

تحقیقی

تأثیر نیتریک اکساید بر کورتکس پره‌فرونتال مغز موش صحرایی بالغ متأثر از استرس بی‌حرکتی

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک‌اکساید مولکول کوچک ناپایداری است که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک بدن نقش دارد. قشر پره‌فرونتال مغز نقش بسیار مهمی در شخصیت و وضعیت روحی دارد و بعد از تولد به تکامل خود ادامه داده و تحت تأثیر عوامل محیطی و جسمی نظیر استرس قرار می‌گیرد. در این تحقیق اثر نیتریک اکساید روی کورتکس پره‌فرونتال مغز موش صحرایی متأثر از استرس مورد بررسی قرار گرفت تا تأثیر هم‌زمان استرس و نیتریک‌اکساید روی تکامل پس از تولد کورتکس پره‌فرونتال موش صحرایی مشخص گردد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۸۰ تا ۱۰۰ گرم انجام شد. ۴۸ موش به دو گروه ۲۴ تایی تحت استرس و فاقد استرس تقسیم‌بندی شدند. هر گروه ۲۴ تایی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. به هر گروه ۶ تایی به مدت ۳۰ روز (یک‌ماه) به ترتیب ماده $L\text{-arginine}$ ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در ۲ سی‌سی نرمال سالین و $L\text{-NAME}$ ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در ۲ سی‌سی نرمال سالین به صورت داخل صفاقی و 7-nitroindazole (25mg/g) به صورت زیرجلدی تزریق شد. پس از یک‌ماه مغز موش‌ها خارج گردید و به دو قسمت شامل نیمه قدامی برای بررسی بافت‌شناسی و نیمه خلفی برای تعیین میزان نیتریک اکساید تقسیم شد. بررسی‌های بافت‌شناسی با تهیه مقاطع سریال ۱۰ میکرونی و رنگ‌آمیزی (H&E) انجام شد. برای تعیین میزان نیتریک‌اکساید، نمونه‌ها هموژنیزه و با محلول Solch مخلوط شده و به وسیله روش اسپکتوفتومتری با طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که ضخامت کورتکس پره‌فرونتال و تعداد سلول‌های بتز و میزان تولید نیتریک‌اکساید به نحو معنی‌داری در موش‌های صحرایی تحت استرس دریافت کننده $L\text{-NAME}$ و 7-nitroindazole در مقایسه با گروه فاقد استرس کاهش یافته است. به نحوی که این دو ماده سبب تشدید آسیب ناشی از استرس می‌گردند و برعکس $L\text{-arginine}$ با تولید نیتریک‌اکساید بیشتر سبب کاهش آسیب ناشی از استرس می‌گردد.

نتیجه‌گیری: استرس از نوع بی‌حرکتی سبب آسیب به کورتکس پره‌فرونتال شده و مهار کننده‌های سنتز نیتریک‌اکساید سبب تشدید آن و پیش‌ساز نیتریک‌اکساید سبب کاهش این آسیب می‌شود و از طرفی در موش‌های بدون استرس $L\text{-NAME}$ ، $L\text{-arginine}$ و 7-nitroindazole همگی باعث آسیب کورتکس پره‌فرونتال خواهند شد.

کلیدواژه‌ها: نیتریک‌اکساید - استرس بی‌حرکتی - کورتکس پره‌فرونتال - ان‌نیتروال

آرژنین متیل استر

دکتر مهدی مهدی‌زاده

دانشیار گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی ایران

دکتر آرزو نهاوندی

استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران

بتول عبادی

کارشناس ارشد علوم تشریحی گروه رادیولوژی

بیمارستان شفا یحیایان تهران

دکتر تابنده شریعتی

استادیار گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی ایران

معصومه فقه‌الاسلام

کارشناس ارشد گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

نویسنده مسؤول: دکتر مهدی مهدی‌زاده

پست الکترونیکی: maranaoo@iums.ac.ir

نشانی: تهران، بزرگراه همت، تقاطع شهید چمران

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران

مرکز علوم پایه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

تلفن: ۸۸۰۵۸۶۸۹-۰۲۱

نمابر ۸۸۰۵۸۷۲۰

وصول مقاله: ۸۵/۵/۲۱

اصلاح نهایی: ۸۵/۹/۲۷

پذیرش مقاله: ۸۵/۱۱/۷

مقدمه

روند تکامل مغز خصوصاً در نواحی قشری پس از تولد بیش از دوران جنینی فعال بوده و بنابراین حضور عوامل مداخله گر در این میان از اهمیت خاصی برخوردار است. عواملی که مانع روند تکاملی قشر مغز می گردند، می توانند از شکل گیری طبیعی مغز جلوگیری به عمل آورند. استرس ها، منجر به القای پدیده Lipid peroxidation Reaction می گردد که این واکنش در نتیجه تولید بیش از حد رادیکال های آزاد رخ می دهد. از جمله آثار بروز این واکنش صدمات ساختمانی (structural) و عملکردی (functional) به غشاء های سلولی می باشد (۱).

