



Semnan University



Research Article

Investigation of the Effects of Diazepam and Sertraline on Gene Expression in Chronic Stress-Induced Depression in Zebrafish (*Danio rerio*) as an Animal Model

Shahab Tirgar Fakheri¹, Reza Changizi^{1*}, Hamed Manouchehri¹, Ali Tahamtan nezhad Emran¹, Mohadesch Najarzadeh Ahangarkolaei¹, Meysam Rameshgar².

Abstract

Depression is a prevalent mental disorder affecting millions of people worldwide, and its incidence continues to rise, highlighting the need for research using reliable depression models. This study aimed to investigate the effects of diazepam and sertraline on biochemical and molecular parameters in zebrafish (*Danio rerio*) subjected to the Unpredictable Chronic Stress (UCS) protocol. Biochemical analyses were conducted by measuring cortisol levels, and molecular analyses were performed by assessing the expression of pro- and anti-inflammatory cytokine genes. The results demonstrated that diazepam, sertraline, and their combination significantly prevented depression-related effects by reducing the expression of pro-inflammatory cytokine genes (TNF- α , IL-6). Sertraline exhibited the strongest inhibitory effect on cortisol, significantly lowering its levels from approximately 1 ng/g tissue to 0.25 ng/g tissue. These findings confirm previous data indicating that the UCS protocol induces behavioral and neuroendocrine changes in zebrafish, which can be mitigated by diazepam and sertraline administration. Furthermore, this study reinforces the use of zebrafish as a model organism for investigating the behavioral and physiological effects of stress.

Keywords: Depression, Diazepam, Sertraline, Zebrafish, UCS Protocol.

1. Department of Veterinary, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.
2. Department of Biology, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

*Corresponding author: changizi@iaau.ac.ir

DOI: [10.22075/jvlr.2026.37436.1162](https://doi.org/10.22075/jvlr.2026.37436.1162)

Received: 18.04.2025

Revised: 16.05.2026

Accepted: 04.06.2026

How to Cite this Article:

Tirgar fakheri,S , Changizi,R , Manouchehri,H , Tahamtan nezhad emran,A , Najarzadeh Ahangarkolaei,M and Rameshgar,M . (2026). Investigation of the Effects of Diazepam and Sertraline on Gene Expression and Depression Induced by Chronic Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) as Human Model. (e10903). *Journal of Veterinary Laboratory Research*, 18(1), 117-133 doi: [10.22075/jvlr.2026.37436.1162](https://doi.org/10.22075/jvlr.2026.37436.1162)



مقاله پژوهشی

بررسی اثرات داروهای دیازپام و سرتالین بر بیان ژن در افسردگی ناشی از استرس مزمن در ماهی زبرا (*Danio rerio*) به عنوان مدل حیوانی

شهاب تیرگر فخری^۱، رضا چنگیزی^{۱*}، حامد منوچهری^۱، علی تهمتن نژاد عمران^۱، محدثه نجارزاده آهنگر کلایی^۱، میثم رامشگر^۲.

خلاصه

یکی از بیماری‌های ذهنی که امروزه بسیاری از مردم جهان را تحت تأثیر قرار داده است، افسردگی می‌باشد. طبق آمارها، این مشکل هر روز جدی‌تر می‌شود که نیاز روزافزون به تحقیق بر روی مدل‌های افسردگی را نمایان می‌کند. هدف از این تحقیق، بررسی تأثیرات دیازپام و سرتالین بر پارامترهای بیوشیمیایی و مولکولی در ماهی زبرا (*Danio rerio*) با استفاده از پروتکل UCS (Unpredictable Chronic Stress) می‌باشد. آزمایش‌های بیوشیمیایی با اندازه‌گیری کورتیزول و آزمایشات مولکولی با بررسی بیان ژن سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی انجام شد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که دیازپام، سرتالین و ترکیب آن‌ها به شکل معنی‌داری موجب پیشگیری از اثرات افسردگی با کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن سایتوکاین‌های پیش‌التهابی (α -IL-6، TNF-) می‌گردد. همچنین سرتالین بیشترین اثر مهاري را بر میزان کورتیزول داشته و موجب کاهش معنی‌دار سطوح آن (از حدود ۱ نانوگرم کورتیزول بر گرم بافت به ۰.۲۵ نانوگرم بر گرم بافت) می‌گردد. در این پژوهش داده‌های قبلی تأیید شد که نشان می‌دهد پروتکل UCS موجب القای تغییرات رفتاری و نورواندوکراین در ماهی زبرا می‌گردد که با مصرف دیازپام و سرتالین، می‌توان از آن‌ها پیشگیری نمود. همچنین این مطالعه استفاده از ماهی زبرا به عنوان ارگانیسم مدل در مطالعات تأثیرات رفتاری و فیزیولوژیک استرس را تقویت نمود.

واژه‌های کلیدی: افسردگی، دیازپام، سرتالین، ماهی زبرا، پروتکل UCS.

۱. گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

*نویسنده مسئول: changizi@iaau.ac.ir

DOI: [10.22075/jvlr.2026.37436.1162](https://doi.org/10.22075/jvlr.2026.37436.1162)

دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۹

بازنگری: ۱۴۰۵/۰۲/۲۶

پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۱۴

افسردگی یک بیماری ذهنی جدی است. با توجه به آخرین آمارها، بیش از ۳۰۰ میلیون نفر از مردم سراسر جهان تحت تأثیر افسردگی قرار دارند (Depression, 2017). همچنین پاندمی کووید ۱۹ باعث کاهش قابل توجه سلامت روانی مردم در سراسر دنیا شده است (Zhu, et al., 2023). در نتیجه تحقیق بیشتر بر روی داروهای ضدافسردگی و عوارض جانبی آنها، به یک نیاز جدی در پزشکی تبدیل شده است (Rush et al., 2006). از ارگانیک‌های مدل متفاوتی جهت مطالعه آثار استرس بر سیستم‌های زیستی استفاده شده است. چونندگان مدل‌های جانوری پایه برای مطالعه افسردگی بوده‌اند (Overstreet and Wegener, 2013; Porsolt, et al., 1977). برای بررسی افسردگی در چونندگان، از پروتکل‌های متفاوتی استفاده شده است. اما گران قیمت و طولانی مدت بودن و همچنین نیازمندی به ساختارهای فیزیکی بزرگ، از معایب این پروتکل‌ها می‌باشد (Wang et al., 2017). استفاده از مهره‌داران آبی مانند ماهی زبرا برای آزمایش داروهای مؤثر بر سیستم اعصاب مرکزی، مفید بوده و حساسیت بالایی نسبت به گستره وسیعی از داروهای ضدافسردگی دارند (Clark, et al., 2019). ماهی زبرا (Zebrafish) با نام علمی *Danio rerio* به‌عنوان یک ارگانیک مدل جدید مطرح شده است که در آزمایش‌های پیش‌درمانگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Goessling and Sadler, 2015). در این تحقیق جهت ایجاد افسردگی در ماهی زبرا، از پروتکل UCS (Unpredictable Chronic Stress) استفاده شد. این پروتکل موجب القای تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی همانند بیماران افسردگی می‌شود که از ارتباط معنادار این پروتکل با افسردگی حمایت می‌کند. پروتکل UCS در ماهی زبرا نسبت به مدل‌های چونندگان، چندین مزیت دارد. چرخه تولیدمثلی سریع، بدن شفاف طی دوران تکامل اولیه، شباهت ژنتیکی و فیزیولوژیک زیاد به انسان و هزینه‌های نگهداری اندک، از جمله این مزیت‌ها می‌باشد (Horzmann and Freeman, 2018; Manuel et al., 2014).

جهت کنترل و درمان طیف وسیعی از اختلالات روانی، از داروهای ضدافسردگی استفاده می‌شود. این نوع داروها به طور متناوب در آب‌های سطحی مناطق پرجمعیت یافت می‌شود. اثرات این داروها بر آبزیان موجب تغییرات اکولوژیکی

می‌گردد. از سوی دیگر وجود مقادیری از این داروها در محصولات دریایی، ممکن است اثرات مختلفی بر مصرف‌کنندگان آنها بگذارد که باید بدان توجه نمود (Brodin, et al., 2013; Calisto, et al., 2011; Gunnarsson, et al., 2008). مصرف بسیار زیاد این داروها در جوامع انسانی امروز نیز، نشان‌دهنده نیاز به تحقیق بیشتر بر روی آنها برای بررسی اثر سوء احتمالی می‌باشد. در این تحقیق، تأثیرات داروهای آرام‌بخش (دiazepam) و ضدافسردگی (سرتالین) پرمصرف بر پارامترهای بیوشیمیایی و مولکولی در ماهی زبرا با استفاده از پروتکل UCS بررسی شده است.

