مقایسه اثر دو نوع استرس دوران بارداری روی میزان کورتیکو سترون خون و گیرنده های تحریکی مغز

الهام توسلی[۱] , مسعود تشفام[۱*] , احسان صبوری[۲], یوسف رسمی[۳]

۱)گروه دام پزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲)مرکز تحقیقات نورو فیزیو لوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۳)گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۳

چکیده

مقدمه: استرس مادران در دوران بار داری می تواند یک فاکتور بالقوه در ایجاد برخی از بیماری ها نورو لوژیک باشد. مسیر بیو شیمیایی در پاسخ به استرس ها ترشح فاکتور آزاد کننده کورتیکو تروپین CRF از هسته پارا ونتریکولار است که منجر به تحریک ترشح ACTH و نهایتا افزایش گلوکو کورتیکوئید های پلاسما می شوند.

افزایش سطح کورتیکو سترون خون CBL در نوزادان موش های صحرایی نشان دهنده القا استرس دوران بار داری به آن ها است و می تواند نسل بعدی را مستعد ابتلا به بیماری های نورو لوژیک هم چون صرع و اختلال یاد گیری کند. در این مطالعه سعی شد اثر دو نوع استرس شکارچی و بی حرکتی روی CBL و گیرنده مغزی NMDA موش صحرایی بررسی شود.

مواد و روش ها : در این آزمایش تعداد ۹۶ موش ماده (نژاد ویستار) انتخاب و پس از آمیزش، موش های بار دار تحت اثر دو نوع استرس بی حرکتی و شکارچی در طی هفته آخر بار داری قرار گرفتند. بعد از زایمان، CBL و گیرنده های NMDA در مغز نوزادان مورد بررسی قرارگرفت .

یافته های پژوهش: CBL در موش های صحرایی استرس دیده در تمام روز های آزمایش به خصوص در جنس نر بالا تر بود. در روز دوم در نوزادان نر گروه های استرس گیرنده های NMDA بالا تری نسبت به کنترل داشتند. همه نوزادان گروه استرس بی حرکتی در روز ششم سطح بالا تری از گیرنده های NMDA نسبت به کنترل داشتند. در روز پانزدهم همه نوزادان گیرنده های گلوتامات سطح بالا تری در گروه کنترل شکارچی نسبت به بی حرکتی و بی حرکتی سطح بالا تری نسبت به کنترل داشتند.

بحث و نتیجه گیری : استرس اثرات موثری روی نسل بعدی و مستعد کردن آن ها در ابتلا به بیمار های نورو لوژیک دارد.

واژه های کلیدی: استرس بی حرکتی، استرس شکارچی، هورمون کورتیکو سترون، گیرنده های تحریکی

* **نویسنده مسئول:** گروه دام پزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

Email: Teshfam@ut.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

مقدمه

استرس در مفهوم عام عاملی است که همواره تعادل فیزیکی و روانی فرد را بهم زده و با ایجاد مشکلات روان تنی و مشکلات روانی کارایی فرد را در ابعاد مختلف زندگی کاهش می دهد. در طول استرس افزایش چشمگیری در فعالیت نور آدرنر ژیکی در پی آزاد سازی اپی نفرین و نور اپی نفرین از غده فوق کلیه دیده می شود (۱). هم چنین در طول استرس افزایش چشمگیری در آزاد شدن نور اپی نفرین از آمیگدال و هیپو کمپ مشاهده می شود (۲). صرع از جمله اختلالات مزمن و شایع دستگاه عصبی در انسان می - باشد. بر اساس آمار بدست آمده در دنیا از هر هزار نفر ۵ نفر مبتلا به صرع می باشند و این رقم در کودکان به ۵۱ نفر از هر هزار نفر می رسد (۳). مطالعات حکایت از آن دارد که استرس باعث تشدید تشنج در صرع می - شود (۴). مسیر معمول بیو شیمیایی در پاسخ به استرس ها آزاد شدن فاکتور آزاد کننده کورتیکو تروپین (CRF) Corticotropin-Releasing Factor از هسته پارا ونتریکولار به سیستم باب هیپو فیزی می باشد که به نوبه خود باعث تحریک ترشح (ACTH) Adrenocorticotropic hormone به گردش عمومی خون می شود. سپس ACTH موجود در گردش خون با اثر بر گیرنده های خود در قشر فوق کلیه باعث تولید استروئید ها و افزایش چشمگیر در میزان گلوکو کورتیکوئید های پلاسما می شود (۵). بعد از تماس اولیه با انواع مختلف عوامل استرس زا تغییرات پلاستیسیتی نورونی در هر کدام از هسته های موجود در محور هیپو تالاموس- هیپو فیزی- فوق کلیه (Hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA می تواند اتفاق بیافتد (۶،۷). می توان گفت که تغییرات عمیق در خصوصیات الکتریکی نورون ها ممکن است به علت قرار گرفتن در معرض شرایط پر استرس باشد که به نوبه خود می تواند باعث افزایش حساسیت نورونی برای القاء فعالیت‌های صرعی و تغییر آسیب پذیری نورون‌های هیپوکمپ در بسیاری از شرایط نورو پاتو لوژیک باشد (۵،۸). در تحقیق حاضر با توجه به این که این گیرنده مهم ترین گیرنده تحریکی مغز می باشد و در بسیاری از فرایند های مغزی نظیر یاد گیری و اعتیاد و تشنج نقش مهمی بازی می کند، انتخاب و سعی شد اثرات استرس بی حرکتی و استرس شکارچی در دوران بار داری روی تراکم گیرنده های گلوتامات در مغز نوزادان موش های صحرایی مورد بررسی قرار گیرد (۹). در این مطالعه موش های صحرایی حامله در روز ۱۵ حاملگی در معرض استرس قرار گرفته و بعد از پایان طبیعی حاملگی نوزادان متولد شده در سنین ۲،۶ و ۱۵ روزگی از نظر تراکم گیرنده های گلوتامات مورد مطالعه قرار خواهند گرفت . هم چنین در مطالعه حاضر سعی خواهد شد مکانیسم تداخل بین صرع و استرس از نقطه نظر سیستم گلوتاماتی مغز تا حد امکان روشن گردد.

