

بررسی اثر ملاتونین بر اضطراب ناشی از القاء فشار روانی پس از سانحه در موش صحرایی نر

آسیه سرگلزهی (M.Sc)، کتانه ابراری* (Ph.D)، محمود الهدادی سلمانی (Ph.D)، ایران گودرزی (Ph.D)
دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات تزریق مکرر ملاتونین بر رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از القاء بیماری اختلال استرس پس از سانحه (Post-traumatic stress disorder, PTSD) می‌باشد. مواد و روش‌ها: القا PTSD در ۶۰ سر موش صحرایی نر به روش تلفیقی شوک و تک استرس طولانی‌مدت (Single Prolong Stress, SPS) صورت گرفت. حیوانات به مدت ۵ روز روزانه برای ۲ ثانیه یک شوک یک میلی آمپر دریافت کردند و سپس با مدل سه مرحله‌ای SPS (۲ ساعت در مقیدکننده، بلافاصله ۲۰ دقیقه شنای اجباری و ۱۵ دقیقه بعد بی‌هوشی با دی‌اتیل‌تر) مواجه شدند. هفت روز بعد، تست Open field و ماز به‌علاوه‌ای مرتفع انجام شد. تزریق روزانه داخل صفاقی ملاتونین در ۳ دوز ۵، ۱۰، ۱۵ mg/kg یا سالیین بعد از القا مدل تا روز تست انجام شد. یافته‌ها: آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که گروه‌های بیمار (سالیین) و تیمار شده (ملاتونین) از نظر درصد زمان گذرانده شده در بازوهای باز ماز به‌علاوه‌ای مرتفع با یک‌دیگر تفاوت معنادار دارند و ملاتونین تنها با دوز ۱۵ mg/kg به طور معنی‌داری میزان درصد زمان گذرانده شده را در بازوی باز در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. تفاوت معنی‌داری از نظر درصد دفعات ورود به بازوی باز وجود ندارد. مقدار Crossing در Open field به‌طور معنی‌داری در حیواناتی که ملاتونین ۱۰ mg/kg دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل بیش‌تر بود. نتیجه‌گیری: ملاتونین قادر است اضطراب ایجاد شده ناشی از PTSD را اصلاح نماید.

واژه‌های کلیدی: اضطراب، ملاتونین، اختلال فشار روحی پس از سانحه، موش صحرایی

مقدمه

در واسطه‌گری اضطراب نقش دارد، که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان آمیگدال، هیپوکمپ، هیپوتالاموس، سیتوم و قشر پیش‌پیشانی را نام برد [۳،۲].

اختلالات اضطرابی انواع مختلفی دارد، یکی از انواع رایج اختلال‌های اضطرابی، اختلال استرس پس از سانحه-Post (traumatic stress disorder, PTSD) است [۴] که می‌تواند به دنبال مواجهه با رویدادهای استرس‌زای شدید رخ دهد. افراد دچار PTSD اغلب دارای افکار ترسناک بوده و از نظر هیجانی کاملاً بی‌تفاوت و کرخت می‌باشند.

اضطراب عبارت است از یک احساس منتشر، ناخوشایند و دلواپسی، با منشا ناشناخته که به فرد دست می‌دهد و شامل عدم اطمینان، درماندگی و برانگیختگی فیزیولوژی است. وقوع مجدد موقعیت‌هایی که قبلاً استرس‌زا بوده‌اند یا طی آن‌ها به فرد آسیب رسیده است، باعث اضطراب در فرد می‌شود. اضطراب یکی از شایع‌ترین اختلالات روانی محسوب شده و شیوع آن در طول زندگی زنان ۳۰/۵ درصد و در مردان ۱۹/۲ درصد گزارش شده است [۶]. قسمت‌های مختلف مغز

