Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences No.95/ Aug-Sep 2018
DOI: 10.22102/22.6.1

Effect of prenatal immobilization stress on spatial memory, anxiety-like behavior and brain BDNF concentration in the F1 generation male mice

Aliabadi N., MSc[1] , Hedayat Sahraei H., PhD[2] , Bahari Z., PhD [3], Meftahi G.H., PhD[4]
1. MSc of biology, Department of Biology, Azad Islamic University, North Branch, Tehran, Iran
2. Professor, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Physiology and Medical Physic, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, (Corresponding Author), Tel:+98-21-26127286, hossein.meftahi@bmsu.ac.ir

ABSTRACT
Background and Aim: In this study, we investigated the effect of immobilization stress during pregnancy on the spatial memory, anxiety-like behavior and brain BDNF level in F1 generation male NMRI mice.
Materials and Methods: Twenty female pregnant mice were randomly divided into stress and control groups. The stress group received stress using a restraint cylinder (6 cm ID, 20 cm L) 60 min/day from the 1st to the 15th day of pregnancy. The control group did not receive stress. The male F_1 offspring was nursed by their mothers (n=10/group) until reaching weights between 20 and 25 g. Then they were tested for spatial memory using Barnes maze and anxiety-like behavior by the elevated plus-maze. Also, brain BDNF level was measured by means of an ELISA reader.
Results: Barnes maze test results showed that the time and distance to reach the target hole were significantly ($p<0.001$) increased in the stress group. Also, the number of errors and anxiety-like behavior in the stress group were significantly ($p<0.001$) increased compared to those in the control group ($p<0.001$). BDNF level_in the brain was significantly ($p<0.05$) higher in the control group.
Conclusion: The present study indicated that prenatal stress can lead to decreased level of BDNF in the brain of the offspring which may result in spatial memory disorder and anxiety-like behavior.
Key Words: Restraint stress, Barnes maze, Spatial memory, Anxiety-like behavior, BDNF.

Received: Feb 17, 2018 **Accepted:** May 22, 2018

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و سوم / مرداد و شهریور ۱۳۹۷-۸۴-۷۳ DOI: 10.22102/22.6.1

اثر استرس بی‌حرکتی بارداری بر حافظه فضایی، رفتارهای شبه اضطرابی و غلظت BDNF مغز موشهای کوچک آزمایشگاهی نر نسل اول

نسترن علی‌آبادی[۱]، هدایت صحرایی[۲]، زهرا بهاری[۳]، غلام حسین مفتاحی[۴]

۱.کارشناسی ارشد ، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران

۲.استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۳.استادیار، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۴.استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن ثابت: ۲۶۱۲۷۲۸۶-۰۲۱

hossein.meftahi@bmsu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: در این مطالعه، اثر استرس بی‌حرکتی مادر در دوران بارداری بر حافظه فضایی، رفتار شبه-اضطرابی و غلظت BDNF در مغز فرزندان نسل اول نر در موشهای کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI بررسی گردید.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی، بیست موش ماده بطور تصادفی به دو گروه استرس و کنترل تقسیم شدند. حیوانات گروه استرس از روز اول تا روز پانزدهم بارداری،هر روز به مدت شصت دقیقه در داخل لوله‌هایی (به قطر داخلی ۶ سانتیمتر و به طول ۲۰ سانتیمتر) بمنظور القاء استرس بی‌حرکتی قرارگرفتند. گروه کنترل استرسی دریافت نکردند. پس از تولد، فرزندان توسط مادران پرورش‌یافته و فرزندان نر (۱۰سر در هر گروه) بعداز رسیدن به سن بلوغ (۲۰-۲۵گرم)مورد ارزیابی حافظه فضایی با استفاده از ماز بارنز و رفتار شبه-اضطرابی با استفاده از ماز مرتفع بعلاوه قرار گرفتند.همچنین غلظت BDNF مغز با استفاده از الایزاریدر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج ماز بارنز نشان داد که زمان رسیدن و مسافت طی شده برای رسیدن به سوراخ هدف در موشهایی که تحت استرس بودند نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) را نشان داد. همچنین، تعداد خطا جهت رسیدن به‌سوراخ هدف در گروه استرس به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$)بیشتر از گروه کنترل بود. علاوه براین، میزان اضطراب درموشهایی که تحت استرس جنینی بودند بطور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. غلظت BDNF مغز گروه کنترل نیز بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) از گروه استرس بیشتر بود.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که استرس دوران بارداری می‌تواند سبب کاهشBDNF مغز فرزندان شود و ممکن از این‌طریق سبب اختلال در حافظه فضایی و رفتارهای شبه-اضطرابی گردد.

کلمات کلیدی: استرس بی‌حرکتی، ماز بارنز، حافظه فضایی، رفتار شبه اضطرابی، BDNF

وصول مقاله:۹۶/۱۱/۲۸ اصلاحیه نهایی:۹۷/۲/۵ پذیرش:۹۷/۳/۱

مقدمه

استرس مجموعه واکنش هایی است که در پاسخ به هر عاملی که موجب بهم خوردن تعادل درونی (هومئوستاز) شود به وجود می آید. در صورتی که استرس مزمن و غیر قابل کنترل باعث بروز اختلالات یادگیری، عاطفی، اضطراب و افسردگی می شود (۳-۱). به عبارت دیگر هر گونه عامل محیطی یا ذهنی که ادامه حیات را برای جاندار مشکل سازد می تواند یک استرس محسوب شود (۴). مطالعات نشان داده اند که قرار گرفتن مادر در دوران بارداری در معرض استرس می تواند اثرات طولانی مدتی در مغز و رفتار فرزندان ایجاد کند و می تواند منجر به اختلالات متابولیک، رفتاری و روانی در بزرگسالی شود (۷-۵). در فرزندانی که در دوره ی جنینی در معرض استرس بوده اند، علائم کاهش وزن، تضعیف سیستم ایمنی، رفتار غیر طبیعی جنسی، تغییر در ترشح نوروترانسمیترها نظیر دوپامین، سروتونین، گابا و نوراپی نفرین گزارش شده است که می تواند آنها را مستعد بروز بیماری های خلق و خو مانند افسردگی، اضطراب و حتی اعتیاد کند (۹ و ۸) که این بیماری ها همه ساله مقادیر عظیمی از بودجه های بهداشتی را در کشورها به خود اختصاص می دهند.

محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) یکی از سیستم‌های استرسی اولیه در پستانداران می‌باشد. HPA یک سیستم عصبی و اندوکرینی جامع بوده که یک نقش کلیدی در آزادسازی گلوکوکورتیکوئیدها، کورتیزول در انسان و کورتیکوسترون در جوندگان، بازی می کند. همراه با سایر سیستم های حساس به استرس، گلوکوکورتیکوئیدها بدن را برای بقاء به وسیله تجهیز کردن ذخائر انرژی، مهار سیستم های فیزیولوژیکی غیرضروری و هماهنگ کردن پاسخ های رفتاری در مواجهه با موقعیت ها یا حوادثی که پر استرس شناخته می‌شوند، آماده می‌کنند (۱۲-۱۰). اگرچه گلوکوکورتیکوئیدها برای رشد نرمال مغز حیاتی می باشند، مواجهه بیش از اندازه این هورمون ها در طول دوران های حساس جنینی ممکن است ساختار و عملکرد مغز در حال رشد را تغییر دهد. به علت رشد سریع، مغز جنین ممکن است به خصوص نسبت به اثرات مقادیر بالای گلوکوکورتیکوئیدها آسیب پذیر باشد. مطالعات در حیوانات آزمایشگاهی پیشنهاد می کند که محورHPA حساس به استرس به خصوص مستعد به این اثرات زودرس می باشد و اختلال در محور HPA در دوران جنینی ممکن است سبب ایجاد اختلالات روانی در بزرگسالی شود (۱۳). Dorey و همکاران (۲۰۱۲) نشان داده اند که در موش هایی که پیش از تولد استرس در معرض استرس بوده اند به علت کاهش رسپتورهای گلوکوکورتیکوئیدی فیدبک مهاری هورمون آزاد کننده کورتیکوتروپین تضعیف شده و سطح پلاسمایی کورتیکواسترون بالا رفته و از این رو در سازش با محیط جدید از خود ضعف نشان می دهد (۱۴).

نوروتروفین ها نقش های بسیار زیادی در رشد و نمو نورون ها و تنظیم عملکرد آنها ایفا می‌کنند. این فاکتورها شامل دامنه گسترده‌ای از پروتئین‌ها می‌شود، که یکی از مهم‌ترین آنها فاکتور رشد مشتق از مغز (BDNF) می‌باشد که به مقدار زیاد در سیستم عصبی وجود دارد و نقش‌های بسیار گسترده‌ای در تمایز نورونها، حفظ حیات نورون‌ها، ایجاد سیناپس‌های جدید و گسترش اعصاب، چه در اعصاب مرکزی و چه در اعصاب محیطی دارد (۱۶ و ۱۵). همچنین BDNF برای تکوین نرمال نورون های گاباارژیک، کولینرژیک و سرتونرژیک که برای یادگیری و حافظه و جلوگیری از اضطراب نقش حیاتی دارند مورد نیاز می باشد (۱۷). تغییر در سطوح این فاکتورها در اختلالات استرسی نقش دارد اما مطالعات محدودی در مورد میزان و نحوه تغییر این فاکتور به دنبال استرس دوران جنینی وجود دارد. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات استرس دوران جنینی بر تغییرات حافظه فضایی و رفتارهای اضطرابی به عنوان مهمترین نشانه ی تغییرات شناختی در موش های نر نسل اول مادران استرس دیده بود.

روش بررسی

حیوانات:

این مطالعه تجربی بر روی موشهای آزمایشگاهی کوچک نر نژاد NMRI با میانگین وزنی ۳۰-۲۵ گرم صورت گرفت. حیوانات از دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله خریداری شده و پس از انتقال به اتاق حیوانات در قفس‌های پلاستیکی شفاف مخصوص به ابعاد (۱۵× ۳۰×۴۵) در شرایط آزمایشگاهی استاندارد با آب و غذای مناسب و تازه و همچنین دوره ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۴°C-۲۲ نگهداری شدند. حیوانات برای سازش با محیط جدید آزمایشگاه یک هفته قبل از شروع آزمایش به محیط آزمایش منتقل شدند. دوره ی جنسی حیوانات قبل از شروع آزمایش ها و انجام عمل لقاح بررسی و همه ی حیوانات ماده جهت جفت گیری با حیوانات نر در فاز استروس قرار داشتند. آزمایشات بر طبق دستورالعمل‌های اخلاقی بین المللی و با تایید کمیته اخلاق انجام شد.

گروه های آزمایشی:

موشهای نر و ماده به نسبت ۱ به ۲ در هر قفس گذاشته شده تا عمل لقاح صورت گیرد. صحت انجام لقاح با انجام اسمیر ومشاهده پلاگ واژنی تایید شد. پس از تایید لقاح، موشهای نر از قفسها برداشته شدند تا هر قفس فقط شامل موش ماده باردار باشد. موشهای ماده به دو گروه کنترل (بدون استرس n=10) و گروه استرس (n=10) تقسیم شدند. پس از وضع حمل موشها، شرایط مشابه برای فرزندان در هر دو گروه فراهم شد تا فرزندان آنها بدون هر گونه استرس بیرونی پرورش یابند. پس از رسیدن فرزندان آنها به سن بلوغ (۲۰-۲۵ گرمی)، حیوانات نر و ماده جدا شدند و حیوانات نر (n= 10/Group) در این تحقیق مورد بررسی قرارگرفتند.

روش القای استرس مزمن بی حرکتی در موش های ماده ی باردار:

در گروه تعیین شده به عنوان گروه استرس (شامل ۱۰ سر سوری)، بلافاصله پس از تایید بارداری (از روز صفر بارداری)، استرس بی حرکتی (restraint stress) روزانه به مدت ۱ ساعت با قرار دادن موشها در داخل لوله اعمال میشد. این لوله ازجنس P.V.C به طول ۲۰ سانتیمتر وقطر داخلی ۶ ساتی متر است که یک انتهای آن به صورت نیمه کامل بسته شده به نحوی که حیوانات می توانند پوزه ی خود را در قسمت نیمه باز لوله قرار داده و نفس بکشند، اما امکان چرخش یا عقب گرد حیوان وجود ندارد. انتهای این لوله بوسیله یک درپوش بسته می شود، در نتیجه حیوان امکان جابجایی در داخل لوله را ندارد. این استرس هر روز به مدت یک ساعت تکرار می‌شود (۱۸). اما زمان شروع و پایان القای استرس به صورت کنترل نشده (تصادفی در ساعات متفاوت روز) تعیین میشد، تا حیوان نتواند به استرس عادت کند. این استرس تا روز ۱۵ بارداری به حیوانات اعمال گردید. در گروه تعیین شده به عنوان گروه کنترل، حیوانات در شرایط بدون استرس نگهداری شدند.

