

بررسی ارتباط عملکردی آمیگدال-هیپوکمپ در شرایط استرس در موش‌های صحرایی آسمی

کلثوم دهدار^۱، محمدرضا رئوفی^{*۱}

(۱) گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده:

اختلالات اضطراب در میان بیماران آسمی شایع می‌باشد و با شدت آسم و عدم پاسخدهی به درمان در ارتباط است. مدار آمیگدال-هیپوکمپ در اضطراب نقش دارد و همچنین با ساقه مغز و مراکز دخیل در کنترل تنفس در ارتباط است. در این مطالعه برهمکنش پتانسیل‌های میدانی موضعی مدار آمیگدال-هیپوکمپ در شرایط استرس در حیوانات کنترل و مدل حیوانی آسمی بررسی شد. در این مطالعه موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در دو گروه کنترل، گروه آسمی (با تزریق و استنشاق اووالبومین) قرار گرفتند. پتانسیل‌های میدانی موضعی مدار آمیگدال-هیپوکمپ حیوانات در شرایط استرس ثبت شد. همبستگی نوسانات این مدار در گروه آسمی در حالت استرس بیشتر از گروه کنترل بود. تغییرات مغزی ناشی از آلرژن باعث می‌شود اثر استرس بر عملکرد مغز تغییر یابد. این مطالعه بینش جدیدی را درباره پاتوفیزیولوژی آسم آلرژیک و بروز اختلالات عصبی رفتاری فراهم آورد.

واژگان کلیدی: آسم، اضطراب، استرس، پتانسیل میدانی موضعی

*نویسنده مسئول:

دکتر محمد رضا رئوفی، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. پست الکترونیک: raoufy@modares.ac.ir

مقدمه:

آسم، سندرمی است که با التهاب و انسداد برگشت پذیر راه های هوایی مشخص می شود. راه های هوایی در افراد آسمی به طیف وسیعی از محرک ها حساس تر شده و منجر به پاسخ بیش از حد راه های هوایی به محرک، کاهش جریان هوا، خس خس سینه، سرفه و تنگی نفس می شود. مطالعات اخیر نشان داده که مشکلات سایکولوژیکی مانند استرس و اضطراب در میان بیماران آسمی شایع است و افراد آسمی دو برابر افراد سالم ریسک ابتلا به اختلالات سایکولوژیکی را دارند و این اختلالات با بدتر شدن بیماری، عدم پاسخدهی به درمان آسم، افزایش طول مدت بستری در بیمارستان و اختلال در کیفیت زندگی مرتبط با سلامتی در ارتباط است (۱،۲). مطالعات نشان می دهند که شیوع استرس و اضطراب در بیماران آسمی زیاد است و این بیماران در شرایط استرس و اضطراب دیس پنه را بیشتر درک می کنند (۳،۴). هرچند به نظر می رسد در شرایط استرس مزمن افزایش التهاب ناشی از استرس باعث ایجاد حمله آسم می شود (۵،۶). ولی مکانیسم ایجاد تنگی تنفس و حمله آسم به دنبال استرس کوتاه مدت هنوز به خوبی مشخص نیست. به دنبال استرس کوتاه مدت عملکرد تنفسی (FEV_1 ، FVC و PEF) افراد آسمی کاهش می یابد (۷). آسم نه تنها راه هوایی را متأثر می کند بلکه بر روی سیستم عصبی نیز اثر دارد، شواهد نشان می دهد که التهاب و آلرژی در ریه موش های حساس شده با اووآلبومین^۴ باعث القاء سیتوکاین های پیش التهابی در هسته مسیر منزوی و هیپوکمپ و کاهش تعداد سلول های $NeuN^{+5}$ در قشر پره فرونتال و هیپوکمپ می شود (۸-۱۰). همچنین، قرار گرفتن در معرض آلرژن باعث افزایش c-Fos در آمیگدال و هیپوتالاموس، همراه با افزایش رفتار شبه اضطراب در موش های حساس شد (۱۱). با توجه به نقش مدار آمیگدال-هیپوکمپ در استرس و اضطراب، شواهدی از ارتباط این مدار با ساقه

