University of Mosul

College of Dentistry

The Ameliorating Effects of Melatonin on Behavioral Parameters and Salivary Glands Histology after Induction of Autistic Like Behavior by Acetaminophen Administration in Rat pups

A Thesis Submitted by

Hiba Adnan Mohammed

B.Sc Pharmacy

To

The Council of Dentistry College / Mosul University

as a Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science

in

Pharmacology/ Dental Pharmacology

Supervised by

Professor	Assistant Professor
Dr. Ghada A. Taqa	Dr. Luma I. Al-Allaf

2021AD 1443 AH

ABSTRACT

Background: Autism Spectrum Disorder (ASD) is a spectrum of a complex, lifelong developmental disability. A strong suggestions that genetic and environmental factors are sharing together in ASD pathogenesis and one example of drugs that may develop autism is acetaminophen.

Objective: study aims to examine the effect of acetaminophen on some anatomical parameters (body weight and eye opening) in male rats after early postnatal exposure to acetaminophen, and on several behavioral outcomes and its role to precipitate the autistic-like behavior with investigating the ameliorating role of melatonin on these parameters. In addition, to examine the role of melatonin on improvement of oxidative stress status and on the improvement the histological structure of submandibular salivary gland of rat pups after acetaminophen exposure.

Materials and Methods: Thirty healthy Albino male rat pups were selected for this study. At post natal day 3 (PND3), rat pups were divided into three groups (10 pups\ group). group1were served as a control group and includes pups which were injected subcutaneously with normal saline for 7 days then gavaged with normal saline for 2 weeks , group 2 includes pups which were injected subcutaneously in a dose (50 mg/kg) of acetaminophen once daily for 7 days then these pups were gavaged with normal saline for 14 days group 3 includes pups which were injected subcutaneously in a dose (50 mg/kg) acetaminophen once daily for 7 days then gavaged with melatonin (10 mg/kg) for 14 days. Developmental parameters were monitored and Five behavioral test, such as nest seeking test at PND8, the negative geotaxis test was done at "PND 15 and 17", open field test at PND21, modified T-maze were performed test at PND22, 23, and 24 and social interaction test at PND 25.

Blood samples were obtained for biochemical examination at PND 30 "the end of the experiment" then rats euthanized by ether and salivary glands were excised for histological examination.

Results: The present study demonstrated that acetaminophen exposed rat pups exhibited a significantly decrease in body weight when compared with control, and melatonin treated groups. A significant delay in the eye opening in pups of acetaminophen group when compared to that control day and melatonin treated groups.

According to behavioral tests, at PND 8 nest seeking test showed that the time of pups of acetaminophen group to approach maternal bedding was significantly faster than time of control group. At PND (15,17) negative geotaxis test showed a significant increase in time spent to rotate 180° of the pups of acetaminophen group when compared with that of the control group and melatonin treated group

Data of open field test showed that pups of acetaminophen group were traveled significantly more total distance (number of squares crossed) compared to those traveled by pups of control and melatonin treated groups These results demonstrate that the locomotors activity and anxiety levels of acetaminophen groups were significantly higher than control group and melatonin treated group.

The data of spontaneous alternation rate from three consecutive days (PNDs 22,23,24) in the T-Maze test revealed that acetaminophen group was significantly lowest when it was compared to the control group and melatonin treated group.

In sociability test, pups of acetaminophen group showed lower social interaction index compared to those of the control and of melatonin treated groups.

The biochemical result of this study showed that the serum GSH level was significantly decreased in rats which exposed to acetaminophen alone than those of rats in control, and of melatonin treated groups.

Histmorphometric result of salivary glands of this study showed significantly different in sections of pups of acetaminophen compared to the melatonin treated groups.

Conclusion: Administration of acetaminophen at dose 50 mg/kg/day for 7 days induces autistic like behavioral manifested by several alteration in rat pups. These alteration include decrease in the body weight, delay in eye opening´s day, alteration in behavioral outcomes, oxidative stress status and change in submandibular gland histology. These alteration were ameliorated by administration with melatonin (10 mg/kg for14 days) after exposure to acetaminophen.

