

اثرات محافظت عصبی آستاگزانتین بر رفتارهای شبه اضطرابی و استرس اکسیداتیو ناحیه قشر مغز موش کوچک آزمایشگاهی مدل اتانولی

اکبر حاجی‌زاده مقدم^{۱*}، معصومه برادران پایین رودپشتی^۱، صدیقه خانجانی جلودار^۱، سروش فرهادی پهنردی^۱

^۱گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. ایمیل: a.hajizadeh@umz.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۲

چکیده

مقدمه: اتانول ماده‌ای مخدر و روانگردان است که مصرف آن سبب بروز استرس اکسیداتیو در مغز و تغییرات رفتاری مانند اضطراب می‌شود. اثرات اتانول ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد و پدیده‌ی استرس اکسیداتیو است.

اهداف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظت عصبی آستاگزانتین بر رفتارهای شبه اضطرابی و استرس اکسیداتیو ناحیه قشر مغز موش کوچک آزمایشگاهی مدل اتانولی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ۳۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ به ۵ گروه ($n = 7$) شامل کنترل، آستاگزانتین، اتانول و ۲ گروه تیمار با آستاگزانتین با دوزهای ۲۰ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. همه‌ی تیمارها روزانه و در یک دوره‌ی ۱۴ روزه انجام شدند. آزمون‌های رفتاری ماز صلیبی بالاتر از زمینه (EPM) و زمینه باز (OFT) و فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، گلوکاتایون S-ترنسفرز (GST) و سطح گلوکاتایون (GSH) در بافت قشر مغز اندازه‌گیری شد.

نتایج: اتانول به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت حرکتی و کاهش زمان ماندن در بازوی باز، تعداد ورود به بازوی باز، زمان ماندن در مرکز، فعالیت آنزیم‌ها و سطح GSH نسبت به گروه اتانول شد. آستاگزانتین به‌طور معنی‌داری باعث کاهش فعالیت حرکتی و افزایش زمان ماندن در بازوی باز، تعداد ورود به بازوی باز، زمان ماندن در مرکز، فعالیت آنزیم‌ها و سطح GSH نسبت به گروه اتانول شد.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد، درمان با آستاگزانتین رفتارهای اضطرابی را بهبود بخشیده و به‌طور موثر از قشر مغز در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف اتانول محافظت می‌کند. بنابراین، از آستاگزانتین احتمالاً می‌توان به‌عنوان مکمل دارویی برای بهبود آسیب‌های رفتاری و اکسیداتیو ناشی از اتانول استفاده کرد.

واژگان کلیدی: اتانول، استرس اکسیداتیو، اضطراب، آستاگزانتین، موش کوچک آزمایشگاهی

۱. مقدمه

اضطراب، افسردگی و اختلالات روانی مرتبط است (۴). ارتباط نسبتاً قوی بین مصرف الکل در نوجوانی و افزایش شیوع اختلالات اضطرابی و افسردگی در بزرگسالی وجود دارد (۵). پیامدهای رفتاری ناشی از مصرف الکل در سنین نوجوانی، شامل کاهش انعطاف‌پذیری شناختی، افزایش ریسک‌پذیری و اضطراب است که با تغییرات عصبی متعددی مرتبط است (۶). مکانیسم‌های اثرات پایدار قرار گرفتن در معرض اتانول قبل از تولد در انسان هنوز مبهم است، اما محققان بر این باورند که محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق کلیه (HPA) در این مورد درگیر است (۷). قرار گرفتن در معرض اتانول قبل از تولد اغلب موجب افزایش فعالیت HPA و افزایش پاسخ‌دهی به HPA در دوران نوزادی می‌شود که از دوران نوجوانی تا

اتانول مایعی شفاف و محلول در آب است که از تخمیر قندها تولید شده که جز اصلی نوشیدنی‌های الکلی محسوب می‌شود (۱، ۲). مصرف بیش از حد اتانول، اثرات مخرب زیادی بر بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مغز دارد. این اثرات به‌دلیل مسمومیت و تخریب عصبی ناشی از اکسیداسیون اتانول در مغز است. متابولیسم اتانول به استالدهید و سپس به استات با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مرتبط است که موجب تقویت حالت اکسیداتیو در سلول‌ها می‌گردد. مطالعات نشان داده‌اند که مصرف اتانول، سبب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپید و کاهش آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا مانند گلوکاتایون می‌شود (۳). استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف اتانول با

بزرگسالی ادامه می یابد (۸).

استفاده از ترکیبات گیاهی به دلیل خواص آنتی اکسیدانی عالی برای حفاظت و درمان برخی از بیماری ها توصیه می شود. یکی از این ترکیبات گیاهی کاروتنوئیدها هستند. کاروتنوئیدها اصطلاح کلی برای دسته ای از رنگدانه های طبیعی هستند که نقش مهمی در سلامت انسان دارند. آستاگزانتین نوعی کاروتنوئید محلول در چربی با فرمول شیمیایی $\text{dione-4,4-dihydroxy-}\beta,\beta\text{'-carotene-3,3}$ است (۹). آستاگزانتین ترکیبی با خواص آنتی اکسیدان قوی و اثرات محافظتی شامل پاک سازی رادیکال های آزاد، محافظت از میتوکندری و ضدالتهابی است (۱۰). آستاگزانتین توسط جلبک ها، گیاهان و تعداد محدودی قارچ و باکتری تولید می شود. این ماده به عنوان مهارکننده گونه های اکسیژن فعال عمل می کند. توانایی قرارگیری داخل غشای فسفولیپیدی یا سطح غشا را دارد و از طریق سد خونی- مغزی عبور می کند (۴). در هنگام جذب، آستاگزانتین با اسید صفراوی مخلوط شده، میسل ایجاد می کند و در شیلومیکرون گنجانده می شود. آستاگزانتین با لیپوپروتئین جذب می شود و به بافت های بدن منتقل می شود تا از سلول ها و غشا در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت کند (۱۱). آستاگزانتین به دلیل خاصیت عبور از سد خونی-مغزی، دارای اثرات محافظت عصبی نیز است. همچنین در بهبود رفتارهای شناختی نیز بسیار موثر است (۱۲). در سال های اخیر، پژوهشگران تأیید کرده اند که آستاگزانتین به دلیل داشتن خواص آنتی اکسیدانی، اثرات بالقوه ای بر بیماری های مختلف از جمله فشار خون بالا، دیابت، بیماری های قلبی-عروقی، گوارشی، کبدی و بیماری های پوستی دارد (۱۳).

۲. اهداف

اگرچه مطالعات اخیر اثرات آنتی اکسیدانی آستاگزانتین را تأیید می کنند، مطالعات گسترده تری با استفاده از مدل های مختلف بیماری ها برای بررسی دقیق تر رویکرد این ماده به نظر می رسد. بدین منظور، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات محافظت عصبی آستاگزانتین بر رفتارهای شبه اضطرابی و استرس اکسیداتیو ناحیه قشر مغز موش کوچک آزمایشگاهی مدل اتانولی است.

۳. مواد و روش ها

در این پژوهش ۳۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵-۳۰ گرم از انستیتو پاستور آمل تهیه گردید. در اتاق حیوانات دانشکده زیست شناسی در شرایط استاندارد با دوره های روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته در

دمای ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. همچنین آب و غذای مخصوص حیوانات به مقدار مناسب و کافی در دسترس قرار گرفت. به منظور عادت کردن موش ها به شرایط محیطی، آزمایش ها یک هفته بعد از انتقال موش ها به آزمایشگاه انجام پذیرفت. کلیه مراحل مطابق با منشور اخلاق زیستی دانشگاه مازندران با کد اخلاق IR.UMZ.REC.1401.044 انجام پذیرفت. برای ایجاد مدل اتانولی، اتانول ۲۰ درصد تهیه شد و به مقدار ۰/۱ سی سی به مدت ۱۴ روز متوالی به گروه اتانول و گروه های تیمار گاوژ شد. پودر آستاگزانتین از شرکت دایا اکسیر، نمایندگی سیگما آلدریج تهیه شد (شماره کاتالوگ SML۰۹۸۲). سپس به ترتیب هر یک از دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم از پودر آستاگزانتین در ۱ سی سی آب مقطر حل شد. سپس مطابق با وزن هر موش مقدار لازم به صورت گاوژ خورانده شد.

حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه (هر گروه ۷ سر) تقسیم شدند ($n=7$):

- ۱- گروه کنترل که هیچ دارویی را دریافت نکردند.
- ۲- گروه آستاگزانتین ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم را به مدت ۱۴ روز متوالی به صورت گاوژ دریافت کردند.
- ۳- گروه اتانولی، اتانول ۲۰ درصد را به میزان ۰/۱ سی سی به مدت ۱۴ روز متوالی به صورت گاوژ دریافت کردند.
- ۴- گروه تیمار شده با آستاگزانتین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، به مدت ۱۴ روز متوالی ابتدا اتانول ۲۰ درصد را به صورت گاوژ دریافت کرده و ۲ ساعت بعد آستاگزانتین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم را به صورت گاوژ دریافت کردند.
- ۵- گروه تیمار شده با آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، به مدت ۱۴ روز متوالی ابتدا اتانول ۲۰ درصد را به صورت گاوژ دریافت کرده و ۲ ساعت بعد آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم را به صورت گاوژ دریافت کردند.

۱.۳. آزمون های رفتاری

۱.۱.۳. آزمون ماز صلیبی بالاتر از زمینه (EPM)

آزمون ماز صلیبی بالاتر از زمینه، مدلی برای تعیین و ارزیابی میزان اضطراب در جوندگان است (۱۴). قبل از انجام آزمایش، موش ها به مدت ۵ دقیقه در اتاقی که دستگاه در آن بود، قرار گرفتند. حیوانات به طوری در مرکز دستگاه قرار داده شدند که صورت آن ها به سمت بازوی باز باشد. مدت ۵ دقیقه به موش ها فرصت داده شد تا در بازوهای باز و بسته آزادانه حرکت کنند. رفتار و حرکات موش ها با استفاده از یک دوربین نصب شده در دستگاه ضبط شد. سپس مدت زمان و تعداد دفعات ورود به بازوی باز مطابق فرمول زیر بر حسب درصد محاسبه شد. عبور چهار دست و پای حیوان از خط

ورودی بازوی باز و بازوی بسته به عنوان ورود در نظر گرفته می شود.

$$\%OAT = \frac{\text{مدت زمان حضور در بازوی باز}}{\text{مجموع مدت زمان حضور در بازوی باز و بسته}} \times 100$$

$$\%OAE = \frac{\text{تعداد دفعات ورود به بازوی باز}}{\text{مجموع تعداد دفعات ورود به بازوی باز و بسته}} \times 100$$

۲.۱.۳. آزمون زمینه باز (OFT)

برای ارزیابی میزان اضطراب و فعالیت حرکتی آزمون زمینه باز به کار برده می شود. برای انجام این آزمون، حیوان را در یکی از چهار گوشه دستگاه قرار می دهیم تا در جعبه به طور آزادانه حرکت کند. مدت زمان انجام این تست حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه است. در این تست پارامترهای زیر مورد ارزیابی و سنجش قرار می گیرند: (۱) شاخص سنجش فعالیت حرکتی؛ (۲) شاخص سنجش اضطراب (۱۵)

۲.۳. جداسازی بافت قشر مغز

پس از پایان مراحل آزمایش، موش ها را توسط کلروفورم بیهوش کرده و پس از جداسازی سر حیوان، ناحیه قشر مغز از سایر نواحی مغز جدا و در نیتروژن مایع فریز شد. نمونه های جدا شده به منظور انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۱.۲.۳. روش هموزن کردن بافت قشر مغز

از محلول Tris-HCl (pH = ۷/۴)، غلظت ۱۰ نانومولار، EDTA (۱ میلی مولار) و ساکارز (۰/۳۲ مولار) استفاده گردید. ۱۵۰ میلی گرم از بافت قشر مغز هر موش را در ۱/۵ سی سی از بافر Tris-HCl با دستگاه هموژنایزر هموزن کرده تا مخلوط یکدست شود. بافت هموزن شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع شفاف رویی جمع آوری شد و برای سنجش فعالیت آنزیم ها و سطح گلوکوتاتیون مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

۳.۳. سنجش شاخص های آنتی اکسیدانی قشر مغز

۱.۳.۳. اندازه گیری غلظت پروتئین

اندازه گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد و در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از منحنی پروتئین استاندارد آلبومین انجام شد (۱۷).

۲.۳.۳. تعیین سطح گلوکوتاتیون هر نمونه

تعیین غلظت گلوکوتاتیون (GSH) به روش المان انجام شد و برای تعیین سطح گلوکوتاتیون هر نمونه، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سوپرناتانت نمونه هموزن شده به محلول بافر سدیم فسفات ۰/۲۵ مولار با pH=۷/۴ و ۱۳۰ میکرولیتر DTNB ۰/۴ درصد و ۱۷۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. پس از آن جذب نوری گلوکوتاتیون در مقابل محلول شاهد که حاوی تمام مواد بالا به جز سوپرناتانت نمونه مغز بود، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد (۱۸).

۳.۳.۳. سنجش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز

فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) با روش هریتکو اندازه گیری شد. برای اندازه گیری فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز در هر نمونه از مخلوط واکنشی که شامل ۱ میلی لیتر سدیم آزید ۵ میلی مولار، ۱ میلی لیتر بافر گلوکوتاتیون کاهیده ۴ میلی مولار، ۱ میلی لیتر سدیم فسفات ۰/۴ مولار با pH=۷/۴ که با ۰/۴ میلی مولار EDTA حل شده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافت هموزن شده به مخلوط واکنش اضافه گردید و اجازه داده شد به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردد و در نهایت ۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۴ میلی مولار به مخلوط افزوده شد و دوباره به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در پایان جذب محلول در طول موج ۳۴۰ نانومتر و به مدت ۲ دقیقه خوانده شد (۱۹).

۴.۳.۳. سنجش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S-ترنسفرز

اندازه گیری گلوکوتاتیون S-ترنسفرز (GST) با روش Habig و Jakoby انجام شد (۲۰). ۰/۴۶۸ گرم از پودر گلوکوتاتیون به ۲/۵ سی سی بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با pH=۶/۵ اضافه شد. به این مواد محلول ۱-کلرو-۲،۴-دی نیتروبنزن (CDNB) ۵۰ میلی مولار اضافه شد. سپس محلول آماده شده به ۲۵ میکرولیتر نمونه هموزن شده اضافه شد و در پایان جذب نوری محلول در طول موج ۳۴۰ نانومتر و به مدت ۳ دقیقه خوانده شد (برای تهیه محلول CDNB، ۰/۰۳ گرم از پودر CDNB در ۲/۵ سی سی اتانول ۱۰۰ درصد حل شد).

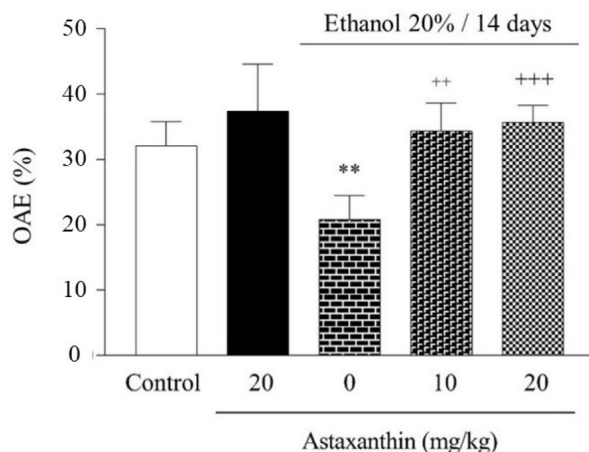
۴.۳. آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه بین گروه ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده گردید. در صورت معنی دار شدن نیز از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. تمامی محاسبات و رسم نمودار با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism انجام شده و مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شدند.

