

Comparison of Currant Hydroalcoholic Extract and Diazepam on Serum Corticosterone Levels in Adult Male Mice

مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی مویز و دیازپام بر میزان سرمی هورمون کورتیکوسترون در موش‌های سفید آزمایشگاهی نر بالغ

E. Hosseini^{1*}, D. Mehrabani², Y. Avazpour³,
M. RafieiRad⁴

1. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran, 2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran, 3. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran, 4. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Izeh Branch, Izeh, Iran
(Received: Aug. 5, 2013; Accepted: Sep. 3, 2014)

سید ابراهیم حسینی^{۱*}، داوود مهربانی^۲،
یاسمن عوض‌پور^۳، مریم رفیعی‌راد^۴

۱. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران، ۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران، ۳. کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران، ۴. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه، ایذه، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۴، تاریخ تصویب: ۹۳/۶/۱۲)

چکیده

اضطراب و استرس‌های مختلف از طریق تحریک محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال باعث افزایش میزان گلوکوکورتیکوئیدها در خون می‌گردند که در دراز مدت می‌توانند سلامت جسمانی و روانی فرد را به خطر اندازند. این مطالعه با هدف مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی مویز و دیازپام بر میزان کورتیکوسترون در سرم خون موش‌های آزمایشگاهی نر بالغ انجام گردید. در این مطالعه از ۴۸ سر موش سفید آزمایشگاهی نر بالغ استفاده شد که به ۶ گروه ۸ تایی شامل گروه‌های کنترل (فاقد تیمار)، شاهد (دریافت کننده آب مقطر) و ۴ دسته تجربی دریافت کننده دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی مویز و دریافت کننده دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازپام به صورت گاواژ تقسیم شدند. پس از ۱۵ روز که موش‌ها در ماز صلیبی مورد ارزیابی استرس قرار گرفتند، با خون‌گیری از قلب آنها میزان هورمون کورتیکوسترون اندازه‌گیری و نتایج با کمک آزمون‌های تجزیه واریانس یک طرفه و توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکلی مویز در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) و دیازپام باعث کاهش معنی‌دار ($P \leq 0.01$) در میزان سرمی کورتیکوسترون می‌شوند. دیازپام احتمالاً از طریق گیرنده‌های بنزودیازپینی و با تسهیل اثر مهارى گابا و عصاره مویز احتمالاً از طریق تحریک مسیرهای نورآدرنژیک به ترتیب باعث کاهش و افزایش میزان کورتیکوسترون در خون می‌شوند.

Abstract

Glucocorticoids are observed to increase at anxiety and different stressful situations. This augmentation is driven by stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis which can threaten physical and mental health in long-term. Thus, this study compared the effects of diazepam and currant hydroalcoholic extract on serum corticosterone level in adult male rat. In this study, 48 adult male mice were used in 6 groups of 8 animals, including the control (no treatment), Sham (receiving water) and 4 experimental groups receiving doses of 100, 200, 400 mg/kg from currant hydroalcoholic extract and 1 mg/kg of diazepam by gavage. After 15 days, rats perceived stress in elevated plus maze, after which corticosterone level was measured in the serum of the blood collected from their heart. Results were statically analyzed using ANOVA and Tukey's test. The results of this study showed that the doses of 200 and 400 mg/kg from currant extract significantly increases ($P \leq 0.05$) and diazepam significantly decreases ($P \leq 0.01$) the corticosterone levels I serum. Diazepam reduced corticosterone levels in serum by affecting the benzodiazepine receptors and facilitating inhibitory effect of GABA while currant extract increased it probably by stimulating noradrenergic pathways.

Keywords: Diazepam, Currant extract, Corticosterone, Mice.

واژه‌های کلیدی: دیازپام، عصاره هیدروالکلی مویز، کورتیکوسترون، موش.

