



اثر فعال سازی سیستم ایمنی بدن مادر بر بیان مارکرهای التهابی استریاتوم مغز فرزندان نر متولد شده در مدل تجربی اسکیزوفرنیا القا شده با لیپوپلی ساکارید

روناک موسویان^۱، ریحانه بابایی^۲، فائزه عزیزاده^۲، ابراهیم سواره^۲، هانیه کاظمی^۱، ناهید داودیان^{۳*}

۱- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشکده سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۳- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
مقدمه اخیرا مطالعات اپیدمیولوژیک و همچنین مدل های تجربی حیوانی، عفونت دوران بارداری را به عنوان یک فاکتور خطر مهم در بروز بیماری اسکیزوفرنیا در فرزندان شناسایی کرده اند. علاوه بر این، مطالعات زیادی ارتباط بین اسکیزوفرنیا و التهاب را نشان داده اند. در مطالعه حاضر، با استفاده از مدل فعال سازی سیستم ایمنی مادر (MIA) القا شده با لیپوپلی ساکارید (LPS)، اثر MIA بر بیان چند مارکر التهابی در استریاتوم فرزندان نر متولد شده مورد بررسی قرار گرفت مواد و روش ها موش های باردار در روزهای ۱۵ و ۱۶ بارداری به صورت درون صفاقی سالیین و یا LPS با دوز ۵۰۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن را دریافت کردند. شصت روز پس از تولد، فرزندان نر بدنیا آمده یوتانزی شده و بیان ژن مارکرهای التهابی در استریاتوم آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته ها بیان ژن های $\text{TNF}\alpha$، $\text{IL-1}\beta$، IL-6، $\text{NF-}\kappa\beta$ در استریاتوم فرزندان نر بدنیا آمده از مادران عفونی شده نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت. نتیجه گیری بیان ژن های $\text{TNF}\alpha$، $\text{IL-1}\beta$، IL-6، $\text{NF-}\kappa\beta$ در استریاتوم فرزندان نر بدنیا آمده از مادران عفونی شده نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت. کلیدواژه ها اسکیزوفرنیا، مارکرهای التهابی، استریاتوم، فعال سازی سیستم ایمنی مادر، لیپوپلی ساکارید	تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۴ *نویسنده مسئول: ناهید داودیان، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران تلفن: ۰۷۶۳۳۷۱۰۳۷۳ پست الکترونیک: Nahid.Davoodian@hums.ac.ir



مقدمه

بیماری اسکیزوفرنیا یک بیماری روانی با نشانه‌های سایکوز، فقدان عاطفه، انزوای اجتماعی و اختلالات شناختی است که شیوع آن در هر جمعیت بالغی تقریباً ۱٪ گزارش شده است (۱). علائم این بیماری به سه دسته تقسیم می‌شوند که عبارتند از علائم مثبت، علائم منفی و علائم شناختی. علائم مثبت شامل توهم و هذیان است که اکثر افراد بطور عادی تجربه نمی‌کنند. علائم منفی فقدان لذت، فقدان اراده و انگیزه را شامل می‌شود و علائم شناختی که در آن حافظه، تمرکز و عملکردهای اجرایی مغز دچار اختلال می‌گردد (۲). از عواملی که باعث اختلال اسکیزوفرنیا می‌شوند، می‌توان به عوامل ژنتیکی و زیست محیطی اشاره کرد. تعداد زیادی از مطالعات اپیدمیولوژیک انسانی نشان داده است که عوامل محیطی از جمله قرار گرفتن در معرض عوامل عفونی ویروسی و باکتریایی در دوران بارداری باعث افزایش ریسک بیماری‌های روانپریشی و اختلالات عصبی در فرزندان متولد شده می‌گردد (۳). لذا با توجه به تاثیر عفونت دوران بارداری بر عملکرد مغز و فنوتیپ رفتاری فرزندان، مدل‌های حیوانی فعال‌سازی سیستم ایمنی مادر (MIA) بر اساس تجویز ترکیبات ایمونوژنیک در دوران بارداری گسترش یافته است (۴-۷). مهمترین روش‌ها جهت ایجاد عفونت در مادر، مبتنی بر استفاده از لیپوپلی‌ساکارید (LPS) باکتریایی و آنالوگ RNA دو رشته‌ای (dsRNA) پلی‌اینوزینیکیک: پلی‌سایتیدیلیک اسید (Poly (I:C)) می‌باشد که هر دو روش به طور موثری جهت ایجاد مدل‌های حیوانی برخی از رایج‌ترین و ناتوان‌کننده‌ترین بیماری‌های عصبی-روانی مانند اسکیزوفرنیا، افسردگی و اوتیسم به کار می‌رود (۸-۱۰).

