

اثرات استرس مزمن چندگانه بر شاخص‌های مورفومتریک سلول‌های بتز در لایه هرمی داخلی قشر مغز موش صحرائی نر

طوفان صابرنیا^۱، فرزاد رجایی^{۲*}

چکیده

زمینه و هدف: افزایش استرس در پی پیشرفت تکنولوژی، عامل بسیار مهمی در تهدید سلامت اعضای بدن نظیر دستگاه عصبی است. این مطالعه با هدف بررسی آثار استرس مزمن چندگانه بر تغییرات مورفومتریک سلول‌های بتز در قشر مغز موش صحرائی نر انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۱۸ سر موش صحرائی نژاد ویستار به صورت تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم شدند. حیوانات در گروه تحت استرس به مدت ۱۰ روز در معرض استرس‌های مختلف به صورت محرومیت غذایی، محرومیت آب، بی‌حرکتی در دمای ۴°C، شنای اجباری و ایزوله شدن قرار گرفتند، درحالی‌که حیوانات گروه کنترل بدون هیچ اختلالی در قفس‌های خود نگهداری شدند. پس از مدت مورد نظر، حیوانات بیهوش و مغز آنها جدا شد. در ادامه، بعد از فیکساسیون، نمونه‌هایی از قشر فرونتال مغز برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تی صورت گرفت و سطح معنی‌داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میانگین تعداد و اندازه سلول‌های بتز در گروه‌های تحت استرس، به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0/001$). مشاهدات کیفی نیز آثار کروماتولیز اجسام نیسل، متراکم شدن هسته و کاهش استتاله‌های نورونی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد استرس مزمن چندگانه با کاهش اندازه و تعداد سلول‌های بتز می‌تواند اثرات منفی بر قشر مغز موش صحرائی داشته باشد، با این وجود مطالعات بیشتری برای تأیید نتایج فوق ضروری است.

کلید واژه‌ها: استرس؛ سلول‌های هرمی؛ مغز؛ موش صحرائی.

^۱کارشناس ارشد علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

^۲استاد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

فرزاد رجایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

farzadraj@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۷

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۱۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Sabernia T, Rajaei F. The effects of chronic multiple stresses on morphometric indices of betz cells in internal pyramidal layer of cerebral cortex of male rat. Qom Univ Med Sci J 2013;7(6):1-6. [Full Text in Persian]

مقدمه

هرگونه پاسخ به اثرات عوامل زیان آور خارجی و محرکها تحت عنوان آشفستگی روحی یا عاطفی و یا استرس تعریف می شود (۱). عوامل استرس زا به صورت های متنوع و در مدت طولانی می توانند منجر به بروز استرس شوند (۲). استرس های اجتماعی مزمن با تغییر در میزان ترشح نوروترانسمیترها و ساختارهای نورونی، سبب به وجود آمدن انواع گوناگونی از اختلالات و بیماری ها می شوند (۳). استرس های متنوع مزمن در موش صحرایی به صورت محرومیت غذایی، محرومیت آب، بی حرکتی، شنای اجباری و ایزوله شدن تعریف می گردد (۴). شدت تغییرات فیزیولوژیک تحت تأثیر عوامل استرس زا، بستگی به میزان تناوب و طول مدت قرارگیری حیوان در آن موقعیت دارد (۵). استرس می تواند یک پارچگی فیزیولوژیکی و روانشناختی فرد را مورد تهدید قرار داده و سبب تغییرات روانی رفتاری شود. شواهد آزمایشگاهی نشان داده است استرس سبب تغییرات ساختمانی در شبکه عصبی همچون هیپوکامپ، قشر پره فرونتال و آمیگدال می شود (۶). انواع گوناگونی از استرس های فیزیولوژیک و روانشناختی وجود دارند که بر محور (هیپوتالاموس - هیپوفیز - قشر فوق کلیوی)، محور (هیپوتالاموس - هیپوفیز - گنادی)، سیستم سمپاتیک آدرنومدولاری و سیستم عصبی سمپاتیک اثر کرده و سبب تغییرات شگرف در برخی از اعضای بدن می شوند (۷). کورتکس پره فرونتال داخلی با دخالت در عملکردهای شناختی، در تنظیم پاسخ های استرسی نقش دارد (۸). همچنین این ناحیه محلی است که در روند اختلالات افسردگی در پی استرس، درگیر می شود و به وضوح نشان داده شده است استرس می تواند سبب اختلال در عملکرد کورتکس پره فرونتال داخلی در مدل های حیوانی شده و سبب تغییرات مورفولوژیکی در سلول های بتز کورتکس پره فرونتال داخلی شود (۹). عمده نورون های قشر مغز از نوع بتز و ستاره ای بوده و بر حسب قرارگیری این سلول ها، قشر مغز دارای ۶ لایه سلولی می باشد. لایه هرمی داخلی دارای سلول های بسیار بزرگی است که به سلول های بتز (Betz) موسوم است (۱۰). مطالعات قبلی نشان داده اند استرس مزمن با ایجاد تغییرات مولکولی، مورفولوژیکی و فراساختاری در هیپوکامپ موش صحرایی باعث مشکلات شناختی می شود (۱۱).

