

The Effect of Exposure to Noise-Induced Stress during Lactation on Cognitive Behaviors and Synaptic Plasticity in the Hippocampus of Rat Offspring

F. Aghighi (MSc)¹, M. Salami (PhD)¹, S. A. Talaei (PhD)^{*1}

1. Physiology Research Center, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran.

*Corresponding Author: S. A. Talaei (PhD)

Address: Physiology Research Center, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran.

Tel: +98 (31) 55589336. E-mail: talaei@kaums.ac.ir

Article Type ABSTRACT

Research Paper

Background and Objective: The critical period of brain development is the time period between the embryonic period and early life, during which the interaction of genetics and environmental signals leads to the formation of synaptic connections. Exposure to stress during lactation can affect the neurobiological development of offspring. The present study was conducted to investigate the effect of exposure to noise-induced stress during lactation on spatial learning and memory, as well as synaptic plasticity in rat offspring.

Methods: This experimental study was conducted on 4 groups including 10 45-day-old male Wistar rats: control group (CON), and offsprings whose mothers were exposed to noise level of 95 dB for 1 (ST1) or 2 (ST2) or 4 hours (ST4) during the daily lactation. Spatial learning and memory were examined using the Morris water maze test. Basal field excitatory postsynaptic potentials were recorded in the hippocampal CA1 region, and then, long-term potentiation (LTP) was induced by high-frequency stimulation. Serum corticosterone levels of the rats were measured and compared at the end of the study.

Findings: In the ST4 group, the time spent finding the platform increased compared to the CON group ($p < 0.001$). Furthermore, the ST4 group (8.91 ± 0.45 seconds) spent less time in the target quadrant compared to the control group (13.23 ± 0.74 seconds) ($p < 0.001$). Tetanic stimulation induced LTP in CA1 neurons of the control group (0.9 ± 0.01 mV) and conversely, induced long-term depression (LTD) in the ST4 group (0.5 ± 0.02 mV). Corticosterone in ST4 rats (128.50 ± 4.80 nmol/L) was significantly higher than the control group (97.63 ± 2.90 nmol/L) ($p < 0.001$).

Conclusion: The results of this study demonstrated that exposure of lactating rats to noise-induced stress disrupts spatial learning and memory of the offsprings, and leads to synaptic plasticity in hippocampal CA1 region in adulthood by increasing the serum corticosterone levels.

Keywords: Stress, Lactation, Hippocampus, Spatial Learning, Synaptic Plasticity, Rats.

Received:

Jun 7th 2024

Revised:

Sep 16th 2024

Accepted:

Oct 12nd 2024

Cite this article: Aghighi F, Salami M, Talaei SA. The Effect of Exposure to Noise-Induced Stress during Lactation on Cognitive Behaviors and Synaptic Plasticity in the Hippocampus of Rat Offspring. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2025; 27: e57.

تأثیر مواجهه با استرس صوتی در دوره شیردهی بر رفتارهای شناختی و شکل پذیری سیناپسی در هیپوکامپ فرزندان موش‌های صحرایی

فاطمه عقیقی (MSc)^۱، محمود سلامی (PhD)^۱، سید علیرضا طلائی (PhD)^{۱*}

۱. مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

نوع مقاله	چکیده
مقاله پژوهشی	سابقه و هدف: دوره بحرانی تکامل مغز، محدوده زمانی مربوط به دوران جنینی و ابتدای زندگی است که در آن برهمکنش ژنتیک و پیام‌های محیطی باعث شکل‌گیری ارتباطات سیناپسی می‌شود. قرارگرفتن در معرض استرس در دوران شیردهی می‌تواند بر تکامل نوروبیولوژیکی فرزندان اثر بگذارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر مواجهه با استرس صوتی در دوران شیردهی بر یادگیری و حافظه فضایی و نیز شکل‌پذیری سیناپسی فرزندان موش‌های صحرایی است. مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی روی ۴ گروه ۱۰ تایی از موش صحرایی نر نژاد ویستار ۴۵ روزه انجام شد: گروه کنترل (CON)، فرزندان که مادران آن‌ها در دوره شیردهی روزانه به مدت ۱ (ST1) یا ۲ (ST2) یا ۴ ساعت (ST4) در معرض استرس صوتی با شدت ۹۵ دسی بل بوده‌اند. یادگیری و حافظه فضایی با استفاده از ماز آبی موریس بررسی شد. پتانسیل‌های پس سیناپسی تحریکی میدان پایه در ناحیه CA1 هیپوکامپ ثبت شد و سپس، تقویت طولانی مدت (Long-Term Potentiation = LTP) با تحریک فرکانس بالا القا شد. میزان کورتیکوسترون سرم موش‌ها در پایان مطالعه اندازه‌گیری و مقایسه شد. یافته‌ها: در گروه ST4 زمان سپری شده برای یافتن سکو در مقایسه با گروه CON افزایش یافت ($p < 0.001$). همچنین، موش‌های گروه ST4 (8.91 ± 0.45 ثانیه) زمان کمتری را در ربع هدف در مقایسه با گروه کنترل (13.23 ± 0.74 ثانیه) سپری کردند ($p < 0.001$). اعمال تحریک تنانیک باعث القای LTP در نورون‌های ناحیه CA1 گروه کنترل (0.9 ± 0.01 میلی‌ولت) شد و بالعکس در گروه ST4 (0.5 ± 0.02 میلی‌ولت) باعث القای تضعیف دراز مدت (Long-Term Depression = LTD) گردید. کورتیکوسترون موش‌های ST4 ($12.8/50 \pm 4/80$) نانومول بر لیتر) به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ($9.7/63 \pm 2/90$ نانومول بر لیتر) ($p < 0.001$). نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که مواجهه موش‌های صحرایی شیرده با استرس صوتی از طریق بالابردن میزان کورتیکوسترون سرم فرزندان باعث مختل شدن یادگیری و حافظه فضایی و نیز شکل‌پذیری سیناپسی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ آن‌ها در بزرگسالی می‌گردد. واژه‌های کلیدی: استرس، شیردهی، هیپوکامپ، یادگیری فضایی، شکل‌پذیری سیناپسی، موش صحرایی.

استناد: فاطمه عقیقی، محمود سلامی، سید علیرضا طلائی. تأثیر مواجهه با استرس صوتی در دوره شیردهی بر رفتارهای شناختی و شکل‌پذیری سیناپسی در هیپوکامپ فرزندان موش‌های صحرایی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۴؛ ۲۷: ۵۵۷.

