مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ششم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۶، ۲۸۲-۲۷۳

اثرات محرومیت از خواب REM موش‌های صحرایی حامله بر یادگیری فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها

علی محمد پوررحیمی[۱]، دکتر مهدی عباس‌نژاد[۲]، دکتر وحید شیبانی[۳]، دکتر شهرزاد مظهری[۴]

دریافت مقاله: ۸۶/۱/۱۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۶/۴/۱۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۶/۹/۱۹ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۷

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات گذشته نشان می‌دهند که استرس‌های محیطی مختلف در دوران بارداری موش مادر بر رفتارهای فیزیولوژیک فرزندان آن‌ها مؤثر است. در این پژوهش، اثرات محرومیت از خواب REM (یا PSD) مادر در دوران بارداری بر یادگیری فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها با استفاده از ماز آبی موریس (MWM) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی برای محروم کردن حیوانات از تکنیک سکو استفاده گردید. موش‌های حامله در ۵ گروه جداگانه قرار گرفتند: گروه اول موش‌های بارداری که در روزهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶ بارداری بوسیله سکوی کوچک (به قطر ۵/۵ سانتی‌متر) مورد PSD قرارگرفتند. گروه دوم شامل موش‌های بارداری که روی سکوی بزرگ (به قطر ۱۹سانتی‌متر) به عنوان شاهد قرار گرفته و گروه سوم موش‌های بارداری که تحت PSD قرار نگرفتند (گروه کنترل). مداخلات مشابهی در روزهای ۱۷ ،۱۸ و ۱۹ بارداری در ۲ گروه دیگر موش‌های حامله نیز صورت گرفت (گروه ۴ برای سکوی کوچک و گروه ۵ برای سکوی بزرگ). فرزندان ماده هر ۵ گروه بعد از رسیدن به سن بلوغ (۳/۵-۳ ماهگی) در ماز آبی موریس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: شاخص‌های یادگیری فضایی MWM در مورد فرزندان ماده موش‌های مادر گروه ۱ و ۲، تغییر معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. اما تعدادی از این شاخص‌ها، در مورد فرزندان موش‌های مادر گروه ۴، در مقایسه با گروه ۵ و گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، اثرات PSD موش‌های مادر حامله بر یادگیری فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها، بسته به مدت و دوره زمانی اعمال آن، پاسخ‌های متفاوتی را خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: محرومیت از خواب REM، یادگیری فضایی، موش صحرایی باردار، ماز آبی موریس

مقدمه

خواب یک رفتار ویژه است که مانند بیداری به عنوان یک مرحله از آگاهی نیز محسوب می‌آید. هر دو حالت خواب و بیداری، رفتارهای پایه‌ای از سیستم اعصاب مرکزی بوده و مانند تعداد زیادی از رفتارها، تحت کنترل مکانیسم‌های فعال و ساعت بیولوژیک است.

۱- (نویسنده مسؤول) کارشناس ارشد گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تلفن: ۳۲۲۲۰۳۲-۰۳۴۱ ، فاکس: ۳۲۲۲۰۳۲-۰۳۴۱، پست الکترونیکی: alpoorrahimi2001@yahoo.com

۲- استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- استادیار گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۴- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

یک دوره خواب شبانه از دو قسمت متمایز خواب با امواج آهسته و خواب با حرکات سریع چشم یا خواب REM (Rapid Eye Movement) تشکیل می‌شود. این خواب در تمام پرندگان و پستانداران مطالعه شده وجود دارد [۱]. خواب REM، در دوران جنینی حیوانات نیز وجود دارد، چنانچه در پستاندارانی که مغز آن‌ها در زمان تولد نارس است، مقدار زیادی از خواب، در مرحله REM سپری می‌شود [۲]. میزان بالای خواب REM در دوران نوزادی، باعث تکامل مغز شده و ارتباط زیادی با افزایش سیناپس‌های دستگاه عصبی دارد [۳]. نقش دیگر خواب REM، دخالت در امر یادگیری و حافظه است. بدین منظور که خوابیدن به دنبال یادگیری در تقویت حافظه دخالت دارد و اطلاعاتی که در طی بیداری کسب شده‌اند، در طی خواب (خصوصاً خواب REM) دوباره فعال و متراکم می‌شوند [۴]. هیپوکامپ نقش بسیار زیادی در یادگیری و حافظه، به خصوص یادگیری و حافظه فضایی دارد [۵]. اعمال استرس در دوران بارداری یا PS (Prenatal Stress)، باعث آسیب نورون‌های مغزی، به خصوص هیپوکامپ می‌شود [۶]. این اختلال یادگیری وابسته به هیپوکامپ، با اختلال در عملکرد محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال (HPA) نیز وابسته است. به ویژه اعمال PS در هفته آخر حاملگی باعث توقف نورون‌زایی مرتبط با یادگیری فضایی می‌شود [۷]. دخالت خواب REM در امر حافظه و یادگیری را می‌توان به وسیله مطالعات محرومیت از خواب REM یا PSD (Paradoxical Sleep Deprivation) نیز نشان داد [۹-۸]. PSD، باعث اختلال در یادگیری فضایی می‌شود [۱۰-۹، ۵].