روش خون گیری:

جهت اندازه گیری میزان کورتیزول (به عنوان هورمون استرس) از مادران باردار در هر دو گروه استرس وکنترل خون‌گیری انجام شد. برای این منظور به کمک پیپت پاستور آغشته با EDTA سه درصد از گوشه‌ی داخلی چشم (سینوس رترو اوربیتال) مادران باردار در هر دو گروه استرس وکنترل در روز ۱۵ بارداری به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر خون گیری انجام و سپس دراپندورف‌های با حجم ۱/۵ میلی‌ْلیتر ریخته شد. جهت جمع‌آوری پلاسما پس از خون گیری، توسط سانتریفیوژ جداسازی پلاسما صورت پذیرفت. اپندورف‌های حاوی نمونه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۳۰۰۰ دور چرخش به مدت ۷ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفتند، سپس پلاسمای نمونه‌ها توسط سمپلر جدا شده و تا زمان سنجش غلظت هورمون کورتیکواسترون، در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شدند. جهت تعیین سطوح غلظت کورتیزول از کیت مخصوص آزمایشگاهی (Cortisol ELISA kit; EIA-4164; DRG Instruments GmbH, Germany) و به روش الایزا صورت گرفت. ابتدا چاهک‌های

میکروپلیت آماده و ۲۰ میکرولیتر از هر یک از استانداردها، کنترل و نمونه در چاهک مربوط ریخته شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از آنزیم کونژوگه به تمامی چاهک‌ها اضافه و میکروپلیت به آهستگی تکان داده شده و به مدت ۶۰ دقیقه، انکوباسیون در دمای اتاق صورت پذیرفت. بعد از آن مخلوط انکوباسیون از تمامی چاهک‌ها تخلیه شده و چاهک‌ها سه مرتبه با ۴۰۰ میکرولیتر از محلول شستشوی رقیق شده، شستشو داده شد. پس از هر بار شستشو تمامی مایع موجود در چاهک‌ها خارج شده و با ضربه زدن میکروپلیت روی کاغذ جاذب رطوبت، تمامی قطرات باقی مانده حذف شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به داخل هر چاهک اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اطاق انکوبه شد. در این هنگام واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از محلول بازدارنده به تمامی چاهک‌ها، متوقف شد. ده دقیقه پس از اضافه کردن محلول بازدارنده، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۱۰±۴۵۰ نانومترتوسط دستگاه الایزاریدر بررسی گردید(۲).

ماز بارنز (Barnez maze):

ماز بارنز روشی است جهت اندازه گیری حافظه فضایی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی و موش صحرایی(۱۹). این ماز از یک صفحه‌ی مدور از جنس پلاکسی گلاس شیری رنگ ساخته شده که ۹۲ سانتیمتر قطر دارد. در اطراف این ماز به فاصله‌ی ۲ سانتیمتر از لبه‌ی ماز ۱۲ سوراخ به قطر ۸ سانتیمتر تعبیه شده است. فاصله‌ی سوراخ‌ها از هم ۵ سانتیمتر است. در زیر یکی از این سوراخ‌ها (سوراخ هدف یا Target Holl) یک اتاقک از جنس پلاکسی گلاس تیره به ابعاد ۲۰×۲۰ سانتیمتر قرار دارد که می‌تواند از یک سوراخ به سوراخ دیگر جابه‌جا شود. این ماز بر روی یک پایه به ارتفاع ۱۰۰ سانتیمتر قرار دارد و یک لامپ ۵۰۰ وات (کم مصرف) در ارتفاع ۱۰۰ سانتیمتر بالای آن تعبیه شده است. برای آموزش حیوانات، هر حیوان در روز صفر به مدت ۳ دقیقه بر روی ماز قرار می‌گیرد. در این حالت لامپ خاموش است و اتاقک نیز در زیر هیچ سوراخی قرار ندارد (روز آشنایی). ۲۰ دقیقه پس از آشنایی، ابتدا اتاقک در محل خود قرار می‌گیرد، حیوان به ماز برگردانده می‌شود و در زیر یک محفظه از جنس پلاکسی گلاس به ابعاد ۱۵×۱۵ سانتیمتر قرار می‌گیرد. ۱۰ ثانیه بعد لامپ روشن شده و محفظه برداشته می‌شود. به حیوان ۹۰ ثانیه وقت داده میشد تا سوراخ هدف را پیدا کند. اگر سوراخ هدف را پیدا نمی‌کرد با دست آن را به سمت سوراخ هدف هدایت می کردیم. پس از یافتن سوراخ هدف، لامپ خاموش شده و یک صفحه‌ی نیز بر روی سوراخی که حیوان در آن قرار داشت گذاشته میشد و ۶۰ ثانیه حیوان در همان حالت باقی می‌ماند. این روش ۴ بار در هر روز برای هر حیوان انجام می‌شود که برای هر حیوان ۴ روز پشت سرهم تکرار میشد و در روز پنجم روز آزمون حافظه بود. پس از هر آزمایش، تمام سطح ماز با محلول الکل ۷۰٪ تمیز می‌شود تا اثرات بویایی در سطح ماز باقی نماند. برای هر حیوان هم اتاقک مقصد پیش از شروع آزمایش با محلول فوق شسته میشد. پارامترهای مورد بررسی جهت سنجش حافظه فضایی شامل تعداد سوراخ‌های خطا، مسافت طی شده توسط حیوان و زمان رسیدن به سوراخ هدف بود. هم چنین استراتژی رسیدن به سوراخ هدف نیز مورد بررسی قرار گرفت. این استراتژی شامل حرکات تصادفی (Random movement)، حرکات سری (Serial movement) و حرکات مستقیم (Direct movement) هستند که برای هر حیوان یک نوع و برای مجموعه‌ی حیوانات به صورت ستونی نمایش داده می‌شود.

