

## Effect of fish oil treatment during chronic hypoxia in pregnancy on memory impairment, brain morphometry changes and oxidative stress in adult male rat offspring

Aliheydari M, Ghotbeddin Z\*, Khazaeil K, Tabandeh MR

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran.

Received: 2019/09/11 | Accepted: 2020/04/21

### Abstract:

**Background:** One of the possible mechanisms to the nervous system growth restriction and behavioral impairment following hypoxia, is oxidative stress. According to the antioxidant effect of fish oil, the present study was designed to investigate the effect of fish oil treatment during chronic hypoxia in pregnancy on memory, brain morphometric changes and oxidative stress in adult rat offspring.

**Materials and Methods:** In this study female pregnant rat (Wistar) were used; they were randomly divided into 5 experimental groups: control, sham, hypoxia, fish oil and hypoxia groups treated with fish oil. Hypoxia with 10% oxygen and 90% nitrogen intensity was applied. Fetal brain morphometry was examined on the 15th and 20th day of pregnancy and the 30-day-old offspring. Passive avoidance memory and oxidative stress parameters were examined in the 30-day-old rat offspring.

**Results:** The brain weight average in the 15 and 20 day-old fetuses and 30-day-old offspring of the hypoxia group was significantly lower than the sham group ( $P<0.05$ ). Memory results evaluation indicated that the avoidance memory was significantly decreased in hypoxia group compared to the sham group ( $P<0.05$ ). Oxidative stress also increased significantly in the 30-day-old offspring of the hypoxia group compared to the sham group and fish oil treatment prevented the reduction of these parameters ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** According to these results, Fish oil treatment during chronic hypoxia in pregnancy can be attenuate fetal brain restriction, oxidative stress and memory impairment following hypoxia.

**Keywords:** Brain morphometry, Fish oil, Maternal hypoxia, Oxidative stress, Passive avoidance memory, Rat

**\*Corresponding Author:**

**Email:** z.ghotbeddin@scu.ac.ir

**Tel:** 0098916 600 3655

**Fax:** 0098 61 333 36312

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2020; Vol. 24, No 2, Pages 170-180*

Please cite this article as: Aliheydari M, Ghotbeddin Z, Khazaeil K, Tabandeh MR. Effect of fish oil treatment during chronic hypoxia in pregnancy on memory impairment, brain morphometry changes and oxidative stress in adult male rat offspring. *Feyz* 2020; 24(2): 170-80.

# اثر تیمار با روغن ماهی در طی هیپوکسی مزمن بارداری بر اختلال حافظه، تغییر مورفومتری مغز و استرس اکسیداتیو در زاده‌های موش صحرایی ماده بالغ

مریم علی‌حیدری<sup>۱</sup>، زهره قطب‌الدین<sup>۲\*</sup>، کاوه خزائیل<sup>۳</sup>، محمدرضا تابنده<sup>۲</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** یکی از مکانیسم‌های احتمالی برای محدودیت رشد سیستم عصبی و اختلالات رفتاری به‌دنبال اعمال هیپوکسی، استرس اکسیداتیو است. با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی روغن ماهی، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر روغن ماهی به‌طور هم‌زمان با اعمال هیپوکسی مزمن بارداری بر حافظه، تغییرات مورفومتری مغز و استرس اکسیداتیو در زاده‌های بالغ موش صحرایی طراحی شد.

**مواد و روش‌ها:** در این آزمایش از موش صحرایی ماده بارداری (نژاد ویستار) استفاده شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه آزمایشی تقسیم شدند: کنترل، شاهد، هیپوکسی، روغن ماهی و گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی. هیپوکسی با شدت اکسیژن ۱۰ درصد و نیتروژن ۹۰ درصد اعمال شد. مورفومتری مغز جنین در روزهای ۱۵ام و ۲۰ام بارداری و در زاده‌های ۳۰ روزه سنجیده شد. حافظه احترازی غیرفعال و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در زاده‌های موش صحرایی ۳۰ روزه ارزیابی شدند.

**نتایج:** میانگین وزن مغز در جنین‌های ۱۵ و ۲۰ روزه و زاده‌های ۳۰ روزه گروه هیپوکسی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود ( $P < 0.05$ ). نتایج ارزیابی حافظه، بیانگر کاهش معنی‌دار حافظه احترازی در گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه شاهد بود ( $P < 0.05$ ). استرس اکسیداتیو نیز در زاده‌های ۳۰ روزه گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری داشت و تیمار با روغن ماهی از کاهش این پارامترها جلوگیری کرد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، تیمار روغن ماهی در طی هیپوکسی مزمن دوران بارداری، باعث کاهش محدودیت رشد مغز جنین، استرس اکسیداتیو و اختلال حافظه ایجاد شده به‌دنبال هیپوکسی شد.

**واژگان کلیدی:** استرس اکسیداتیو، حافظه احترازی غیرفعال، روغن ماهی، مورفومتری مغز، موش صحرایی، هیپوکسی بارداری

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۹، صفحات ۱۸۰-۱۷۰

## مقدمه

مهم‌ترین سیستمی که تحت تأثیر این هیپوکسی قرار می‌گیرد، سیستم عصبی است و محدودیت رشد جنین با تأثیر بر سیستم عصبی در حال رشد، موجب اختلالات عصبی و بروز رفتار غیرطبیعی در طول زندگی می‌شود [۳]. FGR باعث کاهش حجم کل مغز و تغییر ساختار قشر، کاهش تعداد کل سلول‌ها و اختلال در سنتز میلین می‌شود. ارتباط بین نورون‌ها به‌دنبال نقص در مهاجرت عصبی و کاهش تعداد دندریت‌ها ضعیف می‌شود. اکثر مشکلات حرکتی و شناختی، به اختلال در تکامل سیستم عصبی دوران بارداری برمی‌گردد. رشد نامطلوب جنین، یک فاکتور کلیدی در تکامل نامناسب سیستم عصبی به حساب می‌آید [۴]. حساسیت مغز در حال رشد نسبت به هیپوکسی، بستگی به ترکیب لیپیدی غشای سلولی مغز، میزان پراکسیداسیون لیپید و دفاع آنتی‌اکسیدانی دارد. افزایش استرس اکسیداتیو به‌دنبال هیپوکسی بارداری، یک مکانیسم مهم برای محدودیت رشد جنین و اختلال شناخت بعد از تولد است. هیپوکسی داخل رحمی با افزایش تولید ROS، تأثیر مخربی بر تکامل جنین دارد و موجب آسیب بافت‌های حساس، از جمله سیستم عصبی در زاده‌ها می‌شود [۵]. مکانیسم جبران‌کننده به‌دنبال کاهش اکسیژن در طی هیپوکسی بارداری، افزایش فعالیت میتوکندری است که منجر به افزایش

