

مقاله پژوهشی

بررسی مکانیسم اثرات حفاظتی تزریق فینگولیمود متعاقب تشنج‌های دوره نوزادی القاشده توسط هایپوکسی در موش‌های صحرایی نر و ماده بالغ: نقش احتمالی فاکتور رشد عصب مشتق از مغز و نیتریک اکساید

کوثر باورصاد^{۱،۲}، ندا یزدان‌فر^۳، یعقوب فرهود^{۱،۲}، علیرضا سرکاکی^{۱،۲}، سمیره غفوری^{۱،۲*}

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲. مرکز تحقیقات فیزیولوژی خلیج فارس، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

پذیرش: ۹ آذر ۱۴۰۲

دریافت: ۲۰ آبان ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: تشنج‌های نوزادی القاشده توسط هایپوکسی مکانیسم‌های التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو را فعال می‌کند و منجر به آسیب مغزی می‌شود. باتوجه به حساسیت بالای مغز نابالغ به متابولیسم بی‌هوازی در زمان هایپوکسی، هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی مکانیسم اثرات حفاظتی فینگولیمود در تعدیل عوارض ناشی از تشنج‌های دوره نوزادی القاشده توسط هایپوکسی در زمان بلوغ می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۴۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار نر و ماده، در ۴ گروه قرار گرفتند: ۱. کنترل-سالین، ۲. کنترل- فینگولیمود، ۳. هایپوکسی-سالین و ۴. هایپوکسی- فینگولیمود. تشنج‌های دوره نوزادی ۱۰ روز پس از تولد با قرار گرفتن نوزادان در محفظه هایپوکسی به مدت ۱۵ دقیقه القا شدند. در گروه‌های آزمایشی مختلف فینگولیمود یا سالین از روز ۱۰ الی ۲۱ بعد از تولد تزریق شدند. سپس ۶۰ روز بعد از تولد نمونه‌های هیپوکامپ استخراج شدند و برای ارزیابی‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد فینگولیمود از افزایش سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز و نیتریک اکساید در هیپوکامپ هر دو گروه هایپوکسی نر و ماده به‌صورت معنی‌داری جلوگیری می‌نماید ($p < 0.05$). اگرچه در گروه هایپوکسی-سالین ماده این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: تجویز داروی فینگولیمود می‌تواند عوارض ناشی از تشنج‌های دوره نوزادی را احتمالاً از طریق کاهش بیان فاکتور رشد عصب مشتق از مغز و اثر جبرانی نیتریک اکساید در زمان بلوغ تعدیل نماید.

واژه‌های کلیدی: استرس اکسیداتیو، التهاب، تشنج‌های دوره نوزادی، فاکتور رشد عصب مشتق از مغز، فینگولیمود

مقدمه

حافظه، نقایص شناختی و ناهنجاری‌های رفتاری در ادامه زندگی همراه است، اما تا نون روش درمانی مناسبی برای این بیماری مشخص نشده است [۲]. گزارش‌ها حاکی از آن است که به‌دنبال تشنج‌های دوره نوزادی سلول‌های گلیال، یعنی میکروگلیا و آستروسیت‌ها فعال می‌شوند و ترشح سایتوکین‌ها التهابی (بعد از

تشنج یکی از شایع‌ترین اختلالات عصبی نوزادان در نظر گرفته می‌شود و شیوع آن در نوزادان نارس تا ۱۰ درصد نیز گزارش شده است. در میان عوامل اتیولوژیک متعدد این بیماری، هایپوکسی شایع‌ترین علت القای تشنج در نوزادان^۱ است [۱]. اگر چه تشنج‌های دوره نوزادی با اختلالات عصبی، نظیر اختلال

¹Hypoxia-induced neonatal seizure (HINS)

درمان‌های سنتی تشنج‌های نوزادی توسط فنوباریتال، درحال حاضر، تلاش‌های زیادی برای یافتن راهکارهای درمانی وجود دارد [۸]. فینگولیمود، داروی تاییدشده توسط سازمان غذا و دارو، گیرنده اسفنگوزین-۱-فسفات^۵ را مهار می‌کند که منجر به کاهش سایتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شود. توانایی فینگولیمود برای نفوذ به سد خونی مغزی، آن را به‌عنوان یک کاندید برای اختلالات عصبی پیشنهاد می‌کند [۹]. نتایج مطالعه پیشین ما اثرات تزریق فینگولیمود (روزهای ۱۰ الی ۲۱ بعد از تولد) در تعویق روند صرع‌زایی و کاهش مدت زمان تشنج‌های موضعی^۶ و عمومی^۷ حیوانات بالغ را در مدل حیوانی تشنج‌های دوره نوزادی القاشده توسط هایپوکسی نشان داد و همچنین ثابت شد تزریق فینگولیمود در دوره نوزادی به‌صورت معنی‌داری اختلالات رفتاری از جمله اضطراب و نیز حافظه شناختی را به‌دنبال القا تشنج‌های دوره نوزادی در روز ۶۰ بعد از تولد در هر دو جنس نر و ماده بالغ کاهش می‌دهد [۱۰]. لذا، در مطالعه حاضر، به بررسی مکانیسم‌های مولکولی احتمالی اثرات ضدصرع‌زایی، ضد تشنجی و نیز تعدیل اختلالات شناختی فینگولیمود در روز ۶۰ بعد از تولد به‌دنبال القا مدل تشنج‌های دوره نوزادی القاشده توسط هایپوکسی (در روز ۱۰ بعد از تولد) در دو جنس نر و ماده پرداختیم و به‌این‌منظور غلظت فاکتورهای استرس اکسیداتیو، سطح نیتریک اکساید و نیز غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز در ناحیه هایپوکمپ مغز اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

تشنج‌های دوره نوزادی القاشونده توسط هایپوکسی

مجوز انجام این مطالعه از کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی (IR.AJUMS.ABHC.REC.1399.045) اخذ شد و آزمایشات مطابق با اصول کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام شد. نوزادان موش‌های صحرایی نژاد ویستار از مرکز حیوانات دانشگاه تهیه شدند و در چرخه استاندارد ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی (۷ صبح تا ۷ بعد از ظهر)، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند.