دiazepam از دسته آرام‌بخش‌های بنزودیازپینی (Benzodiazepine) و از پرمصرف‌ترین داروهای آرام‌بخش و خواب‌آور می‌باشد. این دارو به گیرنده $GABA_A$ (Gamma Amino Butyric acid, GABA) غشای عصبی متصل شده و انتقال $GABA_{Aergic}$ (انتقال به واسطه GABA) را افزایش می‌دهد. خاصیت آرام‌بخشی Diazepam نیز نتیجه همین فرایند است (Eghbali, et al., 1997). در همین زمینه Chen و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی اثرات دُزهای مزمن Diazepam بر روی ماهی زبرا کار کردند و اثرات آن را بر تغییر در میانجی‌های عصبی آنها و همچنین تغییرات رفتاری تأیید نمودند (Chen et al., 2021).

سرتالین از داروهای ضدافسردگی دسته داروهای مهارکننده انتخابی بازجذب سروتونین (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI) است. این دسته از شایع‌ترین داروهای ضدافسردگی می‌باشد. این داروها با مهار بازجذب سروتونین، موجب افزایش غلظت آن شده و این‌گونه اثرات ضدافسردگی خود را اعمال می‌کنند (MacQueen, and Steiner, 2001). در همین راستا Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی اثرات سرتالین بر رفتار ماهی زبرا تحقیق کردند و اثرات دُزهای مختلف این دارو را بر ایجاد رفتارهای متفاوت در ماهی زبرا، نشان دادند (Zhang et al., 2018). همچنین Marcon و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ بر روی اثرات برومازپام و فلوکستین بر تغییرات رفتاری ماهی زبرا تحقیق کردند و تغییرات رفتاری و نورواندوکراین در این موجودات را تأیید نمودند (Marcon et al., 2016).

هدف از استفاده همزمان دیازپام و سرتالین، بررسی اثر ترکیبی داروهای آرامبخش و ضدافسردگی بر محور HPI و پاسخهای رفتاری-زیستی بود. با توجه به اینکه دیازپام به عنوان یک بنزودیازپین اثرات مهاری سریع بر اضطراب دارد و سرتالین به عنوان یک داروی ضدافسردگی سروتونرژیک اثرات طولانی مدت و تنظیم کننده مسیرهای سروتونرژیک دارد، ترکیب آنها می تواند نشان دهد که اثر همزمان داروهای کوتاه مدت و بلندمدت بر پاسخ به استرس مزمن چه تغییری ایجاد می کند.

ارزیابی تأثیرات منفرد و ترکیبی داروهای آرامبخش و ضدافسردگی پرمصرف مانند دیازپام و سرتالین بر پارامترهای بیوشیمیایی (کورتیزول تام بدن) و مولکولی (بیان ژن های TNF- α , IL-6, IL-10, COX-2) در ماهی زبرا تحت پروتکل UCS از دیگر اهداف این پژوهش بوده است.

مواد و روش کار

تیمارهای مورد آزمایش

جدول ۱- شرایط مناسب نگهداری ماهی ها جهت انجام پروتکل UCS، اندازه گیری کورتیزول و بیان ژن

دما	pH	اکسیژن محلول	آمونیاک کل	سختی کل	قلیایی
$26 \pm 1^{\circ} \text{C}$	7 ± 0.3	$7 \pm 0.4 \text{ mg/L}$	کمتر از 0.01 mg/L	5.8 mg/L	22 mg/L کلسیم کربنات

داروها

دیازپام و سرتالین از شرکت های داروسازی ایرانی کاسپین و لقمان تهیه شد. غلظت داروها بر اساس آزمایش های انجام شده در تحقیقات مشابه دیگر (Chen et al., 2021; Faria et al., 2022) تعیین شد و در نهایت غلظت $10 \mu\text{g/L}$ برای دیازپام و $120 \mu\text{g/L}$ برای سرتالین به دست آمد. داروها طی ۲۱ روز به درون آب همزمان با عوامل استرسزا، آزاد شدند. هدف از این کار، ارزیابی نمودن تأثیرات این داروها در پیشگیری از اثرات القایی ناشی از پروتکل UCS بود.

القای افسردگی در ماهی زبرا مدل بر اساس پروتکل UCS (Unpredictable Chronic Stress)

در این پژوهش از پروتکل UCS جهت القای افسردگی در

در این تحقیق از ۳۸۴ ماهی زبرا بالغ ۶ ماهه از سویه باله کوتاه (Short-fin) و مخلوط نر و ماده استفاده شد. این ماهی ها در ۲۴ آکواریوم ۱۰ لیتری (۱۶ ماهی در لیتر، ۱۶ ماهی در هر آکواریوم) نگهداری شدند که با آب تصفیه شده کلرزدایی شده (Dechlorination) پر شده بود. ماهی ها چرخه روشنایی تاریکی ۱۴ به ۱۰ ساعت داشتند (روشن شدن چراغ ها ساعت ۷ صبح) و حداقل ۱ هفته قبل از آزمایش در این شرایط نگهداری شدند.

قسمتی از آب تانک دو بار در هفته تعویض شده و ماهی ها تحت شرایط مناسب نگهداری می شدند. ماهی ها ۲ بار در روز با تکه های کوچک غذای ماهی تجاری، غذادهی شدند. شرایط مناسب نگهداری ماهی ها بر اساس تحقیقات پیشین فراهم شد (Levin, et al., 2007; Marcon et al., 2016; Piato et al., 2011) که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

ماهی های زبرا، استفاده شد. طراحی کلی این آزمایش و استفاده از این پروتکل، بر اساس روش مورد استفاده در تحقیقات مشابه پیشین (Marcon et al., 2016; Piato et al., 2011) بود. در پروتکل UCS با استفاده از القای مداوم عوامل استرسزای متفاوت، در نهایت افسردگی به ماهی های زبرا، القا گردید. مطابق جدول ۲ در این پروتکل، ماهی های زبرا ابتدا به دو گروه کلی کنترل (بدون عوامل استرسزا) و UCS (با عوامل استرسزا) تقسیم شدند. درون هر گروه نیز ماهی ها به گروه های کنترل، دیازپام (۱۲۰ میکروگرم بر لیتر)، سرتالین (۱۰ میکروگرم بر لیتر) و دیازپام (۱۲۰ میکروگرم بر لیتر) + سرتالین (۱۰ میکروگرم بر لیتر) تقسیم شدند. هر یک از این گروه های آزمایشی شامل ۳ تکرار مستقل (آکواریوم) بود.

جدول ۲- نمای کلی از تیمارهای مورد آزمایش. ماهی ها به دو گروه کنترل (بدون عوامل استرسزا) و UCS (دارای عوامل استرسزا) تقسیم شدند.

گروه ۳ با استرس	گروه ۳ بدون استرس	گروه ۲ با استرس	گروه ۲ بدون استرس	گروه ۱ با استرس	گروه ۱ بدون استرس	کنترل با استرس	کنترل بدون استرس	
۱۲۰	۱۲۰	۰	۰	۱۲۰	۱۲۰	۰	۰	دیازپام (µg/L)
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	سرتالین (µg/L)

سالیین فسفات (PBS, pH = 7.4) برای ۶ دقیقه قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه هموژنایزر، به خوبی هموژن و یکنواخت شد (Zimmermann et al., 2016). سپس دی اتیل اتر اضافه نموده و نمونه ها برای ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از آن فوراً در نیتروژن مایع فریز شدند. قسمتی که پس از فروبردن در نیتروژن مایع یخ زده (دی اتیل اتر حاوی کورتیزول)، به آهستگی درون دکانتور خالی شد. دی اتیل اتر حاوی کورتیزول به درون یک لوله جدید منتقل شد و به طور کامل تحت یک جریان بخار نیتروژن ملایم برای ۲ ساعت، تبخیر گردید. آنچه باقی ماند، یک عصاره لیپیدی حاوی کورتیزول بود. این عصاره در دمای 20°C ذخیره شد تا هنگامی که تست الایزا روی سوسپانسیون نمونه ها با ۱ ml بافر PBS عمل آوری شد (Piato et al., 2011).

