

## اثر محیط زندگی غنی شده بر حجم غده فوق کلیه موش های صحرائی مواجه شده با استرس پیش از تولد

محمد حسینی شریف آباد<sup>۱\*</sup>، سیدحسین حکمتی مقدم<sup>۲</sup>

(۱) گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد  
(۲) گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۷

### چکیده

**مقدمه:** مطالعات نشان می دهند که استرس پیش از تولد باعث افزایش حجم غده فوق کلیه رت های نر جوان شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر محیط نگهداری حیوانات در دوره بلوغ بر برگشت پذیری تغییرات ساختمان و عملکرد غده فوق کلیه ناشی از استرس پیش از تولد بود.

**مواد و روش ها:** رت های نر دو ماهه ویستار که در معرض استرس محدودیت حرکتی واقع شده بودند در سراسر ماه سوم زندگی در قفس با محیط استاندارد یا محیط غنی شده نگهداری شدند. پس از پایان این دوره، سطوح کورتیکوسترون خون قبل و بعد از استرس حاد اندازه گیری شد. هم چنین با استفاده از روش استریولوژیک کوالیری حجم نواحی غده آدرنال آن ها محاسبه گردید.

**یافته های پژوهش:** تحلیل داده ها نشان داد که مقادیر کورتیکوسترون پس از اعمال استرس حاد در رت های گروه شاهد و گروه استرس که در محیط غنی شده قرار داشته اند تفاوت معنی داری نداشت اما این مقادیر در رت های گروه استرس نگهداری شده در محیط استاندارد در مقایسه با سایرین به طور معنی داری بالاتر بود. حجم کل و حجم ناحیه فاسیکولاتای قشر غده آدرنال رت های گروه استرس متعاقب زندگی در محیط غنی شده کاهش یافته در حالی که بر روی این شاخص در حیوانات سایر گروه ها اثری نداشته است.

**بحث و نتیجه گیری:** این مطالعه تجربی نشان داد که غنی سازی محیط زندگی رت های نر بالغی که مادرانشان طی هفته آخر بارداری در معرض استرس محدودیت حرکتی بودند باعث طبیعی نمودن پاسخ محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال به استرس حاد و کاهش حجم قشر فوق کلیه می شود.

**واژه های کلیدی:** غنی سازی محیط، استرس پیش از تولد، استریولوژی، غده فوق کلیه

\* نویسنده مسئول: گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

[Email:mhosseini81@yahoo.com](mailto:mhosseini81@yahoo.com)

## مقدمه

امروزه کاملاً معلوم شده است که شرایط محیط دوره جنینی اثرات عمیقی بر روی تکامل موجود دارد، به گونه ای که استرس و رخداد های ناخوشایند در این دوران می تواند تغییرات و اختلالات مهم نورویولوژیک، اندوکرینی و رفتاری را در دوره بزرگسالی در پی داشته باشد. (۳-۱)

بررسی ها نشان می دهد که استرس پیش از تولد (Prenatal stress) تنظیم سیستم های اندوکرینی مختلف منجمله محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) را بر هم می زند. به طوری که حیوانات مورد آزمایش نمی توانند به شرایط استرس آمیز زندگی واکنش مناسب نشان دهند. به عبارتی استرس پیش از تولد باعث می شود مغز به طور مداوم به شرایط استرس زا حساس شود و مدت زمان ترشح گلوکوکورتیکوئید در پاسخ به استرس حاد طولانی شود. (۶-۱، ۴)

مطالعات نشان می دهند که غنی سازی محیط زندگی (Environmental Enrichment) بر سیستم ایمنی رت هایی که در معرض استرس پیش از تولد قرار گرفته بودند اثر مثبت داشته است، (۷) و نیز عملکرد محور HPA را به حالت طبیعی بازگردانده است. (۸)

غنی سازی محیط ابتدا در سال ۱۹۴۷ در آزمایشگاه انجام شد، (۹). از سال ۱۹۶۰ تاکنون مطالعات متعددی نشان داده است که قرار دادن تعداد زیادی حیوان در یک قفس بزرگ حاوی اشیاء متعدد و متنوعی که مکرر تعویض و جا به جا می شوند موجب تغییراتی در شاخص های رفتاری، نوراناتومیکی، نوروفیزیولوژیکی و نوروشیمیایی در مغز رت می شود، (۱۰). برخی مطالعات در زمینه تاثیر غنی سازی بر عملکرد محور HPA نشان می دهد که غنی نمودن محیط زندگی موجب افزایش مقدار پایه کورتیکوسترون پایه در رت، (۱۱)، موش، (۱۲، ۱۳)، و خوکچه، (۱۴)، شده است در حالی که مطالعات دیگری نشان می دهد که غنی نمودن محیط عملکرد پایه محور HPA را کاهش می دهد، (۱۵، ۸)، یا بر آن بی تاثیر است. (۱۶)

