

مقاله پژوهشی

اثرات دیازپام و نورتریپتیلین بر تغییرات رفتاری و افسردگی ناشی از استرس
مزمین در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

محدثه نجارزاده آهنگرکلایی^۱، رضا چنگیزی^{۲*}، حامد منوچهری^۲، علی سیاه‌پشت خاچکی^۳

DOI: 10.22124/japb.2025.30222.1566

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۴

چکیده

افسردگی یک بیماری ذهنی است و طبق آمارها هر روز جدی‌تر می‌شود که نشان از نیاز روزافزون به مطالعه بر روی مدل‌های افسردگی و تولید داروهای ضدافسردگی جدید دارد. هدف این پژوهش، ارزیابی تأثیرات منفرد و ترکیبی داروهای دیازپام و نورتریپتیلین بر شاخص‌های رفتاری و بیوشیمیایی در ماهی گورخری (*Danio rerio*) بوده است. در این مطالعه، ۳۸۴ ماهی گورخری ابتدا به دو دسته کلی شاهد (بدون عوامل استرس‌زا) و UCS (با استرس‌زا) تقسیم شدند و درون هر دسته نیز ماهی‌ها به تیمارهای شاهد، دیازپام، نورتریپتیلین و دیازپام + نورتریپتیلین تقسیم شدند (هشت تیمار با سه تکرار). تعداد ماهی‌های هر تیمار، ۱۶ قطعه و هر تیمار نیز دارای ۳ تکرار بود. برای ایجاد افسردگی در ماهی‌ها از پروتکل Unpredictable Chronic Stress (UCS) استفاده شد. آزمایش‌های رفتاری با آزمایش مخزن جدید (NTT) و آزمایش‌های بیوشیمیایی با اندازه‌گیری کورتیزول تام بدن انجام شد. دیازپام و نورتریپتیلین موجب بهبود قابل توجه و معنی‌داری در شاخص‌های رفتاری شامل افزایش معنی‌دار در مدت زمان حضور در سطح بالایی و تعداد انتقال به سطح بالایی و کاهش معنی‌دار مسافت کل طی شده و پیشگیری از اثرات بیوشیمیایی افسردگی با کاهش معنی‌دار سطوح کورتیزول (از 1.01 ± 0.07 به 0.38 ± 0.16 نانوگرم) شدند. در این مطالعه داده‌های پژوهش‌های مشابه پیشین در این زمینه تایید شد که نشان می‌دهد پروتکل UCS موجب القای تغییرات رفتاری و نورواندوکرین در ماهی گورخری می‌شود که با مصرف دیازپام و نورتریپتیلین، می‌توان از آنها پیشگیری کرد. همچنین این مطالعه استفاده از ماهی گورخری را به عنوان مدل در مطالعات تأثیرات رفتاری و فیزیولوژیکی استرس تقویت کرد.

واژگان کلیدی: افسردگی، نورتریپتیلین، پروتکل UCS، دیازپام، ماهی گورخری.

۱- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

۲- استادیار گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

۳- دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

* نویسنده مسئول: changizi@iau.ac.ir

مقدمه

می‌تواند در آزمایش‌های پیش‌درمانگاهی مورد استفاده قرار بگیرد (Goessling and Sadler, 2015). در این پژوهش، برای ایجاد افسردگی در ماهی گورخری، از پروتکل UCS (Unpredictable Chronic Stress) استفاده شد. پروتکل UCS موجب القای تغییرات رفتاری، بیوشیمیایی و مولکولی همانند بیماران افسردگی می‌شود که از ارتباط معنادار این پروتکل با افسردگی حمایت می‌کند. Piato و همکاران در سال ۲۰۱۱ مدل UCS را برای مطالعه بر روی تغییرات رفتاری ماهی گورخری، ابداع کردند. پروتکل UCS در ماهی گورخری نسبت به مدل‌های جوندگان، چندین مزیت دارد. از جمله آنها می‌توان به چرخه تولیدمثلی سریع، بدن شفاف طی دوران تکامل اولیه، شباهت ژنتیکی و فیزیولوژیکی زیاد به انسان و هزینه‌های نگهداری اندک اشاره کرد (Manuel et al., 2014; Horzmann and Freeman, 2018).

از داروهای ضدافسردگی برای کنترل و درمان بسیاری از اختلالات روانی استفاده می‌شود. این نوع داروها به دلیل تولید بسیار زیاد و همچنین مصرف گسترده توسط مردم سراسر جهان و راهیابی آن به زباله‌ها و فضولات، به

افسردگی یک بیماری ذهنی جدی است. بر اساس آمارها، بیش از ۳۲۰ میلیون نفر از مردم جهان تحت تاثیر این بیماری قرار دارند (WHO, 2017). پاندمی کووید ۱۹ نیز باعث کاهش قابل توجه سلامت روانی مردم در سراسر دنیا شده است (Zhu et al., 2023). موارد یاد شده باعث شده است نیاز به تولید داروهای ضدافسردگی جدید، به یک مشکل جدی تبدیل شود (Rush et al., 2006). برای مطالعه آثار استرس بر سیستم‌های زیستی، از مدل‌های متفاوتی استفاده شده است. جوندگان برای مدت‌های طولانی به عنوان مدل‌های جانوری پایه برای مطالعه افسردگی بوده‌اند (Porsolt et al., 1977; Overstreet and Wegener, 2013). برای بررسی افسردگی در جوندگان، از پروتکل‌های متفاوتی استفاده می‌شود که این پروتکل‌ها گران قیمت و طولانی مدت بوده و نیازمند ساختارهای فیزیکی بزرگی هستند. مهره‌داران آبی مانند ماهی گورخری (*Danio rerio*, Zebrafish) حساسیت بالایی نسبت به گستره وسیعی از داروهای ضدافسردگی دارند (Clark et al., 2019; Lachowicz et al., 2021). ماهی گورخری به عنوان یک مدل جدید مطرح شده است که

Butyric Acid) در غشای سلولهای عصبی دستگاه عصبی مرکزی (CNS) متصل می‌شود. این گیرنده‌ها توسط نوروترانسمیتر GABA فعال می‌شوند و از طریق کانال یونی کلر، اثرات خود را اعمال می‌کنند. GABA اصلی‌ترین نوروترانسمیتر مهاری CNS است. ديازپام روند پیوند بین گیرنده‌های GABA و کانال‌های کلر مربوط به آنها را تعدیل (Modulate) می‌کند و انتقال GABAergic (انتقال به واسطه GABA) را افزایش می‌دهد. خاصیت آرامبخشی ديازپام نیز نتیجه همین فرایند است. در همین زمینه Chen و همکاران در سال ۲۰۲۱ با مطالعه اثرات مقادیر مزمن ديازپام بر روی ماهی گورخری، اثرات آن را بر تغییر در میانجی‌های عصبی و همچنین تغییرات رفتاری تایید کردند.