مواد و روش ها

در این تحقیق از ۹۶ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با سن ده هفته استفاده گردید. حیوانات از حیوان خانه دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه تهیه و به آزمایشگاه بخش فیزیو لوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه منتقل گردید. دو هفته بعد از سازگار شدن حیوانات با محیط جدید ، ماده ها در یک قفس مجزا در ساعت ۹ صبح با یک نر که قبلاً تجربه جنسی داشت ، جفت شدند. در ساعت ۳ بعد از ظهر موش های ماده از نظر وجود پلاگ جفت گیری کنترل شدند. بعد از مشاهده شدن پلاگ جفت گیری، ماده ها از نر ها جدا شده و در قفس های ۸ تایی با دوره شبانه روزی ۱۲ ساعته در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد با آب و غذای کافی نگه داری شدند. سپس موش ها به طور تصادفی به سه گروه ۳۲ تایی کنترل ، استرس بی حرکتی و استرس شکارچی تقسیم شدند. حیوانات کنترل بدون هیچ مداخله ای نگه داری شدند. حیوانات گروه استرس بی حرکتی (Restraint stress) شروع هفته سوم بار داری یعنی روز ۱۵ حاملگی (E15) به مدت سه روز متوالی هر روز دو مرتبه و هر بار به مدت یک ساعت (۸ صبح و ۶ بعد از ظهر) در Plexiglas tube بی حرکت نگه داشته شدند. حیوانات گروه استرس شکارچی (Predator stress) در شروع هفته سوم بار داری (E15)) به مدت سه روز متوالی هر روز

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

دو مرتبه و هر بار به مدت دو ساعت (۸ صبح و ۶ بعد از ظهر) در فاصله ۳۰ سانتی متر از قفس گربه قرار گرفتند.

در نهایت روز دوم بعد زایمان ، تعداد ۳۶ سر از موش - های دو روزه (P2) از هر سه گروه (کنترل ، استرس بی حرکتی و استرس شکارچی) پس از تعیین جنسیت از روی شواهد ظاهری بر اساس فاصله انو ژنیتال انجام گرفت. در نوزادان نر فاصله بین مخرج و مجرای ادراری بیش تر از نوزادان ماده است (۱۰). ۱۲ موش دو روزه ماده و ۱۲ موش دو روزه نر ، پس از آسان کشی و قطع نخاع، از طریق شریان گردنی خون‌گیری شده و نمونه های به دست آمده در آب یخ قرار گرفتند و بلا فاصله با سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. پلاسما به طور کامل به لوله های میکرو سانتریفوژی انتقال یافت و در فریزر در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد برای تعیین میزان هورمون کورتیکو سترون (COS) Corticosterone hormoneنگه داری شدند. برای خارج کردن بافت مغز در این بررسی ابتدا سر را از قسمت بصل النخاع از تنه جدا کرده و سپس به آرامی استخوان کاسه سر جدا شد. سپس برای این که بافت مغز قوام مناسب برای خارج کردن آن از داخل استخوان جمجمه را داشته باشد با استفاده از سرنگ مقداری فرمالین ۱۰ درصد بافری را روی بافت مغز ریخته و پس از ۳۰-۲۰ ثانیه جدا سازی بافت مغز از استخوان های اطراف شروع شد. این کار ۳-۲ مرتبه تکرار شد و در عرض کم تر از ۲ دقیقه بافت مغز که شامل تمامی قسمت های مغز بود، از استخوان جمجمه جدا شد. پس از خارج نمودن مغز و با ایجاد یک شیار طولی نیم کره های مغز از هم جدا و داخل محلول فرمالین ۱۰ درصد بافری قرار گرفتند. (۱۲، ۱۱) چند روز بعد نمونه مغز پس از طی شدن مراحل پاساژ بافتی در بلوک پارافینی قرار گرفتند. برای سنجش تراکم گیرنده های گلوتاماتی از آنتی بادی مربوط به گیرنده NMDA (N-methyl-d-aspartate) استفاده شد. بطور مشابه، همین روش را روی نوزادان در روز های ششم و پانزدهم بعد از تولد بترتیب P6 و P15 در گروه های کنترل و استرس دیده، انجام گردید. گروه بندی در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱ – گروه بندی موش ها در این مطالعه

	زیر گروه ها با حجم نمونه برابر انتخاب شد (n=6)			گروه ها
زیر گروه های توله ها:	روز ۱۵ بعد زایمان	روز ۶ بعد زایمان	روز ۲ بعد زایمان	نوزادان کنترل
	روز ۱۵ بعد زایمان	روز ۶ بعد زایمان	روز ۲ بعد زایمان	نوزادان استرس بی حرکتی
	روز ۱۵ بعد زایمان	روز ۶ بعد زایمان	روز ۲ بعد زایمان	نوزادان استرس شکارچی

