مطالعهٔ نقش انسولین بر شاخصهای رفتاری و نوروآندوکرینی استرس با استفاده از روش میکرودیالیز مغز در موش سفید

دکتر عبدالوهاب وهاب‌زاده*

چکیده

مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی اثر انسولین بر روی بروز پاسخهای رفتاری استرس در مغز صورت گرفته‌است. در موش‌های سفیدنر، پرابهای میکرودیالیز مغز تحت تأثیر بیهوشی و به روش استرئوتاکسی کاشته شد. بعد از ریکاوری (Recovery) موشها مورد تجربه قرار گرفتند، در حالی که جریان مایع مغزی نخاعی مصنوعی در پرابهای کاشته شده برقرار بود. ۵ دقیقه استرس Tail pinch (TP) به گروه کنترل اعمال شد. برای گروه شم (Sham) نیز همان مدت استرس اعمال شد، در حالی که جریان مایع در پرابها برقرار بود. در گروه آزمایش انسولین بطور سیستمیک تزریق و یا به جریان مایع مغزی نخاعی مصنوعی اضافه شد و استرس مشابه اعمال گردید. برای اثبات استرس‌زا بودن ۵ دقیقه TP سطح کورتیزول خون در حیوانات گروه شاهد و گروه TP بعنوان شاخص فعالیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال (HPA) اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. استرس TP پاسخهای رفتاری مختلفی را در موش سفید موجب می‌شود. طول این پاسخها در طی اعمال استرس ثبت، و در گروه شم با کنترل، و در گروه آزمایش با شم مقایسه شد. تغییرات بر اساس درصد محاسبه، و آنالیز آماری بر مبنای داده‌های مطلق انجام گرفت. نتایج حاصله پیشنهاد می‌کند که انسولین پ سخهای رفتاری مربوط به استرس TP را افزایش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: ۱- میکرودیالیز مغز ۲- انسولین ۳- موش سفید ۴- استرس

مقدمه

استرس یکی از مسائل عمدهٔ جوامع بشری، خصوصاً جوامع مترقی بوده و نقش آن در بروز بیماریهای روانی مشخص شده است.[۳] علیرغم اهمیت این مسأله مطالعات علمی روی آن، از اوائل قرن ۱۹ آغاز شد. در این مطالعات اثرات استرس بر روی کل بدن و خصوصاً دستگاه اعصاب خودمختار مورد توجه بوده‌است.[۴]

تکامل ابزارهای اندازه‌گیری از یک سو، و پیشرفتهای حاصل در زمینهٔ علوم اعصاب از سوی دیگر، توجه پژوهشگران را به مغز معطوف نمود. مطالعات مقدماتی دهه ۸۰، که اکثراً پس از اعمال استرس به حیوان، روی بافت مرده و یا مغز له شده انجام می‌گرفت، به اهمیت نقش سیستمهای سروتونرژیک و کاتاکولامینرژیک مغز در مکانیسمهای مغزی مربوط به استرس اشاره می‌کرد.[۱،۱۰،۱۲و۱۶] در اکثر این مطالعات بجای تغییرات تحریک‌پذیری نورون و آزادشدن نوروترانسمیتر، تغییرات سطح متابولیتهای این مواد میانجی مثل ۵- هیدراکسی اندول استیک اسید (5-HIAA) و ۳-

* استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:12 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