با توجه به نقش محوری این سلول ها در فعالیت های حرکتی، و وجود مطالعات اندک در این زمینه، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر انواع متفاوت عوامل استرس زا بر شاخص های مورفومتریک سلول های بتز در لایه هرمی داخلی قشر مغز موش صحرایی در انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه ۱۸ سر موش صحرایی نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰۰-۳۰۰g به صورت تصادفی به دو گروه مساوی استرس و بدون استرس تقسیم شدند. گروه بدون استرس، بدون هیچ اختلالی در قفس های خود در طول ۱۰ روز نگهداری شدند، در حالی که در گروه تحت استرس، حیوانات به مدت ۱۰ روز در معرض انواع مختلف استرس قرار گرفتند (جدول شماره ۱) (۱۲).

جدول شماره ۱: عوامل استرس زای چندگانه توتیبی به کار رفته در مطالعه

روزها	موارد استفاده شده	دوره
۱	شنای اجباری	۱۰ دقیقه
۲	محدودیت	۳ ساعت
۳	محرومیت آب در دمای ۳°C	۲۴ ساعت
۴	محدودیت در دمای ۴°C	۱/۵ ساعت
۵	ایزولیشن	۲۴ ساعت
۶	محرومیت غذا	۲۴ ساعت
۷	محرومیت آب	۲۴ ساعت
۸	محدودیت در دمای ۴°C	۲ ساعت
۹	محدودیت غذا	۲۴ ساعت
۱۰	شنای اجباری	۱۰ دقیقه

در این بررسی استرس در زمانهای مختلفی از روز، به منظور به حداقل رساندن قابلیت پیش بینی شدن آن، به حیوانات وارد شد. بی حرکتی با قرارگیری در محفظه پلاستیکی لوله ای شکلی به ابعاد ۲۱×۶cm انجام شد، به طوری که حیوانات قادر به حرکت نبودند. شنای اجباری با قرار دادن حیوان در مخزن شیشه ای با اندازه های ۳۰×۳۳×۴۴cm و با عمق ۲۲cm آب در دمای ۲۳±۲°C صورت گرفت. همچنین غذای مناسب و آب کافی در اختیار حیوانات هر دو گروه قرار گرفت. پس از پایان ۱۰ روز موش های هر دو گروه با تزریق کتامین ۶۰mg/kg و زایلازین ۶mg/kg بیهوش شدند. سپس مراحل پاساژ بافتی شامل فیکساسیون، آبگیری، شفاف سازی

یافته‌ها

تعداد و اندازه سلول‌های بتز در لایه هرمی داخلی قشر مغز موش صحرایی در گروه‌های تحت استرس در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$) (جدول شماره ۲). بررسی‌های کیفی نیز نشان‌دهنده آثار کروماتولیز اجسام نیسل، متراکم شدن هسته و کاهش استتاله‌های نورونی بود (شکل).

