اثر غنی سازی محیطی بر بافت جسم سیاه رت های مبتلا به پارکینسون با استرس دوران جنینی

تورج محمد زمانی[۱]، احمدرضا موحدی[۲*]، الهه عرب عامری[۳]

۱) گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲) گروه رفتار حرکتی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳) گروه رفتار حرکتی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۵ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۷**

چکیده

مقدمه: استرس پیش از تولد موجب تغییرپذیری مغز شده و اثرات طولانی مدتی بر ساختار و عملکرد آن بر جای می گذارد. پارکینسون یک بیماری مخرب عصبی پیشرونده است و یکی از عوامل مستعدکننده پارکینسون استرس پریناتال است. استفاده از شرایط غنی سازی محیطی روشی مناسب برای پیشگیری این بیماری می باشد. این مطالعه با هدف بررسی میزان اثربخشی غنی سازی محیطی بر بافت جسم سیاه در رت های پارکینسونی دارای استرس پریناتال انجام گردید.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت آزمایشگاهی انجام گردید. تعداد ۴۸ موش نر نژاد ویستار که نیمی از آن ها تحت استرس پریناتال بوده و به دنبال آن در محیط غنی سازی قرار گرفته بودند در ۸ گروه ۶ تایی؛ با استرس(کنترل، شم، پارکینسونی، پارکینسون+غنی سازی) و بدون استرس (کنترل، شم، پارکینسونی، پارکینسون+غنی سازی) تقسیم شدند. پس از ۸ هفته، حیوانات با کتامین و زیلازین بی هوش و با روش جراحی استریوتاکس، ۶ میکروگرم نوروتوکسین در ۲ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد حاوی اسید اسکوربیک به درون مغز تزریق و سه هفته بعد علائم پارکینسون با استفاده از آزمون آپومورفین تایید گردید. مغز از داخل جمجمه خارج و بعد از انجام مراحل؛ پاساژ بافتی، برش و رنگ آمیزی، تعداد نورون ها با استفاده از میکروسکوپ شمارش و داده های با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکراهه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل گردید.

یافته های پژوهش: یافته ها نشان داد که غنی سازی محیطی نتوانست به طور کامل از تخریب نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه جلوگیری نماید اما تعداد نورون های جسم سیاه درگروه غنی سازی محیطی، به طور معنی داری بیشتر از گروه پارکینسونی تخریب با نوروتوکسین بود($P\leq0.001$). غنی سازی محیطی اثر مخرب استرس پریناتال بر کاهش تعداد نورون های جسم سیاه و آزمون های رفتاری را امحا نمود($P\leq0.001$).

بحث و نتیجه گیری: نتایج به اثرات مفید شرایط غنی سازی در حفاظت تعداد نورون های بیشتر جسم سیاه اشاره می‌کند و پیشنهاد می نماید شرایط محیطی غنی سازی شده می تواند به عنوان یک عامل سودمند در کاهش دژنره شدن نورون های دوپامینرژیک بیماری پارکینسون و کاهش اثر استرس پریناتال موثر باشد.

واژه های کلیدی: استرس پریناتال، غنی سازی محیطی، جسم سیاه، پارکینسون

* نویسنده مسئول: گروه رفتار حرکتی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: armovahedi@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

در طول دوره های بحرانی یا حساس رشد، مغز تغییرپذیری زیادی دارد و به عوامل مخل محیطی مانند استرس آسیب پذیر است. استرس پیش از تولد(PS) ناشی از قرار گرفتن در معرض سختی های محیطی، فیزیکی یا اجتماعی در طی دوران بارداری می باشد که ممکن است ظرفیت تنظیم کننده طبیعی غدد درون ریز، سیستم عصبی و ایمنی را در جنین در حال رشد تهدید کند(۱). رشد سریع سیستم عصبی مرکزی پستانداران در دوران جنینی، آن ها را مستعد آسیب در برابر عوامل مختلف فیزیکی و فیزیولوژیک می کند. امروزه کاملاً معلوم شده است که شرایط محیط دوره جنینی اثرات عمیقی بر روی تکامل موجود دارد، به گونه ای که استرس و رخدادهای ناخوشایند در این دوران می تواند تغییرات و اختلالات مهم نوروبیولوژیک، اندوکرینی و رفتاری را در دوره بزرگسالی در پی داشته باشد(۲).

شواهد زیادی نشان می دهد که استرس قبل از تولد ممکن است اثرات طولانی مدتی بر ساختار و عملکرد مغز داشته باشد. استرس دوران بارداری منجر به تاخیر در رشد حرکتی، اختلال در سازگاری نسبت به شرایط استرس زا، رفتارها جنسی تغییر یافته، اختلال در یادگیری و اختلال در رشد نورونی و مورفولوژی مغز می شود. بسیاری از این تغییرات به نوروترنسمیتور دوپامین (DA) نسبت داده شده است. در انسان اختلال در عملکرد سیستم دوپامینرژیک با رشد چندین اختلال عصبی مانند پارکینسون(PD)، اسکیزوفرنی، اختلال بیش فعالی و کمبود توجه و افسردگی همراه است(۳).

بیماری پارکینسون یک بیماری مخرب عصبی پیشرونده است که با افزایش سن به طور معنی داری افزایش می یابد. این بیماری پیش رونده و برگشت ناپذیر منجر به اختلالات حرکتی می شود(۴). در این بیماری نورون های واقع در سطح عقده های قاعده ای و بیشتر نورون های جسم سیاه را که دوپامین ترشح می کنند تحت تاثیر قرار می دهد. کمبود دوپامین منجر به نواقص حرکتی، وضعیتی و ناتوانی های کارکردی می شود. این بیماری با علائم حرکتی و غیرحرکتی مانند ترمور، برادی کینزیا، کاهش تعادل، اختلال در راه رفتن و کاهش کیفیت زندگی مشخص می شود(۵). بسیاری از تغییرات ایجاد شده در مغز به دلیل تغییر در نروترنسمیتر دوپامین رخ می دهد. اختلال در عملکرد سیستم دوپامینرژیک منجر به اختلالات عصبی هم چون پارکینسون می گردد. بیماری پارکینسون بعد از آلزایمر به عنوان شایع ترین بیماری مخرب عصبی مطرح است(۶). این بیماری تقریباً ۱ درصد از افراد بالای ۵۰ سال را در حال حاضر مبتلا کرده است. علائم بالینی بیماری تقریباً به دنبال از بین رفتن حدود ۸۰ درصد از نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه بروز می کند(۷).