در ارتباط با پاتوفیزیولوژی بیماری اسکیزوفرنیا، اختلال در سیستم نوروترانسمیترها، اختلالات آناتومیک مغزی و

تغییراتی در سیستم ایمنی و متعاقب آن فرایند التهاب عنوان شده است (۱۱). تحقیقات نشان داده است که در جریان این بیماری، میزان نوروترانسمیترهای گلوتامات و سروتونین کاهش می‌یابد و نوروترانسمیتر دوپامین در نواحی استریاتوم و مزولیمبیک مغز افزایش و در قسمت پره فرونتال کاهش یافته است (۱۲). همینطور بررسی تکوین ساختار و عملکرد سیستم دوپامینرژیک مغزی از دوران جنینی تا بزرگسالی در مدل موشی MIA با استفاده از Poly (I:C)، نشان داد که تحریک سیستم ایمنی مادر در دوران بارداری منجر به اختلالات ساختاری و عملکردی مرتبط با اسکیزوفرنیا می‌گردد که با تغییرات دوپامینرژیک در ناحیه استریاتوم همراه است (۱۳). هم‌راستا با این مطالعه، افزایش سطح دوپامین در ناحیه استریاتوم میمون‌های رزوس متولد شده از مادران عفونی شده در دوران بارداری تاییدی بر استفاده از مدل MIA در فهم بیولوژی و اختلالات تکوین عصبی بیماری اسکیزوفرنیا می‌باشد (۱۴).

بیماری اسکیزوفرنیا به طور قابل توجهی با سیستم ایمنی و التهاب مرتبط است. همانطور که در بالا شرح داده شد، تحریک سیستم ایمنی مادران باردار بوسیله‌ی عوامل باکتریایی مانند LPS و عوامل ویروسی منجر به ایجاد علایمی شبیه به اسکیزوفرنیا می‌شود. بعلاوه وجود مقادیر بالایی از سایتوکاین‌های پیش التهابی شامل IL-6، IL-1 β و TNF α در خون و مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا نشانی از ارتباط بین سیستم ایمنی و این بیماری می‌باشد (۱۱، ۱۵). نتایج برخی از تحقیقات حاکی از آن است که سلول‌های میکروگلیا در مغز، منبع اصلی واسطه‌های التهابی و استرس اکسیداتیو در بیماری اسکیزوفرنیا هستند. تحریک سلول‌های میکروگلیا با عوامل بیماری‌زا و یا آسیب مغزی منجر به تغییر موفولوژیکی این



مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تعداد ۱۲ عدد موش بزرگ ماده و ۶ عدد موش بزرگ نر آزمایشگاهی نژاد ویستار (۱۶-۱۲ هفته) در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۷۰ گرم از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان تهیه شده و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد، رطوبت ۶۰-۷۰٪ و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی) و بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. قابل ذکر است که در این مطالعه حجم نمونه و تعداد مادران باردار بر طبق روش resource equation (۲۰) و همچنین مقالات قبلی انتخاب گردید (۲۱). نگهداری حیوانات و تمامی پروتکل‌های آزمایشی انجام شده در این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان تایید شد (HUMS.REC.1396.45).

گروه‌بندی آزمایش: به منظور آمیزش جنسی، هر، دو موش بزرگ ماده با یک موش بزرگ نر در یک قفس جداگانه نگهداری شده و بارداری با استفاده از تست اسمیر واژینال در روز اول پس از آمیزش (روز یک بارداری (GD1)) مورد تایید قرار گرفت. سپس ۱۲ موش باردار به صورت تصادفی در دو گروه کنترل و تیمار با LPS تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱). در گروه کنترل، حیوانات تزریق داخل صفاقی نرمال سالین را در روزهای ۱۵ و ۱۶ بارداری دریافت کردند. در گروه تیمار با LPS، حیوانات تزریق داخل صفاقی LPS (سیگما-آمریکا) با دوز ۵۰۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن را در روزهای ۱۵ و ۱۶ بارداری دریافت کردند (۷). یکی از محدودیت‌های مهم مطالعه حاضر، عدم بارداری موش‌های بزرگ ماده علی‌رغم مثبت بودن تست اسمیر واژینال بود. لذا جهت اطمینان از بارداری موش‌ها، وزن‌گیری موش‌های