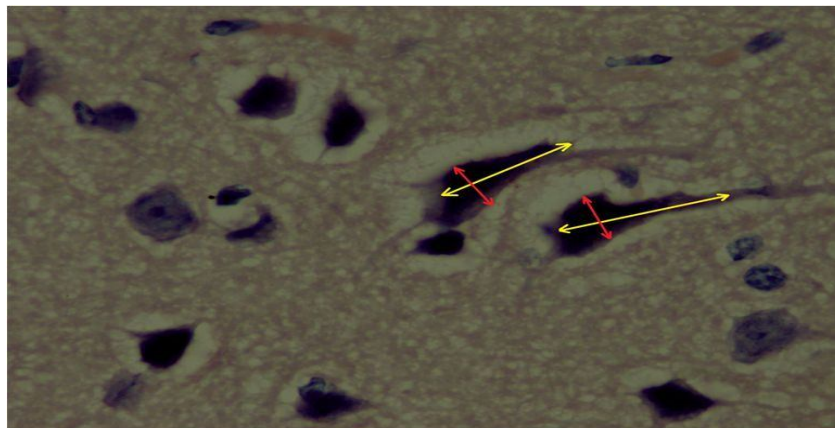
جدول شماره ۲: اندازه و تعداد سلول‌های بتز لایه داخلی قشر مغز موش

متغیر	گروه‌ها	کنترل	استرس
قطر بزرگ		۲۳۷/۵۲±۵۴/۱۷	۱۹۷/۱۵±۴۵/۰۰
قطر کوچک		۱۴۶/۳۳±۲۹/۹۰	۱۳۰/۹۸±۳۸/۳۷
میانگین قطرها		۲۷۹/۹۴±۵۷/۲۵۷	۲۳۸/۰۰±۵۳/۵۵
تعداد سلول‌های هرمی		۱۲/۹۲±۴/۶۸	۶/۴۸±۳/۰۰

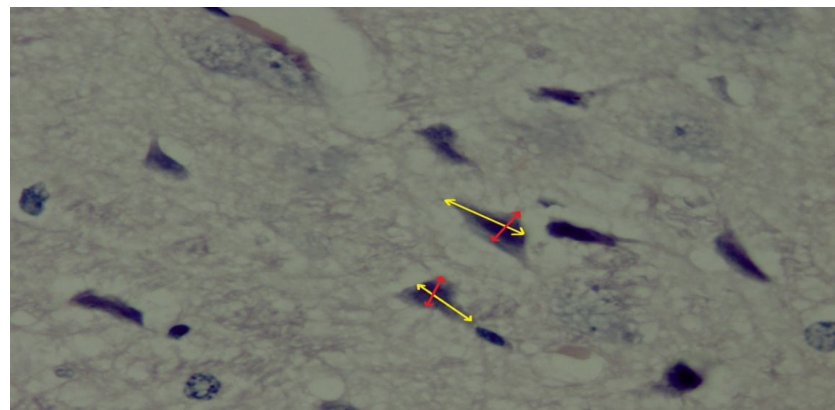
* داده‌ها بر اساس "انحراف معیار ± میانگین" می‌باشد.