معلوم شده است که غنی سازی محیط باعث افزایش بیان گیرنده گلوکوکورتیکوئید در هیپوکامپوس می شود که به نوبه خود منجر به افزایش فیدبک منفی گلوکوکورتیکوئید می شود، (۱۰). از طرفی بیان شده است که اثرات رفتاری غنی سازی بعد از برداشتن محیط غنی شده تا ۳ ماه ادامه می یابد، (۱۷). این یافته ها نشان می دهد که با غنی نمودن

محیط ممکن است مداخله ای فراهم شود که از اثرات منفی بلند مدت استرس مادر روی رفتار و عملکرد محور HPA جلوگیری کند یا آن ها را کاهش دهد. با توجه به آن که گزارش شده است که اعمال استرس در دوره بارداری باعث افزایش اندازه و حجم غده فوق کلیه در موالید موش صحرایی شده است، (۱۸، ۱۹)، و برخی مطالعات نیز نتایج متفاوتی از اثر غنی سازی محیط بر عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز آدرنال در موالید حیوانات آزمایشگاهی متعاقب استرس پیش از تولد گزارش نموده اند، (۱۶، ۸)، این مطالعه در ادامه مطالعات قبلی ما بر استرس پیش از تولد، (۲۱، ۲۰)، و با هدف ارزیابی اثر غنی سازی محیط زندگی بر میزان کورتیکوسترون خون و اندازه حجم نواحی غده آدرنال در رت های بالغ که در هفته آخر بارداری تحت استرس محدودیت حرکتی واقع شده بودند، انجام شد. در این مطالعه برای تخمین حجم غده آدرنال رت هایی که مادران آن ها در هفته آخر بارداری در معرض استرس قرار گرفته بودند، از اصل کوالیری استفاده شد. (۲۲)

## مواد و روش ها

رت های ماده نژاد ویستار دو ماهه (خریداری شده از خانه حیوانات دانشکده پزشکی اصفهان) با وزن ۲۵۰-۲۳۰ گرم در قفس های پلاستیکی و در شرایط دمایی  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد و دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته (از ۷ صبح تا ۷ بعد از ظهر) با دسترسی کامل به آب (لوله کشی شهر) و غذای رت (خوراک دام پارس) نگهداری شدند. پس از یک هفته عادت با محیط جدید، هر دو رت ماده با یک رت نر جفت شدند و اسمیر واژینال در صبح روز بعد بررسی گردید. روزی که اسمیر واژینال اسپرم مثبت بود به عنوان روز صفر جنینی یادداشت گردید. سپس هر رت باردار جداگانه در قفس نگهداری شد و حیوانات به طور تصادفی به دو گروه آزمایش (استرس پره ناتال) و شاهد تقسیم شدند.

مادران گروه استرس پره ناتال، در طی هفته آخر بارداری (روز ۱۵ تا ۲۱) روزانه به مدت یک ساعت (از ساعت ۸ تا ۹ صبح) در استوانه ای مشبک و از جنس پلاستیک (به قطر ۷ سانتی متر و با طول متغیر بر حسب اندازه طول حیوان) تحت استرس به صورت محدودیت حرکتی (Restraint) واقع شدند، (۲۳)، و بعد از اعمال استرس به قفس بازگردانده شدند اما مادران گروه شاهد بدون اعمال استرس در قفس ماندند.

پس از تولد نوزادان، مادرانی که بین ۸ تا ۱۲ نوزاد با تعداد مشابه نر و ماده به دنیا آورده بودند، همراه با نوزادانشان در مطالعه حفظ و بقیه حذف شدند. نوزادان در پایان سه هفتهگی از شیر گرفته شدند و زمانی که دو ماهه شدند دو رت نر سالم و در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم از هر مادر و جمعاً ۲۰ سر رت از هر گروه (شاهد و استرس پره ناتال) انتخاب گردید. سپس این حیوانات به دو دسته مساوی ده تایی تقسیم و در دو محیط استاندارد و غنی شده به مدت یک ماه و در شرایط مشابه تغذیه ای نگهداری شدند.