متوکسی - ۴- هیدراکسی فنیل گلیکول سولفات (MHPG-SO4) مغز در مقابل استرسهای مختلفی مثل شوک پا و محدودکردن حیوان، اندازه‌گیری شده بود.[۵،۹،۱۰،۱۲،۱۳و۱۴] از آنجاکه استرس یک پدیدهٔ پویا است، بنابراین لازم است اثرات آن روی موجود زنده و هوشیار (unanaesthetised) نیز مورد مطالعه قرار گیرد. تکامل در روش میکرودیالیز مغز[۶،۷،۸،۱۱،۱۸،۱۹،۲۰و۲۱] این امکان را مهیا ساخت. پژوهشهای اخیر با استفاده از این تکنیک، افزایش سطح سروتونین و نورآدرنالین مغز را در اثر استرس Tail pinch (TP) نشان داد.[۲۰] با این حال نقش این تغییرات بر روی رفتارهای مربوط به استرس کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌است. در این مطالعات محدود نیز بیشتر اثرات محیطی مواد روی رفتارهای مربوط به استرس مورد مطالعه قرار گرفته‌است. بنابراین مشخص کردن محل اثر دقیق این مواد در کل بدن و یا مغز چندان خالی از اشکال نیست.

در مطالعات استرس انواع مختلف عوامل استرس‌زا مورد استفاده قرار گرفته‌است.[۱۸] با این حال مدارک دال بر استرس‌زا بودن این عوامل محدود است. استرس، هیپوگلیسمی و ارتباط آن با سیستمهای منوآمینرژیک مغز موضوع کار بعضی از مطالعات اخیر بوده‌است.[۲۱] خصوصاً که ارتباط هر دو موضوع، یعنی هیپوگلیسمی و تغییرات سیستمهای منوآمینرژیک مغز در بروز بعضی از رفتارهای غیرفیزیولوژیک ادعا شده‌است.[۱۵و۲۳] این ارتباط هیپوگلیسمی با سیستمهای منوآمینرژیک مغز و یا اثر آن در بروز رفتارهای غیرفیزیولوژیک نقش انسولین را در مغز پیشنهاد می‌کند. با این حال این نقش تاکنون مشخص نشده‌است. در پژوهش حاضر، نقش انسولین در بروز پاسخ رفتاری استرس در موش سفید زنده و هوشیار (Unanaesthetised) مورد مطالعه قرار گرفته و از TP بعنوان عامل استرس‌زا استفاده شده، و با اندازه‌گیری فعالیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال (HPA) استرس‌زا بودن این عامل مورد بررسی قرار گرفته‌است.