و آغستگی توسط دستگاه پردازش بافتی انجام گرفت. برش‌های نازک به ضخامت ۵μ توسط دستگاه میکروتوم دوار تهیه و در نهایت از هر نمونه ۵ برش (برش‌های شماره ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ و ۱۷)، به‌منظور پرهیز از شمارش مجدد یک سلول، انتخاب شد. لام‌های میکروسکوپی پس از رنگ‌آمیزی برش‌ها با هماتوکسیلین و اتوزین تهیه گردید، سپس با دوربین نیکون از میدان‌های میکروسکوپی لام‌ها عکسبرداری شد، در ادامه، عکس‌ها به کامپیوتر منتقل و تعداد و اندازه سلول‌های لایه بتز داخلی قشر مغز، با برنامه نرم‌افزاری Image Tool در گروه‌های مورد مطالعه مشخص گردید. برای تعیین میانگین اندازه سلول‌های هرمی، ابتدا قطر بزرگ و کوچک سلول‌ها تعیین و سپس با استفاده از فرمول: $x = \sqrt{a^2 + b^2}$

میانگین اندازه سلول‌ها به دست آمد. برای آنالیز داده‌ها از آزمون تی استفاده شد و سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.



(الف)



(ب)

شکل: نمای میکروسکوپی سلول‌های بتز. قطر بزرگ و کوچک سلول‌های بتز لایه داخلی قشر مغز در گروه کنترل (الف) و استرس (ب). همان‌طوری که مشاهده می‌شود اندازه سلول‌های بتز در گروه تحت استرس نسبت به گروه کنترل، کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است (بزرگنمایی ۱۰۰×).

بحث

یافته‌های مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری در قطر بزرگ و کوچک سلول‌های بتز لایه هرمی داخلی قشر مغز، همچنین در تعداد سلول‌های بتز بین موش‌های گروه تحت استرس و کنترل نشان داد. طبق نتایج، استرس مزمن چندگانه با ایجاد فرآیند تخریبی باعث کاهش تعداد سلول‌های بتز در قشر مغز می‌شود. استرس سبب آسیب به سلول، در نتیجه موجب کاهش اندازه سلول و حتی مرگ سلولی و آپوپتوز می‌گردد. Osada و همکاران (سال ۲۰۱۰) نشان دادند آستروسیت‌ها و نورون‌های بتز در مناطق CA1، متحمل آپوپتوز به صورت افزایش در کاسپاز ۱۲ در پی استرس رتیکولوم آندوپلاسمیک وابسته به مکانیسم‌های بعد از ایسکمی می‌شوند (۱۳). همچنین در مطالعه دیگری مشخص گردید استرس اجتماعی سبب کاهش بیان ژن‌های مرتبط با نوروزنزیس و در نتیجه کاهش تکثیر سلولی در مغز می‌شود (۱۴). از نتایج مطالعه Lambert و همکاران به دست آمد که یک دوره کوتاه از استرس (۶ روز)، سبب آتروفی نورون‌های بتز در هیپوکامپ می‌شود. آنها در این مطالعه با تهیه برش‌هایی از مناطق CA1 و CA3 هیپوکامپ، مشاهده کردند استرس به طور معنی‌داری سبب کوتاه‌تر شدن و کمتر منشعب شدن نورون‌های تنه کوتاه در این مناطق نسبت به حیوانات گروه کنترل با دریافت دوره استرس شده است. این نتایج در نورون‌های تنه بلند این مناطق نیز مشاهده گردید، که معنی‌دار نبود. در نهایت، آنها چنین نتیجه گرفتند که یک دوره کوتاه از استرس مزمن سبب آتروفی نورون‌های بتز در هیپوکامپ می‌شود (۱۵). هیپوکامپ نسبت به استرس حساس بوده و به هورمون‌های گنادی، تیروئیدی و آدرنال پاسخ می‌دهد. این پاسخ به صورت تغییر در ساختار سیناپسی، ساختمان دندریتی و تنظیم حجم دندریت‌های چین‌های مغزی در طی دوره تکامل و در زندگی بزرگسالی است. دو نوع شکل‌پذیری در اثر استرس ایجاد می‌گردد:

۱- استرس مکرر، که سبب آتروفی دندریت‌های ناحیه CA3 می‌شود؛

۲- استرس حاد و مزمن، که سبب توقف نوروزنزیس دندریت‌های نورون‌های گرانولار چین‌های مغزی می‌گردد (۱۶).