تست ماز بعلاوه مرتفع (Elevated plus maze test, EPM):

ماز بعلاوه مرتفع به عنوان تست ارزیابی رفتارهای اضطرابی در حیوانات آزمایشگاهی شناخته می شود(۲۰) و از دو بازوی باز (۰/۵×۵×۲۵ سانتیمتری) و دو بازوی بسته (۱۶×۵×۲۵ سانتیمتری) تشکیل شده است که بازوهای شبیه به هم دو به دو روبروی یکدیگر قرار گرفته اند و کل ماز در ارتفاع ۵۰ سانتیمتری از کف زمین قرار می گیرد. برای

جلوگیری از سقوط حیوانات در دو طرف و انتهای بازوی باز لبه هایی به اندازه یک سانتیمتر تعبیه شده است. چهار بازو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۵×۵ سانتی متر منتهی می شوند. موشها درون محدوده مرکزی و رو به یک بازوی باز قرار میگیرند. در زمان فاز روشنایی سیکل تاریک/روشن، این تست انجام میگرفت بطوری که حیوان در مرکز ماز قرار داده شده و به مدت ۵ دقیقه رفتارهای آن توسط دوربین قرار گرفته در بالای ماز ثبت میگردید که به ما امکان بررسی دقیق تر تمام جنبه های رفتاری حیوان را میداد. پس از هر تست کل سطح ماز بوسیله الکل ۲۰ درصد تمیز می گردید تا نشانه های بویایی به جا مانده از حیوان قبل از بین برود. به منظور ارزیابی عملکرد اضطرابی حیوان در تست EPM، پارامترهای مورد ارزیابی شامل، درصد زمان سپری شده در بازوی باز و مدت زمان سپری شده در بازوی باز بود. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته قرار گرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر است.

تعیین سطوح غلظت BDNF هیپوکمپ:

پس از انجام آزمون های رفتاری با رعایت ملاحضات اخلاقی موش‌ها کشته شدند و مغز آن‌ها خارج گردید و داخل تانک نیتروژن مایع قرار دادیم و بعد از آنان به فریز با دمای ۸۰ – درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از آن در محلول بافر فسفات سرد توسط دستگاه مخصوص هموژنیزه کردن، همونیزه شدند. سپس نمونه‌های هموژنیزه شده به داخل اپندورف منتقل شوند و در سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه‌ی سانتی گراد با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و بعد از آن توسط کیت مخصوص تعیین غلظت BDNF، به جذب نوری نمونه ها در طول موج ۱۰±۴۵۰ نانومترتوسط دستگاه الایزاریدر بررسی شدند.

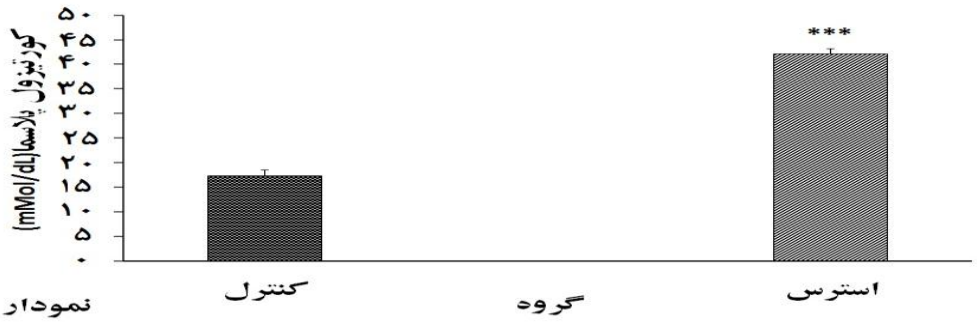
تجزیه و تحلیل داده‌ها:

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 22 درصد آنالیز گردید. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد بیان شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون کولوگروف-اسمیرنوف، برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون t-test مستقل استفاده شد. P<۰/۰۵ به عنوان مرز معنی دار بودن یافته ها در نظر گرفته شد.

یافته ها

بررسی اثر استرس بی حرکتی بر میزان کورتیزول خون مادران باردار :

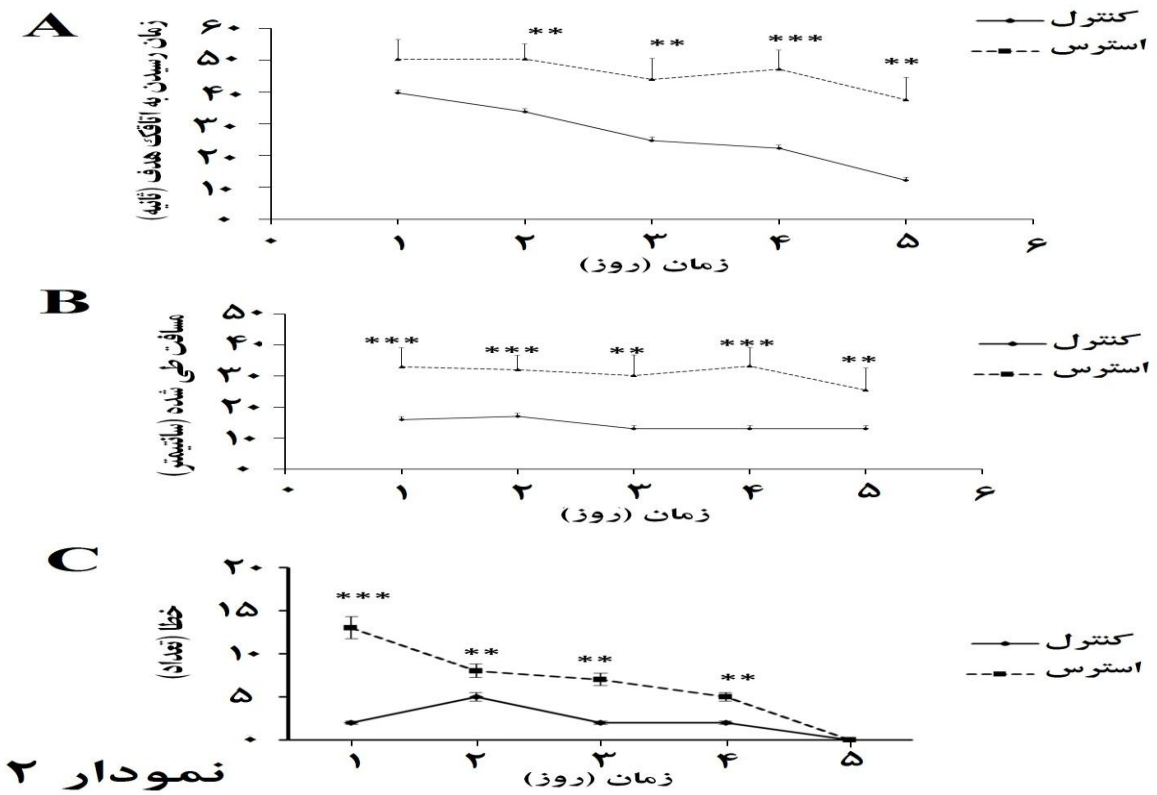
نتایج حاصل از مقایسه سطح پلاسمایی کورتیزول خون مادران گروه استرس و کنترل نشان داد که میزان کورتیزول خون در مادرانی که از روز ۱ تا ۱۵ بارداری تحت استرس بی‌حرکتی بودند افزایش معنی‌داری (mMol/dL ۴۲/۱۶±۳/۷۴) نسبت به مادران گروه کنترل (mMol/dL ۱۷/۳۲±۲/۴۹) نشان داد (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۱).