قابل ذکر است که مغز به حضور رادیکال های آزاد بسیار حساس است، چرا که مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع که به آسانی پراکسید می گردند، در سلول های مغزی حضور دارند (۵-۲). از طرف دیگر مغز فاقد منابع غنی آنزیم های آنتی اکسیدانت محافظت کننده است (۶). بنابراین وقتی ایسکمی یا هیپوکسی مغزی رخ می دهد، تولید رادیکال های آزاد منجر به صدمات جبران ناپذیری می گردد. از طرفی مشخص شده است که به دنبال ایسکمی ناشی از هیپوکسی در بافت مغزی فعالیت iNOS افزایش می یابد. قابل ذکر است که نه تنها ایسکمی یا هیپوکسی مغزی بلکه طیف وسیعی از استرس های فیزیکی باعث بروز تأثیرات ویژه روی Lipid peroxidation reaction در مغز می گردد (۱۱-۷). برای مثال استرس خاص بی حرکتی منجر به آسیب اکسیداتیو چربی در مغز موش می گردد (۱۰). شواهد کلینیکال نشان می دهد که ارتباط نزدیکی بین اعمال استرس های روانی و افزایش Lipid peroxidation reaction در پلاسما وجود دارد (۱۲). بنابراین، یافته ها نشان می دهد که تحریکات پر از استرس منجر به افزایش تولید رادیکال های آزاد می گردد. یکی از شاخص ترین رادیکال های آزاد در بدن نیتريک اکساید می باشد که یک مولکول کوچک ناپایدار و رادیکال آزاد چربی دوست است که به وسیله سلول های متفاوت پستانداران ساخته می شود و اعمالی از جمله میانجی گری عصبی و اثر سیتوتوکسیک در بدن دارد (۱۳). به علاوه نیتريک اکساید یک وازودیلاتور قوی است که به وسیله اندوتلیوم عروق

عضله صاف از اکسیژن و اسید آمینه L-arginine به کمک آنزیم سنتز کننده نیتريک اکساید (NOS) ساخته می شود. ایزومرهای متعدد این آنزیم شامل تیپ I یا eNOS، تیپ II یا iNOS، تیپ III یا eNOS هستند. تعدادی از مواد آنالوگ L-arginin نظیر L-NAME و 7-nitroindazole هر دو نوع ایزومر ساختمانی و القایی را مهار می کنند (۱۴ و ۱۵). به دنبال ایسکمی ناشی از هیپوکسی در بافت مغزی فعالیت iNOS افزایش می یابد و در این شرایط زمانی که مقادیر بالایی از نیتريک اکساید به وسیله NOS نوع دو ساخته شده و مقادیر بین سلولی آنیون سوپراکسیداز (O_2^-) نیز در محیط زیاد است، نیتريک اکساید قادر است با سوپراکسیدها واکنش دهد تا پروکسی نیتريت و متعاقباً رادیکال هیدروکسیل که هر دو از خود نیتريک اکساید سمی تر هستند را تولید نماید و با بیماری های تخریب کننده اعصاب و آسیب های غشاء های نورونی ارتباط تنگاتنگی دارد (۲ و ۲۰-۱۶) و از طرفی مانع فعالیت عامل رشد عصب می شود (۲۱). علت بررسی ناحیه پره فرونتال نقشی است که این کورتکس در کنترل رفتار، قضاوت، آینده نگری و نهایتاً شخصیت ایفا می کند. وجود بسیاری از استرس های دوران قبل از بلوغ می تواند با آسیب این ناحیه سبب اختلالات متفاوت شخصیتی گردد. در این تحقیق اثر نیتريک اکساید روی کورتکس پره فرونتال مغز موش صحرایی متأثر از استرس مورد بررسی قرار گرفت تا تأثیر هم زمان استرس و نیتريک اکساید روی تکامل پس از تولد کورتکس پره فرونتال موش صحرایی مشخص گردد.

روش بررسی

در این پژوهش تجربی از تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد wistar استفاده شد. موش ها یک ماهه و دارای وزن تقریبی ۸۰-۱۰۰ گرم بودند. شرایط نگهداری حیوانات در حیوان خانه در دمای ۲۷-۲۳ درجه سانتی گراد و دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. رژیم غذایی همانند سایر موش ها و محدودیتی وجود نداشت. دوره انجام آزمایش روی حیوانات یک ماه بود.

L-arginine با دوز ۲۰۰ mg/kg (sigma) (۱۹ و ۲۶) حل شده در ۲ میلی لیتر نرمال سالین، یک روز در میان به صورت داخل صفاقی به موش های صحرایی تزریق گردید.

میکروتوم روتاری و رنگ آمیزی لام‌های تهیه شده به روش H8E، ارزیابی‌های مورفومتری به کمک دو نوع عدسی مشبک و خطی انجام گرفت. با توجه به این که مقاطع به دست آمده از مغز موش‌ها به صورت سریال روی لام‌ها قرار داده شد و از هر موش در حدود ۳۰ لام ۱۰ سریالی تهیه گردید، برای شمارش از هر نمونه ۱۵ لام انتخاب گردید و مقاطع به صورت یک در میان شمارش شد. به این ترتیب که به کمک عدسی مشبک تعداد سلول‌های بتز کورتکس در سطح مقطع ۱۰×۱۰ در میدان دید میکروسکوپ شمارش گردید و به کمک عدسی خطی ضخامت کورتکس در واحد میکرون اندازه گرفته شد. اندازه‌گیری‌ها در بزرگ‌نمایی عدسی ۱۰× و ۴۰× انجام گردید.

با توجه به این که نیتریک اکساید یک رادیکال آزاد چربی دوست بوده و به راحتی قادر است از غشاءهای سلولی عبور نماید (۱۳)، بنابراین می‌توان فرض کرد که نیتریک اکساید در سرتاسر بافت مغزی وجود دارد، ولی با توجه به این که نیتریک اکساید در بدن یک مولکول ناپایدار است و بلافاصله به ترکیبات پایدار نظیر نیتريت و نترات تبدیل می‌شود (۱۳ و ۲۲)، به منظور تعیین میزان نیتریک اکساید می‌توان میزان نیتريت موجود در بافت مغزی را اندازه‌گیری نمود. در این مطالعه ابتدا محلول Solch را با مخلوط نمودن کلروفورم و متانول به نسبت ۲ به ۱ تهیه نمودیم و سپس بافت جداشده از نیمه خلفی مغز را داخل ۵ سی‌سی محلول Solch و ۲ سی‌سی آب مقطر هموژنیزه نموده، پس از آن داخل فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم و بعد از یک ساعت به کمک سانتریفوژ با دور ۱۱۰۰۰ شیره آن را استخراج کرده و با کمک Griess Reagent در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر میزان نیتريت آن را اندازه‌گیری کردیم. سپس نتایج حاصله را روی منحنی استاندارد که نمایانگر غلظت نیتريت و میزان جذب نوری است، بردیم. این منحنی از تعیین میزان جذب نور محلول‌های ۱ مولار، ۲ مولار، ۳ مولار و ۴ مولار نیتريت سدیم به دست آمد.