مقدمه

محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) یک سیستم کنترل مرکزی است که در همراهی سیستم عصبی و هورمونی در تنظیم شرایط فیزیوشیمیایی ارگانیسم بدن نقش داشته و باعث افزایش سازش پذیری جانور با شرایط تنش و طبیعی ماندن عملکردهای فیزیولوژیک بدن می‌گردد (Brigitte et al., 2005). در شرایط استرس از هیپوتالاموس، هورمون (Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) ترشح می‌گردد که از طریق افزایش ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروفیک، باعث تحریک ترشح گلوکوکورتیکوئیدها از بخش قشری غدد آدرنال می‌شود (Tsigos et al., 2002). در انسان کورتیزول و در موش کورتیکوسترون، مهمترین هورمون‌ها از این دسته می‌باشند (Tsigos et al., 2002). در بدن میزان گلوکوکورتیکوئیدها در خون توسط چندین مکانیسم فیدبک منفی تنظیم می‌گردد (Fernandez et al., 2009). تنش‌ها و استرس‌های مختلف روانی، فیزیکی، فارماکولوژیکی و غیره، ترشح هورمون کورتیزول را افزایش می‌دهند (Mantella et al., 2008; Putman et al., 2010). کورتیزول با متابولیسم کردن سریع آمینواسیدها و چربی‌ها برای آزادسازی انرژی جهت مصارف سلولی نقش مهمی را در سازمان‌دهی و مدیریت بدن در پاسخ به استرس‌های مختلف بازی می‌کند (Levine et al., 2007). غلظت اولیه کورتیزول و افزایش آن نسبت به یک رویداد استرس زا متناسب با سن تغییر می‌نماید و این تغییر در سنین کودکی و نوزادی بیشتر است (Felt et al., 2000). با افزایش سن، میزان ترشح و غلظت کورتیزول کاهش می‌یابد (Tollenaar et al., 2010). روشن شده است که نورترانس‌میتراگابا به ویژه از طریق گیرنده‌های GABA نوع B باعث تعدیل حالات اضطرابی می‌گردد (Rezayat et al., 2005). گابا

نوروترانس‌میتراگابا نوع ۳ گیرنده A، B و C می‌باشد و نشان داده شده است که تحریک گیرنده‌های نوع C باعث القاء اضطراب و تحریک گیرنده‌های A و B به وسیله آگونیست‌های مختلف از جمله بنزودیازپین‌ها باعث کاهش میزان اضطراب می‌شوند (Roohbakhsh et al., 2008). نتایج مطالعات جدید در سطح مولکولی تاییدی بر وجود گیرنده‌های متعددی به عنوان زیر گروه‌های بنزودیازپینی می‌باشند که پایه منطقی در افتراق اثرات خواب‌آوری از عمل اضطراب‌زدایی این داروها است (Brunton et al., 2006). اگرچه در سال‌های اخیر داروهایی با عوارض کمتر ضد اضطراب و افسردگی به بازار عرضه شده‌اند اما هنوز انسان‌ها برای رهایی از اضطراب شدید از بنزودیازپین‌ها استفاده فراوان می‌نمایند (Nutt et al., 2005; Schmith et al., 2005). انگور میوه درخت مو با نام علمی *Vitis vinifera* از خانواده Vitaceae می‌باشد که امروزه در سراسر دنیا کشت می‌شود. کشمش و مویز خشک شده میوه رسیده ارقام مختلف انگور با دانه و یا بی دانه تازه است که برحسب رقم، روش خشک کردن و شرایط خشک کردن به اسامی مختلفی خوانده می‌شوند. کشمش و مویز به عنوان یک منبع غنی غذایی است که حاوی ترکیبات کربوهیدراتی، آهن، انواع ویتامین‌ها می‌باشند (Doymaz et al., 2006). میوه انگور حاوی ترکیبات شیمیایی مختلفی از قبیل فلاونوئیدهای مختلف نظیر کاتچین، پروسیانیدین، آنتوسیانین، مالویدین، اپی کاتچین و مشتقات استیلین می‌باشد (Iriti et al., 2006; Mukesh Yadav, 2009). ترکیبات پلی فنلی موجود در عصاره هسته انگور باعث آرامش اندوتلیومی رگ‌های خونی و بهبود میگرن و پیشگیری‌کننده از حملات قلبی می‌شود (Harshal et al., 2011). ویژگی دیگر عصاره هسته انگور خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مهارکننده رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Caillet et al., 2006).