نورتریپتیلین (Nortriptyline) در دسته داروهای ضدافسردگی سه‌حلقه‌ای (Three Cyclic Antidepressant: TCA) جای می‌گیرد. این داروها با مهار بازجذب سروتونین و نوراپی‌نفرین، موجب افزایش غلظت آنها می‌شوند و این گونه اثرات ضدافسردگی خود را اعمال می‌کنند. داروهای ضدافسردگی سه‌حلقه‌ای قبل از معرفی داروهای SSRI، پرمصرف‌ترین داروهای ضدافسردگی بودند. اما

فراوانی در آب‌های سطحی مناطق پرجمعیت یافت می‌شوند. اثرات این داروها بر آبزیان موجب تغییرات اکولوژیکی می‌شود. از سوی دیگر وجود مقادیری از این داروها در محصولات دریایی در نتیجه آلودگی منابع آبی و دریاها، ممکن است اثرات مختلفی بر مصرف‌کنندگان آنها بگذارد که باید بدان توجه کرد (Brodin et al., 2013; Calisto et al., 2011; Gunnarsson et al., 2008). در این پژوهش، تاثیرات داروهای آرامبخش (ديازپام) و ضدافسردگی (نورتریپتیلین) پرمصرف بر پارامترهای رفتاری و بیوشیمیایی در ماهی گورخری با استفاده از پروتکل UCS بررسی شده است.

ديازپام از دسته آرامبخش‌های بنزودیازپینی (Benzodiazepine) و از پرمصرف‌ترین داروهای آرامبخش و خواب‌آور است. بنزودیازپین‌ها دارای اثرات ضداضطراب، تسکین‌دهنده، آرامبخش، شل‌کننده عضلانی (Muscle Relaxant) و ضدتشنج (Anti-convulsant) هستند. به نظر می‌رسد علت آن اثر بر روی سیستم لیمبیک مغز به ویژه ناحیه هیپوکامپ و آمیگدال باشد. این داروها به دلیل سمیت بسیار پایین، به فراوانی در طب انسانی به کار می‌روند (Mandelli et al., 1978). این دارو به گیرنده $GABA_A$ (Gamma Amino)

سنجش میزان استرس است. Egan و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی تغییرات رفتاری و فیزیولوژیک ناشی از استرس در ماهی گورخری مطالعه کردند و نشان دادند همانند انسان، استرس موجب تغییرات سطح کورتیزول در بدن ماهی زبرا می‌شود.

هدف مطالعه حاضر، ارزیابی تاثیرات منفرد و ترکیبی داروهای آرامبخش و ضدافسردگی پرمصرف شامل دیازپام و نورتریپتیلین بر شاخص‌های رفتاری (آزمایش مخزن جدید، NTT) و بیوشیمیایی (کورتیزول تام بدن، Whole Body Cortisol) در ماهی گورخری تحت پروتکل UCS بوده است. از آن جایی که بر اساس فرضیه التهابی افسردگی، استرس موجب تغییرات رفتاری و نهایتاً افسردگی می‌شود، در این پژوهش تاثیرات یک داروی آرامبخش و یک داروی ضدافسردگی پرمصرف که در عین حال بر کاهش سطوح استرس تاثیرگذار هستند، ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تیمارهای مورد آزمایش

در این پژوهش از ۳۸۴ قطعه ماهی گورخری (*Danio rerio*) بالغ از سویه باله کوتاه (Short-fin)، با سن ۶ ماه و تعداد برابر نر و ماده

امروزه تنها در مواردی که بیمار نسبت به داروهای ضدافسردگی رایج‌تر مانند SSRI پاسخ ندهد، تجویز می‌شوند (Merwar et al., 2023). در همین راستا Marcon و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ اثرات برومازپام و نورتریپتیلین را بر تغییرات رفتاری ماهی گورخری مطالعه کردند و تغییرات رفتاری و نورواندوکراین را در این موجودات تایید کردند. در پژوهش حاضر برای بررسی اثرات رفتاری داروهای موثر بر اعصاب در ماهی گورخری، از آزمایش مخزن جدید (Novel Tank Test) استفاده شد. Levin و همکاران در سال ۲۰۰۷ آزمایش مخزن جدید را برای بررسی اثرات رفتاری ناشی از استرس و افسردگی، طراحی کردند و کارکرد آن را در مطالعه این اثرات، بسیار مفید ارزیابی کردند.

کورتیزول یک هورمون گلوکوکورتیکوئیدی و شاخص اولیه استرس در ماهی گورخری است. مقدار این هورمون عمدتاً با قرار گرفتن ماهی در معرض عوامل استرس‌زای حاد و مزمن، افزایش می‌یابد (Ramsay et al., 2006). میزان کورتیزول در حداقل ۷۳ درصد مبتلایان به افسردگی، بیش از حد طبیعی است (Stetler and Miller, 2011). در مهره‌داران به‌ویژه ماهی‌ها، کورتیزول از مهم‌ترین شاخص‌های

جدول ۱: شرایط مناسب نگهداری ماهی‌ها برای انجام پروتکل UCS

مقدار	شاخص
۲۶±۱	دما (°C)
۷±۰/۳	pH
۷±۰/۴	اکسیژن محلول (mg/L)
<۰/۰۱	آمونیاک کل (mg/L)
۵/۸	سختی کل (mg/L)
۲۲	قلیایی (mg/L CaCO ₃)

غلظت داروها بر اساس آزمایش‌های انجام شده در مطالعات مشابه پیشین تعیین شد (Marcon et al., 2016; Chen et al., 2021) و در نهایت غلظت‌های ۱۲۰ میکروگرم در لیتر برای دیازپام و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر برای نورتریپتیلین در نظر گرفته شد. برای ارزیابی این که آیا این داروهای انتخاب شده می‌توانند از تاثیرات القا شده توسط UCS پیشگیری کنند، داروها طی ۲۱ روز به درون آب همزمان با عوامل استرس‌زا، آزاد شدند.

القای افسردگی در ماهی گورخری مدل بر اساس پروتکل UCS
در این پژوهش برای القای افسردگی در ماهی‌های گورخری، از پروتکل UCS (Unpredictable Chronic Stress) استفاده

استفاده شد. این ماهی‌ها در ۲۴ آکواریوم نگهداری شدند که حجم آب آنها ۱۰ لیتر بود (۱۶ ماهی در هر آکواریوم). آکواریوم‌ها با آب تصفیه شده کلرزدایی شده (Dechlorination) آب‌گیری شده بودند. ماهی‌ها چرخه روشنایی تاریکی ۱۴ به ۱۰ ساعت (L14:D10) داشتند (روشن شدن چراغ‌ها ساعت ۷ صبح) و حداقل ۱ هفته قبل از آزمایش در این شرایط نگهداری شدند. قسمتی از آب هر آکواریوم دو بار در هفته تعویض شده و ماهی‌ها تحت شرایط مناسب نگهداری می‌شدند. ماهی‌ها ۲ بار در روز با غذای تجاری (Skretting, Gemma Micro 300، نروژ) با اندازه مناسب دهان ماهی، غذادهی شدند. شرایط محیطی مناسب نگهداری ماهی‌ها (جدول ۱) بر اساس آزمایش‌های رفتاری و اندازه‌گیری کورتیزول در مطالعات پیشین فراهم شد (Levin et al., 2007; Piato et al., 2016; Marcon et al., 2011).