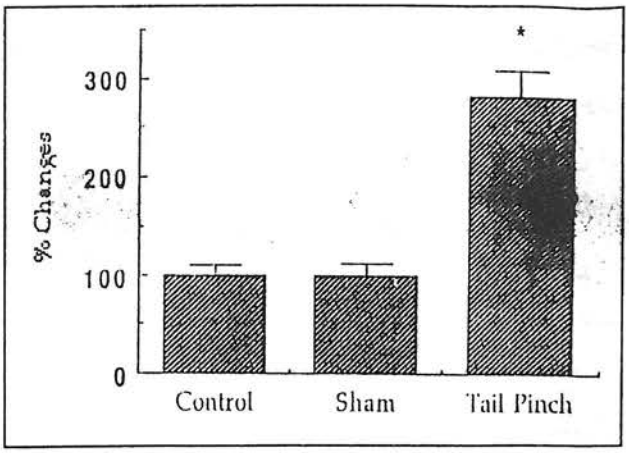
روش بررسی

موش‌های سفید نر آلبینووستر (Albino Wistar) به وزن ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم که تحت شرایط متعارف آزمایشگاهی نگهداری و از غذای فشرده استاندارد تغذیه می‌شدند انتخاب شدند. پرابهای میکرودیالیز تحت تأثیر بیهوشی کلرال هیدارت و به روش استرئوتاکسی در مغز موشها کاشته شد. برای کاشت پراب در بطن جانبی (Lateral Ventricle) از مشخصات فضائی: ۰/۸ میلیمتر فاصله قدامی خلفی از برگما، ۳/۲ میلیمتر عمق از سطح سخت‌شامه، ۱/۴ میلیمتر فاصله کناری از خط میانی استفاده شد. ۱۲ ساعت بعد از کاشت پراب موشها مورد تجربه قرار گرفتند، در حالی که جریان مایع نخاع مصنوعی در پرابها به میزان ۲ میکرولیتر در دقیقه برقرار بود. ۵ دقیقه Tail pinch با بستن گیره مخصوص به ۲/۵ سانتیمتری انتهای دم حیوانات گروه کنترل اعمال شد. برای گروه شم (Sham) نیز همان مدت استرس اعمال شد، در حالی که جریان مایع در پرابها برقرار بود. در یک سری از تجارب، در گروه آزمایش از انسولین سیستمیک (5 IU/Kg s.c.) و در سری دیگر انسولین (5 IU/Kg) به جریان مایع اضافه شد. بلافاصله بعد از انسولین در هر دو سری از تجارب استرس مشابه با شم به گروه آزمایش اعمال گردید. استرس TP رفتارهای مختلفی از قبیل جویدن، دندان قوروچه و حملات تهاجمی را در موش موجب می‌شود.[۲] طول جویدن در طی اعمال استرس ثبت، و در گروه شم با کنترل، و در گروه آزمایش با شم قیاس شد. برای نشان دادن فعالیت محور HPA سطح کورتیزول خون در موش سفید بدون استرس (شاهد) و یا بلافاصله بعد از اعمال استرس (آزمایش) به روش رادیوایمونواسی (RIA) اندازه‌گیری شد. سطح کورتیزول خون گروه TP با گروه شاهد مقایسه گردید. تغییرات بر اساس درصد (percentage) محاسبه، و آنالیز آماری بر مبنای داده‌های مطلق (Absolute data) صورت گرفت. برای قیاس داخل گروه از تی‌تست دوطرفه (Two tail studentt-test) و برای قیاس بین‌گروهی از ANOVA (Analysis of variance) و برنامهٔ آماری Stat view موجود در کامپیوتر مکنتاش استفاده گردید.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:12 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

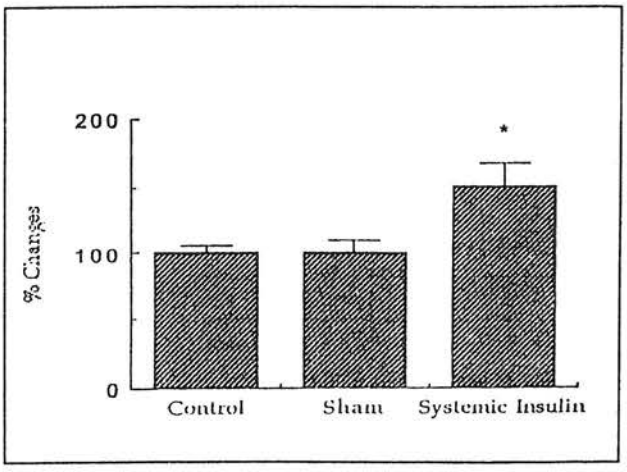
نتایج

اثر استرس *TP* بر روی سطح کورتیزول خون: در ساعت ۳ عصر سطح کورتیزول در موشهای سفید *0.09 μg* بود، در اثر اعمال ۵ دقیقه استرس *TP* به *0.21 μg* افزایش یافت. بنابراین در گروه *TP* نسبت به گروه شاهد و در همان ساعت روز سطح کورتیزول به *231±11% (P<0.0003,n=8)* افزایش پیدا کرد. این تغییرات که در شکل ۱ نشان داده شده‌است، از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۱- درصد تغییرات کورتیزول خون در گروه‌های شاهد، شم و استرس *TP* (ستاره نشانگر معنی‌دار بودن تغییرات از نظر آماری است)

