مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره هفتم، شماره ششم، بهمن ـ اسفند ۹۲
صفحه ۱ الی ۶

مقاله پژوهشی
(Original Article)

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

طوفان صابرنیا[1]، فرزاد رجایی[2*]

## چکیده

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

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۱۸ سر موش صحرایی نژاد ویستار به‌صورت تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم شدند. حیوانات در گروه تحت استرس به مدت ۱۰ روز در معرض استرس‌های مختلف به‌صورت محرومیت غذایی، محرومیت آب، بی‌حرکتی در دمای $4^{\circ}c$، شنای اجباری و ایزوله‌شدن قرار گرفتند، درحالی‌که حیوانات گروه کنترل بدون هیچ اختلالی در قفس‌های خود نگهداری شدند. پس از مدت مورد نظر، حیوانات بیهوش و مغز آنها جدا شد. در ادامه، بعد از فیکساسیون، نمونه‌هایی از قشر فرونتال مغز برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تی صورت گرفت و سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** میانگین تعداد و اندازه سلول‌های بتز در گروه‌های تحت استرس، به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۰۱$). مشاهدات کیفی نیز آثار کروماتولیز اجسام نیسل، متراکم‌شدن هسته و کاهش استطاله‌های نورونی را نشان داد.

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

**کلید واژه‌ها:** استرس؛ سلول‌های هرمی؛ مغز؛ موش صحرایی.

[1]کارشناس ارشد علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

[2]استاد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
فرزاد رجایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
farzadraj@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۷

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۱۱

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

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



www.SID.ir

## مقدمه

هرگونه پاسخ به اثرات عوامل زیان‌آور خارجی و محرک‌ها تحت عنوان آشفتگی روحی یا عاطفی و یا استرس تعریف می‌شود (۱). عوامل استرس‌زا به‌صورت‌های متنوع و در مدت طولانی می‌توانند منجر به بروز استرس شوند (۲). استرس‌های اجتماعی مزمن با تغییر در میزان ترشح نوروترانسمیترها و ساختارهای نورونی، سبب به‌وجود آمدن انواع گوناگونی از اختلالات و بیماری‌ها می‌شوند (۳). استرس‌های متنوع مزمن در موش صحرایی به‌صورت محرومیت غذایی، محرومیت آب، بی‌حرکتی، شنای اجباری و ایزوله‌شدن تعریف می‌گردد (۴). شدت تغییرات فیزیولوژیک تحت تأثیر عوامل استرس‌زا، بستگی به میزان تناوب و طول مدت قرارگیری حیوان در آن موقعیت دارد (۵). استرس می‌تواند یک‌پارچگی فیزیولوژیکی و روانشناختی فرد را مورد تهدید قرارداده و سبب تغییرات روانی رفتاری شود. شواهد آزمایشگاهی نشان داده است استرس سبب تغییرات ساختمانی در شبکه عصبی همچون هیپوکامپ، قشر پره‌فرونتال و آمیگدال می‌شود (۶). انواع گوناگونی از استرس‌های فیزیولوژیک و روانشناختی وجود دارند که بر محور (هیپوتالاموس- هیپوفیز- قشر فوق‌کلیوی)، محور (هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادی)، سیستم سمپاتیک آدرنومدولاری و سیستم عصبی سمپاتیک اثر کرده و سبب تغییرات شگرف در برخی از اعضای بدن می‌شوند (۷). کورتکس پره‌فرونتال داخلی با دخالت در عملکردهای شناختی، در تنظیم پاسخ‌های استرسی نقش دارد (۸). همچنین این ناحیه محلی است که در روند اختلالات افسردگی در پی استرس، درگیر می‌شود و به وضوح نشان داده شده است استرس می‌تواند سبب اختلال در عملکرد کورتکس پره‌فرونتال داخلی در مدل‌های حیوانی شده و سبب تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های بتز کورتکس پره‌فرونتال داخلی شود (۹). عمده نورون‌های قشر مغز از نوع بتز و ستاره‌ای بوده و برحسب قرارگیری این سلول‌ها، قشر مغز دارای ۶ لایه سلولی می‌باشد. لایه هرمی داخلی دارای سلول‌های بسیار بزرگی است که به سلول‌های بتز (Betz) موسوم است (۱۰). مطالعات قبلی نشان داده‌اند استرس مزمن با ایجاد تغییرات مولکولی، مورفولوژیکی و فراساختاری در هیپوکامپ موش صحرایی باعث مشکلات شناختی می‌شود (۱۱).