چند ساعت) و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی (بعد از ۲۴ ساعت) را افزایش می‌دهند، چنانچه فعال‌شدن آبشارهای مسیریهای سیگنالینگ التهاب سبب تشدید آسیب‌های مغزی به‌دنبال تشنج می‌شود [۳]. استرس اکسیداتیو ارتباط نزدیکی با التهاب عصبی دارد و می‌تواند باعث آپوپتوز سلولی و نکروز شود. عوامل متعددی نظیر نیازهای گسترده به اکسیژن و گلوکز، غلظت کم عوامل آنتی‌اکسیدانی، غلظت آهن داخل‌سلولی بالا و اسیدهای چرب غیراشباع در غشای عصبی، آسیب‌پذیری مغز درحال‌رشد را در برابر استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهند. علاوه‌براین، با تغییر متابولیسم هوازی به بی‌هوازی به‌دنبال هایپوکسی، غلظت رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و حساسیت مغز نابالغ نسبت به استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد، به‌گونه‌ای که یک دوره هایپوکسی برای مدت کوتاه می‌تواند سبب اختلالات طولانی‌مدت و برگشت‌ناپذیر در عملکرد سیستم عصبی شود [۴]. متعاقب تشنج با فعال‌شدن واسطه‌های التهابی، آبشارهای سیگنالی دیگری نیز فعال می‌شوند که التهاب و استرس اکسیداتیو را تشدید می‌کنند. فاکتور رشد عصب مشتق از مغز^۲ به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت رشد، انعطاف‌پذیری و بقای عصبی، سبب افزایش تحریک‌پذیری مغز می‌شود. چنانچه گزارش‌ها حاکی از آن است که تحریک مسیر سیگنالینگ فاکتور رشد عصب مشتق از مغز/تیروزین کیناز^۳ و اینترلوکین-۱^۴، واسطه‌های اولیه التهابی را در مدل تشنج پنتیلین تترازول تعدیل می‌کنند [۵]. ازسوی دیگر، هایپوکامپ به‌علت وسعت مدارهای نورونی تحریکی و تعداد زیاد گیرنده‌های سایتوکاین‌های التهابی یک ساختار بسیار آسیب‌پذیر در تشنج می‌باشد و با تغییرات مورفولوژیکی و مولکولی به‌صورت طولانی‌مدت تحت تأثیر عوارض ناشی از هایپوکسی قرار می‌گیرد [۶]. همچنین، شواهد بسیاری حاکی از مقاومت بیشتر جنس ماده نسبت به جنس نر در برابر هایپوکسی و آسیب‌های مغزی ناشی از آن می‌باشد. درمقابل، ثابت شده است نوزادان پسر به‌دنبال هایپوکسی ظرفیت کمتری برای بهبود مغز دارند و حساسیت بالاتری نسبت به استرس اکسیداتیو به‌دنبال هایپوکسی نشان می‌دهند و این موضوع آسیب‌پذیری آن‌ها را در برابر آسیب‌های مغزی و اختلالات شناختی متعاقب آن افزایش می‌دهد [۷].

باتوجه‌به گزارش‌های متعدد مبنی بر پیامدهای زیانبار

⁵ Sphingosine-1-phosphate receptor

⁶ Local seizures

⁷ Generalizes seizures

² Brain derived neurotrophic factor (BDNF)

³ BDNF/tyrosine kinase

⁴ Interleukin-1 β

انجام تست‌های بیوشیمیایی به روش الیزا^۸

لوله‌های حاوی نمونه‌های هیپوکامپ روی یخ قرار داده شدند و با نسبت ۱۰۰ میلی گرم بافت در ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات^۹، در حضور قرص‌های کوکتل مهارکننده پروتئاز (زلیبو، آلمان)^{۱۰} هموزن شدند. هر نمونه به مدت تقریبی ۱۰ دقیقه (در ۶۰۰-۴۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شدند و مایع رویی جمع‌آوری شد.

تعیین سنجش غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از

مغز

غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز مطابق با دستور العمل شرکت سازنده (زلیبو، آلمان) مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، نمونه با حجم ۴۰ میکرولیتر به آنتی‌بادی (۱۰ میکرولیتر) + استرپتوئیدین با حجم ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد اجازه دادیم تا واکنش به‌صورت کامل صورت بگیرد. بعد از آن تمامی چاهک‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر بافر رقیق شده شسته شدند و به دنبال آن محلول کروموژن (حجم ۱۰۰ میکرولیتر) به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و پلیت حاوی چاهک‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای تغییر رنگ نمونه‌ها اینکوبه شدند. در نهایت، محلول توقف واکنش با حجم ۵۰ میکرولیتر اضافه شد و آزمایشگر مقدار جذب توسط هر یک از نمونه‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر در بازه زمانی ۱۰ دقیقه خواند. برای محاسبه غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز مطابق با دستور العمل کیت، مقادیر منحنی استاندارد در فایل اکسل رسم شد، مناسب‌ترین منحنی خطی و بهترین تناسب ایجاد شد و سپس غلظت به ازای هر نانوگرم پروتئین در کل بافت نرمال شد. محدوده سنجش کیت برای فاکتور این فاکتور از ۲۵ الی ۸۰۰ پیکوگرم/ میلی لیتر بافت می‌باشد.

ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو

غلظت مالون دی‌آلدهید^{۱۱} به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی و همچنین محتوای گروه‌های تیول^{۱۲} کل در بافت هیپوکامپ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، پس از واکنش مالون‌دی‌آلدهید با اسید تیوباربیتوریک، میزان جذب هر

تشنج‌های دوره نوزادی در دو جنس نر و ماده در روز ۱۰ پس از تولد القا شدند. برای این منظور، آن‌ها به‌طور تصادفی در محفظه القا هایپوکسی، به مدت ۱۵ دقیقه در معرض مخلوط گازی ۵ درصد اکسیژن و ۹۵ درصد نیتروژن قرار گرفتند. حیواناتی که تشنج‌های تونیک-کلونیک را در طی ۱۵ دقیقه دوره هایپوکسی بروز دادند، به‌عنوان گروه‌های هایپوکسی و هایپوکسی-فینگولیمود وارد مطالعه شدند [۱۱].