### یافته های پژوهش

اثر غنی سازی محیط بر وزن بدن و وزن غده آدرنال: یافته های مطالعه نشان داد که غنی سازی محیط بر روی وزن حیوانات گروه شاهد اثری نداشت ( $30.2 \pm 9$  گرم در محیط غنی شده،  $29.5 \pm 16$  گرم در محیط استاندارد  $P=0.61$ ) اما بر روی وزن رت های گروه استرس پره ناتال اثر مثبت داشت. ( $27.8 \pm 15$  گرم در محیط غنی شده،  $25.8 \pm 14$  گرم در محیط استاندارد  $P=0.009$ )

هم چنین شاخص نسبت وزن آدرنال به وزن بدن در حیوانات گروه استرس پره ناتال متعاقب غنی سازی محیط کاهش معنی داری نشان داد در حالی که بر این شاخص در گروه شاهد اثری نداشت. (نمودار شماره ۱)

اثر غنی سازی محیط بر میزان کورتیکوسترون خون: میانگین مقادیر کورتیکوسترون پایه (قبل از استرس)، در گروه شاهد و استرس پره ناتال متعاقب زندگی در دو محیط غنی شده و استاندارد تفاوت معنی داری نداشتند. هم چنین میانگین مقدار کورتیکوسترون خون بلافاصله پس از اعمال استرس ۳۰ دقیقه ای و نیز دو ساعت پس از این استرس در گروه شاهد و گروه استرس پره ناتال که در محیط غنی شده قرار داشتند تفاوت معنی داری نداشت اما در زمان های مشابه پس از استرس این مقادیر در حیواناتی که در معرض استرس پیش از تولد بودند و در محیط استاندارد زندگی کردند به طور معناداری بالاتر بود. (نمودار شماره ۲)

اثر غنی سازی محیط بر حجم غده آدرنال: تحلیل داده ها نشان داد که حجم کل غده آدرنال و حجم قشر آن متعاقب غنی سازی محیط در رت های بالغی که در معرض استرس پره ناتال بودند کاهش معنی داری دارد ( $P<0.0001$ ) در حالی که بر روی این شاخص ها در حیوانات گروه شاهد اثری نداشت. (به ترتیب  $P=0.60$ ,  $P=0.62$ ) هم چنین نتایج حاکی از آن است که پیچیدگی محیط زندگی بر حجم بخش مرکزی این غده در هر دو گروه مورد مطالعه اثری نداشت. (جدول شماره ۱) تحلیل داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که هم استرس پیش از تولد و هم نوع محیط زندگی بر حجم ناحیه فاسیکولاتا موالیید رت گروه آزمایش اثر دارد ( $P<0.0001$ ) به طوری که استرس پیش از تولد باعث افزایش حجم این ناحیه به میزان ۳۵ درصد شد و زندگی در محیط غنی شده

پس از تولد نوزادان، مادرانی که بین ۸ تا ۱۲ نوزاد با تعداد مشابه نر و ماده به دنیا آورده بودند، همراه با نوزادانشان در مطالعه حفظ و بقیه حذف شدند. نوزادان در پایان سه هفتهگی از شیر گرفته شدند و زمانی که دو ماهه شدند دو رت نر سالم و در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم از هر مادر و جمعاً ۲۰ سر رت از هر گروه (شاهد و استرس پره ناتال) انتخاب گردید. سپس این حیوانات به دو دسته مساوی ده تایی تقسیم و در دو محیط استاندارد و غنی شده به مدت یک ماه و در شرایط مشابه تغذیه ای نگهداری شدند.

محیط غنی شده قفس پلاستیک بزرگتری در مقایسه با محیط استاندارد بود که استوانه ها، مکعب های پلاستیکی رنگی در اندازه های مختلف و وسایل بازی در آن قرار داده و هفته ای دو بار عوض می شد. در هر قفس ۵ رت نگهداری شدند.

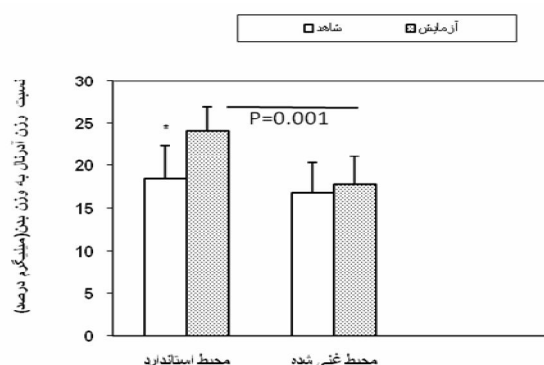
پس از طی این دوره، اندازه گیری سطح کورتیکوسترون پلاسما با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت ICN Biochemicals (آمریکا) و بر اساس دستورالعمل کارخانه انجام شد. این سنجش بر روی سه نمونه خونی از ورید دمی حیوانات هر چهار گروه در سه مرحله قبل از استرس، بلافاصله بعد از استرس (روش اعمال استرس مشابه روش فوق الذکر و مدت آن ۳۰ دقیقه بود) و ۱۲۰ دقیقه بعد از استرس صورت گرفت.