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که PS می‌تواند منجر به اختلال شدید در رشد، نمو و رفتار فرزندان در انسان و حیوانات شود که شامل عقب افتادگی در رشد و نمو، بی‌قراری، تشدید واکنش‌های هیجانی و عاطفی، افزایش پاسخ‌های هورمونی به استرس، تغییر در ریتم‌های شبانه‌روزی [۱۱] و اختلال در یادگیری و حافظه، حتی در دوران بلوغ فرزندان آن‌ها می‌باشد [۱۳-۱۲، ۶]. حیواناتی که در معرض PS قرار گرفته‌اند، در دوران بلوغ، نسبت به استرس‌های متفاوت آسیب پذیرترند [۷]. اعمال استرس بر مادران حامله، اثرات متنوعی را در فرزندان به جای گذاشته [۱۴] که به نوع و مدت زمان اعمال استرس و نیز شدت آن، بستگی دارد [۶]. اعمال PS در یک سوم نهایی بارداری، اختلالات شدید یادگیری را در اوان زندگی فرزندان به دنبال خواهد داشت که شامل اختلال در حافظه‌های کوتاه مدت، بلند مدت، فضایی و غیرفضایی خواهد بود [۱۱].

با توجه به مقدمه ذکر شده، از آن جا که به نظر می‌رسد محرومیت از خواب REM می‌تواند اعمال فیزیولوژیکی و رفتاری متعددی، از جمله یادگیری و حافظه فضایی را تحت الشعاع قرار دهد، هدف از اجرای تحقیق حاضر، ارزیابی پایداری این تغییرات در زمان حاملگی موش‌های صحرایی مادر به عنوان یکی از انواع PS و آثار احتمالی آن بر یادگیری و حافظه فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها در ماز آبی موریس یا MWM (Morris Water Maze) می‌باشد.

با توجه به موارد ذکر شده و نقش خواب REM در حافظه و یادگیری و تغییراتی که هیپوکامپ و محور HPA در اثر اعمال PS دارد و نیز با توجه به این که اغلب اثرات رفتاری و هورمونی انواع استرس‌ها در جوندگان، در هفته نهایی حاملگی گزارش شده است، هدف از اجرای این تحقیق، بررسی اثرات PSD موش‌های صحرایی مادر به عنوان یکی از انواع PS در دوران حاملگی، بر یادگیری و حافظه فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها در ماز آبی موریس MWM (Morris Water Maze) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این کار پژوهشی که به صورت تجربی (Experimental) انجام گرفت، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی ماده بالغ با میانگین وزنی ۲۰±۱۵۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که این موش‌ها، فرزندان موش‌های صحرایی ماده بالغ نژاد NMRI با میانگین وزنی ۲۰±۱۵۰گرم (تهیه شده از انستیتو رازی حصارک کرج) بودند. سن تمامی حیوانات مورد آزمایش در این پژوهش، ۳/۵- ۳ ماه بود. حیوانات در قفس‌های مخصوص در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد در خانه

حیوانات، نگهداری شدند. به علاوه همه حیوانات آزادانه بـه آب و غذا دسترسی داشتند.

نحوه محرومیت از خـواب REM: بـرای اعمـال PSD، در ایـن تحقیـق از روش سـکو (Flower pot technique) اسـتفاده گردید. در این روش حیوان روی یک سـکوی کوچـک کـه بـه وسیله آب احاطه شده است، قرار می‌گیـرد [۸]. قطـر سـکوی مورد استفاده جهت اعمال PSD، ۵/۵ سانتی‌متر و بـرای گـروه شاهد ۱۹ سانتی‌متر بود که به حیوان اجـازه بیـداری و هـر دو نوع خواب REM و NREM را می‌دهد [۱۵].

روش ارزیـابی یـادگیری و حافظـه فـضایی: بـرای سـنجش یادگیری و حافظه فضایی، از ماز آبی موریس استفاده شد. این ماز از یک حوضچه استوانه‌ای شـکل سـیاهرنگ بـا قطـر ۱۳۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متری با آب ۱±۲۰ درجه سانتی‌گراد پر مـی‌شـود. یـک سکوی سیاه رنگی از جـنس پلکـسی گـلاس بـا قطـر ۱۰ سانتی‌متر درون حوضچه در یک سانتی‌متری زیـر سـطح آب در مرکز یکی از چهار ربع حوضچه استوانه‌ای شـکل به گونه‌ای قرار مـی‌گیـرد کـه فاصـله مرکـز سـکو از دیـواره حوضچه و مرکز دایره به یک اندازه باشد.