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی به شماره ۹۸۰۷۴ دانشگاه علوم پزشکی کاشان می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر سید علیرضا طلائی

رایانامه: talaei@kaums.ac.ir

آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات فیزیولوژی. تلفن: ۰۳۱-۵۵۵۸۹۳۳۶

مقدمه

استرس پاسخ فیزیولوژیک فرد به یک عامل استرس‌زا مثل تغییر در شرایط محیط اطراف است؛ این پاسخ با همکاری چندین سیستم در بدن پستانداران تولید می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها سیستم اتونوم و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (Hypothalamus Pituitary Adrenal= HPA) می‌باشد؛ اگرچه برخی استرس‌ها لازمه حفظ حیات هستند، اما بسیاری از آن‌ها، بالاخص زمانی که مزمن شوند، می‌توانند بر ساختار و عملکرد کلیه دستگاه‌های بدن اثر سوء بگذارند (۱). مواجه شدن با استرس به عنوان یک عامل بیرونی منجر به افزایش سطح پلاسمایی کورتیکوسترون می‌شود (۲ و ۳). کورتیکوسترون با واسطه گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی که حضور آن‌ها در نواحی مختلف مغز بالاخص ناحیه هیپوکامپ (۴ و ۵) ثابت شده است، اعمال اثر می‌کند. تئوری‌های موجود بر اهمیت دوگونه شکل‌پذیری سیناپسی شامل تقویت درازمدت (Long-Term Potentiation= LTP) و تضعیف درازمدت (Long-Term Depression= LTD) در تشکیل حافظه تاکید می‌کنند (۶). به نظر می‌رسد که LTP منعکس‌کننده مکانیسم‌های سیناپسی در تشکیل حافظه باشد. در واقع LTP افزایش درازمدت در تقویت انتقال سیناپسی است که متعاقب فعالیت سیناپسی با فرکانس بالا ایجاد می‌شود و به عنوان یکی از روندهای سلولی مداخله‌کننده در ذخیره حافظه تلقی شده است (۶). شواهد حاکی از آن است که استرس از طریق تغییرات نورواندوکرینی مانند افزایش طولانی مدت در سطح گلوکوکورتیکوئید پلازما باعث اختلال در القای LTP و تسهیل LTD در هیپوکامپ می‌شود (۷). همچنین نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض استرس صوتی علاوه بر افزایش دادن ترشح پایه کورتیکوسترون و اختلال در یادگیری و تثبیت حافظه فضایی و برخی پارامترهای هماتولوژیک، اثری منفی بر پاسخ سیناپسی پایه ثبت شده از نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ داشته و منجر به کاهش القای LTP در موش‌های صحرایی می‌گردد (۸ و ۹).

در دوران حساس جنینی و شیرخوارگی دستگاه عصبی پستانداران به شدت تحت تاثیر عوامل درونی و بیرونی است (۱۰). استرس به عنوان یک عامل خارجی در دوران نوزادی می‌تواند اثراتی طولانی مدت بر ساختار و عملکرد هیپوکامپ داشته باشد (۱۱). نشان داده شده است که توسعه سلول‌های گرانولی در ناحیه DG هیپوکامپ موش‌های صحرایی در اواخر دوران جنینی شروع شده و تا هفته اول بعد از تولد ادامه دارد (۱۲)، از این رو مواجهه با استرس در دوران ابتدایی بعد از تولد می‌تواند ساختار و تکامل هیپوکامپ را دستخوش تغییر قرار دهد (۱۳). مطالعات قبلی نشان دادند که تجویز کورتیکوسترون آگروژن نشان‌دار شده منجر به افزایش سطح کورتیکوسترون در شیر مادر و حضور کورتیکوسترون نشان‌دار در مغز و پلاسمای فرزندان می‌گردد، که این یافته بیانگر این امر است که کورتیکوسترون می‌تواند از شیر مادر عبور کرده و به شیرخوار برسد (۱۴). استرس با اثر بر اکسی‌توسین و پرولاکتین و در نتیجه مهار سنتز و تخلیه شیر، به صورت مستقیم و با اثر بر فاکتورهایی مثل اپیوئیدها و نوروپپتید Y و رفتارهای مادرانه، به صورت غیرمستقیم شیردهی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۵ و ۱۶). علی‌رغم اینکه استرس وارد شده به مادر در دوران شیردهی نمی‌تواند باعث فعال شدن محور HPA در فرزندان گردد اما منجر به پیامدهای رفتاری طولانی مدتی همچون اضطراب در فرزندان موش‌های سوری می‌شود که مشابه زمانی است که فرزندان مستقیماً در معرض استرس قرار گرفته باشند (۱۷). بنابراین به نظر می‌رسد که قرار گرفتن در معرض استرس در طولانی مدت علاوه بر تاثیر بر مراقبت‌های مادرانه و ترکیب شیر بتواند بر تکامل نوروبیولوژیکی فرزندان نیز اثر بگذارد (۱۸). نشان داده شده است که خوردن دوز بالایی از کورتیکوسترون حل شده در آب آشامیدنی توسط موش صحرایی شیرده منجر به افزایش سطح کورتیکوسترون و کاهش القای LTP در ناحیه CA1 هیپوکامپ فرزندان ۴۵ روزه آن‌ها می‌گردد (۱۹). هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر مواجهه با استرس صوتی در دوره شیردهی بر یادگیری و حافظه فضایی و القای LTP در هیپوکامپ فرزندان موش‌های صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان با کد IR.KAUMS.MEDNT.REC.1398.062، بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر با وزن حدود ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم و سن ۴۵ روزه از نژاد ویستار انجام شد، که به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. مادران موش‌های گروه کنترل (CO) در دوران شیردهی در شرایط استاندارد حیوانخانه نگهداری شدند و مادران حیوانات گروه‌های ST1، ST2 و ST4 در دوران شیردهی به ترتیب روزانه ۱، ۲ و ۴ ساعت در روز در معرض استرس صوتی بودند. در بقیه مواقع حیوانات در یک محیط استاندارد از نظر دما (۲۲±۲) درجه سانتی‌گراد و رطوبت محیط (۵۵±۵٪) نگهداری می‌شدند و دسترسی آزادانه به آب و مواد غذایی داشتند. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با دستورالعمل‌های کمیته اخلاق رعایت گردید.