سپس حیوانات را وزن و با اورتان (مرک، آلمان) عمیقاً بی هوش نموده و غده آدرنال به طور کامل از شکم خارج گردید. و پس از جدا نمودن چربی ها از آن، وزن و کد بندی شدند، به مدت یک هفته در محلول فرمالین ۴ درصد نگهداری گردید سپس بلوک های پارافینی از آن ها تهیه و برش های سریال به ضخامت ۵ میکرون بریده شد. از هر حیوان تعداد ۱۰ تا ۱۲ برش بافتی به صورت تصادفی سیستماتیک یکنواخت برداشته و با هماتوکسیلین آئوزین رنگ شد. (۲۴)

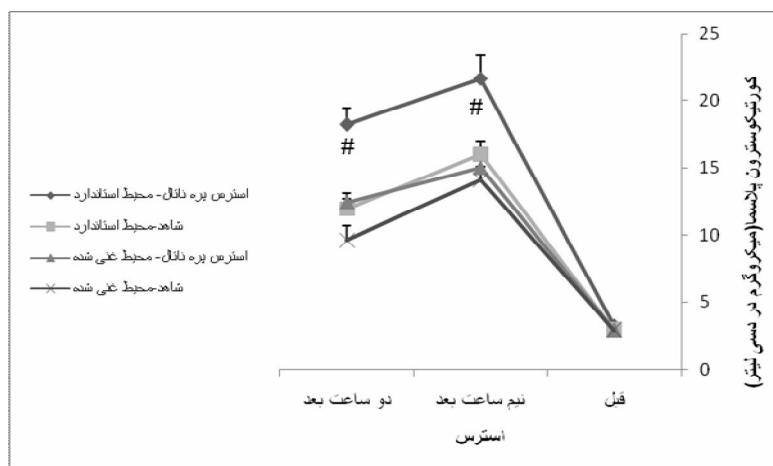
تصویر مقاطع بافتی از طریق دوربینی (Motic، اسپانیا) که بر روی میکروسکوپ نوری سوار شده بود به مانیتور کامپیوتر منتقل شد و با قرار دادن تصادفی نقاطی با مساحت معین  $A(P)$  بر روی تصویر و شمارش نقاطی که با مغز  $Medulla$  و قشر  $Cortex$  آدرنال و نواحی قشر شامل ناحیه گلوبولوزا، فاسیکولاتا و رتیکولر برخورد کرده بودند ( $\sum P$ ) سطح هر ناحیه محاسبه شد و با ضرب نمودن آن در فاصله بین برش های انتخابی که ثابت است (d)، حجم هر ناحیه و حجم کل آدرنال با استفاده از فرمول زیر بر طبق اصل کاوالیری محاسبه شد. (۲۲)

داد که استرس پیش از تولد و غنی سازی محیط زندگی بر حجم نواحی گلومرولوزا و رتیکولر اثر ندارد. (به ترتیب  $P=0.13$ ,  $P=0.76$ ) (جدول شماره ۲)

حجم این ناحیه را در این حیوانات به طور معنی داری کاهش داد اما نوع محیط زندگی بر حجم این ناحیه در حیوانات گروه کنترل اثر نداشت. هم چنین یافته ها نشان



نمودار شماره ۱. اثر غنی سازی محیط بر شاخص نسبت وزن آدرنال به وزن بدن رت های گروه های شاهد و آزمایش (استرس نمودار شماره ۱. اثر غنی سازی محیط بر شاخص نسبت وزن آدرنال به وزن بدن رت های گروه های شاهد و آزمایش (استرس پیش از تولد) (در هر گروه ۱۰ رت)،  $P=0.004$ \*



نمودار شماره ۲. اثر غنی سازی محیط بر کورتیکوسترون خون در رت های گروه های شاهد و آزمایش (استرس پیش از تولد) (در هر گروه ۱۰ رت)،  $P=0.000$  #

جدول شماره ۱. میانگین و انحراف معیار حجم غده آدرنال (بر حسب میلی متر مکعب) رت های گروه های شاهد و آزمایش (استرس پیش از تولد) در محیط های استاندارد و غنی شده (تعداد رت در هر گروه=۱۰)

گروه	نواحی آدرنال	محیط استاندارد	محیط غنی شده
شاهد	قشر	۵/۶±۰/۳	۵/۲±۰/۸
	مغز	۰/۴۲±۰/۰۶	۰/۴۳±۰/۰۵
آزمایش	کل	۶/۲±۱/۰	۵/۷±۰/۸
	قشر	۰/۷۳±۰/۰۴*	۵/۵±۱/۰
	مغز	۰/۴۶±۰/۰۵	۰/۴۴±۰/۰۲
	کل	۰/۷۸±۰/۰۴*	۶/۱±۰/۰۹

\* P &lt; 0.0001

جدول شماره ۲. میانگین و انحراف معیار حجم نواحی قشر غده آدرنال (بر حسب میلی متر مکعب) رت های گروه های شاهد و آزمایش (استرس پیش از تولد) در محیط های استاندارد و غنی شده (تعداد رت در هر گروه=۱۰)