تجربه‌های تلخ در زندگی و در نتیجه اضطراب شده‌اند عمل‌کرد ملاتونین سبب تعدیل نوسان در بیان رسپتورهای اپیوئیدی و سطوح بتا اندورفین شده و از این طریق ملاتونین منجر به کاهش میزان اضطراب و افسردگی می‌گردد. مشاهده شده است که در بیماران افسرده، سطح پلاسمایی بتا‌اندورفین وابسته به استرس به شدت بالا است. از طرفی دیگر باعث تحریک چندین آنزیم آنتی‌اکسیدانت مهم (فعال‌کننده یا بیان‌کننده زن) مثل سوپر اکسید دیسموتاز و گلو‌تاتیون پراکسیداز می‌شود [۱۳]. هم‌چنین ملاتونین از آسیب‌های مغزی که منجر به تخریب هیپوکامپ و حافظه فضایی می‌شود جلوگیری می‌کند. در طی آسیب‌هایی که دو ساختار هیپوکامپ و کورتکس تحت تاثیر قرار می‌گیرند، ملاتونین توانسته از مرگ نورونی در CA1، CA3 و شکنج دندان‌دار هیپوکامپ جلوگیری کند و از این طریق باعث بهبودی حافظه فضایی می‌گردد. ملاتونین از آسیب‌هایی که در اثر تزریق MPTP در هیپوکامپ ایجاد می‌شود نیز جلوگیری می‌کند، و از این طریق سبب افزایش محصول پراکسیداسیون لیپید در استریاتوم و هیپوکامپ به طور قابل توجهی می‌شود، که ملاتونین این اثر را از طریق قابلیت آنتی‌اکسیدانتی خود انجام می‌دهد و مانع آپوپتوز نورون توسط گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی (ROS) می‌شود [۱۴].

از سوی دیگر، مطالعه ریتم ترشح ملاتونین در افسردگی نشان داد که ملاتونین در کنترل حالات و رفتارشان انسان نقش دارد. افراد مبتلا به اضطراب و افسردگی دچار اختلال در ترشح ملاتونین و در نتیجه کاهش سطح ملاتونین هستند. مشخص شده است ملاتونین یک عامل کاهش‌دهنده اضطراب در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد [۱۵].

با توجه به شیوع زیاد اضطراب و PTSD در کشورهای در حال توسعه و با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و همین‌طور ضد اضطرابی ملاتونین بر آن شدیم تا تاثیر آن را بر اضطراب ناشی از القاء فشار روانی پس از سانحه (PTSD) در موش صحرایی نر بررسی کنیم. با این فرض که ملاتونین قادر خواهد بود از بروز علائم جلوگیری کند.

این بیماران اغلب آسیب را به شکل کابوس‌های شبانه، خاطرات نگران‌کننده و مرور خاطرات گذشته در طی ساعت‌های بیداری نشان می‌دهند. غرق شدن در خاطرات گذشته ممکن است موجب شود که ارتباط فرد با واقعیت برای ساعت‌ها و یا حتی روزها قطع شود [۵]. نواحی متعددی از مغز در اثر ابتلا به PTSD تخریب شده و موجب بروز علائم بیماری می‌گردند. این بیماری هم‌راه با تغییرات مورفولوژیکی و ساختاری در هیپوکامپ است به طوری که حجم هیپوکامپ در بیماران مبتلا به PTSD نسبتاً کاهش می‌یابد. علت این آتروفی به وضوح مشخص نیست اما تحقیقات حاکی از آن است که آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو سلول‌های هیپوکامپ می‌تواند یکی از دلایل اصلی این کاهش حجم باشد [۷،۶].

ملاتونین محصول عمده‌ی غده‌ی پینه‌آل است. این هورمون توسط لرنر و همکارانش در سال ۱۹۵۸ شناسایی شد. ملاتونین مشتق تریپتوفان است، در سلول‌های غده پینه‌آل pinealocyte سنتز و بدون ذخیره شدن، آزاد می‌شود [۸،۹،۱۰] و از طریق انتشار به داخل جریان خون وارد می‌گردد [۹]. نیمه عمر ملاتونین در خون حدود ۳۰ دقیقه بوده، به سرعت در سلول‌های کبدی به ۶-هیدروکسی ملاتونین متابولیزه و بعد با سولفوریک یا گلوکوکورونیک اسید ترکیب و به‌داخل ادرار دفع می‌شود. این محصول ترکیبی چربی دوست و غیر سمی است و به راحتی از سد خونی مغز عبور می‌کند.