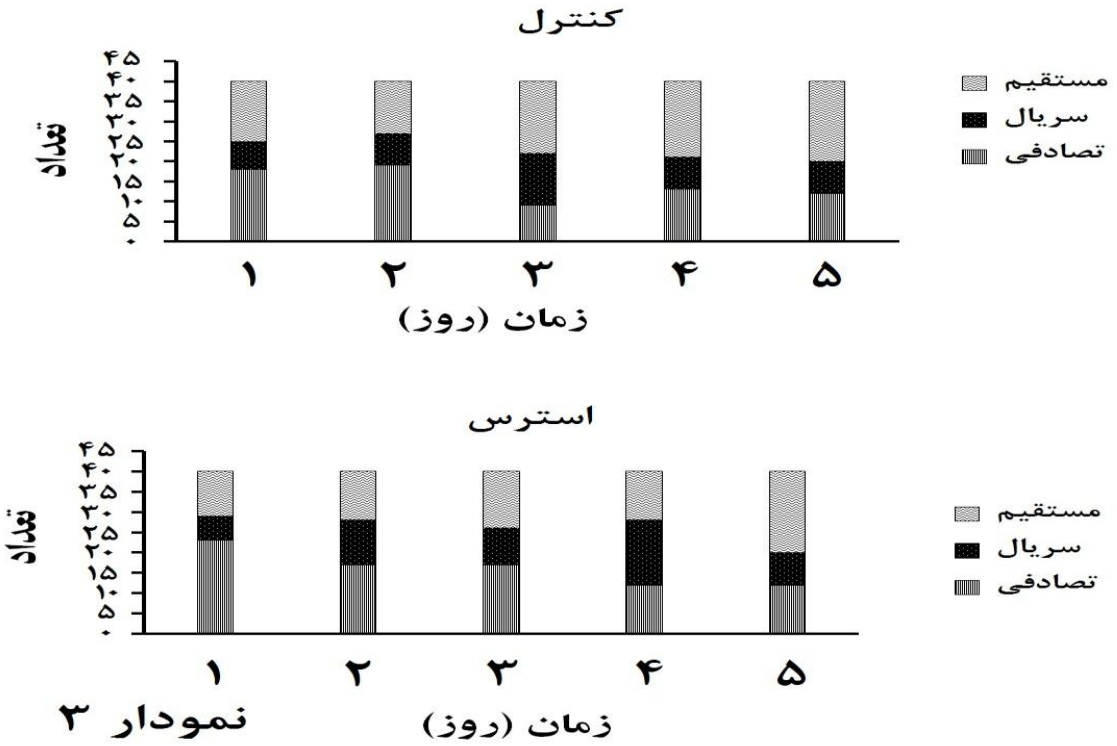
نمودار ۱- تغییرات میزان کورتیزول پلاسما در مادران باردار تحت استرس مزمن بی حرکتی. نتایج نشان داد که میزان کورتیزول خون موش های باردار استرس دیده بالاتر از موش های باردار گروه کنترل بود. تعداد موش ها در هر گروه ۱۰ سر و اطلاعات به صورت میانگین± انحراف معیار استاندارد بیان شده است. *** P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنتر

بررسی اثر استرس بی حرکتی بر یادگیری فضایی در فرزندان نسل اول:

جهت بررسی حافظه فضایی فرزندان نسل اول از ماز بارنز استفاده گردید. نتایج نشان داد که فرزندان نسل اول متولد شده ازمادران استرس دیده مدت زمان بیشتری را جهت رسیدن به اتاقک هدف نسبت به گروه کنترل طی کردند که از نظر آماری معنی دار بود (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۲A). همچنین فرزندان نسل اول متولد شده ازمادران استرس دیده به طور معنی داری (p<۰/۰۰۱) مسافت بیشتری را جهت رسیدن به اتاقک هدف نسبت به گروه کنترل طی کردند (نمودار ۲B). علاوه بر این فرزندان مادران گروه استرس دیده تعداد خطاهای (Error Numbers) بیشتری را جهت رسیدن به اتاقک هدف نسبت به فرزندان گروه کنترل مرتکب شدند که از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۲C). نتایج نشان داد که موش های نسل اول متولد شده از مادران گروه کنترل بیشتر استراتژی حرکت مستقیم (Direct) برای رسیدن به اتاقک هدف اتخاذ کردند در حالی که فرزندان متولد شده از مادران گروه استرس دیده بیشتر استراتژی حرکت تصادفی (Random) برای رسیدن به اتاقک هدف اتخاذ کردند (نمودار ۳). بنابراین نتایج نشان داد که استرس جنینی سبب اختلال در حافظه فضایی در بزرگسالی می گردد.