روش کار مورد استفاده در بررسی حاضر در مورد بخش بافت شناسی مغز به این گونه بوده است که بعد از قالب گیری برش هایی با ضخامت ۳ میکرون تهیه شده و مقاطع تهیه شده با آنتی بادی اولیه که آنتی - بادیNMDAR2B با مشخصات کیت به شرح 1.0mg/ml ,Cat No,NB100-74476 NOVUS (Biological Littleton ,USA) بود ، به شکل کامل پوشانده شد. و در انتها برای رنگ آمیزی بافت زمینه و مشاهده بهتر هسته ها از رنگ هما توکسیلن استفاده شد (۱۳). نمونه ها توسط میکرو سکوپ نوری (Olympus BH2,Japan X40) متصل به دوربین دیجیتالی Dino-Lite lens مورد بررسی هیستو مورفو متریکی قرار گرفت. در این مطالعه زیر واحد های NMDAR2B در نیم کره راست مغز موش های صحرایی شناسایی شد. به این صورت که تعداد سلول - های رنگ گرفته شده در تعداد ۳ فیلد میکرو سکوپی در قسمت هیپو کمپ، فورنیکس و کورتکس جلویی بوسیله برنامه Dino-capture 2 software (DinoCapture2.0, Dino-Lite) شمارش گردید.

نمونه های خون توسط بافر داخل کیت تجاری r Corticosterone 125 [RIA] (isotope, Budapest ,Hungary) توسط روش رادیو ایمنو اسی بررسی شدند. ابتدا به نسبت ۱:۱۰ رقیق شدند. قبل از شروع آزمایش، برای جداسازی کورتیکو سترون از گلوبولین متصل شونده به آن، نمونه ها تا ۶۰ درجه سانتی گراد برای۳۰ دقیقه در حمام آب گرم حرارت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

داده شدند. و سپس خنک گردیدند. اصول کیت بر این اساس است که رقابت بین کورتیکو سترون غیر نشان دار و مقدار مشخص کورتیکو سترون نشان دار با 125I است که برای تعداد معدودی محل اتصال بر روی آنتی بادی خاص کورتیکو سترون می باشد با تعداد مشخص و محدود آنتی بادی و لیگاند رادیو اکتیو، میزان باند های لیگاند رادیو اکتیو توسط آنتی بادی نسبت معکوس با غلظت لیگاند بدون رادیو اکتیو اضافه شده دارد.

آنتی بادی متصل به کورتیکو سترون سپس با معرف جدا کننده واکنش می دهد جدا سازی باند آنتی بادی هم توسط جدا سازی مگنتیک یا با سانتریفوژ انجام شد. اندازه گیری رادیو اکتیویته در پلت این امکان را فراهم می سازد که میزان کورتیکو سترون نشان دار در باند های شکسته اندازه گیری شود. غلظت کورتیکو سترون غیر نشان دار در نمونه با استفاده از منحنی استاندارد قابل اندازه گیری است.

نتایج بر اساس Mean+SEM بیان شد. در این بررسی از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ برای بررسی استفاده شد (SPSS, Chicago USA) به این صورت که چون داده‌های مربوط به Corticosterone blood (CBL) levels و دانسیته گیرنده ها توزیع نرمال داشت داده ها با استفاده از تکنیک های پارا متریکی آنالیز شد. مقایسه دو گروه با استفاده از روش t-test و در حالی که مقایسه چند گروهی با آنالیز یک طرفه ANOVA انجام شد. وقتی لازم بود از آنالیز post-hoc مثل تست tukey استفاده شد. اثر استرس شکارچی و بی حرکتی روی دانسیته NMDA با استفاده از روش دو طرفه ANOVA برای دو فاکتور آنالیز شد. تمامی تست ها، با P-value <0.05 معنی دار تلقی شد.

یافته های پژوهش

اثر استرس بی حرکتی و شکارچی روی سطح کورتیکو سترون در نوزاد نر و ماده موش صحرایی از هر کدام از گروه های P2 ، P6 و P15 تعیین شد. سطح کورتیکو سترون خون به طور مشخص بین گروه کنترل و استرس موش های صحرایی به صورت معنا داری متفاوت بود. هم چنین بین دو نوع استرس هم تفاوت معنی دار مشاهده شد (جدول ۲ و ۳). به علاوه هر دو نوع استرس روی نوزادان اثر وابسته به جنس داشت .

جدول شماره ۲. اثر استرس بی حرکتی و شکارچی طی هفته سوم حاملگی روی سطح کورتیکو سترون خون در نوزاد های نر موش های صحرایی(ng/ml).

گروه ها	N	روز دوم بعد زایمان (ng/ml)	روز ششم بعد زایمان (ng/ml)	روز پانزدهم بعد زایمان (ng/ml)
کنترل	۱۲	۰.۹۴ ±۰.۰۴	۰.۳۲±۰.۰۳	۰.۲۱±۰.۰۲
بی حرکتی	۱۲	۳.۵± ۰.۲*	۳.۰۳±۰.۱۷*	۲.۵۴±۰.۲۲*
شکارچی	۱۲	۵.۵۹±۰.۲۳*	۴.۳۴±۰.۱۳*	۳.۲۲±۰.۱۴*
ANOVA		F(۲)=۷۹.۵۸, P <۰.۰۰۱ Tukey, P <۰.۰۰۱	F(۲)=۱۲۳.۱۳, P <۰.۰۰۱ Tukey, P <۰.۰۰۱	F(۲)=۵۱.۱, P <۰.۰۰۱ Tukey, P <۰.۰۰۹

*بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در یک ردیف است. (P <0.05)

جدول شماره ۳. اثر استرس بی حرکتی و شکارچی طی هفته سوم حاملگی روی سطح کورتیکو سترون خون در نوزاد های ماده موش های صحرایی (ng/ml).