حیوانات هـر گـروه، بـه مـدت چهـار روز، مـورد آزمـایش MWM قرار می‌گیرند. این آزمایش در هر روز به صـورت یـک بلوک مرکب از چهـار آزمـایش (trial) انجـام مـی‌شـود. بـرای شروع آزمایش موش از یکی از نقـاط شـروع درون حوضـچه رها می‌شود و ۹۰ ثانیه بـه آن فرصـت داده مـی‌شـود سـکوی مخفی را در زیر آب بیابد. چنانچه حیوان توانست در این مدت سکو را پیدا کند، به آن اجازه داده می‌شود کـه بـه مـدت ۳۰ ثانیه روی سـکو بمانـد چنانچـه در مـدت ۹۰ ثانیـه نتوانـست موقعیت سکو را پیدا نماید، توسط آزمایشگر از درون آب خارج شده و به روی سکو منتقل می‌شـود. پـس از مـدت زمـان ۳۰ ثانیه قرارگیری روی سکو، موش از درون حوضچه خـارج و بـه مدت ۱۰ ثانیه خارج از حوضچه قرارداده شده و سپس از نقطه شروع دوم رها می‌شود. این عمل تا پایان آزمایش چهارم تکرار می‌شود. موقعیت سکو در طول ۴ روز اول آزمایشات ثابت باقی می‌ماند در هر آزمایش، حرکت موش بوسیله یک دوربـین کـه در بالای حوضچه نصب گردیده، فیلم برداری و پردازش شده و سپس اطلاعاتی نظیر سرعت شنا کردن، زمان و مـسافت کـل طی شده برای یافتن سکو، درصد زمان و مسافت طـی شـده در ربع هدف (ربعی که سکو در آن قرار داشـته)؛ تعـداد عبـور از چهار شعاع R۱ تا R۴ استخراج و ذخیره مـی‌شـود. در روز پـنجم موش در حوضچه بدون سکو رها می‌شود. مسیر حرکت حیوان به مـدت ۶۰ ثانیـه ثبـت شـده و اطلاعـات لازم نظیـر درصـد مسافت و زمان طی شده در ربعی که سکو، قبلاً در آن بـوده و نیز تعداد عبور از شعاع‌های R۱ تا R۴ استخراج و مورد تجزیـه و تحلیـل قـرار مـی‌گیرنـد [۱۶]. در ایـن پـژوهش، تمـامی آزمایشات بین ساعت ۹ تا ۱۱ صبح انجام شده و جهت سازش با محیط آزمایشگاه، حیوانات هر روز به مدت یک ساعت قبـل از شـروع آزمـایش در محـیط آزمایـشگاه قـرار مـی‌گرفتنـد. هم‌چنین تمامی فرزندان ماده بالغ موقع آمـوزش و آزمـون در شرایط استرس یکسانی بودند.

گروه بندی حیوانـات: مـوش‌هـای مـاده بعـد از قرارگیـری در حضور موش‌های نر، از نظر تشکیل پلاک واژنی مـورد بررسـی قرار گرفتند. زمان مشاهده شدن پلاک واژنی، روز اول حاملگی یا E0 محسوب می‌شد [۱۷]. این حیوانات به پنج گروه تقسیم شدند: گروه اول کـه در روزهـای E۱۴، E۱۵ و E۱۶ از خـواب REM محـروم شـده و گـروه دوم کـه در همـین روزهـا روی سکوی بزرگ قرارگرفته و شاهد گروه اول بودند.گروه سوم کـه در روزهای E۱۷، E۱۸ و E۱۹ از خواب REM محروم شـده و گروه چهارم که در همین روزها روی سکوی بزرگ قرارگرفته و شاهد گروه سوم بودند.

گروه پنجم که گروه کنترل (دست نخورده) بـود بـدون اعمـال PSD، بـه طـور طبیعـی در محـیط حیـوان خانـه نگهـداری می‌شدند. تمامی پنج گروه فوق بعد از زایمـان در قفـس‌هـایی جداگانه نگهداری شدند تا فرزندان آن‌ها مرحله بلوغ را سـپری کنند (حـدود ۳/۵-۳ مـاهگی). فرزنـدان بـالغ جهـت بررسـی یادگیری فضایی در MWM، در ۵ گروه تقسیم‌بندی شدند:

گروه اول، فرزندان ماده بالغ موش‌های بـارداری بودنـد کـه در روزهـای E۱۴-E۱۶ از خـواب REM محـروم شـدند (n=۶) و گروه دوم، فرزندان ماده بالغ موش‌های بـاردار، کـه بـه عنـوان

شاهد گروه اول بودند (n=۷). گروه سوم، فرزندان ماده بالغ موش‌های بارداری بودند که در روزهای E۱۹-E۱۷ از خواب REM محروم شدند (n=۶) و گروه چهارم، فرزندان ماده بالغ موش‌های بارداری که به عنوان شاهد گروه سوم بودند (n=۶) و گروه پنجم به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد (n=۷).

محاسبات آماری: جهت مقایسه شاخص‌های چهار روز اول، از آنالیز واریانس دو طرفه (آزمون آماری Tukey) استفاده گردید و هم‌چنین شاخص‌های روز پنجم با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس (آزمون آماری Tukey) یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت[۲]. تفاوت‌ها در سطح p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد ($\overline{X}$ ± SEM) نمایش داده شده است.

نتایج

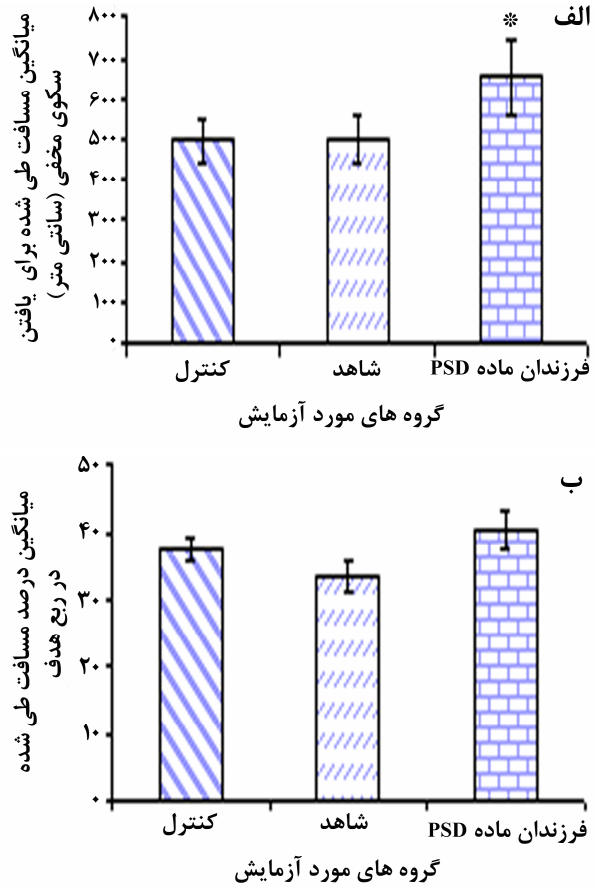
۱- بررسی تاثیر PSD در دوره E۱۶-E۱۴ موش‌های صحرایی باردار بر یادگیری فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها در MWM: هیچکدام از ۶ شاخص یادگیری فضایی MWM (میانگین مسافت و زمان طی شده برای یافتن سکوی مخفی، میانگین درصد مسافت و میانگین درصد زمان طی شده در ربع هدف برای یافتن سکوی مخفی، میانگین درصد تعداد عبور از شعاع‌های دو طرف ربع هدف و میانگین سرعت شنا کردن برای یافتن سکوی مخفی) در چهار روز اول آزمایش، در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان نداد .