نمودار ۲. تأثیر استرس مزمن بی حرکتی مادران باردار در موش های نر نسل اول بر حافظه و یادگیری فضایی. نتایج ماز بازنز نشان داد موش های نر که از مادران گروه استرس دیده متولد شده بودند زمان بیشتری را برای رسیدن به اتاقک هدف صرف کردند (A). همچنین مسافت بیشتری را برای رسیدن به اتاقک هدف صرف کردند (B) و تعداد خطاهای بیشتری را جهت رسیدن به اتاقک هدف (Target Hole) مرتکب شدند (C). تعداد موش ها در هر گروه ۱۰ سر و اطلاعات به صورت میانگین±انحراف معیار استاندارد بیان شده است. **P<۰/۰۱ ، ***P<۰/۰۰۱

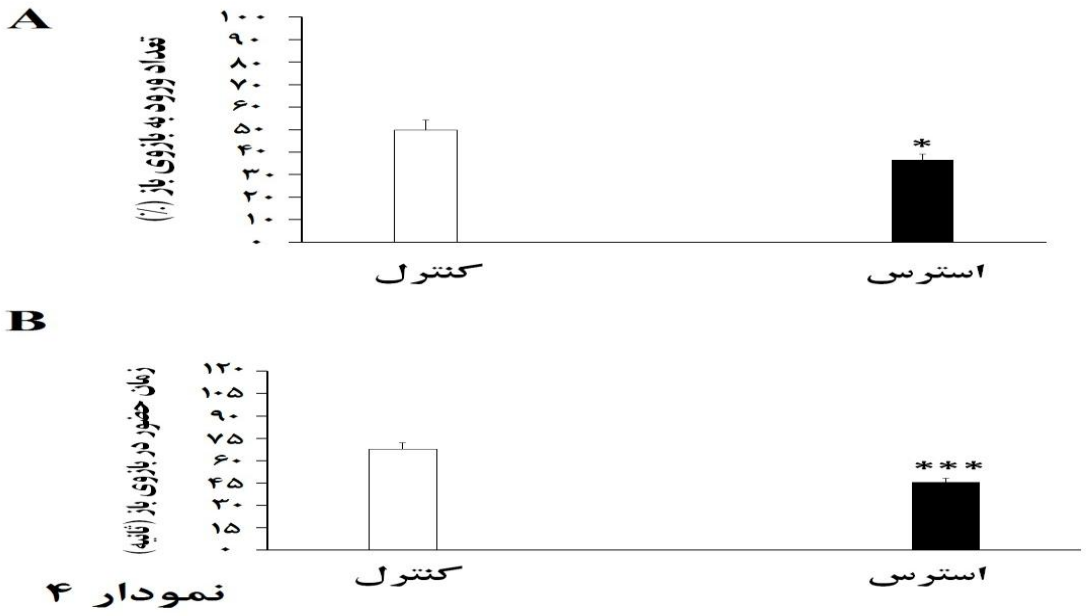


نمودار ۳. نوع استراتژی رسیدن به سوراخ هدف در موش های نسل اول گروه استرس و کنترل. این استراتژی شامل حرکات تصادفی (Random movement)، حرکات سری (Serial movement) و حرکات مستقیم (Direct movement) هستند که برای هر حیوان یک نوع و برای مجموعه‌ی حیوانات به صورت ستونی نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که استراتژی اتخاذ شده توسط موش های نسل اول گروه استرس بیشتر استراتژی حرکت تصادفی(Random) بود ولی استراتژی اتخاذ شده توسط گروه کنترل بیشتر حرکت مستقیم(Direct) بود.

بررسی اثر استرس بی حرکتی بر رفتارهای اضطرابی در فرزندان نسل اول:

نتایج آنالیز مشخص نمود که درصد ورود به بازوی باز EPM در فرزندان نسل اول مادران استرس دیده نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۴A). همچنین زمان حضور در بازوی باز در فرزندان نسل اول مادران استرس دیده نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته بود (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۴B). این نتایج نشان دهنده وجود اضطراب در فرزندان مادران باردار که تحت استرس بی حرکتی بوده اند می باشد.

.



نمودار ۴

نمودار ۴. بررسی اثر اعمال استرس بی حرکتی در دوران بارداری بر درصد ورود فرزندان نر حاصل به بازوهای باز (A) و مدت زمان حضور در بازوی باز (B) ماز بعلاوه مرتفع. تعداد موش ها در هر گروه ۱۰ سر و اطلاعات به صورت میانگین±انحراف معیار استاندارد بیان شده است. *P<۰/۰۵ ، ***P<۰/۰۰۱

بررسی اثر استرس بی حرکتی مزمن در مادران باردار بر غلظتBDNF فرزندان نسل اول:

نتایج نشان داد که میزان غلظت BDNF در مغز موش های متولد شده از مادران گروه کنترل بیشتر (nMol/Lit ۹/۸±۱/۰۹) از مغز موش های متولد شده از مادران گروه استرس دیده (nMol/Lit ۶/۷±۰/۲۶۶) بود که این تغییرات از نظر آماری معنی دار بود (p<۰/۰۵)(نمودار ۵).

نمودار ۵

نمودار ۵. تأثیراسترس مزمن بی حرکتی مادران بر غلظت BDNF مغز موش های نر نسل اول. تعداد موش ها در هر گروه ۱۰ سر و اطلاعات به صورت میانگین ±انحراف معیار استاندارد بیان شده است. *P<۰/۰۵

بحث

تحقیق ما نشان داد که میزان کورتیزول پلاسمای موش‌های ماده باردار استرس دیده از موش‌های ماده باردار استرس ندیده بسیار بالاتر بود. هر چند هورمون کورتیکواسترون، گلوکوکورتیکوئید اصلی در موش می باشد اما مطالعات نشان داده اند که کورتیزول نیز در طی استرس در موشها افزایش می یابد (۲۱ و ۳). بنابراین اگر چه کورتیزول به عنوان هورمون اصلی استرس در جوندگان محسوب نمی‌شود اما به دلیل آن که در حین استرس این هورمون نیز در خون ترشح می‌شود می‌توان گفت که با یک نسبت معین این هورمون نیز در خون حیوانات استرس دیده نسبت به حیوانات استرس ندیده افزایش معنی داری پیدا میکند. به همین دلیل علی رغم اهمیت کمتر هورمون کوتیزول نسبت به هورمون کورتیکو سترون در جوندگان می‌توان از سنجش کورتیزول هم به عنوان یک معیار قابل اعتماد در بررسی‌های مربوط به استرس در جوندگان استفاده کرد. به همین دلیل تحقیق ما نیز در تأیید این تحقیقات بیان می کند که می‌توان از تغییرات هورمون کورتیزول پلاسما نیز به عنوان معیاری برای بررسی القای استرس در موش‌ها استفاده کرد.