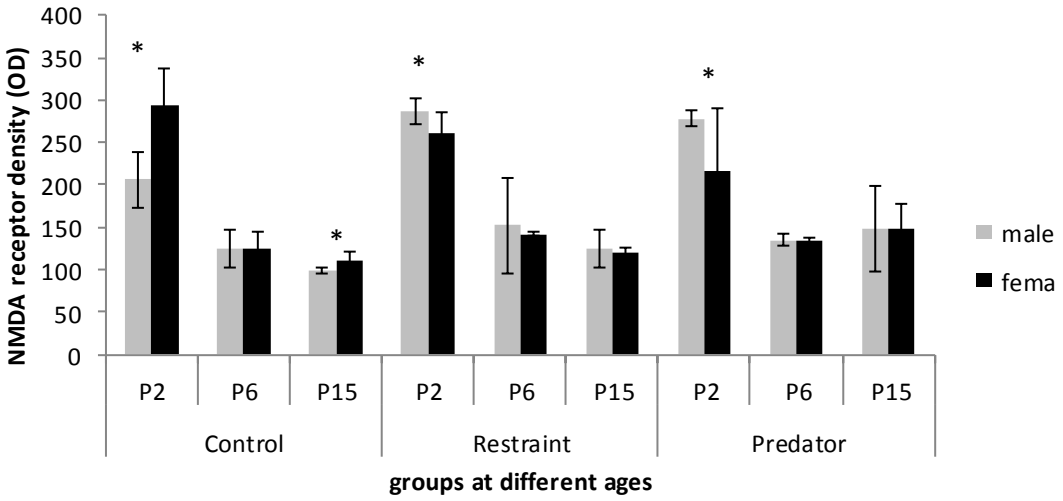
گروهها	N	روز دوم بعد زایمان (ng/ml)	روز ششم بعد زایمان (ng/ml)	روز پانزدهم بعد زایمان (ng/ml)
کنترل	۱۲	۰.۹۲±۰.۰۷	۰.۳۷±۰.۰۸	۰.۲۶±۰.۰۶
بی حرکتی	۱۲	۲.۷±۰.۱۸*	۲.۲۵±۰.۲۱*	۱.۶۲±۰.۱۳*
شکارچی	۱۲	۳.۷۴±۰.۳۲*	۳.۲±۰.۱۹*	۲.۳۲±۰.۱۸*
ANOVA		F(۲)=۴۴.۴۷,P<۰.۰۰۱ Tukey, P <۰.۰۰۵	F(۲)=۷۰.۵۲, P <۰.۰۰۱ Tukey, P <۰.۰۰۲	F(۲)=۶۲.۳۶, P <۰.۰۰۱ Tukey, P <۰.۰۰۳

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

*بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در یک ردیف است. (P <0.05) (جدول ۴).

آنالیز اثرات استرس شکارچی و بیحرکتی روی تراکم گیرنده های گلوتامات نشان داد که تداخل معنا دار بین استرس و روز بعد از تولد وجود دارد (نمودار ۱). در روز دوم پس از زایمان (P2)تراکم گیرنده های گلوتامات در کلیه نوزادان گروه کنترل با کلیه نوزادان گروه های تحت استرس تفاوت معنی داری نداشت (P =0.131) (جدول ۴). حال ان که در بررسی نوزادان نر در هر دو گروه استرس سطح بالا تری از گیرنده های گلوتامات نسبت به گروه کنترل داشتند (جدول ۶). تراکم گیرنده های (NMDA) نوزادان ماده کنترل در این روز تنها با نوزادان ماده تحت استرس شکارچی در این روز تفاوت معنی داری داشت (P =0.018) (جدول ۵). در روز ششم تراکم گیرنده های (NMDA) در همه نوزادان استرس بی حرکتی به شکل معنا داری سطح بالا تری نسبت به همه نوزادان گروه کنترل داشت. در در حالی که در همین روز در جنس ماده اختلاف بین گروه کنترل و بی حرکتی معنا دار بوده است (جدول ۵). و در نوزادان نر اختلاف بین هیچ یک از گروه ها به تنهایی معنا دار نبوده است (جدول ۶). در بررسی همه نوزادان در روز پانزدهم تفاوت معنی دار بین هر سه گروه وجود داشت. (P <0.01) که میانگین گیرنده های گلوتامات (NMDA) در گروه استرس شکارچی به شکل معنا داری بزرگ تر از گروه بی حرکتی و کنترل بود. مشابه آن در گروه استرس بی حرکتی بزرگتر از گروه کنترل بود. (جدول ۴) در حالی که در همین روز در نوزادان ماده اختلاف معنا دار بین گروه کنترل و شکارچی بوده است (چدول۵). در نوزادان نر هم بین گروه کنترل و شکارچی باز هم اختلاف معنادار بوده است (جدول ۶).