تمام داده‌های اندازه‌گیری شده ابتدا توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل واریانس قرار گرفت، سپس میانگین‌ها به روش Post Test (Newman Kwals) در سطح احتمال

L-NAME با دوز ۲۰ mg/kg حل شده در ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین، ۲ روز در هفته به صورت داخل صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق گردید.

7-nitroindazole با دوز ۲۵ mg/kg که با ۶-۷ قطره Tween 80 به علاوه ۴-۳ میلی‌لیتر اتانول داغ حل می‌گردید، هم‌زمان با حرارت دادن به صورت زیرجلدی ۲ روز در هفته تزریق شد.

تعداد ۴۸ سر موش به دو گروه تحت استرس و فاقد استرس تقسیم شدند. سپس هر گروه به ۴ گروه که هر کدام دارای ۶ سر موش صحرایی بودند، تقسیم گشته و تحت تزریق مواد ذکر شده در بالا قرار گرفتند.

گروه‌ها شامل: گروه کنترل ۱ (دریافت کننده ۲ سی‌سی نرمال سالین تحت استرس)، گروه کنترل ۲ (دریافت کننده ۲ سی‌سی نرمال سالین فاقد استرس)، گروه تجربی A1 (دریافت کننده ۲۰۰ mg/kg L-arginine تحت استرس)، گروه تجربی A2 (دریافت کننده ۲۰۰ mg/kg L-arginine فاقد استرس)، گروه تجربی B1 (دریافت کننده ۲۰ mg/kg L-NAME تحت استرس)، گروه تجربی B2 (دریافت کننده ۲۰ mg/kg L-NAME فاقد استرس)، گروه تجربی C1 (دریافت کننده ۲۵ mg/kg 7-nitroindazole تحت استرس) و گروه تجربی C2 (دریافت کننده ۲۵ mg/kg 7-nitroindazole فاقد استرس) بودند.

نحوه اعمال استرس عبارت بود از بی حرکت نگه داشتن موش‌های صحرایی به مدت ۶ ساعت در طول روز از ساعت ۸ صبح الی ۲ بعدازظهر که برای این منظور از وسایل خاصی به نام wirewarp (توری‌های مشبک فلزی فیکس شده روی قطعات چوبی)، استفاده شد.

پس از طی ۳۰ روز دوره آزمایش، موش‌ها با استفاده از ۹۰ mg/kg xylozine و ۱۰ mg/kg Ketamine تحت بیهوشی عمومی قرار گرفتند و عمل decapitation روی آنها انجام و طی یک عمل جراحی، مغز خارج و با یک برش کروئال از محل شیار مرکزی به دو نیمه تقسیم شد. سپس نیمه قدامی مغز که شامل کورتکس پره‌فرونتال نیز می‌باشد، جدا شده و برای بررسی‌های هیستولوژیک تحت عملیات آماده‌سازی بافت قرار گرفت. پس از تهیه مقاطع سریال ۱۰ میکرونی به کمک

جدول ۱: مقایسه میانگین ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه های بدون استرس و با استرس

گروه بدون استرس				گروه تحت استرس			
کنترل ۲	A2	B2	C2	کنترل ۱	A1	B1	C1
۱۲۴۹±۱۹	۹۳۱±۱۲	۷۴۳±۱۱	۸۵۰±۶/۷	۵۶۷±۷/۵	۸۱۵±۲۰	۶۴۹±۱۵	۶۴۹±۱۵
۲۲۲±۵/۵	۲۸۱±۱۰	۱۶۱±۴	۱۹۷±۷/۵	۱۲۲±۴/۵	۲۱۴±۴	۱۲۱±۱۹	۱۲۱±۱۹

آمده از گروه کنترل ۱ در مقایسه با گروه تجربی A1 مشاهده می شود که گروه A1 دارای افزایش در ضخامت کورتکس پره فرونتال است، اما این افزایش از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد.

جدول ۲: مقایسه میانگین ضخامت کورتکس پره فرونتال و تعداد سلول های بتز در گروه های بدون استرس

ضخامت کورتکس (II) و تعداد سلول های بتز		
کنترل ۲	a	b
تجربی A2	b	a
تجربی B2	c	C
تجربی C2	b	C

در هر ستون میانگین هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند، فاقد تفاوت آماری در سطح احتمال $P < 0.05$ می باشد.

تصاویر ۸-۱ نشانگر کاهش ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه های تحت استرس نسبت به گروه های فاقد استرس می باشد. تصاویر ۱ و ۲ نشان دهنده کاهش ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه کنترل ۱ نسبت به گروه کنترل ۲ است. تصاویر ۳ و ۴ نشان دهنده کاهش ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه تجربی A1 نسبت به گروه تجربی A2 است. تصاویر ۵ و ۶ نشان دهنده کاهش ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه تجربی B1 نسبت به گروه تجربی B2 است. تصاویر ۷ و ۸ نشان دهنده کاهش ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه تجربی C1 نسبت به گروه تجربی C2 است. تصاویر ۹ و ۱۰ نشان دهنده کاهش ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه تجربی B1 نسبت به گروه تجربی B2 است.