همچنین Goldwater و همکاران (سال ۲۰۰۹) نشان دادند استرس

بی‌حرکتی مزمن، سبب انقباض و جمع شدن دندریت‌های سلول‌های بتز ناحیه اینفرالیمبیک (IL) از کورتکس پره‌فرونتال داخلی رت می‌شود (۱۷). در مطالعه Cook نیز استرس بی‌حرکتی به مدت ۳ هفته در رت‌ها سبب تغییرات معنی‌داری در دندریت‌های رأسی نورون‌های بتز لایه‌های II-III کورتکس پره‌فرونتال داخلی شد، به طوری که کاهش معنی‌داری در تعداد و طول شاخه‌های دندریتی رأسی این نورون‌ها مشاهده شد (۱۸). در مطالعات دیگر مشخص گردید، استرس شناکردن سبب کاهش معنی‌دار دندریت‌های انتهایی رأسی نورون‌های بتز ناحیه اینفرالیمبیک کورتکس پره‌فرونتال داخلی در موش می‌شود و در مقابل، در مورفولوژی نورون‌های پره‌لیمبیک به وسیله استرس، تغییری ایجاد نمی‌کند.

این نتایج نشان دادند نورون‌های نواحی اینفرالیمبیک و نه پره‌لیمبیک حتی نسبت به استرس‌های مختصر نیز حساس هستند (۱۹). در مطالعه Pawluski و همکاران، استرس در طی بارداری در موش‌های صحرائی بارور سبب کاهش تعداد سلول‌های هرمی CA3 در هیپوکامپ شد، ولی بر روی وضعیت سلول‌های CA1 هیپوکامپ تأثیری نداشت (۲۰). استرس بی‌حرکتی سبب آتروفی دندریت‌های رأسی سلول‌های بتز لایه V کورتکس پره‌فرونتال داخلی در رت می‌شود (۲۱)، به طوری که مغز از طریق فعال کردن سلول‌های عصبی و آزاد کردن نوروترانسمیترها سبب آلوستازی (allostasis) به معنای کسب تعادل و ثبات داخلی می‌گردد. زمانی که شخص به طور مکرر در حال مبارزه با عامل استرس‌زا است، واسطه‌های آلوستازی سبب تولید استهلاک و فرسودگی بدن و مغز شده، که فشار آلوستاتیک (allostatic load) نامیده می‌شود. مثال‌های فشار آلوستاتیک شامل: تجمع چربی شکم، از دست دادن مواد معدنی استخوان و آتروفی سلول‌های عصبی در هیپوکامپ می‌باشد (۲۲).

همچنین استرس می‌تواند سبب آتروفی و آسیب سلولی گردد و به نظر می‌رسد آسیب سلولی در پی افزایش آزاد شدن کورتیکواسترون‌ها از محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) باشد و مشاهده شده است که دریافت هورمون‌های استرسی نظیر کورتیکواسترون تأثیرات مورفولوژیکی استرس را تقلید می‌کنند (۲۱).

باشد (۲۴). کروماتولیز اجسام نیسل، متراکم شدن هسته و کاهش استطاله‌های نورونی در بررسی‌های کیفی نیز حاکی از آسیب نورون‌ها به‌صورت کاهش اندازه و تعداد نورون‌ها بوده که در بررسی‌های کمی نشان داده شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استرس مزمن چندگانه ترتیبی با کاهش اندازه و تعداد سلول‌های بتز می‌تواند اثرات منفی بر قشر مغز موش داشته باشد، ولی برای تأیید نتایج فوق به مطالعات بیشتری نیاز است.