نمودار شماره ۱. اثر استرس پیش از تولد روی سطح گیرنده های گلوتامات در نوزادان نر و ماده .حیوانات در معرض استرس بی حرکتی و شکارچی سطح گیرنده گلوتامات در نوزادان آن ها در روزهای P2,P6و P15
نمودار ستونی نشان دهنده تراکم گیرنده های گلوتامات OD (optical density) است.
***بیانگر اختلاف معنی دار بین نر و ماده در ستون های کنار هم است. (P <0.05)**

جدول شماره ٤. اثر استرس پیش از تولد بی حرکتی و شکارچی طی هفته سوم حاملگی روی سطح گیرنده های گلوتامات در تمام نوزادان موش صحرایی *بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در یک ردیف است. (P <0.05)

گروه‌ها	روزدومبعد زایمان (n=۱۲)	روز ششم بعد زایمان (n=۱۲)	روز پانزدهم بعد از زایمان (n=۱۲)
کنترل	۲۵۰.۰۴±۵۸.۶۵۸	۱۲۵.۲۵±۲۰.۰۷۶	۱۰۴.۴۶±۹.۲۷۸
بی‌حرکتی	۲۷۴.۳۳±۲۳.۱۱۵	۱۴۶.۹۶±۳۹.۶۱۹ *	۱۲۳.۰۰±۱۵.۶۷۶ *
شکارچی	۲۴۷.۰۴±۶۱.۱۲۶	۱۳۴.۰۰±۶.۱۱۵	۱۴۸.۳۷±۴۱.۱۶۵ **

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]
[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

ANOVA	F(۲)=۲.۰۹۱, *P* =۰.۱۳۱	F(۲)=۴.۲۷۳, P =۰.۰۱۸ Tukey, *P* =۰.۰۱۳	F(۲)=۱۷.۲۷, *P*<۰.۰۰۱ Tukey, *P*<۰.۰۰۱

جدول شماره ۵. اثر استرس پیش از تولد بی حرکتی و شکارچی طی هفته سوم حاملگی روی سطح گیرنده های گلوتامات در نوزادان ماده موش صحرایی. *بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در یک ردیف است. (*P* <0.05)

گروهها	*روز دوم بعد زایمان*	*روز ششم بعد زایمان*	*روز پانزدهم بعد زایمان*
کنترل	۲۹۴.۲۵±۴۳.۴۲	۱۲۵.۵۸±۱۹.۲۶۱	۱۱۰±۱۰.۲۶
بی حرکتی	۲۶۲.۰±۲۴.۰۶	۱۴۱.۶۷±۲.۶۴ *	۱۲۱±۵.۴۷
شکارچی	۲۱۵.۹۲±۷۴.۹۲ *	۱۳۳.۵۰±۴.۹۴۵	۱۴۸.۳۳±۳۰.۴۲ *
ANOVA	F=۶.۹۰۸, *P* =۰.۰۰۳ Tukey, *P* =۰.۰۰۲	F=۵.۷۸۶, , *P* =۰.۰۰۷ Tukey, *P* =۰.۰۰۵	F=۱۳.۲۱۹, , *P* <۰.۰۰۱ Tukey, *P* <.۰۰۱

جدول شماره ٦. اثر استرس پیش از تولد بی حرکتی و شکارچی طی هفته سوم حاملگی روی سطح گیرنده های گلوتامات در نوزادان نر موش صحرایی. *بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در یک ردیف است. (*P* <0.05)

گروهها	روز دوم بعد زایمان	روز ششم بعد زایمان	روز پانزدهم بعد زایمان
کنترل	۲۰۵.۸±۳۲.۳	۱۲۴.۹±۲۱.۷	۹۸.۹±۲.۷
بی حرکتی	۲۸۶.۶±۱۴.۳ *	۱۵۲.۲±۵۶.۶	۱۲۵±۲۱.۷
شکارچی	۲۷۸.۱±۹.۲ *	۱۳۴.۵±۷.۲	۱۴۸.۴۲±۵۱.۱ *
ANOVA	F= ۵۳.۱۱, *P* <۰.۰۰۱ Tukey, *P* <.۰.۰۰	F= ۱.۸۵, *P* =۰.۱۷	F= ۷.۱۲, *P* =۰.۰۰۳ Tukey, *P* =۰.۰۰۲

بحث و نتیجه گیری

اثر استرس پیش از تولد بی حرکتی و شکارچی را روی تراکم گیرنده های NMDA به عنوان پروتئین های عملکردی با استفاده از روش ایمنو هیستو شیمی بررسی شد و نتایج نشان داد که استرس بی حرکتی بطور معناداری باعث افزایش بیان این گیرنده ها در P6 می‌شود و هر دو نوع استرس بی حرکتی و شکارچی باعث افزایش بیان این گیرنده ها در روز P15 می‌شوند . Lupienو همکاران و Charil و همکاران در دو مقاله مروری استرس را از طریق محور HPA در افزایش کورتیکو سترون موثر دانستند. (۱۴،۱۵). مدل مناسب برای استرس پیش از تولد در موش صحرایی استرس بی حرکتی است (۱۶،۱۷). استرس بی حرکتی پیش از تولد (PRS) prenatal restraint stress هم چنین باعث افزایش عملکرد نا مناسب محور HPA وابسته به سن می شود. محرک شکارچی برای موش صحرایی استرس زا است. تماس با شکارچی های طبیعی و حتی بوی آن ها می تواند باعث آزاد سازی هورمون های استرس و منو آمینرژیک در موش صحرایی و در موش سوری شود (۱۸،۱۹،۲۰). بنا بر این برای به دست آوردن نتایج دقیق در مطالعه حاضر از دو نوع استرس استفاده شد. استفاده از روش استرس بی حرکتی که در این مطالعه به کار رفت قبلاً توسط Sadaghiani و Saboory کارایی آن ثابت شده است (۲۱). برای نشان دادن این که حیوانات واقعاً تحت استرس بودند غلظت کورتیکو سترون در این مطالعه اندازه گیری شد. دو گروه استرس سطح کورتیکو سترون خون بالا تری نسبت به کنترل در هر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