ملاتونین با واسطه هسته سوپراکسیاسماتیک، ساعت بیولوژیک که در هیپوتالاموس قرار دارد، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده فاز و دامنه ریتم‌های شبانه‌روزی شناخته شده است. ملاتونین دارای عمل‌کردهای فیزیولوژیک مهمی است از جمله تنظیم ریتم شبانه‌روزی، الگوی عمومی خواب، کنترل بلوغ جنسی، سن بلوغ و تنظیم درجه حرارت [۱۱]. از طرفی به عنوان اهداء‌کننده‌ی الکترون نقش آنتی‌اکسیدانتی دارد [۱۲]. ملاتونین ویژگی‌های نوروپروتکتیو (محافظ نورونی) در برابر آسیب‌ها و عمل‌کردهای بد سلول‌ها دارد. در افرادی که دچار

مواد و روش‌ها

حیوانات. در این مطالعه از ۶۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن تقریبی ۲ ماه و وزن ۱۵۰-۲۵۰ گرم، تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ایران واحد کرج استفاده شد. حیوانات در قفس‌های ۵ تایی با سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و درجه حرارت ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در حالی که آب و غذا را آزادانه در اختیار قرار داشتند، نگهداری شدند.

داروها. در این پژوهش از ملاتونین ساخت شرکت سیگما (آلمان) و هم‌چنین وهیکل (سالین و اتانول) به عنوان حلال ملاتونین استفاده شد. ملاتونین با دوزهای ۵، ۱۰، ۱۵ mg/kg توسط سرنگ انسولینی و به صورت داخل صفاقی (i.p) تزریق می‌گردید [۲۸،۲۷].

مدل آزمایشگاهی ایجاد PTSD. مدلی که برای القاء PTSD استفاده شده روش تلفیقی تک استرس طولانی مدت و شوک الکتریکی (S&SPS) بود [۲۹]. در این مدل حیوانات به مدت ۵ روز، روزانه یک شوک الکتریکی دریافت می‌کردند. به این ترتیب که حیوانات به مدت ۲ دقیقه و ۱۲ ثانیه در دستگاه ترس شرطی (Fear conditioning system) قرار می‌گرفتند. به طوری که پس از ۷۰ ثانیه یک شوک الکتریکی ۱ میلی‌آمپری به مدت ۲ ثانیه دریافت و یک دقیقه بعد از دستگاه خارج می‌شدند. دستگاه ساخت شرکت Noldus (کشور هلند) است. شامل محفظه مکعب مستطیل شکل از جنس پلاستیک شفاف به ابعاد ۴۵×۴۵×۴۷ سانتی‌متر است. کف محفظه از میله‌های ضد زنگ به تعداد ۲۸ عدد و با قطر ۶ میلی‌متر که به فواصل ۱۲ میلی‌متر از یک‌دیگر قرار دارند، به منظور اعمال شوک الکتریکی به حیوان، تشکیل شده است. درب محفظه از جنس پلاستیک شفاف و قابل باز شدن است. کف آن سینی قابل برداشتی دارد که امکان پاک‌سازی محفظه را از فضولات حیوانی فراهم می‌سازد. سقف دستگاه مجهز به لامپ، بلندگو و دوربین فیلم‌برداری است که این دوربین ثبت حرکات مختلف حیوان چون پریدن، جابه‌جا شدن، بی‌حرکتی و غیره را انجام

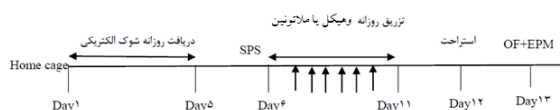
می‌دهد. به منظور تنظیم متغیرهای آزمایش و ثبت داده‌ها و تجزیه و تحلیل اطلاعات، دستگاه به رایانه‌ای مجهز به نرم‌افزار Etho-vision (نسخه ۳) متصل می‌باشد.

در روز ششم با مدل سه مرحله‌ای SPS مواجه می‌شدند. در مرحله اول SPS، حیوانات ۲ ساعت در مقیدکننده (Restrainer) بی‌حرکت شدند. در مرحله دوم، بلافاصله بعد از خروج از مقیدکننده، حیوانات به مدت ۲۰ دقیقه در ظرفی استوانه‌ای شکل که دو سوم آن با آب ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد پر می‌شد، جهت شنای اجباری قرار گرفتند و نهایتاً، بعد از ۱۵ دقیقه با دی‌اتیل‌اتر بی‌هوش شدند.

هفت روز پس از القاء PTSD یعنی در روز سیزدهم، تست Open field و ماز به‌علاوه‌ای مرتفع (Elevated Plus Maze) (EPM) صورت می‌گرفت.