بازوی بسته $۱۵ \times ۵ \times ۳۰$ سانتی متری می‌باشد که در مقابل هم قرار داشته و به وسیله یک صفحه مرکزی ۵×۵ سانتی متر با هم در ارتباط می‌باشند و به ارتفاع ۵۰ سانتی متری از سطح زمین قرار دارد. این مدل سنجش اضطراب غیرشرطی است و نیازی به آموزش و یادگیری ندارد. در این مطالعه ۳۰ دقیقه پس از آخرین گاوآژ موش‌ها به آرامی و به طوری که سر حیوان به سمت بازوی باز باشد در مرکز ماز قرار داده شدند و به مدت ۵ دقیقه تعداد رفت و برگشت موش‌ها به وسیله شخصی که نسبت به آزمون اطلاعات خاصی نداشت و توسط دوربین فیلمبرداری ثبت گردید و تعداد دفعات داخل شدن حیوانات بر بازوهای باز و بسته و همچنین مجموع زمان صرف شده در بازوهای باز و بسته محاسبه گردید. در این تست افزایش مدت زمان حضور و تعداد دفعات ورود موش‌ها در بازوهای باز به عنوان یک نشانه عدم اضطراب و مدت زمان و دفعات حضور موش‌ها در بازوهای بسته به عنوان یک نشانه اضطراب در نظر گرفته شد (Holmes et al., 2000). در این مطالعه حیوانات به صورت نامحدود از آب معمولی شهر شیراز و غذای فشرده ساخت شرکت دام پارس تهران استفاده نمودند. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید.

تهیه عصاره هیدروالکلی مویز

برای تهیه عصاره از روش پرکولاسیون استفاده شد. برای این کار به اندازه کافی مویز تهیه شده از انگور سیاه تهیه شده از باغات اطراف شیراز را به مدت سه ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آب خیس نموده و سپس با کمک دستگاه هم زن به خوبی هم زده شد، تا به حالت یکنواخت درآید و آنگاه ۱۰۰ گرم از مخلوط یکنواخت به دست آمده در ۳۲۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درجه ریخته شد تا در دمای آزمایشگاه به مدت ۴۸ ساعت و دور از نور به خوبی خیسانده شود و

(Jayaprakasha et al., 2003) از آنجا که استرس‌های مزمن از طریق افزایش درازمدت در میزان هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی نظیر کورتیزول علاوه بر ایجاد اختلالات جسمانی، منجر به بروز انواعی از اختلالات روانی، از جمله افسردگی و اضطراب می‌گردند و با عنایت به آن که داروهای ضد اضطرابی رایج نظیر دیازپام علاوه بر داشتن اثرات جانبی، اعتیادآور بوده و در صورت قطع مصرف امکان برگشت اختلال وجود دارد لذا این مطالعه با هدف مقایسه اثرات عصاره هیدروالکلی مویز با دیازپام بر میزان سرمی هورمون کورتیکوسترون در موش‌های سفید آزمایشگاهی نر بالغی که تحت اضطراب قرارگیری در ماز صلیبی بودند، انجام گردید. پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس انجام شد. در این پژوهش از ۴۸ سر موش سفید آزمایشگاهی نر بالغ با محدوده ۳۰ ± ۲ گرم که از مرکز پژوهش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شده بودند استفاده گردید. در این مطالعه تمام حیوانات در درجه حرارت ۲۲ ± ۲ درجه سانتی‌گراد و در شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند.