نتایج حاصل از عملکرد گروه‌ها در روز پنجم آزمایش: نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه شاخص‌های اندازه‌گیری شده در روز پنجم آزمایش در بین گروه‌های مذکور، اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌داد. این نتایج در جدول ۱ خلاصه شده است.

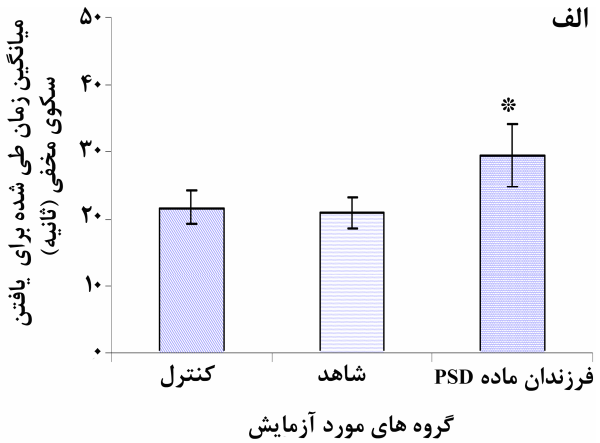
جدول ۱- درصد مسافت و زمان طی شده در ربع هدف، درصد تعداد عبور از شعاع های دو طرف ربع هدف و سرعت شنا کردن فرزندان ماده PSD در دوره E۱۶-E۱۴ در روز پنجم آزمایش. آنالیز واریانس یک طرفه و ازمون Tukey سطح معنی داری کلی p<۰/۰۵.

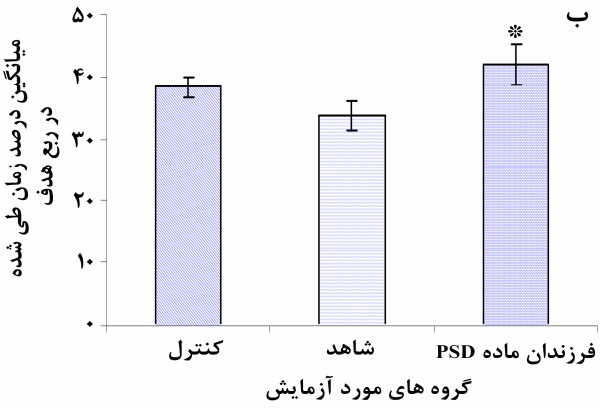
شاخص اندازه گیری شده	گروه	$\overline{X}$ ± SEM	P	$F_{(۳,۱۷)}$
درصد مسافت طی شده در ربع هدف	کنترل	۳۹/۱۵۸±۲/۹۷	۰/۳۰۳	۱/۲۸۳
	شاهد	۳۶/۱۰۲±۳/۱۵		
	فرزندان ماده PSD	۳۱/۵۵۵±۳/۹۱		
درصد زمان طی شده در ربع هدف	کنترل	۴۳/۴۵۸±۳/۵۴	۰/۲۵۹	۱/۴۶۳
	شاهد	۴۱/۲۹۱±۴/۱۵		
	فرزندان ماده PSD	۳۳/۹۴۰±۴/۴۰		
درصد تعداد عبور از شعاعهای دو طرف ربع هدف	کنترل	۵۹/۹۷۴±۲/۷۶	۰/۹۵۵	۰/۰۴۶
	شاهد	۶۱/۵۷۴±۶/۸۶		
	فرزندان ماده PSD	۵۹/۳۶۰±۵/۵۷		
سرعت شنا کردن	کنترل	۲۴/۱۴۲±۰/۹۰	۰/۴۳۰	۰/۸۸۷
	شاهد	۲۵/۹۲۸±۲/۵۵		
	فرزندان ماده PSD	۲۴/۵۴۱±۰/۷۴		

۲- بررسی تاثیر PSD در دوره E۱۹-E۱۷ موش‌های صحرایی باردار بر یادگیری فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها در MWM: میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی در چهار روز اول آزمایش، در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان می‌داد ($F_{۲,۶۴}$=۳/۳۳۴ ،p=۰/۰۴۲) (نمودار ۱، الف). میانگین زمان طی شده برای یافتن سکوی مخفی در چهار روز اول آزمایش نیز، در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان می‌داد ($F_{۲,۶۴}$=۴/۰۱۷ ،p=۰/۰۲۳) (نمودار ۲، الف). هم‌چنین میانگین درصد زمان طی شده در ربع هدف برای یافتن سکوی مخفی در چهار روز اول آزمایش، در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان می‌داد ($F_{۲,۶۴}$=۳/۴۰۲ ،p=۰/۰۳۹) (نمودار ۲، ب). اما میانگین درصد مسافت در ربع هدف برای یافتن سکوی مخفی، میانگین سرعت شنا کردن برای یافتن سکوی مخفی و میانگین درصد تعداد عبور از شعاع‌های دو طرف ربع هدف در چهار روز اول آزمایش، در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