اگر چه علت این بیماری هنوز شناخته شده نیست، اما دو عامل محیط و ژنتیک برای این بیماری مطرح شده است(۸). همان طور که ذکر شد یکی از عوامل مستعدکننده پارکینسون ممکن است استرس پریناتال باشد اما تحقیقات بسیار کمی در این مورد صورت گرفته است و هنوز تحت بررسی است.

تحقیقات نشان داده اند که عوامل محیطی و سبک زندگی مانند رژیم غذایی، آموزش، ورزش و قرار گرفتن در معرض ترکیبات سمی بر فرآیند تخرب نورونی پیش رونده که منجر به بیماری پارکینسون می شود، اثرگذار است. تحریک ذهنی و فعالیت بدنی می تواند در تنظیمات محیطی به وسیله استفاده از غنی سازی محیطی مدل سازی شود. غنی سازی محیطی(EE) به عنوان یک افزایش پیش رونده و پایدار در محرک های حسی-حرکتی و شناختی با فعالیت داوطلبانه جسمانی و تعامل اجتمایی پیچیده تعریف شده است(۴).

مفهوم غنی سازی محیطی برای اولین بار توسط هب در سال ۱۹۴۷ مطرح شد. که به تفاوت های کیفی رفتار بین موش هایی که برای بازی کودکان به منزل برده شده بودند و موش هایی که در آزمایشگاه باقی مانده بودند اشاره می کند(۹). غنی سازی محیطی شامل ایجاد تغییر در قفس حیوان یا یک محیط جستجوگری دوم بود. که فرصت های حسی، حرکتی، شناختی و بالقوه اجتماعی را فراهم می‌کرد. به این صورت که موش ها در قفس های با اندازه بزرگ تر قرار می گیرند و تعدادی وسیله مانند چرخ های گردان، نردبان، قطعات چوب و مواد لازم برای لانه سازی لوله پلاستیکی برای پنهان شدند و اسباب بازی در داخل قفس فراهم می شد. آن ها امکان انجام فعالیت های جستجوگری، بازی کردن با سایر موش ها و دیگر فعالیت های فیزیکی را نیز داشتند. حتی دسترسی به آب و غذا برای این موش ها به نحوی بود که باید جهت دریافت آن ها به جستجو می پرداختند. چنین شرایطی شباهت بیشتری به نحوه زندگی جوندگان در محیط های طبیعی داشت(۱۰). 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، نورآناتومیکی، نوروفیزیولوژیکی و نوروشیمیایی در مغز رت می شود(۱۱).

تا مدت ها پژوهشگران به بررسی اثر غنی سازی محیطی و دامنه رفتارهای بهنجار حیوانات پرداختند که نتایج بهبود عملکرد در تکالیف یادگیری مختلف مانند افزایش در بازی های اجتماعی، کنکاش بیشتر و اضطراب کمتر را نشان داد. مطالعات مختلفی به بررسی انواع غنی سازی و راهکارهای ارائه آن پرداخته و اهمیت عواملی مانند سن، جنسیت، گونه، تفاوت های فردی و پیش بینی پذیری محیط غنی شده(۱۲) را در اثربخشی این روش در حیوانات مشخص نموده است. آزمایش ها نشان دادند که ترکیب در رویدادهای حسی مختلف بر رفتار و رشد مغز اثر مثبتی دارد(۱۳). هم چنین بین بهبود در عملکرد رفتاری با تغییر در انعطاف پذیری و جنبه های آناتومی و نوروشیمیایی مغز مانند افزایش انشعابات دندریتی در قشر هیپوکامپ و افزایش بروز عوامل نوروتروفیک و هم چنین افزایش نورونزایی ارتباط وجود دارد.

اشنایدر و همکاران بیان می کنند که تصویر گسترده مربوط به تاثیر غنی سازی بر عملکرد موش های سالم این فرضیه را ایجاد می کند که این روش ممکن است برای غلبه بر نقایص شناختی در حیوانات مبتلا به آسیب مغزی نیز به کار رود.

از سال ۱۹۶۰ تحقیقات متفاوتی وجود دارد که اکثریت قریب به اتفاق آن ها سودمندی غنی سازی را در آسیب های مغزی نشان داده اند. از آن جا که محرک های رفتاری و تمرینی انعطاف پذیری مغز را حفظ کرده یا بهبود می بخشد و عملکرد شناختی را افزایش می دهند پیشنهاد شد که غنی سازی محیطی می تواند درمانی برای اختلالات عصبی-تحولی نیز باشد. در همین راستا اشنایدر و همکاران نیز موش هایی در معرض VPA را در محیط غنی شده قرار دادند. این گروه از موش ها در مقایسه با گروه کنترل در رفتارهای تکراری و قالبی اضطراب و افزایش در رفتارهای جستجوگرانه و اجتماعی کاهش معناداری را نشان دادند.

به کارگیری غنی سازی محیطی در مدل های حیوانی باعث هماهنگی حرکتی، بهبود یادگیری و حافظه، کاهش رفتارهای تکراری، افزایش رفتارهای اجتماعی و جستجوگری شد. هم چنین غنی سازی محیطی، تراکم سیناپسی را بهنجار سازی کرد و عوامل نوروترافیک BDNF و NGF را افزایش داد(۱۴). هم راستا با پیشرفت دانش در حوزه اثربخشی غنی سازی در مدل های حیوانی تلاش زیادی برای به کارگیری آن به عنوان درمانی برای اختلالات مغزی در انسان انجام گرفته است.

بر اساس رابطه بین عوامل محیطی و پاتولوژی بیماری پارکینسون، مطالعات گذشته نشان داده اند که درمان تجربی ممکن است اثر درمانی مطلوبی بر نشانه ها و پیشرفت بیماری نشان دهد. در ارتباط با این یافته ها، قرار گرفتن در شرایط محیطی غنی سازی شده در حیوانات ضایعه دیده با سم ۶-هیدروکسی دوپامین

هیدروکلراید(6-OHDA) به طور قابل توجهی عملکرد حرکتی مانند دسترسی ماهرانه بهبود یافت(۱۵). مطالعات پیشین پیشنهاد کرده اند که تمایز بین قرار دادن در شرایط غنی سازی شده محیطی قبل از ضایعه در مقایسه با بعد از ضایعه امری ضروری است.