(B) بررسی شمارش تعداد سلول های بتز در کورتکس پره فرونتال

در بررسی دو بدو بین گروه های تحت استرس و فاقد استرس دریافت کننده نرمال سالین، L-NAME، L-arginine

$P < 0.05$ مقایسه شد.

یافته ها

نتایج حاصله از آزمایش ها از سه دیدگاه (A) بررسی ضخامت کورتکس پره فرونتال، (B) شمارش سلول های بتز در کورتکس مغز و (C) بررسی کیفی میزان نیتريك اكسايده تولیدی در بافت مغز، مورد بررسی قرار گرفت.

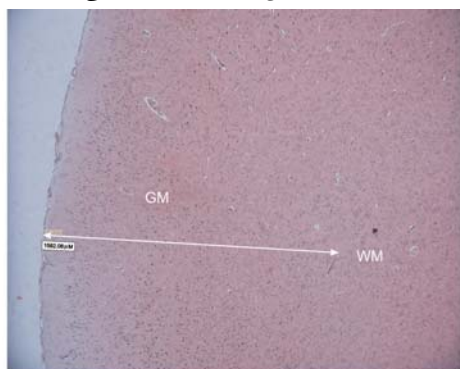
(A) بررسی ضخامت کورتکس پره فرونتال

در بررسی دو بدو بین گروه های تحت استرس و فاقد استرس دریافت کننده نرمال سالین، L-NAME، L-arginine و 7-nitroindazole مطابق جدول یک مشخص گردید که در تمامی گروه های مورد آزمایش، ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه های تحت استرس کاهش معنی داری در حد $P < 0.05$ نسبت به گروه های فاقد استرس داشته است.

مقایسه میانگین ضخامت کورتکس پره فرونتال در بین گروه های فاقد استرس نسبت به یکدیگر مطابق جدول ۲ نشان دهنده کاهش معنی دار ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه های تجربی C2 و B2 به ترتیب با میانگین های $۸۵۰ \pm ۶/۷$ و ۷۴۳ ± ۱۱ میکرون در مقایسه با گروه کنترل ۲ با میانگین ۱۲۴۹ ± ۱۹ میکرون می باشد. از طرفی مقایسه میانگین ضخامت کورتکس پره فرونتال بین دو گروه تجربی A2 و C2 اختلاف معنی داری را ذکر نمی کند.

مقایسه میانگین ضخامت کورتکس پره فرونتال در بین گروه های تحت استرس نسبت به یکدیگر مطابق جدول ۳ نشان دهنده کاهش معنی دار ضخامت کورتکس پره فرونتال در گروه های تجربی C1 و B1 به ترتیب با میانگین های $۵۶۷ \pm ۷/۵$ و ۶۴۹ ± ۱۵ میکرون در مقایسه با گروه کنترل ۱ با میانگین ۷۶۰ ± ۱۴ میکرون و گروه تجربی A1 با میانگین ۸۱۵ ± ۲۰ میکرون می باشد. در بررسی میانگین های به دست

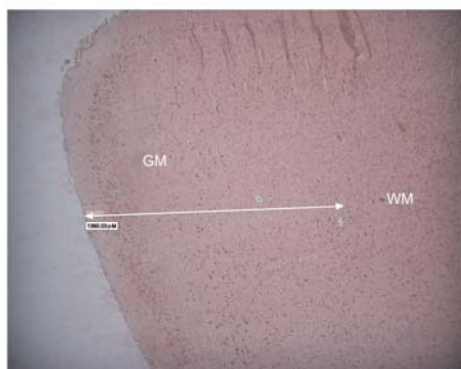
مقایسه میانگین تعداد سلول‌های بتز در بین گروه‌های فاقد استرس نسبت به یکدیگر مطابق جدول ۲، نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌ها در گروه تجربی A2 با میانگین 281 ± 10 عدد در مقایسه با گروه کنترل ۲ با میانگین $222 \pm 5/5$ عدد می‌باشد. همچنین مقایسه میانگین تعداد سلول‌ها بین دو گروه تجربی C2 و B2 از طرفی و دو گروه کنترل ۲ و تجربی A2 از طرف دیگر، نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌ها در گروه B2 با میانگین 161 ± 4 عدد سلول و گروه C2 با میانگین $197 \pm 7/5$ عدد می‌باشد.



تصویر ۳: برش کروئال کورتکس پره‌فرونتال رت گروه تجربی A2

بزرگنمایی ۱۰۰، رنگ آمیزی H&E

GM: gray matter, WM: white matter



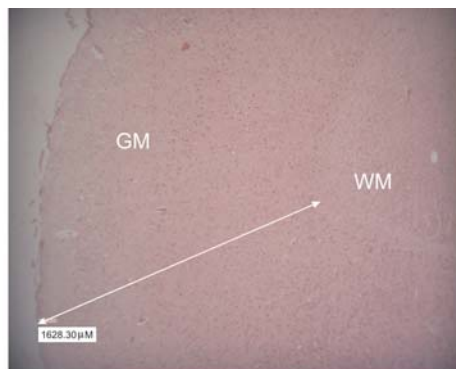
تصویر ۴: برش کروئال کورتکس پره‌فرونتال رت گروه تجربی A1

بزرگنمایی ۱۰۰، رنگ آمیزی H&E

GM: gray matter, WM: white matter

مقایسه میانگین تعداد سلول‌های بتز کورتکس در بین گروه‌های تحت استرس نسبت به یکدیگر مطابق جدول ۳ نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌ها در گروه‌های C1 و B1 به ترتیب با میانگین‌های $122 \pm 4/5$ عدد و 121 ± 19 عدد سلول در مقایسه با گروه‌های A1 و کنترل ۱ به ترتیب با

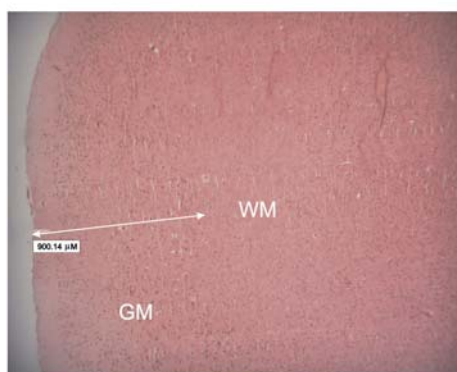
و 7-nitroindazole مطابق جدول ۱، مشخص گردید که در تمامی گروه‌های مورد آزمایش، تعداد سلول‌های بتز کورتکس در گروه‌های تحت استرس کاهش معنی‌داری در حد $P < 0/05$ نسبت به گروه‌های فاقد استرس داشته است.



تصویر ۱: برش کروئال کورتکس پره‌فرونتال رت گروه کنترل ۲

بزرگنمایی ۱۰۰، رنگ آمیزی H&E

GM: gray matter, WM: white matter



تصویر ۲: برش کروئال کورتکس پره‌فرونتال رت گروه کنترل ۱

بزرگنمایی ۱۰۰، رنگ آمیزی H&E

GM: gray matter, WM: white matter

جدول ۳: مقایسه میانگین ضخامت کورتکس پره‌فرونتال

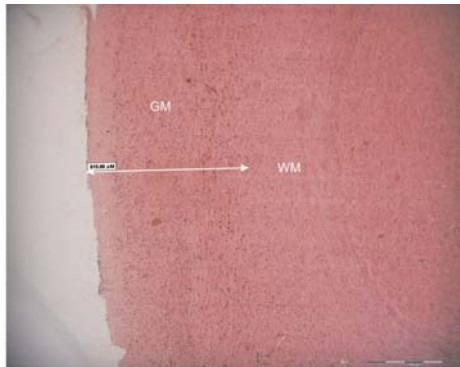
و تعداد سلول‌های بتز در گروه‌های تحت استرس

تعداد سلول‌های بتز	ضخامت کورتکس (μ)	
۲۴۳±۲۲	^a ۷۶۰±۱۴	کنترل ۱
۲۱۴±۴	^a ۸۱۵±۲۰	تجربی A1
۱۲۱±۱۹	^b ۶۴۹±۱۵	تجربی B1
۱۲۲±۴/۵	^c ۵۶۷±۷/۵	تجربی C1

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند،

فاقد تفاوت آماری در سطح احتمال $P < 0/05$ می‌باشند.

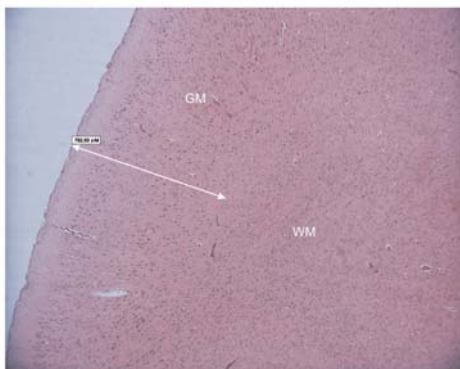
کننده مهارکننده نیتریک اکساید، در مقایسه با گروه‌های کنترل میزان نیتريت کمتری دارند و گروهی که L-arginine دریافت کرده است، میزان بالاتری از نیتريت را نشان می‌دهد.



تصویر ۷: برش کروئال کورتکس پره فرونتال رت گروه تجربی B2

بزرگنمایی ۱۰۰، رنگ آمیزی H&E

GM:gray matter, WM: white matte



تصویر ۸: برش کروئال کورتکس پره فرونتال رت گروه تجربی B1

بزرگنمایی ۱۰۰، رنگ آمیزی H&E

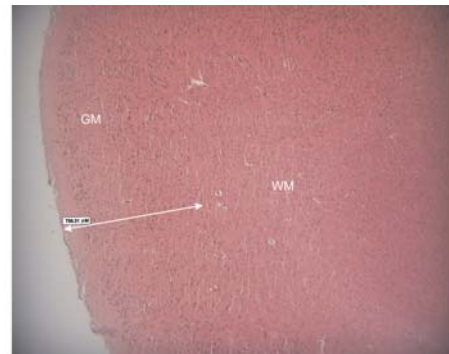
GM:gray matter, WM: white matte

بحث

در این بررسی مطالعات میکروسکوپی نشان داد که ضخامت کورتکس پره فرونتال و تعداد سلول‌های بتز و میزان تولید نیتریک اکساید در موش‌های صحرایی تحت استرس دریافت کننده L-NAME و 7-nitroindazole در مقایسه با گروه فاقد استرس به نحو معنی‌داری کاهش می‌یابد.

براساس مطالعات انجام شده پیشین در روند تمایز و تکامل مغز بیشترین و مهم‌ترین تغییرات در نئوکورتکس رخ می‌دهد. همچنین در نئوکورتکس بارزترین تغییرات در قشر پره فرونتال به وقوع می‌پیوندد که نقش اساسی در تفکر، تعیین شخصیت، قضاوت و تمرکز دارد (۲۳ و ۲۴). روند تکاملی مغز در انسان بنا به گفته برخی پژوهشگران تا ۱۰ سالگی و حتی تا ۱۴

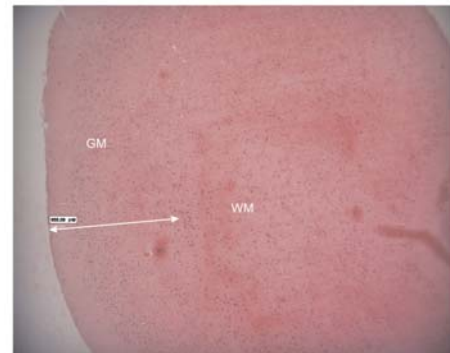
میانگین‌های 214 ± 4 عدد و 243 ± 22 عدد سلول می‌باشد، ولی مقایسه میانگین‌های به دست آمده از دو گروه A1 و کنترل ۱ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را ذکر نمی‌کند.