هیپوکسی دوران بارداری یک بیماری شایع است که به‌دلیل نرسیدن جریان خون و اکسیژن کافی به مغز، باعث اختلال در برنامه تکاملی جنین می‌شود و دلیل اصلی برای آسیب مغزی در زاده‌هاست [۱]. به‌طور مشابه با انسان، هیپوکسی قبل از زایمان، باعث محدودیت رشد جنینی (FGR) در جوندگان می‌شود. FGR یکی از عوارض جانبی مهم هیپوکسی قبل از زایمان است که نه تنها مرگ‌ومیر نوزادان و اختلالات جنینی را افزایش می‌دهد، بلکه خطر ابتلا به بیماری‌هایی نظیر اختلال شناخت، تأخیر تکلم و اختلالات رفتاری را نیز در دوران بلوغ بالا می‌برد [۲].

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
  ۲. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
  ۳. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- \* **نشانی نویسنده مسئول:** بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
- تلفن: ۰۹۱۶۶۰۰۳۶۵۵  
دورنویس: ۰۶۱۳۳۳۳۶۳۱۲  
پست الکترونیک: z.ghotbeddin@scu.ac.ir  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۲۰  
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۲/۲

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار (محدوده وزنی  $220 \pm 25$  گرم) در روز ۶ تا ۱۵ بارداری استفاده شد. تمام مراحل آزمایش براساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، طراحی و با کد EE/97.24.3.49914/scu.ac.ir اجرا شد. حیوانات در طول مطالعه، در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد رطوبت ( $50 \pm 5$ ) نگهداری شدند. تمام حیوانات به‌صورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. موش‌ها از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه جندی‌شاپور اهواز تهیه و به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۳ تایی از موش‌های باردار در هر گروه تقسیم شدند: کنترل، شاهد، هیپوکسی، روغن ماهی با دوز ۱ میلی‌لیتر و گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی. جهت تعیین زمان دقیق بارداری، پس از جفت‌گیری، از موش‌های ماده اسمیر واژنی گرفته می‌شد و به محض دیدن اولین اسپرما‌توزوا، آن روز به‌عنوان روز صفر بارداری مشخص می‌شد. هیپوکسی با شدت اکسیژن ۱۰ درصد و نیتروژن ۹۰ درصد در جعبه هیپوکسی اعمال می‌شد [۱۲]. گروه‌های روغن ماهی در روز ۶ تا ۱۵ بارداری، روغن ماهی را به شکل گاواژ دریافت کردند [۱۳]. به گروه شاهد نیز در مدت‌زمان مشابه، سالی‌ن گاواژ شد. کلیه آزمایش‌ها در زمان روشنایی، بین ساعت ۸ صبح الی ۴ بعدازظهر به منظور جلوگیری از تأثیر ریتم شبانه‌روزی حیوان بر آزمایش‌ها انجام گرفت. حیوانات یک‌ساعت قبل از شروع آزمون به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا با شرایط آزمایشگاه عادت کنند. نمونه‌گیری از گروه‌های مختلف در ۳ نوبت انجام شد. در مرحله اول و دوم در روز ۱۵ و ۲۰ بارداری، موش‌ها توسط کتامین ( $100 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $10 \text{ mg/kg}$ ) بی‌هوش شدند [۱۴]. سپس جنین‌ها استخراج و مغز آن‌ها جدا شد و طول و عرض آن‌ها با استفاده از کولیس دیجیتال و وزنشان با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. مرحله سوم نمونه‌گیری در روز سی‌ام پس از تولد انجام شد و بعد از سنجش حافظه احترازی غیرفعال با استفاده از دستگاه شاتل‌باکس، حیوانات آسان‌کشی و مغز آن‌ها جدا شد. سپس وزن، طول، عرض، حجم و ضخامت مغز اندازه‌گیری و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت مغز سنجیده شد. سنجش حافظه احترازی غیرفعال از طریق دستگاه شاتل‌باکس این دستگاه از دو محفظه تاریک و روشن تشکیل شده است که حیوان در محفظه تاریک شوک دریافت می‌کند. روش

تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود [۶]. در سال‌های اخیر، به بررسی نقش اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد در پاتوفیزیولوژی هیپوکسی پرداخته شده است و مطالعات نشان می‌دهند که هیپوکسی بارداری، باعث افزایش تخریب DNA و پراکسیداسیون لیپید در کبد می‌شود و این اثر با تجویز آنتی‌اکسیدان N-acetylcysteine برمی‌گردد [۷]. رشد مناسب جنین و نوزاد، به‌ویژه رشد مغز در ۳ ماهه آخر بارداری و سال‌های اول بعد از تولد، سریع و به کیفیت محیط و تغذیه مادر وابسته است. دوکازا هگزانویک اسید (*DHA*) از خانواده اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره طولانی (*LC-PUFAs*) یا اسیدهای چرب امگا ۳ است که در غشای فسفولیپیدی اکثر سلول‌ها به‌ویژه سلول‌های عصبی یافت می‌شود. این اسید چرب، جزء اسیدهای چرب ضروری است که بدن قادر به سنتز آن نیست و باید از طریق رژیم غذایی وارد بدن شود [۸]. ماهی یا روغن ماهی با داشتن این اسید چرب، برای رشد و تکامل طبیعی جنین توصیه می‌شود [۹]. این اسیدهای چرب، طی بارداری به‌واسطه جفت، از گردش خون مادر به جنین منتقل می‌شوند و برای رشد بافت عصبی ضروری هستند. بیشتر گزارشات نشان می‌دهند که رژیم غذایی غنی از این اسیدهای چرب در طول بارداری، از اختلالات جفت، کاهش رشد جنین و زایمان زودرس جلوگیری می‌کند [۱۰]. یافته‌های بالینی نشان می‌دهند که در ۳ ماهه دوم بارداری، *DHA* به‌سرعت در بافت‌های قشری مغز و سیناپس‌های بینایی تجمع می‌یابد و در تکامل سیستم بینایی، بهبود شناخت و حافظه مؤثر است [۱۱]. این اسیدهای چرب با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی، باعث محافظت بافت در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند. روغن ماهی با داشتن اسیدهای چرب امگا ۳، نظیر *acid eicosapentaenoic* و *docosahexaenoic acid*، خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد و مصرف آن در موش صحرایی، باعث کاهش فعالیت MDA در گروه درمان نسبت به گروه کنترل می‌شود [۱۱]. با توجه به این‌که مکانیسم احتمالی برای محدودیت رشد جنین، تغییر مورفومتری مغز و اختلال حافظه ناشی از هیپوکسی و افزایش استرس اکسیداتیو است، کاربرد ترکیبات آنتی‌اکسیدان نظیر روغن ماهی می‌تواند در جلوگیری از کاهش رشد جنین، به‌خصوص کاهش رشد سیستم عصبی به‌دنبال هیپوکسی و بهبود فعالیت شناختی بعد از تولد، مؤثر باشد. بنابراین تحقیق حاضر، با هدف بررسی اثر روغن ماهی، هم‌زمان با ایجاد مدل هیپوکسی مزمن بارداری، بر استرس اکسیداتیو، تغییرات مورفومتری مغز و حافظه احترازی غیرفعال در زاده‌های موش صحرایی طراحی شد.

تیمار با روغن ماهی در طی هیپوکسی مزمن بارداری، ...

گروه شاهد مقایسه شدند. نتایج مربوط به حافظه احترازی غیرفعال در زاده‌ها در بخش (الف)، نتایج مربوط به پارامترهای مورفومتری مغز جنین و زاده‌ها در بخش (ب) و نتایج مربوط به استرس اکسیداتیو در بخش (ج) ارائه شدند.

(الف) نتایج مربوط به حافظه احترازی غیرفعال بین گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از دستگاه شاتل باکس:

در این بخش، میانگین مدت تأخیر در ورود به جعبه تاریک و مدت زمان سپری شده در جعبه تاریک، ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک، در گروه‌های مختلف بررسی و با یکدیگر مقایسه شد.

الف-۱- مقایسه میانگین مدت زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک (آزمون به‌خاطرآوری) و میانگین مدت زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک در گروه شاهد، هیپوکسی و دریافت‌کننده روغن ماهی به ترتیب  $208/66 \pm 48/31$ ،  $58/16 \pm 13/61$  و  $231/65 \pm 40/26$  ثانیه و در گروه هیپوکسی دریافت‌کننده روغن ماهی،  $132/5 \pm 16/92$  ثانیه به‌دست آمد. نتایج، بیانگر کاهش معنی‌دار مدت زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک در گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد ( $P=0/006$ )، روغن ماهی ( $P=0/004$ ) و هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی ( $P=0/03$ ) بود. در حالی‌که تیمار با روغن ماهی، مدت زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک را افزایش داد و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد (نمودار شماره ۱).

کار با این دستگاه، شامل ۳ مرحله آموزش، آزمون و اکتساب (به‌خاطرآوری) است.

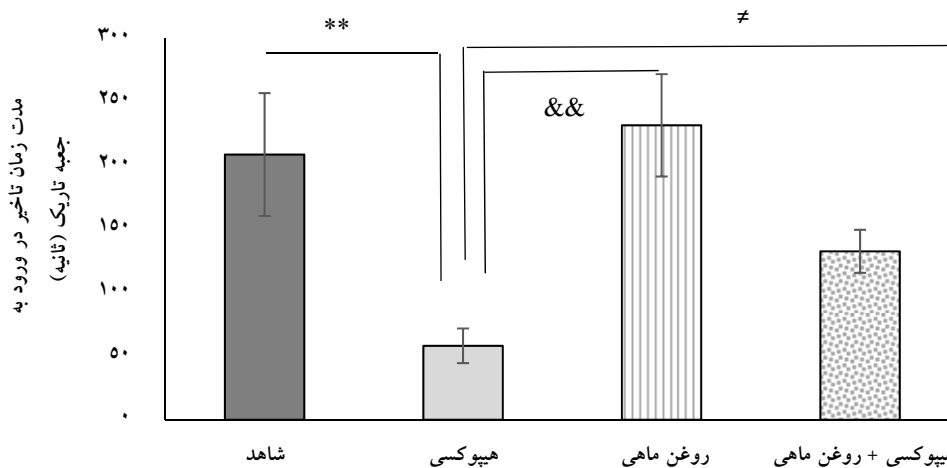
۱- مرحله آموزش: حیوان فقط با دستگاه آشنا می‌شد (بدون اعمال شوک).

۲- مرحله آزمون: ۲۴ ساعت بعد از آموزش، شوک با شدت جریان مشخص (فرکانس ۵۰ هرتز، شدت ۰/۵ میلی‌آمپر و به مدت ۲ ثانیه) به پای حیوان در محفظه تاریک اعمال می‌شد.

۳- مرحله اکتساب: به منظور تست به‌خاطرآوری و حافظه درازمدت، ۲۴ ساعت بعد از آموزش، موش در قسمت روشن قرار داده می‌شد و مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک و زمان سپری شده در محفظه تاریک به‌عنوان شاخص‌های حافظه اجتنابی درازمدت اندازه‌گیری می‌شدند [۱۵]. کلیه داده‌های حاصل از این مطالعه به‌صورت  $(\bar{X} \pm SEM)$  ارائه و تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از برنامه آماری SPSS ویرایش ۲۱ با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  انجام شد. تفاوت آماری پارامترهای مختلف در بین گروه‌های مختلف، در صورت نرمال و همگن بودن داده‌ها، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس ANOVA یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون متعاقب Tukey انجام شد.

## نتایج

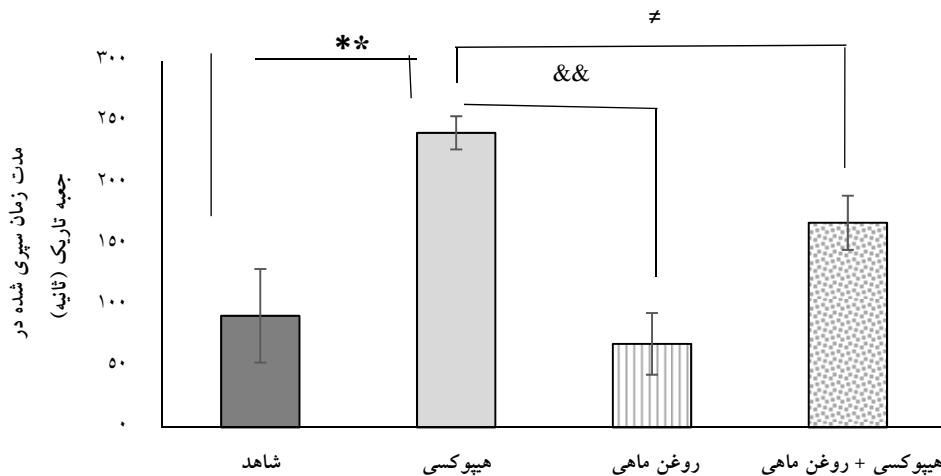
در نتایج به‌دست‌آمده، با توجه به این‌که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با شاهد مشاهده نشد، تمام گروه‌ها با



نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین زمان تأخیر در ورود به جعبه تاریک، ۲۴ ساعت پس از اعمال شوک (مرحله به‌خاطرآوری)، در گروه‌های مورد مطالعه. \*\*، && و ≠ به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد ( $P < 0/01$ )، روغن ماهی ( $P < 0/01$ ) و هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی ( $P < 0/05$ ) است. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده شده‌اند ( $n=8$ ).

الف-۲- مقایسه میانگین مدت زمان سپری شده در جعبه تاریک، ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک (آزمون به‌خاطر آوری) میانگین مدت زمان سپری شده در جعبه تاریک، ۲۴ ساعت بعد از اعمال شوک، در گروه شاهد  $38/31 \pm 91/33$  ثانیه و در گروه‌های هیپوکسی و دریافت‌کننده روغن ماهی به ترتیب  $13/61 \pm 24/13$  و  $26/25 \pm 33/26$  ثانیه به‌دست آمد. همچنین مدت زمان سپری شده در جعبه تاریک، در گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی

بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه نشان داد که مدت زمان سپری شده در جعبه تاریک، در گروه‌های هیپوکسی نسبت به گروه شاهد ( $P=0/005$ )، گروه دریافت‌کننده روغن ماهی ( $P=0/002$ ) و گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی ( $P=0/04$ ) افزایش معنی‌داری یافت (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین مدت زمان سپری شده در جعبه تاریک، ۲۴ ساعت پس از اعمال شوک در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده شده‌اند. \*، \*\* و && به ترتیب تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی، نسبت به گروه شاهد ( $P < 0/01$ )، روغن ماهی ( $P < 0/01$ ) و هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی ( $P < 0/05$ ) را نشان می‌دهد ( $n=8$ ).

ب) نتایج مربوط به مورفومتری مغز جنین و زاده‌ها:

در این بخش، نتایج مربوط به مورفومتری مغز در جنین ۱۵ و ۲۰ روزه و در زاده‌های ۳۰ روزه به ترتیب در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ به شرح ذیل آمده است.

ب-۱- میانگین وزن مغز جنین ۱۵ روزه: میانگین وزن مغز جنین در گروه شاهد  $0/081 \pm 0/0026$  گرم و در گروه‌های هیپوکسی و دریافت‌کننده روغن ماهی به ترتیب  $0/028 \pm 0/00268$  و  $0/081 \pm 0/0026$  گرم به‌دست آمد. میانگین وزن مغز در گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی نیز  $0/062 \pm 0/0058$  گرم بود. اعمال هیپوکسی، سبب کاهش معنی‌دار وزن مغز در جنین ۱۵ روزه نسبت به گروه شاهد شد ( $P < 0/001$ ). اما روغن ماهی سبب افزایش معنی‌دار وزن مغز در گروه هیپوکسی شد و اختلاف معنی‌داری در گروه تیمار شده با گروه شاهد مشاهده نشد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- میانگین  $\pm$  خطای معیار وزن مغز در جنین ۱۵ روزه

نام گروه	وزن مغز (گرم)
شاهد	$0/081 \pm 0/0026$
هیپوکسی	$0/028 \pm 0/00268^{***}$
روغن ماهی	$0/081 \pm 0/0026$
هیپوکسی + روغن ماهی	$0/062 \pm 0/0058$

\*\*\* اختلاف نسبت به گروه شاهد را در سطح  $P < 0/001$  نشان می‌دهد.

ب-۲- میانگین وزن و حجم مغز در جنین‌های ۲۰ روزه میانگین وزن مغز در جنین ۲۰ روزه گروه شاهد  $0/198 \pm 0/0034$  گرم و در گروه‌های هیپوکسی و دریافت‌کننده روغن ماهی به ترتیب  $0/148 \pm 0/0071$  و  $0/207 \pm 0/0089$  گرم به‌دست آمد. میانگین وزن مغز در گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی نیز  $0/192 \pm 0/0082$  گرم بود. وزن مغز در گروه هیپوکسی ( $P < 0/01$ ) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت و میانگین حجم مغز در گروه شاهد  $0/368 \pm 0/0016$  میلی‌متر مکعب و در گروه‌های

تیمار با روغن ماهی در طی هیپوکسی مزمن بارداری، ...

گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره ۲).

هیپوکسی، دریافت‌کننده روغن ماهی و گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی به ترتیب  $0/175 \pm 0/0016$ ،  $0/356 \pm 0/0017$  و  $0/3 \pm 0/013$  میلی‌متر مکعب به دست آمد. میانگین حجم مغز در

جدول شماره ۲- میانگین  $\pm$  خطای معیار وزن و حجم مغز در جنین ۲۰ روزه گروه‌های آزمایش

نام گروه	وزن مغز (گرم)	حجم مغز (میلی‌متر مکعب)
شاهد	$0/198 \pm 0/0034$	$0/368 \pm 0/0016$
هیپوکسی	$0/148 \pm 0/0071^{**}$	$0/175 \pm 0/0016^{***}$
روغن ماهی	$0/207 \pm 0/0089$	$0/356 \pm 0/0017$
هیپوکسی + روغن ماهی	$0/192 \pm 0/0082$	$0/3 \pm 0/013$

\*\* و \*\*\* اختلاف با گروه شاهد به ترتیب در سطح  $P < 0/01$  و  $P < 0/001$  را نشان می‌دهد.

گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/01$ ) و کاهش طول و عرض در گروه‌های تیمار شده با روغن ماهی نیز نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). ضخامت مغز در گروه‌های هیپوکسی و هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). (جدول شماره ۳)

ب-۳- میانگین وزن، حجم، طول، عرض و ضخامت مغز در زاده‌های ۳۰ روزه: میانگین  $\pm$  خطای معیار داده‌ها به‌طور کامل در جدول شماره ۳ نوشته شده است. وزن و حجم مغز در گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد در سطح معنی‌داری  $P < 0/001$  کاهش یافت. طول و عرض مغز نیز در گروه هیپوکسی نسبت به

جدول شماره ۳- میانگین  $\pm$  خطای معیار وزن، حجم، طول، عرض و ضخامت مغز در زاده‌های ۳۰ روزه گروه‌های آزمایشی

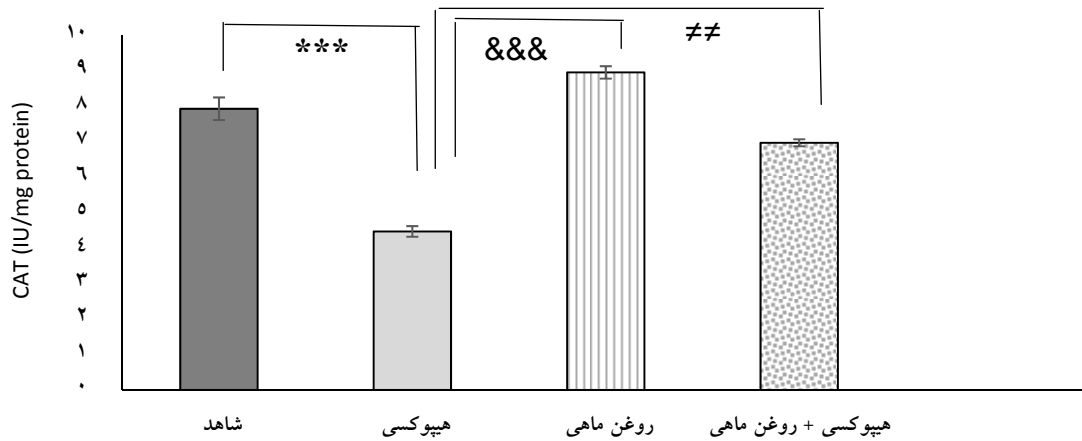
نام گروه مورد مطالعه	وزن مغز	حجم مغز	طول مغز	عرض مغز	ضخامت مغز
شاهد	$1/35 \pm 0/071$	$0/741 \pm 0/02$	$21/65 \pm 2/18$	$15/84 \pm 1/28$	$9/43 \pm 1/57$
هیپوکسی	$1/22 \pm 0/19^{***}$	$0/508 \pm 0/02^{***}$	$19/81 \pm 2/65^{**}$	$13/84 \pm 2/78^{**}$	$8/45 \pm 2/68^*$
روغن ماهی	$1/39 \pm 1/44$	$0/7 \pm 0/25$	$21/2 \pm 2/82$	$15/67 \pm 2/71$	$9/33 \pm 0/93$
هیپوکسی + روغن ماهی	$1/3 \pm 1/06$	$0/641 \pm 0/02$	$20/09 \pm 1/85^*$	$14/69 \pm 1/38^*$	$8/42 \pm 1/3^*$

\*, \*\*, و \*\*\* به ترتیب اختلاف نسبت به گروه شاهد در سطح  $P < 0/05$ ،  $P < 0/01$ ،  $P < 0/001$  را نشان می‌دهند.

هیپوکسی دریافت‌کننده روغن ماهی  $6/97 \pm 0/1$  به دست آمد. با مقایسه فعالیت کاتالاز، کاهش معنی‌داری در گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد ( $P = 0/001$ )، گروه روغن ماهی ( $P = 0$ ) و گروه هیپوکسی دریافت‌کننده روغن ماهی ( $P = 0/002$ ) مشاهده شد و روغن ماهی فعالیت کاتالاز را به‌طور معنی‌داری در گروه هیپوکسی افزایش داد (نمودار شماره ۳).

ج) نتایج مربوط به استرس اکسیداتیو نتایج مربوط به تغییرات شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت مغز زاده‌ها در نمودارهای شماره ۳ تا ۶ ارائه شده است.

ج-۱- کاتالاز (CAT) میانگین فعالیت کاتالاز در گروه‌های شاهد، هیپوکسی و نیز روغن ماهی به ترتیب  $7/93 \pm 0/32$ ،  $4/47 \pm 0/15$  و  $8/95 \pm 0/17$  و در گروه



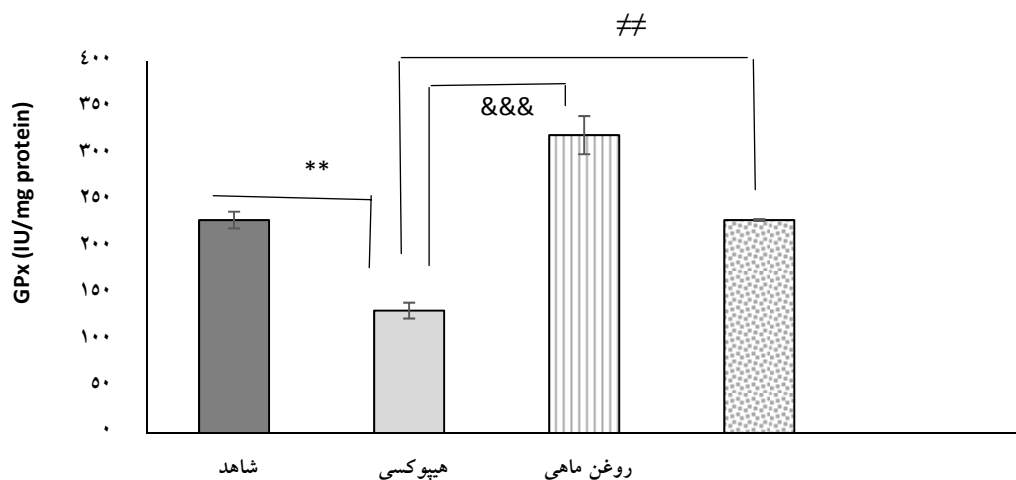
نمودار شماره ۳- مقایسه فعالیت کاتالاز در گروه‌های مورد مطالعه.

\*\*\*، &&& و # به ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد ( $P < 0.001$ )، روغن ماهی ( $P < 0.001$ ) و هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی ( $P < 0.01$ ) است. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده شده‌اند ( $n=5$ ).

نسبت به گروه شاهد ( $P=0.003$ )، روغن ماهی ( $P=0$ ) و هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی ( $P=0.002$ )، کاهش معنی‌داری یافت. در حالی که تیمار با روغن ماهی سبب افزایش فعالیت آنزیم GPx در گروه هیپوکسی شد و این گروه اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد (نمودار شماره ۴).

### ج-۲- گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)

میانگین فعالیت آنزیم GPx در گروه شاهد، هیپوکسی و نیز دریافت‌کننده روغن ماهی به ترتیب  $229/32 \pm 9$ ،  $131/78 \pm 8/53$  و  $320/77 \pm 20/54$  و در گروه هیپوکسی دریافت‌کننده روغن ماهی  $229/32 \pm 1$  به دست آمد. فعالیت این آنزیم در گروه هیپوکسی



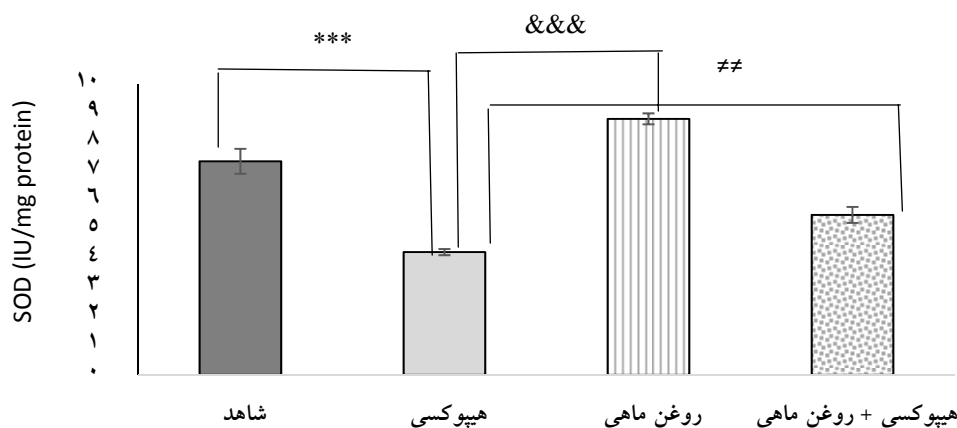
نمودار شماره ۴- مقایسه فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه.

\*\*\*، &&& و # به ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد ( $P < 0.01$ )، روغن ماهی ( $P < 0.001$ ) و هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی ( $P < 0.01$ ) است. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده شده‌اند ( $n=5$ ).

معنی‌داری در گروه هیپوکسی نسبت به گروه شاهد ( $P < 0.01$ ) مشاهده شد و مصرف روغن ماهی همزمان با اعمال هیپوکسی، فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز را به طور معنی‌داری در گروه هیپوکسی افزایش داد (نمودار شماره ۵).

### ج-۳- آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

میانگین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در گروه‌های شاهد، هیپوکسی و روغن ماهی به ترتیب  $7/35 \pm 0/43$ ،  $4/22 \pm 0/1$  و  $8/80 \pm 0/18$  و در گروه تیمار شده با روغن ماهی  $5/5 \pm 0/27$  به دست آمد. با مقایسه فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، کاهش



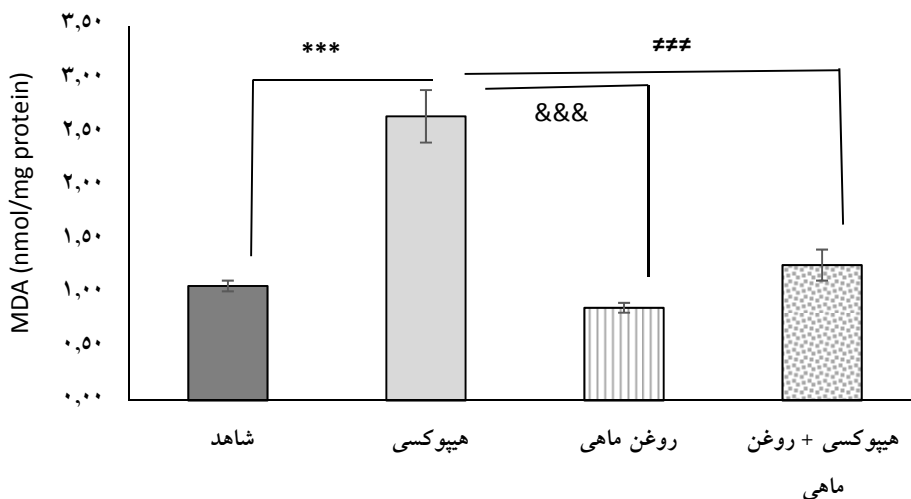
نمودار شماره ۵- مقایسه فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در گروه‌های مورد مطالعه.

\*\*\* و &&& اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.001$  نسبت به گروه شاهد و روغن ماهی و # اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  نسبت به گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی را نشان می‌دهد ( $n=5$ ).

آمد. بنابراین شاخص اکسیداسیون لیپیدی در گروه هیپوکسی، نسبت به تمام گروه‌های مورد مطالعه، افزایش معنی‌داری یافت ( $P < 0.001$ )؛ اما مصرف روغن ماهی در گروه هیپوکسی مؤثر بود و اکسیداسیون لیپیدی را کاهش معنی‌داری داد (نمودار شماره ۶).

ج-۴- مالون دی‌آلدئید (MDA)

اکسیداسیون لیپیدی در گروه شاهد، هیپوکسی و نیز دریافت‌کننده روغن ماهی به ترتیب  $1.07 \pm 0.05$ ،  $2.75 \pm 0.24$  و  $0.86 \pm 0.04$  و در گروه هیپوکسی دریافت‌کننده روغن ماهی  $1.26 \pm 0.14$  به دست



نمودار شماره ۶- مقایسه مالون دی‌آلدئید در گروه‌های مورد مطالعه.

\*\*\*، &&& و ### اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.001$  نسبت به گروه شاهد، روغن ماهی و گروه هیپوکسی تیمار شده با روغن ماهی را نشان می‌دهد ( $n=5$ ).

آن‌ها نیز اختلال حافظه مشاهده شد. همچنین هیپوکسی، باعث افزایش استرس اکسیداتیو در گروه‌های مورد مطالعه شد؛ اما تیمار روغن ماهی توانست از شدت آن بکاهد. در راستای این نتایج، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که به‌طور مشابه با انسان، هیپوکسی

بحث

یافته‌های حاصل از مقایسه مورفومتری مغز و نتایج حافظه، بیانگر این مطلب است که در چنین‌های گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه شاهد حجم و وزن مغز کاهش یافت و در زاده‌های



قبل از زایمان، باعث محدودیت رشد جنین در جوندگان می‌شود. همچنین FGR را به‌عنوان یکی از عوارض جانبی مهم هیپوکسی قبل از زایمان در انسان مطرح کرده‌اند [۲]. تغییر ساختار و عملکرد مغز در اغلب نوزادانی که با FGR به دنیا می‌آیند، مشاهده می‌شود. به‌طوری‌که نوزادانی که با FGR به دنیا آمده‌اند، دور سر کوچک‌تری نسبت به نوزادان طبیعی دارند [۱۶]. این موضوع از نظر کلینیکی اهمیت دارد، چرا که سایز کوچک‌تر سر و مغز در هنگام تولد، حاکی از تکامل و رشد نامناسب سیستم عصبی در دوران بارداری است. تحقیقات بالینی نشان می‌دهد که کاهش وزن مغز نوزادانی که در دوران بارداری از FGR رنج می‌برند، بیشتر مربوط به ناحیه خاکستری مغز است. کاهش حجم ماده خاکستری، مشکلاتی نظیر کاهش توجه و شناخت را به دنبال دارد. بعد از تولد، اختلال در سنتز میلین وجود دارد و حجم ماده سفید نیز کاهش می‌یابد [۱۷]. به‌طور خلاصه کاهش دور سر، کاهش حجم ماده خاکستری، حجم کل مغز، هیپوکمپ و مخ، تعداد سلول‌های عصبی، تأخیر در میلین‌سازی و کاهش ارتباط نورونی، از جمله تغییرات ساختاری مهم مغز به دنبال FGR هستند و اختلالات حرکتی - شناختی، بینایی، کاهش IQ، اختلالات رفتاری، توجه و پیش‌فعالی، اضطراب و در موارد شدید فلج مغزی از جمله تغییرات عملکردی و فیزیولوژیک مهم بعد از تولد است [۱۸]. یکی از عوارض مهم هیپوکسی بارداری، اختلال حافظه است که در درازمدت خود را نشان می‌دهد. Weis و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که هیپوکسی ایسکمی در بدو تولد عامل اصلی مرگ‌ومیر نوزادان است و در درازمدت منجر به اختلال نورولوژیک، نظیر اختلال شناخت و حافظه، فلج مغزی و صرع می‌شود و اتوفازی به‌ویژه در ناحیه CA3 به‌عنوان مکانیسم احتمالی برای این اختلال حافظه ناشی از هیپوکسی مطرح شد [۶]. نتایج مطالعه Ikeda و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز بیانگر افزایش خطای حافظه مرجع در ماز شعاعی ۸ بازویی در موش‌هایی است که در روز ۷ام پس از تولد در معرض ایسکمی - هیپوکسی قرار گرفتند. به‌نظر می‌رسد اختلال در مسیر کولینرژیک که از مغز جلویی به سمت کورتکس می‌رود، می‌تواند به‌عنوان مکانیسم احتمالی اختلال حافظه بلندمدت مطرح باشد. اغلب مطالعاتی که به مکانیسم درگیر برای آسیب مغز و اختلال حافظه ناشی از هیپوکسی می‌پردازند، از مدل‌های مختلف حیوانی مشتق می‌شوند. نکته کلیدی این است که کاهش اکسیژن می‌تواند بر متابولیسم مغز تأثیر بگذارد. هیپوکسی / ایسکمی شدید با کاهش شدید ذخایر انرژی بافت، منجر به وقایع بیوشیمیایی کوتاه‌مدت نظیر اسیدوز، سمیت تحریکی گلوتامات، تولید نیتریک اکسید و ایجاد استرس

اکسیداتیو در سیستم عصبی مرکزی می‌شود. این وقایع بیوشیمیایی به نوبه خود، تشکیل سیستم عصبی را به تأخیر می‌اندازد و به آپوپتوز و تشکیل التهاب کمک می‌کند [۱۹]. مکانیسم جبران‌کننده به دنبال کاهش اکسیژن در طی هیپوکسی بارداری، افزایش فعالیت میتوکندری است که منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود [۶]. تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن می‌تواند در پاتوژنز آسیب ماده سفید مغز و مرگ نورونی به دنبال فعال شدن آستروسیت‌ها با آنزیم iNOS نقش داشته باشد [۲۰]. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار با روغن ماهی، اثر مثبتی بر وزن و حجم مغز جنین و زاده‌ها دارد و باعث بهبود حافظه احترازی در موش‌هایی می‌شود که در معرض هیپوکسی بارداری قرار گرفته‌اند. همچنین استرس اکسیداتیو را در گروه‌های هیپوکسی کاهش می‌دهد. نوروزن با مهاجرت، ارگانیزاسیون و سنتز میلین دنبال می‌شود. بخش عمده‌ای از تکامل ساختار مغز قبل از تولد اتفاق می‌افتد، در حالی‌که ارگانیزاسیون و سنتز میلین تا چندین سال بعد از تولد ادامه می‌یابد. مراحل تکامل نرمال به عوامل مختلفی نظیر فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، پروتئین‌های خاص و تغذیه مناسب وابسته است. بخش عمده میلین از لیپید و اسید چرب است، بنابراین رژیم غذایی حاوی اسیدهای چرب برای سنتز میلین، ارگانیزاسیون و تکامل طبیعی و نرمال ضروری می‌باشد [۲۱]. اسیدهای چرب غیراشباع و روغن ماهی بخش مهمی از ساختار ماده سفید مغز را تشکیل می‌دهند و در ساختمان غشای سلولی و غلاف میلین اطراف آکسون شرکت دارند. سیالیت غشا تا حد زیادی به این اسیدهای چرب وابسته است. استحکام ساختار میلین برای انتقال آکسونی مناسب و ارتباط نورونی ضروری است و رژیم‌های غذایی غنی از اسیدهای چرب غیراشباع با پایداری و استحکام میلین و حفظ سیالیت غشا به مورفولوژی طبیعی مغز، ارتباط نورونی مناسب بین شبکه‌های نورونی و عملکرد نرمال سیستم عصبی کمک می‌کنند [۲۲]. مطالعات آزمایشگاهی و بالینی نشان می‌دهند که مصرف روغن ماهی به‌خاطر داشتن اسیدهای چرب غیراشباع از جمله DHA در طی دوران بارداری اثر مهمی بر رشد جنین، رشد مغز و افزایش یادگیری، حافظه و شناخت بعد از تولد دارد [۲۳]. مطالعات Yonekubo و همکاران نیز بیانگر افزایش توانایی یادگیری در زاده‌های متولدشده از موش‌هایی است که مادران آن‌ها طی بارداری روغن ماهی مصرف می‌کردند [۲۴]. DHA از اصلی‌ترین اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۳ در مغز است که در تکامل نورونی نرمال، یادگیری و حافظه، شکل‌پذیری سیناپسی، تنظیم بیان ژن، سیگنالینگ سلول و افزایش LTP نقش دارد [۲۵]. مکانیسم احتمالی در اثر محافظتی روغن ماهی و بهبود

SOD و کاهش میزان MDA مؤثر است [۲۹].

#### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که هیپوکسی مزمن بارداری با افزایش استرس اکسیداتیو باعث محدودیت رشد جنین و تغییرات مورفومتری نظیر کاهش وزن و حجم مغز جنین می‌شود و این تغییر مورفومتری در دوره حساس از شکل‌پذیری مغز منجر به اختلال حافظه در زاده‌ها نیز می‌شود. در حالی که تیمار با روغن ماهی با کاهش استرس اکسیداتیو از محدودیت رشد مغز جنین، تغییر مورفومتری مغز در دوران جنینی و اختلال حافظه ناشی از هیپوکسی در زاده‌ها جلوگیری می‌کند.

#### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب پژوهانه در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

#### References:

- [1] Akhavan MM, Foroutan T, Safari M, Sadighi-Moghaddam B, Emami-Abarghoie M, Rashidy-Pour A. Prenatal exposure to maternal voluntary exercise during pregnancy provides protection against mild chronic postnatal hypoxia in rat offspring. *Pak J Pharm Sci* 2012; 25(1): 233-38.
- [2] Levine TA, Grunau RE, McAuliffe FM, Pinnamaneni R, Foran A, Alderdice FA. Early childhood neurodevelopment after intrauterine growth restriction: a systematic review. *Pediatrics* 2015; 135(1):126-41.
- [3] Wei B, Li L, He A, Zhang Y, Sun M, Xu Z. Hippocampal NMDAR-Wnt-Catenin signaling disrupted with cognitive deficits in adolescent offspring exposed to prenatal hypoxia. *Brain Res* 2016; 1631:157-64.
- [4] Bamfo JE, Odibo AO. Diagnosis and management of fetal growth restriction. *J Pregnancy* 2011; 2011: 640715.
- [5] Fuhrmann DC, Dominik C, BRÜNE B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol* 2017; 12: 208-215.
- [6] Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, Valentim LM, Mota CS, Dalmaz C, et al. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 2012; 12(2): 271-9.
- [7] Thornton C, Leaw B, Mallard C, Nair S, Jinnai M, Hagberg H. Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Front Cell Neurosci* 2017; 248(11): 1-19.

شناخت و حافظه، کاهش استرس اکسیداتیو است. به‌طوری‌که نتایج این تحقیق نیز بیانگر کاهش استرس اکسیداتیو در گروه‌های تیمار شده با روغن ماهی بود و همچنین مطالعات پیشین در این راستا نشان می‌دهند که روغن ماهی با کاهش استرس اکسیداتیو باعث از بین رفتن اختلال حافظه بعد از TBI در موش صحرایی می‌شود [۲۶]. افزایش تولید پراکسید لیپید منجر به فعال شدن آنزیم‌های سلولی می‌شود که فرآیند نورودژنراتیو را به‌دنبال دارد و درمان مزمن با آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر  $\alpha$ -tocopherol باعث بهبود عملکرد سیستم عصبی می‌شود [۲۷]. مطالعه Sakai و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان می‌دهد که اسیدهای چرب امگا ۳ به‌ویژه Docosahexaenoic از بیماری‌های قلبی - عروقی جلوگیری می‌کند و Docosahexaenoic با کاهش استرس اکسیداتیو از طریق افزایش پاسخ‌های آنتی‌اکسیدان NRF2 از آسیب DNA در سلول‌های اندوتلیال عروق جلوگیری می‌کند [۲۸]. مشخص شده است که پیش‌درمانی با DHA باعث محافظت سلول‌ها از آسیب اکسیداتیو القا شده با H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می‌شود و DHA در کاهش تولید ROS و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر GPx

- [8] Ratnayake WM, Galli C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann Nutr Metab* 2009; 55:8-43.
- [9] Jung UJ, Torrejon C, Tighe AP, Deckelbaum RJ. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: mechanisms underlying beneficial effects. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(6): 2003S-9S.
- [10] Carvajal JA. Docosahexaenoic acid supplementation early in pregnancy may prevent deep placentation disorders. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 1-10.
- [11] Gould JF, Smithers LG, Makrides M. The effect of maternal omega-3 (n-3) LCPUFA supplementation during pregnancy on early childhood cognitive and visual development: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2013; 97(3): 531-44.
- [12] Jang EA, Longo LD, Goyal R. Antenatal maternal hypoxia: criterion for fetal growth restriction in rodents. *Front Physiol* 2015; 176 (6): 1-17.
- [13] Albert BB, Vickers MH, Gray C, Reynolds C M, Segovia SA, Derraik JG, et al. Fish oil supplementation to rats fed high-fat diet during pregnancy prevents development of impaired insulin sensitivity in male adult offspring. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1-27.
- [14] Etten V. Recommended Methods of Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia for

- Laboratory Animal Species. *Inst for Anim Stud*; 460 (718): 839-7100.
- [15] Ghotbeddin Z, Moazedi AA, Parham GA. Effect of combined administration of Zinc chloride and Aluminum chloride on memory and motor activity of young rats. *J Physiol Pharm Pharmacol* 2007; 11(2): 146-152.
- [16] Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Rossignol AS, Lazeyras F, et al. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 2004; 56(1):132.
- [17] Businelli C, Wit C, Visser GH, Pistorius LR. Ultrasound evaluation of cortical brain development in fetuses with intrauterine growth restriction. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med* 2015; 28(11): 1302-7.
- [18] Miller SL, Huppi PS, Mallard C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J Physiol* 2016; 594(4): 807-23.
- [19] Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004; 207(18): 3149-54.
- [20] Volpe JJ. Cerebral white matter injury of the premature infant—more common than you think. *Pediatrics* 2003; 112(1): 176-80.
- [21] Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 2007; 137(4): 855-9.
- [22] Abu-Ouf NM, Jan MM. The influence of fish oil on neurological development and function. *Can J Neurol Sci* 2014; 41(1): 8-13.
- [23] Daniels JL, Longnecker MP, Rowland AS, Golding J. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. *Epidemiology* 2004; 15(4): 394-402.
- [24] Yonekubo A, Honda S, Okano M, Takahashi K, Yamamoto Y. Dietary fish oil alters rat milk composition and liver and brain fatty acid composition of fetal and neonatal rats. *J Nutr* 1993; 123(10): 1703-8.
- [25] Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 2000; 275(40): 30749-52.
- [26] Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotraum* 2004; 21(10):1457-67.
- [27] Yamada K, Han T, Senzaki D, Kameyama K, Nabeshima T. Protective effects of idebenone and  $\alpha$ -tocopherol on  $\beta$ -amyloid-(1–42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* 1999; 11(1): 83-90
- [28] Sakai C, Ishida M, Ohba H, Yamashita H, Uchida H, Yoshizumi M, et al. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PLoS One* 2017; 12(11): e0187934
- [29] Clementi ME, Lazzarino G, Sampaiolese B, Brancato A, Tringali G. DHA protects PC12 cells against oxidative stress and apoptotic signals through the activation of the NFE2L2/HO-1 axis. *Int J Mol Med* 2019; 43(6): 2523-31.