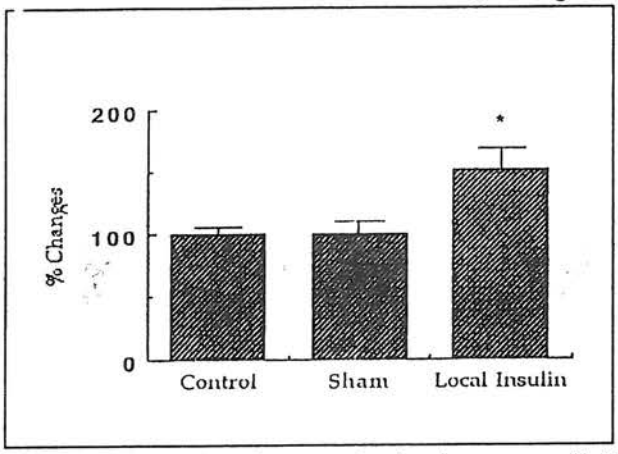
اثر تجویز محیطی انسولین بر روی پاسخ رفتاری استرس: بعد از کاشت پراب اثر استرس روی پاسخ رفتاری در گروه‌های شاهد و شم مقایسه شد، که اختلاف معنی‌داری را نشان‌نداد. بنابراین گروه آزمایش از این به بعد با گروه شم مورد قیاس قرار گرفت.



شکل ۲- درصد تغییرات پاسخ رفتاری استرس در گروههای شاهد، شم و بعد از تجویز محیطی انسولین (ستاره نشانگر معنی‌دار بودن تغییرات از نظر آماری است)

تزریق زیرجلدی انسولین پاسخ رفتاری *TP* را به *151±16% (P<0.0001,n=10)* شم افزایش داد. این تغییرات در شکل ۲ نشان داده‌شده‌است.

اثر تجویز موضعی انسولین بر روی پاسخ رفتاری استرس: تحویل موضعی انسولین در بطن جانبی پاسخ رفتاری *TP* را به *138±17% (P<0.0001,n=10)* شم افزایش داد. این تغییرات در شکل ۳ نشان داده‌شده‌است.



شکل ۳- درصد تغییرات پاسخ استرس در گروه‌های شاهد، شم و بعد از تجویز مرکزی انسولین (ستاره نشانگر معنی‌داربودن تغییرات از نظر آماری است)

بحث

روش میکرودیالیز مغز در سالهای اخیر در تعداد معدودی از مراکز علمی دنیا مورد استفاده پژوهشهای جاری در زمینه علوم اعصاب قرار گرفته است.[۶،۷،۸،۱۱،۱۶،۱۸،۱۹،۲۰و۲۱] این تکنیک هم امکان نمونه‌برداری و هم تحویل موضعی دارو در هسته‌های مغزی را فراهم می‌کند. با این حال پیچیدگی تکنیکی و نیاز به تجهیزات مدرن، استفاده از این روش را محدود کرده‌است.

نتایج مطالعات نشان می‌دهد که استرس موجب افزایش فعالیت محور *HPA* می‌گردد.[۲۲] با تکیه به این نتایج، افزایش سطح کورتیزول در اثر ۵ دقیقه استرس *TP* مدرک قابل قبولی برای استرس‌زا بودن *TP* با مدت داده شده ارائه می‌دهد.

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که انسولین پاسخهای رفتاری استرس را افزایش می‌دهد. این افزایش در پاسخهای رفتاری استرس، ممکن است بدلیل کاهش سطح گلوکز خون باشد. با این حال کاهش سطح گلوکز خون اولاً تحریک‌پذیری

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:12 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

سلولهای مغز را کاهش می‌دهد، ثانیاً تجویز موضعی انسولین در مغز که سلولهای آن برای متابولیسم نیازی به انسولین ندارد، نتایج مشابه با تجویز محیطی را نشان می‌دهد، بنابراین نتایج موجود نقش دیگری غیر از نقش اندوکرینی انسولین را پیشنهاد می‌کند، این نقش بیشتر مشخصات مواد تعدیلگر مغز را تداعی می‌کند. انسولین فعالیت سیستمهای سروتونرژیک و نورآدنرژیک مغز را افزایش می‌دهد.[۲۱] چنین افزایشی را در این سیستمها، در اثر استرس TP نیز گزارش کرده‌اند.[۲۰] با توجه به این مدارک، نتایج حاضر پیشنهاد می‌کند که ممکن است سیستمهای منوآمینرژیک مغز موجب افزایش پاسخهای رفتاری TP گردد. با توجه به اینکه احتمال وجود گیرنده‌های انسولینی در روی نورونهای این سیستمها نیز اخیراً پیشنهاد شده‌است.[۱۷] از سوی دیگر مطالعات بالینی نیز به نقش هیپوگلیسمی، و یا به عبارت دیگر هیپرانسولینی در بروز رفتارهای تهاجمی اشاره می‌کند.[۲۳و۱۵] ارتباط چنین رفتارهائی با استرس نیز مشخص گردیده‌است.[۳]