۴. نتایج

۱.۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر مدت زمان حضور در بازوی باز آزمون ماز صلیبی بالاتر از زمینه

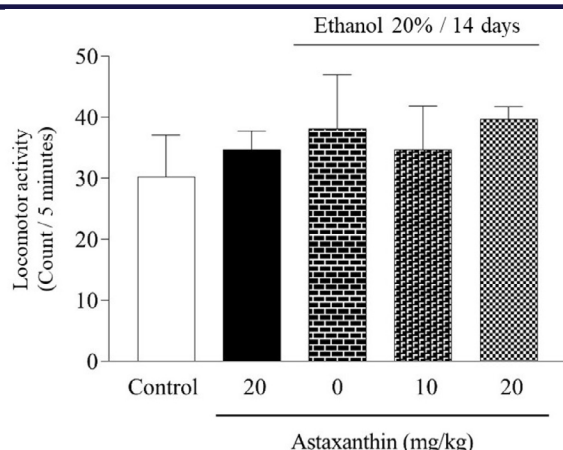
نتایج طبق **تصویر ۱** نشان می‌دهد که مدت زمان حضور در بازوی باز در گروه اتانول کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل دارد. در حالی که مدت زمان حضور در بازوی باز در گروه‌های اتانولی تیمار شده با آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب افزایش معنی‌دار ($P < 0.01$) و ($P < 0.05$) نسبت به گروه اتانول نشان می‌دهد.



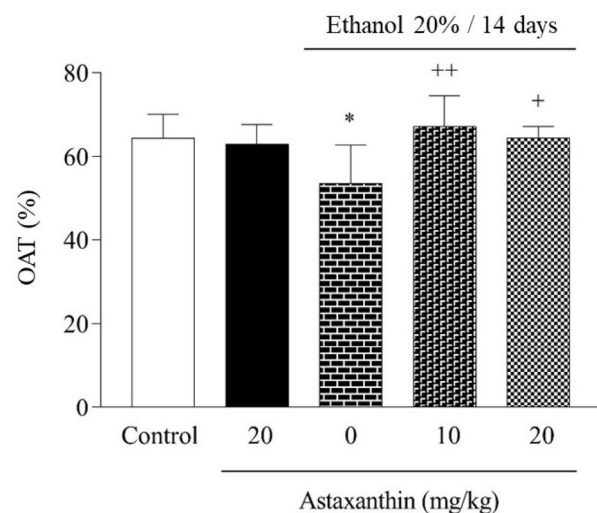
تصویر ۲. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر تعداد دفعات حضور در بازوی باز در آزمون ماز صلیبی. OAE: تعداد دفعات ورود به بازوی باز بر حسب درصد. گروه Control هیچ تیماری دریافت نکرد. گروه ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را دریافت کرد. گروه ۰، اتانول ۲۰ درصد را دریافت کرد. گروه‌های ۱۰ و ۲۰، ابتدا اتانول ۲۰ درصد و سپس آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند ($n = 7$). برای هر گروه و ($Mean \pm SD$). $P < 0.01$ ** در مقایسه با گروه کنترل. $P < 0.001$ +++ در مقایسه با گروه اتانول.

۳.۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر شاخص فعالیت حرکتی در آزمون ماز صلیبی بالاتر از زمینه

با توجه به نتایج **تصویر ۳**، فعالیت حرکتی در گروه اتانولی افزایش داشته ولی این افزایش معنی‌دار نبود. همچنین فعالیت حرکتی در گروه اتانولی تیمار شده با آستاگزانتین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش داشته ولی این کاهش نیز معنی‌دار نبود.



تصویر ۳. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر فعالیت حرکتی در آزمون ماز صلیبی. گروه Control هیچ تیماری دریافت نکرد. گروه ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را دریافت کرد. گروه ۰، اتانول ۲۰ درصد را دریافت کرد. گروه‌های ۱۰ و ۲۰، ابتدا اتانول ۲۰ درصد و سپس آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند ($n = 7$). برای هر گروه و ($Mean \pm SD$).



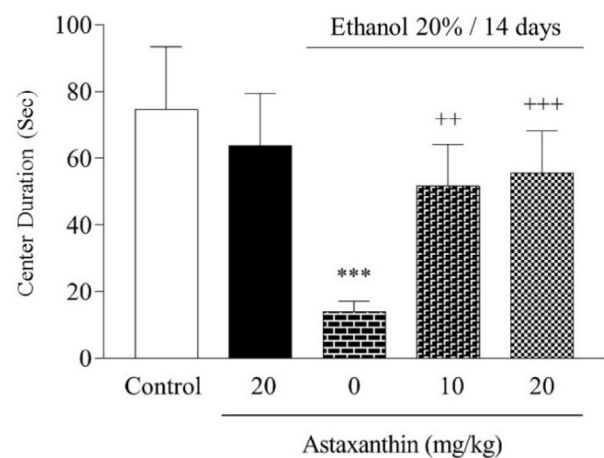
تصویر ۱. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر مدت زمان حضور در بازوی باز در آزمون ماز صلیبی. OAT: مدت زمان حضور در بازوی باز بر حسب درصد. گروه Control هیچ تیماری دریافت نکرد. گروه ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را دریافت کرد. گروه ۰، اتانول ۲۰ درصد را دریافت کرد. گروه‌های ۱۰ و ۲۰، ابتدا اتانول ۲۰ درصد و سپس آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند ($n = 7$). برای هر گروه و ($Mean \pm SD$). $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه کنترل. $P < 0.05$ + و $P < 0.01$ ++ در مقایسه با گروه اتانول.

۲.۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر تعداد دفعات ورود به بازوی باز در آزمون ماز صلیبی بالاتر از زمینه

نتایج طبق **تصویر ۲** نشان می‌دهد که درصد ورود به بازوی باز در گروه اتانول کاهشی معنی‌دار ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل دارد. در حالی که در گروه‌های اتانولی تیمار شده با آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به ترتیب افزایش معنی‌دار ($P < 0.01$) و ($P < 0.001$) در تعداد ورود به بازوی باز در مقایسه با گروه اتانول مشاهده شد.

۴.۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر مدت زمان بودن در مرکز در آزمون زمینه باز

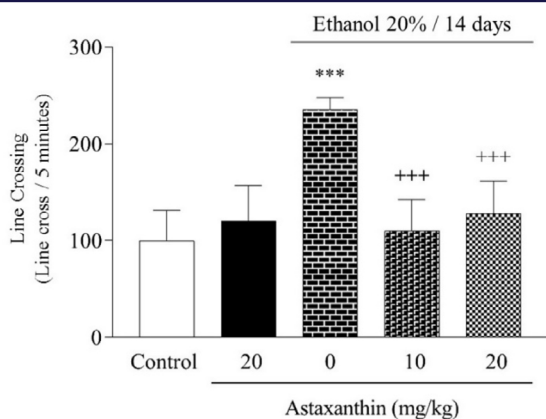
طبق نتایج **تصویر ۴**، مدت زمان بودن در مرکز در گروه اتانول کاهش معنی داری ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. همچنین این زمان در گروه‌های اتانولی تیمار شده با دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین، به ترتیب افزایش معنی دار ($P < 0.001$) و ($P < 0.001$) نسبت به گروه اتانول داشتند.



تصویر ۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر مدت زمان حضور در مرکز در آزمون زمینه باز. گروه Control هیچ تیماری دریافت نکرد. گروه ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت کرد. گروه ۰، اتانول ۲۰ درصد را دریافت کرد. گروه‌های ۱۰ و ۲۰، ابتدا اتانول ۲۰ درصد و سپس آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند ($n = 7$ برای هر گروه و $Mean \pm SD$). $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل. $P < 0.001$ ++ و $P < 0.001$ +++ در مقایسه با گروه اتانول.