مغز و ساختارهای دخیل در تعدیل سیستم اتونوم و کنترل تنفس گزارش شده است. در هنگام اضطراب قسمت بازولترال آمیگدال از تالاموس و هیپوکمپ ورودی دریافت می کند و با قسمت مرکزی آمیگدال ارتباط دارد و از این قسمت خروجی به بخش هایی از ساقه مغز مانند PAG، dVAC، NTS دارد و در نتیجه پاسخ هایی مانند افزایش تعداد تنفس و ضربان قلب ایجاد می شوند (۱۲). از ناحیه سایبیکولوم و CA1 هیپوکمپ شکمی به آمیگدال ارتباط مستقیم وجود دارد. قسمت شکمی هیپوکمپ جوندگان، مطابق با قسمت قدامی هیپوکمپ پرمات ها است، عمدتاً در استرس و احساسات درگیر است (۱۳). باتوجه به اهمیت مدار آمیگدال-هیپوکمپ در بروز رفتارهای مربوط به اضطراب و ارتباط این مدار با ساقه مغز و ساختارهای دخیل در کنترل تنفس، در این مطالعه برهمکنش پتانسیل های میدانی موضعی مدار آمیگدال-هیپوکمپ در شرایط استرس در حیوانات کنترل و مدل حیوانی آسمی بررسی شد.

مواد و روش ها:

در این مطالعه از موش های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۸۰-۱۰۰ گرم (تهیه از انستیتو پاستور کرج) استفاده کرده ایم. حیوانات پس از خریداری در قفس هایی از جنس پلکسی گلاس شفاف در خانه حیوانات گروه فیزیولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شده اند. در اتاق نگهداری نور، تهویه، سیستم گرمایی و سرمایی کنترل و ثبت دمای بیشینه و کمینه انجام شد. شرایط نوری حیوانات بطور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی رعایت شد (شروع روشنایی ساعت ۷ صبح). آب و غذا بطور آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد. رطوبت تابع شرایط رطوبتی هوای آزاد است. پیش از شروع آزمایشات زمان لازم برای سازش حیوانات با محیط آزمایشگاه رعایت شد. کار با حیوانات بر اساس مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

ایجاد مدل حیوانی:

موش ها در زمان شروع ایجاد مدل ۸۰-۱۰۰ گرم وزن داشتند و در انتهای این پروسه (روز ۴۰) به وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم رسیدند. مطابق شکل ۱، حیوانات ۲ تزریق داخل صفاقی سالین یا $OVA-Al(OH)_3$ (۱ میلی گرم σ III، Sigma و ۱۰۰ میلی گرم Al

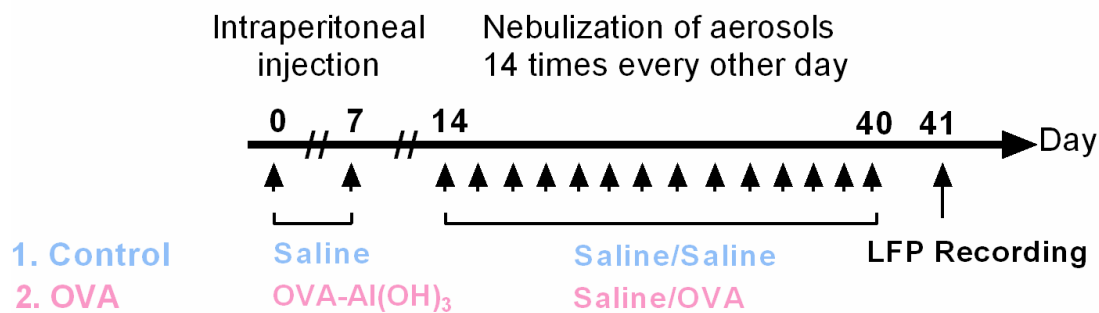
¹ - Forced expiratory volume in 1 second

² - Forced vital capacity

³ - Peak expiratory flow

⁴ - Ovalbumin

⁵ - Neuronal nuclear Antibody



شکل ۱ - روند ایجاد مدل های حیوانی در مطالعه. گروه Control: تزریق و استنشاق سالین، گروه آسمی: تزریق و استنشاق اووآلبومین (OVA). OVA: ovalbumin.