تشکر و قدردانی: از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران به جهت تشویق و در اختیارگذاشتن امکانات این مطالعهٔ تجربی قدردانی می‌گردد.

References

1) Adell A., Garcia-Marqquez C., Armario A. and Gelpi E.; Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress; Journal of Neurochemistry, 1988, 50: 1678-1681

2) Antelman S.E., Szechtman H., Chin P. and Fisher A.E.; Tail pinch induced eating, gnawing and licking behaviour in rats: Dependence on the nigrostratal dopamine system; Brain Research 1975, 99: 319-337

3) Brake W.G., Noel M.B., Boksa P. and Gratton A.; Perinatal asphyxia increases sensitization of the mesolimbic dopamine response to repeated stress; Soc. Neurosci. Abstr (1993)

4) Cannon W.B.; Bodily changes in pain, hunger, fear and rage; Appleton & Co., New York, 1915, pp: 1-51

5) Cassens G., Roffman M., Kuruc A., Orsulak P.J. and Schildkraut J.J.; Alterations in brain norepinephrine metabolism induced by environmental stimuli pereviously paired with inescapable shock; Science 209: 1980, 1138-1139

6) Di Chiara G; In vivo brain dialysis of neurotransmitters, Trends in Pharmacological Sciences 1990; 11: 116-121

7) Hamberger A., Berthold C.H., Jacobson I., Karlsson B., Lehmann A., Nystrom B. and Sandberg M.; In vivo brain dialysis of extracellular nontransmitter and putative transmitter amino acids: In: In vivo perfusion and release of neuroacitve substances; A. Bayon and R.Drucker-Colin (eds)1985; 119-139, Academic Press, Orlando, Florida

8) Hamberger A., Jacobson I., Larsson S., Lonnroth P., Nystrom B. and Sandberg M.; Microdialysis techniques for studing brain amino acids in the extracellular fluid: Basic and clinical studies; In: Microdialysis in the neurosciences. T.E. Robinson and B.V. Justice (eds) 1991 407-423, Elsevier Science Publishers B.V.

9) Irwin J., Ahluwalla P. and Anisman H. Sensitization of norepinephrine activity following acute and chronic footshock. Brain Research 1986; 379: 98-103

10) Iuvone P.M. and Dunn A. J.; Tyrosine hydroxylase activation in mesocortical

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:12 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

17) Smythe G.A., Bradshaw J.E., Nicholson M.V., Grunstein H.S. and Storlien, L.H.; Rapid bidirectional effects of insulin on hypothalamic noradrenergic and serotonergic neuronal activity in the rat: Role in glucose homeostasis. Endocrinology, 1985, 117: 1590-1597

18) Vahabzadeh A.; In vivo monitoring of the responses to stress of the noradrenergic and serotonergic projections to the rat hippocampus, Oxford University Press, Oxford, 1993, pp: 1-30

19) Vahabzadeh A. and Fillenz M.; Studies on the origin of hippocampal dihydroxyphenylacetic acid using microdialysis. Neuroscience Letters, 1992, 136: 51-55

20) Vahabzadeh A. and Fillenz M., Comparison of stress-induced changes in noradrenergic and serotoergic neurones in the rat hippocampus using microdialysis; European Journal of Neuroscience, 1994, 1205-1212