مواجهه با استرس صوتی: به منظور تولید صدای یکنواخت در محیط و نیز مواجه شدن همه جانبه حیوانات با صوت، قفس آن‌ها در محفظه انعکاسی از جنس پلکسی گلاس و با ابعاد $90 \times 60 \times 60$ سانتی‌متر قرار گرفت. برای مواجه کردن مادران شیرده با آلودگی صوتی ترافیک شهری، ابتدا صدای ناشی از ترافیک در یکی از میدانی پرتراфик شهر تهران (میدان انقلاب) ضبط شده و با استفاده از نرم‌افزار Sonar 8.5 شدت آن معادل ۹۵ دسی‌بل تنظیم شد. سپس، توسط یک بلندگو که در فاصله ۳۰ سانتی‌متری بالای قفس حیوان قرار داشت، در محیط پخش شد. برای اینکه حیوانات در همه ساعات در معرض شدت صوت یکسان قرار بگیرند با یک دستگاه Sound Level Meter شدت صوت در تمام مدت زمان مواجهه پایش می‌شد (۷). با توجه به اینکه صدای ضبط شده از ترافیک طیف وسیعی از فرکانس‌های صوتی را در بر می‌گیرد، در این تحقیق تنها شدت آزارنده صوت مد نظر قرار گرفت. موش‌های صحرایی شیرده هر روز بین ساعات ۸ صبح تا ۱۲ ظهر که ترشح کورتیکوسترون در کمترین حد خود می‌باشد (۲۰) در مواجهه با صوت قرار گرفتند.

سنجش یادگیری و تثبیت حافظه فضایی: برای این کار از ماز آبی موریس استفاده شد. ماز یک تانکر آب است که به طور فرضی به چهار ربع مساوی شمالی، جنوبی، شرق و غربی تقسیم شده و یک سکوی نجات در وسط یکی از این چهار ربع قرار می‌گیرد؛ به طوری که حدود $1/5$ سانتی‌متر زیر سطح آب واقع می‌شود و از بیرون قابل دیدن نیست. در اتاق محل استقرار ماز علائم فضایی مختلفی وجود دارد که در طول آزمایشات ثابت بوده و برای حیوان در ماز قابل دیدن است. رفتار حیوان در ماز از طریق دوربین مونتور شده و با استفاده از نرم‌افزار «دریاب» ویرایش ۷ آنالیز می‌شود.

مرحله یادگیری یا آموزش: طی این مرحله، حیوان از یکی از سمت‌های چهارگانه فرضی در حالی که صورت آن به طرف دیواره ماز است، در آب رها می‌شد و حداکثر ۶۰ ثانیه فرصت داشت تا سکوی نجات را پیدا کند. در صورتی که حیوان به طور اتفاقی سکوی پنهان را پیدا می‌کرد و روی آن قرار می‌گرفت، به حیوان اجازه داده می‌شد تا به مدت ۱۵ ثانیه روی سکو بماند و با جستجوی اطراف و دیدن علائم موجود در آزمایشگاه موقعیت خود را شناسایی کند. اگر در مدت تعیین شده موش نمی‌توانست سکو را پیدا کند، حیوان توسط محقق به آرامی به سوی سکو هدایت می‌شد تا سکو را یافته و برای ۱۵ ثانیه روی آن قرار گیرد. پس از گذشت این زمان، حیوان از سکو برداشته شده و بعد از خشک شدن با یک حوله به قفس خود برگردانده می‌شد. پس از ۱۰ دقیقه آزمایش تکرار می‌شد؛ با این تفاوت که محل رها شدن موش در ماز نسبت به مرحله قبل متفاوت بود. هر موش روزانه ۴ جلسه آموزش با فاصله ۱۰ دقیقه‌ای داشت. در مجموع این مرحله از آزمایش به مدت ۳ روز طول کشید و طی آن ۱۲ جلسه آزمایش روی حیوانات انجام گرفت. میانگین زمان لازم برای رسیدن به سکو و نیز مسافت پیموده شده در آن زمان توسط موش‌های گروه‌های مختلف در هر روز ملاک روند یادگیری فضایی بود (۲۱).

مرحله بازخوانی حافظه فضایی یا پروب: بلافاصله پس از تکمیل ۴ مرحله یادگیری در شب سوم، سکوی نجات از ماز برداشته شده و آزمایش انجام شد. و این نکته مورد توجه بود که موش در حین آزمایش (که قاعدتاً قادر به یافتن سکو نیست) بیشترین وقت خود را در کدامیک از قسمت‌های چهارگانه ماز می‌گذراند. در این مرحله از آزمایش هر موش تنها ۳۰ ثانیه فرصت داشت تا در ماز شنا کند و پس از آن از ماز خارج می‌شد. مدت زمان ماندن و نیز مسافت پیموده شده در ربع صحیح ماز (که در مرحله قبل واجد سکو بود) معیار یادآوری قرار گرفت (۲۱).