*نمودار ۱- الف- میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی در MWM درگروه‌های کنترل (n=۷)، شاهد مربوطه (n=۶) و فرزندان ماده PSD (n=۶) در دوره E۱۹-E۱۷ در چهار روز اول آزمایش (Cont vs &Sham *p<۰/۰۵).ب:- میانگین درصد مسافت طی شده در ربع هدف برای یافتن سکوی مخفی در MWM در گروه‌های کنترل (n=۷)، شاهد مربوطه (n=۶) و فرزندان ماده PSD (n=۶) در دوره E۱۹-E۱۷ در چهار روز اول آزمایش آنالیز واریانس دو طرفه و ازمون Tukey سطح معنی‌داری کلی p<۰/۰۵.*





*نمودار ۲- الف- میانگین زمان طی شده برای یافتن سکوی مخفی در MWM در گروههای کنترل (n=۷)، شاهد مربوطه (n=۶) و فرزندان ماده PSD (n=۶) در دوره E۱۹-E۱۷ در چهار روز اول آزمایش (Cont &Sham vs *: p<۰/۰۵). ب: میانگین درصد زمان طی شده در ربع هدف برای یافتن سکوی مخفی در MWM در گروههای کنترل (n=۷)، شاهد مربوطه (n=۶) و فرزندان ماده PSD (n=۶) در دوره E۱۹-E۱۷ در چهار روز اول آزمایش (Sham vs *: p<۰/۰۵). آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون Tukey سطح معنی داری کلی p<۰/۰۵*

نتایج حاصل از عملکرد گروه‌ها در روز پنجم آزمایش: نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه شاخص‌های اندازه‌گیری شده در روز پنجم آزمایش در بین گروه‌های مذکور، اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌داد. این نتایج در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول ۲- درصد مسافت و زمان طی شده در ربع هدف، درصد تعداد عبور از شعاع های دو طرف ربع هدف و سرعت شنا کردن فرزندان ماده PSD در دوره E۱۹-E۱۷ در روز پنجم آزمایش. آنالیز واریانس یک طرفه و ازمون Tukey سطح معنی داری کلی p<۰/۰۵

شاخص اندازه‌گیری شده	گروه	$\overline{X} \pm SEM$	P	$F_{(۲,۱۶)}$
درصد مسافت طی شده در ربع هدف	کنترل	۳۹/۱۵۸±۲/۹۷	۰/۴۶۷	۰/۷۹۸
	شاهد	۳۹/۴۳۵±۳/۶۹		
	فرزندان ماده PSD	۳۱/۶۵۸±۶/۹۱		
درصد زمان طی شده در ربع هدف	کنترل	۴۳/۴۵۸±۳/۵۴	۰/۴۳۷	۰/۸۷۱
	شاهد	۴۱/۶۰۶±۴/۰۹		
	فرزندان ماده PSD	۳۳/۷۶۹±۸/۱۹		
درصد تعداد عبور از شعاع‌های دو طرف ربع هدف	کنترل	۵۹/۹۷۴±۲/۷۶	۰/۶۲۸	۰/۴۷۸
	شاهد	۶۰/۰۵۳±۳/۵۳		
	فرزندان ماده PSD	۵۴/۷۱۵±۶/۴۰		
سرعت شنا کردن	کنترل	۲۴/۱۴۲±۰/۹۰	۰/۸۳۶	۰/۱۸۱
	شاهد	۲۳/۵۸۳±۱/۱۸		
	فرزندان ماده PSD	۲۴/۵۰۰±۱/۱۲		

بحث

۱- بررسی تاثیر PSD در دوره E۱۶-E۱۴ بر یادگیری فضایی فرزندان ماده بالغ: نتیجه‌گیری کلی این آزمایش‌ها، دلالت بر عدم تغییر یادگیری فضایی در هر دو گروه فرزندان ماده PSD و شاهد آن در مقایسه با گروه کنترل در MWM دارد.

عدم تغییر در یادگیری فضایی فرزندان ماده، از دو دیدگاه قابل بررسی است. نخست آن که احتمالاً استرس ایجاد شده در به کارگیری روش سکو، باعث تعدیل یا تخفیف اثرات مخرب محرومیت از خواب REM بر یادگیری و حافظه فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها شده است. دوم این که، شواهدی در پژوهش مشابه (اعمال PS از نوع بی‌حرکت نمودن در روزهای ۱۵ تا ۱۹ حاملگی) وجود دارد که مبتنی بر بی اثر بودن PS اعمال شده بر یادگیری و حافظه فضایی فرزندان ماده بالغ در این دوره می‌باشد [۱۸].