تصویر ۵: برش کروئال کورتکس پره فرونتال رت گروه تجربی C2

بزرگنمایی ۱۰۰، رنگ آمیزی H&E

GM:gray matter, WM: white matte



تصویر ۶: برش کروئال کورتکس پره فرونتال رت گروه تجربی C1

بزرگنمایی ۱۰۰، رنگ آمیزی H&E

GM:gray matter, WM: white matte

جدول ۴: نشان‌دهنده میانگین غلظت نیتريت

در گروه‌های مورد آزمایش

گروه	بدون استرس بر حسب مول	با استرس بر حسب مول
نرمال سالین	۲/۶۵	۲/۳۵
L-arginine	۳/۶	۲/۷۵
L-NAME	۲/۲	۱/۹
7-nitroindazole	۲	۱/۵

C) تعیین کیفی میزان تولید نیتریک اکساید به وسیله اندازه‌گیری میزان نیتريت بافت

مطابق جدول ۴ میزان تولید نیتريت در تمامی گروه‌هایی که استرس دریافت نموده‌اند، نسبت به گروه‌های فاقد استرس کاهش یافته است و این در حالی است که گروه‌های دریافت

سالگی ادامه دارد (۲۳ و ۲۴)، که معادل آسیب‌پذیرترین دوره نسبت به اختلالات و فشارهای بیرونی است و می‌تواند باعث ایجاد اختلال در روند تکاملی مغز و کورتکس پره‌فرونتال گردد.

یکی از اختلالات روانی منشاء گرفته از قشر پره‌فرونتال بیماری اسکیزوفرنی است و مشخص گردیده، نیتریک اکساید در پاتوژنز آن نقش بارزی دارد. به این صورت که نیتریک اکساید به عنوان پیامبر ثانویه گیرنده ان‌متیل‌دی‌اسپاراتات در بدن عمل نموده و با هر دو سیستم دوپامینرژیک و سروتینرژیک به خوبی وارد عمل می‌شود (۲۵). بنابراین می‌توان استنباط کرد که نیتریک اکساید در پاتوژنز سایکوزهای اندوژن با منشاء قشر پره‌فرونتال، موثر است.

در مورد موش صحرایی نژاد wistar زمان تکامل کورتکس مغز تا ۲ ماهگی می‌باشد (۲۶). در خلال این مدت از یک‌ماهگی تا ۲ ماهگی موش‌های مطالعه حاضر، تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند. در مورد ارتباط نیتریک اکساید و استرس و کورتکس پره‌فرونتال می‌توان گفت که اثرات نیتریک اکساید وابسته به دوز می‌باشد، بدین ترتیب که در دوز طبیعی به عنوان یک ماده synaptogene عمل نموده و باعث رشد زوائد سلول‌های عصبی می‌گردد و از آنجا که برقراری ارتباط با محیط و سلول‌های مجاور برای سلول جنبه حیاتی دارد، باعث ابقای حیات سلول و رشد سلول و ایجاد زوائد سلولی تازه برای سلول می‌گردد (۲۱ و ۲۳). این ماده در دوز بالاتر از حد طبیعی به عنوان یک ماده سمی عمل نموده و از طریق تداخل عمل با اکسیژن منجر به تشکیل Peroxynitrate می‌گردد و این ماده نیز از سیر عملکردی NGF ممانعت به عمل می‌آورد، حال آن که NGF در مغز مسؤول حفظ عملکرد استیل‌کولین، حفظ اندازه و تعداد سلول و حفظ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است. هرگونه اختلال عمل در مسیر عملکردی NGF با بیماری‌های نورودژنراتیو و آسیب غشاء‌های نورونی و اختلال در تنظیم و تعداد سلول‌ها همراه است (۲۴). از طرفی نیتریک اکساید تولید شده به وسیله iNOS در سلول‌های گلیال یا nNOS می‌تواند در بوقوع پیوستن فرایند دژنره شدن نرون‌ها نقش کلیدی داشته باشد (۲۷). نیتریک اکساید در دوز کمتر از حد طبیعی نیز باعث

محروم شدن سلول‌ها از نقش سیناپتوژنز آن گردیده و لذا سلول‌ها قادر به برقراری ارتباط لازم و کافی با سلول‌های دیگر و محیط نخواهند بود و بدین ترتیب از رسیدن به رشد استاندارد و اندازه و تعداد لازم محروم می‌گردند (۱۳). بنابر آنچه گفته شد نیتریک اکساید تولیدی در سلول‌های کورتکس مغز با دوز طبیعی با افزایش سیناپس‌های سلولی و ابقای سلولی و تمدید رشد منجر به افزایش تعداد زوائد سلولی شده و در نتیجه افزایش ضخامت کورتکس را به همراه خواهد داشت. در حالی که در صورت اعمال استرس چه از نوع اکسیداتیو و یا از نوع سایکولوژیک که واکنش Lipid peroxidation را به همراه دارد، با تولید رادیکال‌های آزاد فراوان از جمله نیتریک اکساید، باعث افزایش نیتریک اکساید بیش از حد طبیعی شده و با ممانعت از سیر عملکردی NGF باعث کاستن از اندازه و تعداد سلول‌های عصبی شده و در مجموع با کاهش ضخامت کورتکس همراه بود. همچنین در صورت استفاده از مهارکننده‌های تولید نیتریک اکساید نظیر L-NAME و 7-nitroindazole که با کاستن از میزان نیتریک اکساید منجر به کاهش تعداد سلول‌ها و ارتباطات سلول‌ها می‌شوند، کاهش ضخامت کورتکس را سبب می‌گردند (۳۱-۲۸). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که انواع استرس‌ها چه از نوع سایکولوژیک و چه از نوع اکسیداتیو موجب کاهش بارز دندریت‌های سلول‌های کورتکس مغز می‌گردد و سلول‌های بتز نیز در این میان با کاهش دندریت‌های سلولی مواجه هستند. این کاهش به صورت کاهش در طول و میزان انشعابات و شاخه‌شاخه شدن انشعابات جلوه می‌کند (۳۱). از آنجا که می‌دانیم حیات یک سلول به ارتباطات آن بستگی دارد، لذا حذف و یا کاهش این ارتباطات باعث نارسایی و اختلال عمل سلول عصبی و در نهایت سبب مرگ آن می‌گردد. لذا کاهش ضخامت کورتکس با کاهش در میزان سلول‌های کورتیکال از جمله سلول‌های بتز قابل توجیه است (۲۸ و ۲۹).