الکتروفیزیولوژی: در روز بعد از اتمام بررسی‌های رفتاری، موش‌ها به واسطه تزریق داخل صفاقی اورتان ($1/5$ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از ثابت نمودن سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA)، با تزریق 0.5 میلی‌لیتر محلول لیدوکائین ۱٪ زیر پوست سر حیوان، علاوه بر ایجاد بی حسی موضعی، پوست سر نیز از جرمه جدا می‌شد تا بریدن آن به آسانی صورت پذیرد. سپس، پوست سر از ناحیه پشت گردن تا نزدیک بینی بریده شده تا جرمه نمایان می‌شد. پس از تعیین نواحی برگما، لامبدا و خط وسط روی جرمه، محل قرارگیری الکترودها به وسیله اطلس استریوتاکسیک مشخص می‌شد. الکترود تحریکی در مختصات ($AP = -4/2 \text{ mm}$, $LR = 2/8 \text{ mm}$, $D = 2/4 \text{ mm}$) در محل اکسون نورون‌های ناحیه انتورینال کورتکس میانی و الکترود ثبات نیز در مختصات ($AP = -3/4 \text{ mm}$, $LR = 2/5 \text{ mm}$, $D = 2/5 \text{ mm}$) روی دندربیت نورون‌های ناحیه CA1 قرار می‌گرفت. الکترودها هر دو دوقطبی و از جنس استیل زنگ نزن با پوشش تفلون و قطر 0.005 اینچ (A-M Systems USA) بودند. پس از قرار گرفتن الکترودها در محل اختصاصی و برای اطمینان بیشتر با اعمال پالس‌های تحریکی زوج (Paired Pulse) صحت محل الکترود مورد بررسی قرار می‌گرفت. بلندتر بودن حداقل ۲۰ درصدی دامنه دومین پاسخ نسبت به دامنه پاسخ اول، نشان از درستی محل قرارگیری الکترودهای پایدار و تحریکی داشت. در پاسخ به تحریک نورون‌های انتورینال کورتکس، پتانسیل‌های پس‌سیناپسی تحریکی (Excitatory Post Synaptic Potential = EPSP) ابتدا توسط آمپلی فایر (WSI, A3308, I.R.Iran) تا ۱۰۰۰ برابر تقویت شده و سپس با ورود به بورد مبدل آنالوگ به دیجیتال (Electromodule 12, ScienceBeam, Iran) تبدیل به داده‌های رقمی شده و در پایان ثبت می‌شدند. پس از حدود ۳۰ دقیقه ثبت اولیه پاسخ‌ها و زمانی که دامنه پاسخ با شدت تحریک ثابت بدون تغییر می‌ماند، منحنی Input/Output رسم می‌شد. شدتی از تحریک الکتریکی که در آن ۶۰٪ حداکثر دامنه پاسخ به دست می‌آمد به عنوان شدت تحریک برای ادامه روند آزمایش و نیز برای اعمال تحریک تتانیک انتخاب می‌شد. تحریکات با فرکانس 0.1 هرتز، مدت ۱۰۰ میلیونیم ثانیه و با تاخیر ۵ هزارم ثانیه اعمال می‌گردید. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه EPSP ثبت می‌شد. برای القای LTP در مدار نورونی مورد آزمایش تحریک تتانیک با فرکانس بالا (High Frequency Stimulation = HFS) اعمال می‌شد. الگوی این تحریک شامل ۱۰ قطار شامل ۱۰ تحریک با فرکانس ۲۰۰ هرتز و فاصله ۲ هزارم ثانیه

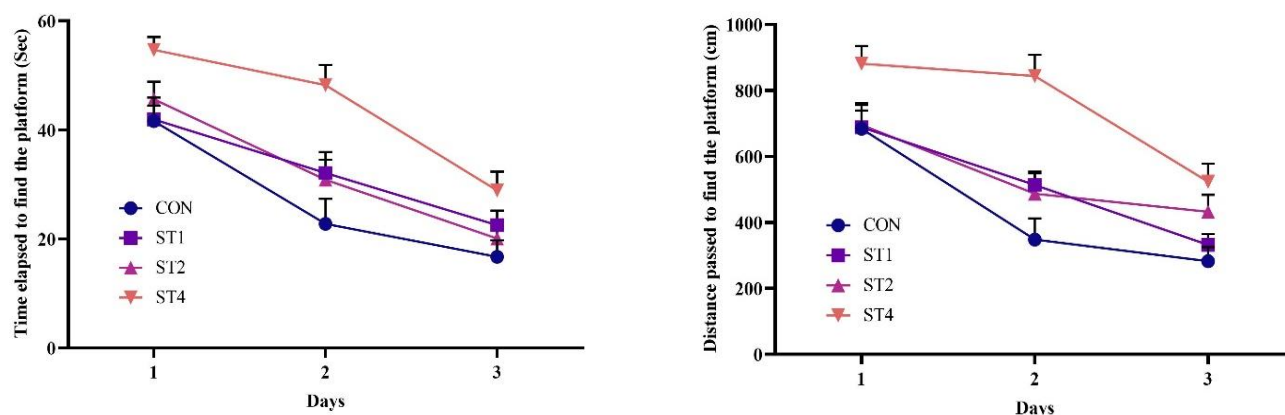
بود. مدت زمان هر پالس تحریکی نیز ۱/۰ هزارم ثانیه بود. پس از تحریک تتانیک روند تحریک و ثبت به مدت ۹۰ دقیقه ادامه می‌یافت. از نرم‌افزار NuroTrace® (ScienceBeam, Iran) برای پدیده‌های تحریک و ثبت و نیز تجزیه و تحلیل پاسخ‌ها استفاده شد. به منظور مقایسه گروه‌ها، درصد تغییر دامنه پاسخ‌ها بر حسب میلی‌ولت قبل و بعد از اعمال تحریک تتانیک مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش یا کاهش حداقل ۲۰٪ در دامنه پاسخ‌ها پس از تحریک تتانیک به ترتیب به عنوان معیار وقوع LTP و LTD در نظر گرفته شد (۱۲ و ۱۳).

سنجش کورتیکوسترون سرم: پس از اتمام آزمایشات الکتروفیزیولوژی و هنگامی که هنوز حیوانات در بیهوشی عمیق بودند، با استفاده از گیوتین سرشان جدا شده و پس از جمع‌آوری نمونه خون از ورید ژگولار، ابتدا نمونه‌ها در دمای اتاق و در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و برای انجام آزمایشات بعدی سرم خون جدا شده و در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان کورتیکوسترون سرم حیوانات با استفاده از کیت RIA (DRG, Germany) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده بررسی شد. میزان کورتیکوسترون سرم خون حیوانات توسط دستگاه گاما کانتر (Berthold; LB951G, Germany) سنجیده شد.

آنالیز آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism ویرایش ۹ و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس‌آزمون Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