مدل های اخیر توان بخشی اغلب از استراتژی های جبرانی به عنوان مدیریت درمانی استفاده کرده اند، با این حال شواهدی در مورد سودمندی ورزش در شرایط نوروپلاستی و توانایی خود تعمیری مغز وجود دارد(۱۶).

بیش از ۸۰ درصد از زنان باردار استرس، به ویژه استرس روانی را تجربه می کنند. کورتیکواستروئیدها تولید شده ناشی از استرس در بدن مادر ممکن است به راحتی از سد جفت گذشته و بر فعالیت سلول های جنین اثر بگذارد و برنامه ریزی سلول های عصبی جنینی را تغییر دهد و در رشد سیستم عصبی تداخل ایجاد نماید(۱۷).

زمان بارداری مرحله بسیار حساسی است که در طی آن تغییرات نوروپلاسیتی ممکن است منجر به تغییرات طولانی مدت یا دائمی در ساختار و عملکرد سیستم عصبی شود. این آسیب پذیری چندان گسترده نیست اما در عوض بر مناطق ویژه و مسیرهای عصبی تاثیر می گذارد که ممکن است با تخریب نورونی و کاهش پلاسیتی در ساختار جسم سیاه منجر شده و عامل بیماری پارکینسون گردد. بنا بر این افزایش پلاسیتی عصبی و انعطاف پذیری سلولی ممکن است پیش درمانی مناسب برای این بیماران باشد.

اغلب قرار گرفتن در معرض استرس مادر غیر قابل کنترل است و عواقب طولانی مدت آن نیاز فوری برای استراتژی های درمانی را اهمیت می بخشد که به طور موثری برنامه نویسی استرس را معکوس می سازد. تحقیقات نشان داده است که قرار گرفتن در معرض تجارب مناسب یکی از قدرتمندترین درمان ها برای افزایش نوروپلاسیتیسی و عملکرد حرکتی در هر زمان از زندگی می باشد.

با توجه به استفاده گسترده از غنی سازی محیطی در مطالعات حیوانی به منظور پلاسیتیسیته مغز، بسیار تعجب آور است که مطالعات محدودی این درمان را برای استرس دوران بارداری به کار برده اند و هیچ تحقیقی به طور قطعی به بررسی اثر غنی سازی محیطی بر رت های پارکینسونی دارای استرس پرناتال نپرداخته است. قرار گرفتن در معرض تجارب مناسب پیچیده هم چون غنی سازی محیطی(EE) یکی از قدرتمندترین درمان ها برای افزایش نوروپلاسیتی و عملکرد رفتاری در هر زمان از زندگی می باشد. این مطالعه نشان می دهد که غنی سازی ممکن است یک درمان موثر، برای افرادی که از اثرات استرس پرناتال یا آسیب دیده در اوایل زندگی هستند، ارائه دهد.

در تعدادی از تحقیقات که تاثیر ورزش بر روی نورون های دوپامینرژیک رت های دارای استرس پرناتال را مورد بررسی قرار داده اند، نوزادان دارای استرس پرناتال جدا از مادر پرورش داده شده اند، در حالی که استرس جدایی از مادر خود، یکی از عوامل استرس زای اوایل زندگی نوزاد می باشد که ممکن است کودک را مستعد به اختلالات تخریب نورونی در بزرگسالی نماید(۱۸). در این پژوهش عامل استرس زای جدایی از مادر کنترل شده است و نتایج منحصراً به دلیل استرس پرناتال می باشد. در حال حاضر تحقیقات به سمت شناخت روش های نوین برای پیشگیری از بروز این بیماری است. با توجه به اهمیت بررسی اثر عوامل مختلف استرس زا در دوران بارداری بر نورون های دوپامینرژیک در فرزندان پس از تولد و کمک به کاهش مشکلات بهداشتی و هزینه های درمانی بعدی فرزندان، مطالعه بیشتر در این خصوص کاملاً ضروری به نظر می رسد و پیشگیری از افزایش روز افزون تعداد بیماران پارکینسون در

جامعه از ضروریات و اهمیت انجام این پژوهش می باشد.

مواد و روش ها

روش این پژوهش از نوع تجربی بود. ۴۸ رت نر نژات ویستار که نیمی از آن ها در شرایط استاندارد و طبیعی و نیم دیگر تحت استرس پیش از تولد با قرارگیری مادر در شرایط بی حرکتی توسط دستگاه restrainer از روز ۸ تا ۲۱ دوره بارداری هر روز به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند، استفاده گردید. از روز تولد تا روز ۲۱ نوزادان و مادر در شرایط بدون استرس قرار گرفتند. در روز ۲۱ بعد از تولد نوزاد از شیر گرفته شد و سپس هر ۳ نوزاد در یک قفس جداگانه و در شرایط استاندارد قرار گرفتند، که به آب و مواد غذایی ویژه موش ها دسترسی آزاد داشتند. در روز ۳۰ پس از تولد، رت های دارای استرس پریناتال و بدون استرس پریناتال در ۸ گروه زیر تقسیم شدند.

-گروه های(کنترل) ۱ و ۲ که در شرایط استاندارد زندگی کردند و هیچ گونه فعالیت بر روی آن ها انجام نگردید.

-گروه های(شم) ۱ و ۲ که در این گروه از حلال سالین به جای تزریق سم 6-OHDA، استفاده شد. با توجه به این که در تزریق نوروتوکسین سوزن همیلتون از ساختارهای متفاوتی از مغز عبور می کند؛ بنا بر این هدف از طراحی این گروه، بررسی اثر تخریب احتمالی سوزن همیلتون بود.

-گروه های(پارکینسونی) ۱ و ۲ که در این گروه با تزریق 6-OHDA القاء پارکینسون صورت گردید.