سه روز P6, P2 و P15 نشان دادند که این ارتباط زیاد بین میزان کورتیکو سترون خون و بیان گیرنده گلوتامات در مغز را نشان می دهد. این شاید به علت کاهش فعالیت حفاظتی یازده بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در جفت و متعاقب آن در معرض قرار گرفتن جنین به گلوکو کورتیکوئیدهای مادری است (۲۲). در این آزمایش استرس بی حرکتی از روز ۲۱-۱۴ بارداری به حیوان داده شده بود (مدت زمان طولانی). نتایج این آزمایش پس از آسان کشی و نمونه برداری از نوزادان در نودومین روز این بود که گیرنده های گلوتامات NMDA سطح بالای از NMDA در ناحیه CA1 هیپو کمپ مشاهده شد. سطح گیرنده های NMDA در Medial prefrontal cortex (MPC) و Dorsal frontal cortex (DFC) به ترتیب ،۵۰، ۴۶ درصد در موش های صحرایی استرس بی حرکتی دیده شده افزایش یافت. UNO و همکاران پیشنهاد کردند که در پریمات ها هیپو کمپ به عنوان اولین هدف استروئید های گلوکو کورتیکوئیدی ترشح شده طی وقایع استرس زا بعد و پس از تولد است (۲۳). محققان نشان دادند که گیرنده های NMDA احتمالاً نقش کلیدی در بسیاری از بیماری های نورولوژیکی هم چون صرع دارند (۲۴). به خوبی مشخص شده است که گیرنده های NMDA نقش محوری در اتیو لوژی صرع بازی می‌کنند (۲۵) و بنا بر این عواملی که باعث اثر روی گیرنده های NMDA طی دوران پیش از تولد می شود، می تواند شرایط صرعی ایجاد کند (۲۶). در در مطالعه Lee و همکاران، شرایط استرس شدید را با دادن دوز های بالای کورتیکو سترون به موش های صحرایی که بعد از تولد آدرنا لکتومی شده بودند، به وجود آوردند. نشان دادند که بیان mRNA برخی زیر واحدهای NMDA افزایش یافته است (۲۷). Berger و همکاران فقط نوزادان نر را بررسی کردند. نشان دادند که نقص در میانجی عصبی باعث جبران از طریق افزایش بیان و شاید هم تنظیم افزایشی گیرنده های NMDA در بسیاری از نواحی مغز جلویی می-شود. این پدیده شاید نقش مهم در پاتو فیزیو لوژی اسکیزو فرنیا و سایر بیماری های عصبی داشته باشد (۲۸) . در آزمایش مذکور مادر ها را ۳ بار در روز آن هم بمدت ۷ روز استرس دادند. در بررسی حاضر تصمیم گرفته شد که مدت زمان استرس و تعداد دفعات آن کم تر شود (۲ بار در روز برای سه روز) تا فهمیده شود که آیا گیرنده های NMDA تغییر می‌کنند. مطالعه حاضر هم در راستای آزمایش Berger نشان داد که استرس پیش از تولد به طور مشخص باعث افزایش تراکم گیرنده های NMDA نیم کره راست مغز می شود. Berger و همکاران ، اثر استرس بی حرکتی را روی بیان گیرنده های دوپامین و گلوتامات ۹۰ روز بعد از تولد حیوانات بررسی کردند. در حالی که در مطالعه حاضر سطح گلوتامات را در موش های صحرایی نوزاد در روزهای دوم، ششم و پانزدهم بعد تولد را بررسی میکند. مطالعات ما در تایید مطالعات برگر است چون نشان می دهد تنظیم افزایشی گیرنده های NMDA حداقل تا روز پانزدهم نسبت به کنترل معنی دار است. این بررسی نشان داد که در معرض استرس پیش تولد ، بودن سطح گلوتامات را در روز های ششم و پانزدهم نوزادی بالا می‌برد و با تغییر دادن انتقال گلوتاما ترژیکی باعث افزایش احتمال ابتلا به صرع و سایر بیماری های نورو پاتو لوژیکی در ادامه زندگی شود. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که در معرض PS بودن باعث افزایش سطح گیرنده های NMDA در روزهای ۶ و ۱۵ نوزادی می شود که می تواند روی تکامل مغز اثر بگذارد و باعث افزایش احتمال ابتلا به صرع و سایر بیماری های نورو پاتو لوژیکی در زندگی از طریق همین انتقال گلوتاماتی شود. داده های اخیر نشان می دهد که هیچ تفاوتی بین گروه های استرس و کنترل در p۲ وجود نداشته است. اما تفاوت معنی دار در زمان p۱۵ وp ۶ وجود دارد که نتیجه آنالیز داده ها از هر دو جنس، را نشان می دهد. به هر حال آنالیز داده ها به طور جدا گانه برای هر دو جنس، نشان دهنده تفاوت معنی دار بین کنترل و موش های صحرایی استرس دیده در p۲ (هر دو نوع استرس) و p ۱۵ (فقط شکارچی) است ولی نه در p۶. درp۶ تنها گروه بی‌حرکتی با کنترل اختلاف معنی‌دار داشت. تفاوت در روزها در این مطالعه شاید به علت تفاوت اثر استرس روی نوزادان نر و ماده است. همان طور که در نمودار ۱ مشخص بود، تراکم NMDA در نوزاد ماده بیش تر از