Open field. به منظور ارزیابی عدم وجود نقص حرکتی و بررسی فعالیت جستجوگرانه‌ی از تکنیک Open field استفاده شد. حیوانات به مدت ۵ دقیقه در این جعبه قرار می‌گرفتند. جعبه‌ای با دیواره‌هایی از جنس پلکسی‌گلس (Plexiglass)، به ابعاد ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متر که کف جعبه به ۹ مربع با اندازه‌های مساوی (۱۶/۶×۱۶/۶) تقسیم شده بود. پارامتر اصلی Crossing یعنی تعداد اضلاع مربع‌هایی که حیوان از آن عبور می‌کند شمارش می‌شد و مورد بررسی قرار می‌گرفت [۲۹]. اگرچه علاوه بر شاخص مذکور حرکتی مثل Grooming یعنی تعداد دفعاتی که عمل تمیز کردن (یا خاراندن) خود را انجام می‌دهد و Rearing یعنی تعداد دفعاتی که روی دو پای خود می‌ایستد نیز شمارش می‌شد، اما نتایج به‌دست آمده مورد بررسی قرار نگرفتند.

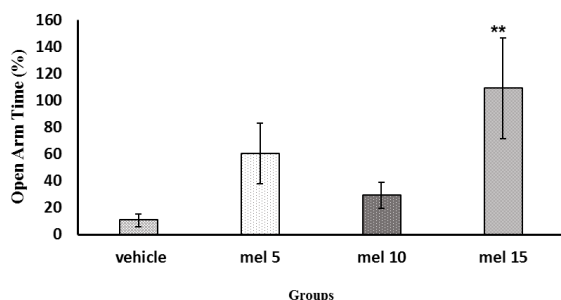
دستگاه ارزیابی سطح اضطراب. دو ساعت بعد از Open field حیوانات در ماز به‌علاوه‌ی شکل مرتفع برای ارزیابی اضطراب قرار گرفتند. این دستگاه از جنس چوب و دارای دو بازوی باز (هر یک ۵×۵ سانتی‌متر) و دو بازوی بسته (هر یک ۱۰×۵ سانتی‌متر) است و حدود ۵۰ سانتی‌متر از کف اتاق بالاتر قرار می‌گیرد. در مدت ۵ دقیقه حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف حرکت می‌کند. بین آزمایشات باید



شکل ۱. مراحل مختلف آزمایش

نتایج

آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که گروه‌های مختلف از نظر درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز (OAT) با یکدیگر تفاوت معنادار دارند [F(3,34)=3.969, P=0.016] و آزمون تکمیلی توکی نشان داد که ملاتونین تنها با دوز ۱۵ mg/kg به طور معنی‌داری میزان درصد زمان گذرانده شده را در بازوی باز در مقایسه با گروه بیمار افزایش داد (P=۰/۰۱۴). در شکل ۲ مقادیر OAT در گروه‌های تیمار با گروه کنترل مقایسه شده است.



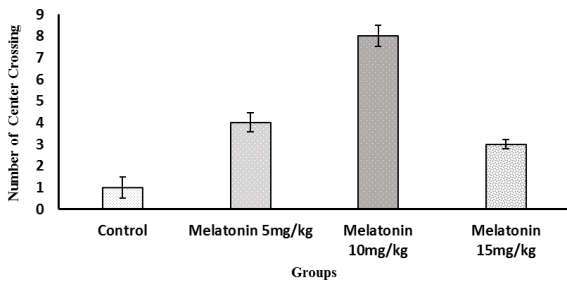
شکل ۲. اثر تزریق مکرر دوزهای مختلف ملاتونین بر فاکتور درصد زمان حضور در بازوی باز. داده‌ها به صورت Mean \pm SEM نمایش داده شده‌اند. * P < ۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل. (n = 10)

آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر درصد دفعات ورود به بازوی باز (OAE) بین گروه‌های مختلف وجود ندارد [F(3,34)=0.6, P=0.619] (شکل ۳). آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در پارامتر crossing بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد [F(3,34)=4/230, P=0/012] و آزمون تکمیلی توکی افزایش معنی‌داری را در مقدار Crossing گروه ملاتونین ۱۰ mg/kg (در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۷).