-گروه های(غنی سازی+پارکینسون)۱ و ۲ که در این گروه هشت هفته زندگی در محیط غنی سازی شده؛ شامل قفس پلاستیک سه تا چهار بزرگ تر در مقایسه با محیط استاندارد است که استوانه ها، مکعب های پلاستیکی رنگی در اندازه های مختلف، وسایل بازی و چرخ دوار، دارحلقه و ارتباط بین قفس ها با کانال های تعبیه شده به منظور تبادلات اجتمایی را شامل می شود و هفته ای سه بار به منظور افزایش فعالیت های جستجوگرانه وسایل و ابزارهای بازی عوض می شوند. در هر قفس ۹ تا ۱۲ رت نگهداری شدند. بعد از هشت هفته با تزریق 6-OHDA بیماری پارکینسون در این گروه نیز القاء گردید.(عدد ۱ مشخصه گروه بدون استرس و عدد ۲ مشخصه گروه با استرس است)

پس از ۸ هفته زندگی در شرایط استاندارد و شرایط غنی سازی شده، تمامی حیوانات با کتامین و زیلازین بی هوش شده و مورد جراحی استریوتاکس و تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین قرار گرفتند. با توجه به اطلس Paxinos و Watson مختصات تزریق به قرار زیر می باشد: ۹/۲+میلی متر قدامی-خلفی، ۳- میلی متر جانبی و ۴/۵ میلی متر شکمی. میله دندانی ۳/۳ میلی متر پایین تر از سطح افقی تنظیم گردید(۱۹). بعد از سوراخ کردن محل مورد نظر با استفاده از دریل دستی، ۶ میکروگرم نوروتوکسین(6-OHDA) در ۲ میکرولیترسالین ۰/۹ درصد حاوی اسید اسکوربیک ۲ درصد به درون CNS سمت چپ با استفاده از سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری که به پمپ تزریق نصب شده بود تزریق گردید. سرعت تزریق ۰/۳۳ میکرولیتر در دقیقه بود. برای جلوگیری از بازگشت محلول به درون سرنگ و انتشار بهتر محلول در مغز، سوزن به مدت ۷ دقیقه پس از تزریق در جای خود قرار داده شد. سپس سر حیوانات بخیه و حیوانات جراحی شده در قفس های جداگانه مورد مراقبت قرار گرفتند. در این پژوهش سه هفته بعد از جراحی تست آپومورفین انجام شد. در ادامه حیوانات با محلول اتر بی هوش و سپس کشته شدند. بعد از وزن کشی حیوان، بافت مغز آن ها به سرعت و با دقت زیاد از داخل جمجمه خارج گردید. وزن مغز هر حیوان ثبت و جهت مطالعه میکروسکوپی نوری، نمونه هایی از نیمکره چپ در داخل محلول فیکساتور فرمالین ۱۰ درصد به مدت چهار روز قرار داده شد. سپس مراحل پاساژ بافتی توسط دستگاه tissue processor شامل فیکس کردن، آبگیری، شفاف سازی و آغشتگی انجام شد. بلوک های پارافینی تهیه و برش های سریالی نازکی به ضخامت ۵ میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم دوار در ناحیه جسم سیاه انجام شد و در نهایت از هر نمونه ۹ برش در قسمت قدامی، میانی و خلفی بافت به صورت تصادفی سیستماتیک یکنواخت انتخاب گردید به طوری که تمامی بافت را شامل شود و پس از رنگ آمیزی با

هماتوکسیلین آئوزین لام های میکروسکوپی تهیه گردید. سپس از برش های انتخاب شده با درشت نمایی X۴۰ و X100 با میکروسکوپ Tokyo, Japan, Olympus, BX51 WI عکس برداری صورت گرفت. تعداد نورون ها در عکسبرداری X40 در ناحیه متراکم جسم سیاه از سمت میانی تا بخش جانبی در برش کرونال با نرم افزار کامپیوتری Image G در گروه ها تعیین و به صورت درصد محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: پس از انجام آزمون کولموگراف اسمیرونوف و تایید نرمال بودن توزیع داده ها، از آزمون های پارامتریک استفاده گردید. جهت بررسی تفاوت های موجود در بین گروه های مورد آزمایش از تحلیل واریانس یک طرفه و هم چنین در صورت مشاهده اختلاف معنی دار از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در این پژوهش از برنامه SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید.

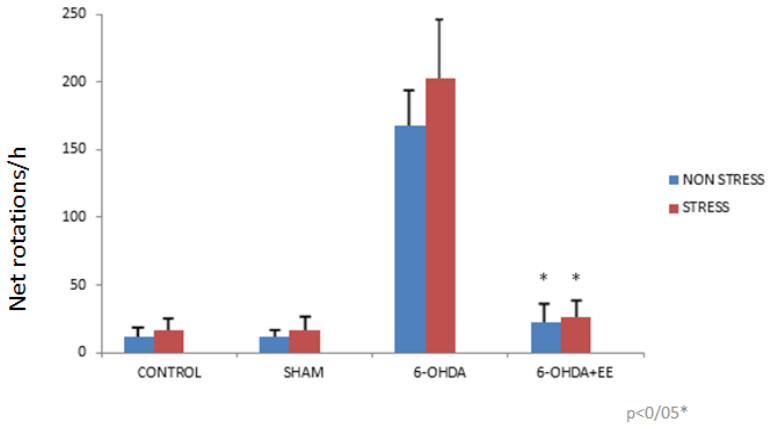
یافته های پژوهش

جهت بررسی میزان تاثیر غنی سازی محیطی بر روی نورون ها، رفتار چرخش حیوانات به دنبال تزریق آپومورفین هیدروکلراید و هم چنین از نظر بافت شناسی، شمارش کمی تعداد نورون ها در ناحیه بخش متراکم جسم سیاه مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی رفتار چرخشی: بررسی رفتار چرخشی توسط دارویی آپومورفین هیدروکلراید با غلظت ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم سه هفته بعد از جراحی انجام پذیرفت. برای اندازه گیری تعداد دفعات چرخش از روش استاندارد استفاده شد(۲۰). به این ترتیب که موش ها ده دقیقه قبل از شروع ارزیابی به منظور سازگاری با محفظه استوانه ای به داخل محفظه انتقال یافتند. قطر استوانه ۳۳ سانتی متر ارتفاع ۲۵ سانتی متر انتخاب شد. موش ها چند دقیقه پس از تزریق در داخل استوانه در جهت عکس سمت آسیب دیده کنترالترال(سمت راست) شروع به چرخش کرده و تعداد چرخش های کامل آن ها به مدت یک ساعت شمارش گردید(۲۱).