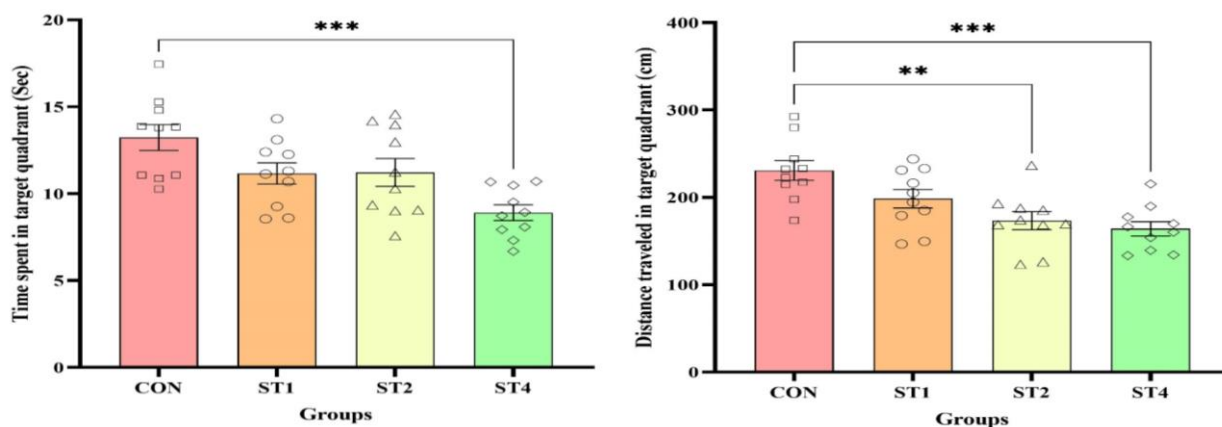
یافته‌ها

پس از بررسی اطلاعات مربوط به یادگیری و حافظه فضایی در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از ماز آبی موریس، داده‌های مربوط به زمان سپری شده و مسافت پیموده شده تا رسیدن به سکوی پنهان در مرحله یادگیری و نیز مدت زمان سپری شده و مسافت طی شده در ربع هدف در مرحله تثبیت حافظه (پروپ)، نتایج زیر حاصل شد. همزمان با پیشرفت روزانه مراحل یادگیری، حیوانات همه گروه‌ها محل سکوی پنهان را آموخته و مدت زمان کمتر و مسافت پیموده شده کمتری را صرف یافتن سکوی کردند. آنالیز داده‌ها نشان داد اختلاف بین گروه‌های کنترل و ST4 از نظر آماری معنی‌دار است و موش‌های گروه ST4 زمان بیشتری را صرف یافتن سکوی پنهان کرده و مسافت بیشتری را نیز پیموده‌اند ($p < ۰/۰۰۱$ برای هر دو مقایسه) (نمودار ۱).



نمودار ۱. زمان سپری شده (تصویر سمت چپ) و مسافت پیموده شده (تصویر سمت راست) جهت یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات در آزمون ماز آبی موریس در روزهای مختلف آزمایش. اختلاف بین گروه‌های CON و ST4 در هر دو مورد معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۱$). داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده‌اند ($n=10$).

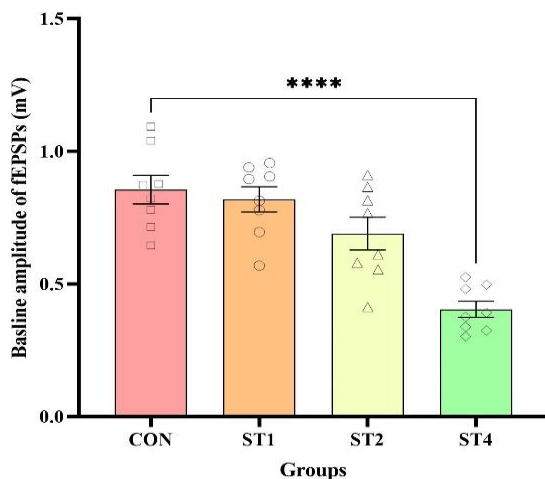
نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌ها با آزمون آنالیز واریانس بیانگر این مطلب است که در مرحله یادآوری حافظه موش‌های گروه‌های استرس در مقایسه با گروه کنترل زمان کمتری را در ربع هدف سپری کرده و مسافت کمتری را نیز پیموده بودند و هر چقدر زمان مواجهه با استرس برای مادران آن‌ها در دوران شیردهی بیشتر بود، این مقادیر کمتر بود (نمودار ۲). موش‌های گروه کنترل از مجموع ۳۰ ثانیه زمان آزمون پروپ $13/23 \pm 0/74$ ثانیه را در ربع هدف سپری کرده و این زمان برای موش‌های گروه ST4 $8/91 \pm 0/45$ بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۱$). در مورد مسافت پیموده شده در ربع هدف نیز اختلاف بین گروه‌های کنترل و ST2 ($p < ۰/۰۰۱$) و نیز ST4 معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۱$).



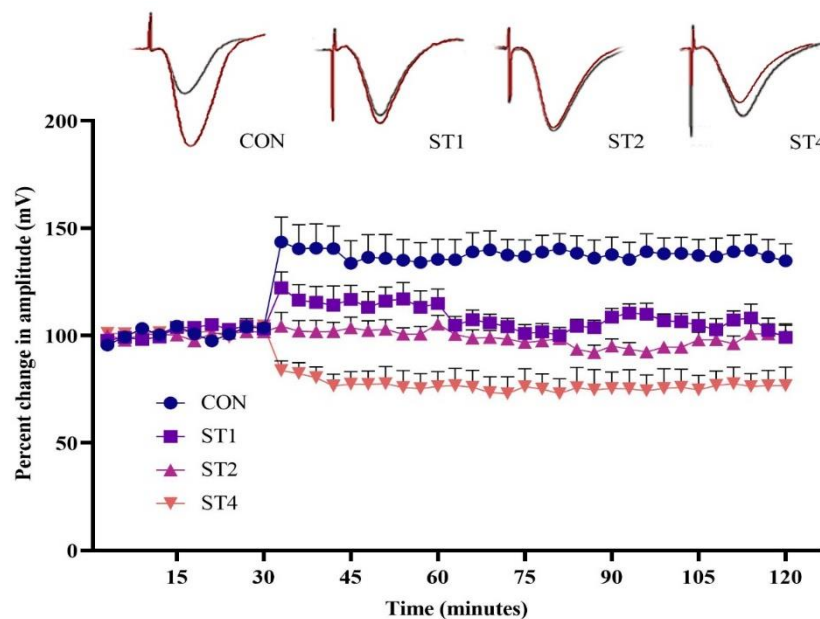
نمودار ۲. مدت زمانی که موش های گروه های آزمایش در مرحله بازخوانی اطلاعات صرف کردند (تصویر سمت چپ) و مسافتی که پیمودند (تصویر سمت راست) تا سکوی پنهان را بیابند. **اختلاف بین گروه های CON و ST2 معنی دار است ($p < 0.01$), ***اختلاف بین گروه های CON و ST4 معنی دار است ($p < 0.001$). داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده اند ($n=10$).

داده های مربوط به پاسخ های ثبت شده در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش های صحرایی که مادران آنها دوره شیردهی استاندارد را طی کرده بودند، نشان داد که میانگین دامنه پاسخ های پایه در آنها 0.86 ± 0.05 میلی ولت بوده و این در حالی است که مواجهه شدن مادر شیرده با استرس باعث ایجاد کاهش در دامنه پاسخ های پایه شده و هر چقدر طول دوره مواجهه با استرس بیشتر بوده این روند کاهشی شدیدتر می شود؛ به طوری که میانگین دامنه پاسخ ها در گروه ST4 به 0.40 ± 0.03 میلی ولت رسیده و اختلاف آن از نظر آماری با گروه CON معنی دار می شود ($p < 0.001$; نمودار ۳).