با توجه به نقش محوری این سلول‌ها در فعالیت‌های حرکتی، و وجود مطالعات اندک در این زمینه، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر انواع متفاوت عوامل استرس‌زا بر شاخص‌های مورفومتریک سلول‌های بتز در لایه هرمی داخلی قشر مغز موش صحرایی نر انجام شد.

## روش بررسی

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

**جدول شماره ۱: عوامل استرس‌زای چندگانه ترتیبی به کار رفته در مطالعه**

| روزها | موارد استفاده‌شده | دوره |
|---|---|---|
| ۱ | شنای اجباری | ۱۰ دقیقه |
| ۲ | محدودیت | ۳ ساعت |
| ۳ | محرومیت آب در دمای ۳°c | ۲۴ ساعت |
| ۴ | محدودیت در دمای ۴°c | ۱/۵ ساعت |
| ۵ | ایزولیشن | ۲۴ ساعت |
| ۶ | محرومیت غذا | ۲۴ ساعت |
| ۷ | محرومیت آب | ۲۴ ساعت |
| ۸ | محدودیت در دمای ۴°c | ۲ ساعت |
| ۹ | محدودیت غذا | ۲۴ ساعت |
| ۱۰ | شنای اجباری | ۱۰ دقیقه |

در این بررسی استرس در زمانهای مختلفی از روز، به‌منظور به حداقل رساندن قابلیت پیش‌بینی‌شدن آن، به حیوانات وارد شد. بی‌حرکتی با قرارگیری در محفظه پلاستیکی لوله‌ای شکلی به ابعاد ۲۱×۶cm انجام شد، به‌طوری‌که حیوانات قادر به حرکت نبودند. شنای اجباری با قراردادن حیوان در مخزن شیشه‌ای با اندازه‌های ۳۰×۳۳×۴۴cm و با عمق ۲۲cm آب در دمای ۲۳±۲°c صورت گرفت. همچنین غذای مناسب و آب کافی در اختیار حیوانات هر دو گروه قرار گرفت. پس از پایان ۱۰ روز موش‌های هر دو گروه با تزریق کتامین ۶۰mg/kg و زایلازین ۶mg/kg بیهوش شدند. سپس مراحل پاساژ بافتی شامل فیکساسیون، آبگیری، شفاف‌سازی

Archive of SID


www.SID.ir

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

$x=\sqrt{a^2+b^2}$

میانگین اندازه سلول‌ها به دست آمد. برای آنالیز داده‌ها از آزمون تی استفاده شد و سطح معنی‌داری $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

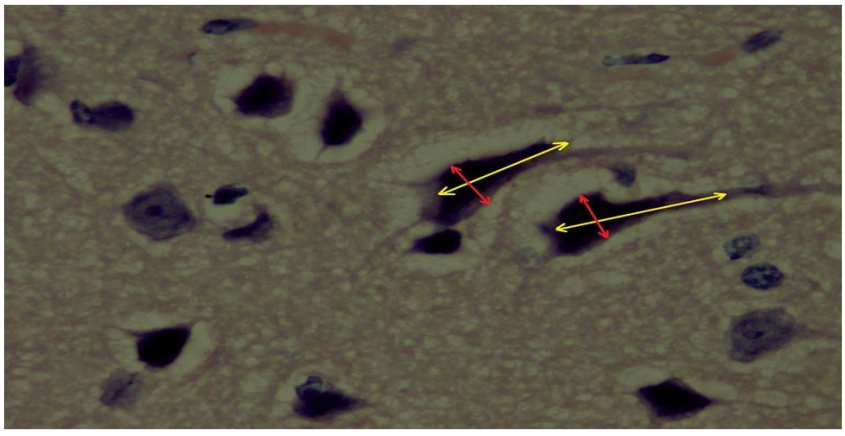
## یافته‌ها

تعداد و اندازه سلول‌های بتز در لایه هرمی داخلی قشر مغز موش صحرایی در گروه‌های تحت استرس در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<0/001$) (جدول شماره ۲). بررسی‌های کیفی نیز نشان‌دهنده آثار کروماتولیز اجسام نیسل، متراکم شدن هسته و کاهش استطاله‌های نورونی بود (شکل).