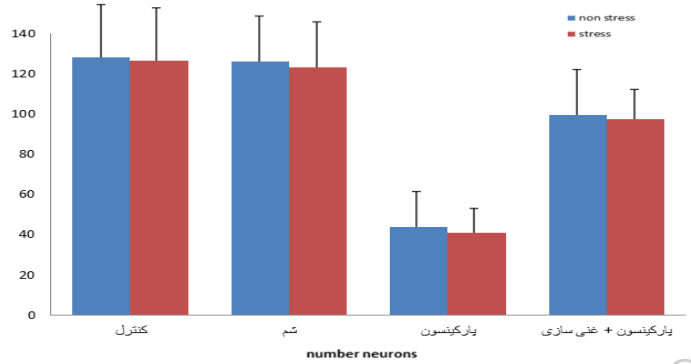
نتایج حاصل از القاء آپومرفین در رت های بدون استرس، نشان داد که در گروه کنترل میزان چرخش به راست به طور میانگین ۱۲ دور در ساعت و در گروه تخریب ۶-هیدروکسی دوپامین میزان چرخش به راست ۱۸۷/۸۳ دور در ساعت بود که تفاوت معنی داری را بین گروه کنترل و گروه ۶-هیدروکسی دوپامین نشان می دهد($P>0.01$). هم چنین نتایج نشان داد که میزان چرخش به سمت راست در گروه شم(تزریق سالین) ۱۱/۶۸ بود، که نشان دهنده عدم تاثیر فیزیکی جراحی بر عملکرد رفتاری گروه سالین می باشد و تفاوتی با گروه کنترل را از نظر آماری نشان نداد. از طرفی گروه ۶-هیدروکسی دوپامین+غنی سازی ۲۲/۲۳ چرخش به سمت راست داشتند که این میزان تفاوت بین گروه ۶-هیدروکسی دوپامین+غنی سازی و گروه تخریب ۶-هیدروکسی دوپامین از نظر آماری معنی دار می باشد(نمودار شماره ۱).

هم چنین القاء آپومرفین در دسته رت های با استرس، نشان داد که در گروه کنترل میزان چرخش به راست به طور میانگین ۱۵/۲۴ دور درساعت و در گروه تخرب ۶-هیدروکسی دوپامین میزان چرخش به راست ۲۳۱/۱۳ دور در ساعت بود که تفاوت معنی داری را بین گروه کنترل و گروه ۶-هیدروکسی دوپامین نشان می‌دهد($P>0.01$). میزان چرخش به راست گروه شم(تزریق سالین) ۱۵/۶۸ بود، که نشان دهنده عدم تاثیر فیزیکی جراحی بر عملکرد رفتاری ای گروه سالین می باشد و تفاوتی با گروه کنترل را از نظر آماری نشان نداد. چرخش به راست گروه ۶-هیدروکسی دوپامین+غنی سازی ۲۳/۲۳ بود که این میزان تفاوت بین گروه ۶-هیدروکسی دوپامین+غنی سازی و گروه تخریب ۶-هیدروکسی دوپامین از نظر آماری معنی دار می باشد(نمودار شماره ۱).

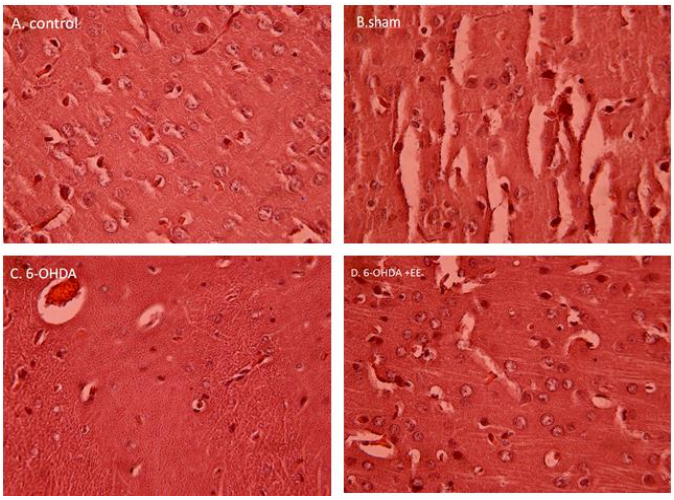


نمودار شماره ۱. میانگین تعداد چرخش به سمت راست(کنترالترال) ناشی از القاء آپومورفین در گروه های مورد آزمایش

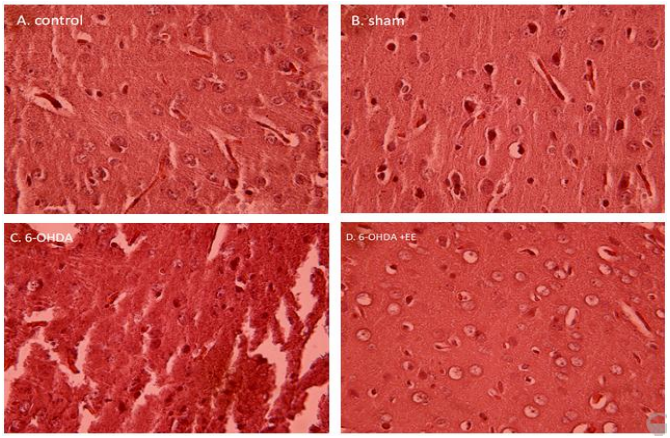
مطالعه بافت شناسی و شمارش نورونی(CNS): نتایج حاصل از بررسی بافتی در ناحیه متراکم جسم سیاه از قسمت میانی تا بخش جانبی در برش عرضی، حاکی از آن بود که میانگین و انحراف معیار تعداد نورون های شمارش شده در واحد میکرومتر مکعب در گروه های با و بدون استرس پریناتال با هم اختلاف معنی داری را نشان ندادند($P\leq0.001$). در بین تمامی گروه ها، بیشترین تعداد نورون به ترتیب مربوط به گروه کنترل و شم بود که تعداد آن ها نسبت به سایر گروه ها از لحاظ آماری معنی دار بود($P\leq0.001$). هم چنین تفاوت معنی داری بین گروه های کنترل و شم با و بدون استرس پریناتال مشاهده نشد($P\leq0.001$). بعد از گروه های یاد شده، گروه(پارکینسونی+غنی سازی) نسبت به گروه های (پارکینسونی) دارای بیشترین تعداد نورون در بخش متراکم جسم سیاه بودند که این مقدار نیز از نظر آماری معنی دار بود($P=0.000$). کمترین تعداد نورونی مربوط به گروه پارکینسونی تخریب با 6-OHDA بود که اختلاف معنی دار آماری را با سایر گروه های مورد مطالعه نشان داد($P=0.000$). غنی سازی محیطی، به طور معنی داری از تخریب نورون های جسم سیاه جلوگیری نکرد($P\leq0.001$)(نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲. میانگین و انحراف معیارتعداد نورون ها در نیمکره سمت چپ گروه های مورد آزمایش