پردازش سیگنال و تحلیل آماری:

مدت ۶۰ ثانیه از داده های بدست آمده در حالت هوشیار و بی حرکتی به صورت offline در نرم افزار MATLAB تجزیه و تحلیل شد. تحلیل cross-correlation برای باندهای فرکانسی دلتا ($4 \text{ Hz} <$) و تتا ($12-4 \text{ Hz}$) در مدار آمیگدال-هیپوکمپ با استفاده از دستور xcorr و coeff انجام شد. برای مقایسه نتایج از آزمون آماری t-test استفاده شد. سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها:

به منظور بررسی دینامیک مدار آمیگدال-هیپوکمپ، آنالیز cross-correlation برای محاسبه همبستگی نوسانات دلتا و تتا بین پتانسیل های میدانی موضعی این مدار انجام شد. استرس باعث افزایش همبستگی نوسانات دلتای آمیگدال-هیپوکمپ در گروه آسمی نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$) (شکل ۲).

همچنین، در شرایط استرس همبستگی نوسانات تتا آمیگدال-هیپوکمپ در گروه آسمی نسبت به گروه کنترل بیشتر بود ($P < 0.05$) (شکل ۳).

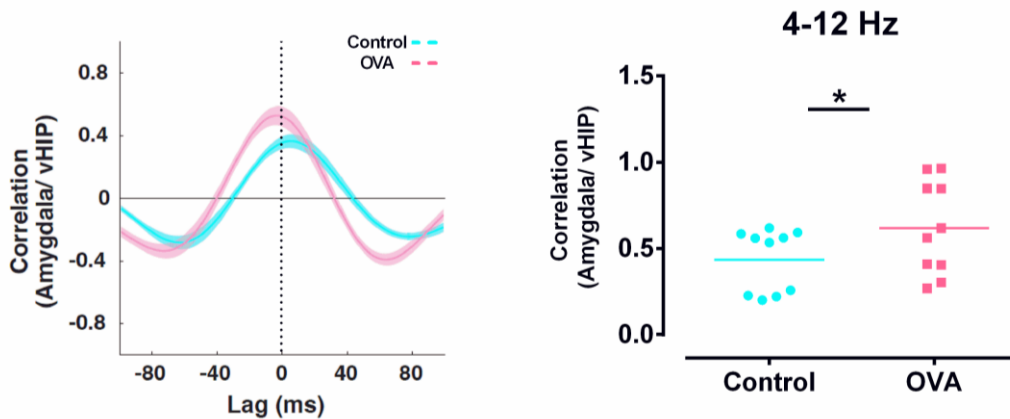
بحث:

در بیماران آسمی اختلالات روانی مخصوصا اضطراب تاثیر بارزی بر روی درمان این بیماران مانند مراجعه بیشتر به مراکز درمانی، اورژانس و کناره گیری مکرر در شرکت در فعالیت های منظم داشته است (۱، ۱۵).

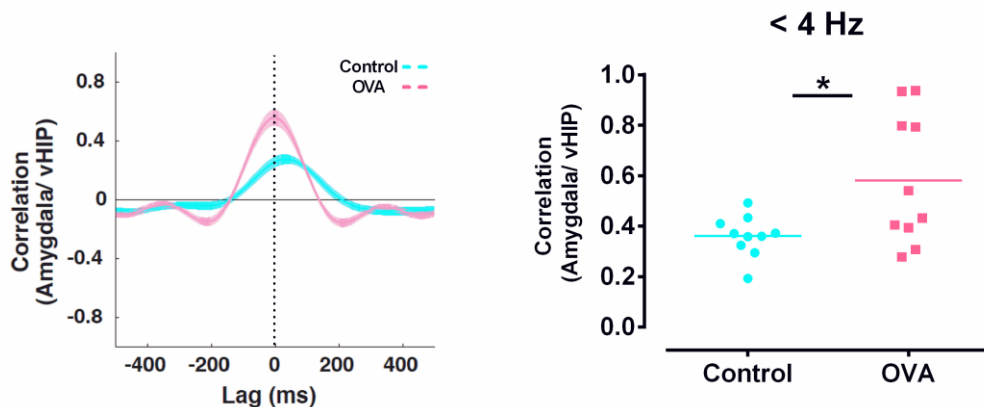
OH_3 (در ۱ میلی لیتر سالین) در روزهای ۰ و ۷ دریافت کردند و از روز ۱۴ الی ۴۰ به صورت یک روز درمیان به مدت ۳۰ دقیقه سالین یا اووآلبومین ۲٪ را به صورت استنشاقی با نبولایزر دریافت کردند. ۳۰ دقیقه قبل از دریافت اووآلبومین یا سالین استنشاقی، سالین استنشاقی (گروه آسمی و کنترل) دریافت می کردند.