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

نر در۲ p در گروه های کنترل بوده در حالی که در توله های استرس دیده بر عکس بوده است. و در حالی که این جا نتایج به طور مشخص در نوزادان نر بالا تر است. این نتایج نشان می دهد که نوزادان موش صحرایی نر بیش تر از ماده ها در معرض استرس اواخر بار داری بوده اند. نتایج حاضر در موازات سایر نتایج محققان است. گزارش شده است که در PS نوزادان نر میزان CBL و صرع ناشی از (PTZ) Pentylenetetrazol و پیلو کارپین و نرخ مرگ و میر بیش تر از ماده ها داشته‌اند (۲۱،۲۹) . , Mueller Bale نشان دادند که جنین نر بسیار به استرس پیش از تولد حساس تر از ماده است (۱۷). علت باید این باشد که فعالیت و حساسیت (11- b-HSD2) -11β Hydroxysteroid dehydrogenase2 جفتی وابسته به جنس است و باعث می شود جنین نر بیشتر در معرض هورمون های استرس قرار گیرند (۳۰). نوزادان نر گیرنده گلوتامات بیش تری از ماده در روز دوم بعد زایمان نشان دادند. گیرنده های گلوتامات هیپوکمپ در موش های صحرایی ماده استرس ندیده بیش تر از نر ها در همان روز بود (۳۰). در مطالعه اخیر تفاوت معنی داری بین نر و ماده در گروه های کنترل و استرس در روزهای ۶ و ۱۵ بعد زایمان دیده نشد. در حالی که تمایل کاهشی گیرنده NMDA با سن از P2 تا P15 در تمامی گروه‌ها مشاهده شد. Wenk و همکاران ،کاهش گیرنده های NMDA در ناحیه CA هیپو کمپ با افزایش سن از ۳ تا ۳۱ ماه را نشان دادند (۳۱). نتایج مطالعه حاضر همگام با این محققان نشان داد که در ۳ گروه آزمایش در دوره کوتاه (روز دوم تا پانزدهم) کاهش وجود دارد. از طرف دیگر, Weinstockو همکاران نشان دادند که اگرچه شرایط استرس زای پیش از تولد می تواند تغییرات دائمی در رفتار و در هر دو جنس بگذارد. ولی می تواند اثرات ویژه روی HPA در نوزادان ماده موش صحرایی بگذارد (۳۲). در جوندگان و مطالعات نشان می دهد که بارداری تحت استرس بی حرکتی یا بی نوری یا با نور های فلاش متناوب یا صدا دانسیته گیرنده های گلوکو کورتیکوئیدی هیپو کمپ را در نوزادان تغییر می دهد. بعد از استرس بی حرکتی در موش های صحرایی باردار بمدت ۳۰ دقیقه در روز های ۱۹–۱۵ بار داری، تراکم گیرنده های گلوکو کورتیکوئید هیپو کمپ تا تقریباً ۵۰٪ در توله های ماده کاهش می یابد در حالی که بین نوزادان نر و نر های کنترل دیده نمی شود. این کاهش ویژه جنس ماده در گیرنده های گلوکو کورتیکوئید هیپو کمپ توسط Weinstock و همکاران در سال ۱۹۹۲ هم گزارش شد (۳۲). همچنین Henry و همکاران ۱۹۹۴ کاهش مشابه در نر ها را نشان دادند البته این مطالعه فقط روی نوزادان نر انجام شده بود (۳۲،۳۳). در مطالعه حاضر، نوزاد نر گیرنده گلوتامات بیش تری از ماده در روز دوم بعد از تولد را نشان داد. در حالی که گیرنده گلوتامات هیپو کمپ ماده های استرس ندیده بیش تر از گیرنده های نر در این روز بودند هم چنین در این بررسی تفاوت معنی دار بین نر و ماده در این گروه های آزمایشی در روزهای ۶ و ۱۵ بعد تولد مشاهده نگردید. شرایط استرس زا طی بارداری اثرات مهمی روی گیرنده های تحریکی گلوتامات NMDA فرزندان دارد که می تواند بسیاری از ناهنجاری های بزرگ سالی مثل صرع و اسکیزو فرنیا و سایر نا هنجاری نورونی را تحت تاثیر قرار دهد. تاثیر استرس روی گیرنده های NMDA وابسته به جنس و سن هستند . طوری که جنس نر را بیش تر متاثر می کنند تفاوت در CBL و تراکم NMDA بین نر ها و ماده ها و تمایل وابسته به سن آن شاید توضیح دهنده پاسخ های رفتار های ویژه جنس نر و ماده در طول زندگی و طی بزرگ سالی باشد.

References

1.Wieser HG. Mesial temporal lobe epilepsy versus amygdalar epilepsy late seizure recurrence after initially successful amygdalotomy and regained seizure control following hippocampectomy. Epil Dis2000;2:141-52.

2.Sah P, Faber E, Armentia ML, Power J. The amygdaloid complex anatomy and physiology. Physiol Rev 2003;83:803-34.

3.Vago C, Bulgheroni S, Franceschetti S, Usilla A, Riva D. Memory performance on the California Verbal learning test of