شکل شماره ۱. نمای میکروسکوپی نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه در گروه بی استرس A:(کنترل)، B:(شم، تزریق سالین نرمال)، C:(پارکینسونی تخریب با 6-OHDA)، D:(پارکینسونی تخریب با 6-OHDA+غنی سازی محیطی)



شکل شماره ۲. نمای میکروسکوپی نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه در گروه با استرس A:(کنترل)، B:(شم، تزریق سالین نرمال)، C:(پارکینسونی تخریب با 6-OHDA)، D:(پارکینسونی تخریب با6-OHDA+غنی سازی محیطی

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش تاثیر شرایط غنی سازی محیطی مدل تجربی بیماری پارکینسون در موش های صحرایی نر نژاد ویستار دارای استرس پرناتال مورد بررسی قرار گرفت. آسیب یک طرفه به سیستم دوپامینرژیک جسم سیاه از طریق تزریق داخل بطنی 6-OHDA باعث کاهش دوپامین و در نتیجه افزایش گیرنده های پس سیناپسی دوپامینرژیک و عدم تقارن کارکردی می شود(۲۲) که میزان آسیب توسط چرخش کنترالترال ناشی از تست آپومورفین تایید می گردد(۲۳). در این مطالعه نتایج حاصل از القاء سم نوروتوکسین در رت ها، توسط آزمون آپومورفین مورد بررسی قرار گرفت که اطلاعات حاصل نشان از تاثیر سم نوروتوکسین و اثر تخریبی آن بر جسم سیاه داشت که در این زمینه با تحقیق فوق هم راستا می باشد.

شواهد زیادی نشان می دهند که استرس قبل از تولد ممکن است اثرات طولانی مدتی بر ساختار و عملکرد مغز داشته باشد(۲۴). هورمون استرس بیش از حد در گردش خون مادر می تواند برنامه ریزی سلول های عصبی جنین را تغییر دهد و در رشد سیستم عصبی تداخل ایجاد نماید. همراه با عوامل ژنتیکی، نوع و ماهیت محیط زیست پس از تولد، کیفیت توجه به مادر و استرس تجربه شده در رحم می تواند در رفتار فرزند عاملی تعیین کننده باشد(۲۵).

بر اساس نتایج مطالعه ما غنی سازی محیطی نتوانست به طور تمام و کمال از تخریب نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه جلوگیری نماید، اما تعداد نورون های جسم سیاه در گروه غنی سازی محیطی، به طور معنی داری بیشتر از گروه پارکینسونی تخریب با نوروتوکسین بود. هم چنین غنی سازی محیطی اثر مخرب استرس پریناتال بر کاهش تعداد نورون های جسم سیاه و آزمون های رفتاری را امحاء نمود.

سبب شناسی پارکینسون و عوامل موثر بر پیشرفت آن هنوز درک نشده است اما اطلاعات اتیولوژیک نشان می دهد که سبک زندگی ممکن است بر آن موثر باشد(۲۶). ریسک پارکینسون ممکن است توسط دستیابی پیشرفت تحصیلی و شغلی و نیز فعالیت بدنی تحت تاثیر قرار گیرد. تحریک ذهنی و فعالیت های بدنی می تواند در تنظیمات محیطی به وسیله استفاده از غنی سازی محیطی مدل سازی شود(۲۷).

مطالعات نشان می دهند که غنی سازی بر ایمنی رت هایی که در معرض استرس پیش از تولد قرار گرفته بودند اثر مثبت داشته است و نیز عملکرد محور AHP را به حالت طبیعی بازگردانده است(۲۸).

جاداوجی و متز درمان تجربی غنی سازی محیطی بر فرآیندهای تخریب نورونی که زمینه ساز بیماری پارکینسون است را قبل و بعد از ضایعه توسط سم 6-OHDA مورد بررسی قرار دادند. نتایج اثرات مفید قرار گرفتن در محیط غنی سازی شده قبل و بعد از ضایعه در عملکرد حرکتی ماهرانه به وسیله افزایش استفاده از اندام جبرانی و بازسازی حرکات ماهرانه را نشان داد. هم چنین سبک زندگی غنی قبل از شروع علائم حرکتی و برنامه های توانبخشی پس از تشخیص ممکن است در وضعیت بیماران پارکینسونی مفید باشد(۱۵). شرایط محیط دوره جنینی اثرات عمیقی بر روی تکامل موجود زنده دارد، به گونه ای که استرس در این دوران می تواند تغییرات و اختلالات مهم نوروبیولوژیک، و رفتاری را در دوره بزرگسالی بر جای بگذارد(۲).

در یک مطالعه جانگلینگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثرات غنی سازی زودهنگام پس از تولد را بر تغییرات عملکردی و مورفولوژیکی درازمدت در یک مدل بیماری پارکینسون در موش های صحرایی بالغ مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها تفاوت معنی داری در درصد سلول های باقی مانده بین گروه کنترل و گروه های غنی سازی شده را نشان نداد(۲۹). عدم هم خوانی نتایج مطالعه فوق با پژوهش حاضر می تواند تفاوت در فاصله زمانی تزریق نروتوکسین و مطالعه بافت شناسی باشد. آن ها ۱۰ روز پس از تزریق نوروتوکسین، بافت شناسی را انجام دادند. علی رغم نظر آناستازیا و همکاران، ۲۰۰۹ مبنی بر این که ۸۵ تا ۹۵ درصد نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه ۳ هفته پس از تزریق نوروتوکسین از بین می روند. هم چنین نتایج آنان در مورد آزمون های رفتاری نشان داد غنی سازی محیطی نتوانست از کاهش عملکرد حرکتی رت های پارکینسونی جلوگیری نماید. که با نتایج پژوهش ما هم راستا می باشد.

از دیگر نتایج پژوهش ما حفظ بیشتر عملکرد حرکتی در آزمون ها رفتاری گروه های غنی سازی شده نسبت به گروه های پارکینسونی می باشد. مکانیزم های متعددی ممکن است تغییرات ساختاری و عملکردی در حیوانات غنی سازی شده را تعدیل نماید. به دلیل پیچیدگی اثرات غنی سازی، تعیین آن که کدام یک از جنبه های غنی سازی منجر به تغییرات مورفولوژیکی یا رفتاری می شود مشکل است(۳۰). اگر چه نشان داده شده است که ورزش و تمرینات بدنی ریکاوری و بهبود عملکرد حرکتی را پس از تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین افزایش می دهد.