به طور کلی علل کاهش ضخامت کورتکس پره‌فرونتال در گروه‌های تحت استرس نسبت به گروه‌های بدون استرس با توجه به مطالب ذکر شده در دو مورد ذیل خلاصه می‌گردد:

الف) تأثیر استرس بر افزایش نیتریک اکساید و اختلال

عملکردی NGF

ب) کاهش سلول‌های عصبی به خصوص در گروه سلول‌های عصبی بتز در توجیه سایر نتایج به دست آمده، بایستی گفت در گروهی که به همراه استرس به طور مزمن L-arginine را به عنوان یک ماده پیش ساز نیتريک اكساييد دریافت کرده‌اند، کاهش ضخامت كورتكس و کاهش در تعداد سلول‌ها در مقایسه با سایر گروه‌های تحت استرس تا حدودی جبران شده است و البته این جبران سبب ایجاد اختلاف معنی‌داری نگردیده است. در توجیه این مطلب می‌توان این گونه تصور کرد که احتمالاً نیاز به دوز بالاتری از L-arginine بوده و یا شاید افزایش تعداد نمونه‌ها بتواند کمک به معنی دار شدن این اختلاف نماید.

در گروه‌های تحت استرسی که L-NAME و یا 7-nitroindazole را دریافت کرده‌اند، میزان ضخامت كورتكس و نیز تعداد سلول‌ها از گروه تحت استرس دریافت کننده نرمال سالین و L-arginine کمتر بود. این نشان‌دهنده نقش تخریبی كمبود نیتريک اكساييد به عنوان یک نوروترانسمیتر در شرایط استرس‌زا می‌باشد. مطلب مهمی که باید در مورد آن صحبت کرد، کاهش ضخامت لایه كورتكس پره فرونتال در نمونه‌های بدون استرس است که L-arginine دریافت کرده‌اند. در واقع علت این کاهش را می‌توان آسیب بافتی ناشی از تولید بیش از حد نیتريک اكساييد و متابولیت ناشی از آن یعنی پراكسی نیترات دانست. مطلب جالب توجه دیگر در این مورد افزایش سلول‌های بتز در گروهی است که تحت استرس نبوده و L-arginine دریافت کرده‌اند. برای توجیه این مطلب این گونه می‌توان بیان نمود که براساس یافته‌ها و مطالعات قبلی، در صورت آسیب به كورتكس تجمع سلول‌های بتز در اطراف ضایعه دیده می‌شود. به عبارت دیگر در شرایطی که موش تحت استرس نمی‌باشد، حضور L-arginine تزریقی سبب افزایش مقادیر نیتريک اكساييد شده و بنابراین خود با تولید آنیون پراكسی نیترات سبب آسیب اكسیداتیو می‌گردد (۳۰ و ۳۱). همین آسیب

اكسیداتیو می‌تواند عامل افزایش سلول‌های بتز در شمارش نوروئی انجام شده باشد.

در گروه تحت استرس دریافت کننده L-arginine تعداد سلول‌ها نسبت به گروه دریافت کننده نرمال سالین تحت استرس اختلاف معنی‌داری را ذکر نمی‌کند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، استرس سبب کاهش ضخامت كورتكس و تعداد سلول‌های بتز گردید. از طرفی، تزریق L-arginine در موش‌های بدون استرس سبب آسیب به كورتكس شد که به دلیل افزایش شدید رادیکال آزاد نیتريک اكساييد در این موارد بود و در کنار آن حضور L-NAME و 7-nitroindazole نیز باعث بروز این تغییرات به صورت کاهش ضخامت و نیز کاهش در تعداد سلول‌ها گردید که به دلیل کاهش سطح نیتريک اكساييد به میزان کمتر از حد فیزیولوژیک بود. از طرفی در حضور استرس، به دنبال دریافت L-arginine کاهش ضخامت كورتكس جبران می‌شود و در همین شرایط به کار بردن L-NAME و 7-nitroindazole سبب تشدید آسیب به صورت تأثیر بر ضخامت و تعداد سلول‌ها گردید. در این شرایط مقدار نیتريک اكساييد تولید شده در بافت مغز بسیار کمتر از گروه کنترل است (۲/۳۵ مول به نسبت ۱/۵ مول) و همین عامل باعث می‌شود که آثار مخرب استرس بر كورتكس بیشتر اعمال گردد.

در شرایط فیزیولوژیک (بدون استرس) استفاده از L-arginine نه تنها نقش حفاظتی نداشته، بلکه آثار تخریبی خود را به نحوی که قبلاً ذکر شد، نشان می‌دهد. بنابراین افزایش نیتريک اكساييد در شرایط استرس‌زا روی كورتكس مغز نقش حفاظتی داشته و در شرایط فیزیولوژیک افزایش سطح آن دارای آثار مخرب می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مراتب تقدیر خود را از بخش علوم اعصاب گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، ابراز می‌دارند.