تزریق داروی فینگولیمود

چهل و پنج دقیقه پس از قرار گرفتن در شرایط نورموکسی یا هایپوکسی، سالیین یا داروی فینگولیمود هیدروکلراید (شرکت توسعه داروسازی دانش، ایران) با دوز ۰/۳ میلی گرم/کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به‌صورت روزانه تا روز ۲۱ بعد از تولد تزریق شدند [۱۰].

حیوانات و طراحی آزمایش

در این مطالعه، ۴۰ سر موش صحرایی ویستار (۲۰ سر نر و ۲۰ سر ماده) در ۴ گروه (به تفکیک جنسیت نر و ماده) قرار گرفتند. حیواناتی که روز ۱۰ بعد از تولد در محفظه القا هایپوکسی در معرض هوای حاوی ۲۱ درصد اکسیژن قرار گرفتند و نرمال سالیین را روی از روز ۱۰ الی ۲۱ بعد از تولد دریافت کردند، به‌عنوان گروه کنترل-سالیین در نظر گرفته شدند. حیوانات گروه کنترل-فینگولیمود، روز ۱۰ بعد از تولد در محفظه هایپوکسی با درصد اکسیژن نرمال ۲۱ درصد قرار گرفتند و فینگولیمود را از روز ۱۰ الی ۲۱ بعد از تولد به‌صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه‌های هایپوکسی-سالیین و هایپوکسی-فینگولیمود ۶۰ دقیقه بعد پس از شروع هایپوکسی به‌ترتیب سالیین و فینگولیمود را از روز ۱۰ الی ۲۱ بعد از تولد دریافت نمودند. حیوانات تا زمان بلوغ در شرایط استاندارد نگهداری شدند. حیوانات در سن ۶۰ روزگی کشته شدند و هیپوکامپ آن‌ها استخراج شد و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی منجمد و نگهداری شدند.

¹¹ Malondialdehyde

¹² Thiol

⁸ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

⁹ Phosphate buffered saline (PBS)

¹⁰ Zellbio, Germany

یافته‌ها

در مطالعه حاضر، ما از هایپوکسی به‌عنوان یک مدل مناسب برای القا تشنج‌های دوره نوزادی در موش صحرایی استفاده کردیم. حیوانات گروه‌های مختلف در سن ۱۰ روزگی در معرض درصد اکسیژن نرمال یا هایپوکسی قرار گرفتند و ۶۰ دقیقه پس از شروع هایپوکسی، روزانه تا سن ۲۱ روزگی به آن‌ها سالی‌ن یا فینگولیمود به‌صورت درون صفاقی تزریق شد.

اندازه‌گیری غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز

در آزمایش اول، غلظت فاکتور مشتق از عصب در هیپوکامپ توسط تکنیک الایزا ارزیابی شد تا مشخص شود که آیا تغییرات غلظت این فاکتور به‌دنبال تشنج‌های دوره نوزادی مسئول اختلالات شناختی در موش‌های بالغ جوان در مطالعه پیشین ما [۱۰] است و این‌که استفاده از فینگولیمود به‌دنبال هایپوکسی در دوران شیرخوارگی چگونه می‌تواند بر غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز در هیپوکامپ تأثیر بگذارد. نتایج این آزمایش حاکی از آن است که غلظت این فاکتور در هیپوکامپ هر دو گروه هایپوکسی‌سالی‌ن نر و ماده نسبت به گروه‌های کنترل-سالی‌ن نر و ماده به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$) برای هر دو جنس) و تزریق فینگولیمود در گروه‌های هایپوکسیک نر و توانست غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز را به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های هایپوکسی-سالی‌ن نر و ماده کاهش دهد ($p < 0.05$ برای هر دو جنس). علاوه‌براین، تزریق فینگولیمود در گروه‌های کنترل نر و ماده نتوانست غلظت این فاکتور نروتروفیک را در مقایسه با گروه‌های کنترل-سالی‌ن نر و ماده تغییر دهد. اگرچه نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد، غلظت هیپوکامپ فاکتور رشد عصب مشتق از مغز در گروه‌های هایپوکسی-سالی‌ن نر و ماده تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد و تغییرات غلظت این فاکتور در حیوانات هایپوکسیک تحت تأثیر جنسیت قرار می‌گیرد ($F(3, 34) = 3.7$ و $p < 0.05$)، اما فینگولیمود در دو جنس نر و ماده تفاوت معنی‌داری را در گروه‌های هایپوکسی-فینگولیمود نشان نداد (نمودار ۱).

نمونه در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. برای ارزیابی گروه‌های تیول، پس از انجام واکنش‌ها مطابق پروتکل [۱۰]، میزان جذب هر نمونه در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد و غلظت مالون‌دی‌آلدئید و نیز محتوای تیول کل به‌صورت میلی‌مولار بیان شد. همچنین از روش رنگ‌سنجی برای ارزیابی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز^{۱۳} در بافت هیپوکامپ مطابق با پروتکل‌های مطالعات قبلی [۱۰] استفاده شد و فعالیت این آنزیم در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج به‌صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

ارزیابی غلظت نیتریک اکساید

غلظت نیتریک اکساید مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (آناسل^{۱۴}، ایران) ارزیابی شد. به‌این‌منظور ابتدا رقت‌های مختلف از محلول استاندارد تهیه شد. سپس حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول معرف (مخلوط محلول‌های شماره یک و دو کیت به نسبت مساوی) به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه در هر چاهک اضافه شد. درنهایت، مقدار جذب در هر نمونه در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت به‌صورت میکرومول در میلی‌لیتر گزارش شد. محدوده سنجش برای نیتریک اکساید مطابق با کیت مورد استفاده، صفر تا ۲۰۰۰ میکرومول/میلی لیتر بود.