سلول‌ها از حالت استراحت با مورفولوژی منشعب (M0) به میکروگلیای فعال کلاسیک با مورفولوژی آمیبی شکل (M1) می‌گردد. میکروگلیای فعال کلاسیک خاصیت نوروٹوکسیک داشته که می‌تواند از طریق فعالسازی فاکتور نسخه‌برداری NF- κ B منجر به تولید و رهاسازی مارکرهای التهابی از جمله IL-6، IL-1 β ، TNF α و همینطور تولید پروتئین‌های کمپلمان، پروتئینازها و ROS ها شده که در نهایت باعث مرگ سلولی (آپاپتوز) می‌شود (۱۶). تاکنون در چندین مطالعه در مدل حیوانی MIA، افزایش فعالیت سلول‌های میکروگلیا و همینطور افزایش بیان مارکرهای التهابی در نواحی متفاوت مغز فرزندان متولد شده از جمله هیپوکمپ، پیش‌پیشانی و آمیگدال عنوان شده است (۱۷، ۱۸). با این وجود، علی‌رغم اهمیت ناحیه استریاتوم در پاتوفیزیولوژی بیماری اسکیزوفرنیا، تاکنون گزارشی در خصوص تغییرات مارکرهای التهابی در این ناحیه مغز گزارش نشده است. هر چند که اخیراً در مطالعه‌ای بر نمونه‌های مغز بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا پس از مرگ آنها، افزایش بیان مسیرهای سلولی در ارتباط با التهاب به خصوص در ناحیه هیپوکمپ و به مقدار کمتر در نواحی استریاتوم و پیش‌پیشانی عنوان شده است که بیانگر اهمیت این نواحی مغزی در اتیولوژی این بیماری است (۱۹). در مطالعه قبلی با استفاده از تست‌های رفتاری نشان دادیم که تزریق LPS (۵۰۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) در روزهای ۱۵ و ۱۶ بارداری منجر به اختلال در حافظه کاری و شناختی، تنها در فرزندان نر بالغ متولد شده می‌گردد (۴). با توجه به اهمیت فرایند التهاب در پاتوفیزیولوژی بیماری اسکیزوفرنیا، در مطالعه حاضر تلاش بر آن است که تغییرات سطح ژن‌های التهابی از جمله NF- κ B، IL-6، IL-1 β و TNF α برای اولین بار در ناحیه استریاتوم مغز فرزندان نر متولد شده در مدل حیوانی MIA مورد ارزیابی قرار گیرد.



فرزند نر به صورت تصادفی انتخاب شد (n=۱۶). پس از یوتانزی موش‌ها با استفاده از گاز CO₂، بلافاصله ناحیه استریاتوم از مغز جدا و به نیتروژن مایع منتقل شده و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بافت‌های دیگر حیوانات اضافی جهت آزمایش‌های دیگر که در اینجا ذکر نشده است، جداسازی و نگهداری شد.

باردار در طول دوران بارداری مورد ارزیابی قرار گرفت و در صورت عدم وزن‌گیری و یا کاهش شدید وزن بویژه پس از تزریق LPS، حیوان از مطالعه خارج شد. قابل ذکر است که در مطالعه حاضر، موش‌های نر متولد شده از مادران باردار مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۲۱ روز پس از تولد، فرزندان به دنیا آمده، بر اساس جنسیت و تیمار از مادر جدا شده و تا ۶۰ روز پس از تولد در شرایط استاندارد نگهداری شدند. جهت انجام تست qPCR از هر مادر باردار در هر گروه، یک



شکل ۱- شماتیک مراحل انجام تحقیق؛ موش‌های باردار در روزهای ۱۵ و ۱۶ بارداری به صورت درون صفاقی سالی و یا LPS با دوز ۵۰۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن را دریافت کردند. شصت روز پس از تولد، فرزندان نر متولد شده یوتانزی شده و استریاتوم آنها جهت بررسی بیان ژن ماکرهای التهابی با استفاده از تکنیک qPCR جداسازی شد.

و در واکنش‌های ۱۰ میکرولیتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و به صورت سه تایی انجام شد. واکنش توسط دستگاه qPCR system (Bio Mic Molecular System-استرالیا) و با پروتوکل سه مرحله‌ای (جدول ۲) صورت گرفت. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفته و تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط روش $\Delta\Delta Ct$ و فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت.

استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن‌های التهابی در ناحیه استریاتوم با استفاده از تکنیک qPCR RNA تام با استفاده از معرف TRI (سیگما-آمریکا) استخراج شده و پس از تیمار با DNase (فرمنتاز-آمریکا)، cDNA مربوطه توسط Thermo Fischer cDNA synthesis kit (Thermo Fischer-آمریکا) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. واکنش qPCR با استفاده از کیت SYBR green (شرکت تاکارا-ژاپن)

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی استفاده شده در تکنیک qPCR.

نام ژن	توالی 3'-5'	دمای اتصال	اندازه محصول (bp)
Rattus TNF α	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC TCTGCTTGTTGGTTTGCTACGAC	۶۰ °C	۱۱۱
Rattus IL-1B	GCTGTGGCAGCTACCTATGTCTTG AGGTCGTCATCATCCACGAG	۶۰ °C	۱۲۰
Rattus IL-6	TGATGGATGCTTCCAAACTG GAGCATTGGAAGTTGGGGTA	۶۰ °C	۲۳۰
Rattus NF-KB	TGCAGAAAGAAGACATTGAGGTG AGGCTAGGGTCAGCGTATGG	۶۰ °C	۱۳۰
Rattus GAPDH	ACGCAAGTTCAACGGCACAG GACATACTCAGCACCAGCATCACC	۶۰ °C	۱۲۸



جدول ۲- چرخه دمایی انجام qPCR.