References

- 1) Halliwell B. *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J Neurochem. 1992;59(5):1609-23.
- 2) Beckman JS. *The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury*. J Dev Physiol. 1991;15(1):53-9.
- 3) Cini M, Fariello RG, Bianchetti A, Moretti A. *Studies on lipid peroxidation in the rat brain*. Neurochem Res. 1994;19(3):283-8.
- 4) DeLeo JA, Floyd RA, Carney JM. *Increased in vitro lipid peroxidation of gerbil cerebral cortex as compared with rat*. Neurosci Lett. 1986;67(1):63-7.
- 5) Eldjarn L and Pihl A. Mechanisms of protective and sensitizing action. In: Mechanisms in radiobiology. Errara M, Forssberg A. New York. Academic Press. 1960; 231-296.
- 6) Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PA, Meister A. *Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(5):1913-7.
- 7) Guliaeva NV, Dupin AM, Levshina IP, Obidin AB, Boldyrev AA. *Carnosine prevents the activation of free-radical lipid oxidation during stress*. Biull Eksp Biol Med. 1989; 107(2):144-7.
- 8) Kovacs P, Juranek I, Stankovicova T, Svec P. *Lipid peroxidation during acute stress*. Pharmazie. 1996;51(1):51-3.
- 9) Kulak W, Sobaniec W, Sobaniec-Lotowska M. *Inhibition of lipid peroxidation in rat brain by nifedipine and clorazepate after electrically induced seizures*. Mater Med Pol. 1993;25(1):33-5.
- 10) Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. *Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats*. FASEB J. 1996;10(13):1532-8.
- 11) Shaheen AA, Abd El-Fattah A, Gad MZ. *Effect of various stressors on the level of lipid peroxide, antioxidants and Na⁺, K(+) -ATPase activity in rat brain*. Experientia. 1996;52(4):336-9.
- 12) Scarpellini F, Sbracia M, Scarpellini L. *Psychological stress and lipoperoxidation in miscarriage*. Ann N Y Acad Sci. 1994;709:210-3.
- 13) Knowles RG, Moncada S. *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J. 1994;298 (Pt 2): 49-58.
- 14) Voelker CA, Miller MJ, Zhang XJ, Eloby-Childress S, Clark DA, Pierce MR. *Perinatal nitric oxide synthase inhibition retards neonatal growth by inducing hypertrophic pyloric stenosis in rats*. Pediatr Res. 1995;38(5):768-74.
- 15) Pierce RL, Pierce MR, Liu H, Kadowitz PJ, Miller MJ. *Limb reduction defects after prenatal inhibition of nitric oxide synthase in rats*. Pediatr Res. 1995;38(6):905-11.
- 16) Snyder SH, Bredt DS. *Biological roles of nitric oxide*. Sci Am. 1992;266(5):68-71, 74-7.
- 17) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(4):1620-4.
- 18) Terada LS, Willingham IR, Rosandich ME, Leff JA, Kindt GW, Repine JE. *Generation of superoxide anion by brain endothelial cell xanthine oxidase*. J Cell Physiol. 1991;148(2):191-6.
- 19) Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. *Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex*. Neurobiol Aging. 2004;25(4):547-52.
- 20) Buldanlioglu S, Turkmen S, Ayabakan HB, Yenice N, Vardar M, Dogan S, et al. *Nitric oxide, lipid peroxidation and antioxidant defence system in patients with active or inactive Behcet's disease*. Br J Dermatol. 2005;153(3):526-30.
- 21) Jonnala RR, Buccafusco JJ. *Inhibition of nerve growth factor signaling by peroxynitrite*. J Neurosci Res. 2001;63(1):27-34.
- 22) Bulgrin JP, Shabani M, Smith DJ. *Arginine-Free diet suppresses nitric oxide production in wounds*. J Nutr Biochem. 1993; 4(10):588-93.
- 23) Diamond A. The development of prefrontal cortex and executive control functions: Genetic, Biochemical and Environmental modulation. Word shop scheduled for the joint INS/ASSBI conference. Brisbane. Australia. 2003 July7.
- 24) Matsumoto K, Yobimoto K, Huong NT, Abdel-Fattah M, Vanhien T, Watanabe H. *Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide system and its modulation by anxiolytic and anoxiogenic drugs in mice*. Brain Res. 1999; 839(1): 74-84.
- 25) Reif A, Herterich S, Strobel A, Ehls AC, Saur D, Jacob CP, et al. *A neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function*. Mol Psychiatry. 2006;11(3):286-300.
- 26) Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, et al. *Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex*. J Neurochem. 2000;74(2):785-91.
- 27) Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ. *Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain*. Exp Neurol. 2004; 186(2):235-41.
- 28) Silva-Gomez AB, Rojas D, Juarez I, Flores G. *Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats*. Brain Res. 2003; 983: 128-136.
- 29) Wallace MN, Brown IE, Cox AT, Harper MS. *Pyramidal neurones in human precentral gyrus contain nitric oxide synthase*. Neuroreport. 1995;6(18):2532-6.
- 30) Labuda C, Litwinowicz B, Kowianski P, Spodnik JH, Luczynska A, Morys J. *Developmental changes in nitric oxide synthase protein expression in the rat striatum and cerebral cortex*. Folia Morphol (Warsz). 2003;62(3):171-4.
- 31) Wallace MN, Tayebjee MH, Rana FS, Farquhar DA, Nyong'o AO. *Pyramidal neurones in pathological human motor cortex express nitric oxide synthase*. Neurosci Lett. 1996; 212(3): 187-90.