Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Effects of formononetin on the expression of orexin and calcitonin gene-related peptide genes in a stress model rats

Elaheh Basirat[1], Fariba Mahmoudi[1]*, Homayoun Khazali[2]

ABSTRACT

Background and Aims: Formononetin is a flavonoid compound derived from various plants, such as red clover. Calcitonin gene-related peptide (*CGRP*) and Orexin are among the important neuropeptides in the hypothalamus in controlling stress responses. Moreover, previous studies have indicated the anti-stress effects of formononetin. However, its molecular mechanism has not yet been elucidated. The present study aimed to evaluate the effect of formononetin on the hypothalamic expression of *CGRP* and *HCRT* (the hypocretin neuropeptide precursor) in a rat model of stress.

Materials and Methods: In this experimental study, 20 male Wistar rats weighing 200±10 g were divided into four groups (n=5 for each group). For stress induction, rats were placed in a restraint cage for 2 h. Formonontin with 20 µg and 40 µg doses was injected in a single dose with a volume of 3 µl via the third cerebral ventricle. Then, the hypothalamic samples were removed, and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to measure gene expression.

Results: In the stress rat model, the expression of *CGRP* and *HCRT* genes significantly decreased compared to the control group (P≤0.01). The injection of formononetin significantly decreased the expression of *CGRP* and *HCRT* genes compared to stress model rats (P≤0.01).

Conclusion: The present study indicated the anti-anxiety effects of formononetin. The anxiolytic effects of formononetin may be exerted by down-regulating the function of the stress-related neurons in the hypothalamus.

Keywords: Calcitonin gene-related peptide (*CGRP*), Formononetin, Orexin, Restraint stress

Citation: Basirat E, Mahmoudi F, Khazali H. [Effects of formononetin on the expression of orexin and calcitonin gene-related peptide genes in a stress model rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2024; 31(3): 205-214. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/

Received: July 11, 2024 **Accepted:** September 10, 2024

[1] Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2] Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

***Corresponding author:** Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Tel: +989144190422 Fax: +984533514701 E-mail: f.mahmoudi@uma.ac.ir

مقاله اصیل پژوهشی

بررسی اثرات فورمونونتین بر بیان ژن‌های ارکسین و پپتید وابسته به ژن کلسی تونین در موش‌های صحرایی مدل استرس

الهه بصیرت[۱]، فریبا محمودی*[۱]، همایون خزعلی[۲]

چکیده

زمینه و هدف: فورمونونتین ترکیب فلاونوئیدی است که از گیاهان مختلف مثل شبدر قرمز مشتق می‌شود. ارکسین و پپتید مرتبط با ژن کلسی‌تونین (*CGRP*) از جمله نوروپپتیدهای مهم در هیپوتالاموس در کنترل استرس محسوب می‌شوند. همچنین مطالعات اثرات ضداسترسی فورمونونتین را نشان داده است. بااین‌حال مکانیسم مولکولی عملکرد آن هنوز مشخص نشده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر فورمونونتین بر بیان ژن‌های *CGRP* و *Hcrt* (پیش ساز نوروپپتید هیپوکرتین) در موش‌های صحرایی مدل استرس انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، از ۲۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن۱۰± ۲۰۰ گرم در چهار گروه (n=۵) استفاده شد. برای القای استرس، موش‌های صحرایی به مدت ۲ ساعت در معرض استرس قرار گرفتند. فورمونونتین با دوزهای ۲۰ و ۴۰ میکروگرم به‌صورت تک دوز و با حجم ۳ میکرولیتر داخل بطن سوم مغزی تزریق شد. نمونه‌های هیپوتالاموس خارج شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (RT-PCR) برای اندازه‌گیری بیان ژن انجام گرفت.

یافته‌ها: استرس، زمان صرف شده و تعداد ورود به مربع مرکزی را در مقایسه با شرایط بدون استرس کاهش داد در حالیکه گروه¬های دریافت کننده دوزهای ۲۰ و ۴۰ میکروگرم فورمونونتین زمان صرف شده و تعداد ورود به مربع مرکزی را بصورت معنی¬داری نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش داد. همچنین در موش‌های تحت استرس میزان بیان ژن‌های *CGRP* و *Hcrt* نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت (P≤۰/۰۱). تزریق داخل بطنی مغزی فورمونونتین موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *CGRP* و *Hcrt* نسبت به موش‌های صحرایی مدل استرس گردید (P≤۰/۰۱).

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر اثرات ضداضطرابی فورمونونتین را نشان داد. بنابرین اثرات ضد اضطرابی فورمونونتین می‌تواند از طریق کاهش فعالیت نورون‌های مرتبط با استرس در هیپوتالاموس اعمال شود.

واژه‌های کلیدی: CGRP، فورمونونتین، ارکسین، استرس

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۳؛ ۳۱ (۳): ۲۱۴-۲۰۵.

دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۱ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۰

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۲] گروه علوم جانوری و زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

آدرس: اردبیل – دانشگاه محقق اردبیلی – دانشکده علوم – گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۴۴۱۹۰۴۲۲ نمابر:۰۴۵۳۳۵۱۴۷۰۱ پست الکترونیکی: f.mahmoudi@uma.ac.ir

مقدمه

استرس مجموعه‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیکی در برابر محرک‌های نامطلوب جهت حفظ هومئوستازی تعریف می‌شوند (۱). بدن انسان به‌طور کلی توانایی بازیابی تعادل را پس از رویدادهای استرس‌زای موقتی دارد، درحالی‌که استرس مکرر زمینه‌ساز ایجاد بسیاری از بیماری‌ها از جمله اختلالات روان‌پزشکی مانند افسردگی، اضطراب و برخی از بیماری‌های جسمی روانی مانند فشار خون بالا، بی‌خوابی و سرطان است (۲). بنابراین شناخت کامل مکانیسم فرآیند استرس برای پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از استرس بسیار مهم است. یکی از مهم‌ترین سیستم‌های مرتبط با استرس، محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA[1]) است. فعال شدن محور HPA در نهایت باعث افزایش کورتیکوسترون در جوندگان و کورتیزول در انسان می‌شود. مطالعات متعدد ثابت کرده‌اند که فعال شدن مکرر محور HPA و سطوح بالای گلوکوکورتیکوئیدها به‌طور مداوم منجر به بسیاری از بیماری‌های ناشی از استرس می‌شود (۳).

گیاهان همیشه منبع شناخته شده‌ای از داروها بوده‌اند و بسیاری از داروهایی که در حال حاضر در دسترس هستند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از محصولات مواد طبیعی به دست می‌آیند (۴). فورمونونتین یک ایزوفلاون از گروه فیتواستروژن‌ها است که از طریق مکانیسم‌های وابسته و مستقل از استروژن، طیف وسیعی از اثرات فیزیولوژیکی مفید برای سلامتی را نشان می‌دهد. این ترکیب فعال در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های مزمن مانند سرطان، چاقی و بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی بالقوه مؤثر بوده است (۵). همچنین گزارش شده است که ترکیبات فیتوشیمیایی در مدیریت بیماری‌های عصبی مختلف از جمله افسردگی و اضطراب مفید هستند (۴). فورمونونتین به‌عنوان ترکیب ایزوفلاونوئیدی از نورون‌ها در برابر آسیب ناشی از سمیت محافظت می‌کند (۶) و اثر محافظتی عصبی آن بر زوال عقل ناشی از اسکوپولامین گزارش شده است (۷). علاوه بر این وانگ و همکاران نشان دادند که فورمونونتین دارای اثرات ضداضطرابی و ضدالتهابی است (۸). بنابرین گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها به دلیل عوارض جانبی کمتر می‌توانند جایگزین داروهای رایج مورد استفاده برای اختلال اضطراب مانند دیازپام شوند.

ارکسین که هیپوکرتین نیز نامیده می‌شود به دو صورت ارکسین A و B وجود دارند. ارکسین A نوروپپتید ۳۳ اسید آمینه‌ای و ارکسین B نوروپپتید ۲۸ اسید آمینه‌ای است که توسط ژن *Hcrt* (پیش ساز نوروپپتید هیپوکرتین) کد می‌شود. در عملکردهای فیزیولوژیکی مختلف مانند ریتم خواب/بیداری و تنظیم حرارت، کنترل متابولیسم انرژی، پاسخ‌های قلبی عروقی، رفتار تغذیه نقش دارند. در پستانداران، ارکسین A و ارکسین B در نواحی مختلف مغز به‌خصوص در هیپوتالاموس جانبی سنتز می‌شوند (۹،۱۰). ارکسین‌ها ارتباط نزدیکی با سیستم پاسخگر استرس دارند و نقش کلیدی آن‌ها در فعال‌سازی و تنظیم محور HPA نشان داده شده است. مدارهای هیپوتالاموس، به‌ویژه مدارهای بین ارکسین و نورون‌های فاکتور آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRF[2]) نقش مهمی در پاسخ استرس دارد. CRF مستقیماً از طریق فعال‌سازی گیرنده CRF 1 در این نورون‌ها، سرعت دپلاریزاسیون نورون‌های ارکسین را افزایش می‌دهد.

پپتید مرتبط با ژن کلسی‌تونین (CGRP[3]) یک پلی‌پپتید با ۳۷ اسیدآمینه است. عمدتاً توسط ژن کلسی‌تونین که ژن CALCA نیز نامیده می‌شود، کدگذاری می‌گردد (۱۱). CGRP گشادکننده عروق و انتقال‌دهنده عصبی قوی در سیستم عصبی مرکزی است. گیرنده‌های CGRP در هیپوتالاموس، ماده خاکستری مرکزی، هسته شکمی تالاموس، آمیگدال و هیپوکامپ توزیع شده‌اند. گزارش شده است که CGRP در رفتارهای اضطرابی دخیل است، تزریق داخل بطنی مغزی CGRP رفتار اضطرابی و ترس را برمی‌انگیزد (۱۲). بنابراین، بررسی مسیرهای سیگنالینگ استرس که ژن‌های CGRP و ارکسین را در هیپوتالاموس هدف قرار می‌دهد بسیار مهم است. با در نظر گرفتن این موضوع، هدف مطالعه حاضر بررسی این است که آیا فورمونونتین می‌تواند از طریق کاهش بیان ژن‌های *Hcrt* و *CGRP* هیپوتالاموسی در موش‌های صحرایی نر اثرات ضداسترسی خود را اعمال کند.