همچنین در تحقیقی دیگر مشاهده گردید دریافت کورتیکواسترون سبب آتروفی نورون‌ها در مناطق CA3 هیپوکامپ و لایه‌های II و III کورتکس پره‌فرونتال شده و دریافت کورتیکواسترون به مدت ۳ هفته در رت‌ها نیز سبب تغییرات دندریتی در آمیگدال و نورون‌های هرمی CA1 هیپوکامپ می‌شود (۲۳). همچنین کاهش اندازه سلول‌های بتز در قشر مغز می‌تواند به دلیل رادیکال‌های آزاد تولیدشده در پی قرارگیری حیوانات در معرض استرس باشد، به‌طوری‌که برخی محققین معتقدند استرس اجتماعی با تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و ترکیب آن با بیلی‌روبین، سبب افزایش بیوپیرین می‌شود. وجود بیوپیرین نیز می‌تواند از نشانه‌های استرس اجتماعی

References:

1. Selye H. Forty years of stress research: Principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 1976 Jul; 115(1):53-6.
2. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 2008 Apr; 583(2-3):174-85.
3. Woolverton WL, Ator NA, Beardsley PM, Carroll ME. Effects of environmental conditions on the psychological wellbeing of primates. *Life Sci* 1989;44(14):901-17.
4. Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 2001 Jun; 197(1-4):3-24.
5. Chigurupati S, Son TG, Hyun DH, Lathia JD, Mughal MR, Savell J, et al. Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice. *J Endocrinol* 2008 Nov; 199(2):333-41.
6. Fuchs E, Flugge G, Czeh B. Remodeling of neuronal networks by stress. *Front Biosci* 2006;11:2746-58.
7. Ishida H, Mitsui K, Nukaya H, Matsumoto K, Tsuji K. Study of active substances involved in skin dysfunction induced by crowding stress. I. Effect of crowding and isolation on some physiological variables, skin function and skin blood perfusion in hairless mice. *Biol Pharm Bull* 2003 Feb; 26(2):170-81.
8. Perez-Cruz C, Simon M, Flügge G, Fuchs E, Czeh B. Diurnal rhythm and stress regulate dendritic architecture and spine density of pyramidal neurons in the rat infralimbic cortex. *Behav Brain Res* 2009;205(2):406-13.
9. Shansky RM, Morrison JH. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: Effects of circuit, hormones and rest. *Brain Res* 2009;1293:108-13.
10. Mescher LA. Junqueira's basic histology. 12th ed. New York: LANGE; 2010. p. 165-67.
11. Reagan LP, Magariños AM, McEwen BS. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:126-37.
12. Marti O, Armario A. Anterior pituitary response to stress: Time related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 1998;16(3-4):241-60.
13. Osada N, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. Characterization of neuronal and astroglial responses to ER stress in the hippocampal CA1 area in mice following transient forebrain ischemia. *Neurochem Int* 2010 Aug;57(1):1-7.

14. Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 2006;16:233-8.
15. Lambert KG, Buckelew SK, Staffiso-Sandoz G, Gaffga S, Carpenter W, Fisher J, et al. Activity-stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats. *Physiol Behav* 1998 Aug; 65(1):43-9.
16. McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: Implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol* 2001 Jan; 16(S1):S7-S19.
17. Goldwater DS, Pavlides C, Hunter RG, Bloss EB, Hof PR, McEwen BS, et al. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. *Neuroscience* 2009 Dec; 164(2):798-808.
18. Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 2004 Aug; 60(2):236-48.
19. Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurobiol* 2004 Aug; 60(2):236-48.
20. Pawluski JL, Valença A, Santos AI, Costa-Nunes JP, Steinbusch HW, Strekalova T. Pregnancy or stress decrease complexity of CA3 pyramidal neurons in the hippocampus of adult female rats. *Neuroscience* 2012;227:201-10.
21. Liu RJ, Aghajanian GK. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: Role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan; 105(1):359-64.
22. McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: Allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging* 2002;23(5):921-39.
23. Morales-Medina JC, Sanchez F, Flores G, Dumont Y. Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus accumbens and amygdala in the rat. *J Chem Neuroanat* 2009;38(4):266-72.
24. Miyashita T, Yamaguchi T, Motoyama K, Unno K. Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:775-80.