بازوهای باز با اتانول ۷۰ درصد تمیز شود. این مدل تجربی سنجش اضطراب غیر شرطی بوده و نیازی به آموزش و یادگیری حیوان ندارد [۱۶، ۱۷، ۱۸]. در این مدت ۵ دقیقه تمام تحرکات حیوان فیلم‌برداری شده و تعداد دفعات ورود حیوان به بازوهای باز، بازوهای بسته و همچنین مجموع زمان سپری شده در بازوها محاسبه می‌شود. عبور چهار دست و پای حیوان از خط ورودی بازوها ورود محسوب می‌شود. درصد دفعات ورود به بازوی باز و درصد زمان حضور در بازوی باز که ملاک اضطراب است به این صورت محاسبه می‌گردند. الف: درصد نسبت ورود به بازوی باز به مجموع ورود به بازوهای باز و بسته (OAT) % ب: درصد زمان سپری شدن در بازوی باز به مجموع زمان سپری شده در بازوی باز و بسته (OAE) % افزایش درصد ورود به بازوهای باز و افزایش درصد مدت زمان سپری شده در بازوی باز شاخص‌های کاهش اضطراب در موش تلقی می‌شوند [۲۹]. قضاوت در مورد اختلاف معنی‌دار سطح اضطراب بدین صورت بود که اگر هم‌زمان هر دو شاخصه (تعداد ورود به بازوی باز و مدت زمان سپری شده در بازوی باز) در یک راستا کاهش و یا افزایش می‌یافت و یا حداقل یکی از آنها تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل می‌داشت، به عنوان تغییر سطح اضطراب تلقی می‌شد.

حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: یک گروه بیمار (دریافت‌کننده ویکل) و سه گروه تیمار شده با دوزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ mg/kg ملاتونین. مراحل مختلف آزمایش در شکل ۱ نمایش داده شده است.

آنالیز آماری. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه می‌شود. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و با کمک آنالیز واریانس یک طرفه با یکدیگر مقایسه شدند. همچنین از آزمون تکمیلی توکی برای تعیین تفاوت بین هر کدام از گروه‌ها استفاده شد. P < ۰/۰۰۵ به عنوان مرز استنتاج آماری بررسی اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایشی بوده است.



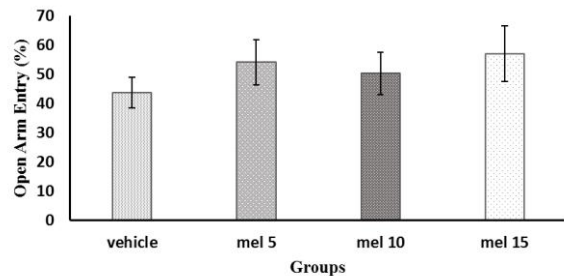
شکل ۵. اثر ملاتونین بر تعداد دفعات گذر از مربع مرکزی. ملاتونین با دوز ۱۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن سبب افزایش معنی دار مقدارگذر از مربع مرکزی نسبت به گروه کنترل شد. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ نمایش داده شده‌اند. ($P < 0/01^{**}$).

بحث و نتیجه گیری

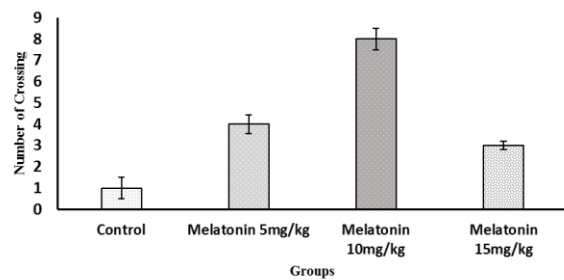
مدل تک استرس طولانی مدت (SPS) توسط Liberzon و همکاران در سال‌های ۱۹۹۷-۱۹۹۹ ارائه و تکمیل شد. اظهار این گروه نسبت به بقیه مدل‌های تا آن زمان از ارزش و اعتبار بیشتری برخوردار بوده و ضوابط قید شده برای یک مدل خوب حیوانی را داراست [۱۹]. Bachmann و همکارانش در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند در رت‌هایی که در معرض SPS قرار داده شدند، بیان بیش از حد رسپتورهای گلوکوکورتیکوئید و کاهش سطح پلاسمای گلوکوکورتیکوئید و تغییرات مغزی مانند آتروفی هیپوکامپ و غیره که از علائم شبیه به علائم بیماران PTSD است، به وجود می‌آید [۲۰]. نتیجه تحقیقات Kohda و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر آن شد که تلفیقی از دو مدل استرس ترس شرطی (CF) و مدل تک استرس طولانی مدت (SPS) در موش صحرائی، به طور گسترده‌ای می‌تواند مانند ترس شرطی و ترس حساس شده که مشابه علائم کلینیکی بیماری PTSD است را ایجاد کند [۲۱]. با توجه به مطالب عنوان شده بر آن شدیم که در تحقیق حاضر برای القا PTSD از مدل تلفیقی استفاده کنیم. مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از آزمایشات پیشین این آزمایشگاه، نیز موید اثرگذاری بیش‌تر مدل مذکور است.