1- Hypothalamic-Pituitary-Adrenal

2- Corticotropin-Releasing Factor

3- Calcitonin Gene-Related Peptide

روش تحقیق

حیوانات و شرایط نگهداری

همه آزمایش‌ها روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (با وزن تقریبی۱۰ ± ۲۰۰ گرم) انجام شد. حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و در دمای ۲ ±۲۲ °C و ۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی نگه‌داری شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق مصوب دانشگاه محقق اردبیلی (کد: IR.UMA.REC.1400.028) تأیید شد.

جراحی و کانول‌گذاری

موش‌های صحرایی برای کانول‌گذاری با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۸۰mg/kg) و زایلزین (۱۰mg/kg) بیهوش شدند. سر حیوان در دستگاه استریوتاکسیک ثابت شد. مختصات بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (mm AP =0.84mm، ML = 00 ،و DV = 6.5mm) تعیین شد. سپس نواحی براگما و لامبدا در سطح جمجمه برای کانول‌گذاری مشخص گردید. کانول‌گذاری در همه گروه‌ها انجام شد. جهت بهبودی، موش‌های صحرایی در قفس جداگانه به مدت یک هفته نگهداری شد.ند. تزریق با استفاده از سرنگ هامیلتون متصل به لوله پلی‌اتیلن ۲۰ انجام شد. به این ترتیب که لوله پلی‌اتیلین۲۰ از یک طرف به سرنگ هامیلتون و از طرف دیگر به سرسوزن دندانپزشکی ۲۷ گیج متصل شد. بعد از برداشت مقدار دارو سرسوزن تزریقی داخل کانول تثبیت شده در سطح جمجمه قرار گرفت و تزریق به داخل بطن به آرامی در مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت (۱۳،۱۴).

تشریح و جداسازی نمونه هیپوتالاموس

حیوانات، در پایان مطالعه بیهوش شدند. جمجمه برای برداشتن مغز شکافته شد. سپس سطح شکمی مغز به سمت بالا قرار داده شد و یک برش حاوی هیپوتالاموس به ضخامت ۴ میلی‌متر (از جلو در نزدیکی کیاسما بینایی، از پشت به مجاورت سیستم پستانی- تالاموسی و از سمت جانبی تا شیار هیپوتالاموس) تشریح شد. نمونه هیپوتالاموس برای ارزیابی mRNA در نیتروژن مایع قرار داده شد و سپس به فریزر ۸۰- انتقال داده شد.

روش القای استرس مهاری (Restrain stress)

پس از دوره سازگاری یک هفته‌ای، برای القای استرس حاد موش‌های صحرایی در یک جعبه مهارکننده (restraint cage) با تهویه مناسب (طول ۱۸ سانتی‌متر و عرض ۵ سانتی‌متر) قرار گرفتند. سپس به مدت ۲ ساعت در اتاقی ساکت نگهداری شدند. فورمونونتین ۳۰ دقیقه قبل از القای استرس به موش‌های صحرایی تزریق شد (۱۴).

گروه‌های آزمایش

در این مطالعه، فورمونونتین از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد. ۲۰ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به ۴ گروه (n=۵) تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه کنترل منفی (بدون استرس)، سالین دریافت کرد. گروه دوم، به عنوان گروه کنترل مثبت (تحت استرس)، سالین دریافت کرد. گروه‌های سوم و چهارم (تحت استرس) ۲۰ و ۴۰ میکروگرم فورمونونتین به‌ترتیب دریافت کردند. تمام تزریقات ۳۰ دقیقه قبل از القای استرس از طریق بطن سوم مغزی (ICV) در حجم ۳ میکرولیتر انجام شد.

تست‌های رفتاری

آزمون میدان باز(Open Field Test)

موش‌ها در یک جعبه پلاستیکی مربعی (۶۰ × ۶۰ × ۴۰ سانتی‌متر) قرار گرفتند. در ابتدای آزمایش، هر موش در مرکز جعبه قرار داده شد و رفتارها به مدت ۵ دقیقه فیلم‌برداری شد. زمان صرف شده در مرکز و تعداد ورودی‌ها به مرکز به عنوان شاخص ارزیابی رفتاری استرس استفاده شد (۱۳).

تست شنا اجباری (Forced Swim Test)

موش‌ها به‌صورت جداگانه در یک مخزن استوانه‌ای (قطر ۳۵ × ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر) حاوی ۳۰ سانتی‌متر آب (۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و با دوربین مدت زمان بی‌حرکتی به مدت ۶ دقیقه ارزیابی شد (۱۳). رفتار شنا شامل حرکت افقی حیوان در آب در نظر گرفته شد. بی‌تحرکی به عنوان حیوان شناور بدون تقلا و

فقط انجام حرکات لازم برای نگه داشتن سر بالای آب تعریف می‌شد (۱۳).