داروها

دیازپام (کاسپین، ایران) و نورتریپتیلین (لقمان، ایران) به صورت ویال محلول در آب با غلظت مشخص تهیه شد.

شد. طراحی کلی این آزمایش و استفاده از این پروتکل و همچنین انتخاب مقدار داروها، بر اساس روش مورد استفاده در مطالعات مشابه پیشین (Piato et al., 2011; Marcon et al., 2016) بود. در این پروتکل با استفاده از القای مداوم عوامل استرس‌زای متفاوت، در نهایت افسردگی به ماهی‌های گورخری، القا شد (Spellman and Liston, 2020). مطابق جدول ۲ در این پروتکل، ماهی‌های گورخری ابتدا به دو گروه کلی شاهد (بدون عوامل استرس‌زا) و UCS (با عوامل استرس‌زا) تقسیم شدند. درون هر گروه نیز ماهی‌ها به ۴ تیمار شاهد، دیازپام (۱۲۰ میکروگرم در لیتر)، نورتریپتیلین (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و دیازپام (۱۲۰ میکروگرم در لیتر) + نورتریپتیلین (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) تقسیم شدند. عوامل استرس‌زای القا شده شامل موارد زیر بود:

- گرم کردن آب مخزن تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه
- سرد کردن آب مخزن تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه
- انتقال ۱۰ ماهی در یک ظرف با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر به مدت ۵۰ دقیقه
- کاهش سطح آب آکواریوم و رساندن حجم آن به کمتر از ۰/۵ لیتر به مدت ۲ دقیقه به طوری

که سطح پستی بدن ماهی‌ها نمایان شود.

- تعویض آب مخزن ۳ بار متوالی با فاصله ۳۰ دقیقه
- تعقیب کردن ماهی با توری به مدت ۸ دقیقه

جدول ۲: تیمارهای مختلف ماهی‌های گورخری با دیازپام و نورتریپتیلین در دو حالت بدون عوامل استرس‌زا و دارای عوامل استرس‌زا (UCS)

تیمار	دیازپام (µg/L)	نورتریپتیلین (mg/L)
C-S	۰	۰
C+S	۰	۰
T ₁ -S	۱۲۰	۰
T ₁ +S	۱۲۰	۰
T ₂ -S	۰	۰/۰۱
T ₂ +S	۰	۰/۰۱
T ₃ -S	۱۲۰	۰/۰۱
T ₃ +S	۱۲۰	۰/۰۱

C: شاهد؛ T: تیمار؛ +S: با استرس؛ -S: بدون استرس.

بر اساس پروتکل UCS، عوامل استرس‌زای یاد شده به صورت تصادفی ۲ بار در روز و طی ۲۱ روز به منظور جلوگیری از خوگیری و عادت کردن ماهی‌ها اعمال شد. کل دوره پژوهش ۲۱ روز بود. همه این عوامل استرس‌زا به صورت تصادفی از ساعت ۸ صبح تا ۱۸ عصر اعمال شدند.

آزمایش مخزن جدید

در روز ۲۲، بین ساعت ۸ تا ۱۱ صبح، هر ماهی گورخری به صورت انفرادی در آزمایش مخزن جدید (Novel Tank Test: NTT) مورد بررسی قرار گرفت. روش انجام این آزمایش، بر اساس مطالعات پیشین صورت گرفت (Levin et al., 2007; Egan et al., 2011; Piato et al., 2009). شاخص‌های رفتاری که در آزمایش مخزن جدید اندازه‌گیری شد شامل اندازه‌گیری مسافت کل طی شده (Total Distance Traveled)، اندازه‌گیری مدت زمان حضور در قسمت بالایی مخزن و تعداد دفعات ورود به قسمت بالایی مخزن بود (Tran and Gerlai, 2016). برای این آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۶ دقیقه در مخزن‌هایی با ابعاد ۲۰×۸×۲۴ سانتی‌متر (طول، عرض، ارتفاع) با سطح آب ۱۵ سانتی‌متر قرار گرفتند. آب درون مخزن برای هر ماهی عوض می‌شد. مخزن‌ها به صورت چشمی به ۳ قسمت افقی برابر (عمق، میانه و سطح) تقسیم شدند. آزمایش‌های رفتاری با استفاده از نرم‌افزار EthoVision XT Software (Vision 11.5, Noldus) ضبط و بررسی شدند. سپس شاخص‌های کل مسافت طی شده، زمان سپری شده در قسمت سطحی و تعداد انتقال به قسمت سطحی اندازه‌گیری

شدند. کل مسافت طی شده، نمایانگر فعالیت حرکتی کل (Total Locomotor Activity) است. زمان سپری شده در قسمت سطحی و تعداد انتقال به قسمت سطحی، مقادیر مشخصی دارد. به طور معمول کاهش هر یک از این شاخص‌ها، نمایانگر رفتار عصبی به شمار می‌رود.

اندازه‌گیری کورتیزول

عصاره‌گیری و اندازه‌گیری کورتیزول تام بدن، بر اساس مطالعات قبلی و با استفاده از کیت الیزا (EIA Gen Cortisol Test, Biochem Immuno Systems) صورت گرفت (Zimmermann et al., 2011; Piato et al., 2016). به طور خلاصه، ۲۴ ساعت پس از اعمال آخرین عامل استرس‌زا، ماهی‌ها با ملایمت گرفته شده و فوراً در نیتروژن مایع منجمد شدند. به دنبال آن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا از آنها عصاره کورتیزول گرفته شود. برای جلوگیری از پاسخ استرس احتمالی ناشی از دستکاری و گرفتن ماهی‌ها، مدت زمان بین گرفتن ماهی تا کشتن آن، کمتر از ۱۰ ثانیه بود (Marcon et al., 2016). هر ماهی گورخری وزن شد و هر مخزن حاوی ۲ ماهی خرد شده بود و درون کیسه استامکر با ۲ میلی‌لیتر بافر سالین فسفات

حاصل از اثرات حاد آزمایش مخزن جدید (NTT) بر روی آنها، جلوگیری شود.