۵.۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر شاخص فعالیت حرکتی در آزمون زمینه باز

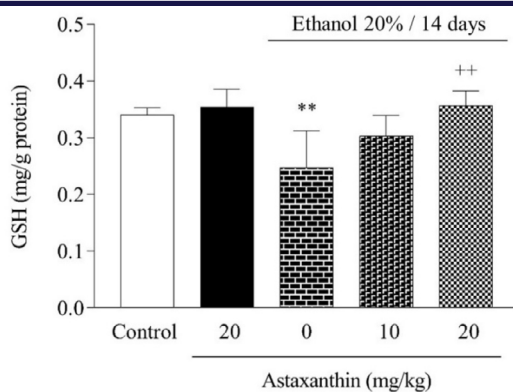
طبق نتایج **تصویر ۵**، فعالیت حرکتی در گروه اتانول مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار ($P < 0.001$) را نشان می‌دهد. در حالی که گروه‌های اتانولی تیمار شده با دوز ۰.۱ و ۰.۲ میلی گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین، کاهش معنی دار ($P < 0.001$) را در مقایسه با گروه اتانول نشان دادند.



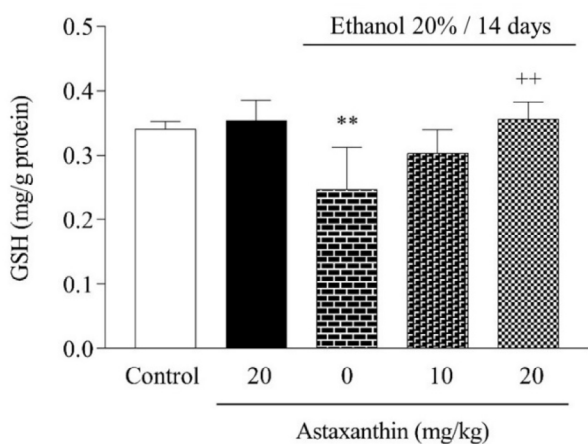
تصویر ۵. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر فعالیت حرکتی در آزمون زمینه باز. گروه Control هیچ تیماری دریافت نکرد. گروه ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت کرد. گروه ۰، ابتدا اتانول ۲۰ درصد و سپس آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند ($n = 7$ برای هر گروه و $Mean \pm SD$). $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل. $P < 0.001$ +++ و $P < 0.001$ +++ در مقایسه با گروه اتانول.

۶.۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر سطح گلوتاتیون ناحیه قشر مغز موش مدل اتانولی

با توجه به **تصویر ۶** در بررسی سطح گلوتاتیون، گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری ($P < 0.001$) داشته است. در گروه اتانولی تیمار شده با آستاگزانتین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم افزایشی در سطح گلوتاتیون نسبت به گروه بیمار مشاهده شد اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبوده است. اما در گروه اتانولی تیمار شده با آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه اتانولی، افزایش معنی داری در سطح گلوتاتیون ($P < 0.001$) مشاهده شد.



تصویر ۶. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر سطح گلوتاتیون در بافت قشر مغز موش مدل اتانولی. گروه Control هیچ تیماری دریافت نکرد. گروه ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت کرد. گروه ۰، ابتدا اتانول ۲۰ درصد و سپس آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند ($n = 7$ برای هر گروه و $Mean \pm SD$). $P < 0.001$ ** در مقایسه با گروه کنترل. $P < 0.001$ ++ در مقایسه با گروه اتانول.



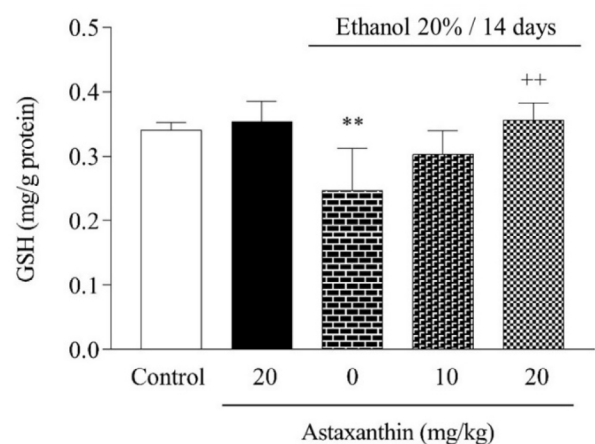
تصویر ۸. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز در ناحیه قشر مغز موش مدل اتانولی. گروه Control هیچ تیماری دریافت نکرد. گروه ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت کرد. گروه ۰، اتانول ۲۰ درصد را دریافت کرد. گروه های ۱۰ و ۲۰، ابتدا اتانول ۲۰ درصد و سپس آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند (n = ۷ برای هر گروه و Mean ± SD). * P < ۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل. + P < ۰/۰۱ در مقایسه با گروه اتانول.

۵. بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که مصرف آستاگزانتین موجب کاهش رفتارهای شبه اضطرابی و پارامترهای آنتی اکسیدانی در ناحیه قشر مغز موش مدل اتانولی می شود. به طور کلی اتانول ماده ای است که به علت داشتن ویژگی سمیت عصبی، برای انسان شناخته شده است. گزارش شده است که قرار گرفتن در معرض اتانول مزمن باعث ایجاد اختلالات روانی می شود. تغییرات رفتاری، ایجاد اضطراب و اختلالات شناختی از جمله آسیب های رفتاری هستند که به دنبال مصرف الکل بروز می کنند (۲۱، ۲۲). نتایج حاصل نشان داد که مصرف اتانول موجب کاهش مدت زمان ماندن در بازوی باز و کاهش تعداد دفعات ورود به بازوی باز در آزمون ماز صلیبی (تصاویر ۱ و ۲) و همچنین کاهش مدت زمان ماندن در مرکز و افزایش فعالیت حرکتی در آزمون زمینه باز (تصاویر ۴ و ۵) نسبت به گروه کنترل شده است. نتایج آزمون های رفتاری نشان می دهد که مصرف اتانول، باعث افزایش رفتارهای شبه اضطرابی می شود. نتایج مطالعه حاضر در راستای برخی مطالعات پیشین است، تحقیقات انجام شده توسط Varlinskaya و همکارانش در سال ۲۰۲۰ مشخص نمود که گاوای اتانول ۶۵-۲۵ درصد موجب کاهش تعداد دفعات ورود به بازوی باز و کاهش مدت زمان ماندن در بازوی باز می شود. این نتایج نشان می دهند اتانول منجر به افزایش رفتارهای شبه اضطرابی می گردد (۲۳). طی پژوهش های به عمل آمده توسط Kameda و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در مورد تاثیر

۷.۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز ناحیه قشر مغز موش مدل اتانولی

با توجه به تصویر ۷ در بررسی فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز، گروه اتانول نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار (P < ۰/۰۱) را نشان داد. در حالی که گروه تیمار شده با آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم افزایش معنی دار (P < ۰/۰۵) نسبت به گروه اتانول داشته است.



تصویر ۷. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز در بافت قشر مغز موش مدل اتانولی. گروه Control هیچ تیماری دریافت نکرد. گروه ۲۰، آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت کرد. گروه ۰، اتانول ۲۰ درصد را دریافت کرد. گروه های ۱۰ و ۲۰، ابتدا اتانول ۲۰ درصد و سپس آستاگزانتین ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند (n = ۷ برای هر گروه و Mean ± SD). * P < ۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل. ** P > ۰/۰۵ در مقایسه با گروه اتانول.

۸.۴. بررسی اثرات تیمار با آستاگزانتین بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز ناحیه قشر مغز موش مدل اتانولی

با توجه به تصویر ۸ در بررسی فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز، گروه اتانول نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار (P < ۰/۰۵) را نشان می دهد. گروه اتانولی تیمار شده با آستاگزانتین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم افزایش در فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز نسبت به گروه اتانولی نشان داد اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبوده است. در گروه اتانولی تیمار شده با آستاگزانتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، افزایش معنی دار (P < ۰/۰۵) نسبت به گروه اتانول مشاهده شد.