از دیدگاه اول، یعنی تعدیل اثرات PS روی یادگیری، یکی از دلایل، حضور هورمون‌های جنسی ماده است. بر خلاف بی‌اثر بودن مقادیر طبیعی تستوسترون در اثرات استرس روی یادگیری در جنس نر، استرادیول به عنوان یک هورمون جنسی ماده، در تنظیم و تعدیل اثرات استرس تأثیر دارد [۱۹]. تحقیقات مشابه نشان دادند که، میزان استروژن پلاسما نیز، در پیشرفت یادگیری دخیل است [۲۰]. در تحقیقی که توسط RE Bowman و همکارانش انجام شد، تخمدان‌های موش‌های ماده را جهت بررسی اثر استرادیول روی رفتارهای شناختی و برخی از عوامل بیوشیمیایی، حذف کرده و آن‌ها را در معرض استرس بی حرکتی طولانی مدت ۲۱ روزه و به میزان ۶ ساعت در هر روز و تجویز استرادیول همزمان با استرس بی حرکتی قرار دادند. موش‌های ماده‌ای که استرادیول دریافت داشتند، پیشرفت یادگیری را در ماز شعاعی نشان دادند. علاوه بر این، استرادیول باعث تغییراتی در نوروترانسمیترها و متابولیت‌های نوروترانسمیتری در بعضی نواحی مغزی گردید [۱۹]. از آن جا که اثر استرادیول بر بهبود یادگیری در محدوده‌ای خاص در موش‌های ماده به اثبات رسیده و همان طور که می‌دانیم، بخشی از این اثر می‌تواند از طریق مداخله مرکزی با سایر نوروترانسمیترهای مغزی مرتبط با یادگیری اعمال گردد و با توجه به غلظت متغییر و غیر یکنواخت استرادیول در موش‌های ماده، احتمالاً این ترکیب توانسته است با اثر بهبود دهندگی خود، تا حدودی مانع از اثرات مخرب PS شود. حتی پیش بینی می‌گردد که اگر آزمایش‌های یادگیری، در مرحله‌ای از سیکل جنسی که غلظت استرادیول کاملاً بالا است انجام می‌شد، شاید این اثر استرادیول به گونه‌ای بروز می‌کرد که یادگیری موش‌های ماده، حتی افزایش نیز می‌یافت [۲۱].

در مورد جنبه دوم، یعنی احتمال بی‌اثر بودن PS اعمال شده در دوره E۱۶-E۱۴ بر فرزندان ماده بالغ نیز عوامل متعددی جهت خنثی کردن اثرات PS گزارش شده‌اند. اثرات متضاد رفتارهای مادرانه و دست آموزی بعد از زایمان در ترشح گلوکوکورتیکوییدها و رفتارهای شناختی، در مقایسه با اثرات آسیب رسان PS [۲۲]، می‌تواند دلیلی برای بی‌اثر کردن PS در یادگیری فرزندان ماده بالغ باشد. مواردی مثل شیر دادن، نوازش و لیسیدن نوزادان توسط مادر (Maternal behavior) از این جمله‌اند. اثرات مثبت این فاکتورها هنگامی به حداکثر خود می‌رسد که نوزادان متحمل PS، توسط مادری طبیعی که استرس را متحمل نشده مراقبت و پرورانده شوند (Cross-fostering) [۶]، زیرا PS در هفته آخر حاملگی، باعث اختلال در رفتارهای مادرانه می‌شود [۲۰].

۲- بررسی تاثیر PSD در دوره E۱۹-E۱۷ بر یادگیری فضایی فرزندان ماده بالغ: نتایج حاصل از چهار روز اول آزمایش، در سه مورد از شش شاخص اندازه گیری شده در MWM، اختلاف معنی‌داری را نشان داد. میانگین مسافت و زمان طی شده برای یافتن سکوی مخفی در گروه فرزندان ماده PSD در مقایسه با گروه شاهد مربوطه و کنترل، افزایش معنی‌داری را به دنبال داشت (نمودار۱- الف و نمودار ۲- الف). به علاوه میانگین درصد زمان طی شده در ربع هدف برای یافتن سکوی مخفی در گروه فرزندان ماده PSD در مقایسه با شاهد آن، افزایش معنی‌داری نشان داد (نمودار۲- ب).

نتیجه کلی این آزمایش‌ها، حاکی از کاهش یادگیری فضایی فرزندان ماده PSD در دوره E۱۹-E۱۷ بوده و این نتیجه با اکثر تحقیقات مشابه، مطابقت دارد [۲۳، ۱۱، ۷].

اصولاً جنس ماده نسبت به وقایع استرس‌زا در طول عمر، حساسیت بیشتری را نسبت به جنس نر از خود نشان می‌دهد [۲۴]. مشخص گردیده که اعمال استرس در موش‌های ماده، بر خلاف موش‌های نر که افزایش یادگیری داشتند، به میزان زیادی باعث آسیب یادگیری شده است. این آسیب می‌تواند متأثر از حضور هورمون‌های جنسی ماده باشد، چرا که در موش‌هایی که تخمدان‌های آن‌ها برداشته شده بود این آسیب یادگیری مشاهده نشد [۲۱].