گروه	نواحی قشر آدرنال	محیط استاندارد	محیط غنی شده
شاهد	گلوومرولوزا	۱/۲۱±۰/۲۱	۱/۲۰±۰/۱۷
	فاسیکولاتا	۳/۷۷±۰/۱۷	۳/۶۳±۰/۱۷
	رتیکولر	۰/۷۶±۰/۱۳	۰/۷۳±۰/۱۲
آزمایش	گلوومرولوزا	۱/۲۶±۰/۰۹	۱/۲۵±۰/۱۶
	فاسیکولاتا	۵/۱±۰/۲۰*	۳/۷۴±۰/۱۶
	رتیکولر	۰/۸۳±۰/۰۶	۰/۷۴±۰/۰۹

\* P &lt; 0.0001

### بحث و نتیجه گیری

این مطالعه تجربی نشان داد که نگهداری موش های صحرایی نر دو ماهه ای که مادرانشان طی هفته آخر بارداری روزانه به مدت یک ساعت متحمل استرس محدودیت حرکتی شده، در محیط غنی شده باعث طبیعی نمودن پاسخ محور HPA به استرس حاد و کاهش شاخص وزنی و اندازه غده فوق کلیه شد.

در توضیح یافته های این مطالعه لازم به ذکر است که استرس مادر در دوره بارداری باعث افزایش ترشح کورتیکوسترون می شود، (۲۳)، کورتیکوسترون به راحتی از سد جفتی گذشته، (۲۵)، وارد دستگاه گردش خون جنین شده و غلظت آن در خون جنین نیز بالا می رود. (۲۸-۲۶)

افزایش کورتیکوسترون پلاسمای جنین در خلال هفته آخر تکامل داخل رحمی که مصادف با زمان بروز گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی در هیپوکامپوس رت است، (۲۹)، موجب کاهش بروز این گیرنده ها (کاهش تراکم آن ها) می

شود، (۲۶، ۲۷، ۳۰)، بنا بر این میزان کورتیکوسترون چسبیده به گیرنده ها کاهش می یابد و میزان کورتیکوسترون خون متعاقب استرس حاد در این حیوانات بالا باقی می ماند، (۳۱). معلوم شده است که استرس پره ناتال turnover نورایی نفرین مغز را در رت های بالغ افزایش می دهد، (۳۲)، و نورایی نفرین یک اثر مهارى مستقیم روی رسپتورهای گلوکوکورتیکوئیدی در هیپوکامپوس دارد بنا بر این ترشح کورتیکوسترون را تسهیل می کند. (۳۳)

افزایش شاخص وزنی و حجم قشر غده فوق کلیه مخصوصاً ناحیه فاسیکولاتا که عمده ترشح کورتیزول را به عهده دارد می توان نتیجه افزایش هورمون رها کننده کورتیکوتروپین و افزایش فعالیت محور HPA، (۳۴، ۳۵)، متعاقب استرس پره ناتال دانست. افزایش حجم غده آدرنال و لایه های قشری آن در رت های یک روزه و بیست و یک روزه که مادرانشان در سراسر دوره بارداری روزانه سه بار تحت استرس محدودیت حرکتی ۴۵ دقیقه ای قرار

گرفته بودند، گزارش شده است، (۱۸)، که یافته های مطالعه ما مبنی بر اثر مثبت استرس پیش از تولد در افزایش حجم قشر آدرنال و لایه فاسیکولاتای آن، با نتایج مطالعه مذکور هم خوانی دارد به هر حال در این بررسی ۴۸ درصد افزایش حجم ناحیه فاسیکولاتا و نیز افزایش ۲۴ درصدی در دو ناحیه دیگر قشر گزارش شده است که با ۳۵ درصد افزایش حجم در لایه فاسیکولاتا و عدم تاثیر بر حجم سایر نواحی قشر که در مطالعه ما به دست آمد هم خوانی ندارد. و این تفاوت را می توان به اختلاف در مدت و شدت اعمال استرس پره ناتال و سن حیوانات در زمان آزمایش نسبت داد.

مطالعات نشان داده است که افزایش هورمون رها کننده کورتیکوتروپین در آمیگدال حیواناتی که در معرض استرس پیش از تولد بودند از روز ۱۴ پس از تولد شروع می شود و تا دوره بزرگسالی (۵ ماهگی) ادامه می یابد، (۳۶)، هم چنین افزایش گیرنده های این هورمون و نیز بزرگی آمیگدال در این زمان دیده می شود، (۳۷،۳۸)