بوده و با تجویز آستاگزانتین با دوز ۴ میلی گرم بر کیلو گرم به موش‌های باردار، شاهد افزایش مدت زمان ورود به بازوی باز و افزایش تعداد دفعات ورود به بازوی باز در آزمون رفتاری ماز صلیبی بودند (۲۹).

استرس اکسیداتیو یک پدیده ناشی از عدم تعادل بین تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌ها و بافت‌ها و توانایی سلول برای حذف این محصولات جانبی است. این پدیده ناشی از اختلال در مکانیسم‌های هموستاتیکی است که در تعادل آنتی‌اکسیدانی نقش دارند. گونه‌های فعال اکسیژن محصولات جانبی تنفس سلولی هستند، فرآیندی که در طی آن واکنش‌های سلولی مربوط به حفظ حیات سلول اتفاق می‌افتد. تجمع گونه‌های فعال اکسیژن نیز در اختلال عملکرد میتوکندری دخیل است که منجر به کمبود در تولید انرژی، تغییرات در هموستاز فلزات و تجمع توده‌های پروتئینی سمی می‌شود که نمونه‌ای از اختلالات مربوط به تخریب عصبی است. این موارد به فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی از طریق آپوپتوز، نکروز، فروپتوز یا اتوفازی منجر می‌شوند (۳۰). سنجش‌های بیوشیمیایی نشان داد پس از مصرف اتانول سطح گلووتاتیون (تصویر ۶) و میزان فعالیت آنزیم‌های گلووتاتیون پراکسیداز (تصویر ۷) و گلووتاتیون S-ترانسفراز (تصویر ۸) در قشر مغز کاهش یافته است. مطالعه در سال ۲۰۲۳ نشان داده است که متابولیسم اتانول در بدن در نهایت سبب تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر می‌گردد و مصرف اتانول با یک پاسخ اکسیداتیو قوی در عروق همراه است که با فشار خون بالا و تغییرات عصبی غدد مرتبط است (۳۱). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۳ نشان داده شد که مصرف اتانول در موش‌های نر سبب افزایش مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان یکی از نشانگرهای لیپید پراکسیداسیون شد که در پی استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد (۳۲). پژوهشی در ارتباط با تاثیر استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول بر کبد و کلیه موش‌ها، نشان داد تجویز اتانول باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز و سطح گلووتاتیون و همچنین افزایش سطح مالون‌دی‌آلدهید شد (۳۳). مصرف طولانی‌مدت اتانول سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی مغز می‌شود. این امر برروز استرس اکسیداتیو را در پی خواهد داشت (۳۴). Ros-Simo و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که گاوآژ اتانول با غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم موجب افزایش اکسیداسیون پروتئین در مغز شده و این تغییرات سبب آسیب اکسیداتیو در سلول‌ها و ایجاد اختلالات شناختی نیز شد (۳۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پیش تیمار با آستاگزانتین منجر به بهبود عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلووتاتیون پراکسیداز و گلووتاتیون S-ترانسفراز و همچنین سطح گلووتاتیون

اتانول بر اضطراب و رفتارهای حرکتی در موش‌ها، مشخص شد که درصد مدت زمان ماندن در بازوی بسته در موش‌های تیمار شده با اتانول به میزان قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا می‌کند. این امر نیز نشان می‌دهد اتانول موجب بروز اضطراب می‌شود (۲۴). احتمالاً بالا بودن کلی درصد دفعات حضور در بازوی باز در این مطالعه (تصویر ۲) به نسبت مطالعات پیشین، می‌تواند ناشی از شرایط زمانی و مکانی آزمایشگاهی برای این تست رفتاری در گروه کنترل باشد. با این وجود همه مقایسه‌های بین گروهی در شرایط کاملاً یکسان صورت گرفته است که بر همین اساس نشان می‌دهد گروه اتانولی در مقایسه با گروه کنترل با کاهش درصد ورود به بازوی باز همراه بوده اما در گروه‌های تیمار با آستاگزانتین این درصد در مقایسه با گروه اتانولی افزایش پیدا کرده است. همچنین در مطالعات دیگر، مانند مطالعه Shoji و Miyakawa و مطالعه Rodgers و همکاران نیز این شاخص در محدوده مطالعه حاضر است (۲۵، ۲۶). همچنین لازم به ذکر است بر اساس یافته‌های حاصل از بررسی فعالیت حرکتی در آزمون ماز صلیبی (تصویر ۳)، که در راستای داده‌های مطالعات پیشین نیز است، تجویز اتانول به موش‌ها با افزایش رفتارهای اضطراب‌زا و همچنین افزایش رفتارهای هیجانی (Motivational behaviors) همراه بوده و این عامل منجر به افزایش فعالیت حرکتی هرچند بی‌معنی در گروه اتانول شده است (۲۷).

در ادامه نتایج حاصل از آزمون‌های رفتاری، نشان داده شد که پیش تیمار با آستاگزانتین تغییرات رفتاری ناشی از اتانول را معکوس کرده و باعث کاهش رفتارهای شبه‌اضطرابی شد. پیش تیمار با آستاگزانتین در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن به مدت ۱۴ روز متوالی، سبب افزایش تعداد دفعات ورود به بازوی باز و همچنین افزایش مدت زمان حضور در بازوی باز در آزمون ماز صلیبی در مقایسه با گروه اتانولی می‌شود. همچنین تیمار با آستاگزانتین در دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن، سبب افزایش معنی‌دار مدت زمان ماندن در مرکز و کاهش معنی‌دار فعالیت حرکتی در آزمون زمینه باز در مقایسه با گروه اتانولی می‌شود. این نتیجه نشان‌دهنده خاصیت ضد اضطرابی آستاگزانتین است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ روی اثر نانوامولسیون فسفولیپیدهای حاوی آستاگزانتین بر موش‌های آلزایمری انجام شد، آزمایش‌های رفتاری نشان می‌دهند که موش‌های تحت درمان با آستاگزانتین در مقایسه با موش‌های کنترل زمان بسیار کمتری را در بازوهای باز ماز صلیبی می‌گذرانند و پارامترهای رفتاری آن‌ها در آزمون میدان باز نیز بهبود می‌یابد (۲۸). مطالعه‌ای که توسط غلامی رودمجانی و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد نشان داد آستاگزانتین دارای اثرات ضد اضطراب

لیپیدی و اکسیداسیون را القا می کند، پراکسی نیتريت است، که توسط آستازانتین خنثی می شود و ۱۵-هیدروآستازانتین را تشکیل می دهد، ترکیبی که دارای اثر آنتی اکسیدانی مهمی است (۴۲).