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از برنامه پریزم^{۱۵} نسخه ۶،۰۱ برای ویندوز انجام شد. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف^{۱۶} استفاده شد. علاوه‌براین، آنالیز واریانس دوطرفه^{۱۷}، و به‌دنبال آن آزمون تعقیب توکی^{۱۸}، برای ارزیابی اثر معنی‌دار تجویز فینگولیمود و جنسیت (متغیرهای مستقل) بر غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز، غلظت شاخص‌های استرس اکسیداتیو و غلظت نیتریک اکساید در هیپوکامپ (متغیرهای وابسته) در بین گروه‌های مختلف آزمایشی انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین بیان شد و حداقل سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

¹⁶ Kolmogorov-Smirnov test

¹⁷ Two Way ANOVA

¹⁸ Post-Hoc Tukey test

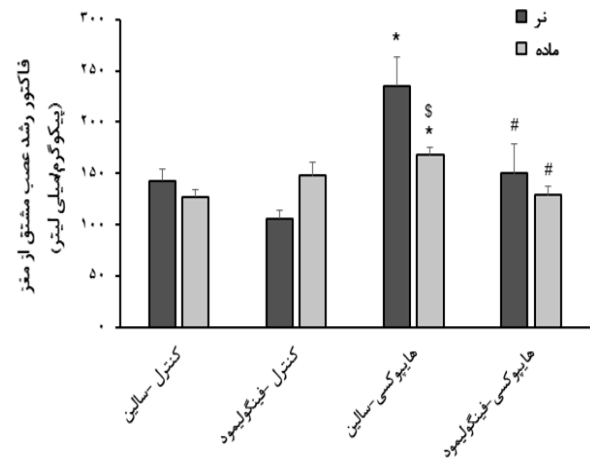
¹³ Superoxide dismutase

¹⁴ Anacell

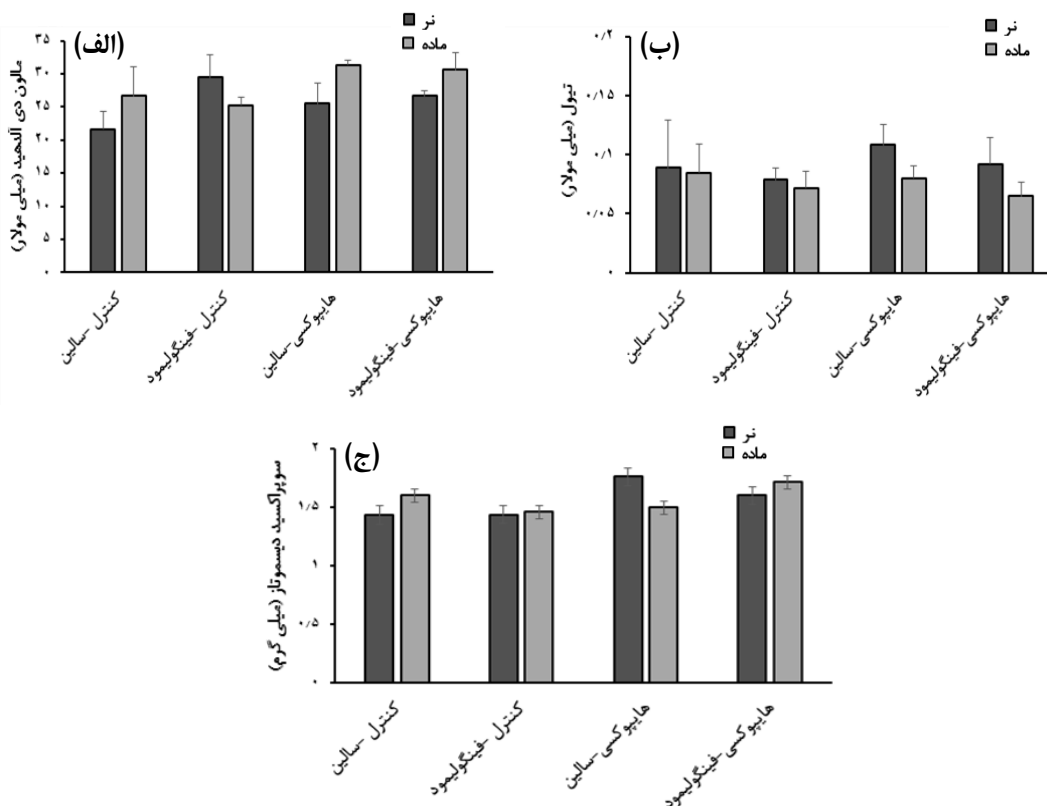
¹⁵ GraphPad Prism

پارامترهای استرس اکسیداتیو

باتوجه به نقش استرس اکسیداتیو در بیماری‌های مختلف عصبی، نقش تغییرات شاخص‌های استرس اکسیداتیو را در نقایص شناختی حیوانات بالغ جوان به دنبال تشنج‌های دوران نوزادی در مطالعه پیشین خود بررسی کردیم و به بررسی اثر فینگولیمود بر غلظت مالون‌دی‌آلدهید، غلظت تیول و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هیپوکامپ حیوانات هیپوکسی نر و ماده پرداختیم. نتایج مطالعه حاکی از آن است در روز ۶۰ بعد از تولد در هر دو جنس نر و ماده غلظت مالون‌دی‌آلدهید، غلظت تیول و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز هیپوکامپ بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نشان نداد. علاوه بر این، نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد در هر سه شاخص استرس اکسیداتیو تأثیر فینگولیمود در دو جنس تفاوت معنی‌داری ندارد (مالون‌دی‌آلدهید: $F(3, 38) = 0.12$ و $p > 0.05$ ، تیول: $F(3, 33) = 0.93$ و $p > 0.05$ ، سوپراکسید دیسموتاز: $F(3, 34) = 2.75$ و $p > 0.05$ (نمودار ۲)).



نمودار ۱- بررسی اثر تزریق فینگولیمود در دوران نوزادی متعاقب تشنج‌های دوران نوزادی بر غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز در هیپوکامپ موش‌های صحرایی بالغ نر و ماده. تعداد نمونه در هر یک از گروه‌ها ۵ عدد می‌باشد. *: تفاوت معنی‌دار گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه کنترل با $p < 0.05$; #: تفاوت معنی‌دار گروه هیپوکسی-فینگولیمود در مقایسه با گروه هیپوکسی با $p < 0.05$; \$: تفاوت معنی‌دار گروه هیپوکسی نر در مقایسه با گروه هیپوکسی ماده با $p < 0.05$.