استخراج RNA و تکنیک REAL TIME

برای بررسی بیان ژن، از هر آکواریوم ۳ ماهی ($n = 9$) در هر گروه) گرفته شد. در این تحقیق جهت ارزیابی میزان بیان ژن های COX-2، $\alpha\text{-TNF}$ ، IL-6 و IL-10 از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از اعمال آخرین عامل استرس زاء، تیمارهای مورد آزمایش با ملایمت گرفته شده و با استفاده از ازت مایع، کشته شدند. سپس مغز آن ها زیر لوپ مطابق با روش Marcon و همکاران (Marcon et al., 2016) بیرون آورده شد. مغزها درون تیوب هایی قرار گرفته و درون تانک ازت مایع به آزمایشگاه آزما اکسیر پژوه واقع در تهران منتقل گردید. آزما اکسیر پژوه از آزمایشگاه های معتبر و همکار وزارت بهداشت بوده و تحت نظارت مستقیم دانشگاه شهید بهشتی اداره می شود. از بسته های حاوی سه مغز ماهی له شده جهت انجام هر آزمایش مستقل استفاده شد. پروتکل استفاده شده توسط این آزمایشگاه بر اساس تحقیقات پیشین انجام شد (Bustin et

عوامل استرس زای القا شده شامل موارد زیر بود:
 - گرم کردن آب تانک تا 33°C به مدت ۳۰ دقیقه
 - سرد کردن آب تانک تا 23°C به مدت ۳۰ دقیقه
 - انتقال ۱۰ ماهی در یک ظرف با حجم ۲۵۰ ml به مدت ۵۰ دقیقه
 - کاهش سطح آب آکواریوم به مدت ۲ دقیقه به طوری که سطح پشتی بدن ماهی نمایان شود.
 - تعویض تانک ۳ بار متوالی با فاصله ۳۰ دقیقه
 - تعقیب نمودن ماهی با توری به مدت ۸ دقیقه
 مطابق با شکل ۱ و بر اساس پروتکل UCS، عوامل استرس زاء به صورت تصادفی ۲ بار در روز و طی ۲۱ روز (روز ۱ تا روز ۲۱) به منظور جلوگیری از خوگیری و عادت نمودن ماهی ها اعمال شد. کل دوره تحقیق ۲۱ روز بوده است. همه این عوامل استرس زاء به صورت تصادفی از ساعت ۸ صبح تا ۱۸ عصر اعمال شدند.

اندازه گیری کورتیزول

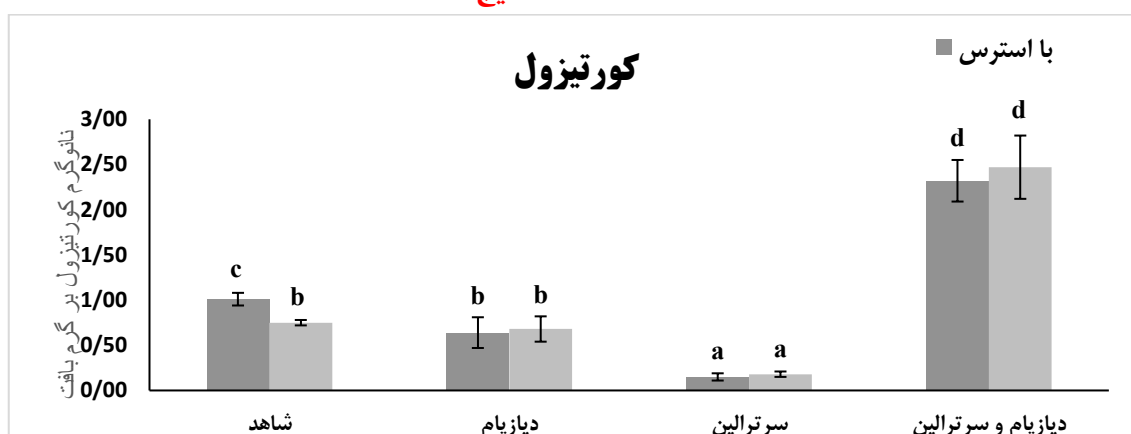
برای سنجش کورتیزول، از هر آکواریوم ۴ ماهی ($n = 12$) در هر گروه) گرفته شد. عصاره گیری و اندازه گیری کورتیزول تام بدن، بر اساس تحقیقات قبلی و با استفاده از یک کیت الایزا (EIA gen CORTISOL test, Biochem Immuno Systems صورت گرفت (Piato et al., 2016; Zimmermann et al., 2011). به طور خلاصه، ۲۴ ساعت پس از اعمال آخرین عامل استرس زاء، ماهی ها با ملایمت گرفته شده و فوراً در نیتروژن مایع فریز شدند. به دنبال آن در دمای 20°C نگهداری شدند تا از آن ها عصاره کورتیزول گرفته شود. برای جلوگیری از پاسخ استرس احتمالی ناشی از دستکاری و گرفتن ماهی ها، مدت زمان بین گرفتن ماهی تا کشتن آن، کمتر از ۱۰ ثانیه بود (Marcon et al., 2016). هر ماهی زبراً وزن شد و هر مخزن حاوی ۲ ماهی خرد شده بود و درون کیسه استامکر با ۲ ml بافر

(al., 2013). در این پژوهش از ژن‌های β -actin و $\text{efl-}\alpha$ به عنوان ژن مرجع یا Housekeeping استفاده شد. پرایمرها نیز بر اساس تحقیقات پیشین (Faikoh, et al., 2014; Leite et al., 2013; Tang, et al., 2007; Varela, et al., 2012) تعیین گردید. برای انجام اندازه‌گیری کورتیزول و بررسی بیان ژن، از گروه‌های جداگانه ماهی‌ها استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس تکراری دوطرفه (ANOVA) و پس‌آزمون تاکی (Tukey's post hoc) استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم شدند. تمامی نتایج با میانگین $\pm$ انحراف استاندارد از میانگین توصیف شدند. همچنین در همه محاسبات سطح معنی‌داری اختلاف $p < 0.05$ محسوب شد.

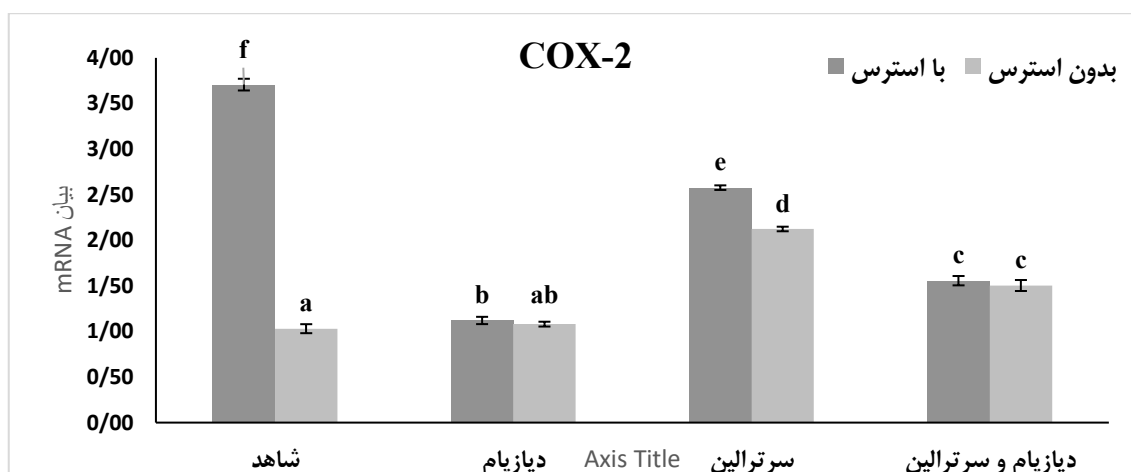
نتایج



نمودار ۱- نتایج اندازه‌گیری سطوح کورتیزول. اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. حد معنی‌داری اختلاف، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف می‌باشد.

نسبت به تیمارهای دریافت‌کننده تک دارو و شاهد دارند ($P < 0.05$). اختلاف معنی‌داری بین سطوح کورتیزول تیمارهای با استرس و بدون استرس تیمارهای تک دارو مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بر اساس داده‌های نمودار ۱، پروتکل UCS در تیمار شاهد با استرس نسبت به شاهد بدون استرس، موجب افزایش معنی‌دار سطوح کورتیزول شده است. تیمار ترکیبی دیازپام و سرتالین، به شکل معنی‌داری سطوح کورتیزول بیشتری

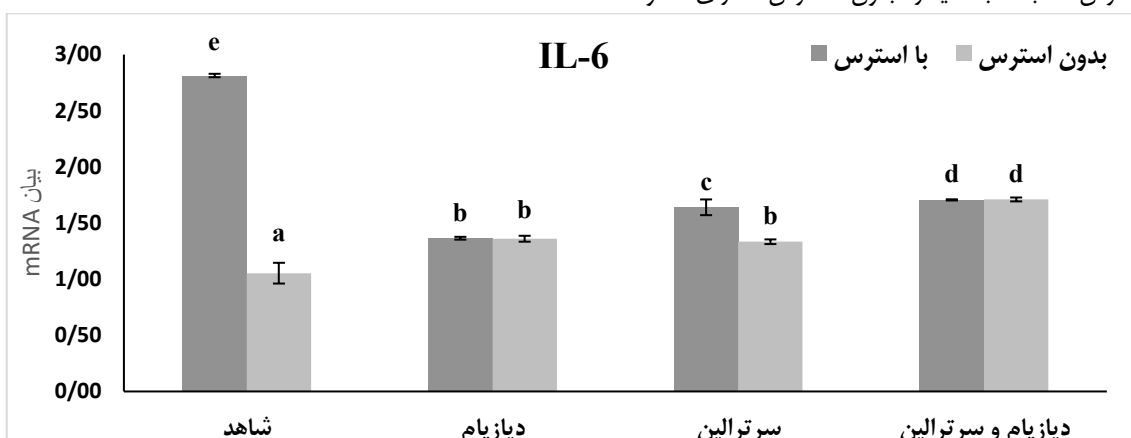


نمودار ۲- نتایج آنالیز بیان ژن COX-2. اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. حد معنی داری اختلاف، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف می باشد.