پژوهشی توسط لین و همکارانش در سال ۲۰۲۲ نشان داد آستازانتین به عنوان یک آنتی اکسیدان کاروتنوئیدی، باعث کاهش آسیب التهابی و اکسیداتیو در روده، قلب و هیپوکامپ موش کوچک آزمایشگاهی می شود. همچنین این مطالعه نشان داد پیش تیمار با آستازانتین سبب کاهش ۸-هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین (8-OHdG) و مالون دی آلدئید و نیز سبب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و سطح گلووتاتیون شد (۴۳). در یک مطالعه آزمایشی نشان داده شد که پس از ۳ ماه مصرف مکمل آستازانتین، سطوح نشانگرهای استرس اکسیداتیو کاهش یافت و بهبودهایی در انقباض قلبی و تحمل ورزش در بیماران نارسایی قلبی با اختلال عملکرد سیستمیک بطن چپ مشاهده شد (۴۴). علی رغم تأثیر گونه های اکسیژن فعال برای بی ثبات کردن غشا و هموستاز سلولی، تولید منظم این رادیکال ها در حفظ سیگنال ردوکس ضروری است. بنابراین، سیستم های آنتی اکسیدانی بر تنظیم گونه های اکسیژن فعال نظارت می کنند بدون این که آن ها را کاملاً از بین ببرند. همه آنتی اکسیدان ها شیوه عمل متفاوتی دارند. فعالیت بیولوژیکی آن ها ممکن است به ساختار سلولی که در آن عمل می کنند نیز مربوط شود. آستازانتین اقدامات آنتی اکسیدانی قوی برای تثبیت هجوم گونه های اکسیژن فعال در بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو مانند آسیب خونرسانی مجدد (I/R) نشان داده است. در واقع، آستازانتین به لطف گروه های انتهایی قطبی خود که به سمت نواحی قطبی لایه دوتایی غشایی گسترش می یابند، توانایی قوی در کاهش اکسیداسیون لیپید نشان داد، بنابراین به مهار ترومبوز و تشکیل پلاک آترواسکروتنیک کمک می کند. با این حال، یک اشکال در عملکرد آستازانتین نیز به ساختار آن نسبت داده شده است، که آن را مستعد اکسیداسیون می کند و فراهمی زیستی آن را کاهش می دهد. سیستم های کپسوله سازی محافظ برای رفع این معایب مورد مطالعه قرار گرفته اند. علاوه بر این، سیستم های تحویل جدید نیز ممکن است به محدود کردن اثرات نامطلوب بالقوه درمان آنتی اکسیدانی *in vivo* که توسط دوزهای مناسب آنتی اکسیدان محدود شده است، کمک کنند (۴۵). علاوه بر این در این مطالعه با هدف بررسی وجود یا عدم وجود عوارض جانبی و آسیب های احتمالی آستازانتین از گروه کنترل مثبت استفاده شد. بر همین اساس نتایج حاصل از گروه کنترل مثبت (آستازانتین ۲۰ میلی گرم) بیانگر این بود که نه تنها آستازانتین عوارضی در پی ندارد، بلکه به تنهایی نیز به عنوان یک آنتی اکسیدان و عامل ضد اضطراب

در ناحیه قشر مغز شده است و به نوعی آن کاهش فعالیت ناشی از اتانول را در شاخص های آنتی اکسیدانی معکوس کرد. آستازانتین یک کاروتنوئید با خواص آنتی اکسیدانی است که با کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو بقای سلولی را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد (۴۶). بر اساس یافته های مطالعه ای که به بررسی اثرات محافظتی آستازانتین پرداخت، نشان داده شد که آستازانتین اثرات محافظت عصبی بالقوه ای را سبب می شود که احتمالاً ناشی از خاصیت آنتی اکسیدانی آن است (۴۷). نتایج مطالعه حاضر در راستای برخی مطالعات پیشین است که نشان دادند موش های صحرایی مدل آلزایمری با مصرف پودر آستازانتین به طور قابل توجهی سطوح توانایی های شناختی خود را بهبود بخشیده اند. این امر همچنین منجر به کاهش تخریب عصبی شده است (۴۸). به همین ترتیب نقش آستازانتین در حذف آنیون سوپراکسید نیز گزارش شده است (۴۹). تجویز آستازانتین با کاهش سنتر گونه های اکسیژن فعال، کاهش اختلال عملکرد میتوکندری و کاهش آپوپتوز سلولی مرتبط است (۴۰). در مدل موش سگته مغزی ایسکمیک، پیش درمانی با آستازانتین باعث کاهش تولید گونه های اکسیژن فعال و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در مغز موش هایی شد که در معرض انسداد شریان مغزی میانی قرار داشتند. آستازانتین به طور همزمان انفارکتوس مغزی را نیز کاهش داد و باعث بهبود عملکرد حرکتی شد (۴۱). آستازانتین به دلیل ساختار شیمیایی که دارد، از غشای سلولی در برابر گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن و آسیب اکسیداتیو محافظت می کند. به این صورت که گروه های قطبی آستازانتین با نواحی قطبی غشای سلولی همپوشانی دارند و ناحیه غیرقطبی مرکزی مولکول در ناحیه غیرقطبی داخلی غشا قرار می گیرد. بنابراین، این کاروتنوئید ممکن است یک تراز غشایی در غشاهای بیولوژیکی به خود بگیرد و به حفظ ساختار غشا و کاهش سیالیت غشا کمک کند و به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کند. آستازانتین گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن و سایر گونه های فعال (گوگرد و کربن) را مستقیماً از طریق اهدای الکترون و از طریق پیوند با رادیکال آزاد برای تشکیل یک محصول غیرواکنشی از بین می برد. علاوه بر این، وجود یک سری پیوندهای مزدوج در ناحیه غیرقطبی مرکزی آستازانتین، مولکول را قادر می سازد تا رادیکال های آزاد (الکترون های پرانرژی) را از داخل سلول با انتقال آن ها در امتداد زنجیره کربنی خود حذف کند، به طوری که این ها توسط آنتی اکسیدان های دیگری که در خارج از غشای سلولی قرار دارند، مانند ویتامین C خنثی می شوند. افزایش حساسیت لیپیدهای غشا و لیپوپروتئین با چگالی کم به اکسیداسیون ممکن است باعث تشکیل ترومبوز و ایجاد آترواسکلروز شود. یکی از گونه های فعالی که پراکسیداسیون

پ. جمع آوری داده‌ها؛ ص.خ. ج.، س.ف. پ. و م. ب. پ. ر. آنالیز و تفسیر نتایج؛ ا.ح. م.، ص.خ. ج. و س.ف. پ.؛ نگارش نسخه اول مقاله.

تضاد منافع:

نویسندگان هیچ تعارض منافی را اعلام نمی‌کنند.

بازیابی داده‌ها:

مجموعه داده ارائه شده در مطالعه به درخواست نویسنده مربوطه در حین ارسال یا پس از انتشار در دسترس است. داده‌ها به دلیل حفظ حریم خصوصی در دسترس عموم نیستند.

کد اخلاق:

پروتکل‌های آزمایشی بر اساس دستورالعمل‌های اخلاقی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه مازندران IR.UMZ.REC.1401.044 انجام شد.

حمایت مالی و معنوی:

این تحقیق هیچ بودجه‌ای دریافت نکرده است.

References

- Coune F, Silvestre de Ferron B, Gonzalez-Marin MC, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O. Resistance to ethanol sensitization is associated with a loss of synaptic plasticity in the hippocampus. *Synapse*. 2017;71(2). [PubMed ID:26898905]. <https://doi.org/10.1002/syn.21899>.
- Jeong J-s, Jeon H, Ko K-m, Chung B, Choi G-W. Production of anhydrous ethanol using various PSA (Pressure Swing Adsorption) processes in pilot plant. *Renewable Energy*. 2012;42:41-5. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.09.027>.
- Patil S, Tawari S, Mundhada D, Nadeem S. Protective effect of berberine, an isoquinoline alkaloid ameliorates ethanol-induced oxidative stress and memory dysfunction in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015;136:13-20. [PubMed ID:26159088]. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.07.001>.
- Nishioka Y, Oyagi A, Tsuruma K, Shimazawa M, Ishibashi T, Hara H. The antianxiety-like effect of astaxanthin extracted from *Paracoccus carotinifaciens*. *Biofactors*. 2011;37(1):25-30. [PubMed ID:21328624]. <https://doi.org/10.1002/biof.130>.
- Jeanblanc J. Comorbidity Between Psychiatric Diseases and Alcohol Use Disorders: Impact of Adolescent Alcohol Consumption. *Curr Addict Rep*. 2015;2(4):293-301. <https://doi.org/10.1007/s40429-015-0076-5>.
- Crews FT, Vetreno RP, Broadwater MA, Robinson DL. Adolescent Alcohol Exposure Persistently Impacts

می‌تواند در راستای بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی مغز و کاهش اضطراب موثر واقع شود. در نهایت، نتایج بررسی شده در این پژوهش نشان می‌دهند که استفاده از آستاگزانتین با خواص موثر محافظت عصبی و رفتاری می‌تواند برای بهبود آسیب‌های مربوط به استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف اتانول در مغز موثر واقع شود.