تجزیه و تحلیل آماری

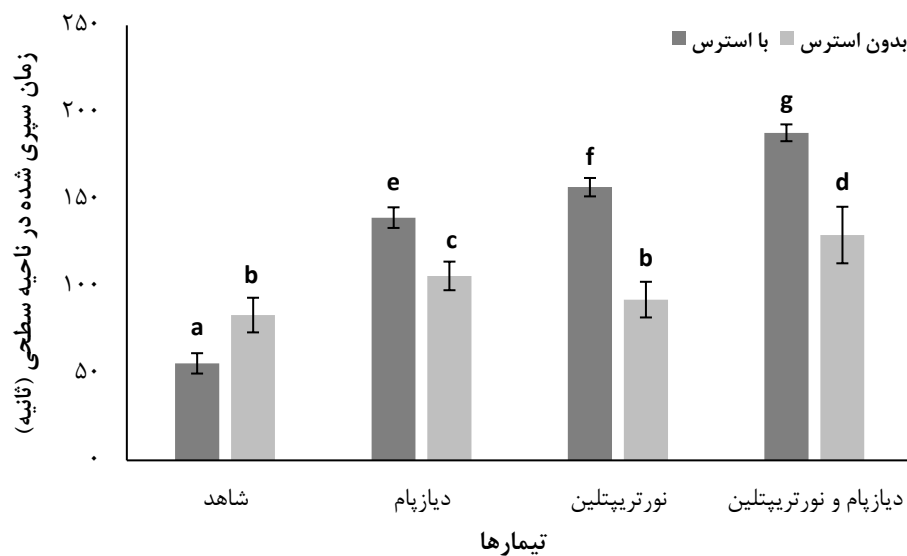
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS 27 و آزمون آماری تحلیل واریانس (ANOVA) تکراری دوطرفه و پس‌آزمون توکی (Tukey's Post Hoc) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 رسم شدند. تمامی نتایج با میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین توصیف شدند.

نتایج

مطابق با شکل ۱ بر اساس نتایج بررسی آزمایش‌های رفتاری، پروتکل UCS موجب کاهش معناداری در زمان سپری شده در ناحیه بالایی مخزن شد. به طوری که زمان سپری شده در ناحیه بالایی مخزن در تیمار شاهد با استرس نسبت به تیمار شاهد بدون استرس، به شکل معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$).

(PBS, pH ۷/۴) برای ۶ دقیقه قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه هموژنایزر به خوبی هموژن و یکنواخت شد (Zimmermann et al., 2016). سپس دی‌اتیل اتر به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها برای ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن فوراً در نیتروژن مایع منجمد شدند. قسمتی که پس از فرو بردن در نیتروژن مایع یخ نزده بود (دی‌اتیل اتر حاوی کورتیزول)، به آهستگی درون دکانتور خالی شد. دی‌اتیل اتر حاوی کورتیزول به درون یک لوله جدید منتقل و به طور کامل تحت یک جریان بخار نیتروژن ملایم برای ۲ ساعت، تبخیر شد. آنچه باقی ماند، یک عصاره لیپیدی حاوی کورتیزول بود. این عصاره در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد ذخیره شد تا تست الایزا روی سوسپانسیون نمونه‌ها با ۱ میلی‌لیتر بافر PBS انجام شود (Piato et al., 2011).

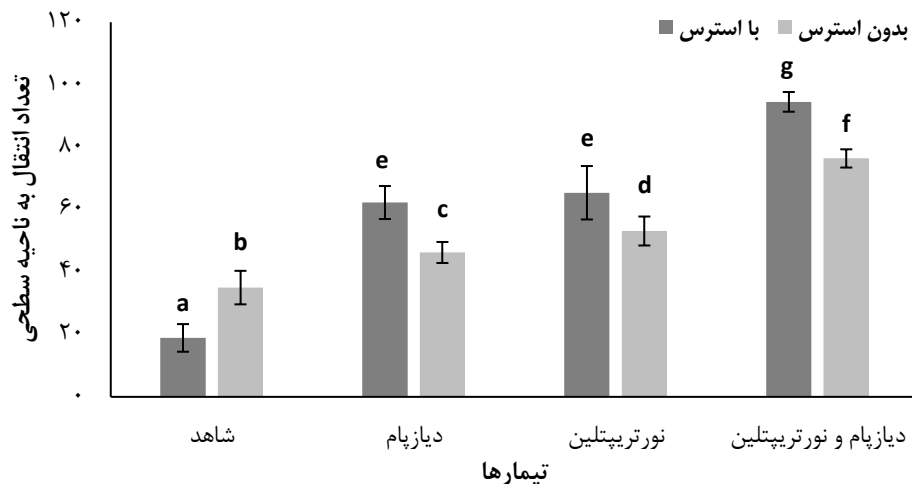
برای اندازه‌گیری کورتیزول نمونه‌ها از ماهیانی جمع‌آوری شد که آزمایش‌های رفتاری روی آنها انجام نشده بود تا از تداخل احتمالی



شکل ۱: نتایج آزمایش رفتاری ماهی گورخری در شاخص زمان سپری شده در ناحیه بالایی مخزن در آزمایش مخزن جدید (NTT) (میانگین $\pm$ انحراف معیار). حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف است ($P < 0.05$).

مطابق با شکل ۲ و بر اساس نتایج بررسی آزمایش‌های رفتاری، پروتکل UCS موجب کاهش معنادار دفعات انتقال ماهی گورخری به ناحیه بالایی مخزن شد. به طوری که تعداد آن در شاهد با استرس به شکل معنی‌داری کمتر از شاهد بدون استرس بود ($P < 0.05$). تعداد انتقال به ناحیه بالایی مخزن در تیمار با استرس ديازپام نسبت به تیمار بدون استرس آن، با اختلاف معناداری بیشتر بود. مشابه همین نتیجه در تیمار با و بدون استرس نورتریپتیلین نیز مشاهده شد ($P < 0.05$).

در تیمار با استرس ديازپام نسبت به تیمار بدون استرس آن، ماهیان به شکل معنی‌داری مدت زمان بیشتری را در ناحیه بالایی مخزن سپری کردند ($P < 0.05$). مشابه این در تیمار با و بدون استرس نورتریپتیلین نیز دیده شد. ماهیان در تیمار ترکیبی با استرس ديازپام و نورتریپتیلین نیز به شکل معنی‌داری نسبت به تیمار بدون استرس خود و تمامی تیمارهای دیگر، مدت زمان بیشتری را در ناحیه بالایی مخزن سپری کردند ($P < 0.05$).



شکل ۲: نتایج آزمایش رفتاری ماهی گورخری در شاخص تعداد انتقال به ناحیه بالایی مخزن (میانگین $\pm$ انحراف معیار). حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف است ($P < 0.05$).