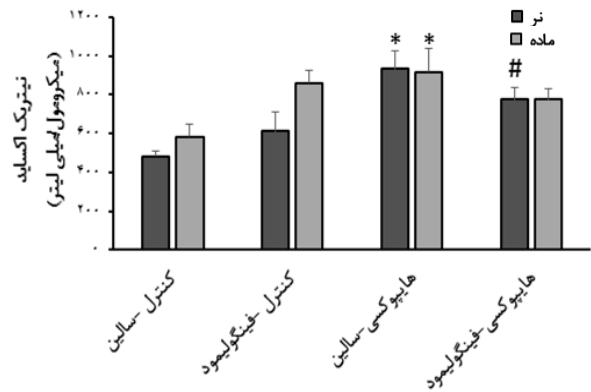
نمودار ۲- بررسی اثر تزریق فینگولیمود در دوران نوزادی متعاقب تشنج‌های دوران نوزادی بر (الف) غلظت مالون‌دی‌آلدهید، (ب) سطح تیول و (ج) سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هیپوکامپ موش‌های صحرایی بالغ نر و ماده. تعداد نمونه در هر یک از گروه‌ها ۵ عدد می‌باشد.

آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد تأثیر فینگولیمود در دو جنس نر و ماده تفاوت معنی‌داری ندارد ($F(3, 32) = 1/20$ و $p > 0/05$)، (نمودار ۳).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز در هیپوکامپ در هر دو گروه هایپوکسی نر و ماده به‌صورت قابل معنی‌داری افزایش یافته و تجویز فینگولیمود در دوران نوزادی متعاقب القای تشنج‌های دوران نوزادی می‌تواند آن را به مقادیر گروه‌های کنترل نر و ماده کاهش دهد. همچنین، افزایش سطح نیتریک اکساید در هیپوکامپ در گروه‌های هایپوکسی نر و ماده با تزریق فینگولیمود کاهش معنی‌داری نشان نداد. علاوه‌براین، تغییر معنی‌داری در پارامترهای استرس اکسیداتیو در بین گروه‌های آزمایشی مختلف در هر دو جنس نر و ماده مشاهده نشد.

مطالعات قبلی نشان دادند مورفولوژی عصبی تغییر یافته ناشی از فعال‌سازی میکروگلیا و التهاب متعاقب تشنج‌های دوره نوزادی باعث نقایص شناختی در ادامه زندگی می‌شود [۱۲]. نتایج پروژه قبلی ما اختلالات شناختی را در موش‌های بالغ جوان به‌دنبال تشنج‌های دوره نوزادی القاشده توسط هایپوکسی تأیید نمود [۱۰]. از این‌رو، پیشنهاد میکنیم که التهاب عصبی ناشی از هایپوکسی می‌تواند سطح نوروتروفین را در مغز تغییر دهد و توانایی‌های شناختی را مختل نماید. داده‌های فعلی نشان داد تشنج‌های دوره نوزادی القاشده توسط هایپوکسی غلظت فاکتور رشد عصب مشتق از مغز را در موش‌های صحرایی نر و ماده در روز ۶۰ بعد از تولد افزایش می‌دهد. همسو با نتایج ما، دیگر مطالعات نیز بیان بالاتر فاکتور رشد عصب مشتق از مغز را پس از تشنج در مدل‌های حیوانی و انسان‌های مبتلا به صرع گزارش نموده‌اند [۱۳]. تشنج با فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ تیروزین کیناز-بتا، می‌تواند گیرنده فاکتور رشد عصب مشتق از مغز را در مسیر فیبر خزه‌ای هیپوکامپ در مدل‌های حیوانی صرع لوب تمپورال افزایش دهد [۱۴]. گزارش شده فعال‌سازی مسیر تیروزین کیناز-بتا از طریق فعال‌شدن گیرنده فاکتور رشد عصب مشتق از مغز علائمی مشابه علائم شناسایی شده در مغزهای صرعی مانند تغییر در شکل‌پذیری سیناپسی سلول‌های گرانولی هیپوکامپ، افزایش تقویت طولانی‌مدت [۵]، و افزایش مهار به‌واسطه سیستم گابا ترژیک را باعث می‌شود [۱۵]. از آنجایی که



نمودار ۳- بررسی اثر تزریق فینگولیمود در دوران نوزادی متعاقب تشنج‌های دوران نوزادی بر غلظت نیتریک‌اکساید در هیپوکامپ موش‌های صحرایی بالغ نر و ماده. تعداد نمونه در هر یک از گروه‌ها ۵ عدد می‌باشد. *: تفاوت معنی‌دار گروه هایپوکسی-سالین در مقایسه با گروه کنترل-سالین ب با $p < 0/05$; #: تفاوت معنی‌دار گروه هایپوکسی-فینگولیمود در مقایسه با گروه هایپوکسی-سالین با $p < 0/05$

غلظت نیتریک اکساید

در آخرین آزمایش نقش التهاب در بروز نقایص شناختی متعاقب تشنج‌های دوره نوزادی القاشده توسط هایپوکسی مورد بررسی قرار گرفت و به‌این‌منظور غلظت نیتریک‌اکساید به‌عنوان یک واسطه فعال‌کننده مسیرهای سیگنالینگ التهابی در هیپوکامپ با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد و همچنین بررسی شد آیا فینگولیمود به‌عنوان یک عامل ضدالتهاب می‌تواند بر غلظت نیتریک‌اکساید در هیپوکامپ حیوانات هایپوکسیک نر و ماده تأثیر بگذارد یا خیر. آنالیز داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد سطح نیتریک‌اکساید هیپوکامپ در هر دو گروه هایپوکسی-سالین نر و ماده نسبت به گروه‌های کنترل-سالین نر و ماده به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p < 0/05$) برای هر دو جنس). اگرچه تزریق فینگولیمود در حیوانات هایپوکسیک نر به‌صورت معنی‌داری باعث کاهش سطح نیتریک‌اکساید هیپوکامپ در مقایسه با گروه‌های هایپوکسی-سالین نر شد ($p < 0/05$)، اما این کاهش در گروه هایپوکسی-فینگولیمود ماده در مقایسه با گروه هایپوکسی-سالین ماده از نظر آماری معنی‌دار نبود. لازم به ذکر است، سطح نیتریک‌اکساید در گروه هایپوکسی-فینگولیمود ماده تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل-سالین ماده نشان نداد. علاوه‌براین، تزریق فینگولیمود در حیوانات کنترل نر و ماده بر غلظت این شاخص التهابی در هیپوکامپ هر دو جنس نر و ماده در مقایسه با گروه کنترل-سالین تأثیر معنی‌داری نداشت. همچنین نتایج