۱.۵. محدودیت‌ها

از محدودیت‌های این مطالعه بررسی رفتاری بوده که عوامل متغیرهای بیرونی می‌توانست روی آن تاثیر گذار باشد، به‌علت محدودیت‌های ابزاری در این مطالعه کنترل تمامی متغیرها تا حدودی امکان‌پذیر نبود. آستاگزانتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان احتمالا تاثیر به‌سزایی بر افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC) در مغز دارد که در این پژوهش اندازه‌گیری نشد. همچنین آستاگزانتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب، احتمالا می‌تواند بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مثل paeK-1 و Nrf-2 و بیان ژن‌های التهابی مانند IL-6 و TNF-a را در مغز بهبود بخشد که این موارد نیز به‌علت محدودیت در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفتند و پیشنهاد می‌گردد که به بررسی این موارد پرداخته شود.

۲.۵. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثرات محافظ عصبی پیش‌تیمار با آستاگزانتین بر رفتار شبه‌اضطرابی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی بافت قشر مغز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل داده‌های رفتاری، بهبود در رفتارهای شبه‌اضطرابی ایجاد شده از طریق مصرف اتانول در گروه تیمار شده با آستاگزانتین را نشان می‌دهد. نتایج به‌دست‌آمده از شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت قشر مغز حاکی از آن است که تیمار با آستاگزانتین، سطح گلووتاتیون و گلووتاتیون میزان فعالیت آنزیم‌های گلووتاتیون-کترنسفرز و گلووتاتیون پراکسیداز را افزایش می‌دهد. بنابراین می‌توان از آستاگزانتین به‌عنوان استراتژی درمانی مناسب جهت بهبود عوارض عصبی ناشی از اتانول مانند اضطراب و آسیب‌های اکسیداتیو استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه‌ی دانشجوی کارشناسی ارشد بوده است. از حمایت‌های مادی معاونت محترم علمی پژوهشی دانشگاه مازندران صمیمانه سپاسگزاریم.

مشارکت نویسندگان:

ا.ح. م. و ص.خ. ج.؛ ایده و طراحی مطالعه؛ م. ب. پ. و ر. س. ف.

- Adult Neurobiology and Behavior. *Pharmacol Rev.* 2016;**68**(4):1074-109. [PubMed ID:27677720]. [PubMed Central ID:PMC5050442]. <https://doi.org/10.1124/pr.115.012138>.
7. Mead EA, Sarkar DK. Fetal alcohol spectrum disorders and their transmission through genetic and epigenetic mechanisms. *Front Genet.* 2014;**5**:154. [PubMed ID:24917878]. [PubMed Central ID:PMC4040491]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00154>.
 8. Uban KA, Comeau WL, Ellis LA, Galea LA, Weinberg J. Basal regulation of HPA and dopamine systems is altered differentially in males and females by prenatal alcohol exposure and chronic variable stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;**38**(10):1953-66. [PubMed ID:23579081]. [PubMed Central ID:PMC3758462]. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.02.017>.
 9. Ekpe L, Inaku K, Ekpe V. Antioxidant effects of astaxanthin in various diseases a review. *J Mol Pathophysiol.* 2018;**7**(1). <https://doi.org/10.5455/jmp.20180627120817>.
 10. Wolf AM, Asoh S, Hiranuma H, Ohsawa I, Iio K, Satou A, et al. Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *J Nutr Biochem.* 2010;**21**(5):381-9. [PubMed ID:19423317]. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.011>.
 11. Komatsu T, Sasaki S, Manabe Y, Hirata T, Sugawara T. Preventive effect of dietary astaxanthin on UVA-induced skin photoaging in hairless mice. *PLoS One.* 2017;**12**(2):e0171178. [PubMed ID:28170435]. [PubMed Central ID:PMC5295690]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171178>.
 12. Manabe Y, Komatsu T, Seki S, Sugawara T. Dietary astaxanthin can accumulate in the brain of rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018;**82**(8):1433-6. [PubMed ID:29625535]. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1459467>.
 13. Li J, Guo C, Wu J. Astaxanthin in Liver Health and Disease: A Potential Therapeutic Agent. *Drug Des Devel Ther.* 2020;**14**:2275-85. [PubMed ID:32606597]. [PubMed Central ID:PMC7293384]. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S230749>.
 14. Braun AA, Skelton MR, Vorhees CV, Williams MT. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;**97**(3):406-15. [PubMed ID:20869983]. [PubMed Central ID:PMC3006066]. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.09.013>.
 15. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015(96):e52434. [PubMed ID:25742564]. [PubMed Central ID:PMC4354627]. <https://doi.org/10.3791/52434>.
 16. Bigdeli MR, Rasoulilian B, Meratan AA. In vivo normobaric hyperoxia preconditioning induces different degrees of antioxidant enzymes activities in rat brain tissue. *Eur J Pharmacol.* 2009;**611**(1-3):22-9. [PubMed ID:19303405]. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.034>.
 17. Kruger NJ. The Bradford Method For Protein Quantitation. In: Walker JM, editor. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 17-24.
 18. Ksenofontov AL, Boyko AI, Mkrtchyan GV, Tashlitsky VN, Timofeeva AV, Graf AV, et al. Analysis of Free Amino Acids in Mammalian Brain Extracts. *Biochemistry (Mosc).* 2017;**82**(10):1183-92. [PubMed ID:29037139]. <https://doi.org/10.1134/S000629791710011X>.
 19. Hritcu L, Ciobica A. Intranasal lipopolysaccharide administration induced behavioral deficits and oxidative stress damage in laboratory rats: relevance for Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2013;**253**:25-31. [PubMed ID:23850357]. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.006>.
 20. Habig WH, Jakoby WB. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 1981;**77**:218-31. [PubMed ID:6173570]. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77029-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77029-0).
 21. Yao H, Zhang D, Yu H, Shen H, Lan X, Liu H, et al. Chronic ethanol exposure induced anxiety-like behaviour by altering gut microbiota and GABA system. *Addict Biol.* 2022;**27**(5):e13203. [PubMed ID:36001417]. <https://doi.org/10.1111/adb.13203>.
 22. Faccioli A, Marawi T, Syed E, Gerlai R. Age-dependent effects of embryonic ethanol exposure on anxiety-like behaviours in young zebrafish: A genotype comparison study. *Pharmacol Biochem Behav.* 2022;**214**:173342. [PubMed ID:35134449]. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173342>.
 23. Varlinskaya EI, Hosova D, Towner T, Werner DF, Spear LP. Effects of chronic intermittent ethanol exposure during early and late adolescence on anxiety-like behaviors and behavioral flexibility in adulthood. *Behav Brain Res.* 2020;**378**:112292. [PubMed ID:31626849]. [PubMed Central ID:PMC7261490]. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112292>.
 24. Kameda SR, Frussa-Filho R, Carvalho RC, Takatsu-Coleman AL, Ricardo VP, Patti CL, et al. Dissociation of the effects of ethanol on memory, anxiety, and motor behavior in mice tested in the plus-maze discriminative avoidance task. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;**192**(1):39-48. [PubMed ID:17242924]. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0684-9>.
 25. Shoji H, Miyakawa T. Effects of test experience, closed-arm wall color, and illumination level on behavior and plasma corticosterone response in an elevated plus maze in male C57BL/6J mice: a challenge against conventional interpretation of the test. *Mol Brain.* 2021;**14**(1):34. [PubMed ID:33588907]. [PubMed Central ID:PMC7885464]. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00721-2>.
 26. Rodgers RJ, Johnson NJ, Cole JC, Dewar CV, Kidd GR, Kimpson PH. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trail 1 and response to post-trail cholinergic receptor blockade. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;**54**(1):41-50. [PubMed ID:8728537]. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02156-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02156-6).
 27. Viudez-Martinez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarron CM,