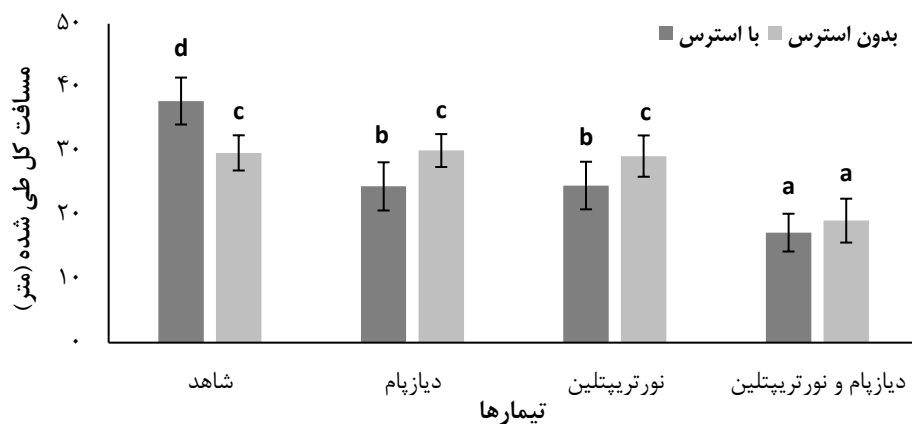
استرس آنها مشاهده نشد ($P > 0.05$). در تیمار ترکیبی دیازپام و نورتریپتیلین، بین تیمار بدون استرس و با استرس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). در تیمار ترکیبی با استرس دیازپام و نورتریپتیلین، بیشترین کاهش در میزان مسافت طی شده مشاهده شد.

بر اساس شکل ۴، پروتکل UCS در تیمار شاهد با استرس، موجب افزایش معنی‌دار سطوح کورتیزول شد. سطوح کورتیزول تیمارهای با و بدون استرس دیازپام، نورتریپتیلین و همچنین ترکیب آنها، به شکل معنی‌داری از تیمار شاهد با استرس کمتر بود ($P < 0.05$). اختلاف معنی‌داری بین سطوح کورتیزول تیمارهای با

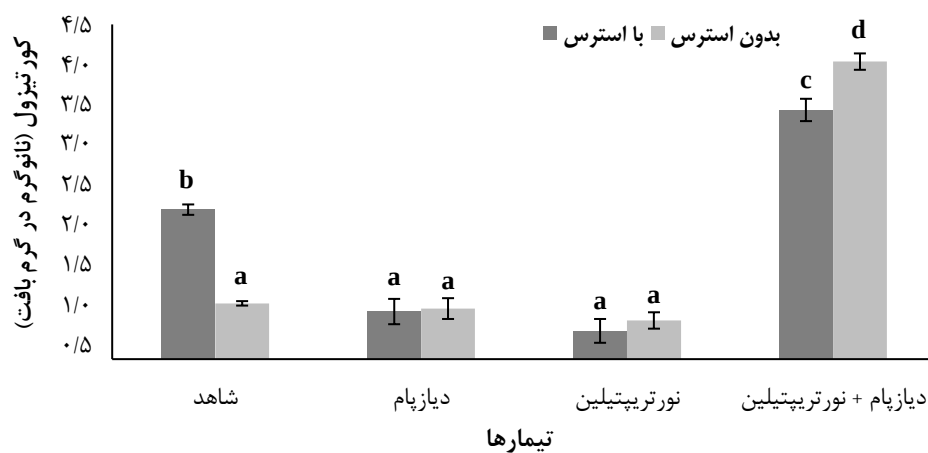
تعداد انتقال به ناحیه بالایی مخزن در تیمار با استرس ترکیبی دیازپام و نورتریپتیلین به شکل معناداری از تیمار بدون استرس خود و تمامی تیمارهای دیگر، بیشتر بود ($P < 0.05$).

مطابق با شکل ۳، بر اساس نتایج بررسی آزمایش‌های رفتاری، پروتکل UCS موجب ایجاد تفاوت معنی‌داری در مسافت کل پیموده شده در تیمار شاهد بدون استرس نسبت به تیمار شاهد با استرس شد ($P < 0.05$). در تیمارهای با استرس دیازپام و نورتریپتیلین نسبت به تیمارهای بدون استرس آنها نیز، کاهش میزان مسافت طی شده مشاهده شد. در حالی که تفاوت معنی‌داری در تیمارهای بدون

استرس و بدون استرس تیمارهای دیازپام و نورتریپتیلین مشاهده نشد ($P > 0.05$). سطوح کورتیزول در تیمار ترکیبی با و بدون استرس



شکل ۳: نتایج آزمایش رفتاری ماهی گورخری در شاخص مسافت کل طی شده (میانگین $\pm$ انحراف معیار). حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف است ($P < 0.05$).



شکل ۴: نتایج اندازه‌گیری سطوح کورتیزول (میانگین $\pm$ انحراف معیار). حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف است ($P < 0.05$).

بحث

آزمایش مخزن جدید نشان می‌دهد که وقتی ماهی گورخری برای اولین بار در یک محیط جدید قرار می‌گیرد، به طور اولیه و در ابتدا ترجیح می‌دهد در اعماق محیط حضور داشته باشد. این یک پاسخ رفتاری عصبی است که به آرامی و پس از این که ماهی گورخری با محیط آشنا شد، کاهش می‌یابد. این رفتار نوعی تلاش ماهی گورخری است تا بتواند به یک مکان امن برای فرار از دست شکارچیان دست یابد (Levin et al., 2007). هر چه ماهی گورخری سطوح پایین‌تری از استرس داشته باشد، مدت بیشتری را در ناحیه بالایی مخزن به سر می‌برد و دفعات بیشتری نیز به ناحیه بالایی مخزن منتقل می‌شود (Gerlai, 2010). بر اساس نتایج آزمایش‌های رفتاری مطابق شکل‌های ۱ و ۲، شاهد بدون استرس نسبت به شاهد با استرس مدت زمان بیشتری را در ناحیه بالایی مخزن گذراند و دفعات بیشتری نیز به ناحیه بالایی مخزن منتقل شد. یعنی شاهد‌های بدون استرس سطوح پایه اضطراب کمتری از شاهد‌های با استرس داشتند. این امر نشان‌دهنده تاثیر پروتکل UCS است که همانند نتایج مطالعات پیشین است (Piato et al., 2011; Marcon et al., 2016; Zimmermann et al., 2016).