نمونه‌ها به ۶ گروه ۸ تایی شامل گروه‌های کنترل، شاهد و ۴ دسته تجربی تقسیم شدند و در طول دوره آزمایش و قبل از آن سعی گردید که تا حد امکان اضطراب و استرس‌هایی از قبیل حرارتی، گرسنگی، تشنگی و روانی بر حیوانات گروه‌های کنترل و شاهد وارد نشده و دسته‌های تجربی نیز تنها تحت شرایط اضطراب قرارگیری در ماز صلیبی قرار داده شدند. در این بررسی برای اندازه‌گیری میزان اضطراب در نمونه‌ها از مدل تست ماز صلیبی استفاده شد که مدل استاندارد ارزیابی میزان اضطراب در جوندگان است و وسیله‌ای از جنس پلکسی گلاس بوده و دارای دو بازوی باز ۳۰×۵۰ سانتی‌متر و دو

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مصرف خوراکی دیازپام باعث کاهش معنی‌دار هورمون کورتیکوسترون در سطح $p \leq 0/01$ و عصاره هیدرو الکلی مویز در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش معنی‌دار هورمون کورتیکوسترون در سطح $p \leq 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل می‌گردند (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی مویز با دیازپام بر میزان سرمی کورتیکوسترون

میانگین \pm خطای معیار	تعداد	گروه	
۵/۸۲۵ \pm ۰/۹۳۱	۸	کنترل	کورتیکوسترون
۶/۲۱۳ \pm ۰/۵۷۱	۸	شم	
۲/۵۱۸ \pm *** ۰/۳۱۴	۸	دیازپام	
	۸	mg/kg	
۴/۸۵۳ \pm ۰/۳۱۱		مویز دوز ۱۰۰	
	۸	mg/kg	
۸/۲۴۵ \pm *** ۰/۵۷۱		مویز دوز ۲۰۰	
	۸	mg/kg	
۸/۸۷۶ \pm * ۰/۸۶۱		مویز دوز ۴۰۰	

*** و * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0/01$ و $p \leq 0/05$ درمقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که دیازپام باعث کاهش معنی‌دار و عصاره هیدروالکلی مویز به صورت وابسته به دوز باعث افزایش میزان سرمی هورمون کورتیکوسترون می‌گردد. مطالعات نشان داده‌اند که مسدود ساختن رسپتورهای گابادر هسته جنب بطنی هیپوتالاموس باعث افزایش ترشح کورتیکوسترون القاء شده بااسترس‌های مختلف می‌گردد (Cullinan

سپس مخلوط حاصل را به وسیله فیلتر صاف نموده و به کمک دستگاه روتاری مخلوط به دست آمده تغلیظ گردید و به کمک دستگاه دسیکاتور تمام رطوبت مخلوط گرفته شد تا عصاره ای با ویسکوزیته بالا به دست آید. در این تحقیق حیوانات گروه کنترل تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند. حیوانات گروه شاهد نیز برای مدت ۱۵ روز و روزانه ۱ میلی‌لیتر آب مقطر را به عنوان حلال دارو به صورت گاواژ دریافت داشتند. گروه تجربی یک به مدت پانزده روز و در هر روز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دیازپام حل شده در آب مقطر (Rabbani et al., 2011) و گروه‌های تجربی ۲ تا ۴ نیز برای مدت ۱۵ روز و در هر روز به ترتیب دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره هیدروالکلی مویز را که در آب مقطر حل شده بود به صورت گاواژ دریافت داشتند. در این بررسی کلیه گروه‌های تجربی و شاهد در هر روز و یک و نیم ساعت بعد از هر گاواژ به مدت ۱۵ دقیقه در بازوی باز ماز صلیبی قرار گرفتند. در پایان دوره آزمایش بین ساعت ۸-۹ صبح پس از بی‌هوش نمودن حیوانات با کمک سرنگ ۵ میلی‌لیتری از قلب حیوانات خون‌گیری به عمل آمد و نمونه‌های تهیه شده جهت انعقاد به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از وقوع انعقاد لوله‌های محتوی خون‌های تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند تا سرم آنها جدا گردد. آن گاه میزان سرمی هورمون کورتیکوسترون با استفاده از کیت هورمونی تهیه شده از شرکت کاوشیار ایران و به کمک روش الیزا اندازه‌گیری گردید. نتایج با کمک آزمون‌های آماری تجزیه واریانس یک طرفه و پیگیری توکی و با استفاده از برنامه آماری SPSS-18 تجزیه و تحلیل شدند و مرز معنی‌داری اختلاف داده‌ها در سطح $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