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

children with benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes. Epil Behav2008;13:600-6.
4.Iancu I, Rosen Y, Moshe K. Antiepileptic drugs in posttraumatic stress disorder. Clin Neuropharmacol2002;25:225-9.
5.Galic M, Fournier N, Martin L. α-Adrenergic inhibition prevents the accompanied anticonvulsant effect of swim stress on behavioral convulsions induced by lithium and pilocarpine. Pharmacol Biochem Behav2004;79:309-16.
6.Bocti C, Robitaille Y, Diadori P, Lortie A, Mercier C, Bouthillier A, et al. The pathological basis of temporal lobe epilepsy in childhood. Neurology2003;60:191-5.
7.Mercier S, Buguet A, Cespuglio R, Martin S, Bourdon L. Behavioural changes after an acute stress: stressor and test types influences. Behaviour Brain Res 2003;139:167-75.
8.Benardo LS. Prevention of epilepsy after head trauma do we need new drugs or a new approach? Epilepsia2003;44:27-33.
9.Blanke ML, Vandongen AM. Activation mechanisms of the NMDA receptor. Mcgraw Hill Publication. 2009;P.114.
10.Koolhaas JM. The laboratory rat. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals. 2th ed. Sunders Publication.2010; P.8.
11.Spijker S. Dissection of rodent brain regions. Neuroproteomics2011;2:13-26.
12.Sahabnegah S, Khaksar Z, Mohammadsadeghi S, Erfanimajd N, Modarresmousavi M, Aligholi H, et al. Effect of nettle root extract on histometrical parameters of cerebral and cerebellar cortices in rat following administration of testosterone. Neurosci J Shefaye Khatam2015;3:71-8.
13.Mescher AL. Junqueiras basic histology text and atlas.1th ed. Mcgraw Hill Med New York Publication. 2010;P.231.
14.Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. Brain Res Rev 2010;65:56-79.
15.Lupien SJ, Mcewen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nature Rev Neurosci2009;10:434-45.
16.Meaney MJ. Epigenetics and the biological definition of gene× environment interactions. Child Dev2010;81:41-79.
17.Mueller BR, Bale TL. Sex specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. J Neurosci2008;28:9055-65.
18.Adamec R, Kent P, Anisman H, Shallow T, Merali Z. Neural plasticity neuropeptides and anxiety in animals implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. Neurosci Biobehavior Rev 1998;23:301-18.
19.Belzung C, Elhage W, Moindrot N, Griebel G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in Mice. Neuropharmacology2001;41:400-8.
20.Hayley S, Borowski T, Merali Z, Anisman H. Central monoamine activity in genetically distinct strains of Mice following a psychogenic stressor effects of predator exposure. Brain Res 2001;892:293-300.
21.Sadaghiani MM, Saboory E. Prenatal stress potentiates pilocarpine-induced epileptic behaviors in infant rats both time and sex dependently. Epil Behav2010;18:166-70.
22.Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. Inhibition of 11β- hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto- placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety like behaviour in the offspring. European J Neurosci2000;12:1047-54.
23.Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, et al. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. Hormone Behav1994;28:336-48.
24.Ghasemi M, Schachter SC. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. Epil Behav2011;22:617-40.
25.Urbanska EM, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski WA. Excitatory amino acids in epilepsy. Restor Neurol Neurosci1998;13:25-39.
26.Scher MS. Prenatal contributions to epilepsy lessons from the bedside. Epileptic disorders. 2003;5:77-92.
27.Lee PR, Brady D, Koenig JI. Corticosterone alters< i> N</i>-methyl-d-aspartate receptor subunit mRNA

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

expression before puberty. Mole Brain Res2003;115:55-62.
28.Berger MA, Barros VG, Sarchi MI, Tarazi FI, Antonelli MC. Long-term effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. Neurochemical Res2002;27:1525-33.
29.Ahmadzadeh R, Saboory E, Roshanmilani S, Pilehvarian AA. Predator and restraint stress during gestation facilitates pilocarpine induced seizures in prepubertal rats. Dev Psychobiol2011;53:806-12.
30.Kerzner LS, Stonestreet BS, Wu KY, Sadowska G, Malee MP. Antenatal Dexamethasone: effect on ovine placental 11 and bgr-hydroxysteroid dehydrogenase Type 2 expression and fetal growth. Pediatr Res 2002;52:706-12.
31.Wenk GL, Barnes CA. Regional changes in the hippocampal density of AMPA and NMDA receptors across the lifespan of the Rat. Brain Res 2000;885:1-5.
32.Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, Mcewen BS. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic pituitary adrenal system in the female Rat. Brain Res1992;595:195-200.
33.Henry C, Kabbaj M, Simon H, Moal M, Maccari S. Prenatal stress increases the hypothalamo pituitary adrenal axis response in young and adult Rats. J Neuroendocrinol1994;6:341-5.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]

Comparing the Effects of Prenatal Stress on Corticosterone Levels in Blood and Brain Excitatory Receptors

Tavassoli E [1], Teshfam M [1], Saboory E [2], Rasmi Y [3]*

(Received: May 11, 2016 Accepted: September 3, 2016)

Abstract

***Introduction*:** The mother's stress during pregnancy can be a potential factor in the development of some neurological diseases in offspring. Biochemical pathway in response to stress is the secretion of corticotrophin releasing factor CRF from the paraventricular nucleus, which stimulates the secretion of ACTH and ultimately increases plasma glucocorticoids content.
Increasing of CBL in rat offsprings is indicative of the induction of prenatal stress and can prone next generation to diseases such as epilepsy and learning disorders. In this study we tried to understand the effects of two types of stress (restraint and predatory) on CBL and brains NMDA receptors in rats.

***Materials & methods*:** 96 female rats (Wistar) were selected and after mating, pregnant rats were exposed to two kinds of prenatal stress (restraint and predator stress) during the last week of gestation. After parturition, CBL and NMDA receptors in the brains of newborns were studied.

***Findings*:** CBL especially in the male pups were higher. In second day after birth, male pups in stress groups had more NMDA receptors than control group. All pups in restraint stress group had more NMDA receptors than control group in sixth day after birth. In 15th day after birth all pups in Predator stress group express had more NMDA receptors than restraint group which in turn had more of these receptors than control group.

***Discussion & conclusions*:** stress is an effective impact on the next generation which is capable to lead to neurological diseases in the future.

***Keywords*:** Restraint stress, Predator stress, Corticosterone hormone, Excitatory receptors

1) Dept of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2) Neurophysiology Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
3) Dept of Biochemistry, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
**Corresponding author Email: Teshfam@ut.ac.ir*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-02-08]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.180]