بعد از ثبت پاسخ های پایه به مدت ۳۰ دقیقه با اعمال تحریک تتانیک با فرکانس ۲۰۰ هرتز، LTP در مدار مسیر پرفورنت به ناحیه CA1 القا شده و سپس ثبت به مدت ۹۰ دقیقه ادامه یافت. بررسی نتایج نشان می دهد که القای LTP منجر به افزایش قابل توجهی در دامنه fEPSPها در گروه CON گردیده و اختلاف بین قبل و بعد از القای LTP (به طور میانگین ۳۷٪ افزایش دامنه) معنی دار بود ($p < 0.01$). همان گونه که در نمودار ۴ نیز مشخص گردیده است، اعمال تحریک تتانیک به نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ حیوانات گروه های استرس باعث شد میانگین تغییر دامنه بعد از اعمال HFS در گروه های ST1، ST2 و ST4 به ترتیب حدود ۸٪ افزایش، ۱٪ کاهش و ۲۳٪ کاهش باشد؛ به عبارت دیگر در گروه ST4 به جای LTP، LTD القا شده بود. نتایج آزمون آماری نشان داد اختلاف بین دامنه پاسخ ها قبل و بعد از اعمال تحریک تتانیک فقط در گروه ST4 معنی دار است ($p < 0.01$) و به علاوه اختلاف آماری بین میانگین دامنه پاسخ ها پس از اعمال تحریک تتانیک بین گروه کنترل و هر سه گروه استرس وجود داشت ($p < 0.01$).

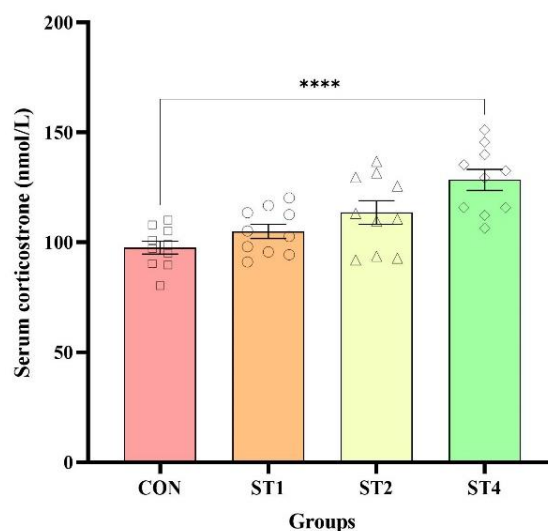


نمودار ۳. مقایسه میانگین دامنه پاسخ ها در گروه های مختلف مطالعه. ****اختلاف دامنه بین گروه های CON و ST4 معنی دار است ($p < 0.0001$). داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده اند ($n=10$).



نمودار ۴. تغییر دامنه fEPSP های ثبت شده از ناحیه CA1 هیپوکامپ موش های صحرایی گروه های مختلف آزمایش پس از اعمال تحریک تتانیک. ثبت هایی که قبل و بعد از القای HFS برای گروه های مختلف به دست آمد. اختلاف بین دامنه پاسخ ها قبل و بعد از القای LTP در گروه های CON و ST4 معنی دار است ($p < 0.001$). همچنین، اختلاف دامنه پاسخ ها بعد از القای LTP بین گروه کنترل و سه گروه استرس معنی دار است ($p < 0.001$). داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده اند ($n=10$).

در پایان آزمایش ها میزان کورتیکوسترون سرم حیوانات بررسی و مشخص گردید میانگین آن در سرم حیوانات گروه کنترل $97/63 \pm 2/90$ نانومول بر لیتر است و مواجه شدن مادران شیرده با استرس باعث افزایش مقدار آن در خون فرزندان می شود؛ به طوری که میزان آن در خون حیواناتی که مادران آنها در دوران شیردهی روزانه ۴ ساعت در معرض استرس بودند، $128/50 \pm 4/80$ نانومول بر لیتر بود و اختلاف آن با گروه کنترل معنی دار بود ($p < 0.0001$) (نمودار ۵).



نمودار ۵. میزان کورتیکوسترون سرم (نانومول بر لیتر) حیوانات گروه های مختلف در پایان مطالعه. **** اختلاف بین گروه های CON و ST4 معنی دار است ($p < 0.0001$). داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده اند ($n=10$).

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه مادر در دوران شیردهی با استرس صوتی باعث می‌شود یادگیری فضایی فرزندان بالغ آن‌ها در ماز آبی موریس مختل شود و آن‌ها به هنگام فراخوانی حافظه فضایی نیز دچار مشکل باشند؛ به عبارت دیگر می‌توان گفت حافظه فضایی آن‌ها تثبیت نشده است. همچنین، بررسی دامنه پتانسیل‌های پس سیناپسی میدانی ثبت شده از نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ فرزندان آن‌ها نشان داد که مواجهه مادر با استرس در دوران شیردهی به مدت ۱، ۲ و ۴ ساعت باعث کاهش دامنه پاسخ‌ها در فرزندان آن‌ها می‌شود که می‌توان آن را نوعی کاهش فعالیت نورونی عنوان کرد و مهم‌تر از آن شکل پذیری سیناپسی نورون‌های این ناحیه نیز مختل شده و متعاقب اعمال تحریک تنانیک به نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ آن‌ها نه تنها تقویت درازمدت مشاهده نمی‌شود که حتی با پدیده تضعیف درازمدت مواجه هستیم. همچنین مشاهده شد که کورتیکوسترون در گردش، فرزندان آن‌ها روزانه ۴ ساعت با استرس صوتی مواجه شدند، بالاتر از حد معمول بود که این به تنهایی می‌تواند دلیل محکمی بر مشاهدات قبلی ما باشد.

نشان داده شده به هنگام مواجهه طولانی مدت مادر شیرده با انواع مختلف استرس فیزیکی و روانی، همزمان با فعال شدن محور HPA مادر افزایش سطح کورتیکوسترون پلازما در فرزندان نیز دیده می‌شود؛ برای مثال، در یک مطالعه نشان داده شد که مواجهه مادر شیرده با استرس فیزیکی باعث بالا رفتن کورتیکوسترون پلاسمائی فرزندان وی از $15/52 \pm 7/94$ تا $31/65 \pm 9/31$ میلی گرم در دسی لیتر) می‌شود و هر چقدر زمان مواجهه با استرس بالاتر باشد، افزایش کورتیکوسترون پلاسمای فرزندان مشهودتر است (۲۳). همچنین بیان شده است که افزودن کورتیکوسترون به آب خوراکی طی دوران شیردهی منجر به کاهش گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی نوع ۱ و ۲ در هیپوکامپ فرزندان ۳۰ روزه آن‌ها می‌گردد (۲۴). گزارش شده است که وارد شدن استرس به مادر منجر به کاهش تنظیمی GRS در هیپوکامپ و ایجاد واکنش پذیری HPA می‌شود، که ممکن است دلایل تغییر در رفتار ناشی از استرس فرزندان باشد (۲۵).

در دوره بحرانی تکامل مغز پستانداران، دوران جنینی و ابتدای تولد، هر دو عامل ژنتیک و عوامل محیطی بر CNS تأثیر می‌گذارند و نتایج بسیاری از مطالعات حاکی از این است که قرار گرفتن در معرض هرگونه استرس به طور مزمن بر برنامه ریزی و توسعه سیستم عصبی فرزندان تأثیر می‌گذارد (۲۶). نشان داده شده است که استرس مزمن و افزایش گلوکوکورتیکوئید ناشی از آن باعث تغییر فعالیت نوروشیمیایی، تحریک پذیری، نوروژنز و حتی مرگ سلولی در مدارهای ناحیه هیپوکامپ می‌گردد (۲۷). در یک مطالعه موش‌ها در ۳ هفته بارداری در معرض استرس حضور در مقیدکن (Restrainer) قرار گرفتند؛ تراکم گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید (GRs) در هیپوکامپ فرزندان ماده آن‌ها ۵۰٪ کمتر از فرزندان بدون استرس بود (۲۸). محرومیت طولانی مدت از تیمار مادری به عنوان یک استرس باعث افزایش پاسخ‌های اندوکرینی و رفتاری به استرس می‌شود (۲۹)؛ به طوری که در مطالعه‌ای نشان داده شد که این حیوانات در بزرگسالی رفتارهای اضطرابی بیشتری را در پلاس ماز از خود نشان می‌دهند (۳۰). از طرف دیگر در مطالعه‌ای نشان داده شد که مصرف دوز پایینی از کورتیکوسترون از طریق آب آشامیدنی موجب بهبود قدرت یادگیری و کاهش رفتارهای اضطرابی و ترس در فرزندان آن‌ها می‌گردد (۳۱) که البته تمام این وقایع در حضور سطح بالای کورتیکوسترون مختل و مهار می‌گردند (۱۸).

شواهد حاصل از مطالعات دانشمندان در زمینه LTP، یادگیری و حافظه این عقیده را به ذهن متبادر می‌سازد که LTP همان مکانیسم حافظه و یادگیری است (۳۲). LTP یک فرآیند فیزیولوژیک کاملاً شناخته شده است که از طریق اعمال تحریکات پرفرکانس بر مدارهای عصبی القا شده و یک مدل مقبول آزمایشگاهی برای تغییر فعالیت سیناپسی یا به اصطلاح شکل پذیری سیناپسی است (۳۳). به علاوه، تشکیلات هیپوکامپ و بالاحص ناحیه CA1 آن با داشتن مدارهای منظم عصبی جایگاهی بسیار مناسب برای بررسی این فرآیند می‌باشند (۳۴). ما دریافتیم که مواجهه با استرس در طول دوران شیردهی منجر به سرکوب القای LTP و تخریب حافظه و یادگیری فضایی می‌شود. نتایج مطالعات مختلف، نشان دهنده وجود اختلال در روند یادگیری، تثبیت حافظه و اعمال شناختی همراه با اختلال در القای LTP در نتیجه مواجهه با استرس است (۳۵ و ۳۶). نشان داده شد که محرومیت از تیمار مادری از تولد تا ۲۱ روزگی روزانه به مدت ۳ ساعت منجر به تخریب یادگیری و حافظه فضای در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در سن ۶۰ تا ۸۰ روزگی می‌شود (۳۷). در تحقیق قبلی دریافتیم که قرار گرفتن در معرض استرس صوتی به مدت ۲ یا ۴ ساعت در هفته سوم بارداری علاوه بر افزایش دادن ترشح پایه کورتیکوسترون در فرزندان نر و اختلال در یادگیری و تثبیت حافظه فضایی این فرزندان، اثری منفی بر پاسخ سیناپسی پایه ثبت شده از نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ داشته و منجر به کاهش القای LTP در فرزندان موش‌های صحرایی می‌گردد (۳۸). مکانیسم دقیقی که استرس دوران شیردهی از واسطه آن شکل پذیری سیناپسی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، هنوز شناخته نشده است. به نظر می‌رسد که تغییرات ساختاری هیپوکامپ در دوران شیرخوارگی با اختلالات سیناپسی بزرگسالی همراه است و این اصل که سطح بالای کورتیکوسترون ناشی از استرس اثرات طولانی مدتی بر فرزندان می‌گذارد، به اثبات رسیده است. مطالعات گسترده از این دیدگاه حمایت می‌کنند که هم انعطاف پذیری و هم پیامدهای پاتولوژیک در بزرگسالی ممکن است به سطوح کورتیکوسترون در گردش بستگی داشته باشد و این اثرات از نمایه U شکل پیروی می‌کند (۲۸).

مواجهه موش‌های صحرایی شیرده با استرس صوتی از طریق بالابردن میزان کورتیکوسترون سرم فرزندان می‌تواند باعث مختل شدن یادگیری و حافظه فضایی و نیز شکل‌پذیری سیناپسی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ آن‌ها در بزرگسالی شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان و اعضا و کارکنان مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، به دلیل همکاری‌های بسیار آن‌ها، همچنین از آقای هادی فرهمند برای همکاری بی دریغ ایشان در انجام این مطالعه، قدردانی می‌گردد.

References

1. Talaei SA, Azami A, Salami M. Postnatal development and sensory experience synergistically underlie the excitatory/inhibitory features of hippocampal neural circuits: Glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neuroscience*. 2016;318:230-43.
2. Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun*. 2005;19(4):296-308.
3. Shin HS, Lee SH, Moon HJ, So YH, Jang HJ, Lee KH, et al. Prolonged stress response induced by chronic stress and corticosterone exposure causes adult neurogenesis inhibition and astrocyte loss in mouse hippocampus. *Brain Res Bull*. 2024;208:110903.
4. Zhang TY, Labonté B, Wen XL, Turecki G, Meaney MJ. Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):111-23.
5. Buurstedde JC, van Weert LTCM, Colucci P, Gentenaar M, Viho EMG, Koorneef LL, et al. Hippocampal glucocorticoid target genes associated with enhancement of memory consolidation. *Eur J Neurosci*. 2022;55(9-10):2666-83.
6. Stacho M, Manahan-Vaughan D. The Intriguing Contribution of Hippocampal Long-Term Depression to Spatial Learning and Long-Term Memory. *Front Behav Neurosci*. 2022;16:806356.
7. Aghighi Bidgoli F, Salami M, Talaei SA. Environmental enrichment restores impaired spatial memory and synaptic plasticity in prenatally stress exposed rats: The role of GABAergic neurotransmission. *Int J Dev Neurosci*. 2020;80(7):573-85.
8. Zhang Y, Zhu M, Sun Y, Tang B, Zhang G, An P, et al. Environmental noise degrades hippocampus-related learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(1):e2017841117.
9. Nazemi S, Pejhan A, Azhdari-Zarmehri H, Mojadadi M S. The Effects of Sound Pollution on the Serum Levels of Corticosterone and Other Hematological Parameters in Male Rats. *J Babol Univ Med Sci*. 2015;17(8):41-7. [In Persian]
10. Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res*. 2000;47(3):291-300.
11. Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus*. 2009;19(12):1222-31.
12. Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*. 1990;301(3):365-81.
13. Orelund S, Nylander I, Pickering C. Prolonged maternal separation decreases granule cell number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats. *Int J Dev Neurosci*. 2010;28(2):139-44.
14. Angelucci L, Patacchioli FR, Scaccianoce S, Di Sciullo A, Cardillo A, Maccari S. A model for later-life effects of perinatal drug exposure: maternal hormone mediation. *Neurobehav Toxicol Teratol*. 1985;7(5):511-7.
15. Neumann ID, Toschi N, Ohl F, Torner L, Krömer SA. Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. *Eur J Neurosci*. 2001;13(5):1016-24.
16. Chen P, Smith MS. Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin. *Endocrinology*. 2004;145(2):823-9.

- 17.Moles A, Rizzi R, D'Amato FR. Postnatal stress in mice: does "stressing" the mother have the same effect as "stressing" the pups?. *Dev Psychobiol*. 2004;44(4):230-7.
- 18.Fodor A, Zelena D. The effect of maternal stress activation on the offspring during lactation in light of vasopressin. *Sci World J*. 2014;2014:265394.
- 19.Domenici MR, Casolini P, Catalani A, Ruggieri V, Angelucci L, Sagratella S. Reduced hippocampal in vitro CA1 long-term potentiation in rat offsprings with increased circulating corticosterone during neonatal life. *Neurosci Lett*. 1996;218(1):72-4.
- 20.Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(1):45-54.
- 21.Mohammadifar M, Aghighi F, Salami M, Talaei SA. Evaluation of the effects of morphine consumption during lactation period on learning and memory of rat's offspring. *Sci J Kordistan Univ Med Sci*. 2018;23(3):36-44. [In Persian]
- 22.Talaei SA, Salami M. Sensory experience differentially underlies developmental alterations of LTP in CA1 area and dentate gyrus. *Brain Res*. 2013;1537:1-8.
- 23.Levine S, Thoman EB. Physiological and behavioral consequences of postnatal maternal stress in rats. *Physiol Behav*. 1969;4(2):139-42.
- 24.Casolini P, Cigliana G, Alemà GS, Ruggieri V, Angelucci L, Catalani A. Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life. *Neuroscience*. 1997;79(4):1005-12.
- 25.Sajjadi FS, Aghighi F, Vahidinia Z, Azami-Tameh A, Salami M, Talaei SA. Prenatal urban traffic noise exposure impairs spatial learning and memory and reduces glucocorticoid receptor expression in the hippocampus of male rat offspring. *Physiol Int*. 2020;107(2):209-19.
- 26.Alyamani RAS, Murgatroyd C. Epigenetic Programming by Early-Life Stress. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;157:133-50.
- 27.Conrad CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(5):742-55.
- 28.De Alcubierre D, Ferrari D, Mauro G, Isidori AM, Tomlinson JW, Pofi R. Glucocorticoids and cognitive function: a walkthrough in endogenous and exogenous alterations. *J Endocrinol Invest*. 2023;46(10):1961-82.
- 29.Francis DD, Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9(1):128-34.
- 30.Troakes C, Ingram CD. Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation. *Stress*. 2009;12(4):362-9.
- 31.Catalani A, Alemà GS, Cinque C, Zuena AR, Casolini P. Maternal corticosterone effects on hypothalamus–pituitary–adrenal axis regulation and behavior of the offspring in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(7):1502-17.
- 32.Talaei Zavareh SA, Hamidi G, Salami M. Long term potentiation as a mechanism for learning and memory. *Cell J (Yakhteh)*. 2009;11(2):88-105. [In Persian]
- 33.Kullmann DM, Lamsa KP. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(9):687-99.
- 34.Jin SX, Feig LA. Long-term potentiation in the CA1 hippocampus induced by NR2A subunit-containing NMDA

- glutamate receptors is mediated by Ras-GRF2/Erk map kinase signaling. PLoS One. 2010;5(7):e11732.
- 35.Lindau M, Almkvist O, Mohammed AH. Effects of stress on learning and memory. In: Fink G, editors. Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior. Elsevier; 2016. p. 153-60.
- 36.Lesuis SL, Lucassen PJ, Krugers HJ. Early life stress impairs fear memory and synaptic plasticity; a potential role for GluN2B. Neuropharmacology. 2019;149:195-203.
- 37.Holubová A, Lukášková I, Tomášová N, Šuhajdová M, Šlamberová R. Early Postnatal Stress Impairs Cognitive Functions of Male Rats Persisting Until Adulthood. Front Behav Neurosci. 2018;12:176.
- 38.Barzegar M, Sajjadi FS, Talaei SA, Hamidi G, Salami M. Prenatal exposure to noise stress: anxiety, impaired spatial memory, and deteriorated hippocampal plasticity in postnatal life. Hippocampus. 2015;25(2):187-96.