جامعة الموصل

كلية طب الأسنان

تأثيرات تحسين مادة الميلاتونين على الانماط السلوكية وأنسجة الغدد اللعابية بعد تحفيز السلوك المشابة للتوحد نتيجة أعطاء عقار الاسيتامينوفين في جراء الجرذان

رسالة تقدمت بها

هبة عدنان محمد

بكالوريوس صيدلة

إلى

مجلس كلية طب الأسنان

جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في

علم الأدوية / أدوية الفم والاسنان

بإشراف

الأستاذ	الأستاذ المساعد
د.غادة عبد الرحمن طاقة	**د. لمى إبراهيم العلاف**

1443هـ **2021 م**

الخلاصة

الهدف : تهدف الدراسة الى فحص تأثير الاسيتامينوفين على بعض المؤشرات التشريحية (وزن الجسم وفتح العين) في ذكور الجرذان بعد التعرض المبكر بعد الولادة للاسيتامينوفين وعلى العديد من النتائج السلوكية ودوره في ترسيب السلوك المشابه للتوحد مع فحص دور الميلاتونين في تحسين تلك المؤشرات. بالإضافة الى فحص دور الميلاتونين في تحسين الاجهاد التأكسدي عن طريق تقدير مستوى الكلوتاثيون وكذلك دوره في تحسين التركيب النسيجي للغدد اللعابية تحت الفك السفلي لصغار الجرذان وذلك بعد تعرضهم للاسيتامينوفين.

المواد وطرائق العمل : تم اختيار 30 من ذكور صغار الجرذان البيضاء الاصحاء لهذه الدراسة .في اليوم الثالث بعد الولادة، تم تقسيم الجراء(صغار الجرذان) الى ثلاث مجموعات (عشرة صغار لكل مجموعة). تم استخدام المجموعة الاولى كمجموعه السيطرة وتضمنت الجراء الذين تم حقنهم تحت الجلد بمحلول الملح الفسيولوجي لمدة سبعه أيام ثم جرعوا بمحلول الملح الفسيولوجي لمدة اسبوعين. **المجموعة الثانية** شملت الجراء الذين تم حقنهم تحت الجلد بجرعه (50ملغم /كغم) من الاسيتومينوفين مرة واحدة يوميا لمدة سبعة أيام ثم تم تجريعهم بمحلول الملح الفسيولوجي لمدة اسبوعين. **المجموعة الثالثة :** شملت الجراء الذين حقنوا تحت الجلد بجرعه (50ملغم/كغم) من الاسيتومينوفين مرة واحدة يومياً لمدة سبعة أيام ثم جرعوا بالميلاتونين بجرعة (10ملغم/كغم) لمدة اسبوعين. ثم تم مراقبة المؤشرات المتعلقة بالتطور مثل وزن الجسم في يوم (0،7،14،21،30 بعد الولادة) مع فتح العين يوم (13،14،15،16،17بعد الولادة)، ثم تم أجراء خمسة اختبارات سلوكية مثل اختبار البحث عن العش في يوم 9 بعد الولادة، واختبار الانجذاب الجغرافي السلبي في يوم (15و17)، واختبار المجال المفتوح يوم21 وتم أجراء اختبار المتاهة المعدل في(22، 23و24 بعد الولادة) واختبار التفاعل الاجتماعي في يوم (25 بعد الولادة). في نهاية التجربة يوم (30 بعد الولادة) تم جمع عينات الدم للتحليل الكيمائي الحيوي ثم تم القتل الرحيم للجرذان بوساطه الأثير ثم اخذ الغدد اللعابية تحت الفك السفلي لتحضيرها واخضاعها للفحص النسيجي .

النتائج : أظهرت الدراسة الحالية أن الجراء المعرضة للاسيتامينوفين أظهرت نقصان ملحوظاً وفرق معنوي في وزن الجسم (36.24±0.97) بالمقارنة مع مجموعه السيطرة والمجموعه المعالجة بالميلاتونين(44.98±0.87) و (46.97±2.16)على التوالي. تأخر

ملحوظ في فتح العين في جراء مجموعة الاسيتامينوفين (16.60±0.54) بالمقارنة مع مجموعه السيطرة (15.16±0.75) والمجموعة المعالجة بالميلاتونين (15.50±0.53). وفقاً للاختبارات السلوكية، اظهر أختبارالبحث عن العش ان الوقت الذي قضاه جراء مجموعة الاسيتامينوفين للوصول الى فرشه الام كان(10.00±1.51) ثانية و هو اعلى بفرق معنوي من مجموعه السيطرة(4.50±2.19) ثانية. في اليوم 15 أظهر اختبار الانجذاب الجغرافي السلبي ارتفاع معنوي في الوقت الذي قضاه للالتفاف º180 وذلك للجراء مجموعه الاسيتامينوفين (7.30±2.86) ثانيه بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (4.56±0.63) ثانية والمجموعة المعالجة بالميلاتونين (3.50±0.63) ثانية. بينما في اليوم السابع عشر بعد الولادة كان هناك زيادة بفرق معنوي ملحوظ في الوقت الذي تم قضاؤه للالتفاف 180 º في اختبار الانجذاب الجغرافي السلبي في الجراء التابعين للمجموعة الاسيتامينوفين (7.40±2.90) ثانية بالمقارنة مع مجموعه السيطرة (3.12 ±1.33) ثانية والمجموعة المعالجة بالميلاتونين (4.18 ±1.43) ثانية.