و درستی انجام این پروتکل را تایید می‌کند. مطابق شکل‌های ۱ و ۲ تیمارهای بدون استرس دیازپام و نورتریپتیلین هم نسبت به تیمار بدون استرس شاهد، مدت زمان حضور در ناحیه بالایی مخزن و تعداد دفعات انتقال به ناحیه بالایی بیشتری ثبت کردند. این امر ناشی از اثر بخش بودن این داروها در کاهش میزان سطح پایه اضطراب است. بیشتر بودن مدت زمان حضور و دفعات انتقال به ناحیه بالایی مخزن در تیمار بدون استرس ترکیبی دیازپام و نورتریپتیلین نیز نسبت به تیمارهای بدون استرس دیازپام، نورتریپتیلین و شاهد، می‌تواند نشان‌دهنده اثرات سینرژیستی این دو دارو در کاهش میزان استرس باشد (Wang et al., 2020). همچنین مطابق شکل‌های ۱ و ۲ تیمارهای با استرس دیازپام، نورتریپتیلین و ترکیب دیازپام و نورتریپتیلین، مدت زمان حضور در ناحیه بالایی و دفعات انتقال به ناحیه بالایی بیشتری نسبت به تیمارهای بدون استرس خود ثبت کرده‌اند. بدین معنا که سطوح پایه اضطراب در این تیمارهای با استرس، کمتر از تیمارهای بدون استرس است و این بر خلاف آن چیزی است که انتظار می‌رود. زیرا به طور کلی انتظار می‌رود سطوح استرس در تیمارهایی که به آنها با استفاده از پروتکل UCS استرس وارد شده،

پیشگیری کننده از عواقب پروتکل UCS و هم اثرات مثبت بر روی علائم رفتاری طبیعی ماهی است. احتمالاً طی این آزمایش، افزایش انعطاف پذیری نورونی که ناشی از مصرف همزمان دارو و وارد کردن عوامل استرس‌زا است، موجب بهبود علائم رفتاری شده است. یعنی اثربخشی این داروها بر شاخص‌های رفتاری هنگامی که تحت شرایط استرس‌زا مصرف شوند، بیشتر خواهد بود و به شکل موثرتری موجب کاهش سطوح پایه استرس می‌شوند.

علاوه بر این، در برخی پژوهش‌ها مشاهده شده است که تاثیرات رفتاری تیمار با داروهای دیازپام و نورتریپتیلین بسته به نوع شرایط استرسی متفاوت است. بدین معنا که اگر شرایط استرسی از نوع دیگری بر ماهی‌ها حاکم بود، مثل استرس گرسنگی یا استرس صوتی، ممکن بود تغییرات الگوی متفاوتی را نشان دهد (Marcon et al., 2016).

شاخص دیگری که در آزمایش‌های رفتاری بررسی شد، میزان مسافت کل طی شده توسط ماهی‌ها بود. همان طور که پیش از این اشاره شد، میزان مسافت کل طی شده، نشان‌دهنده فعالیت حرکتی کل ماهی گورخری است. تفسیر تغییرات فعالیت حرکتی، پیچیده، دشوار و بسته به شرایط، متفاوت است. در تعدادی از

بیشتر از تیمارهایی باشد که استرسی به آنها وارد نشده است. اما نتایج خلاف این را نشان می‌دهند. علت این امر را باید در فرضیه‌های افسردگی به‌ویژه فرضیه نوروتروفیک جستجو کرد. بر اساس فرضیه نوروتروفیک افسردگی، استرس مزمن موجب کاهش انعطاف‌پذیری نورونی (Neuronal Plasticity) و پیوستگی سیناپسی در نواحی کورتیکال مانند هیپوکامپ می‌شود (Serafini et al., 2014). انعطاف‌پذیری نورونی به ظرفیت دستگاه عصبی برای تغییر عملکردی (Functional) و ساختاری (Structural) خود در پاسخ به تجربه و آسیب اشاره دارد. انعطاف‌پذیری نورونی بخشی کلیدی در توسعه نورونی (Neuronal Development) و عملکرد طبیعی دستگاه عصبی در پاسخ به تغییرات محیطی (Changing Environment)، پیری (Aging) و آسیب‌های پاتولوژیک است (Von Bernhardi et al., 2017).

به نظر می‌رسد مصرف دیازپام و نورتریپتیلین که از داروهای موثر بر اعصاب (Psychotropic) هستند، همزمان با وارد کردن عوامل استرس‌زا طی پروتکل UCS، موجب تغییرات مثبتی در انعطاف‌پذیری نورونی می‌شود. به طوری که هم دارای اثرات

کمترین میزان استرس بود که می‌تواند نشان‌دهنده اثر سینرژیستی این داروها در مهار استرس باشد. هر چند که در تیمارهای دارای اثر داروها میزان مسافت کل طی شده کم شده بود، اما در عین حال تعداد دفعات انتقال به قسمت بالایی وان افزایش داشت. علت این امر ابعاد خاص مخزن جدید است، به طوری که کاهش مسافت کل طی شده بیشتر در نتیجه کاهش حرکات ماهی در قسمت‌های عمقی و میانی مخزن جدید بود (Gerlai, 2010).

در ماهی گورخری، استرس باعث افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-اندام درون کلیوی (HPI Axis) شده و در طولانی مدت (حداقل ۱ هفته) منجر به القای افسردگی می‌شود (Zimmermann et al., 2016). تغییرات سطوح کورتیزول وابستگی شدیدی با رفتار استرسی در ماهی‌های گورخری مدل دارد (Egan et al., 2009). میزان کورتیزول در اثر پروتکل UCS افزایش می‌یابد (Piato et al., 2011). مطابق با شکل ۴ در نتایج پژوهش 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 است و با آزمایش‌های پیشین، همخوانی دارد (Marcon

آزمایش‌ها، کاهش فعالیت حرکتی را نشانه رفتار استرسی دانسته‌اند (Giacomini et al., 2016). در برخی از آزمایش‌ها نیز افزایش فعالیت حرکتی را نشانه رفتار استرسی در نظر گرفته‌اند (Tran and Gerlai, 2016). از آن جایی که در این مطالعه فعالیت حرکتی در تیمارهای شاهد بدون استرس کمتر از شاهد‌های با استرس بود، به نظر می‌رسد با احتمال بالایی، افزایش فعالیت حرکتی در این آزمایش، نشان‌دهنده رفتار استرسی باشد. از طرفی در نظر گرفتن افزایش فعالیت حرکتی به عنوان رفتار استرسی، با دو شاخص دیگر حرکتی در این آزمایش یعنی مدت زمان حضور در قسمت سطحی و تعداد انتقال به قسمت سطحی، همخوانی دارد. بر همین مبنا، بیشتر بودن فعالیت حرکتی کل تیمارهای شاهد با استرس نسبت به تیمارهای شاهد بدون استرس، بدین معنا است که پروتکل UCS موجب افزایش سطوح استرس شده است که با پژوهش‌های مشابه (Egan et al., 2009; Piato et al., 2011; Marcon et al., 2016) مطابقت دارد.

مطابق با شکل ۳ در میان تیمارهای با استرس، تیمار ترکیبی دیازپام و نورتریپتیلین دارای کمترین فعالیت حرکتی و در نتیجه

امر احتمالاً ناشی از اثرات تداخلی ترکیب این دو دارو طی مدت آزمایش بر محور HPI است. بدین معنا که منجر به افزایش فعالیت این محور و در نتیجه افزایش سطوح کورتیزول شده است. با توجه به این که در آزمایش‌های پیشین Marcon و همکاران (۲۰۱۶) و Piatto و همکاران (۲۰۱۱)، سطوح متفاوتی از کورتیزول در تیمارهای ترکیبی ماهی گورخری ثبت شد، بررسی دقیق‌تر این امر، نیازمند انجام مطالعات بیشتری در این زمینه است. عامل موثر دیگر بر تاثیرات ضداضطرابی این نوع داروها، مدت زمان تیمار است. این موضوع در راستای این نکته است که مسیرهای مونوآمینرژیک (Monoaminergic Pathways) به‌ویژه مسیرهای سروتونرژیک با مسیرهای اضطراب، همبستگی و در هم تنیدگی دارند. بدین معنی که اعصاب سروتونرژیک دستگاه عصبی در قسمت‌های موثر بر اضطراب مانند محور HPI نقش دارند و این قسمت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Tovote et al., 2015). با این توصیف، به منظور بررسی بیشتر این مورد، لازم است مطالعات دیگری در همین زمینه با طول دوره بیشتر از ۳ هفته صورت گیرد.

مطابق با نتایج به دست آمده از این مطالعه، نشان داده شد که دیازپام و نورتریپتیلین موجب

et al., 2016; Zimmermann et al., 2016). مطابق نمودار شکل ۱ در مطالعه حاضر، میزان کورتیزول تیمارهای با و بدون استرس دیازپام و نورتریپتیلین و از شاهد با استرس به شکل معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$). این امر نشان‌دهنده تاثیر مثبت این داروها در کاهش سطوح استرس پایه در ماهی گورخری است. در عین حال میزان کورتیزول تیمارهای با استرس به همراه داروها، اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P > 0.05$). عدم وجود اختلاف معنی‌دار در تیمارهای با استرس و بدون استرس و همچنین برابری سطوح کورتیزول در تیمارهای مختلف با شاهد بدون استرس، می‌تواند بیانگر این باشد که احتمالاً میزان کورتیزول در ماهی گورخری دارای یک سطح پایه‌ای فیزیولوژیکی (Physiologic Basic Level) است (Nasereddin et al., 2024). با مصرف داروهای ضدافسردگی و آرام‌بخش طی دوره حداقل ۳ هفته‌ای، نمی‌توان میزان آن را از این مقدار پایه‌ای کمتر کرد. در مطالعات مشابه نیز این سطوح پایه‌ای کورتیزول در آزمایش‌های ۱ هفته‌ای و ۲ هفته‌ای تحت پروتکل UCS ثبت شد (Marcon et al., 2016). در عین حال بیشترین سطوح کورتیزول در تیمار ترکیبی دیازپام و نورتریپتیلین قابل مشاهده است. این

پیشگیری از افزایش سطوح کورتیزول بر اثر پروتکل UCS می‌شود. این امر با پژوهش‌هایی که در آنها اثرات آرام‌بخش‌های بنزودیازپینی و داروهای ضدافسردگی بر شاخص‌های نورواندوکراین در جوندگان (Zhao et al., 2012) و انسان‌ها (Pomara et al., 2005) بررسی شد، مطابقت دارد.

در مجموع، ماهی گورخری یک مدل بسیار مناسب برای مطالعه تاثیرات استرس بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است و ظرفیت فوق‌العاده زیادی برای انجام پژوهش‌های دیگر دارد. می‌توان از پروتکل UCS به عنوان یک ابزار آزمایش برای ارزیابی داروهای جدید موثر بر استرس، افسردگی و به طور کلی داروهای موثر بر اعصاب استفاده کرد. مطالعات

بیشتری نیاز است تا بتوان این پروتکل را در ماهی گورخری گسترش داد. گسترش این پروتکل می‌تواند در مطالعه مکانیسم‌های نورولوژیک بسیار پیچیده و اختلالات روانی، برای پژوهشگران راهگشا باشد. به طور کلی داروهای ضدافسردگی و آرام‌بخش دپازپام و نورتریپتیلین موجب کاهش معنی‌دار سطوح کورتیزول شدند که میزان آن در تیمارهای مختلف طی دوره ۳ هفته‌ای پژوهش با هم اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). همچنین استفاده از این داروها با مقادیر مناسب می‌تواند موجب بهبود معنی‌دار شاخص‌های رفتاری شود. استفاده همزمان این داروها می‌تواند اثرات مفیدتری در پیشگیری و درمان افسردگی ایفا کند.

منابع

- Brodin T., Fick J., Jonsson M. and Klaminder J. 2013.** Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*, 339(6121): 814–815. doi: 10.1126/science.1226850
- Calisto V., Domingues M.R.M. and Esteves V.I. 2011.** Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments- Kinetics and photodegradation products. *Water Research*, 45(18): 6097–6106. doi: 10.1016/j.watres.2011.09.008
- Chen K., Wu M., Chen C., Xu H., Wu X. and 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: 1–9 (111747). doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111747
- Clark D., Pazdernik N. and McGehee M. 2019.** Cells and organisms. P: 2–37. In: Clark D.P., Pazdernik N.J. and McGehee M.R. (Eds.). *Molecular Biology*. Academic Press, UK.
- Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., Cachat J.M., Canavello P.R., Elegante M.F., Elkhayat S.I., Bartels B.K., Tien A.K. Tien D.H., Mohnot S., Beeson E., Glasgow E., Amri H., Zukowska Z. and Kalueff A.V. 2009.** Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205(1): 38–44. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.022
- Gerlai R. 2010.** Zebrafish anti-predatory responses: A future for translational research? *Behavioural Brain Research*, 207(2): 223–231. doi: 10.1016/j.bbr.2009.10.008
- Giacomini A.C.V.V., Abreu M.S., Giacomini L.V., Siebel A.M., Zimmerman F.F., Rambo C.L., Mocelin R., Bonan C.D., Piatto A.L., and Barcellos L.J.G. 2016.** Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. *Behavioural Brain Research*, 296: 301–310. doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.027
- Goessling W. and Sadler K.C. 2015.** Zebrafish: An important tool for liver disease research. *Gastroenterology*, 149(6): 1361–1377. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.034
- Gunnarsson L., Jauhiainen A., Kristiansson E., Nerman O. and Larsson D.J. 2008.** Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental Science and Technology*, 42(15): 5807–5813. doi: 10.1021/es8005173