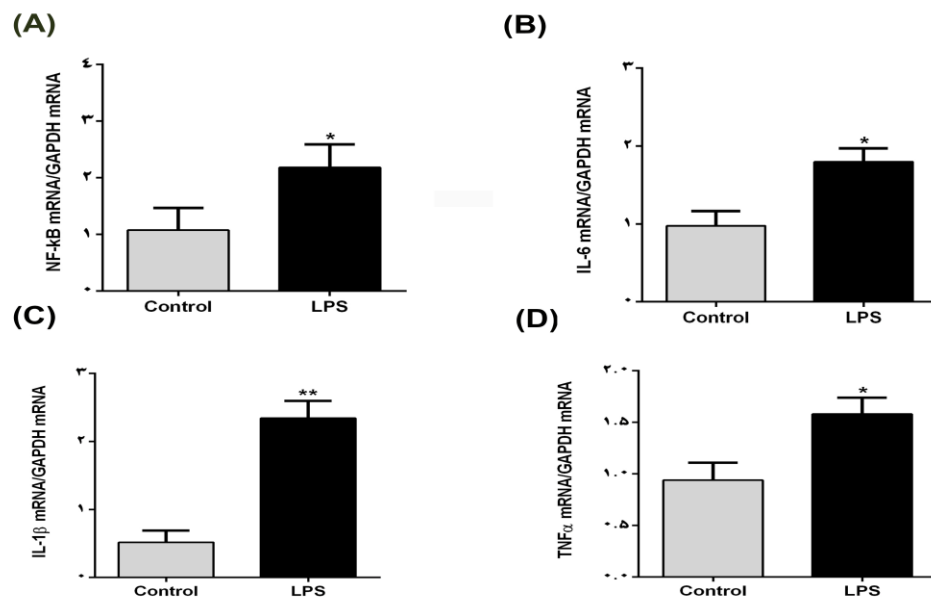
مرحله	دما و زمان
واسرشتگی اولیه	۳۰، ۹۵ °C ثانیه
واسرشتگی چرخه	۵، ۹۵ °C ثانیه
اتصال هر چرخه	۳۰، ۶۰ °C ثانیه
طویل شدن هر چرخه	۳۰، ۷۲ °C ثانیه

آنالیز آماری با استفاده از آزمون Student's t test انجام شده و داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SEM بیان و $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بیان ژن‌های التهابی شامل NF- κ B، IL-6، IL-1 β و TNF α با استفاده از تکنیک qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲ قسمت A نشان داده شده است، سطح بیان ژن NF- κ B در استریاتوم فرزندان نر متولد شده از مادران

باردار تیمار شده با LPS نسبت به گروه کنترل به میزان تقریباً دو برابر و به صورت معناداری ($P < 0.05$) افزایش یافته است (شکل A2). به صورت مشابه، سطح بیان ژن IL-6 نیز تفاوت معناداری ($P < 0.05$) با افزایش تقریباً ۱/۸ برابر در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل نشان داد (شکل B2). علاوه بر این نتایج، این مطالعه حاکی از افزایش معنادار بیان ژن‌های IL-1 β و TNF α در استریاتوم مغز فرزندان نر متولد شده از مادران عفونی شده با LPS در مقایسه با گروه کنترل بود. بطوریکه میزان بیان ژن IL-1 β در گروه تیمار به میزان تقریباً ۲/۵ برابر به صورت معناداری ($P < 0.01$) افزایش داشت (شکل C2). همینطور در مقایسه با گروه کنترل، افزایش ۱/۵ برابری ژن TNF α در گروه تیمار مشاهده گشت (شکل D2).



شکل ۲- تغییرات بیان ژن‌های NF- κ B (A)، IL-6 (B)، IL-1 β (C) و TNF α (D) در استریاتوم مغز فرزندان نر. Control: فرزندان نر متولد شده از مادران بارداری تیمار شده با نرمال سالین، LPS: فرزندان نر متولد شده از مادران بارداری تیمار شده با LPS. بیان ژن GAPDH جهت نرمال‌سازی ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SEM گزارش شده است ($n = 6$) و علامتها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروهها می باشد. * $P < 0.05$ ، در مقایسه با گروه کنترل، ** $P < 0.01$ ، در مقایسه با گروه کنترل



بحث

اسکیزوفرنیا یک بیماری روانشناختی مزمن است که ۱٪ جمعیت جهان را درگیر کرده و هر دو عوامل ژنتیکی و محیطی در بروز آن موثر می‌باشند (۱۲). عوامل زیست محیطی بسیاری از جمله تغذیه ناکافی در دوران پیش از تولد، زمان و محل تولد و عفونت‌های دوران بارداری، ریسک فاکتور ایجاد این بیماری به شمار می‌آیند (۲۲). از اینرو یکی از مدل‌های حیوانی رایج جهت بررسی مکانیسم بیماری اسکیزوفرنیا مدل فعال سازی سیستم ایمنی مادر در دوران بارداری است که در تعدادی از مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است (۴، ۶، ۷). در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که بیان ژن‌های التهابی شامل IL-6 ، $\text{IL-1}\beta$ ، $\text{TNF}\alpha$ و $\text{NF-}\kappa\beta$ در ناحیه استریاتوم مغز فرزندان متولد شده از مادرانی که در دوران بارداری در معرض عفونت قرار داشته اند نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشته است.