مطالعات نشان داده اند که در حین استرس به خصوص استرس روانی به دلیل فعالیت قشر فرونتال، آمیگدال فعال شده و با تحریک نورون های هسته‌ی پارانتریکولار هیپوتالاموس ترشح نورو هورمون فاکتور آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRF) را از این هسته افزایش می‌دهد که این نورو هورمون پس از گذر از جریان خون باب هیپوتالاموس -هیپوفیز به سلول‌های ترشح کننده‌ی POMC در هیپوفیز پیشین رسیده و شکسته شدن مولکول‌های POMC ذخیره شده در این سلول‌ها را سبب می‌شود. سپس هورمون ACTH که ناشی از شکسته شدن مولکول POMC می‌باشد در خون رها شده و به ناحیه‌ی فاسیکولاتای قشر غده‌ی فوق کلیه رسیده و با تحریک سلول‌های این ناحیه باعث افزایش تولید و ترشح گلوکوکورتیکوئیدها از این سلول‌ها می‌شود (۲۵-۲۲).

احتمالاً در این تحقیق نیز مکانیسم مشابهی در مغز و بدن موش‌های مادر در حین القای استرس وجود داشته است.

در ادامه تحقیق نتایج ما نشان داد که موش‌های نر متولد شده از مادران باردار استرس دیده نسبت به موش‌های متولد شده از مادران باردار استرس ندیده توان یادگیری و حافظه‌ی فضایی کمتری را در مازبارنز از خود نشان دادند. تحقیقات متعدد نشان دادند که حافظه و یادگیری فضایی در هیپوکمپ جمع بندی می‌شوند (۲۷ و ۲۶). یکی از مهمترین مناطق دارای تراکم زیاد گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی در مغز هیپوکمپ است که به دلیل تراکم بالای این گیرنده‌ها بایستی که هیپوکمپ را جزء مهمترین اهداف هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی در مغز دانست(۲۸). تحقیقات بر روی مکانیسم اثر گلوکورتیکوئیدها در هیپوکمپ نشان داده است که در غلظت‌های کم این هورمون‌ها با اثر برگیرنده‌های نوع ۱ گلوکوکورتیکوئیدی یا اصطلاحاً گیرنده‌های منیرالوکورتیکوئیدی باعث افزایش نسبت تراکم گیرنده‌های AMPA بر گیرنده‌های NMDA شده و درنتیجه القا حافظه طولانی مدت (LTP) را در این سلول‌ها افزایش می‌دهند این امر به معنای بهبود حافظه در موجود زنده می‌باشد و این همان تاثیر مثبت استرس در القا حافظه است (۲۹).

همچنین مطالعات نشان داده اند که افزایش غلظت گلوکوکورتیکوئیدهای پلاسما و در نتیجه مغز موجب می‌شود تا نوع دوم گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدهای نیز فعال شوند که فعال شدن این گیرنده‌ها با همکاری گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA باعث بهم خوردن جریان کلسیمی رو به داخل و در نتیجه افزایش پاتولوژیک غلظت کلسیم در سلول‌های مغزی به خصوص در هیپوکمپ شود که این امر به فعال شدن مکانیسم‌های مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) می گردد(۲۸). نتیجه خالص این وقایع کاهش حافظه و قدرت یادگیری در حیوان یا انسان تحت استرس مداوم است. از سوی دیگر مطالعات نشان داده اند که افزایش هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی به دلیل استرس

مادر می‌تواند به بروز ناهنجاری‌های زیاد در مغز فرزندان منجر شود که به دلیل اختلال در برنامه ریزی تکاملی فرزندان می باشد (۳۱ و ۳۰). همچنین در تحقیقات قبلی تأخیر در رشد مغزی به خصوص در نواحی قشری مغز در اثر استرس دوران بارداری دیده شده بود (۳۳ و ۳۲) و در تحقیق ما نیز احتمال دارد که کاهش توان حافظه و یادگیری و افزایش اضطراب در ارتباط با تاخیر در رشد عصبی نسل بعدی بوده باشد. همچنین در مطالعه حاضر استرس دوران جنینی سبب افزایش رفتارهای اضطرابی در فرزندان گردید.

در قسمت بعدی آزمایش‌ها میزان غلظت BDNF مغز در هر دو گروه آزمایش و کنترل مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که غلظت BDNF در مغز گروه کنترل بیشتر از گروه آزمایش بود و این امر با نتایج مربوط به کاهش حافظه و یادگیری و افزایش رفتارهای اضطرابی در این گروه هم خوانی داشت. BDNF یک فاکتور رشد عصبی است که به طور عمده در القای نورون و محافظت از نورون‌ها نقش دارد. تحقیقات گسترده نشان داده است که استرس، افسردگی و اضطراب می‌تواند باعث کاهش غلظت مغزی این ماده شوند (۱۷). نشان داده شده است که استرس مزمن می‌تواند به کاهش غلظت BDNF در مغز موش‌ها منجر شود (۳۴). همچنین همراستا با نتایج مطالعه حاضر Boersma و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استرس دوران جنینی سبب کاهش بیان BDNF در مغز موش ها می شود (۳۵). نشان داده شده است که BDNF سبب کاهش قابل توجه جریانات پس سیناپسی مهاری (IPSCs) در نورون های هیپوکمپ می شود. همچنین استفاده مزمن از BDNF سبب تقویت طولانی-مدت رسپتورهای non-NMDA گلوتاماتی می شوند و اثرات مهار سیناپسی را کاهش می دهند(۳۶). با توجه به این که کاهش BDNF یک نشانه‌ی مهم برای بروز بیماری‌های روانی مانند افسردگی و اضطراب می‌باشد، تحقیق حاضر نیز می تواند تاییدی درباره اتیولوژی احتمالی این بیماری نشان دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استرس دوران جنینی در موش های کوچک آزمایشگاهی سبب کاهش حافظه فضایی و افزایش رفتارهای اضطرابی در بزرگسالی میشود که این تغییرات احتمالا می تواند به دلیل کاهش بیان BDNF در مغز موش های کوچک آزمایشگاهی به دنبال استرس دوران جنینی رخ دهد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تشکر و قدردانی میگردد.