بررسی بیان ژن با استفاده از Real time-PCR

RNA تام تمام نمونه‌های هیپوتالاموس با کیت ترایزول (شرکت Qiagen، آلمان) استخراج شد. سپس غلظت RNA با نانودراپ تعیین شد. برای سنتز cDNA، 1 میکروگرم RNA کل طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری سطوح بیان ژن نسبی، ۱ میکروگرم از cDNA سنتز شده وارد واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در زمان واقعی (RT-PCR) شد و با دستورالعمل کیت مستر میکس سایبرگرین (شرکت تاکارا، ژاپن) انجام شد و تکثیر آن با استفاده از دستگاه Real time-PCR انجام شد. یک سیکل (۱۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و ۴۰ چرخه (۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه) برای سیستم PCR در نظر گرفته شد، میزان تغییرات بیان ژن با معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$محاسبه شد. محصولات گلیسرید آلدئید – ۳ – فسفات دهیدروژناز (GAPDH)، Hcrt و CGRP حاصل به ترتیب ۱۲۰، ۸۷ و ۱۵۵ جفت باز هستند. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول شمارهٔ ۱ نشان داده شده است (۱۵،۱۶).

جدول ۱- توالی سنس و آنتی‌سنس پرایمرها

نام ژن‌ها	توالی پرایمرها
سنس :*CGRP*	5'- TCTAAGCGGTGTGGGAATCT -3'
آنتی سنس	5'- TAGGGGTGGTGGTTTGTCTC -3'
سنس :*Hcrt*	5'- CTCCTTCAGGCCAACGGTAA-3'
آنتی سنس	5'- AGGGCAGGGATATGGCTCTA -3'
سنس :*GAPDH*	5′- AAGTTCAACGGCACAGTCAAG -3′
آنتی سنس	5′- CATACTCAGCACCAGCATCAC -3′.

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل بیان ژن از آزمون ANOVA یک طرفه استفاده شد. از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل و آزمایش استفاده شد. نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شد. در تمام موارد، معنی‌داری با $P\leq ۰/۰۵$تعریف شد.

یافته‌ها

در آزمون میدان باز از زمان سپری شده در مرکز و تعداد ورود به مرکز به‌عنوان شاخص اضطراب استفاده شد که بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P\leq ۰/۰۱$). تجزیه و تحلیل نشان داد که استرس، زمان صرف شده در ناحیه داخلی را در مقایسه با شرایط بدون استرس (گروه کنترل منفی) کاهش داد. آنالیز زمان صرف شده در ناحیه مرکزی در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۲۰ و ۴۰ میکروگرم فورمونونتین افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل مثبت نشان داد ($P\leq ۰/۰۱$). همچنین نتیجه این متغیر در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی قابل توجه بود و کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P\leq ۰/۰۰۱$) (شکل ۱).

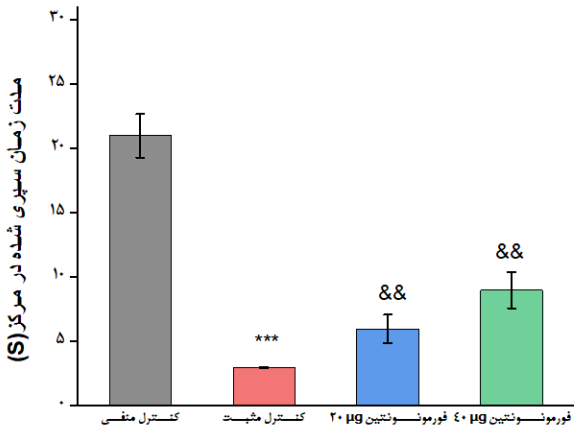
نتایج مربوط به متغیر تعداد ورود به ناحیه مرکزی در بین گروه‌ها نشان داد که گروه‌های دریافت‌کننده فورمونونتین افزایش معنی‌داری را با گروه کنترل مثبت دارند ($P\leq ۰/۰۱$). همچنین گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P\leq ۰/۰۰۱$) (شکل ۲).

نتایج تست شنا اجباری نشان داد که زمان بیشتری برای بی‌حرکتی در گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی و دریافت‌کننده فورمونونتین صرف شده است که نشان‌دهنده افزایش استرس رفتاری در گروه‌های کنترل مثبت است ($P\leq ۰/۰۱$). در

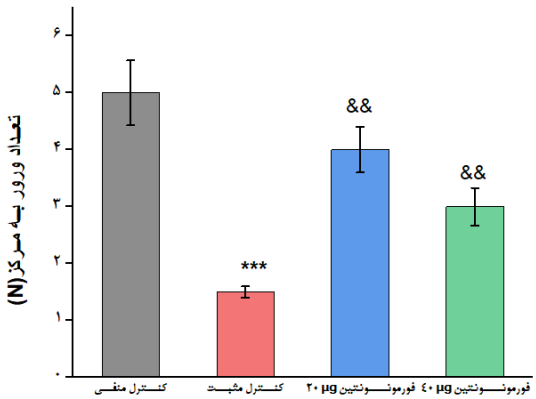
گروه‌های دریافت‌کننده فورمونونتین به صورت داخل مغزی با دوزهای ۲۰ و ۴۰ میکروگرم، مدت زمان بی‌حرکتی در مقایسه با گروه کنترل مثبت کاهش یافت (P≤۰/۰۰۱) (شکل۳).