أظهرت بيانات اختبار الميدان المفتوح أن الجراء من مجموعه الاسيتامينوفين قد انتقلوا بمسافه اجمالية اكبر بكثير(عدد المربعات المقطوعة) (31±8.34) مقارنة بتلك التي انتقلت بواسطة جراء السيطرة (20±4.08) وجراء المجموعة المعالجة بالميلاتونين(22±7.43). توضح هذه النتائج ان الفعالية الحركية ومستوى القلق في مجموعه الاسيتامينوفين كان اعلى معنوياً من مجموعتي السيطرة والمجموعة المعالجة بالميلاتونين. أظهرت نتائج المناورة التلقائية في اختبار المتاهة أن نسبة معدل المناورة في ثلاثة أيام متعاقبة (22،23،24بعد الولادة) للمجموعة الاسيتومينوفين (45.83±15.95 %) هو اقل بشكل ملحوظ عند مقارنته بمجموعة السيطرة(91.66± 9.62 %) والمجموعة المعالجة بالميلاتونين (91.66± 16.67%).

في اختبار التفاعل الاجتماعي ، أظهرت جراء مجموعه الاسيتومينوفين(30.00±7.07) تفاعل اجتماعي أقل بالمقارنة مع مجموعتي السيطرة(86.00±5.47) و المعالجة بالميلاتونين (84.00±5.47)%.

أظهرت نتائج الفحص الكيمائي الحيوي في هذه الدراسة أن مستوى الكلوتاثيون في المصل أنخفض بشكل كبير في الجرذان التي تعرضت للاسيتامينوفين (2.26±0.44) بالمقارنة مع الجرذان في مجموعات السيطرة و المعالجة بالميلاتونين (3.67±0.45) ،(4.48±0.51) على التوالي.

أظهرت النتائج النسيجية للغدة اللعابية تحت الفك السفلي لهذه الدراسة أن متوسط معدل قطر القنوات المخططة كان (93.00±7.71) ما يكرون، (30.22±1.80) ما يكرون،(30.38±2.42) ما يكرون في شرائح جراء مجموعات السيطرة، الاسيتامينوفين والمعالجة بالميلاتونين على التوالي. بينما كان معدل قطر الوعاء للقنوات المخططة (46.04±1.65) ما يكرون، ,(12.56±0.49) ما يكرون، (7.22±0.53) ما يكرون في شرائح جراء مجموعات السيطرة، الاسيتامينوفين و المعالجة بالميلاتونين على التوالي. من جهة اخرى كان معدل ارتفاع البطانة الظهارية للقنوات المخططة للغدد اللعابية تحت الفك السفلي (17.64±0.36) ما يكرون، (6.56±0.31) ما يكرون (10.08±0.35) ما يكرون في شرائح جراء مجموعات السيطرة، الاسيتامينوفين والمعالجة بالميلاتونينعلى التوالي. أظهر فحص الشرائح التابعة لمجموعات السيطرة، الاسيتامينوفين والمعالجة بالميلاتونين أن معدل قطر الاسيني كان (23.74±1.14) مايكرون ،(21.70±0.75) ما يكرون (25.32±0.82) مايكرون بالتعاقب. بالإضافة الى أن معدل ارتفاع البطانة الظهارية للأسيني كان (10.04±0.31) ما يكرون، (12.46±0.64) ما يكرون ،(10.12±0.28) ما يكرون في شرائح جراء مجموعات السيطرة، الاسيتامينوفين والمعالجة بالميلاتونين على التوالي.

الاستنتاج : أن اعطاء الاسيتومينوفين بجرعه (50ملغم /كغم) من اليوم الثالث بعد الولادة يومياً الى اليوم العاشر بعد الولادة قد أستحدث سلوك مشابه للتوحد تم التعبير عنه من خلال العديد من التغيرات في الجراء شملت هذه التغييرات نقصان في وزن الجسم، تأخر في فتح العين ، تغييرات في نتائج السلوك، وفي حاله الاجهاد التأكسدي وكذلك تغيرات في التركيب النسيجي للغدد اللعابية تحت الفك السفلي، تم تحسين هذه التغييرات عن طريق اعطاء الميلاتونين بجرعة (10ملغم/كغم) لمدة اسبوعين بعد التعرض للأسيتومينوفين.