اخیرا نقش عفونت در دوران بارداری به عنوان یک عامل مهم و تاثیرگذار بر اختلال تکوین مغز در دوران جنینی و در نتیجه بروز اختلالات عصبی-رفتاری در دوران بزرگسالی در مطالعات اپیدمیولوژیک و همچنین تجزیه و تحلیل مدل‌های حیوانی عنوان شده است (۲۳-۲۶). بطوریکه این مطالعات بارها ارتباط بین فعال‌سازی سیستم ایمنی بدن مادر و اختلالات روانپزشکی مانند اسکیزوفرنیا در فرزندان را تایید کرده‌اند (۲۷، ۲۸). لذا با توجه به اثرات عفونت دوران بارداری بر فنوتیپ رفتاری و عملکرد مغز در فرزندان، مدل حیوانی MIA بر اساس استفاده از عوامل ایمنوژنیک در حیوان باردار گسترش یافت. رایج‌ترین روش جهت فعال‌سازی سیستم ایمنی مادر استفاده از LPS و Poly (I:C) بوده است که به عنوان مدل حیوانی جهت بررسی مکانیسم بیماری‌هایی مانند اسکیزوفرنیا به کار می‌رود (۸-).

۱۰، ۲۹، ۳۰). با استفاده از مدل حیوانی MIA القا شده با LPS، در مطالعه قبلی نشان دادیم که تزریق LPS (۵۰۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) در روزهای ۱۵ و ۱۶ بارداری منجر به اختلال در حافظه کاری و شناختی، تنها در فرزندان نر بالغ متولد شده می‌گردد. به علاوه، سنجش بیان ژن گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD67) در ناحیه پیش‌پیشانی فرزندان نر متولد شده حاکی از کاهش بیان آنزیم بود (۴) که مشابه نتایج گزارش شده در بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا است (۳۱). در مطالعه حاضر، با توجه به وجود شواهدی مبنی بر نقش سیستم ایمنی در بروز بیماری اسکیزوفرنیا و همین‌طور اهمیت مدل حیوانی MIA در شناسایی مکانیسم بیماری‌هایی مانند اسکیزوفرنیا و اوتیسم، به صورت اختصاصی تغییرات مارکرهای التهابی شامل $\text{NF-}\kappa\beta$ ، IL-6 ، $\text{IL-1}\beta$ و $\text{TNF}\alpha$ در ناحیه استریاتوم فرزندان نر متولد شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

در طی ده‌های گذشته، تعدادی از مطالعات، ارتباط بین سیستم ایمنی و بیماری اسکیزوفرنیا را مطرح کرده‌اند (۱۱، ۱۶، ۳۲-۳۴). هر چند که در نتیجه عوامل مخدوش کننده‌ای مانند تفاوت در تعداد نمونه، سطوح متفاوت روانپزشکی در بیماران و همین‌طور مصرف داروهای متفاوت گاه نتایج متناقضی در ارتباط با سطح مارکرهای التهابی در بیماران مبتلا به اسکیزوفرنی گزارش شده است (۳۵، ۳۶)، با این وجود نتایج تعدادی از مطالعات انسانی مبنی بر وجود مقادیر بالایی از سایتوکاین‌های التهابی در خون و مایع مغزی نخاعی در بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا می‌تواند نشانی از ارتباط بین سیستم ایمنی و این بیماری باشد. علاوه نقش سلول‌های میکروگلیا در پاتوفیزیولوژی بیماری اسکیزوفرنیا هم در بیماران و هم در مدل‌های حیوانی این بیماری مشخص شده است (۳۲، ۳۷). این سلول‌ها از طریق



تولید سیتوکین‌های التهابی در مغز و در نتیجه ایجاد عدم تعادل در سطح این سیتوکین‌ها منجر به اختلال در تکوین عصبی جنین و در نهایت اختلالات روانشناختی و عصبی در بزرگسالی می‌گردد. مطالعات انسانی افزایش فعالیت و دانسیته سلول‌های میکروگلیا در مغز بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا را نشان داده است (۳۴).

در مدل حیوانی MIA نیز نتایج متفاوتی در ارتباط با تغییرات بیان مارکرهای التهابی عنوان شده است که این اختلافات به طور عمده به دلیل تفاوت در ناحیه بررسی شده، سن فرزندان در زمان آزمایش، نژاد حیوان، زمان تزریق ماده ایمونوژنیک و غیره است (۳۸، ۳۹). با این وجود، علی‌رغم اهمیت ناحیه استریاتوم در پاتوفیزیولوژی بیماری اسکیزوفرنیا و همین‌طور وجود شواهدی مبنی بر افزایش سطح دوپامین در ناحیه استریاتوم مغز موش‌های سوری (۱۳) و میمون‌های (۱۴) متولد شده در مدل حیوانی MIA (مشابه بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا)، تاکنون گزارشی در ارتباط با تغییرات مارکرهای التهابی در این مدل حیوانی گزارش نشده است. نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش بیان مارکرهای التهابی شامل $IL-6$ ، $IL-1\beta$ و $TNF\alpha$ در ناحیه استریاتوم فرزندان نر متولد شده در سن شصت روزگی بود که نشان دهنده اثرات طولانی مدت MIA بر مغز فرزندان متولد شده می‌باشد. مسیر سیگنالینگ $NF-\kappa\beta$ یکی از عمده‌ترین مسیرهای التهابی است که ژن‌های کنترل‌کننده پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی، آپاپتوز، فرایندهای التهابی و پاسخ سلولی به استرس را تنظیم می‌نماید. لذا افزایش بیان $NF-\kappa\beta$ منجر به افزایش بیان فاکتورهای التهابی شامل $IL-6$ ، $IL-1\beta$ و $TNF\alpha$ می‌گردد (۴۰) که توجه‌کننده نتیجه بدست آمده در این مطالعه می‌باشد. به طور مشابه، اخیراً در مطالعه‌ای بر مغز بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا پس از مرگ آنها، افزایش بیان

مسیرهای سلولی در ارتباط با التهاب در نواحی هیپوکمپ، استریاتوم و پیش‌پیشانی با استفاده از تکنیک میکروآرای عنوان شده است (۱۹). این مطالعه انسانی نشان دهنده اهمیت فرایندهای التهابی در نواحی متفاوت مغز بیماران مبتلا به اسکیزوفرنیا و احتمالاً پاتوفیزیولوژی این بیماری است. در مطالعه‌ای در در ناحیه هیپوکمپ فرزندان نر متولد شده در مدل حیوانی MIA القا شده با تزریق Poly(I:C) (۴) میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن موش‌های بزرگ، GD19، افزایش سطح بیان ژن فاکتورهای $IL-1\beta$ و $TNF\alpha$ در مقایسه با گروه کنترل گزارش شده است (۴۱). جالب است که در مطالعه‌ای دیگر در مدل حیوانی MIA القا شده با تزریق Poly (I:C) (۵ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن موش‌های کوچک، GD9)، بررسی بیان ژن‌های $IL-6$ ، $IL-1\beta$ و $TNF\alpha$ در ناحیه هیپوکمپ فرزندان متولد شده تنها حاکی از افزایش بیان ژن $IL-1\beta$ بود. این تفاوت نتایج می‌تواند به دلیل اختلاف در متدولوژی تحقیق و همچنین نژاد حیوان مورد مطالعه باشد (۴۲). همچنین، Ribeiro و همکارانش با تزریق poly I:C به میزان ۲ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن موش‌های بزرگ در سن ۵ تا ۷ روزگی، مدل اسکیزوفرنیا را القا کرده و با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوفلورسنت نشان دادند که میزان بیان پروتئین Iba1 در ناحیه هیپوکمپ، پیش‌پیشانی و استریاتوم مغز افزایش قابل توجهی داشته که بیانگر فعال شدن سلول‌های میکروگلیا بوده است. همچنین در مطالعه مذکور افزایش سطح بیان ژن iNOS و عدم تعادل اکسیدانی در نواحی هیپوکمپ، پیش‌پیشانی و استریاتوم مغز نیز گزارش شد (۴۳) که تایید کننده مطالعه حاضر می‌باشد. به طور مشابه، در مدل موشی MIA نیز افزایش فعالیت و تعداد سلول‌های میکروگلیا در نواحی هیپوکمپ و استریاتوم فرزندان متولد شده گزارش شده است (۴۴).



التهاب مغزی در بروز بیماری اسکیزوفرنیا می‌باشد. همچنین این مطالعه نشان داد که MIA منجر به تغییرات طولانی مدت سیتوکین‌ها در ناحیه خاصی از مغز فرزندان شده و ممکن است باعث اختلال در تکوین مغز و اختلالات رفتاری گردد. بنابراین مداخلات درمانی مناسب جهت کنترل و تنظیم فعالیت سیستم ایمنی در مراحل اولیه تکوین مغزی می‌تواند موثر واقع شده و راهکارهای درمانی امیدوارکننده‌ای برای بیماری اسکیزوفرنیا ارائه دهد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان در اجرای این مطالعه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافی در اجرای این پژوهش وجود نداشته است.

در سال‌های اخیر، با توجه به نتایج مطالعات انسانی و حیوانی در ارتباط با فعال شدن سلول‌های میکروگلیا در نواحی مختلف مغزی و در نتیجه رها شدن عوامل مخرب مانند رادیکال‌های آزاد و سیتوکین‌های التهابی مانند IL-6، IL-1 β و TNF α توسط این سلول‌ها، فرضیه میکروگلیا در بیماری اسکیزوفرنیا مطرح شده است (۱۶). یکی از محدودیت‌های مهم پژوهش حاضر عدم امکان بررسی فعالیت سلول‌های میکروگلیا در ناحیه استریاتوم می‌باشد. همینطور بررسی فاکتورهای استرس اکسیداتیو و تغییرات پاتولوژیکی در این ناحیه مغزی می‌تواند اطلاعات بیشتری در ارتباط با اهمیت آن در پاتوفیزیولوژی بیماری اسکیزوفرنیا در فرزندان نر متولد شده در این مدل حیوانی ارائه دهد.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، نتایج این مطالعه نشان داد که تحریک سیستم ایمنی مادر در دوران بارداری در نتیجه عفونت می‌تواند منجر به افزایش بیان مارکرهای التهابی شامل NF- κ B، IL-6، IL-1 β و TNF α در ناحیه استریاتوم مغز فرزندان نر متولد شده در دوران بلوغ شود که نشان از اهمیت فرایند

References

1. Miyamoto S, Duncan G, Marx C, Lieberman J. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry*. 2005;10(1):79-104.
2. Van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature*. 2010;468(7321):203-12.
3. Brown AS. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2006;32(2):200-2.
4. Alizadeh F, Davoodian N, Kazemi H, Ghasemi-Kasman M, Shaerzadeh F. Prenatal zinc supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced behavioral impairments in maternal immune activation model. *Behav Brain Res*. 2020;377:112247.
5. Santos-Toscano R, Borcel É, Ucha M, Orihuel J, Capellán R, Roura-Martínez D, et al. Unaltered cocaine self-administration in the prenatal LPS rat model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;69:38-48.
6. Waterhouse U, Roper VE, Brennan KA, Ellenbroek BA. Nicotine ameliorates schizophrenia-like cognitive deficits induced by maternal LPS exposure: a study in rats. *Disease models & mechanisms*. 2016;9(10):1159-67.
7. Wischhof L, Irrsack E, Osorio C, Koch M. Prenatal LPS-exposure—a neurodevelopmental rat model of schizophrenia—differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015;57:17-30.

8. Fatemi S, Emamian E, Kist D, Sidwell R, Nakajima K, Akhter P, et al. Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Mol Psychiatry*. 1999;4(2):145-54.
9. Fatemi S, Emamian E, Sidwell R, Kist D, Sary J, Earle J, et al. Human influenza viral infection in utero alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the developing brains of neonatal mice. *Mol Psychiatry*. 2002;7(6):633-40.
10. Garbett KA, Hsiao EY, Kálmán S, Patterson PH, Mirnics K. Effects of maternal immune activation on gene expression patterns in the fetal brain. *Transl. Psychiatry*. 2012;2(4):e98-e.
11. Müller N, Weidinger E, Leitner B, Schwarz MJ. The role of inflammation in schizophrenia. *FRONT NEUROSCI-SWITZ*. 2015;9:372.
12. Lang UE, Puls I, Müller DJ, Strutz-Seeböhm N, Gallinat J. Molecular mechanisms of schizophrenia. *CELL PHYSIOL BIOCHEM*. 2007;20(6):687-702.
13. Vuillermot S, Weber L, Feldon J, Meyer U. A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. *J Neurosci*. 2010;30(4):1270-87.
14. Bauman MD, Lesh TA, Rowland DJ, Schumann CM, Smucny J, Kukis DL, et al. Preliminary evidence of increased striatal dopamine in a nonhuman primate model of maternal immune activation. *Transl. Psychiatry*. 2019;9(1):1-8.
15. Meyer U, Schwarz MJ, Müller N. Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *PHARMACOL THERAPEUT*. 2011;132(1):96-110.
16. Monji A, Kato TA, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, et al. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;42:115-21.
17. Ding S, Hu Y, Luo B, Cai Y, Hao K, Yang Y, et al. Age-related changes in neuroinflammation and prepulse inhibition in offspring of rats treated with Poly I: C in early gestation. *BEHAV BRAIN FUNCT*. 2019;15(1):3.
18. O'Loughlin E, Pakan JM, Yilmazer-Hanke D, McDermott KW. Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre-and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. *J. Neuroinflammation*. 2017;14(1):1-12.
19. Lanz TA, Reinhart V, Sheehan MJ, Rizzo SJS, Bove SE, James LC, et al. Postmortem transcriptional profiling reveals widespread increase in inflammation in schizophrenia: a comparison of prefrontal cortex, striatum, and hippocampus among matched tetrads of controls with subjects diagnosed with schizophrenia, bipolar or major depressive disorder. *Transl. Psychiatry*. 2019;9(1):1-13.
20. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies?. *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303.
21. Ahmadian SR, Ghasemi-Kasman M, Pouramir M, Sadeghi F. Arbutin attenuates cognitive impairment and inflammatory response in pentylenetetrazol-induced kindling model of epilepsy. *Neuropharmacology*. 2019;146:117-27.
22. Brown AS, Lau FS. A review of the epidemiology of schizophrenia. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. 23: Elsevier; 2016. p. 17-30.
23. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun*. 2010;24(6):881-97.
24. Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones P. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med*. 2013;43(2):239-57.
25. Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(7):1061-79.
26. Markham JA, Koenig JJ. Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology*. 2011;214(1):89-106.
27. Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry*. 2010;167(3):261-80.
28. Buka SL, Cannon TD, Torrey EF, Yolken RH, Disorders CSGotPOoSP. Maternal exposure to herpes simplex virus and risk of psychosis among adult offspring. *Biol Psychiatry*. 2008;63(8):809-15.



