی‌داری تعداد دفعات ورود به بازوهای باز را در مقایسه با گروه PTSD، افزایش داد ($p < 0/05$). تفاوت معنی‌داری در دو شاخص مذکور بین دو گروه تیمار شده با نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین وجود نداشت (شکل ۱ب).

سنجش ترس حساس شده توسط آزمون زمینه باز

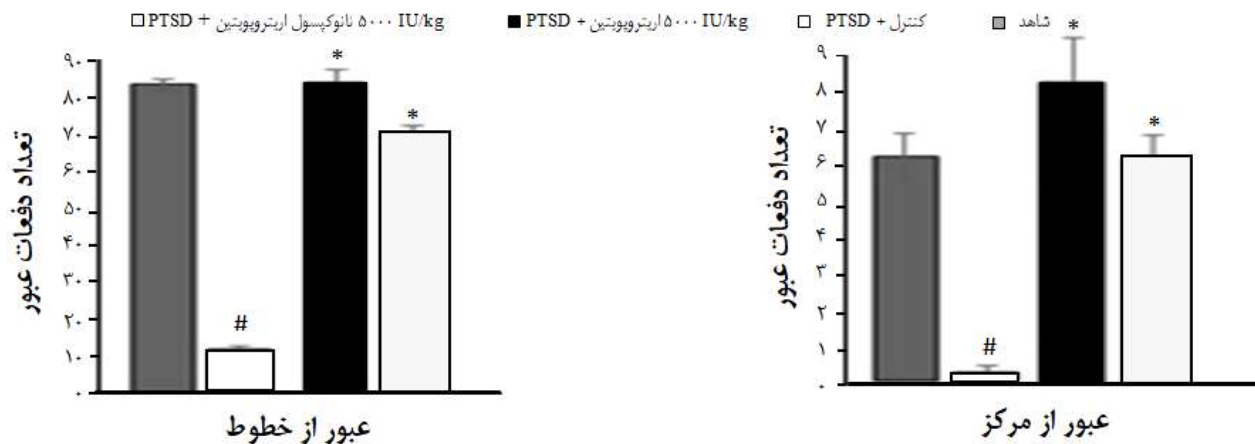
آزمون زمینه باز وسیله‌ای برای ارزیابی میزان ترس حساس شده است. افزایش دو شاخص عبور از خطوط زمینه و همین‌طور عبور از مربع مرکزی نشان‌دهنده کاهش ترس حساس شده در حیوان است (نمودار ۲). آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در هر دو پارامتر مذکور به ترتیب با مقادیر معنی‌داری [$F(30,5) = 9/065, p = 0/000$] و [$F(30,5) = 57/606, p = 0/000$]

تعداد دفعات ورود به بازوهای باز بررسی گردید. آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که گروه‌های مختلف از نظر زمان گذرانده شده در بازوی باز بایکدیگر تفاوت معنادار دارند [$F(5,30) = 20/285, p = 0/000$]. 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 ($p < 0/05$). نانوکپسول اریتروپویتین به‌طور معنی‌داری زمان گذرانده شده در بازوهای باز را در مقایسه با گروه PTSD، افزایش داد ($p < 0/05$). 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 [$F(30,5) = 6/212, p = 0/000$]. به‌طوری‌که حیوانات گروه PTSD در تعداد دفعات ورود به بازوهای باز در مقایسه با گروه



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 $\pm$ انحراف معیار از میانگین در ده موش نمایش داده شده‌اند. #: $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل PTSD. * : $p < 0/05$ در مقایسه با گروه شاهد.

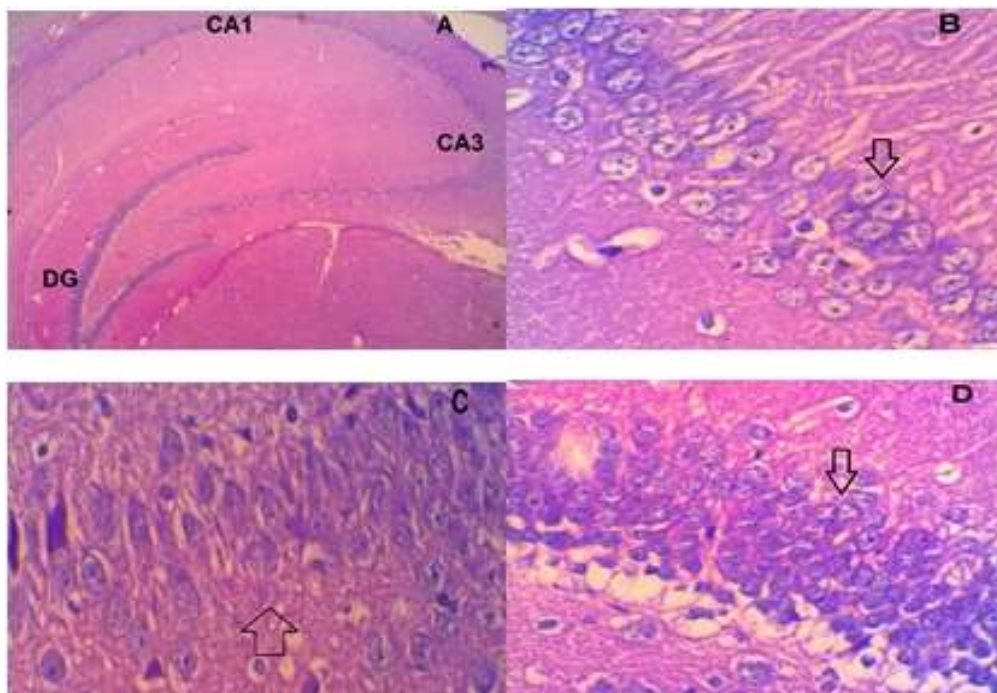


نمودار ۲- اثر نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین بر فعالیت‌های عبور از خطوط و تعداد دفعات عبور از مربع مرکزی آزمون زمینه باز. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در ۱۰ موش نمایش داده شده‌اند. # : $p < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد. * : $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل PTSD.

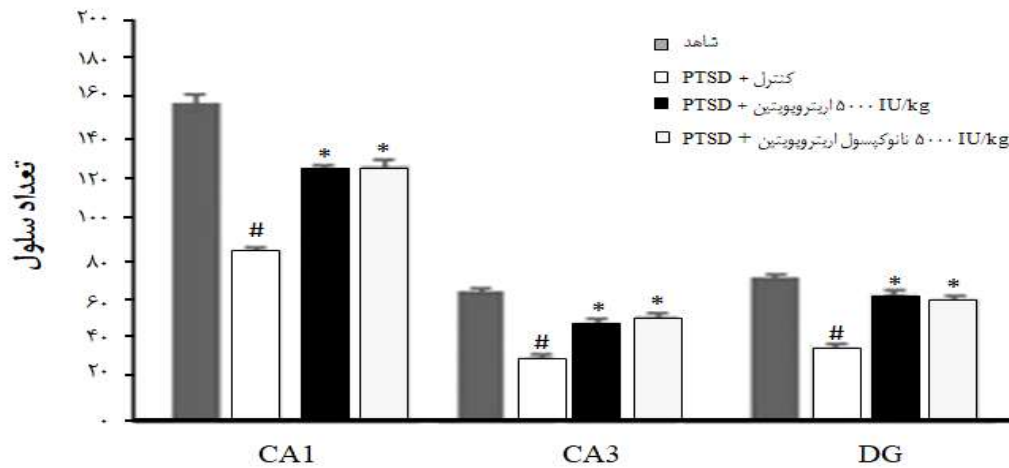
مطالعات بافتی

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 دنداندار و سلول‌های هرمی CA1 و CA3 را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تعداد سلول‌ها در ناحیه CA1

بین گروه‌ها وجود دارد. آزمون تکمیلی توکی افزایش معنی‌داری را در مقدار عبور خطوط زمینه‌ای و عبور از مربع مرکزی در تمام گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$). القاء PTSD سبب کاهش معنی‌دار در شاخص‌های بالا در مقایسه با گروه شاهد شد ($p < 0.05$). تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های مذکور بین گروه‌های تیمار شده با نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین وجود نداشت (نمودار ۲).