کاشت الکتروود:

در روز ۳۰ روند ایجاد مدل حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (100 mg/kg) و زایلازین (mg/kg) ۱۰ بیهوش شدند و پس از قرار گیری در دستگاه استریوتاگس موقعیت هرکدام از نواحی در سطح جمجمه نسبت به برگما و براساس اطلس Paxinos و Watson تعیین شد (۱۴). موقعیت CA1 شکمی (برحسب میلی - متر: ۶ عقب تر و ۵/۵ به سمت راست نسبت به برگما و ۶/۸ به سمت پایین نسبت به سخت شامه)، و موقعیت ناحیه بازولترال آمیگدال (BLA) (برحسب میلی - متر: ۲/۵۲ عقب تر و ۵ به سمت راست نسبت به برگما و ۷/۴ به سمت پایین نسبت به سخت شامه) در سطح جمجمه تعیین گردید. الکتروودهای از جنس استیل ضدزنگ با روکش تفلون قطر ۱۲۷ میکرومتر در محل های مخصوص به خود قرار گرفتند و در استخوان پریتال راست پیچ رفرنس قرار داده شد. پتانسیل های میدانی موضعی در روز ۴۱ یک هفته بعد از جراحی (۲۴ ساعت پس از آخرین استنشاقی)، به مدت ۲۰ دقیقه در حالت استرس (restraint) ثبت شد.



شکل ۳ - اثر استرس بر همبستگی نوسانات تتا (۴-۱۲ Hz) مدار آمیگدال-هیپوکمپ در موش‌های صحرایی آسمی. خط پیوسته میانگین و مناطق سایه دار اطراف آن SEM را نشان می‌دهد. آزمون آماری: t-test. $n = 10$ در هر گروه. $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه آسمی. OVA: ovalbumin, vHIP: ventral hippocampus.



شکل ۲ - اثر استرس بر همبستگی نوسانات دلتا (< ۴ Hz) مدار آمیگدال-هیپوکمپ در موش‌های صحرایی آسمی. خط پیوسته میانگین و مناطق سایه دار اطراف آن SEM را نشان می‌دهد. آزمون آماری: t-test. $n = 10$ در هر گروه. $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه آسمی. OVA: ovalbumin, vHIP: ventral hippocampus.

است که استرس مزمن می‌تواند عاملی باشد برای افزایش التهاب راه هوایی نسبت به یک محرک آلرژی‌زا، افزایش درک بیشتر تنگی تنفس و در نهایت حمله آسم شود (۶،۱۸). در این مطالعات افراد تحت تاثیر استرس مزمن بودند، اما مکانیسم ایجاد حمله آسم به دنبال استرس کوتاه مدت هنوز به خوبی مشخص نیست.

شواهدی وجود دارد که التهاب محیطی ناشی از آلرژن باعث افزایش بیان سیتوکین‌های TH2 همراه با

اگرچه وجود همزمان بیماری اضطراب و آسم در طی چند دهه گذشته توجهات را به خود جلب کرده است، اما اختلاف نظرهایی در مورد جهت علیت بین این دو شرایط وجود دارد. یک متاآنالیز نشان داد که آلرژی و شرایط اتوپیک به شدت خطر اختلال روانی بعدی را افزایش می‌دهد و پاسخ‌های التهابی مرتبط با آلرژی به عنوان یک مسیر اصلی مرتبط با آسم و تغییرات رفتاری پیشنهاد می‌شود (۱۶،۱۷). به علاوه شواهد دیگری حاکی از این

اختلال در این مدار باعث ایجاد تنگی تنفس و حمله آسم به دنبال استرس در بیماران آسمی می‌شود. نتایج ما می‌تواند بینشی جدید برای توضیح مکانیسم‌های اساسی التهاب آلرژیک القا کننده اختلالات عصبی رفتاری در آسم را فراهم کند.

منابع:

- 1) Strine TW, Mokdad AH, Balluz LS, Berry JT, Gonzalez O. Impact of depression and anxiety on quality of life, health behaviors, and asthma control among adults in the United States with asthma, 2006. *J Asthma*. 2008;45(2):123-33.
- 2) Yang Y, Zhao M, Zhang Y, Shen X, Yuan Y. Correlation of 5-HTT, BDNF and NPSR1 gene polymorphisms with anxiety and depression in asthmatic patients. *Int J Mol Med*. 2016;38(1):65-74.
- 3) Coban H, Aydemir Y. The relationship between allergy and asthma control, quality of life, and emotional status in patients with asthma: a cross-sectional study. *Allergy, Asthma Clin Immunol*. 2014;10(1):1-7.
- 4) Stoeckel MC, Esser RW, Gamer M, Kalisch R, Büchel C, von Leupoldt A. Amygdala response to anticipation of dyspnea is modulated by 5-HTTLPR genotype. *Psychophysiology*. 2015;52(7):973-6.
- 5) Chrousos GP. Stress, chronic inflammation, and emotional and physical well-being: concurrent effects and chronic sequelae. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(5):S275-91.
- 6) Liu LY, Coe CL, Swenson CA, Kelly EA, Kita H, Busse WW. School examinations enhance airway inflammation to antigen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(8):1062-7.
- 7) Mohammadi M, Taghizadeh N, Miri MB, Eslaminejad ALIR, Raoufy MR. Correlation between airway constriction and autonomic nerve system dysfunction during short term stress in patients with controlled atopic asthma. 2015;2:33-40.
- 8) Chen S-D, Wen Z-H, Chang W-K, Chan K-H, Tsou M-T, Sung C-S, et al. Acute effect of methylprednisolone on the brain in a rat model of allergic asthma. *Neurosci Lett*. 2008;440(2):87-91.
- 9) Lin M-J, Lao X-J, Liu S-M, Xu Z-H, Zou W-F. Leukemia inhibitory factor in the neuroimmune communication pathways in allergic asthma. *Neurosci Lett*. 2014;563:22-7.
- 10) Xia M-X, Ding X, Qi J, Gu J, Hu G, Sun X-L. Inhaled budesonide protects against chronic asthma-induced neuroinflammation in mouse brain. *J Neuroimmunol*. 2014;273(1-2):53-7.

میکروگلیا و فعال شدن آستروسیت در مناطق مختلف سیستم عصبی مرکزی می‌شود، و این ممکن است به اختلالات عاطفی مرتبط با آسم کمک کند (۱۹،۲۰). علاوه بر این، شواهد نشان می‌دهد که رفتار شبه اضطرابی همراه با فعال سازی میکروگلیا و افزایش سلول‌های Iba1 + است (۲۱،۲۲). با توجه به شواهد قبلی، آسیب شناسی آسم فراتر از مجاری تنفسی است و شامل مغز نیز می‌شود. شواهد تصویربرداری تشدید مغناطیسی در یک مطالعه نشان داد که حجم هیپوکمپ در شرکت کنندگان مبتلا به آسم در مقایسه با افراد سالم به طور قابل توجهی کمتر است (۲۳). این نشان می‌دهد که آسم ممکن است باعث تغییرات ساختاری در مغز شود و از این طریق بر عملکرد شناختی تأثیر بگذارد. آمیگدال به مناطق مغزی گسترده و مرتبط با احساسات متصل است (مانند قشر پره‌فرونتال، هیپوکمپ، قشر سینگولیت قدامی و غیره) و به عنوان یک مرکز عصبی ضروری برای تعدیل رفتارهای اضطرابی در نظر گرفته می‌شود (۲۴). در مطالعات قبلی نقش هیپوکمپ شکمی در اضطراب به وضوح مشخص شده است، همچنین افزایش توان موج تتا در ناحیه هیپوکمپ شکمی در آزمون‌های اضطرابی مشاهده شد (۲۵). همچنین با توجه به ارتباط آمیگدال با هیپوکمپ، همکاری هیپوکمپ شکمی و بازولترال آمیگدال در یک وضعیت اضطراب‌زا را می‌توان انتظار داشت (۲۶،۲۷). در این راستا، تجزیه و تحلیل همبستگی سیگنال‌های LFP، از الکترودهای کاشته شده در بازولترال آمیگدال و هیپوکمپ شکمی نشان داد که قرار گرفتن در معرض آلرژن در موش‌های حساس ارتباط عملکردی را در باند فرکانسی دلتا و تتا در مدار هیپوکمپ شکمی-آمیگدال در حالت استرس افزایش داد. این نتایج با شواهدی که نشان‌دهنده نقش تعیین کننده ارتباطات آمیگدال و هیپوکمپ در تجربه رفتارهای مربوط به اضطراب مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به مطالعات قبلی و شواهدی از تغییرات ساختاری و عملکردی مغزی ناشی از آلرژن به نظر می‌رسد این تغییرات باعث شده که عملکرد مغز و همبستگی نوسانات آمیگدال-هیپوکمپ نیز تغییر یابد. از آنجایی که این مدار با مراکز کنترل تنفس در ارتباط می‌باشد به نظر می‌رسد