میزان بیان نسبی ژن Hcrt در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی از نظر آماری افزایش معنی‌داری پیدا کرد (P≤۰/۰۱) (شکل ۴). میانگین سطح بیان ژن Hcrt پس از تزریق ۲۰ و۴۰ میکروگرم فورمونونتین، در هر دو گروه به‌طور قابل توجهی باعث کاهش معنی‌دار سطح بیان نسبی این ژن نسبت به گروه کنترل مثبت شد (P≤۰/۰۱) (شکل ۴).

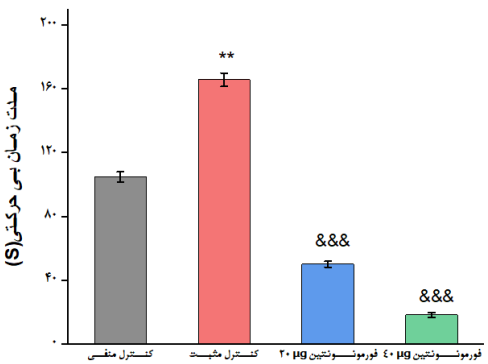
میانگین سطح بیان ژن CGRP در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری یافت (P≤۰/۰۰۱) (شکل ۵). تزریق ۲۰ و ۴۰ میکروگرم فورمونونتین به‌صورت داخل مغزی، به‌طور معنی‌داری میانگین سطح بیان ژن CGRP را در مقایسه با گروه کنترل مثبت کاهش داد (P≤۰/۰۰۱) (شکل ۵).



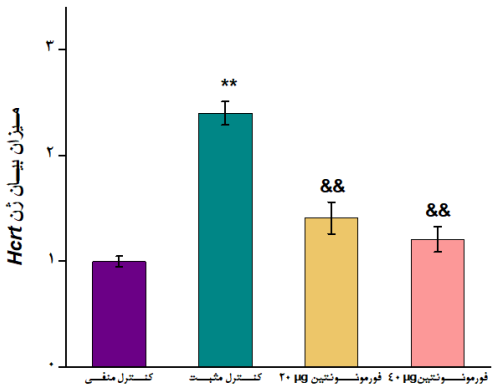
نمودار۱- زمان صرف شده در ناحیه مرکزی در بین گروه‌ها در طی تزریق داخل مغزی فورمونونتین با دوزهای µg ۲۰و µg ۴۰را نشان می‌دهد. *؛ نسبت به گروه کنترل منفی، &&؛ نسبت به گروه کنترل مثبت (P≤۰/۰۱).**



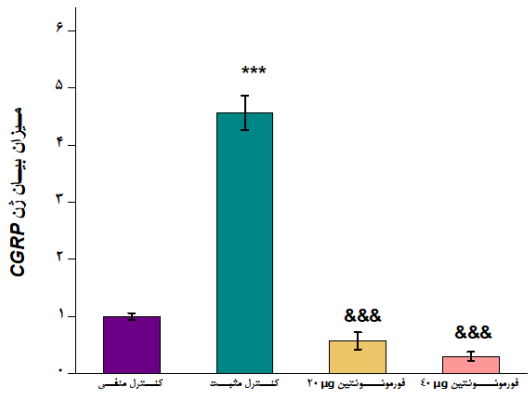
نمودار۲- تعداد ورود به مربع مرکزی در بین گروه‌ها در طی تزریق داخل مغزی فورمونونتین با دوزهای µg ۲۰ و µg ۴۰ را نشان می‌دهد. *؛ نسبت به گروه کنترل منفی، &&؛ نسبت به گروه کنترل مثبت (P≤۰/۰۱).**



نمودار۳- مدت زمان بی حرکتی در بین گروه‌ها در طی تزریق داخل مغزی فورمونونتین با دوزهای µg ۲۰و µg ۴۰را نشان می‌دهد. **؛ نسبت به گروه کنترل منفی، &&&؛ نسبت به گروه کنترل مثبت (P≤۰/۰۰۱).



نمودار۴- میانگین بیان نسبی ژن *Hcrt* با اثر دوز ۲۰ و ۴۰ میکروگرم فورمونونتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مدل استرس. نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده است. n=۵ و P≤۰/۰۱. آنالیز داده‌ها با آنوای یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد؛ نسبت به گروه کنترل منفی، &&؛ نسبت به گروه کنترل مثبت.**



نمودار۵-میانگین بیان نسبی ژن *CGRP* با اثر دوز ۲۰ و ۴۰ میکروگرم فورمونونتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مدل استرس. نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده است n=۵ و ($P\leq$۰/۰۰۱). آنالیز داده‌ها با آنوای یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد. *؛ نسبت به گروه کنترل منفی، &&&؛ نسبت به گروه کنترل مثبت.**