بیش از ۳۰ مدل سنجش اضطراب وجود دارد که غالب آن‌ها ماهیت رفتاری دارند. ماز به علاوه‌ی مرتفع، که یکی از مدل‌های سنجش رفتارهای غیر شرطی می‌باشد و برای

سایر دوزهای ملاتونین نتوانستند تغییر معنی‌داری در پارامتر Crossing در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کنند (شکل ۴).



شکل ۳. اثر تزریق مکرر دوزهای مختلف ملاتونین بر فاکتور درصد دفعات ورود به بازوی باز. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ نمایش داده شده‌اند ($n = 10$).



شکل ۴. اثر ملاتونین بر تعداد دفعات گذر از خطوط زمینه در Open field. ملاتونین با دوز ۱۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن سبب افزایش معنی دار مقدار crossing نسبت به گروه کنترل شد. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ نمایش داده شده‌اند ($P < 0/001^{***}$).

هم‌چنین آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که از نظر تعداد دفعات گذر از مربع مرکزی نیز بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد [$F(3,34)=2/13, P=0/01$] و آزمون تکمیلی توکی افزایش معنی‌داری را در گروه ملاتونین ۱۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0/01$) (شکل ۵).

سروتونین حاصل منجر به کاهش رفتار اضطراب می‌شود [۲۴].

مکانیسم فیزیولوژیک عمل‌کرد ملاتونین با دوز بالا بر رفتار اضطرابی نیازمند مطالعات تکمیلی است.

تست رفتاری Open Field علاوه بر این‌که به منظور سنجش فعالیت‌های حرکتی و جستجوگرانه حیوان استفاده می‌گردد، جهت بررسی میزان ترس حساس شده و اضطراب نیز کاربرد دارد. در این ماز کاهش تعداد دفعات گذر از خطوط زمینه نشان‌دهنده افزایش ترس و اضطراب می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که تزریق ۶ روزه ملاتونین با دوز ۱۰ میلی‌گرم منجر به افزایش معنی‌دار تعداد دفعات عبور از خطوط زمینه در مقایسه با گروه کنترل شد. به عبارتی تیمار حیوانات با این دوز منجر به افزایش گذر حیوان از خطوط زمینه و در نتیجه کاهش ترس و اضطراب شده است. در همین راستا تعداد دفعات عبور از مربع مرکزی نیز در حیوانات تیمار شده با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. این افزایش نیز شاهد دیگری است بر کاهش اضطراب در این گروه از حیوانات.

دوزهای تاثیرگذار در تست‌های ماز به‌علاوه‌ی مرتفع و Open field با یک‌دیگر متفاوت بود. اثرات ملاتونین در تست Open field با دوز پایین‌تری در مقایسه با ماز به‌علاوه‌ی مرتفع مشاهده می‌شود. اختلاف مدل‌های به‌کار رفته، احتمالاً توجیه‌کننده‌ی حساسیت متفاوت آن‌ها به دوزهای مختلف ملاتونین است. با توجه به بالا بودن سطح اضطراب در ماز به‌علاوه‌ی مرتفع در مقایسه با تست Open field احتمالاً دوز بالاتر ملاتونین برای کاهش اضطراب در این تست مورد نیاز است. تفاوت عمل‌کرد وابسته به دوز ملاتونین در گزارش‌های دیگران نیز عنوان شده است [۲۶].

در راستای مشاهده اثرات ضد اضطرابی ملاتونین در تست Open field گزارش شده که تزریق صفاقی ملاتونین با دوز ۱ mg/kg یک ساعت قبل از تست open field باعث افزایش تعداد دفعات گذر حیوان از مربع مرکزی می‌شود [۲۵].

مطالعه‌ی اضطراب در جوندگان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۲۲]. در این تحقیق از مدل ماز به‌علاوه‌ی مرتفع برای مشاهده‌ی اثرات اضطراب ناشی از تزریق دارو استفاده شده است. دو شاخص درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز و درصد دفعات ورود به بازوی باز اندازه‌گیری شد، مقادیر به دست آمده با میزان اضطراب رابطه‌ی عکس دارند.

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق مکرر ملاتونین با دوز ۱۵ mg/kg موجب تعدیل رفتارهای اضطرابی ناشی از القای PTSD می‌شود. میزان اضطراب حیوان ۱۳ روز بعد از تزریق داخل صفاقی ملاتونین ارزیابی شد. ملاتونین تنها با دوز بالا توانست باعث افزایش معناداری تنها در درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز و نه در درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز، موثر باشد. حیوانات تیمار شده با دوز ۱۵ mg/kg ملاتونین تقریباً صد در صد زمان قرارگیری در ماز را در بازوی باز گذراندند و این در حالی است که در حیوانات مبتلا به PTSD که تحت تیمار با ملاتونین قرار نداشتند و حلال دریافت کرده بودند میانگین این زمان تنها ده درصد بود. و همین رفتار منجر به این گردید که میانگین تعداد دفعات عبور تفاوت معنی‌داری در این گروه با گروه کنترل نداشته باشد. چرا که حیوانات در اثر بهبود اضطراب تمایل حضور بیش‌تر در بازوهای باز داشتند.

شواهدی مبنی بر اثرات تزریق مکرر ملاتونین بر رفتارهای اضطرابی وجود ندارد. اما در مطالعه‌ی، گزارش شده است که ریز تزریق ۱۰۰ µg/kg ملاتونین به آمیگدال باعث افزایش کل زمان گذرانده شده در بازوی باز می‌شود. در این تحقیق اعلام شد که افزایش زمان گذرانده شده در بازوی باز، ناشی از دریافت دوز بالای ملاتونین، با Pinealectomy معکوس می‌گردد و شواهدی مبنی بر برهم‌کنش ملاتونین با سیستم گاباژریک ارائه شد. به این ترتیب که ملاتونین سطوح گابای مغزی را افزایش داده و از این طریق بر کاهش اضطراب موثر است [۲۶]. در مطالعه‌ی دیگر، گزارش شده که سطح سروتونین مغزی به طور قابل توجهی حداکثر ۶۰ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی ملاتونین افزایش می‌یابد. افزایش

- [11] Hardeland R. Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms. *J Pineal Res* 2013; 55: 325-356.
- [12] Abreo K, Sella M, Alvarez-Hernandez X, Jain S. Antioxidants prevent aluminum-induced toxicity in cultured hepatocytes. *J Inorg Biochem* 2004; 98: 1129-1134.
- [13] Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237-256.
- [14] Acuna-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG, Reiter RJ. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 1997; 60: 23-29.
- [15] Miller E, Walczak A, Majsterek I, Kedziora J. Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. *J Neuroimmunol* 2013; 257: 97-101.
- [16] Sofiaabadi M, Sadeghipour HR, Shabanzadeh AR, Zarrindast MR, Dehpour AR. Possible involvement of nitric oxide (NO) in anxiety-like behavior induced by female steroid hormones. *Koomesh* 2001; 2: 79-86. (Persian).
- [17] Yildiz F, Ulak G, Erden BF, Gacar N. Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 65: 199-202.
- [18] Wiley JL, Cristello AF, Balster RL. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* 1995; 294: 101-107.
- [19] Liberzon I, Krstov M, Young EA. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22: 443-453.
- [20] Bachmann AW, Sedgley TL, Jackson RV, Gibson JN, Young RM, Torpy DJ. Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2005; 30: 297-306.
- [21] Kohda K, Harada K, Kato K, Hoshino A, Motohashi J, Yamaji T, et al. Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model. *Neurosci* 2007; 148: 22-33.
- [22] Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 33-36.
- [23] Hoffman RA, Reiter RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat Rec* 1965; 153: 19-21.
- [24] Niles LP, Pickering DS, Arciszewski MA. Effects of chronic melatonin administration on GABA and diazepam binding in rat brain. *J Neural Transm* 1987; 70: 117-124.
- [25] Golus P, King MG. The effects of melatonin on open field behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 1981; 15: 883-885.
- [26] Karakas A. Intraamygdalar melatonin injections on the anxiety like behavior and the spatial memory performance in male Wistar rats. *Behav Brain Res* 2011; 222: 141-150.
- [27] Polimeni G, Esposito E, Bevelacqua V, Guarneri C, Cuzzocrea S. Role of melatonin supplementation in neurodegenerative disorders. *Front Biosci* 2014; 19: 429-446.
- [28] Baydasa G, Tuzcu M. Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Exp Neurol* 2005; 194: 175-181.
- [29] Wang H, Zuo D, He B, Qiao F, Zhao M, Wu Y. Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: a new PTSD mouse model. *Neurosci Res* 2012; 73: 142-152.