شکل ۱- اثر اریتروپویتین بر تعداد سلول‌ها در هیپوکامپ. A: هیپوکامپ (با بزرگنمایی ۱۰×). B: ناحیه CA1. C: ناحیه CA3 و D: سلول‌های DG (با بزرگنمایی ۴۰×). فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌ها هستند.



نمودار ۳- مقایسه تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکمپ در موش‌های دریافت‌کننده اریتروپویتین. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در ۱۰ موش نمایش داده شده‌اند. # $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل PTSD. * $p < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد.

معنی‌دار بین گروه‌ها است [$F(6,5) = 1589/811, p = 0.000$]. با توجه به نمودار ۴، نتایج آنالیز تکمیلی نیز نشان داد که گروه PTSD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری از لحاظ بیان دارد ($p < 0.05$). بیان ژن *bcl2* در گروه‌های تیمار شده با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه PTSD یافته است ($p < 0.05$). آنالیز واریانس یک‌طرفه برای بیان ژن *bax* نیز نمایانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است [$F(6,5) = 216/551, p = 0.000$]. نتایج آنالیز تکمیلی نیز نشان داد که گروه PTSD نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری از لحاظ بیان دارد ($p < 0.05$). بیان ژن *bax* در گروه‌های تیمار شده با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه PTSD یافته است ($p < 0.05$).

بحث

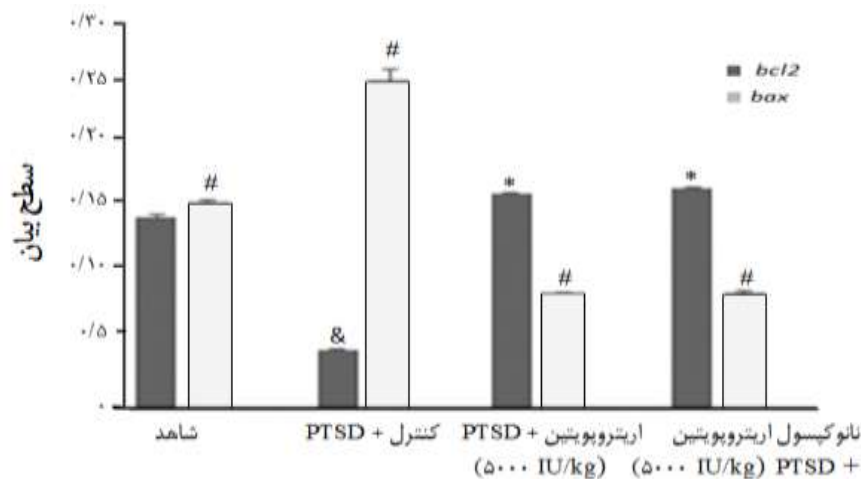
نتایج مطالعات ما نشان داد میزان اضطراب و ترس حساس شده در گروه PTSD به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ایت یافته مطابق با نتایج سایر مطالعه مشابه می‌باشد. [۱۱]. از طرفی میزان اضطراب و ترس حساس شده در گروه‌های ۵۰۰۰ IU/kg اریتروپویتین و ۵۰۰۰ IU/kg نانوکپسول اریتروپویتین کاهش پیدا کرد و همچنین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

نشان‌دهنده افزایش تعداد سلول‌ها متعاقب تیمار با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین و تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف آزمایشی است [$F(30,5) = 160/075, p = 0.000$]. آزمون تکمیلی توکی نشان داد معنی‌داری نسبت به گروه PTSD یافته است ($p < 0.05$) و گروه PTSD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری از لحاظ تعداد سلول نشان داد ($p < 0.05$). آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تعداد سلول‌ها در ناحیه CA3 نیز نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف آزمایشی است [$F(30,5) = 74/228, p = 0.000$]. آزمون تکمیلی نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌ها در تمام گروه‌ها نسبت به گروه PTSD است ($p < 0.05$) و گروه PTSD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری از لحاظ تعداد سلول نشان داده است ($p < 0.05$).

آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تعداد سلول‌ها در ناحیه DG نمایانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است [$F(30,5) = 59/984, p = 0.000$]. نتایج آنالیز تکمیلی مشابه سایر نواحی هیپوکمپ است یعنی تعداد سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده با اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه PTSD یافته است ($p < 0.05$) و گروه PTSD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری از لحاظ تعداد سلول نشان داد ($p < 0.05$).

نتایج مولکولی

آنالیز واریانس یک‌طرفه برای ژن *bcl2* نمایانگر وجود تفاوت



نمودار ۴- اثر نانوکپسول اریتروپویتین و اریتروپویتین بر بیان ژن های *bcl2* و *bax*. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در ۵ موش نمایش داده شده اند. ^s و [&]: تفاوت معنی دار با گروه شاهد معادل خود با $p < 0.05$. * و #: تفاوت معنی دار با گروه PTSD معادل خود با $p < 0.05$.

۵۰۰۰ IU/kg اریتروپویتین و نانوکپسول اریتروپویتین، افزایش معنی داری در تعداد سلول ها در ناحیه های CA1، DG و CA3 نسبت به گروه PTSD دارند ولی این دو گروه نسبت به هم تفاوت معنی داری را نشان ندادند که این یافته منطبق با نتایج آزمون های رفتاری است و نشان می دهد که با دوز ۵۰۰۰ IU/kg ۵۰۰۰ نانوکپسول اریتروپویتین مانند دوز ۵۰۰۰ IU/kg اریتروپویتین باعث کاهش آتروفی هیپوکمپ و در نتیجه مهار لقاء PTSD شده است.

مطالعات گذشته نشان داده است که القا PTSD میزان بیان ژن *bcl2* را کاهش و بالعکس بیان *bax* را افزایش می دهد [۲۱، ۲۲]. در مطالعه ما نیز در گروه PTSD میزان بیان ژن *bcl2* به طور قابل ملاحظه ای کاهش و بالعکس میزان بیان ژن *bax* افزایش پیدا کرد. به عبارت دیگر، نسبت بیان ژن ضد آپوپتوزی به آپوپتوزی (*bcl2/bax*) در گروه PTSD به وضوح نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است ولی این نسبت در گروه های ۵۰۰۰ IU/kg اریتروپویتین و ۵۰۰۰ IU/kg نانوکپسول اریتروپویتین به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، در حالی که این شاخص در دو گروه ذکر شده با هم تفاوت معنی داری نداشتند. این نتایج نشان می دهد 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 می رفت نانوکپسول اریتروپویتین احتمالاً به دلیل تحویل اریتروپویتین به مغز نقش موثری در کاهش دوز مصرفی

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 حامل های سورفاکتانت در آسیب مغزی اشاره شده و این که حامل بدون تغییر در ساختار دارو آن را به مغز تحویل داده است [۱۷].

مطالعات گذشته کاهش خطر ابتلا به بیماری های آسیب مغزی مانند آلزایمر و سکت های 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 می شود. به طوری که تیمار دارویی با اریتروپویتین سبب افزایش سطح پروتئین *bcl2* و کاهش سطح پروتئین *bax* در سلول های عصبی می شود [۱۸].

مطالعات پیشین نشان داده است که بیماری PTSD باعث کاهش حجم هیپوکمپ و آتروفی بافت هیپوکمپ می شود [۱۹]. در پژوهش حاضر هر چند حجم کلی هیپوکمپ اندازه گیری نشد ولی تعداد سلول ها در نواحی مختلف هیپوکمپ شمارش گردید. همانطور که در نتایج مشاهده شد، القای PTSD منجر به کاهش معنی دار تعداد سلول ها 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 برش های بافتی در گروه های تیمار دارویی و مقایسه آن ها با یک دیگر دیده می شود که هر دو گروه

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.

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 اریتروپویتین 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 احتمالاً 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

فهرست منابع

- [1] Halbreich U, Anxiety disorders in women: a developmental and lifecycle perspective. *DepressAnxiety* 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

- 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, Posttraumatic 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.

Research paper

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

Masoud Bagherpour Zarchi¹, Ali Falahati¹, Kataneh Abrari², Adeleh Divsalar³, Ali Bagherpour⁴

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)