ما نشان داد که نیکوتین احتمالاً از طریق تحریک ترشح نوراپی نفرین باعث تقویت اثر استرس بی حرکتی بر میزان سرمی هورمون کورتیکوسترون در موش‌های صحرایی نر بالغ می‌گردد (Hosseini, 2013). از طرف دیگر نیز نشان داده شده است که تحریک محور سمپاتیک بخش مرکزی آدرنال از طریق تحریک ترشح کاتکولامین‌هایی نظیر اپی نفرین باعث افزایش کورتیکوسترون می‌گردد (Goymann et al., 2004). تحقیقات نشان داده است که پروآنتوسیانین‌های موجود در عصاره انگور باعث کاهش زمان بی حرکتی در تست شنای اجباری و افزایش سطح نوراپی نفرین در کورتکس پیشانی، هیپوکامپ و هیپوتالاموس می‌شود (Xu et al., 2010). با توجه به آن که هیپوکامپ در تنظیم عملکرد محور HPA و میزان گلوکوکورتیکوئیدها دارای نقش می‌باشد (Piri et al., 2012; De Kloet, 2003)، و از آنجا که عصاره انگور باعث افزایش میزان کاتکولامین‌ها از جمله نورآدرنالین می‌گردد. لذا علت افزایش میزان کورتیکوسترون در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده مویز در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را می‌توان به خاطر افزایش میزان نوراپی نفرین در سیستم عصبی مرکزی نسبت داد. بر خلاف و در مقایسه با نتایج حاصل از این مطالعه تحقیقات دیگری نیز نشان داده‌اند که عصاره انگور با داشتن ترکیباتی نظیر کاتچین و پروآنتوسیانیدین باعث افزایش میزان سروتونین شده و سروتونین نیز از طریق کاهش بیان ژن‌های مؤثر در بروز اضطراب همانند دیازپام باعث کاهش اضطراب و میزان کورتیکوسترون در خون می‌گردد (Mahalaxmi et al., 2009; Mithun et al., 2011). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی مویز به صورت وابسته به دوز باعث افزایش کورتیکوسترون و دیازپام باعث کاهش میزان این هورمون در خون می‌گردد.