- Horzmann K.A. and Freeman J.L. 2018.** Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences*, 163(1): 5–12. doi: 10.1093/toxsci/kfy044
- Lachowicz J., Niedzialek K., Rostkowska E., Szopa A., Świader K., Szponar J. and Serefko A. 2021.** Zebrafish as an animal model for testing agents with antidepressant potential. *Life*, 11(8): 1–19 (792). doi: 10.3390/life11080792
- Levin E.D., Bencan Z. and Cerutti D.T. 2007.** Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology and Behavior*, 90(1): 54–58. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026
- Mandelli M., Tognoni G. and Garattini S. 1978.** Clinical pharmacokinetics of diazepam. *Clinical Pharmacokinetics*, 3: 72–91. doi: 10.2165/00003088-197803010-00005
- Manuel R., Gorissen M., Zethof J., Ebbesson L. O., Van De Vis H., Flik G. and 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. doi: 10.1242/jeb.109736
- Marcon M., Herrmann A.P., Mocelin R., Rambo C.L., Koakoski G., Abreu M.S., Conterato G.M.M., Kist L.W., Bogo M.R., Zanatta L., Barcellos L.J.G. and Piato A.L. 2016.** Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. *Psychopharmacology*, 233: 3815–3824. doi: 10.1007/s00213-016-4408-5
- Merwar G., Gibbons J.R., Hosseini S.A. and Saadabadi A. 2023.** Nortriptyline. National Center for Biotechnology Information. Retrieved June 5, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482214/>
- Nasereddin L., Alnajjar O., Bashar H., Abuarab S.F., Al-Adwan R., Chellappan D.K. and Barakat M. 2024.** Corticosteroid-induced psychiatric disorders: Mechanisms, outcomes, and clinical implications. *Diseases*, 12(12): 1–18 (300). doi: 10.3390/diseases12120300
- Overstreet D.H. and Wegener G. 2013.** The flinders sensitive line rat model of depression-25 years and still producing. *Pharmacological Reviews*, 65(1): 143–155. doi: 10.1124/pr.111.005397
- Piato A.L., Capiotti K.M., Tamborski A.R., Oses J.P., Barcellos L.J.G., Bogo M.R., Lara D.R., Vianna M.R. and 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. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.12.018
- Pomara N., Willoughby L.M., Sidtis J.J., Cooper T.B. and 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. doi: 10.1007/s00213-004-1974-8
- Porsolt R.D., Le Pichon M. and Jalfre M. 1977.** Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604): 730–732. doi: 10.1038/266730a0
- Ramsay J.M., Feist G.W., Varga Z.M., Westerfield M., Kent M.L. and Schreck C.B. 2006.** Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 258(1-4): 565–574. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.020
- Rush A.J., Trivedi M.H., Wisniewski S.R., Nierenberg A.A., Stewart J.W., Warden D., Niederehe G., Thase M.E., Lavori P.W., Lebowitz B.D., McGrath P.J., Rosenbaum J.F., Sackeim H.A., Kupfer D.J., Luther J. and Fava M. 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. doi: 10.1176/ajp.2006.163.11.1905
- Serafini G., Hayley S., Pompili M., Dwivedi Y., Brahmachari G., Girardi P. and Amore M. 2014.** Hippocampal neurogenesis, neurotrophic factors and depression: Possible therapeutic targets? *CNS and Neurological Disorders-Drug Targets*, 13(10): 1708–1721. doi: 10.2174/1871527313666141130223723
- Spellman T. and Liston C. 2020.** Toward circuit mechanisms of pathophysiology in depression. *American Journal of Psychiatry*, 177(5): 381–390. doi: 10.1176/appi.ajp.2020.20030280
- Stedler C. and Miller G.E. 2011.** Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: A quantitative summary of four decades of research. *Psychosomatic Medicine*, 73(2): 114–126. doi: 10.1097/PSY.0b013e31820ad12b
- Tovote P., Fadok J.P. and Luthi A. 2015.** Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6): 317–331. doi: 10.1038/nrn3945
- Tran S. and Gerlai R.T. 2016.** The novel tank test: Handling stress and the context specific psychopharmacology of anxiety. *Current Psychopharmacology*, 5(2): 169–179. doi: 10.2174/2211556005666160519144414

- Von Bernhardt R., Bernhardt L.E.V. and Eugenin J. 2017.** What is neural plasticity? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1015: 1–15. doi: 10.1007/978-3-319-62817-2_1
- Wang D., Yang L., Wang J., Hu G., Liu Z., Yan D., Serikuly N., Alpyshov E.T., Demin K.A., Galstyan D.S., Strekalova T., De Abreu M.S., Amstislavskaya T.G. and Kalueff A.V. 2020.** Behavioral and physiological effects of acute and chronic kava exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 79: 1–10 (106881). doi: 10.1016/j.ntt.2020.106881
- WHO. 2017.** Depression and Other common mental disorders: Global health estimates. World Health Organization, Switzerland. 24P.
- Zhao Y., Wang Z., Dai J., Chen L., Huang Y. and Zhan Z. 2012.** Beneficial effects of benzo-diazepine diazepam on chronic stress-induced impairment of hippocampal structural plasticity and depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research*, 228(2): 339–350. doi: 10.1016/j.bbr.2011.12.013
- Zhu C., Zhang T., Li Q., Chen X. and Wang K. 2023.** Depression and anxiety during the COVID-19 pandemic: Epidemiology, mechanism, and treatment. *Neuroscience Bulletin*, 39(4): 675–684. doi: 10.1016/j.bbr.2011.12.013
- Zimmermann F., Altenhofen S., Kist L., Leite C., Bogo M., Cognato G. and Bonan C.D. 2016.** Unpredictable chronic stress alters adenosine metabolism in zebrafish brain. *Molecular Neurobiology*, 53: 2518–2528. doi: 10.1007/s12035-015-9270-7



Research Paper

Effects of diazepam and nortriptyline on behavioral changes and chronic stress-induced depression in zebrafish (*Danio rerio*)

Mohadeseh Najarzadeh Ahangarkolaei¹, Reza Changizi^{2*}, Hamed Manouchehri²,
Ali Siahposht Khachaki³

DOI: 10.22124/japb.2025.30222.1566

Received: April 2025

Accepted: August 2025

Abstract

Depression is a mental disorder that according to global statistics, is becoming increasingly prevalent, highlighting the urgent need for further research on depression models and the development of novel antidepressant drugs. This study aimed to evaluate the individual and combined effects of diazepam and nortriptyline on behavioral and biochemical parameters in zebrafish (*Danio rerio*). A total of 384 zebrafish were initially divided into two main groups: a control group (unstressed) and a UCS group (subjected to stress) and within each group, fish were assigned to one of four subgroups: control, diazepam, nortriptyline, and diazepam + nortriptyline (eight treatments with three replicates). To induce depression-like states in zebrafish, the Unpredictable Chronic Stress (UCS) protocol was applied. Behavioral assessments were conducted using the Novel Tank Test (NTT), and biochemical analysis was carried out by measuring whole-body cortisol levels. Diazepam and nortriptyline led to significant improvements in behavioral parameters, including a notable increase in time spent in the upper zone and number of transitions to the upper zone, and a significant reduction in total distance traveled. These behavioral improvements were accompanied by a marked decrease in cortisol levels (from 1.01 ± 0.07 to 0.38 ± 0.16 ng/mL). The results are consistent with previous studies, confirming that the UCS protocol induces behavioral and neuroendocrine changes in zebrafish, which can be attenuated by the administration of diazepam and nortriptyline. Moreover, this study reinforces the utility of zebrafish as a model for investigating the behavioral and physiological impacts of stress.

Key words: Depression, Nortriptyline, UCS Protocol, Diazepam, Zebrafish.

1- Doctor of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Veterinary, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

3- Associate Professor in Department of Physiology, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran.

*Corresponding Author: changizi@iau.ac.ir