بلوغ سیستم گابائترژیک در روز ۱۴ پس از تولد رخ می‌دهد (تغییر از دپلاریزاسیون به هایپرپلاریزاسیون) [۱۶] و در مطالعه ما فینگولیمود بین روزهای ۱۰ الی ۲۱ بعد از تولد تزریق شد، بنابراین مهار گابا می‌تواند با مکانیسم‌های متفاوتی تحت‌تأثیر قرار گیرد. علاوه‌براین، نتایج برخی از مطالعات نشان می‌دهند تزریق فاکتور رشد عصب مشتق از مغز یا تحریک بیش‌ازحد مسیر سیگنالینگ تیروزین کیناز-بتا می‌تواند باعث تشنج شود، درحالی‌که خاموش کردن بیان ژن گیرنده تیروزین کیناز-بتا یا فاکتور-های کاهش‌دهنده فاکتور رشد مشتق از مغز منجر به کاهش بروز صرع و تعویق روند صرع‌زایی در مدل کیندلینگ می‌شوند [۱۷]. در مطالعه حاضر، ما غلظت بالاتری از فاکتور رشد عصب مشتق از مغز در هیپوکامپ حیوانات هایپوکسیک نر در مقایسه با حیوانات هایپوکسیک ماده مشاهده کردیم. همسو با نتایج ما، سوخانوا^{۱۹} و همکاران در مطالعه خود نشان دادند بیان فاکتور رشد مشتق از عصب در نوزادان دو جنس نر و ماده متعاقب هایپوکسی نوزادی افزایش می‌یابد [۱۸]. اگرچه در مطالعه دیگری غلظت این فاکتور در هیپوکامپ موش‌های ماده در مقایسه با حیوانات نر به دنبال ایجاد مدل هایپوکسی-ایسکمی پری‌ناتال کاهش یافت و ساعت‌ها پس از هایپوکسی در حیوانات ماده به سطح پایه بازگشت [۱۹]، اما غلظت این فاکتور در مغز و سرم نوزادان نر برای مدت طولانی بالا باقی ماند، که احتمالاً به دلیل بیان و پایداری بیشتر پروتئین در حیوانات نر می‌باشد [۱۸]. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد تزریق فینگولیمود متعاقب تشنج‌های دوره نوزادی به‌صورت قابل‌توجهی باعث کاهش سطح فاکتور رشد عصب مشتق از مغز در روز ۶۰ بعد از تولد می‌شود. همچنین در مطالعه قبلی ما استفاده از فینگولیمود با پروتکل مشابه متعاقب تشنج‌های دوره نوزادی القا شده توسط هایپوکسی نشان داد، این دارو می‌تواند تشنج‌های موضعی و عمومی را در مدل صرعی پنتیلین تترازول در حیوانات بالغ جوان کاهش دهد [۱۰]. لذا، باتوجه‌به خواص ضدصرع فینگولیمود و ماهیت صرع‌زایی فاکتور رشد عصب مشتق از مغز به‌نظر می‌رسد فینگولیمود تا حدی به‌عنوان یک سرکوب‌کننده تشنج از طریق کاهش سطح فاکتور رشد عصب در هیپوکامپ عمل می‌کند، اگرچه، لازم است نقش فینگولیمود در درمان تشنج و اثرات طولانی‌مدت آن بر پاتوژنز صرع در مطالعات آینده بیشتر مورد بررسی قرار بگیرد.

افزایش غلظت شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بیماری‌های عصبی مختلف گزارش شده است [۲۰]. شواهد حاکی از نقش استرس اکسیداتیو در پاتولوژی تشنج‌های دوره نوزادی القا شده توسط هایپوکسی می‌باشد، به‌گونه‌ای که به‌دنبال تشنج به‌دلیل افزایش تحریک‌پذیری گیرنده‌های گلوتاماتی فاکتورهای استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابند و منجر به افزایش غلظت آهن در محیط و درنهایت فعال‌شدن مسیرهای مرگ‌سلولی به‌صورت آپوپتوز می‌شوند [۲۱]. همچنین گزارش شده استفاده از ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی مانند کوئرستین در دوران نوزادی می‌تواند اختلالات شناختی، رفتار اضطرابی و روند صرع‌زایی در زمان بلوغ را در حیوانات هایپوکسیک کاهش دهد [۱]. اگرچه نتایج مطالعه حاضر تغییرات معنی‌داری را در غلظت مالون‌دی‌آلدهید، تیول و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در هیپوکامپ حیوانات هایپوکسیک که فینگولیمود را متعاقب تشنج‌های دوره نوزادی دریافت نمودند در مقایسه با حیوانات هایپوکسیک که سالیان دریافت کردند، در هر دو جنس نر و ماده در گروه‌های آزمایشی مختلف نشان نداد. همسو با نتایج مطالعه ما، گزارش شده است قرار گرفتن در معرض هایپوکسی در اوایل زندگی هیچ تأثیری بر سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز در بزرگسالی ندارد [۲۲]. همچنین نتایج مطالعه پیشین ما به‌صورت متناقضی نشان داد، تزریق فینگولیمود با پروتکل مشابه به دنبال تشنج‌های دوره نوزادی القا شده توسط هایپوکسی در دو جنس نر و ماده می‌تواند غلظت افزایش‌یافته مالون‌دی‌آلدهید را در روز ۲۳ بعد از تولد به‌صورت معنی‌داری کاهش دهد [۲۳]. این مغایرت در نتایج ممکن است ناشی از سن نمونه‌گیری از هیپوکامپ (۶۰ روزگی در مطالعه فعلی در مقابل ۲۳ روزگی در مطالعه پیشین) باشد. علاوه‌براین، فرض بر این است که در مطالعه حاضر اثر جبرانی سیستم آنتی‌اکسیدانتی در بدن در این بازه زمانی ۴۰ روزه نقش مهمی در بروز این تعارض داشته باشد و احتمالاً غلظت مالون‌دی‌آلدهید در هیپوکامپ در طی این مدت به مقادیر طبیعی کاهش می‌یابد، لذا آزمایشات بیشتری برای کشف مکانیسم‌های دقیق درگیر در این پدیده مورد نیاز می‌باشد. در بخش دیگری از این مطالعه، اثر فینگولیمود^{۲۰} به‌عنوان یک عامل ضدالتهاپی بر غلظت نیتریک اکساید که می‌تواند واسطه‌ای برای فعال‌نمودن مسیرهای التهابی در هیپوکامپ به

19 Sukhanova

20 Fingolimod

بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی بالغ به شدت توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثرات التهاب عصبی به دنبال وقوع تشنج‌های دوره نوزادی، در مغز در حال رشد است، که اختلالات شناختی، افزایش استعداد ابتلا صرع و نیز در حیوانات بالغ را در مطالعه پیشین ما توجیه می‌نماید. با این حال، تجویز داروی ضدالتهاب فینگولیمود در دوره نوزادی می‌تواند این عوارض را احتمالاً از طریق افزایش بیان فاکتور رشد عصب مشتق از مغز و اثر جبرانی نیتریک اکساید در زمان بلوغ کاهش دهد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با شماره APRC-9908 می‌باشد.

ملاحظات مالی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به انجام رسیده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ک.ب.: گردآوری داده‌ها و نگارش مقاله؛ ن.ی.: کمک در نگارش و ویرایش مقاله؛ ی.ف.: ویرایش مقاله و آنالیز آماری؛ ع.س.: نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛ س.غ.: ایده، طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله.

فهرست منابع

[1] Wu Y, H, Li P, Zhao H, Li R, Yang F, Quercetin administration following hypoxia-induced neonatal brain damage attenuates later-life seizure susceptibility and anxiety-related behavior: Modulating inflammatory response. *Front Pediatr* 10 (2022) 791-815.

دنبال تشنج‌های دوره نوزادی القا شده توسط هایپوکسی باشد، مورد بررسی قرار گرفت. جالب توجه است، اگرچه در این مطالعه تزریق فینگولیمود غلظت افزایش یافته نیتریک اکساید هیپوکامپ را در حیوانات هایپوکسیک نر به صورت معنی‌داری کاهش داد اما این کاهش در حیوانات هایپوکسیک ماده از نظر آماری معنی‌دار نبود. لازم به ذکر است در مطالعه پیشین ما نیز تزریق فینگولیمود توانست مقادیر افزایش یافته فاکتور نکروز نکروز توموری آلفا^{۲۱} را در هایپوکامپ حیوانات هایپوکسیک نر و ماده کاهش دهد، که این اثر همراه با اثرات درمانی فینگولیمود در کاهش نقایص شناختی و رفتار اضطرابی در هر دو جنس بود [۱۰]. شایان ذکر است برخی از مطالعات نشان دادند تشکیل نیتریک اکساید سبب تقویت فعالیت سیناپسی می‌شود و این موضوع ممکن است عاملی برای مستعدبودن شروع تشنج باشد [۲۴]. بنابراین، این موضوع توجیه می‌کند چگونه کاهش غلظت نیتریک اکساید در هایپوکامپ می‌تواند به موازات کاهش نقایص شناختی در هر دو گروه هایپوکسی-فینگولیمود نر و ماده رخ دهد [۲۵]، و این موضوع توجیه‌کننده اثرات ضد تشنجی و تعویق روند صرع‌زایی فینگولیمود توام با کاهش نقایص شناختی در دو جنس نر و ماده در مطالعه قبلی ما می‌باشد که احتمالاً ناشی از اثرات ضدالتهابی و تعدیل غلظت نیتریک اکساید در هایپوکامپ توسط این دارو می‌باشد.

اگرچه طراحی مطالعه حاضر بر اساس شایع‌ترین علت تشنج‌های دوره نوزادی در انسان (هایپوکسی) می‌باشد و زمان انجام آزمایش‌ها (روز ۶۰ بعد از تولد) با توجه به بازه زمانی بروز بیشترین مشکلات در بیماران مبتلا می‌باشد، اما پیشنهاداتی برای افزایش تعمیم‌پذیری داده‌ها در مطالعات آینده وجود دارد. از جمله- این که مطالعاتی با حجم نمونه بزرگ‌تر انجام گیرد. علاوه بر این، ثبت خارج سلولی از هایپوکامپ یا سایر مناطق مغز در هنگام مواجهه با هایپوکسی در نوزادان برای روشن شدن رابطه بین شدت تشنج نوزادی و بررسی نقایص شناختی توام با انجام تست‌های

- [2] Medlej Y, Salah H, Wadi L, Saad S, Bashir B, Allam J, Atoui Z, Darwish N, Karnib N, Darwish H, Kobeissy F, Wang K W, Hamade E, Obeid M, Lestaurinib (CEP-701) modulates the effects of early life hypoxic seizures on cognitive and emotional behaviors in immature rats. *EBR* 92 (2019) 332-340.
- [3] Michell-Robinson M A, Touil H, Healy L M, Owen D R, Durafourt B A, Bar-Or A, Antel J P, Moore C S,

²¹ Tumor necrosis alpha (TNF- α)

- Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 138 (2015) 1138-1159.
- [4] Perrone S, Tataranno L M, Stazzoni G, Ramenghi L, Buonocore G, Brain susceptibility to oxidative stress in the perinatal period. *J Matern Fetal Neonatal Med* 28 (2015) 2291-2295.
- [5] Jin M, Sheng W, Han L, He Q, Ji X, Liu K, Activation of BDNF-TrkB signaling pathway-regulated brain inflammation in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol* 83 (2018) 26-36.
- [6] Rodriguez-Alvarez, N, Eva M J, Mark D, John L W, Geraldine B B, David C H, Effects of hypoxia-induced neonatal seizures on acute hippocampal injury and later-life seizure susceptibility and anxiety-related behavior in mice. *Neurobiol Dis* 83 (2015) 100-114.
- [7] Charriaut-Marlangue C, Besson V C, Baud O, Sexually dimorphic outcomes after neonatal stroke and hypoxia-ischemia. *Int J Mol Sci* 19 (2017) 61.
- [8] Frankel S, Medvedeva N, Gutherz S, Kulick C, Kondratyev A, Forcelli P A, Comparison of the long-term behavioral effects of neonatal exposure to retigabine or phenobarbital in rats. *EBR* 57 (2016) 34-40.
- [9] Wang C C, Kuo J R, Wang S J, Fingolimod inhibits glutamate release through activation of SIP1 receptors and the G protein $\beta\gamma$ subunit-dependent pathway in rat cerebrocortical nerve terminals. *Neuropharmacology* 185 (2021) 108451.
- [10] Najafian S A, Farbood Y, Sarkaki A, Ghafouri S, FTY720 administration following hypoxia-induced neonatal seizure reverse cognitive impairments and severity of seizures in male and female adult rats: The role of inflammation. *Neurosci Lett* 748 (2021) 135675.
- [11] Jensen F, Applegate C D, Holtzman D, Belin T R, Burchfiel J L, Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol* 29 (1991) 629-637.
- [12] Quinlan S, Merino-Serrais P, Grande A D, Dussmann H, Prehn J H M, Chonghaile T N, Henshall D C, Jimenez-Mateos E M, The anti-inflammatory compound candesartan cilexetil improves neurological outcomes in a mouse model of neonatal hypoxia. *Front Immunol* 10 (2019) 1752.
- [13] Murray K D, Isackson P J, Eskin T A, King M A, Montesinos S P, Abraham L A, Roper S N, Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 418 (2000) 411-422.
- [14] McNamara J O, Scharfman H E, Temporal lobe epilepsy and the BDNF receptor. *TrkB* (2012).
- [15] Tanaka T, Saito H, Matsuki N, Inhibition of GABA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J Neurosci* 17 (1997) 2959-2966.
- [16] Peerboom C, Wierenga C J, The postnatal GABA shift: a developmental perspective. *Neurosci Biobehav Rev* 124 (2021) 179-192.
- [17] Scharfman H E, Goodman J H, Sollas A L, Croll S D, Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 174 (2002) 201-214.
- [18] Sukhanova I A, Sebentsova E A, Khukhareva D D, Manchenko D M, Glazova N Y, Vishnyakova P A, Inozemtseva L S, Dolotov O V, Vysokikh M Y, Levitskaya N G, Gender-dependent changes in physical development, BDNF content and GSH redox system in a model of acute neonatal hypoxia in rats. *Behav Brain Res* 350 (2018) 87-98.
- [19] Cikla U, Chanana V, Kintner D B, Udho E, Eickhoff J, Sun W, Marquez S, Covert L, Otle A, Shapiro R A, Ferrazzano P, Vemuganti R, Levine J E, Cengiz P, ER α signaling is required for TrkB-mediated hippocampal neuroprotection in female neonatal mice after hypoxic ischemic encephalopathy. *neuro* 3 (2016).
- [20] Ikonomidou C, Kaindl A M, Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *ARS* 14 (2011) 1535-1550.
- [21] Zhang M, Cui Y, Zhu W, Yu J, Cheng Y, Wu X, Zhang J, Xin W, Yu Y, Sun H, Attenuation of the mutual elevation of iron accumulation and oxidative stress may contribute to the neuroprotective and anti-seizure effects of xenon in neonatal hypoxia-induced seizures. *Free Radic Biol Med* 161 (2020) 212-223.
- [22] Sab I M, Ferraz M M D, Amaral T A S, Resende A C, Ferraz M R, Matsuura C, Brunini T M C, Mendes-Ribeiro A C, Prenatal hypoxia, habituation memory and oxidative stress. *Pharmacol Biochem Behav* 107 (2013) 24-28.
- [23] Hajipour S, Khombi Shooshtari M, Farbood Y, Mard S A, Sarkaki A, Moradi Chameh H, Sistani Karampour N, Ghafouri S, Fingolimod prevents cognitive impairments following hypoxia-induced neonatal seizure by ameliorating the inflammation and oxidative stress in male and female juvenile rats. *Learn Motiv* 82 (2023) 101874.
- [24] Banach M, Piskorska B, Czuczwar S J, Borowicz K K, Nitric oxide, epileptic seizures, and action of antiepileptic drugs. *CNS Neurol Disord* 10 (2011) 808-819.
- [25] Scharfman H E, The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7 (2007) 348-354.

Research paper

Investigating the mechanism of protective effects of fingolimod administration following hypoxia-induced neonatal seizures in adult male and female rats: the possible role of brain-derived neurotrophic factor and nitric oxide

Kowsar Bavarsad^{1,2}, Neda Yazdanfar³, Yaghoob Farbood^{1,2}, Alireza Sarkaki^{1,2}, Samireh Ghafouri^{1,2*}

1. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2. Persian Gulf Physiology Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

3. Neuroscience Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 10 November 2023

Accepted: 18 November 2023

Abstract

Background and aims: Hypoxia-induced neonatal seizures activate neuroinflammatory and oxidative stress mechanisms and lead to brain damage. Therefore, considering the high sensitivity of the immature brain to anaerobic metabolism during hypoxia, the purpose of this study is to investigate the mechanism of the protective effects of fingolimod in modulation of complications caused by neonatal seizures induced by hypoxia in puberty.

Methods: In this study, 40 male and female wistar rats were divided into 4 groups: 1. control-saline, 2. control-fingolimod, 3. hypoxia-saline and 4. hypoxia-fingolimod. Neonatal seizures were induced 10 days after birth by placing the neonates in hypoxia chamber for 15 minutes. In different experimental groups, fingolimod or saline were injected from the 10th to the 21st day after birth. Then, 60 days after birth, hippocampus samples were extracted and used for biochemical evaluations.

Results: The results of this study showed that fingolimod significantly prevents the increased concentration of brain-derived neurotrophic factor and nitric oxide in the hippocampus of both male and female hypoxia groups ($p < 0.05$). Although this decrement was not significant in hypoxia-fingolimod female group.

Conclusion: Administration of fingolimod can modulate complications caused by neonatal seizures, possibly through decreasing the expression of brain-derived nerve growth factor and the compensatory effect of nitric oxide during puberty.

Keywords: Oxidative stress, Inflammation, Neonatal seizure, BDNF, Fingolimod

Please cite this article as follows:

Bavarsad K, Yazdanfar N, Farbood Y, Sarkaki A, Ghafouri S, Investigating the mechanism of protective effects of fingolimod administration following hypoxia-induced neonatal seizures in adult male and female rats: the possible role of brain-derived neurotrophic factor and nitric oxide. *Iran J Physiol Pharmacol* 7 (2023) 159-168.

*Corresponding author: samireh.ghafouri@gmail.com or ghafouri-s@ajums.ac.ir (ORCID: 0000-0001-5916-143X)