21) Vahabzadeh A. and Fillenz M., Effects of changes in rat brain glucose on serotonergic and noradrenergic neurons. European Journal of Neuroscience, 1995, 7: 175-179

22) Vahabzadeh A. and Khorasani M., The relationship between stress induced changes of brain 5-hydroxytryptamine and noradrenaline and the activation of sympathoadrenal system; Abstract Book of the International Congress on Endocrine Disorders 083, 1995

23) Virkkunen M., Nuutila A., Goodwing F.K. and Linnoila M.; Cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels in male arsonists; Archives of General Psychiatry, 1987, 44: 241-247

3,4-dihydroxyphenylethylamine neurons following foot shock; Journal of Neurochemistry, 1986; 47: 837-844

11) Kalen P., Kokaia M., Lindvall O. and Bjorklund A., Basic characteristics of noradrenaline release in the hippocampus of intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats as studied by in vivo microdialysis; Brain Research´s 1988, 474: 374-79

12) Kramarcy N.R., Delanoy R.L. and Dunn D.J.; Footshock treatment activates catecholamine synthesis in slices of mouse brain regions; Brain Research, 1984, 290: 311-319

13) Nisenbaum L.K., Zigmond M.J., Sved A.F. and Abercrombie E.D. Prior exposure to chronic stress results in enhanced synthesis and release of hippocampal noradrenaline in response to a novel stressor; Journal of Neuroscience, 1991; 11: 1478-1484

14) Richardson J.S.; Brain part monoamines in the neuroendocrine mechanisms activated by immobilization stress in the rat; Int. J. Neurosci. 1984, 23(1) : 57-67

15) Roy A., Virkunen M. and Linnoila M.; Monoamines, glucese metabolism, aggression towards self and others; International Journal of Neuroscience, 1988, 41: 261-264

16) Sharp T., Barmwell S.R., Clark D. and Graham-Smith D.G.; In vivo measurement of extracellular 5-hydroxytryptamine in hippocampus of the anaesthetized rat using microdialysis: Changes in relation to 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity; Journal of Neurochemistry, 1989, 53: 234-240

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:12 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

STUDY ON THE ROLE OF INSULIN ON BEHAVIOURAL AND NEUROENDOCRINE INDICES OF STRESS, USING BRAIN MICRODIALYSIS IN RATS

*A. Vahabzadeh, Ph.D.**

ABSTRACT

The present investigation aimed to study the role of insulin on stress-induced behavioural responses.

Male albino-Weitar rats (200-300 g) were implanted with microdialysis probes in the lateral ventricle under chloral hydrate (500 mg/kg i.p.) anaesthesia. 12 hours after implantation animals were placed in a bowl. The implanted animals were perfused at 2 µl/min with ringer solution. 5 min tail pinch is applied for control group. In the sham group ringer solution were perfused via microdialysis probes while the tail pinch (5 min) stress is performed. In one experiment, for the test group insulin (5 IU/Kg s.c.) was used, In another set of experiment, for the test group insulin (5 IU/Kg) was added to the ringer solution. The tail pinch induced behavioural responses were observed in all experimental groups. For validation of tail pinch as a stressor blood level of cortisone in control and tail pinch groups were monitored. Tail pinch stress causes a variety of behavioural responses including gnawing, licking and aggression in rats. In the present study duration of these responses were observed at 5 min. Each group was compared with the control animals. Variation calculated in the percentge base. All statistical analysis were carried out using absolute data and either student paired t-test (within same group) or analysis of variance (ANOVA) statistical test (within the differnt groups).

Data from the present study suggest an excitatory role for insulin in those areas of the brain which may play a role in the stress induced behaviours.

Key Words: 1) Brain microdialysis **2) Insulin** **3) Stress** **4) Rat**

* *Assistant Professsor of Iran University of Medical Sciences and Health Services*

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 11:12 IRDT on Saturday July 21st 2012

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]