کاهش یادگیری می‌تواند به تغییرات احتمالی مورفولوژیک متأثر از PS در ساختارهای مغزی جنین خصوصاً هیپوکامپ مربوط باشد [۶]. کاهش تراکم خارها یا زواید دندریتی در تشکیلات هیپوکامپی در موش‌های ماده بالغی که در معرض استرس قرار داشتند (بر خلاف جنس نر، که افزایش این زواید مشاهده شده است) نیز گزارش شده که باعث آسیب یادگیری جدید خواهد شد [۲۱]. اختلال در عملکرد محور HPA در اثر PS، با اختلالات یادگیری (فضایی) وابسته به هیپوکامپ نیز مرتبط است. حتی مقادیر افزایش یافته هورمون‌های گلوکوکورتیکوییدی خصوصاً کورتیکوسترون، باعث آسیب نورون‌های هیپوکامپ خواهد شد [۷]. به علاوه، PS باعث کاهش گیرنده‌های NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) گلوتامات در ناحیه CA_1 هیپوکامپ که مرتبط با مکانیسم تقویت بلند مدت (LTP) و شکل‌پذیری سیناپسی است، شده و کاهش یادگیری در دوران بلوغ را به دنبال دارد [۲۵]. پژوهش‌های مشابه نشان دادند که اعمال PS باعث کاهش معنی‌دار جمعیت نورون‌های هیپوکامپ همراه با افزایش محتوای کلسیم و تولید اکسیدان‌ها در ناحیه CA_3 هیپوکامپ در فرزندان یک ماهه ماده (بر خلاف جنس نر) می‌شود [۲۳]. علت تناقض در برخی از نتایج پژوهش حاضر در مقایسه با تعدادی از تحقیقات مشابه را می‌توان در بعضی از شرایط ویژه این تحقیق جستجو کرد. یکی از این شرایط، محدوده زمانی اعمال PS بر مادران حامله است. گرچه بیشتر اثرات هورمونی و رفتاری استرس در جوندگان، در هفته آخر حاملگی گزارش شده است [۹] لیکن با توجه به اعمال PS در دو دوره E۱۴-E۱۶ و E۱۷-E۱۹ در این پژوهش، این که PS دقیقاً در کدام روزها و با چه محدوده زمانی اعمال شده باشد، طبیعتاً باعث اختلاف نتایج تحقیقات مشابه خواهد شد. چنانچه برخی نتایج دو دوره مذکور پژوهش حاضر (E۱۴-E۱۶ و E۱۷-E۱۹) نیز، با هم اختلاف دارند.

سن انجام تست‌های رفتاری نظیر یادگیری و حافظه در فرزندان واجد PS، نقش بسزایی دارد. چنانچه در پژوهش M Gué، کاهش یادگیری در فرزندان ۲۴ الی ۲۹ روزه [۲۶]، مغایر با نتایج پژوهش حاضر بود که در فرزندان ۳/۵-۳ ماهه انجام شده است. فاکتور سن فرزندان مورد آزمایش، نتایج بسیار متنوعی را به خاطر تغییرات فیزیولوژیکی، تکاملی، تأثیر عوامل مرتبط با جنسیت در دوران بلوغ و به ویژه تأثیر شرایط و تجارب محیط خارجی، به دنبال دارد.

دلیل دیگر تنوع و تناقض در دستاوردهای این تحقیق و تحقیقات مشابه تفاوت، در ابزارها و روش‌های مورد استفاده برای PSD [۲۷] و MWM (مانند تنوع در قطر تانک، محل سکوی مخفی زیر آب، دمای آب، نقاط شروع آزمایش در تانک) [۱۵] می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که اعمال PSD در موش‌های حامله، بسته به اینکه در چه دوره و مدت زمانی اجرا شود، اثرات متفاوتی بر یادگیری فضایی فرزندان ماده بالغ آن‌ها خواهد داشت. اعمال PSD در دوره E۱۴-E۱۶، یادگیری و حافظه فضایی را متحمل تغییراتی ننموده است که شاید اثرات محافظتی هورمون‌های جنسی ماده در این خصوص قابل طرح باشد. علی‌رغم دوره E۱۴-E۱۶، عملکرد حیوانات در MWM در دوره E۱۷-E۱۹ بدتر شده و از دلایل احتمالی مربوط به این پدیده می‌توان تغییرات مورفولوژیک و آناتومیک هیپوکامپ و تغییر در عملکرد محور HPA را نام برد.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب و همکاری گروه زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده که بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

References

[1] Carlson NR. Foundations of physiological psychology. 4th ed. Allyn and bacon. 1999; pp: 210-344.

[2] Siegel JM. Phylogeny and the function of REM sleep. *Behav Brain Res,* 1995; 69(1-2): 29-34.

[3] Morrissey MJ, Duntley SP, Anch AM, Nonneman R. Active sleep and its role in the prevention of apoptosis in the developing brain. *Med Hypotheses*, 2004; 62(6): 876-9.

[4] Wetzel W, Wagner T, Balschun D. REM sleep enhancement induced by different procedures improves memory retention in rats. *Eur J Neurosci*, 2003; 18(9): 2611-7.

[5] Graves LA, Heller EA, Pack AI, Abel T. Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem,* 2003; 10(3): 168-76.

[6] Fujioka T, Fujioka A, Tan N, Chowdhury GM, Mouri H, Sakata Y, et al. Mild prenatal stress enhances learning performance in the non-adopted rat offspring. *Neuroscience*. 2001; 103(2): 301-7.

[7] Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev,* 2002; 26(4): 457-70.

[8] Sheibani V, Motamedi F. Study the effect of REM sleep deprivation on retention memory of rats after two-way active avoidance [Farsi]. MS.c thesis, Human Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Science and Health Services. 1995; pp: 26-33.

[9] Bjorness TE, Riley BT, Tysor MK, Poe GR. REM restriction persistently alters strategy used to solve a spatial task. *Learn Mem*, 2005; 12(3): 352-9.

[10] Ruskin DN, Liu C, Dunn KE, Bazan NG, LaHoste GJ. Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdale-mediated cued learning in rats. *Eur J Neurosci*, 2004; 19(11): 3121-4.