با توجه اثرات مشاهده شده ضد اضطرابی ملاتونین در دو تست ماز به‌علاوه‌ای مرتفع و Open field امید است با انجام آزمایشات تکمیلی ره‌گشای راهی برای ایفای اثرات ضد اضطرابی در بیماری PTSD باشیم.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم آسیه سرگلزهی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد فیزیولوژی از دانشگاه دامغان بود. بدین‌وسیله از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- [1] Meece JL, Anderman EM, Anderman LH. Classroom goal structure, student motivation, and academic achievement. *Annu Rev Psychol* 2006; 57: 487-503.
- [2] McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller M. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacol* 2012; 62: 3-12.
- [3] Davis M, Shi C. The extended amygdala: Are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the striaterminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 877: 281-910.
- [4] Artino AR, Hemmer PA, Durning SJ. Using self-regulated learning theory to understand the beliefs, emotions, and behaviors of struggling medical students. *Acad Med* 2011; 86: 35-38.
- [5] Schipper HM. Sex hormones in stroke, chorea, and anticonvulsant therapy. *Semin Neurol* 1988; 8: 181-186.
- [6] Paunovic N, Lundh LG, Ost LG. Memory bias for faces that are perceived as hostile by crime victims with acute post-traumatic stress disorder. *Cogn Behav Ther* 2003; 32: 203-214.
- [7] Blair K, Shaywitz J, Smith BW, Rhodes R, Geraci M, Jones M, et al. Response to emotional expressions in generalized social phobia and generalized anxiety disorder: evidence for separate disorders. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 1193-1202.
- [8] Geoffriau M, Brun J, Chazot G, Claustrat B. The physiology and pharmacology of melatonin in humans. *Horm Res* 1998; 49: 136-141.
- [9] Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 1974; 184: 1341-1348.
- [10] Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews*. 2005; 9: 11-24.

Effects of melatonin on anxiety- like behaviors induced by post-traumatic stress disorder in rat

Asieh Sargolzehi (M.Sc), Kataneh Abrari (Ph.D)*, Mahmoud Elahdadi Salmani (Ph.D), Iran Goudarzi (Ph.D)

School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

(Received: 30 Aug 2014; Accepted: 15 Jun 2015)

Introduction: Post traumatic stress disorder (PTSD) is an anxiety disorder. This study was aimed to evaluate the effect of multiple injections of melatonin on anxiety like behaviors induced by PTSD.

Materials and methods: PTSD induced in 60 male wistar rats, by combining the shock and single-prolonged stress method (S&SPS). Animals received electric shock (1 mA, 2s) for 5 days, and then on the day 6 they underwent three stages of SPS (restrained for 2 hours, forced swimming for 20 minutes and anesthetized by diethyl ether for 15 minutes). Seven days after PTSD induction, elevated plus maze (EPM) and open field tests were performed to measure anxiety profile. Animals received multiple subcutaneous injections of melatonin (5, 10, 15 mg/kg) or saline, within the 7 days after PTSD.

Results: The control (saline) and treated (melatonin) groups showed significant differences in the percentage of time spent in open arms of the EPM. Melatonin, at dose of 15mg/kg, significantly increased the time spent in open arms of the EPM than the corresponding control group. Animals who received 10mg/kg melatonin showed a significant increase in crossing behavior in open field test than the corresponding control group.

Conclusion: Our study showed that melatonin is able to reduce PTSD-induced anxiety-like behaviors in rats.

Keywords: Anxiety, Melatonin, Post-Traumatic Stress Disorder, Rats

* Corresponding author. Tel: +98 23 35220237

abrari@du.ac.ir