- 2016; i(June).
- 24) Asami T, Nakamura R, Takaishi M, Yoshida H, Yoshimi A, Whitford TJ, et al. Smaller volumes in the lateral and basal nuclei of the amygdala in patients with panic disorder. *PLoS One*. 2018;13(11):1–8.
 - 25) Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA. Article Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety. *Neuron*. 2010;65(2):257–69.
 - 26) Felix-Ortiz AC, Beyeler A, Seo C, Leppla CA, Wildes CP, Tye KM. BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*. 2013;79(4):658–64.
 - 27) Lesting J, Narayanan RT, Kluge C, Sangha S, Seidenbecher T, Pape HC. Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. *PLoS One*. 2011;
 - 11) Costa-Pinto FA, Basso AS, Britto LRG, Malucelli BE, Russo M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. *Brain Behav Immun*. 2005;19(1):52–60.
 - 12) Tsvetkov EA, Krasnoshchekova EI, Vesselkin NP, Kharazova AD. Amygdala: Neuroanatomy and neurophysiology of fear. *J Evol Biochem Physiol*. 2015;51(6):456–70.
 - 13) McDonald AJ, Mott DD. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J Neurosci Res*. 2017;95(3):797–820.
 - 14) Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition. Vol. 1. Elsevier; 2013. 472 p.
 - 15) Ten Brinke A, Ouerkerk ME, Zwinderman AH, Spinhoven P, BEL EH. Psychopathology in patients with severe asthma is associated with increased health care utilization. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(5):1093–6.
 - 16) Dudeney J, Sharpe L, Jaffe A, Jones EB, Hunt C. Anxiety in youth with asthma: A meta-analysis. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(9):1121–9.
 - 17) Chida Y, Hamer M, Steptoe A. A bidirectional relationship between psychosocial factors and atopic disorders: A systematic review and meta-analysis. *Psychosom Med*. 2008;70(1):102–16.
 - 18) Isenberg SA, Lehrer PM, Hochron SM. The effects of suggestion and emotional arousal on pulmonary function in asthma: a review and a hypothesis regarding vagal mediation. *Psychosom Med*. 1992;54(2):192–216.
 - 19) Tonelli LH, Katz M, Kovacsics CE, Gould TD, Joppy B, Hoshino A, et al. Allergic rhinitis induces anxiety-like behavior and altered social interaction in rodents. *Brain Behav Immun*. 2009;23(6):784–93.
 - 20) Yang S, Wu J, Zhang Q, Li X, Liu D, Zeng B, et al. Allergic Rhinitis in Rats Is Associated with an Inflammatory Response of the Hippocampus. *Behav Neurol*. 2018;2018:1–7.
 - 21) Lehmann ML, Cooper HA, Maric D, Herkenham M. Social defeat induces depressive-like states and microglial activation without involvement of peripheral macrophages. *J Neuroinflammation*. 2016;1–19.
 - 22) Wang YL, Han QQ, Gong WQ, Pan DH, Wang LZ, Hu W, et al. Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):1–14.
 - 23) D RTLM, D RMP, D RPM, D SBM, Ph D. Hippocampal Volume in Patients with Asthma : Results from the Dallas Heart Study.

Evaluating Functional Connectivity of Amygdala-Hippocampus During Stress in Asthmatic Rats

Kolsoum Dehdar¹, Mohammad Reza Raoufy^{1*}

1) Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract:

Anxiety disorders are prevalent in asthma, and are associated with severity of disease and poor asthma outcomes. Amygdala-hippocampus circuit plays a crucial role in the expression of anxiety. This circuit is also linked with the brainstem and respiratory control centers. In this study, we investigated the interaction within the local field potentials of amygdala-hippocampus circuit during stress in control and asthmatic rats. Male wistar rats were used and divided into two groups: control and asthmatic groups (injection and inhalation of ovalbumin). The local field potentials of amygdala-hippocampus were recorded during stress. Our findings exhibited that the correlation within this circuit was increased in the asthmatic group during stress in comparison with control. Allergen exposure produce functional brain alterations, this may disrupt the influence of stress on brain functions. This study provides new insight about asthma pathophysiology and neuro behavioral impairment.

Keywords: Asthma, Anxiety, Stress, Local field potential.

*Corresponding Author:

Mohammad Reza Raoufy. Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: raoufy@modares.ac.ir