نتایج این بررسی با یافته های مطالعات دیگر که افزایش طولانی مدت کورتیکوسترون در پاسخ به استرس حاد-و نه کورتیکوسترون پایه- در رت های نر بالغی که در هفته آخر بارداری تحت استرس واقع شده بودند گزارش نموده اند، (۳۹،۴۰)، موافقت دارد اما مطالعات دیگری نیز مبنی بر تغییر میزان کورتیکوسترون پایه موجود می باشد، (۴۰،۴۱). یافته های مغایر با نتایج این مطالعه ممکن است به علت تفاوت های مربوط به آزمایش ها مانند تفاوت در روش القاء استرس و مرحله زمانی بارداری که در آن استرس اعمال می شود و نیز روش های آزمایش نمودن نوزادان و جنس نوزادان باشد. برای نمونه، در رت اعمال استرس مکرر محدودیت حرکتی در سراسر دوره بارداری با افزایش و نیز طولانی شدن پاسخ به استرس در نوزاد نر همراه است، (۴)، در حالی که استرس پیش از تولد به صورت متنوع و تصادفی تغییری در پاسخ محور در نوزاد نر در پی نداشته است، (۳)، بنا بر این ماهیت استرس به میزان زیاد روی عملکرد محور HPA نوزاد اثر دارد.

اگر چه جستجوی چگونگی تاثیر غنی سازی محیط در برعکس نمودن اثرات اندوکرینی ناشی از استرس پیش از تولد از اهداف این مطالعه نبود اما فرضیاتی را می توان برای آن پیشنهاد نمود:

اثر محیط غنی شده در افزایش تراکم گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی هیپوکامپوس و قشر پیشانی که نقش مهمی در تنظیم محور HPA دارد گزارش شده، (۱۰)، که

می تواند کورتیکوسترون بیشتری را به خود گرفته و سطح این هورمون متعاقب استرس حاد در حیوانات در معرض استرس پیش از تولد را پایین آورد. (۴۲)

کاهش شاخص وزن غده به علت نگهداری در محیط غنی شده را می توان به اثر زندگی در این محیط جدید در کاهش مقدار هورمون رها کننده کورتیکوتروپین (CRF) در برجستگی میانی و نیز کاهش بیان mRNA هورمون رها کننده کورتیکوتروپین در هیپوتالاموس مرتبط نمود. (۴۳)

یافته های این مطالعه در ارتباط با اثر غنی سازی محیط بر عملکرد محور HPA حیواناتی که مادرانشان تحت استرس پره ناتال قرار گرفتند با برخی نتایج پیشین موافقت، (۸،۴۴)، و با برخی مغایرت دارد، (۱۶). در مطالعه مورلی و همکاران در سال ۲۰۰۴ غنی سازی محیط پاسخ به استرس را در حیوانات کنترل تغییر نداد در حالی که میزان کورتیکوسترون در پاسخ استرس در نوزادانی که در معرض استرس پره ناتال بودند کاهش داد، (۸)، که با یافته های مطالعه حاضر هم خوانی دارد. اما در مطالعه اماک و ماتیوس در سال ۲۰۱۱ تفاوتی در پاسخ استرسی بین گروه کنترل و نوزادان نر کوچک که مادرانشان در دوره بارداری تحت استرس بودند مشاهده نشد. (۱۶)

به طور کلی تفاوت یافته ها در تاثیر غنی سازی محیط بر عملکرد پاسخ استرس را می توان به تفاوت در پروتکول های غنی سازی محیط، سن مواجهه با محیط غنی شده، مدت زمان دسترسی به محیط غنی شده و اندازه گروه های اجتماعی حیوانات نسبت داد.

پاسخ حیواناتی که در معرض استرس پیش از تولد نبودند و در محیط غنی شده قرار گرفتند به استرس حاد، همانند حیواناتی بود که در محیط استاندارد قرار داشتند که نشانگر اثر ضعیف غنی سازی محیط بر پارامترهای فیزیولوژیک و یا رفتاری در حیوانات سالم می باشد. (۴۵،۴۶) مطالعات متعددی اثرات غنی سازی محیط را در مدل های حیوانی که در معرض مخاطرات مختلف قبل از تولد از قبیل مصرف الکل، (۴۷)، کمبود اکسیژن قبل و بعد از تولد، (۴۸)، سوء تغذیه مادر، (۴۹)، استرس قبل، (۷)، و بعد از تولد، (۴۴)، قرار داشتند بررسی نموده اند که نتایج آن ها نشان داده است غنی سازی محیط، افزایش دفعات انجام رفتارهای طبیعی، کاهش رفتارهای غیر طبیعی، (۵۰)، مانند اضطراب، (۵۱)، افزایش قدرت تطابق و سازگاری در موقعیت های نامناسب، (۵۲،۵۳)، افزایش نورو ن زایی در هیپوکامپوس، (۵۴)، را در پی داشته است. از محدودیت های این مطالعه می توان به اعمال یک نوع استرس (محدودیت

می توان با کمک غنی و بهینه سازی محیط زندگی برطرف نمود و دلایلی دال بر نقش مثبت عوامل محیطی در رفع اثرات سوء بلند مدت متعاقب رخدادهای ناخوشایند دوره پیش از تولد را فراهم نمود. هم چنین این مطالعه یک مبنای هیستولوژیک را برای افزایش ترشح کورتیکوسترون متعاقب استرس پره ناتال و کاهش آن به خاطر زندگی در محیط غنی شده ارائه داد.