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که استرس باعث ایجاد افزایش در بیان ژن ارکسین در هیپوتالاموس می‌شود. مطالعات قبلی نیز نشان داده بودند استرس حاد، مانند استرس بی‌حرکتی یا استرس مهار کننده فعالیت نورون‌های ارکسین و سطح بیان ارکسین را افزایش می‌دهد (۱۷). استرس بر فیزیولوژی طبیعی سیستم بیولوژیکی تأثیر می‌گذارد. قرار گرفتن بیش از حد در معرض رویدادهای استرس‌زا زندگی باعث ایجاد اختلالات رفتاری از جمله افسردگی، اختلال استرس پس از سانحه (PTSD[1]) و اختلالات اضطرابی می‌شود (۱۲). همچنین استرس طولانی مدت ممکن است منجر به اضطراب، ترس، افسردگی و سایر مشکلات سلامتی شود. امروزه افسردگی به یک مشکل رایج سلامت روان تبدیل شده است. استرس مکرر منجر به فعال شدن طولانی مدت HPA می‌شود، اختلال در تنظیم محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) خطر ابتلا به افسردگی و اختلالات اضطرابی را افزایش می‌دهد. علاوه بر تغییرات در سیستم کورتیکوسترون، اختلال در تنظیم سیستم ارکسین در اختلالات مرتبط با استرس نقش دارد (۱۷،۱۸). محور HPA در پاسخ استرس‌زای فیزیولوژیکی و روانی نقش دارد. ترشح ACTH توسط هیپوتالاموس از طریق هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (CRH) تنظیم می‌شود (۱۹). همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند که ارکسین نقش مهمی در استرس حاد و مزمن دارد (۱۷).

در مطالعه حاضر، موش‌های تحت استرس، رفتارهای اضطرابی آشکاری را از خود نشان دادند. در مطالعه wang و همکاران، درمان با فورمونونتین، با نقش تنظیمی گابا ارژیک و گلوتاماترژیک رفتارهای اضطرابی را در موش‌ها تسکین داد (۸). ثابت شده است که فورمونونتین فعالیت استروژنی دارد و میزان اضطراب را در تست‌های رفتاری مربوط به استرس تعدیل می‌کند (۲۰). همچنین مطالعه blake و همکاران نشان داد که موش‌هایی که با رژیم غذایی فیتواستروژن بالا تحت درمان قرار گرفتند، کاهش قابل توجه بی‌حرکتی در آزمون شنای اجباری را نشان دادند که همسو با مطالعه ما بود (۲۱). همچنین مطالعه ای نشان داده است که تزریق فورمونونتین به موش‌های دچار اضطراب ناشی از درد منجر به کاهش قابل توجهی از علائم اضطرابی در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل می‌شود که از یافته‌های ما حمایت می‌کند (۲۲).

نورون‌های CRH در هیپوتالاموس با نورون ارکسین در تعامل هستند. قرار گرفتن در معرض استرس منجر به افزایش فعالیت نورون‌های CRH شده که به نوبه خود باعث تحریک فعالیت نورون‌های ارکسین می‌شود (۲۳). همچنین مطالعات نشان داده است که دپلاریزاسیون نورون‌های سنتز کننده ارکسین A نتیجه افزایش انتشار گلوتامات است، همچنین برهمکنش گلوتامات و ارکسین برای اثرات اضطراب‌زایی ارکسین ضروری است (۲۴). گابا انتقال دهنده عصبی مهاری است. نورون‌های گابارژیکی در ناحیه پیش اپتیک هیپوتالاموس سیگنال‌های مهاری مستقیم را به نورون‌های ارکسین می‌فرستند (۲۵).

مطالعات قبلی نشان داد که فورمونونتین اثرات ضد گلوتاماترژیکی و گابارژیکی دارد. فورمونونتین از نورون‌ها در برابر آپوپتوز ناشی از افزایش فعالیت‌های گیرنده گلوتاماترژیکی متیل-دی آسپارتات (NMDA) محافظت می‌کند (۶). همچنین یک مطالعه

1- Post-Traumatic Stress Disorder

گذشته ثر ضداضطرابی فورمونونتین در مدل موش ناشی از تزریق کورتیکوسترون را تایید کرده است (۲۶). نتایج ما نشان داد تزریق داخل مغزی فورمونونتین بیان ژن‌های ارکسین را در موش‌های صحرایی مدل استرس کاهش داد. احتمالاً فورمونونتین با سرکوب فعالیت سیستم گلوتاماترژیکی و تحریک نورون‌های گاباارژیکی منجر به کاهش آزاد سازی CRH می‌شود که به دنبال آن سطح بیان ژن ارکسین کاهش می‌یابد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین بیان ژن *CGRP* در موش‌های تحت استرس افزایش می‌یابد. یافته ما مطابق با مطالعات گذشته است که نشان می‌دهد فعالیت نورون‌های CGRP در پاسخ به استرس افزایش می‌یابد (۲۷،۱۵). تزریق داخل مغزی فورمونونتین میانگین بیان ژن *CGRP* را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت کاهش داد. مطالعات نشان داده است که CGRP پاسخ استرسی را از طریق تحریک محور HPA با افزایش سطح کورتیکوسترون و CRH ایجاد می‌کند (۲۸).

فورمونونتین نوعی ایزوفلاون است که سطوح سرمی کورتیکوسترون را کاهش و بیان گیرنده فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF[1]) را افزایش می‌دهد (۲۶). خواص محافظت کننده عصبی فورمونونتین در اختلالات عصبی متعدد از جمله بیماری آلزایمر، ایسکمی مغزی، آسیب مغزی تروماتیک، اضطراب و افسردگی مشاهده شده است. اثرات مفید فورمونونتین تا حدی از طریق کاهش التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو همراه با مسیر سیگنالینگ مربوطه بررسی شده است (۲۹). سیستم گیرنده mGluR7 ممکن است هدف جذابی برای اختلالات اضطرابی باشد، زیرا تعدیل کننده‌های این گیرنده در چندین مکان در مدار عصبی عاطفی و اضطرابی نقش دارند. کانال کاتیونی گیرنده گذرا (TRP[2]) واسطه گلوتامات در مغز است، فعال‌سازی کانال‌های TRP می‌تواند باعث آزاد شدن CGRP شود (۳۰). بنابراین، اثرات ضداضطراب فورمونونتین می‌تواند به دلیل کاهش التهاب، کاهش فعالیت محور HPA و کاهش تحریک پذیری عصبی با افزایش BDNF از طریق مهار گیرنده NMDA گلوتامات در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مدل استرس اعمال شود (۸).

1- Brain-Derived Neurotrophic Factor
2- Transient Receptor Potential

نتیجه‌گیری

در مجموع، این مطالعه برای اولین بار اثرات ضداضطرابی فورمونونتین را در موش‌های صحرایی نشان داد. در پژوهش حاضر، تزریق داخل بطن مغزی فورمونونتین موجب کاهش بیان ژن‌های *CGRP* و *ارکسین*، در موش‌های صحرایی مدل استرس بی‌حرکتی گردید. اثرات ضداضطرابی فورمونونتین احتمالاً می‌تواند از طریق کاهش بیان نورون‌های بالادستی CRH اعمال شود.

تقدیر و تشکّر

این مقاله مستخرج از رساله تحت عنوان " بررسی اثرات فورمونونتین بر بیان ژن‌های ارکسین و پپتید وابسته به ژن کلسی تونین در موش‌های صحرایی مدل استرس " تصویب شده در سال ۱۴۰۰ در مقطع دکتری با کد پورپوزال ۱۳/۵۷۶۴/د/۱۴۰۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شده است. نویسندگان در انجام این پژوهش از حمایت‌های مالی و معنوی بخش معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی سپاس‌گزاری می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق مصوب دانشگاه محقق اردبیلی (IR.UMA.REC.1400.028) تأیید شد.

حمایت مالی

مطالعه حاضر با حمایت مالی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد.

مشارکت نویسندگان

طراحی ایده – روش کار: فریبا محمودی

جمع آوری داده‌ها : الهه بصیرت

تجزیه و تحلیل داده‌ها : فریبا محمودی، همایون خزعلی– الهه بصیرت

نظارت: فریبا محمودی

مدیریت پروژه: فریبا محمودی

نگارش-پیش نویس: الهه بصیرت

نگارش- بررسی- ویرایش: فریبا محمودی، همایون خزعلی

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Chen S, Lu D, Wang W, Chen W, Zhang S, Wei S. Plasma metabolomic profiling of repeated restraint stress in rats. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2020; 1160: 122294. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122294
2. Meyer AE, Curry JF. Pathways from anxiety to stressful events: An expansion of the stress generation hypothesis. Clin Psychol Rev. 2017; 57: 93-116. DOI: 10.1016/j.cpr.2017.08.003
3. Goodwin JE, Geller DS. Glucocorticoid-induced hypertension. Pediatr Nephrol. 2012; 27(7): 1059-66. DOI: 10.1007/s00467-011-1928-4
4. Olubodun-Obadun TG, Ishola IO, Adesokan TP, Anih BO, Adeyemi OO. Antidepressant-and anxiolytic-like actions of Cajanus cajan seed extract mediated through monoaminergic, nitric oxide-cyclic GMP and GABAergic pathways. J Ethnopharmacol. 2023; 306: 116142. DOI: 10.1016/j.jep.2023.116142
5. Dutra JM, Espitia PJ, Batista RA. Formononetin: Biological effects and uses–A review. Food chem. 2021; 359: 129975. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129975
6. Tian Z, Liu Sb, Wang Yc, Li Xq, Zheng Lh, Zhao Mg. Neuroprotective effects of formononetin against NMDA-induced apoptosis in cortical neurons. Phytother Res. 2013; 27(12): 1770-5. DOI:10.1002/ptr.4928
7. Aly SH, Elissawy AM, Fayez AM, Eldahshan OA, Elshanawany MA, Singab ANB. Neuroprotective effects of Sophora secundiflora, Sophora tomentosa leaves and formononetin on scopolamine-induced dementia. Nat. Prod. Res. 2021; 35(24): 5848-52. DOI: 10.1080/14786419.2020.1795853
8. Wang X-s, Guan S-y, Liu A, Yue J, Hu L-n, Zhang K, et al. Anxiolytic effects of Formononetin in an inflammatory pain mouse model. Mol Brain. 2019; 12: 1-12. DOI: 10.1186/s13041-019-0453-4
9. Chieffi S, Carotenuto M, Monda V, Valenzano A, Villano I, Precenzano F, et al. Orexin system: the key for a healthy life. Front Physiol. 2017; 8: 357. DOI: 10.3389/fphys.2017.00357
10. Li SB, de Lecea L. The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. Neuropharmacology. 2020; 167: 107993. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.107993
11. Wang Q, Qin H, Deng J, Xu H, Liu S, Weng J, et al. Research progress in calcitonin gene-related peptide and bone repair. Biomolecules. 2023; 13(5): 838. DOI: 10.3390/biom13050838
12. Hashikawa-Hobara N, Ogawa T, Sakamoto Y, Matsuo Y, Ogawa M, Zamami Y, Hashikawa N. Calcitonin gene-related peptide pre-administration acts as a novel antidepressant in stressed mice. Sci Rep. 2015; 5(1): 12559. DOI: 10.1038./srep12559
13. Haghighat K, Mahmoudi F, Khazali H. Study of the central Injection effects of chrysin on behavioral and intra hypothalamic gene expression levels of CRH and CGRP in male rats. Gene, Cell Tissue. 2024; 11(2): e147106. DOI: 10.5812/gct-147106
14. Neghaddadgar L, Mahmoudi F, Khazali H. Effects of dopamine and L-dopa on ghrelin gene expresion in the hypothalamus and ovary in a polycystic ovarian syndrome rat model. Sci. J. Kurdistan Univ. Med. Sci. 2024; 28(6): 1-11. DOI: 10.61186/SJKU.28.6.1

15. Bahari N, Mahmoudi F, Haghighat K, Khazali H. The Effects of Trans-anethole on the Hypothalamic CGRP and CRH Gene Expression in Rat Model of Stress. Arch Biochem Biophys. 2023; 14(1): 1-7. DOI: 10.22037/aab.v14i1.41158

16. Mohammadpour MJ, Nourizadeh E, Mahmoudi F. Analgesic effect of trans-anethole. Journal of Basic and Clinical Pathophysiology. 2023; 11(1): 44-50. DOI: 10.22070/jbcp.2023.17492.1168

17. Sargin D. The role of the orexin system in stress response. Neuropharmacology. 2019; 154: 68-78. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.09.034

18. Hwang BH, Katner J, Iyengar S. Corticotropin-releasing factor mRNA and substance P receptor binding in the paraventricular hypothalamic nucleus, central nucleus of the amygdala, and locus coeruleus of Sprague-Dawley rats following restraint-induced stress. J Mol Neurosci. 2005; 25(3): 239-50. DOI: 10.1385/JMN:25:3:239

19. Iftikhar K, Siddiq A, Baig SG, Zehra S. Substance P: A neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders. Neuropeptides. 2020;79: 101993. DOI: 10.1016/j.npep.2019.101993

20. Wen XD, Qi LW, Li B, Li P, Yi L, Wang YQ, et al. Microsomal metabolism of calycosin, formononetin and drug–drug interactions by dynamic microdialysis sampling and HPLC–DAD–MS analysis. J Pharm Biomed Anal. 2009; 50(1), 100-05. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.03.038

21. Blake C, Fabick KM, Setchell KD, Lund TD, Lephart ED. Neuromodulation by soy diets or equol: anti-depressive & anti-obesity-like influences, age-& hormone-dependent effects. BMC Neurosci. 2011; 12(1), 1-13. DOI: 10.1186/1471-2202-12-28

22. Wang XS, Guan SY, Liu A, Yue J, Hu LN, Zhang K, et al. Anxiolytic effects of Formononetin in an inflammatory pain mouse model. Mol Brain. 2019; 12: 1-2. DOI: 10.1186/s13041-019-0453-4

23. Shainidze KZ, Perekrest SV, Novikova NS, Kazakova TB, Korneva EA. Stimulation of orexinergic system in the CNS and in immune organs by various forms of stress. Adv Neuroimmune Biol. 2012; 3(3-4): 255-64. DOI: 10.3233/NIB-012915

24. Lungwitz EA, Molosh A, Johnson PL, Harvey BP, Dirks RC, Dietrich A, et al. Orexin-A induces anxiety-like behavior through interactions with glutamatergic receptors in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. Physiol Behav. 2012; 107(5): 726-32. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.05.019

25. Saito YC, Tsujino N, Hasegawa E, Akashi K, Abe M, Mieda M, et al. GABAergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. Front Neural Circuits. 2013; 7: 192. DOI: 10.3389/fncir.2013.00192

26. Zhang C, Zhu L, Lu S, Li M, Bai M, Li Y, Xu E. The antidepressant-like effect of formononetin on chronic corticosterone-treated mice. Brain Res. 2022; 1783: 147844. DOI: 10.1016/j.brainres.2022.147844

27. Sink KS, Walker DL, Yang Y, Davis M. Calcitonin gene-related peptide in the bed nucleus of the stria terminalis produces an anxiety-like pattern of behavior and increases neural activation in anxiety-related structures. J Neurosci. 2011; 31(5): 1802-10. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5274-10.2011

28. Dhillo WS, Small CJ, Jethwa PH, Russell SH, Gardiner JV, Bewick GA, et al. Paraventricular nucleus administration of calcitonin gene-related peptide inhibits food intake and stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Endocrinology. 2003;144(4):1420-5. DOI: 10.1210/en.2002-220902

29. Tian J, Wang X-Q, Tian Z. Focusing on formononetin: recent perspectives for its neuroprotective potentials. Front Pharmacol. 2022; 13: 905898. DOI: 10.3389/fphar.2022.905898

30. Wang M, Gu Y, Meng S, Kang L, Yang J, Sun D, et al. Association between TRP channels and glutamatergic synapse gene polymorphisms and migraine and the comorbidities anxiety and depression in a Chinese population. Front Genet. 2023; 14: 1158028. DOI: 10.3389/fgene.2023.1158028