- Morales-Calero MI, Navarrete F, Torres-Suarez AI, et al. Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. *Addict Biol.* 2018;**23**(1):154-64. [PubMed ID:28194850]. <https://doi.org/10.1111/adb.12495>.
28. Lotosh NY, Kryuchkova AV, Kulikov EA, Kulikova IS, Selishcheva AA, Ogurtsov DP, et al. Effect of Nanoemulsions Containing Astaxanthin or Its Esters on the Spatial Behavior of 5XFAD Mice. *Nanobiotechnol Rep.* 2022;**17**(2):227-34. <https://doi.org/10.1134/s2635167622020124>.
 29. Gholami Roudmajani E, Hayati Roodbari N, Goudarzvand M, Parivar K. Protective Effect of Astaxanthin on Prenatal Bacterial Lipopolysaccharide Exposed Behavioral Deficits in Adult Mice. *Iran Red Crescent Med J.* 2020;**22**(2). <https://doi.org/10.5812/ircmj.97600>.
 30. Olufunmilayo EO, Gerke-Duncan MB, Holsinger RMD. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants (Basel).* 2023;**12**(2). [PubMed ID:36830075]. [PubMed Central ID:PMC9952099]. <https://doi.org/10.3390/antiox12020517>.
 31. Padovan JC, Dourado TMH, Pimenta GF, Bruder-Nascimento T, Tirapelli CR. Reactive Oxygen Species Are Central Mediators of Vascular Dysfunction and Hypertension Induced by Ethanol Consumption. *Antioxidants (Basel).* 2023;**12**(10). [PubMed ID:37891892]. [PubMed Central ID:PMC10604002]. <https://doi.org/10.3390/antiox12101813>.
 32. Shirazpour S, Sepehri G, Taheri F, Shahrokhi Raeini A, Zangiabadi M, Sheikhi S. [The effects of high-intensity interval training on oxidative stress indices in the hippocampus following ethanol consumption in male rats]. *Koomesh* 2023;**25**(5). Persian.
 33. Goc Z, Kapusta E, Formicki G, Martiniakova M, Omelka R. Effect of taurine on ethanol-induced oxidative stress in mouse liver and kidney. *Chin J Physiol.* 2019;**62**(4):148-56. [PubMed ID:31535630]. https://doi.org/10.4103/CJP.CJP_28_19.
 34. Shim SY, Kim HS. Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. *Korean J Pediatr.* 2013;**56**(3):107-11. [PubMed ID:23559971]. [PubMed Central ID:PMC3611043]. <https://doi.org/10.3345/kjp.2013.56.3.107>.
 35. Ros-Simo C, Moscoso-Castro M, Ruiz-Medina J, Ros J, Valverde O. Memory impairment and hippocampus specific protein oxidation induced by ethanol intake and 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice. *J Neurochem.* 2013;**125**(5):736-46. [PubMed ID:23521165]. <https://doi.org/10.1111/jnc.12247>.
 36. Lotfi A, Abroodi Z, Khazaei M. [Single and Synergic Effects of Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Astaxanthin on Type 1 Diabetes Induced by Streptozotocin in Rat]. *Koomesh* 2023;**25**(5). Persian.
 37. Gholami Roudmajani E, Goudarzvand M, Hayati Roodbari N, Parivar K. [Evaluation of the protective effect of astaxanthin against undesired effects of Prenatal bacterial lipopolysaccharide (LPS) exposure on maternal behaviors and neuronal changes in Adult Male Offspring in NMRI Mice]. *Koomesh* 2023;**25**(5). Persian.
 38. Taksima T, Chonpathompikunlert P, Sroyraya M, Hutamekalin P, Limpawattana M, Klaypradit W. Effects of Astaxanthin from Shrimp Shell on Oxidative Stress and Behavior in Animal Model of Alzheimer's Disease. *Mar Drugs.* 2019;**17**(11). [PubMed ID:31690015]. [PubMed Central ID:PMC6891431]. <https://doi.org/10.3390/md17110628>.
 39. Kuedo Z, Sangsuriyawong A, Klaypradit W, Tipmanee V, Chonpathompikunlert P. Effects of Astaxanthin from Litopenaeus Vannamei on Carrageenan-Induced Edema and Pain Behavior in Mice. *Molecules.* 2016;**21**(3):382. [PubMed ID:27007359]. [PubMed Central ID:PMC6272999]. <https://doi.org/10.3390/molecules21030382>.
 40. Liu X, Shibata T, Hisaka S, Osawa T. Astaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism. *Brain Res.* 2009;**1254**:18-27. [PubMed ID:19101523]. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.076>.
 41. Shen H, Kuo CC, Chou J, Delvolve A, Jackson SN, Post J, et al. Astaxanthin reduces ischemic brain injury in adult rats. *FASEB J.* 2009;**23**(6):1958-68. [PubMed ID:19218497]. [PubMed Central ID:PMC2698661]. <https://doi.org/10.1096/fj.08-123281>.
 42. Pereira CPM, Souza ACR, Vasconcelos AR, Prado PS, Name JJ. Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). *Int J Mol Med.* 2021;**47**(1):37-48. [PubMed ID:33155666]. [PubMed Central ID:PMC7723678]. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4783>.
 43. Lin X, Bo H, Gu J, Yi X, Zhang P, Liu R, et al. Astaxanthin, a carotenoid antioxidant, pretreatment alleviates cognitive deficits in aircraft noised mice by attenuating inflammatory and oxidative damage to the gut, heart and hippocampus. *Biomed Pharmacother.* 2022;**148**:112777. [PubMed ID:35255410]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112777>.
 44. Kato T, Kasai T, Sato A, Ishiwata S, Yatsu S, Matsumoto H, et al. Effects of 3-Month Astaxanthin Supplementation on Cardiac Function in Heart Failure Patients with Left Ventricular Systolic Dysfunction-A Pilot Study. *Nutrients.* 2020;**12**(6). [PubMed ID:32604721]. [PubMed Central ID:PMC7353230]. <https://doi.org/10.3390/nu12061896>.
 45. Zuluaga M, Gueguen V, Letourneur D, Pavon-Djavid G. Astaxanthin-antioxidant impact on excessive Reactive Oxygen Species generation induced by ischemia and reperfusion injury. *Chem Biol Interact.* 2018;**279**:145-58. [PubMed ID:29179950]. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.012>.

Research Article

The Neuroprotective Effects of Astaxanthin on Anxiety-Like Behaviors and Oxidative Stress in the Cortex of Ethanol Model Mice

Akbar Hajizadeh Moghaddam ^{1,*}, Masoumeh Baradaran Paien Rodposhti ¹, Sedigheh Khanjani Jelodar ¹, Soroush Farhadi Pahnedari ¹

¹Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

*Corresponding author: Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. Email: a.hajizadeh@umz.ac.ir

Received 09/02/2024; Accepted 12/08/2024

Abstract

Background: Ethanol is a narcotic and psychedelic substance, the use of which causes oxidative stress in the brain and behavioral changes such as anxiety. The production of free radicals and oxidative stress causes the effects of ethanol.

Objectives: This study aimed to investigate the neuroprotective effects of astaxanthin on anxiety-like behaviors and oxidative stress in the cortex of ethanol model mice.

Methods: 35 adult male mice were divided into 5 groups (n=7) including control, astaxanthin, ethanol, and 2 groups treated with astaxanthin at 10 and 20 mg/kg. Behavioral tests including elevated plus maze test (EPMT) and open field test (OFT) and activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), and level of glutathione (GSH) in the cortex tissue were measured.

Results: Based on the results, ethanol significantly increased line crossing and decreased the time spent and the number of entries into the open arm, center duration, enzyme activities, and glutathione level compared to the control group. Astaxanthin significantly decreased line crossing and increased time spent and the number of entries into the open arm, center duration, enzyme activities, and glutathione level compared to the ethanol group.

Conclusion: This research showed that astaxanthin treatment improves anxiety-like behaviors and effectively protects cortical areas against ethanol-induced oxidative stress. Therefore, astaxanthin can be used as a medicinal supplement to improve ethanol-induced behavioral and oxidative damage.

Keywords: Ethanol, Oxidative stress, Anxiety, Astaxanthine, Mice