حرکتی) در یک دوره خاص (هفته سوم بارداری) روی حیوانات آزمایشگاهی رت، انجام تحقیق صرفاً روی نوزادان نر، استفاده از محیط غنی شده خاص (بدون Running wheel) اشاره نمود که تعمیم نتایج این مطالعه را با اشکال مواجه می کند.

در مجموع این مطالعه نشان داد که تغییرات در عملکرد و ساختمان غده فوق کلیه ناشی از استرس پیش از تولد را

### References

- 1-Brunton PJ, Russell JA. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex specific effects. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 258-71.
- 2- Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32: 1073-86.
- 3-Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, et al. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res* 2005; 156: 251-61.
- 4- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Linque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 2003; 27: 119-27.
- 5-Seckl JR. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185: 61-71.
- 6-Renznikov AG, Nosenko ND, Tara-senko LV, Sinitsyn PV, Polykova LI. Early and long-term neuroendocrine effects of prenatal stress in male and female rats. *Neurosci Behav Physiol* 2001; 31: 1-5.
- 7-Laviola G, Rea M, Morley-Fletcher S, Di Carlo S, Bacosi A, De Simone R, et al. Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 1655-64.
- 8-Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari M, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 1-8.
- 9-Hebb DO. The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am Psychol* 1947; 2: 306-7.
- 10- Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, et al. Environmental enrichment and the brain. *Prog Brain Res* 2002; 138: 109-33.
- 11-Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 2004; 5: 423-31.
- 12-Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* 2004; 5: 1341-7.
- 13-Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav* 2003; 2: 281-92.
- 14-De Jong IC, Prelle IT, van de Burgwal JA, Lambooj E, Korte SM, Blokhuis HJ, et al. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiol Behav* 2000; 4: 571-8.
- 15-Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 3-4: 481-6.
- 16-Emack J, Matthews SG. Effects of chronic maternal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) function and behavior: no reversal by environmental enrichment. *Horm Behav* 2011; 60: 589-98
- 17-Friske JE, Gammie SC. Environmental enrichment alters plus maze, but not

- maternal defense performance in mice. *Physiol Behav* 2005; 2: 187-94.
- 18- Noorafshan A, Karimipoor M, Bahmanpoor S, Dehghani F. The Influence of Exposure to Stress of Pregnant Rats on the Adrenal Gland Structure of their Offspring. An Unbiased Stereological Study. *Scand J Lab Anim Sci* 2005; 32: 161-6.
- 19-Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11032-7.
- 20-Hosseini-sharifabad M, Hadine-doushan H. Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anat Sci Int* 2007; 82: 211-7.
- 21-Hosseini-sharifabad M, Sabahi AR. Prenatal stress induces impairment of memory and reduction in the volume of hippocampus in rat. *J Isfahan Med Sch* 2006; 75: 67-72.
- 22-Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1988; 96: 379-94.
- 23-Ward IL, Weisz J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female rat fetus and their mothers. *Endocrinology* 1984; 84: 1635-44.
- 24-Gundersen HJG, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J Microsc* 1999; 93: 199-211.
- 25-Zarrow MO, Philpott J, Denenberg V. Passage of <sup>14</sup>C-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature* 1970; 226: 1058-9.
- 26- Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol* 1999; 40: 302-15.
- 27- Szuran TF, Pliska V, Pokorny J, Welzl H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol Behav* 2000; 71: 353-62.
- 28-Lesage J, Blondeau B, Grino M, Br-eant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 2001; 142: 1692-702.
- 29-Rosenfeld P, Sutanto W, Levvine S, De Kloet ER. Ontology of type I and type II corticosteroid receptors in the rat hippocampus. *Dev Brain Res* 1988; 42: 113-38.
- 30-Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci* 1996; 16: 3943-9.
- 31- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 1986; 7: 24-301.
- 32- Takahashi LK, Turner JG, Kalin NH. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. *Brain Res* 1992; 574: 131-7.
- 33- Maccari S, Mormède P, Piazza PV, Simon H, Angelucci L, Le Moal M. Hippocampal type I and type II corticosteroid receptors are modulated by central noradrenergic systems. *Psychoneuroendocrinology* 1992; 17: 103-12.
- 34- Akana SF, Shinsako J, Dallman MF. Drug-induced adrenal hypertrophy provides evidence for reset in the adrenocortical system. *Endocrinology* 1983; 113: 2232-7.
- 35- Lemaire V, Taylor GT, Mormede P. Adrenal axis activation by chronic social stress fails to inhibit gonadal function in male rats. *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22: 563-73.
- 36-Cratty MS, Ward HE, Johnson EA, Azzaro AJ, Birkle DL. Prenatal stress increases corticotrophin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. *Brain Res* 1995; 675: 297-302.
- 37- Ward HE, Johnson EA, Salm AK, Birkle DL. Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotrophin releasing factor systems in rat brain. *Physiol Behav* 2000; 70: 359-66.



- 38-Salm AK, Pavelko M, Krouse EM, Wendy Webster W, Kraszpulski M, Bi-rkle DL. Lateral amygdaloid nucleus e-xpansion in adult rats is associated with exposure to prenatal stress. *Develop Br-ain Res* 2004; 148: 159-67.
- 39-Takahashi LK. Prenatal stress: consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function. *Int J Dev Neurosci* 1998; 16: 199-207.
- 40- Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid recap-tors in adult rats of both gender. *J Neurobiol* 1999; 40:302-15.
- 41- Fride E, Dan Y, Feldon J, Halevy G, Weinstock M. Effect of prenatal str-ess on vulnerability to stress on prep-ubertal and adult rats. *Physiol Behav* 1986; 37: 681-7.
- 42-Levine S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* 2000; 405: 149-60.
- 43-Plotsky PM, Meaney MJ. Early postnatal experience alters hypot-halamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content, and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Res* 1993; 18: 195-200.
- 44-Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of maternal sepa-ration on stress reactivity. *J Neurosci* 2002; 22: 7840-3.
- 45- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of envi-ronmental enrichment. *Nat Rev Neu-rosce* 2000; 1: 191-8.
- 46- Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H. Dissociable effects of isol-ateion rearing and environmental enri-chnment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Phar-macol Biochem Behav* 2002; 73: 209-24.
- 47--Hannigan JH, Berman RF, Zajac CS. Environmental enrichment and the behavioural effects of prenatal exposure to alcohol in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1993; 15: 261-6.
- 48- Iuvone L, Geloso MC, Dell'Anna E. Changes in open field behaviour, sp-atial memory, and hippocampal parva-lbumin immunoreactivity following en-richment in rats exposed to neonatal anoxia. *Exp Neurol* 1996; 139: 25-33.
- 49-Carughi A, Karpenter K, Diamond M. Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on bo-dy growth, blood parameters and cere-bral cortical development of rats. *J Nutr* 1989; 119: 2005-16.
- 50- Olsson I, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. *Lab Animals* 2002; 36: 243-70.
- 51- Qian J, Zhou D, Pan F, Liu CX, Wang YW. Effect of environmental enrichment on fearful behavior and ga-strin-releasing peptide receptor expr-ession in the amygdala of prenatal stre-ssed rats. *J Neurosci Res* 2008; 86:3011-7.
- 52-Escorihuela RM, Tobena A, Ferna-ndez-Teruel A. Environmental enrich-ment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and incre-ases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behav Brain Res* 1994; 61: 169-73.
- 53- Klein SL, Lambert KG, Durr D, SchaeferT, Waring RE. Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiol Behav* 1994; 56: 291-7.
- 54- Brown J, Cooper-Kuhn C, KempermannG, Van Praag H, Winkler J, Gage F, et al. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2042-6.

## Effect of enriched environment on the size of adrenal gland in prenatally stressed rat

Hosseini-sharifabad M<sup>1</sup>, Hekmatimoghadam SH<sup>2</sup>

(Received: July 29, 2013 Accepted: November 2, 2013)

### Abstract

**Introduction:** Studies have shown that prenatal stress causes the enlargement of adrenal gland in young rats. The purpose of this study was to investigate the effect of environmental condition during adolescence on the reversibility of prenatal stress-induced functional and structural alterations.

**Materials & Methods:** 2-month-old Wister male rats that prenatally experienced restraint stress were maintained in either an enriched environment or standard living cages throughout third month of their life. At the end of the period, blood corticosterone level was measured before and after the acute stress. Also, the volume of adrenal gland was estimated using stereological techniques.

**Findings:** Statistical analysis of data showed that corticosterone level, after the acute stress, was not significantly different among control and prenatally stressed rats expo-

sed to enrichment environment. However, this level was significantly higher in prenatally stressed rats exposed to standard environment in comparison to other groups. The total volume as well as the volume of zona fasciculate of the adrenal cortex in prenatally stressed adult rats significantly decreased following maintaining in enrichment environment, while these parameters did not change among other animal groups.

**Discussion & Conclusion:** This experimental study showed that the enrichment of living environment could normalize the response of hypothalamic-pituitary-adrenal axis to acute stress along with decreasing the volume of adrenal gland cortex in adult male rats whose mothers exposed to restraint stress during the last week of gestation.

**Keywords:** Enrichment of environment, prenatal stress, stereology, Adrenal gland

1- Dept of Biology and Anatomical Science, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

2- Dept of Laboratory Science, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

\* (Corresponding author)