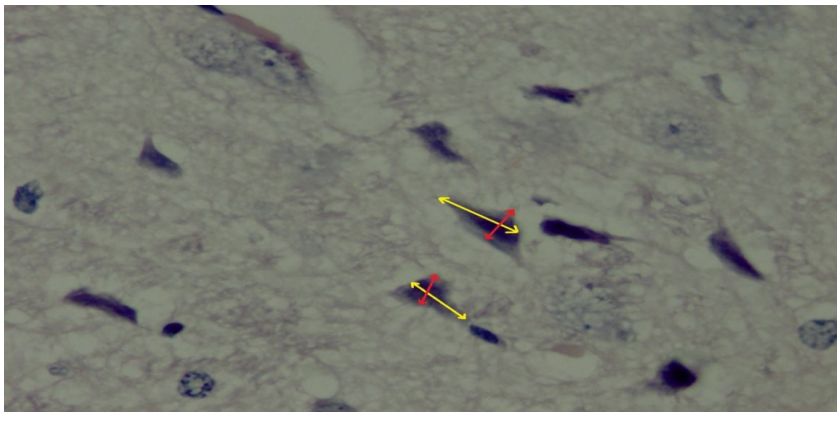
**جدول شماره ۲: اندازه و تعداد سلول‌های بتز لایه داخلی قشر مغز موش**

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

***داده‌ها براساس "انحراف معیار ± میانگین" می‌باشد.**



**(الف)**



**(ب)**

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

fSID



www.SID.ir

## بحث

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

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

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

همچنین Goldwater و همکاران (سال ۲۰۰۹) نشان دادند استرس بی‌حرکتی مزمن، سبب انقباض و جمع شدن دندریت‌های سلول‌های بتز ناحیه اینفرالیمبیک (IL) از کورتکس پره‌فرونتال داخلی رت می‌شود (۱۷). در مطالعه Cook نیز استرس بی‌حرکتی به مدت ۳ هفته در رت‌ها سبب تغییرات معنی‌داری در دندریت‌های رأسی نورون‌های بتز لایه‌های II-III کورتکس پره‌فرونتال داخلی شد، به‌طوری‌که کاهش معنی‌داری در تعداد و طول شاخه‌های دندریتی رأسی این نورون‌ها مشاهده شد (۱۸). در مطالعات دیگر مشخص گردید، استرس شناکردن سبب کاهش معنی‌دار دندریت‌های انتهای رأسی نورون‌های بتز ناحیه اینفرالیمبیک کورتکس پره‌فرونتال داخلی در موش می‌شود و در مقابل، در مورفولوژی نورون‌های پره‌لیمبیک به‌وسیله استرس، تغییری ایجاد نمی‌کند.

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

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

Archive of SID


www.SID.ir

همچنین در تحقیقی دیگر مشاهده گردید دریافت کورتیکواسترون سبب آتروفی نورون‌ها در مناطق CA3 هیپوکامپ و لایه‌های II و III کورتکس پره‌فرونتال شده و دریافت کورتیکواسترون به مدت ۳ هفته در رت‌ها نیز سبب تغییرات دندریتی در آمیگدال و نورون‌های هرمی CA1 هیپوکامپ می‌شود (۲۳). همچنین کاهش اندازه سلول‌های بتز در قشر مغز می‌تواند به دلیل رادیکال‌های آزاد تولیدشده درپی قرارگیری حیوانات در معرض استرس باشد، به‌طوری‌که برخی محققین معتقدند استرس اجتماعی با تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و ترکیب آن با بیلی‌روبین، سبب افزایش بیوپیرین می‌شود. وجود بیوپیرین نیز می‌تواند از نشانه‌های استرس اجتماعی باشد (۲۴). کروماتولیز اجسام نیسل، متراکم شدن هسته و کاهش استطاله‌های نورونی در بررسی‌های کیفی نیز حاکی از آسیب نورون‌ها به‌صورت کاهش اندازه و تعداد نورون‌ها بوده که در بررسی‌های کمّی نشان داده شده است.