معنی داری نمی باشد ($P < 0.05$). در نهایت در میزان بیان ژن شاهد با استرس نسبت به سایر تیمارها، تفاوت معنی داری مشاهده می گردد ($P < 0.05$). بیشترین اثر مهاري بر بیان ژن COX-2 در بین این تیمارها، مربوط به ديازپام با و بدون استرس است که با شاهد بدون استرس اختلاف معنی داری ندارد ($P > 0.05$).

مطابق نمودار ۲، در آنالیز بیان ژن COX-2 در میزان بیان ژن تیمار ديازپام با و بدون استرس، اختلاف معنی داری مشاهده نمی شود. این در حالی است که در تیمار با و بدون استرس سرتالین اختلاف معنی داری مشاهده می شود ($P < 0.05$).

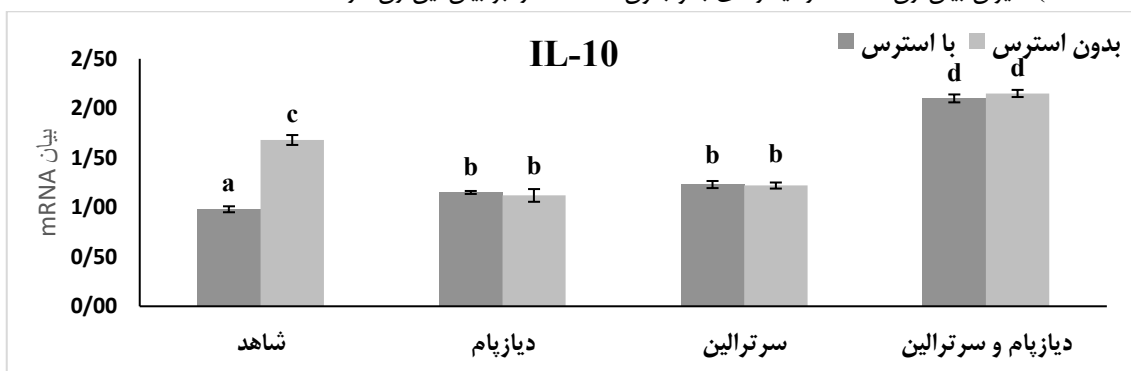
در تیمار ترکیبی ديازپام و سرتالین، میزان بیان ژن تیمار با استرس نسبت به تیمار بدون استرس، دارای تفاوت



نمودار ۳- نتایج آنالیز بیان ژن IL-6. اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. حد معنی داری اختلاف، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف می باشد.

استرس ديازپام و سرتالین، تفاوت معنی داری با هم ندارد ($P > 0.05$). در میان تمامی تیمارها، ديازپام با و بدون استرس، بیشترین اثر مهاري را بر بیان ژن IL-6 داشته است. همچنین تیمار ترکیبی ديازپام و سرتالین، کمترین اثر مهاري را بر بیان این ژن دارد.

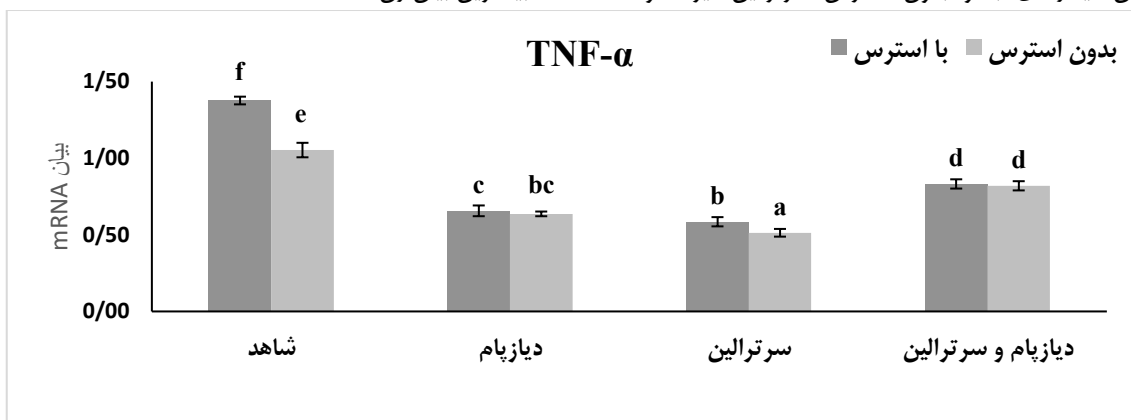
مطابق نمودار ۳ در آنالیز بیان ژن IL-6 در میزان بیان ژن تیمار ديازپام با و بدون استرس، اختلاف معنی داری مشاهده نمی شود ($P < 0.05$). در تیمار سرتالین با و بدون استرس، تفاوت معنی داری در میزان بیان این ژن مشاهده می گردد ($P < 0.05$). میزان بیان ژن IL-6 در تیمارهای با و بدون



نمودار ۴- نتایج آنالیز بیان ژن IL-10. اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. حد معنی داری اختلاف، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف می باشد.

مطابق نمودار ۴ در آنالیز بیان ژن IL-10، میان تیمار شاهد با استرس نسبت به تیمار شاهد بدون استرس، اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌گردد ($P < 0.05$). در تیمارهای با و بدون استرس دیازپام، تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌گردد. بین تیمارهای با و بدون استرس سرتالین نیز تفاوت

معنی‌داری مشاهده نمی‌گردد. در تیمار ترکیبی دیازپام و سرتالین با استرس و بدون استرس و بدون استرس نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ($P > 0.05$). در میان تیمارهای دارای اثر استرس و کاربرد داروها، در تیمار ترکیبی دیازپام و سرتالین، بیشترین بیان ژن IL-10 مشاهده شد.



نمودار ۵- نتایج آنالیز بیان ژن TNF-α. اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. حد معنی‌داری اختلاف، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف می‌باشد.

مطابق نمودار ۵ در آنالیز بیان ژن TNF-α تفاوت معنی‌داری در تیمار با و بدون استرس دیازپام مشاهده نمی‌شود ($P > 0.05$). همچنین بین تیمارهای ترکیبی با و بدون استرس دیازپام و سرتالین نیز اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$). در بیان این ژن بین تیمار با و بدون استرس دارای اثر سرتالین، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$). به طور کلی در میان این تیمارها، در تیمارهای با و بدون استرس دارای اثر سرتالین، بیشترین اثر مهارى در بیان ژن TNF-α مشاهده شد.

بحث

رابطه سطوح کورتیزول با مصرف دیازپام و سرتالین

در ماهی زبرا، استرس باعث افزایش فعالیت محور HPI (هیپوتالاموس-هیپوفیز-اندام درون کلیوی) شده و در طولانی‌مدت (حداقل ۱ هفته) منجر به القای افسردگی می‌گردد (Zimmermann et al., 2016). تغییرات سطوح کورتیزول وابستگی شدیدی با رفتار استرسی در مدل‌های ماهی زبرا دارد (Egan et al., 2009). همچنین، به‌کارگیری پروتکل استرس UCS به‌طور معناداری باعث افزایش ترشح کورتیزول سیستمیک می‌شود (Piato et al., 2011). مطابق با نمودار ۱ در نتایج تحقیق حاضر، سطح کورتیزول تیمارهای شاهد با استرس به شکل معنی‌داری

بیشتر از شاهد بدون استرس بود ($P < 0.05$). این امر نشان‌دهنده درستی انجام پروتکل UCS بوده و با آزمایشات پیشین، همخوانی دارد (Marcon et al., 2016; Zimmermann et al., 2016). تحقیق حاضر، میزان کورتیزول تیمارهای با و بدون استرس دیازپام، سرتالین و ترکیب دیازپام و سرتالین از شاهد با استرس به شکل معنی‌داری کمتر است ($P < 0.05$). این امر نشان‌دهنده تأثیر مثبت این داروها در کاهش سطوح استرس پایه در ماهی زبرا می‌باشد. درعین حال میزان کورتیزول تیمارهای با استرس به همراه داروها، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند ($P < 0.05$). بیشترین کاهش کورتیزول مربوط به تیمارهای با و بدون استرس سرتالین می‌باشد که نشان‌دهنده اثرگذاری مطلوب این دارو در کاهش سطوح کورتیزول و متعاقب آن استرس می‌باشد.

با وجود اثرات مثبت دیازپام و سرتالین در کاهش سطوح کورتیزول، تیمارهای با و بدون استرس ترکیبی دیازپام و سرتالین دارای بیشترین میزان کورتیزول می‌باشد که نسبت به سایر تیمارها به شکل معنی‌داری بیشتر است. این افزایش غیرمنتظره ممکن است ناشی از موارد متفاوتی باشد. بنزودیازپین‌ها (مثل دیازپام) و داروهای بازجذب‌کننده انتخابی سروتونین (مثل سرتالین) ممکن است مسیرهای

پیش‌التهابی (Proinflammatory Cytokines) از اجزای این دستگاه شده و در نهایت موجب ایجاد انواع تغییرات رفتاری، نورواندوکراین و نوروشیمیایی مربوط به افسردگی می‌گردد (Maes, 1999; Nobis, et al., 2020). از همین رو اندازه‌گیری میزان بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی نیز می‌تواند معیار مناسبی جهت ارزیابی اثرات افسردگی باشد. در همین زمینه Dantzer و کلی در سال ۲۰۰۷ بر روی تأثیرات رفتاری القاشده توسط سایتوکاین‌ها تحقیق نمودند. آن‌ها اثرات القایی سایتوکاین‌ها را در بروز تغییرات رفتاری ناشی از افسردگی، بسیار مهم توصیف کردند (Dantzer and Kelley, 2007). طبق این فرضیه فعال شدن دستگاه ایمنی محیطی (Peripheral Immune System) موجب ترشح سایتوکاین‌هایی از اجزای این سیستم می‌شود که در تغییرات نورواندوکراین و نوروشیمیایی مرتبط با افسردگی، نقش دارد (Schiepers, et al., 2005). سایتوکاین‌ها و گیرنده‌های آن‌ها نقش مکمل را در فرآیندهای تغییرات رفتاری و علائم عصبی دارند (Mihailova et al., 2016). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، نقش رهاکننده و ماشه‌مانند (Trigger) را در پاتوژن افسردگی دارند (Maes, et al., 1993; Maes et al., 1995). واسطه بین اثر ماشه‌مانند سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و افزایش فعالیت محور HPI که موجب بروز اثرات افسردگی می‌گردد، سیستم‌های نورواندوکراین و نوروترانسمیتر می‌باشد (Maes, 1999). اثر القایی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، موجب افزایش فعالیت محور HPI می‌گردد. نتیجه این افزایش فعالیت، افزایش غلظت کورتیکوستروئیدها به‌خصوص کورتیزول است. این فیدبک منفی که به شکل طبیعی و ذاتی همراه محور HPI است، موجب کاهش تحریک‌پذیری این محور شده و باعث می‌شود میزان کورتیکوستروئیدها از حدی بالاتر نرود (Sapolsky, et al., 1984).

TNF- α یک سایتوکاین پیش‌التهابی است. این سایتوکاین موجب تحریک بیان ژن و ترشح هورمون CRH از هسته‌های پاراونتریکولار (Paraventricular Nucleus, PVN) هیپوتالاموس می‌گردد (Hayley, et al., 2005). هسته‌های پاراونتریکولار هیپوتالاموس، مرکز کنترل محور HPI می‌باشد و موجب انتقال، تغییر و تبدیل سروتونین و نوراپی‌نفرین در هیپوتالاموس، آمیگدال، هیپوکامپ و

مونوآمینرژیک را به شکل غیرخطی تحت تأثیر قرار دهند (Herculano and Maximino, 2014). ترکیب این دو دارو می‌تواند باعث تداخل در بازخورد محور HPI شود و در نتیجه سطح کورتیزول را افزایش دهد، حتی اگر هر دارو به‌تنهایی کاهش‌دهنده استرس باشد (Pavlidis, et al., 2015). همچنین مصرف طولانی‌مدت داروهای سروتونرژیک و بنزودیازپین ممکن است باعث حساسیت‌زدایی گیرنده‌های GABA و 5-HT شود. این اتفاق می‌تواند منجر به کاهش اثر مهارى محور HPI و افزایش کورتیزول شود (Tovote, et al., 2015). علاوه بر این، ترکیب دو دارو ممکن است محور HPI را تحریک کرده و پاسخ جبرانی ایجاد کند. این می‌تواند باعث افزایش موقت کورتیزول نسبت به گروه‌های تک دارو شود، بدون اینکه از گروه کنترل پراسترس بالاتر رود (Piato et al., 2011).

مطابق با نتایج به دست آمده از این تحقیق، نشان داده شد که دیازپام و سرتالین موجب پیشگیری از افزایش سطوح کورتیزول بر اثر پروتکل UCS می‌شود. این امر با تحقیقات پیشین که در آن‌ها اثرات آرامبخش‌های بنزودیازپینی و داروهای ضدافسردگی بر پارامترهای نورواندوکراین در جوندگان (Zhao et al., 2012) و انسان‌ها (Pomara et al., 2005) بررسی شد، مطابقت دارد.

شواهد اساسی و محکمی وجود دارد که نقش سیستم ایمنی را در پاتوژن افسردگی نشان می‌دهد. این شواهد از رابطه بین استرس و التهاب عصبی (Neuroinflammation) حکایت دارد که هم در مطالعات بالینی (Clinical) و هم در مطالعات پیش‌بالینی (Preclinical) ثابت شده است (Leonard and Maes, 2012; Maes, et al., 2011). این شواهد ما را به سمت فرضیه سایتوکاینی افسردگی سوق می‌دهد. فرضیه التهابی یا سایتوکاینی بیان می‌دارد که فعالیت طولانی مدت (Hyperactivity) سیستم پاسخ التهابی (System Response, IRS, Inflammatory) در پاسخ به شرایط استرس‌زا، به ایجاد افسردگی می‌انجامد. بر اساس این فرضیه، افزایش فعالیت محور HPI (Hypothalamus-Pituitary-Intra-renal) موجب افزایش فعالیت دستگاه ایمنی محیطی (System Immune Peripheral) می‌گردد (Alsop and Vijayan, 2009). از طرفی افزایش فعالیت دستگاه ایمنی محیطی موجب افزایش ترشح سایتوکاین‌های

کورتکس پری فرونتال می گردد (Ando and Dunn, 2000; Brebner, et al., 1999). پروتکل UCS باعث افزایش بیان ژن کدکننده این سایتوکاین می گردد (Dantzer, 2006; Dantzer and Kelley, 2007). مطابق با نمودار ۵، میزان بیان ژن $TNF-\alpha$ در تیمار شاهد با استرس بیشتر از شاهد بدون استرس بود که نشان دهنده درستی عملکرد پروتکل UCS بوده و با تحقیقات قبلی یاد شده، مطابقت دارد. همچنین مطابق با نمودار ۸ در تحقیق حاضر، میزان بیان ژن $TNF-\alpha$ در تیمارهای با و بدون استرس دیازپام، سرتالین و ترکیب دیازپام و سرتالین، علاوه بر شاهد با استرس از شاهد بدون استرس نیز به شکل معنی داری کمتر بوده است ($P < 0.05$) که نشان از اثربخشی مطلوب این داروها در ممانعت از بیان ژن این سایتوکاین پیش التهابی و جلوگیری از التهاب دارد. همان طوری که در نمودار ۵ مشاهده می شود، در میان تمامی تیمارها، تیمارهای با و بدون استرس سرتالین، بیشترین اثر مهاري را بر بیان ژن های کدکننده $TNF-\alpha$ داشته است. یعنی سرتالین در طی دوره ۳ هفته ای آزمایش، بیشترین اثربخشی را داشته است. نظر به اینکه در تحقیقات گذشته با استفاده از پروتکل UCS طی مدت زمان کمتر از ۳ هفته (Marcon et al., 2011; Piato et al., 2016)، الگوی متفاوتی به دست آمده است، انتظار می رود که تداوم دوره آزمایش منجر به بروز تغییرات بیشتری در این روند شود.

IL-6 نیز همانند $TNF-\alpha$ یک سایتوکاین پیش التهابی است. بیان این ژن در تیمار شاهد با استرس به شکل معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بدون استرس است ($P < 0.05$). این امر نشان دهنده اثرات تحریکی پروتکل UCS بر بیان ژن های پیش التهابی است و با تحقیقات پیشین همخوانی دارد (Zhao et al., 2012; Mocelin et al., 2019). مطابق با نمودار ۳ در میان همه تیمارهایی که دارو دریافت نموده اند، تیمارهای با و بدون استرس سرتالین به شکل معنی داری دارای بیشترین اثر مهاري روی بیان این ژن بوده است ($P < 0.05$). این امر نشان می دهد در دوره ۳ هفته ای پروتکل UCS، دیازپام دارای مطلوب ترین اثر در کاهش بیان ژن IL-6 می باشد.

IL-10 یک سایتوکاین ضد التهابی است و دارای نقش تعدیل کننده و کاهشی در سطوح پایه استرس می باشد. بر اساس تحقیقات پیشین (Dowlati et al., 2010; Mesquita et al., 2008)، IL-10 موجب کاهش رفتار

استرسی و افسردگی می گردد. در این آزمایش میزان بیان ژن IL-10 در تیمارهای شاهد با استرس به شکل معنی داری کمتر از تیمار شاهد بدون استرس بود ($P < 0.05$). این امر نشان دهنده تأثیر پروتکل UCS در مهار بیان ژن IL-10 می باشد که مطابق با یافته های قبلی است (Marcon et al., 2016). از آن جایی که IL-10 یک سایتوکاین ضد التهابی است و داروهای مورد استفاده در تحقیق حاضر نیز دارای اثرات ضد التهابی و مهار کننده استرس می باشند، انتظار می رود که داروها موجب افزایش بیان ژن IL-10 گردند.

مطابق با نمودار ۴ در میان تیمارها، دیازپام و سرتالین به تنهایی موجب تغییر معنی داری در میزان بیان ژن IL-10 نسبت به تیمار شاهد با استرس شده اند ($P < 0.05$). اما در تیمار ترکیبی دیازپام و سرتالین، بیان ژن IL-10 به شکل معنی داری بیشترین افزایش را نشان می دهد ($P < 0.05$) که می تواند نشان دهنده اثرات سینرژیستی مطلوب این داروها در مهار التهاب باشد. در تحقیقات مائز، مصرف داروهای آرام بخش و ضد افسردگی موجب کاهش میزان بیان ژن IL-10 شده است (Maes, 1999). در پژوهش های Fornaro و همکاران تفاوت معنی داری میان میزان بیان ژن تیمارهایی که این داروها را مصرف کرده بودند، مشاهده نشد (Fornaro, et al., 2013). در پژوهش های Carboni و همکاران نیز مصرف این داروها موجب افزایش بیان ژن IL-10 گردید (Carboni et al., 2019). هر چند علت دقیق این تفاوت چشمگیر همچنان به طور کامل مشخص نشده است، اما محققان دلایلی را برای آن ذکر کرده اند. مائز و همکاران عقیده دارند علت کاهش بیان ژن IL-10، فعال شدن سیستم Compensatory Inflammatory (CIRS) در برخی موارد است. فرضیه ای مطرح شده است که بیان می دارد سیستم CIRS دارای نقشی ضد تنظیمی (Counter-regulatory) روی سایتوکاین ها است و اثر آن ممکن است در برخی موارد موجب کاهش بیان ژن IL-10 گردد (Maes et al., 2012). Benarroch و همچنین Brynsklick و همکاران، این مورد را با فرضیه نوروتروفیک افسردگی توجیه می کنند. این محققان طی تحقیقات خود نتیجه گرفتند که کاهش میزان بیان ژن IL-10 در برخی موارد، جهت ایجاد تعادل میان سایتوکاین های پیش التهابی و ضد التهابی و نگاه داشتن آن ها در سطوح فیزیولوژیک است تا انعطاف پذیری نورونی (Neuronal Plasticity) در سطح مطلوبی بماند و

ژن‌های کدکننده سایتوکاین‌ها تأثیر دارد. زیرا محصول اصلی آنزیم COX-2، پروستاگلندین E2 (PGE2) است. PGE2 موجب تحریک تولید IL-6 می‌گردد (Hinson, et al., 1996; Müller, et al., 2009). غلظت PGE2 در بیماران مبتلا به افسردگی، بالا است و بر اثر مصرف داروهای ضدافسردگی، پایین می‌آید (Calabrese et al., 1986). اهمیت این آنزیم در افسردگی در جایی عیان شد که تأثیرات درمانی مهارکننده‌های COX-2 در درمان افسردگی تیمارهای مدل مبتلا به افسردگی، مشاهده گردید. همچنین در تیمارهای آزمایشی مدل افسردگی، افزایش بیان ژن COX-2 در سلول‌های ناحیه هیپوکامپ نیز مشاهده شد (Cassano et al., 2006). از همین رو محققان در حال مطالعه بر روی داروهای ضدالتهاب که فعالیت آنزیم COX-2 را مهار می‌نماید، می‌باشند تا بتوانند از آن به‌عنوان یک درمان احتمالی افسردگی استفاده کنند. اما نتایجی که تاکنون به دست آمده است، بسیار متفاوت می‌باشد (Eyre, et al., 2015). در این آزمایش میزان بیان ژن COX-2 در تیمار شاهد با استرس نسبت به شاهد بدون استرس به شکل معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). این امر نشان‌دهنده اثربخشی پروتکل UCS و مطابق با یافته‌های پیشین است. در میان سایر تیمارها، در تیمارهای با و بدون استرس دیازپام، میزان بیان ژن COX-2 کمتر است. این امر نشان از این دارد که در دوره ۳ هفته‌ای که پروتکل UCS اجرا گردید، دیازپام دارای اثرات مهاری بیشتری بر میزان بیان ژن می‌باشد. در تحقیقات Hannestad و همکاران و Keller و همکاران مشاهده شد که داروهای ضدافسردگی می‌توانند موجب کاهش سطوح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی در موش‌ها و انسان‌های تحت اثر استرس مزمن شوند (Hannestaet, al., 2011; Keller et al., 2017). در این پژوهش، ویژگی‌های مولکولی پروتکل UCS با اندازه‌گیری بیان ژن‌های COX-2 و IL-6، گسترش یافت. همچنین اثرات داروهای مؤثر بر مغز و اعصاب در تقابل با استرس مزمن در ماهی زبرا نشان داده شد که همسو با نتایج به دست آمده در مدل‌های جوندگان توسط Willner و همکاران و Muscat, et al., 1992; (Willner, et al., 1992). از آن جایی‌که نتایج حاصل از اجرای پروتکل UCS طی ۷ و ۱۴ روز مشابه بود (Marcon et al., 2016; Piato et al., 2011)، تصمیم گرفته شد تا در این تحقیق اثرات این

ارتباطات ساختاری مغز در واکنش به استرس، آسیمی نبیند (Benarroch, 2013; Brynskikh, et al., 2008). Martinowich و Lu طی تحقیقات خود نتیجه گرفتند که میزان بیان ژن IL-10 بسته به زمان می‌تواند متفاوت باشد. علاوه بر این، مارتینوویچ و لو و همچنین جوادیان طی تحقیقات خود استدلال نمودند که تأثیرات داروهای مهارکننده بازجذب سروتونین مانند سرتالین، موجب ایجاد تغییراتی در انعطاف‌پذیری سیناپسی (Synaptic Plasticity) می‌شود. این تغییرات به تدریج و در طول مدت‌زمان زیادی اتفاق می‌افتد و پس از آن اثرات بیان ژن بروز می‌نماید (Djavadian, 2004; Martinowich, 2008). Więdołcha و همکاران طی تحقیقات خود این‌گونه استنتاج نمودند که کاهش بیان ژن IL-10 خود جزئی از مکانیسم‌های پیچیده دیگری است که نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد (Więdołcha et al., 2018). با وجود تمامی پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه سایتوکاین‌ها و رابطه آن‌ها با افسردگی، همچنان کاملاً مشخص نشده است که افسردگی نتیجه پاسخ مغز به استرس مزمن یا حاد است و یا این که تغییر خاص در سایتوکاین‌ها موجب ایجاد افسردگی می‌گردد (Wang et al., 2020). از همین رو ظرفیت پژوهشی بسیار زیادی در این زمینه وجود دارد. COX-2 یکی از دو ایزوفرم آنزیم سیکلواکسیژناز (Cyclooxygenase, COX) است که موجب تولید پروستاگلندین‌ها (Prostaglandins) از آراشیدونیک اسید (Arachidonic acid) می‌گردد. سطوح آنزیم COX-2 در بیماری‌های التهابی مزمن افزایش می‌یابد. در پژوهش‌های Valko و همکاران نشان داده است که COX-2 ممکن است نقشی کلیدی در پاتوفیزیولوژی افسردگی داشته باشد (Valko et al., 2007). همچنین در تحقیقات Minghetti مشخص شده است که آنزیم COX-2 ممکن است نقشی کلیدی را در فرآیندهای نورودژنراتیو (Neurodegenerative) فیزیولوژی مغز بازی کند (Minghetti, 2004). بیان ژن کدکننده COX-2 نه تنها در سلول‌های التهابی، بلکه در سلول‌های دستگاه عصبی مرکزی (CNS) نیز مشاهده شده است (Müller, et al., 2011). تولید آنزیم COX-2 توسط سایتوکاین‌ها القا می‌شود (Maes et al., 2011)، اما خود این آنزیم نیز بر روی بیان

پروتکل در مدت طولانی‌تر و طی ۲۱ روز بررسی گردد. زیرا داروهای ضدافسردگی برای شروع اثرات مثبت خود، نیازمند یک دوره حداقل ۲ هفته‌ای هستند (Lam, 2012). یکی از اهداف تحقیقات دیگری که در آن‌ها پروتکل UCS طی ۷ و ۱۴ روز انجام شد، تعیین حداقل طول دوره تیمار هر دارو جهت بازگرداندن تأثیرات استرس بود. اما در این پژوهش چنین هدفی وجود نداشت. همچنین یکی دیگر از محدودیت‌های پروتکل UCS در ۷ و ۱۴ روز، نزدیکی و پیوستگی زیاد اثرات اضطراب و افسردگی است. در این تحقیق با افزایش این مدت، اثرات افسردگی به طور کامل در ماهی‌های زیر نمایان شد.

Piato و همکاران و Marcon و همکاران که تحقیقات مشابهی انجام دادند، توصیه نمودند که به منظور بررسی بهتر و نمایان شدن تمام ابعاد عملکرد پروتکل UCS، مدت‌زمان این پروتکل افزایش یابد. این محققین از دوره‌های ۷ و ۱۴ روزه برای انجام این پروتکل استفاده کردند. در تحقیق حاضر از دوره ۲۱ روزه استفاده شد و تغییراتی نسبت به تحقیقات قبلی شناسایی گردید. مقایسه نتایج نشان می‌دهد که در دوره‌های کوتاه‌تر، تغییرات کورتیزول و بیان IL-10 کمتر و کوتاه‌مدت بوده است، درحالی‌که در دوره ۲۱ روزه، تغییر طولانی‌مدت سطوح کورتیزول و تغییرات پایدار در الگوی بیان ژن‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی یاد شده مشاهده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که طول دوره تیمار و استرس می‌تواند شدت و مدت پاسخ‌های بیولوژیک را افزایش دهد و اثرات دارویی نیز ممکن است با طول دوره تغییر کند. بنابراین، مطالعات آینده باید تأثیر طول دوره‌های مختلف را به طور مستقیم بررسی کنند تا مکانیسم‌های سازگاری طولانی‌مدت محور HPI و پاسخ ایمنی روشن شود.

از همین رو پیشنهاد می‌شود جهت گسترش اطلاعات درباره تغییرات بیوشیمیایی، مولکولی و ژنی ناشی از پروتکل UCS، آن را در دوره‌های طولانی‌تر مثلاً ۴ هفته و ۸ هفته انجام شود. نشانگرهای زیستی متفاوتی جهت بررسی اثرات افسردگی وجود دارد. در این تحقیق از متداول‌ترین آن‌ها که در تحقیقات مشابه پیشین به کار رفته است، استفاده شد. جهت نمایان شدن ابعاد مختلف پاتوفیزیولوژی پیچیده افسردگی، پیشنهاد می‌شود نشانگرهای زیستی دیگری که اطلاعات کمتری از آن‌ها در دست است مانند IL-4 و IL-12، اندازه‌گیری شود. در این آزمایش فاکتور اشتها بررسی نگردید. با توجه به این که تغییرات اشتها مانند کم‌اشتهایی از

علائم متداول افسردگی به شمار می‌رود، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده اثرات داروها بر فاکتور اشتها نیز بررسی گردد. یکی از محدودیت‌های این مطالعه، استفاده از ماهی‌های زبرا با جنسیت مخلوط بود. پاسخ به استرس و داروها ممکن است وابسته به جنسیت باشد (Segner, 2009). لذا ممکن است نتایج به دست آمده تحت تأثیر جنسیت نیز قرار گرفته باشد. از همین رو توصیه می‌شود در تحقیقات آینده اثرات جنسیت نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

ماهی زبرا یک ارگانیزم مدل بسیار مناسب برای مطالعه تأثیرات استرس بر روی پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک است و ظرفیت فوق‌العاده زیادی برای انجام پژوهش‌های دیگر دارد. می‌توان از پروتکل UCS به عنوان یک ابزار آزمایش جهت ارزیابی داروهای جدید مؤثر بر استرس، افسردگی و به طور کلی داروهای مؤثر بر اعصاب استفاده نمود. تحقیقات بیشتری نیاز است تا بتوان این پروتکل را در ماهی زبرا گسترش داد. گسترش این پروتکل می‌تواند در مطالعه مکانیسم‌های نورولوژیک بسیار پیچیده و اختلالات روانی، برای محققان راهگشا باشد. به طور کلی داروهای ضدافسردگی و آرام‌بخش دیاپام و سرتالین موجب کاهش معنی‌دار سطوح کورتیزول می‌شوند که میزان آن در تیمارهای مختلف طی دوره ۳ هفته‌ای تحقیق باهم اختلاف معنی‌داری ندارند. همچنین این داروها موجب افزایش بیان ژن‌های ضدالتهابی و کاهش بیان ژن‌های پیش‌التهابی می‌گردند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل و همچنین از آزمایشگاه آزما اکسیر پژوه (تهران) به دلیل همکاری در انجام آزمایش‌های مولکولی این پژوهش، ابراز می‌دارند. همچنین از تمامی همکاران و دانشجویانی که در مراحل مختلف اجرای پروژه یاری رساندند، سپاسگزاری می‌شود. لازم به ذکر است که این تحقیق هیچ گونه حمایت مالی از سوی سازمان‌ها یا نهادهای خاصی دریافت نکرده و تمامی هزینه‌های آن توسط نویسندگان تأمین شده است.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله، تعارض در منافع ندارند.

مشارکت های نویسندگان

شهاب تیرگر فاخری: طراحی مطالعه، انجام آزمایش‌های رفتاری و بیوشیمیایی، تحلیل داده‌ها و نگارش پیش‌نویس مقاله.

رضا جنگیزی: انجام آزمایش‌های Real-Time PCR و آنالیز بیان ژن.

حامد منوچهری: اجرای پروتکل UCS، نمونه‌برداری و اندازه‌گیری کورتیزول.

علی تهمتن نژاد عمران: مشارکت در طراحی مطالعه، تحلیل آماری داده‌ها و بازبینی انتقادی مقاله.

محدثه نجارزاده آهنگرکلایی: نگهداری و تکثیر ماهی‌های زبرا، تهیه محلول‌های دارویی و کمک در اجرای تیمارها.

میثم رامشگر: مشارکت در جمع‌آوری داده‌ها، تهیه نمودارها و ویرایش نهایی مقاله.

همه نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کرده‌اند و مسئولیت محتوای آن را بر عهده دارند.

منابع مالی

در انجام این پژوهش پشتیبانی مالی از هیچ سازمانی یا موسسه‌ای دریافت نشد و تمامی هزینه‌های پژوهش تماماً توسط نویسندگان تقبل گردید.

بیانیه اخلاقی

نگهداری ماهی‌های زبرا و انجام آزمایشات بر روی آن‌ها، با تأیید و نظارت کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل انجام شد. شناسه اخلاق این پژوهش به شماره IR.IAU.BABOL.REC.1403.034 در وبگاه سامانه ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی، قابل مشاهده می‌باشد.

References

- Alsop, D., & Vijayan, M. (2009). The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *General and comparative endocrinology*, 161(1), 62-66.
- Ando, T., & Dunn, A. J. (1999). Mouse tumor necrosis factor- α increases brain tryptophan concentrations and norepinephrine metabolism while activating the HPA axis in mice. *Neuroimmunomodulation*, 6(5), 319-329.
- Benarroch, E. E. (2013). Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*, 81(12), 1079-1088.
- Brebner, K., Hayley, S., Zacharko, R., Merali, Z., & Anisman, H. (2000). Synergistic effects of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α : central monoamine, corticosterone, and behavioral variations. *Neuropsychopharmacology*, 22(6), 566-580.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., & Klaminder, J. (2013). Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*, 339(6121), 814-815.
- Brynskikh, A., Warren, T., Zhu, J., & Kipnis, J. (2008). Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain, behavior, and immunity*, 22(6), 861-869.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Shipley, G. (2013). The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nature methods*, 10(11), 1063-1067.
- Calabrese, J. R., Skwerer, R. G., Barna, B., Gullledge, A. D., Valenzuela, R., Butkus, A., . . . Krupp, N. E. (1986). Depression, immunocompetence, and prostaglandins of the E series. *Psychiatry research*, 17(1), 41-47.
- Calisto, V., Domingues, M. R. M., & Esteves, V. I. (2011). Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments—Kinetics and photodegradation products. *Water research*, 45(18), 6097-6106.
- Carboni, L., McCarthy, D. J., Delafont, B., Filosi, M., Ivanchenko, E., Ratti, E., . . . Domenici, E. (2019). Biomarkers for response in major depression: comparing paroxetine and venlafaxine from two randomised placebo-controlled clinical studies. *Translational psychiatry*, 9(1), 182.
- Cassano, P., Hidalgo, A., Burgos, V., Adris, S., & Argibay, P. (2006). Hippocampal upregulation of the cyclooxygenase-2 gene following neonatal clomipramine treatment (a model of depression). *The Pharmacogenomics Journal*, 6(6), 381-387.
- Chen, K., Wu, M., Chen, C., Xu, H., Wu, X., & Qiu, X. (2021). Impacts of chronic exposure to sublethal diazepam on behavioral traits of female and male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111747.
- Clark, D., Pazdernik, N., & McGehee, M. (2019). Cells and organisms. *Molecular Biology*, 3rd ed.; Clark, DP, Pazdernik, NJ, McGehee, MR, Eds, 2-37.
- Dantzer, R. (2006). Cytokine, sickness behavior, and depression. *Neurologic clinics*, 24(3), 441-460.
- Dantzer, R., & Kelley, K. W. (2007). Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain, behavior, and immunity*, 21(2), 153-160.
- Depression, W. (2017). Other common mental disorders: global health estimates. Geneva: World Health Organization, 24(1).
- Djavadian, R. (2004). Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 64(2), 189-200.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*, 67(5), 446-457.
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavella, P. R., Elegante, M. F., . . . Tien, D. H. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural brain research*, 205(1), 38-44.
- Eghbali, M., Curmi, J., Birnir, B., & Gage, P. (1997). Hippocampal GABA_A channel conductance increased by diazepam. *Nature*, 388(6637), 71-75.
- Eyre, H. A., Air, T., Proctor, S., Rositano, S., & Baune, B. T. (2015). A critical review of the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 57, 11-16.
- Faikoh, E. N., Hong, Y.-H., & Hu, S.-Y. (2014). Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 38(1), 15-24.

- Faria, M., Bellot, M., Soto, O., Prats, E., Montemurro, N., Manjarrés, D., . . . Raldúa, D. (2022). Developmental exposure to sertraline impaired zebrafish behavioral and neurochemical profiles. *Frontiers in physiology*, 13, 1040598.
- Fornaro, M., Rocchi, G., Escelsior, A., Contini, P., & Martino, M. (2013). Might different cytokine trends in depressed patients receiving duloxetine indicate differential biological backgrounds. *Journal of affective disorders*, 145(3), 300-307.
- Goessling, W., & Sadler, K. C. (2015). Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology*, 149(6), 1361-1377.
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., & Larsson, D. J. (2008). Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental science & technology*, 42(15), 5807-5813.
- Hannestad, J., DellaGioia, N., & Bloch, M. (2011). The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*, 36(12), 2452-2459.
- Hayley, S., Poulter, M., Merali, Z., & Anisman, H. (2006). The pathogenesis of clinical depression: stressor-and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*, 135(3), 659-678.
- Herculano, A. M., & Maximino, C. (2014). Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 55, 50-66.
- Hinson, R. M., Williams, J. A., & Shacter, E. (1996). Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 4885-4890.
- Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2018). Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences*, 163(1), 5-12.
- Keller, J., Gomez, R., Williams, G., Lembke, A., Lazzaroni, L., Murphy, G. M., & Schatzberg, A. F. (2017). HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Molecular psychiatry*, 22(4), 527-536.
- Lam, R. W. (2012). Onset, time course and trajectories of improvement with antidepressants. *European Neuropsychopharmacology*, 22, S492-S498.
- Leite, C. E., de Oliveira Maboni, L., Cruz, F. F., Rosemberg, D. B., Zimmermann, F. F., Pereira, T. C. B., . . . Morrone, F. B. (2013). Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicology and applied pharmacology*, 272(3), 681-689.
- Leonard, B., & Maes, M. (2012). Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(2), 764-785.
- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & behavior*, 90(1), 54-58.
- MacQueen, G., Born, L., & Steiner, M. (2001). The selective serotonin reuptake inhibitor sertraline: its profile and use in psychiatric disorders. *CNS Drug Reviews*, 7(1), 1-24.
- Maes, M. (1999). Major depression and activation of the inflammatory response system. *Cytokines, stress, and depression*, 25-46.
- Maes, M., Berk, M., Goehler, L., Song, C., Anderson, G., Gałeczki, P., & Leonard, B. (2012). Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC medicine*, 10, 1-19.
- Maes, M., Kubera, M., Obuchowicz, E., Goehler, L., & Brzeszcz, J. (2011). Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuroendocrinol Lett*, 32(1), 7-24.
- Maes, M., Meltzer, H. Y., Cosyns, P., Suy, E., & Schotte, C. (1993). An evaluation of basal hypothalamic-pituitary-thyroid axis function in depression: results of a large-scaled and controlled study. *Psychoneuroendocrinology*, 18(8), 607-620.
- Maes, M., Vandoolaeghe, E., Ranjan, R., Bosmans, E., Bergmans, R., & Desnyder, R. (1995). Increased serum interleukin-1-receptor-antagonist concentrations in major depression. *Journal of affective disorders*, 36(1-2), 29-36.
- Manuel, R., Gorissen, M., Zethof, J., Ebbesson, L. O., van de Vis, H., Flik, G., & van den Bos, R. (2014). Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: stronger effects in the resting phase than in the active phase. *Journal of Experimental Biology*, 217(21), 3919-3928.

- Marcon, M., Herrmann, A. P., Mocelin, R., Rambo, C. L., Koakoski, G., Abreu, M. S., . . . Zanatta, L. (2016). Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. *Psychopharmacology*, 233, 3815-3824.
- Martinowich, K., & Lu, B. (2008). Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 73-83.
- Mesquita, A. R., Correia-Neves, M., Roque, S., Castro, A. G., Vieira, P., Pedrosa, J., . . . Sousa, N. (2008). IL-10 modulates depressive-like behavior. *Journal of psychiatric research*, 43(2), 89-97.
- Mihailova, S., Ivanova-Genova, E., Lukanov, T., Stoyanova, V., Milanova, V., & Naumova, E. (2016). A study of TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, and IFN- γ gene polymorphisms in patients with depression. *Journal of neuroimmunology*, 293, 123-128.
- Minghetti, L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(9), 901-910.
- Mocelin, R., Marcon, M., D'ambros, S., Mattos, J., Sachett, A., Siebel, A. M., . . . Piatto, A. (2019). N-acetylcysteine reverses anxiety and oxidative damage induced by unpredictable chronic stress in zebrafish. *Molecular Neurobiology*, 56, 1188-1195.
- Müller, N., Myint, A.-M., & Schwarz, M. J. (2009). The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders-relation to drug treatment. *Dialogues in clinical neuroscience*, 11(3), 319-332.
- Müller, N., Myint, A.-M., & Schwarz, M. J. (2011). Inflammatory biomarkers and depression. *Neurotoxicity research*, 19, 308-318.
- Muscat, R., Papp, M., & Willner, P. (1992). Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacology*, 109, 433-438.
- Nobis, A., Zalewski, D., & Waszkiewicz, N. (2020). Peripheral markers of depression. *Journal of clinical medicine*, 9(12), 3793.
- Overstreet, D. H., & Wegener, G. (2013). The flinders sensitive line rat model of depression—25 years and still producing. *Pharmacological reviews*, 65(1), 143-155.
- Pavlidis, M., Theodoridi, A., & Tsalafouta, A. (2015). Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 60, 121-131.
- Piatto, A. L., Capiotti, K. M., Tamborski, A. R., Oses, J. P., Barcellos, L. J., Bogo, M. R., . . . Bonan, C. D. (2011). Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(2), 561-567.
- Pomara, N., Willoughby, L. M., Sidtis, J. J., Cooper, T. B., & Greenblatt, D. J. (2005). Cortisol response to diazepam: its relationship to age, dose, duration of treatment, and presence of generalized anxiety disorder. *Psychopharmacology*, 178, 1-8.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732.
- Rush, A. J., Trivedi, M. H., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Stewart, J. W., Warden, D., . . . Lebowitz, B. D. (2006). Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *American Journal of Psychiatry*, 163(11), 1905-1917.
- SAPOLSKY, R. M., KREY, L. C., & McEWEN, B. S. (1984). Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocrinology*, 114(1), 287-292.
- Schiepers, O. J., Wichers, M. C., & Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(2), 201-217.
- Segner, H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 187-195.
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W. C., & Love, D. R. (2007). Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(5), 384-390.
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 317-331.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Varela, M., Dios, S., Novoa, B., & Figueras, A. (2012). Characterisation, expression and ontogeny of interleukin-6 and its receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental & Comparative Immunology*, 37(1), 97-106.

- Wang, H., Li, P., Zhang, Y., Zhang, C., Li, K., & Song, C. (2020). Cytokine changes in different types of depression: specific or general? *Neurology, Psychiatry and Brain Research*, 36, 39-51.
- Wang, Q., Timberlake II, M. A., Prall, K., & Dwivedi, Y. (2017). The recent progress in animal models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 77, 99-109.
- Więdołcha, M., Marcinowicz, P., Krupa, R., Janoska-Jaździk, M., Janus, M., Dębowska, W., . . . Szulc, A. (2018). Effect of antidepressant treatment on peripheral inflammation markers—A meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 80, 217-226.
- Willner, P., Muscat, R., & Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16(4), 525-534.
- Zhang, S., Liu, X., Sun, M., Zhang, Q., Li, T., Li, X., . . . Feng, X. (2018). Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). *Behavioral and Brain Functions*, 14, 1-14.
- Zhao, Y., Wang, Z., Dai, J., Chen, L., Huang, Y., & Zhan, Z. (2012). Beneficial effects of benzodiazepine diazepam on chronic stress-induced impairment of hippocampal structural plasticity and depression-like behavior in mice. *Behavioural brain research*, 228(2), 339-350.
- Zhu, C., Zhang, T., Li, Q., Chen, X., & Wang, K. (2023). Depression and anxiety during the COVID-19 pandemic: epidemiology, mechanism, and treatment. *Neuroscience Bulletin*, 39(4), 675-684.
- Zimmermann, F., Altenhofen, S., Kist, L., Leite, C., Bogo, M., Cognato, G., & Bonan, C. D. (2016). Unpredictable chronic stress alters adenosine metabolism in zebrafish brain. *Molecular Neurobiology*, 53, 2518-2528.