References

1.McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. Dialogues Clin Neurosci 2006; 8: 36738.

2.Dalooei JR, Sahraei H, Meftahi GH, Khosravi M, Bahari Z, Hatef B, et al. Temporary amygdala inhibition reduces stress effects in female mice. J Adv Res 2016; 7: 643-9.

3.Ghobadi N, Sahraei H, Meftahi GH, Bananej M, Salehi S. Effect of estradiol replacement in ovariectomized NMRI mice in response to acute and chronic stress. J Appl Pharm Sci 2016; 6: 176-84.

4.Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. Rev Reproduct 2000; 5: 105-13.

5.Glover V. Prenatal stress and its effects on the fetus and the child: possible underlying biological mechanisms. Adv Neurobiol 2015; 10: 269–83.

6.King S, Dancause K, Turcotte-Tremblay AM, Veru F, Laplante DP. Using natural disasters to study the effects of prenatal maternal stress on child health and development. Birth Defects Res C Embryo Today 2012; 96: 273–88.
7.Mortazaei S, Sahraei H, Bahari Z, Meftahi GH, Pirzad Jahromi G, Hatef B. Ventral tegmental area inactivation alters hormonal, metabolic, and locomotor responses to inescapable stress. Arch Physiol Biochem 2018. [In Press]
8.Benoit JD, Rakic P, Frick KM. Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression. Behav Brain Res 2015; 281: 1-8.
9.Boersma GJ, Tamashiro KL. Individual differences in the effects of prenatal stress exposure in rodents. Neurobiol Stress 2015; 1: 100-8.
10.Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. Nature Rev Neurosci 2012; 13: 22-37.
11.Shemiran SS, Meftahi GH, Sahraei H, Ghobadi N. Effect of testosterone replacement on feeding behaviors after acute and chronic stress in gonadectomized male NMRI mice. Front Biol 2017; 12: 430-41.
12.Hassantash M, Sahraei H, Bahari Z, Meftahi GH, Vesali R. The role of dopamine D2 receptors in the amygdala in metabolic and behavioral responses to stress in male Swiss-Webster mice. Front Biol 2017; 12: 298–310.
13.Wingenfeld K, Wolf OT. HPA axis alterations in mental disorders: impact on memory and its relevance for therapeutic interventions. CNS Neurosci Therap 2011; 17: 714–22.
14.Dorey R, Piérard C, Chauveau F, David V, Béracochéa D. Stress-induced memory retrieval impairments: different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus. Neuropsychopharmacol 2012; 37: 2870–80.
15.Hassanzadeh K, Nikzaban M, Moloudi MR, Izadpanah E. Effect of selegiline on neural stem cells differentiation: a possible role for neurotrophic factors. Iran J Basic Med Sci 2015; 18: 549-54.
16.Taliaz D, Loya A, Gersner R, Haramati S, Chen A, Zangen A. Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. J Neurosci 2011; 31: 4475-83.
17.Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. Pharmacol Rev 2012; 64: 238e258.
18.Ampuero E, Luarte A, Santibañez M, Varas-Godoy M, Toledo J, Diaz-Veliz G, et al. Two chronic stress models based on movement restriction in rats respond selectively to antidepressant drugs: aldolase C as a potential biomarker. Int J Neuropsychopharmacol 2015; 18: 1-9.
19.Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. Learn Mem 2006; 13: 809-19.
20.lbrechet-Souza L, Cristina de Carvalho M, Rodrigues Franci C, Brandao ML. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. Horm Behav 2007; 52: 267-73.
21.Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, et al. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. PLoS One 2015; 20: e0117503.
22.McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. Neuropsychopharmacol 2016; 41: 3-23.

23.Asalgoo S, Jahromi GP, Meftahi GH, Sahraei H. Posttraumatic stress disorder (ptsd): Mechanisms and possible treatments. Neurophysiology 2015; 47:482-89.
24.Motahari AA, Sahraei H, Meftahi GH. Role of nitric oxide on dopamine release and morphine-dependency. Basic Clin Neurosci 2016; 7: 283-90.
25.Ehteram BZ, Sahraei H, Meftahi GH, Khosravi M. Effect of intermittent feeding on gonadal function in male and female NMRI mice during chronic stress. Braz Arch Biol Technol 2017; 60: e17160607.
26.Meftahi G, Ghotbedin Z, Eslamizade MJ, Hosseinmardi N, Janahmadi M. Suppressive effects of resveratrol treatment on the intrinsic evoked excitability of CA1 pyramidal neurons. Cell Journal (Yakhteh) 2015; 17: 532-39.
27.Shrager Y, Bayley PJ, Bontempi B, Hopkins RO, Squire LR. Spatial memory and the human hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 2961-6.
28.McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. Nature Neurosci 2015; 18: 1353-63.
29.Ter Heegde F, De Rijk RH, Vinkers CH. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. Psychoneuroendocrinol 2015; 52: 92-110.
30.Cottrell EC, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. Front Behav Neurosci 2009; 3: 19.
31.Alipour M, Ghahremani L, Amooee S, Keshavarzi S. The effectiveness of relaxation techniques on depression, anxiety and stress in pregnant women: based on self-efficacy theory. SJKU 2017; 22: 19-30. [In Persian]
32.Buss C, Entringer S, Swanson JM, Wadhwa PD. The role of stress in brain development: the gestational environment's long-term effects on the brain. Cerebrum 2012; 2012: 4.
33.Zarei L, Moloodi-Tapeh M. Evaluation of inhibitory effect of caffeine on bone morphogenesis in pregnancy in a model of rat embryos. SJKU 2017; 22: 21-31. [In Persian]
34.Larsen MH, Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Sandi C. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. J Psychiat Res 2010; 44: 808–16.
35.Boersma GJ, Lee RS, Cordner ZA, et al. Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats. Epigenetics 2014; 9: 437-47.
36.Licinio J, Wong ML. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in stress and affective disorders. Mol Psychiatry 2002; 7: 519.