## نتیجه‌گیری

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

## References:


1. Selye H. Forty years of stress research: Principal remaining problems and misconceptions. Can Med Assoc J 1976 Jul; 115(1):53-6.

2. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. Eur J Pharmacol 2008 Apr; 583(2-3):174-85.

3. Woolverton WL, Ator NA, Beardsley PM, Carroll ME. Effects of environmental conditions on the psychological wellbeing of primates. Life Sci 1989;44(14):901-17.

4. Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Aquaculture 2001 Jun; 197(1-4):3-24.

5. Chigurupati S, Son TG, Hyun DH, Lathia JD, Mughal MR, Savell J, et al. Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice. J Endocrinol 2008 Nov; 199(2):333-41.

6. Fuchs E, Flugge G, Czeh B. Remodeling of neuronal networks by stress. Front Biosci 2006;11:2746-58.

7. Ishida H, Mitsui K, Nukaya H, Matsumoto K, Tsuji K. Study of active substances involved in skin dysfunction induced by crowding stress. I. Effect of crowding and isolation on some physiological variables, skin function and skin blood perfusion in hairless mice. Biol Pharm Bull 2003 Feb; 26(2):170-81.

8. Perez-Cruz C, Simon M, Flügge G, Fuchs E, Czéh B. Diurnal rhythm and stress regulate dendritic architecture and spine density of pyramidal neurons in the rat infralimbic cortex. Behav Brain Res 2009;205(2):406-13.

9. Shansky RM, Morrison JH. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: Effects of circuit, hormones and rest. Brain Res 2009;1293:108-13.

10. Mescher LA. Junqueira's basic histology. 12th ed. New York: LANGE; 2010. p. 165-67.

11. Reagan LP, Magariños AM, McEwen BS. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. Ann N Y Acad Sci 1999;893:126-37.

12. Marti O, Armario A. Anterior pituitary response to stress: Time related changes and adaptation. Int J Dev Neurosci 1998;16(3-4):241-60.

13. Osada N, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. Characterization of neuronal and astroglial responses to ER stress in the hippocampal CA1 area in mice following transient forebrain ischemia. Neurochem Int 2010 Aug;57(1):1-7.


Archive of SID



www.SID.ir

14. Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. Hippocampus 2006;16:233-8.

15. Lambert KG, Buckelew SK, Staffiso-Sandoz G, Gaffga S, Carpenter W, Fisher J, et al. Activity-stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats. Physiol Behav 1998 Aug; 65(1):43-9.

16. McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: Implications for the pathophysiology of affective disorders. Hum Psychopharmacol 2001 Jan; 16(S1):S7-S19.

17. Goldwater DS, Pavlides C, Hunter RG, Bloss EB, Hof PR, McEwen BS, et al. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. Neuroscience 2009 Dec; 164(2):798-808.

18. Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. J Neurobiol 2004 Aug; 60(2):236-48.

19. Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. J Neurobiol 2004 Aug; 60(2):236-48.

20. Pawluski JL, Valença A, Santos AI, Costa-Nunes JP, Steinbusch HW, Strekalova T. Pregnancy or stress decrease complexity of CA3 pyramidal neurons in the hippocampus of adult female rats. Neuroscience 2012;227:201-10.

21. Liu RJ, Aghajanian GK. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: Role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 jan; 105(1):359-64.

22. McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: Allostasis, allostatic load and the aging process. Neurobiol Aging 2002;23(5):921-39.

23. Morales-Medina JC, Sanchez F, Flores G, Dumont Y. Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus accumbens and amygdala in the rat. J Chem Neuroanat 2009;38(4):266-72.

24. Miyashita T, Yamaguchi T, Motoyama K, Unno K. Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine. Biochem Biophys Res Commun 2006;349:775-80.

Archive of SID


www.SID.ir