(et al., 2008). برخی از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تزریق muscimol به عنوان آگونیست گیرنده‌های گابا به درون ناحیه جنب بطنی هیپوتالاموس مانع افزایش کورتیکوسترون پلازما در پاسخ به استرس بی حرکتی می‌شود. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات روشن شده است که در صورت بلوکه نمودن رسپتورهای گاباژیک ترشح کورتیکوسترون در پاسخ به استرس‌های مختلف از جمله بی حرکتی افزایش می‌یابد (Campbell et al., 2004). مطالعات نورواناتومیکی نشان‌دهنده وجود پایانه‌های عصبی گاباژیک و گلوتاماترژیک در مجاورت هسته عصبی جنب بطنی در هیپوتالاموس می‌باشند (Herman et al., 2003; Gerrits et al., 2003). براساس نتایج حاصل از پژوهش‌های گذشته روشن شده است که مکانیسم‌های مهارتی به ویژه سیستم‌های نوروترانسمیتری گابا ژرژیک نقش مهمی در عملکرد محور HPA در پاسخ به انواع استرس‌ها بازی می‌کنند به طوری که تزریق muscimol به عنوان آگونیست گیرنده‌های گابا به درون هیپوتالاموس مانع افزایش کورتیکوسترون در پاسخ به استرس می‌شود و تجویز مسدودکننده‌های گیرنده‌های گابا باعث افزایش ترشح کورتیکوسترون می‌گردند (Marqus de Suuza et al., 2008). استرس‌های مختلف بر روی متابولیسم و عملکردهای فیزیولوژیک گابا در سیستم عصبی مرکزی مؤثر هستند (Torres et al., 2001). در حین استرس‌های مختلف عملکرد سیستم‌های گاباژیک با واسطه مهار رسپتورهای بنزودیازپینی کاهش می‌یابند و تجویز آگونیست‌های گاباژیک نظیر baclofen مانع اثر افزایشی استرس‌ها بر ترشح کورتیکوسترون می‌شوند (Yu et al., 2010; Bremmer et al., 2000). و لذا احتمالاً دیازپام به عنوان آگونیست رسپتورهای بنزودیازپینی گابا اثر این نوروترانسمیتر مهارتی بر هسته عصبی جنب بطنی را تسهیل نموده و باعث کاهش میزان کورتیکوسترون در خون می‌گردد. مطالعه دیگر

سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه بیمارستان مادر و کودک دانشگاه علوم پزشکی شیراز که

امکانات لازم جهت انجام این پژوهش را فراهم آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Bremmer JD, Innis RB, Southwick SM, et al. (2000) Decreased benzodiazepine receptor binding in prefrontal cortex in combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*. 157: 1120-1126.
- Brigitte MK, Clemens K (2005) Sex differences in HPA axis responses to stress: a review *Biological Psychology*. (69) 113–132.
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (2006) *Godman gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11 th ed. Mcgraw hill new York. 429- 460.
- Caillet S, Salmieri S, Lacroix M (2006) Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chem*. 95: 1-8.
- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM (2004) Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 161(4): 598-607.
- Cullinan WE, Ziegler DR, Herman JP (2008) Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct Funct*. 213 (1-2):65-80.
- De Kloet ER (2003) Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*. 37: 51-68.
- Doymaz I (2006) Drying kinetics of black grapes treated with different solutions. *J. Food Engineering*. 76: 212-217.
- Felt BT, Mollen E, Diaz S, Renaud E, Zeglis M, Wheatcroft G, et al. (2000) Behavioral interventions reduce infant distress at immunization. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 154 (7):719-24
- Fernandez E, Watterberg K (2009) Relative adrenal insufficiency in the preterm and term infant. *J of Perinatol*. 29 (2): 44-9.
- Gerrits M, Westenbroek C, Fokkema DS, Jongasma ME, Den Boer JA, Ter Horst GJ (2003) Increased stress vulnerability after a prefrontal cortex lesion in female rats. *Brain Res Bull*. Oct 15; 61 (6):627-35.
- Goymann W, Wingfield JC (2004) Allostatic load, social status, and stress hormones- the costs of social status matter. *Animal Behaviour*. 67: 591-2.
- Harshal A, Pawar Nilesh M (2011) Khutle, Suparna Shukla, Apoorva Ugarkar and Saumya Vijaykumar. *Functional Foods And Their Health Benefits: An Overview, International Journal of Advances in Pharmaceutical Research*, 2(7): 397-404.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, et al. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. Jul; 24 (3):151-80.
- Holmes A, Parmigiani PF, Ferrari PF, Palanza P, Rodgers RJ (2000) Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiology Behavior*. 71: 509 - 16.
- Hosseini SE (2013) The effect of interference of Nicotine and immobility stress on performance pituitary–adrenal axis in mature male rats. 3. 20(3):359-366
- Iriti M, Faoro F (2006) Grape phytochemicals: A bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Med Hypothesis*. 67: 833–838.