29. Bauman MD, Iosif A-M, Smith SE, Bregere C, Amaral DG, Patterson PH. Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biol Psychiatry*. 2014;75(4):332-41.
30. Dickerson D, Bilkey D. Aberrant neural synchrony in the maternal immune activation model: using translatable measures to explore targeted interventions. *FRONT BEHAV NEUROSCI*. 2013;7:217.
31. de Jonge J, Vinkers C, Hulshoff Pol H, Marsman A. GABAergic mechanisms in schizophrenia: Linking postmortem and in vivo studies. *Front. Psychiatry*. 2017;8:118.
32. Blank T, Prinz M. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia*. 2013;61(1):62-70.
33. Fineberg AM, Ellman LM. Inflammatory cytokines and neurological and neurocognitive alterations in the course of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2013;73(10):951-66.
34. Frick LR, Williams K, Pittenger C. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013.
35. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011;70(7):663-71.
36. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*. 2008;63(8):801-8.
37. Fricker M, Vilalta A, Tolkovsky AM, Brown GC. Caspase inhibitors protect neurons by enabling selective necroptosis of inflamed microglia. *BIOL CHEM*. 2013;288(13):9145-52.
38. Bergdolt L, Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Prog Neurobiol*. 2019;175:1-19.
39. Solek CM, Farooqi N, Verly M, Lim TK, Ruthazer ES. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev Dyn*. 2018;247(4):588-619.
40. Ghosh S, Hayden M. Celebrating 25 years of NF- κ B research. *Immunol Rev*. 2012;246(1):5.
41. Mattei D, Djodari-Irani A, Hadar R, Pelz A, de Cossío LF, Goetz T, et al. Minocycline rescues decrease in neurogenesis, increase in microglia cytokines and deficits in sensorimotor gating in an animal model of schizophrenia. *Brain Behav Immun*. 2014;38:175-84.
42. Giovanoli S, Notter T, Richetto J, Labouesse MA, Vuillermot S, Riva MA, et al. Late prenatal immune activation causes hippocampal deficits in the absence of persistent inflammation across aging. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):1-18.
43. Ribeiro BMM, do Carmo MRS, Freire RS, Rocha NFM, Borella VCM, de Menezes AT, et al. Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine. *Schizophr Res*. 2013;151(1-3):12-9.
44. Juckel G, Manitz MP, Brüne M, Friebe A, Heneka MT, Wolf RJ. Microglial activation in a neuroinflammatory animal model of schizophrenia—a pilot study. *Schizophr Res*. 2011;131(1-3):96-100.



The effect of maternal immune activation on the expression of inflammatory factors in the striatum of male offspring in lipopolysaccharide-induced experimental model of schizophrenia

Ronak Mousaviyan^{1,2}, Reyhaneh Babaei Khorzoughi², Faezeh Alizadeh², Ebrahim Savareh², Haniyeh Kazemi¹, Nahid Davoodian^{3*}

1- Molecular Medicine Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

2- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

3- Endocrinology and Metabolism Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

Original Article

Received: 28 Jan 2020

Accepted: 14 Jul 2020

***Corresponding Author:**

Nahid Davoodian, Ph.D of Clinical Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

TEL: +98 763 371 9373

Email:

Nahid.Davoodian@hums.ac.ir

ABSTRACT

Introduction

Recently, epidemiological studies, as well as experimental animal models, have identified the gestational infection as a particular risk factor for the development of schizophrenia in the offspring. Besides, several studies have demonstrated the association between schizophrenia and inflammation. Using a rat model of maternal immune activation (MIA) induced by lipopolysaccharide (LPS), the present study evaluated the effect of MIA on the expression of several pro-inflammatory markers in the striatum of male offspring

Materials and Methods

Pregnant rats were intraperitoneally administered with either saline or LPS (500µg/kg) on gestation days 15 and 16. At postnatal day 60, male offspring were humanely killed, and the gene expression of inflammatory mediators was evaluated in the striatum

Results

Male rats born to LPS-challenged mothers showed significantly increased expression of NF-κβ, IL-6, IL-1β, and TNFα in the striatum compared to the control group

Conclusion

Collectively, these results support the idea that prenatal immune challenge induces increased inflammatory markers in the striatum of the resulting offspring

Keywords

Schizophrenia, pro-inflammatory markers, striatum, maternal immune activation, lipopolysaccharide

► **Please cite this article as:** Mousaviyan R, Babaei Khorzoughi R, Alizadeh F, Savareh E, Kazemi H, Davoodian N. The effect of maternal immune activation on the expression of inflammatory factors in the striatum of male offspring in lipopolysaccharide-induced experimental model of schizophrenia. J Neyshabur Univ Med Sci 2020;8(3):76-86.