یکی از فاکتورهای غنی سازی، غنی سازی جسمانی(ورزش) می باشد که علاوه بر تعاملات اجتمایی، محرک های حسی-حرکتی بهتری را ایجاد می کند. که در پژوهش ما فاکتور ورزش اختیاری چرخ دوار در محیط غنی سازی شده لحاظ گریده بود.

نتایج پژوهش به اثرات شرایط غنی سازی شده در حفاظت بهتر تعداد نورون های جسم سیاه اشاره می‌کند و پیشنهاد می نماید شرایط محیطی غنی سازی شده می تواند تا حدودی به عنوان یک عامل سودمند در کاهش دژنره شدن نورون های دوپامینرژیک بیماری پارکینسون و کاهش اثر استرس پریناتال موثر باشد.

مکانیزم محافظت نورونـــی غـــنی سازی محیطی ناشناخته است اما اطلاعات متعدد نشان می دهد که سنتز و آزادسازی عوامل ترافیک(TFS) ممکن است در آن نقش حیاتی داشته باشند.

از جمله وجه تمایز این پژوهش با مطالعات قبلی در این است که در پژوهش حاضر میزان استرس به عنوان یک متغیر با سازه رفتاری مورد مطالعه قرار گرفته است. مشاهدات عینی در مورد وضعیت زندگی حیوانات دارای استرس و بدون استرس حاکی از آن بود که رت های دارای استرس پریناتال رفتار های متناقضی را با سایر گروه ها نشان دادند. به گونه ای که رت های این گروه دائماً در حال درگیری با یکدیگر، اضطراب و بی قراری شدید بودند و ابزار و وسایلی که به منظور غنی سازی محیط در قفس آن ها گذاشته شده بود در طی چند روز اول به طور کامل جویده و تخریب شدند و این در حالی بود که وضعیت های مشاهده شده در گروه غنی سازی بدون استرس پریناتال دیده نشد. بر اساس نتایج حاصل از این مشـــاهدات می توان گـــفت که وضـــعیت استرس زای پریناتال تا چه اندازه می تواند بر روی حالات رفتاری افراد تاثیر گذاشته و اثرات مخربی را بر جای بگذارد.

از آن جـــایی کـــه در پـــژوهش هـــای پیشـــین نوزادان دارای اسـترس پریناتـال جـدا از مـادر پـرورش داده شـده انـد و خـود جـدایی از مـادر یـک عامـل اصلی در ایجاد استرس خواهـد بـود، پـس نمـی تـوان بـه طـور قطعـی نتـایج آن هـا را مربـوط بـا اسـترس پریناتـال دانسـت زیـرا کـه اثـرات اسـترس جـدایی از مـادر بعـد از تولـد بـا اسـترس پریناتـال خلـط شـده اسـت. از نقـاط قـوت مطالعـه حاضـر ایـن اسـت کـه عامـل اسـترس زای جـدایی از مـادر، بـا قـرار دادن نوزاد در کنار مـادر تـا سـه هفتـه بعـد از تولـد کنتـرل شده اسـت و مـی تـوان بـه طـور قطعـی بیـان نمـود که نتایج حاصل منحصـراً بـه دلیـل اسـترس پریناتـال می باشد.

نتایج آزمون های رفـــتار حـــرکتی و شناختی و مطالعات بافت شناسی به دست آمده در این مطالعه به مفید بودن تاثیر شرایط غنی سازی محیطی در کاهش استرس بیماران پارکینسونی به عنوان یک مکمل مناسب و عامل تاثیرگذار در درمان بیماری پارکینسون را تایید می‌نماید.

سپاسگزاری

از همـــکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه های علوم جانوری و بافت شناسی مرکز تحقیقات زکریای رازی واحد علوم تحقیقات تهران که در انجام این تحقیق همـــکاری و زحمات بی دریغی را متحمل شده اند تشـــکر و قدردانی می گردد.

تاییدیه کد اخلاقی:

IR.IAU.SRB.REC.1396.53

References

1.Koolhaas J, Bartolomucci A, Buwalda Bet al. Stress revisited a critical evaluation of the stress concept.Neurosci Biobehav Rev2011;35:1291-301.

2.Brunton PJ, Russell JA. Prenatal soc ial stress in the rat programmes neur oendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex spe-ific effects. J Neuroendocrinol 2010; 22: 258-71. doi: 10.1111/j.1365-2826.

3. Musa V. Lauriston A, William MU, Vivienne A, Effect of exercise on dopamine neuron survival in prenatally stressed Rats. Metab Brain Dis 2010; 24: 525-39. doi: 10.1007/s11011-009-9161-6

4. Agustin A, Luciana T, Gabriel A. de Erausquin, and Daniel H. Masco. Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinsons disease. J Neurochem2009;109:755-65.

doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06001.

5.Jankovic J .Parkinsons disease clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatr 2008; 79: 368-76. doi: 10.1136/jnnp

6. Nutt JG, Wooten GF.N Engl J Med.Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinsons disease2005; 8;353:1021-7doi: 10.1056/NEJMcp043908.

7. Allen NE, Canning CG, Sherrington C, Lord SR, Latt MD, Close JC, Rourke SD, et al. The effects of an exercise program on fall risk factors in

people with Parkinsons disease a randomized controlled trial. 2010;25:1217-25. doi: 10.1002/mds.23082.
8. Dimond PF. No new Parkinsons disease drug expected anytime soon. GEN news highlights GEN Genetic Engineering and Biotechnology, and intelligenceand153/ no new Parkinson disease. Drug Exp Any2010;77.89-93.
9. Hebb DO. The effects of early experience on problem solving at maturity. Am Psychol1947; 2: 306-7. doi: 10.3390/ijms141122258
10. Renner MJ, Rosenzweig MR. Enriched and impoverished environment effects on brain and behavior. Springer 2013. dio: 978-1-4612-4766-1
11. Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerlingleffler J, Ernfors P, Winblad B, et al. Environmental enrich ment and the brain. Prog Brain Res 2002; 138: 109-33. dio: 10.1016/S0079-6123(02)38074-9
12. Favre MR, La Mendola D, Mystre J, Chirstodoulou D, Cochran MJ, Markram H, et al. Predictable enriched environment prevents development of hyper-emotionality in the VPA rat model of autism. Front Neurosci. 2015; 9:33-89. doi: 10.3389/fnins.2015.00127.
13. Woo CC, Leon M. Environmental enrichment as an effective treatment for autism a randomized controlled trial. Behav Neurosci2013; 127: 487-97. dio: 10.1037/a0033010
14. Kondo M, Gray LJ, Pelka GJ, Christodoulou J, Tam PP, Hannan AJ. Environmental enrichment ameliorates a motor coordination deficit in a mouse model of Rett syndrome Mecp2 gene dosage effects and BDNF expression. Eur J Neurosci2008; 27: 3342-50. doi: 10.1111/j.1460-9568.
15. Jadavji NM, Kolb B, Metz GA. Enriched environment improves motor function in intact and unilateral 6-hydroxydopamine dopam inedepleted Rats. Neuroscience2006; 140:1127-38. doi: 10.1016/j.neuroscience.
16. Capecci M, Serpicelli C, Fiorentini L. Postural rehabili tation and kinesio taping for axial postural disorders in Parkin-sons disease. Arc Phys Med Rehabil 2014; 95: 1067-75. doi: 10.1016/j.apmr.2014.01.020
17. Kinney DK, Munir KM, Crowley DJ, Miller AM. Prenatal stress and risk for autism. Neurosci Biobehav Rev 2008;32:1519-32. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.06.004. Epub 2008 Jun 13.
18. Sharief H ,Edward O, Lauriston A. Kellaway V, Vivienne A. Effect of maternal separation on mitochondrial function and role of exercise in a rat model of Parkinsons disease Sharief. Metab Brain Dis2012; 27:387-92. doi 10.1007/s11011-012-9305-y
19. Olanow CW, Tatton WG, .Biology and pathogenesis of Parkinson disease. Annu Rev Neurosci 1999; 22: 123-49. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.123
20. Casas M, Ferre S, Cobos A, Cadafalch J, Grau JM, Jane F. Comparison between apomorphine and amphetamine induced rotational behavioral in rats with a unilateral nigrostriatal pathway. Neuropharmacol 1998, 27; 657-9.
21. Williams RJ, Spencer JP, Riceevans C. Flavonoids antioxidants or signaling molecules. Free Rad Biol Med2004; 7: 838-49. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001
22.Moradganjeh A, Ziai SA, Roghani M. [Protective of Petroselinum hortense Hoffm on experimental model of Parkinsons disease in rats: behavioral and histopathological evidences]. J Vet Clin Res 2011;2203-23. (Persian)
23. Morpurgo C. Effects of antiparkinson drugs on a phenothiazine induced cataonic reaction. Arch Int Pharmacodyn Ther Eur J Neurosci 2003; 18: 1-8.
24. Hove DLA, Steinbusch HW, Scheepens A, Berg WDJ, Kooiman LAM, Boosten BJG, et al. Prenatal stress and neonatal brain development. Neurosciences2006;137:145-55. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.060
25. Weinstock M. The long term behavioural consequences of prenatal stress. Neurosci Biobehav Rev 2008;32:1073-086. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.002
26. Olanow C, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinsons disease. Annu Rev Neurosci1999; 22:123-44. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.123
27. Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric

disorders. Neurobiol Dis2008; 31:159–168. doi: 10.1016/j.nbd.2008.05.001
28. Morleyfletcher S, Rea M, Maccari M, Laviola G. Environmental enrich ment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play beh-aviour and HPA axis reactivity in rats. Eur J Neurosci 2003; 18: 1-8.
29. Jungling A, Reglodi D, Nozomikaradi Z, Horvath G, Farkas J, Gaszner B. A·effects of postnatal enriched environment in a model of Parkinsons disease in adult Rats. Int J Mole Sci2017 ; 18: 406. doi: 10.3390/ijms18020406
30. Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR .Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training .Prog Neurobiol 2004; 72:167-82. doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.03.001

The Effects of Enriched Environment on Substantia nigra Tissue in Parkinson's Disease Rats with Prenatal Stress

Mohammadzamani T[1], Movahedi A[2], ArabAmeri E[3]*

(Received: May 26, 2018 Accepted: September 8, 2018)

Abstract

Introduction: Prenatal stress causes brain alteration and long-term effects on its structure and function. Parkinson's is a progressive neurodegenerative disease and one of the factors driving Parkinson's is the prenatal stress. The use of enrichment environments is a good way to prevent this disease. This survey has been done due to studying the measurement of environmental enrichment effectiveness on Substantia nigra tissue in rats who are suffering from Parkinson's disease and have prenatal stress.

Materials & Methods: A Laboratory research method was used .We divided 48 Wistar male rats who had been affected by prenatal stress and enriched environment, to 8 groups with 6 members; with stress (Control, sham, Parkinson, Parkinson + enrichment) and without stress (Control, sham, Parkinson, Parkinson + enrichment). After eight weeks, we anaesthetized all the rats by the use of Ketamine and Xylasein and then injected 6mg of 6OHDA within %0/9 salt solotion of Ascorbic Acid in to the brains of the rats by Stereotaxic Surgery, and after 3 weeks the signs of Parkinson's disease became confirm by Apomorphin Test. Then we emit brains of the rats from their skulls, and after tissue process, cutting and painting, we calculated the numbers neurons by use of microscope and then the data were analyzed by One-Way ANOVA and Tukey's Post Test.

Findings: The findings showed that environmental enrichment did not completely prevent the destruction of Substantia nigra dopaminergic neurons, but the number of Substantia nigra neurons in the environmental enrichment group was significantly higher than that of the Parkinsonian group of degeneration with neurotoxin.($P \leq 0.001$) Environmental enrichment also prevented the destructive effect of perinatal stress on the reduction of the number of Substantia nigra neurons and behavioral tests.($P < 0.001$)

Discussion & Conclusion: The results show the beneficial effects of enrichment in the protection of the number of more Substantia nigra neurons and suggests that enriched environmental conditions can be used as a beneficial factor in reducing the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease Reducing the effect of prenatal stress is effective.

Keywords: Prenatal stress, Enriched environment, Substantia nigra tissue, Parkinson's diseas

1. Dept of Physical Education and Sport Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Dept of Motor Behavior, Faculty of Physical education, university of Isfahan, Isfahan, Iran
3. Dept of Motor Behavior, Faculty of Physical education, university of Tehran, Tehran, Iran