- Jayaprakasha Gk, Selvi T, Sakariah KK (2003) Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res Int.* 36: 117-122.
- Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Lewis JG, Weller A (2007) Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol and Behav.* 90(1): 43-53.
- Mahalaxmi M, Swati S, Jadhav, Veena S, Kasture, Sanjay B (2009) Kasture Effect of myricetin on behavioral paradigms of anxiety, *Pharmaceutical Biology*, 47(10): 927-931.
- Mantella RC, Butters MA, Amico JA, Mazumdar S, Rollman BL, Begley AE, et al. (2008) Salivary cortisol is associated with diagnosis and severity of late-life generalized anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 33(6):773-81.
- Marqus de Suuza L, Franci CR (2008) GABAergic mediation of stress-induced secretion of corticosterone and oxytocin, but not prolactin, by the hypothalamic paraventricular nucleus. *Life Sci.* 83(19-20): 686-92.
- Mithun SR, Sampada S, Vineet M, Puri A (2011) Herbal Antidepressants. *IJPF*, 1(1): 159-169.
- Mukesh Yadav (2009) Biological and Medicinal Properties of Grapes and Their Bioactive Constituents, *An Update J Med Food*, 12(3), 473-484.
- Nutt DJ (2005) Overview of diagnosis and drug treatment of anxiety disorders. *J CNS spectr.* 10(1): 49- 56.
- Piri M, Ayazi E, Bananej M, Shahin MS (2012) Influence of Dopamine D1 Receptors of the Dorsal Hippocampus on the Histamine-Induced Anxiety Behavior in Mice. *ZUMS Journal.* 20(79): 1-13.
- Putman P, Hermans EJ, Van Honk J (2010) Cortisol administration acutely reduces threat-selective spatial attention in healthy young men. *Physiol & Behav.* 99(3): 294-300.
- Rabbani M, Sajjadi SE, Khalili S (2011) A Lack of tolerance to the anxiolytic action of Echiium amoenum. *Res Pharm Sci.* Jul-Dec; 6(2): 101-106.
- Rezayat M, Roohbakhsh A, Zarrindast MR, Massoudi R, Djahanguiri B (2005) Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated Plus-maze test of anxiety. *Physiol Behav.* 84(5): 775-782.
- Roohbakhsh A, Mahmoodi Delfan K, Rostami P, Hajizadeh Moghaddam A (2008) The Effect of Intracerebroventricular Injection of GABAC Selective Agonist and Antagonist on Anxiety-like Behaviors in Male Rats. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences.* 7(1):13-20.
- Schmith R, Gazalle FK, Lima MS, Cunha A and et al. (2005) The efficacy of antidepressants for G.A.D. A systematic review and meta-analysis. *J rev brass psiquiatr.* 27(1): 18-24.
- Tollenaar MS, Jansen J, Beijers R, Riksen-Walraven JM, Weerth Cd (2010) Cortisol in the first year of life: Normative values and intra-individual variability. *Early Hum Dev.* 86(1):13-6.
- Torres IL, Vasconcellos AP, Silveira Cucco SN, Dalmaiz C (2001) Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. *Braz J Med Biol Res.* 34: 241-244.
- Tsigos C, Chrousos, GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J.Psychosom. Res.* 53, 865-871.
- Xu Y, Li S, Chen R, Li G, Barish PA, You W, Chen L, Lin M, Ku B, Pan J, Ogle WO (2010) Antidepressant-like effect of low molecular proanthocyanidin in mice: involvement of monoaminergic system, *Pharmacol Biochem Behav.*

94: 447-53.
Yu G, Chen H, Xingium WU, Shannon G, Matta, Burt M (2010) Nicotine self-administratration modulates glutamate and GABA transmission in

hypothalamic paraventricular nucleus to enhance in hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress.J Neurochem. 113(4): 919-29.