[11] Gué M, Bravard A, Meunier J, Veyrier R, Gaillet S, Recasens M, et al. Sex differences in learning deficits induced by prenatal stress in juvenile rats. *Behav Brain Res*, 2004; 150(1-2): 149-57.

[12] Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt, Gordon M, Luine VN. Sextually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology.* 2004; 145(8): 3778-87.

[13] Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, et al. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of the juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry*, 2003; 54(10): 1025-34.

[14] Velazquez-Moctezuma J, Dominguez Salazar E, Cruz Rueda ML. The effect of prenatal stress on adult sexual behavior in rats depends on the nature of the stressor. *Physiol Behav*, 1993; 53(3): 443-8.

[15] Youngblood BD, Zhou J, Smagin GN, Ryan DH, Harris RB. Sleep deprivation by the "flower pot" technique and spatial reference memory. *Physiol Behav*, 1997; 61(2): 249-56.

[16] Majlesi N, Kadkhodaee M, Parviz M. Study the interaction effect of serotonin and nitroxide (NO) on spatial learning of rat [Farsi]. PhD thesis, Human physiology, Tehran Medical University. 2002; pp. 24-40.

[17] Beylin AV, Shors TJ. Glucocorticoids are necessary for enhancing the acquisition of associative memories after acute stressful experience. *Horm Behav*, 2003; 43(1): 124-31.

[18] Szuran TF, Pliška V, Pokorny J, Welzl H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol Behav*, 2000; 71(3-4): 353-62.

[19] Bowman RE, Ferguson D, Luine VN. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience*. 2002; 113(2): 401-10.

[20] Lemaire V, Billard JM, Dutar P, George O, Piazza PV, Epelbaum J, et al. Motherhood-induced memory improvement persists across lifespan in rats but is abolished by a gestational stress. *Eur J Neurosci*, 2006; 23(12): 3368-74.

[21] Shors TJ, Miesegaes G. Testosterone in uterus and at birth dictates how stressful experience will affect learning in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2002; 99(21): 13955-60.

[22] Vallée M, MacCari S, Dellu F, Simon H, LeMoal M, Mayo W. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci*, 1999; 11(8): 2906-16.

[23] Zhu Z, Li X, Chen W, Zhao Y, Li H, Qing C, et al. Prenatal stress causes gender-dependent neuronal loss and oxidative stress in rat hippocampus. *Wiley Interscience*, 2004; 5(3): 225-30.

[24] Shors TJ. Learning during stressful times. *Learn Mem,* 2004; 11(2): 137-44.

[25] Son GH, Geum D, Chung S, Kim EJ, Jo JH, Kim CM, et al. Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *J Neurosci*, 2006; 26(12): 3309-18.

[26] Beylin AV, Gandhi CC, Wood GE, Talk AC, Matzel LD, Shors TJ. The role of the hippocampus in trace conditioning: temporal discontinuity or task difficulty? *Neurobiol Learn Mem*, 2001; 76(3): 447-61.

[27] Nabaii A, Motamedi F. Study relationship between REM sleep and memory, and caffein role in windows of paradoxical sleep in rat [Farsi]. MS.c thesis, Shahid Beheshti University, 1998; pp: 10-8

The Effects of REM Sleep Deprivation of Pregnant Rats on Spatial Learning of Their Adult Female Offspring

A.M. Poorrahimi MSc[1], **M. Abbasnejad** PhD[2], **V. Sheibani** PhD[3], **SH. Mazhari** MD[4]

Received: 03/04/07 **Sent for Revision: 01/07/07** **Received Revised Manuscript: 10/12/07** **Accepted: 26/02/08**

Background and Objective: Previous studies have shown that different environmental stresses during pregnancy, affect physiological behaviors of their offspring. In this study the effects of Rapid Eye Movement (REM) sleep deprivation or Paradoxical Sleep Deprivation (PSD) of pregnant rats were studied on the spatial learning of the adult female offspring by Morris water maze (MWM).

Materials and Methods: In this experimental study, flower pot technique was used for PSD. Pregnant rats were divided into 5 groups as follow; group1: in which PSD was performed in 3 days of gestation (E14, E15 and E16) by using small (5.5 cm in diameter) platform. Group2: pregnant rats on large (19 cm in diameter) platform as sham. Group3: Pregnant rats which did not achieved PSD (control). The same treatments were performed on two other groups of pregnant rats in E17, E18 and E19 (group 4 for small platform and group 5 for large platform). The female offspring of all the groups (after maturation in age of 3-3.5 months) were evaluated for MWM.

Results: Offspring of group1 and 2 did not show any significant differences in MWM spatial learning indices when compared with control groups while some of these indices were increased significantly in offspring of group 4 in compared with group 5 and control group ($p<0.05$).

Conclusion: According to the results, the effects of PSD in pregnant rat on the spatial learning of its adult female offspring rats depend on the duration and the time of the PSD producing various responses.

Key words: REM Sleep Deprivation, Spatial Learning, Pregnant Rat, Morris Water Maze

Funding: This research was jointly funded by: 1-Nouroscience Research Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 2- Shahid Bahonar Uniersity Kerman Iran.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Research and Ethics Committee of the Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Science of Iran approved the study.

1- MSc, Dept., of Biology, Shaheed Bahonar University, Kerman, Iran
(Corresponding Author) Tel: (0341) 3222032, Fax: (0341) 3222032, E-mail: alpoorrahimi2001@yahoo.com
2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Shaheed Bahonar University, Kerman, Iran
3- Assistant Prof., Dept. of Physiology, Nouroscience Reaserch Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran
4- General Physician, Nouroscience Reaserch Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran