

اثر استرس حاد بر یادگیری موش‌های کوچک آزمایشگاهی

سیده گیتی غمامی^۱، شیرین کوشکی^۲

^۱ کارشناس ارشد روانشناسی، دانشگاه آزاد، دانشکده روانشناسی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران.

^۲ دانشیار دانشگاه آزاد، دانشکده روانشناسی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران.

نام نویسنده مسئول:

شیرین کوشکی

چکیده

مواجهه با استرس با شدت و زمان‌های مختلف، تأثیرات متفاوتی ایجاد می‌کند. هدف پژوهش حاضر تعیین چگونگی تأثیر استرس حاد بر یادگیری در دو جنس نر و ماده موش‌های سوری نژاد NMRI (۲۰-۲۵ گرم) در مدل یادگیری احترازی غیرفعال است. در این مطالعه تجربی، ۶۴ سر موش نر و ماده به صورت مجزا، بطور تصادفی در گروه‌های ۸ تایی شامل گروه کنترل و گروه‌های استرس حاد قرار گرفتند. در تمام گروه‌ها معیار میزان حافظه، زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک دستگاه تست بود. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس، t همبسته و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. نتایج نشان داد که ۳۰ دقیقه محدودیت حرکتی در استرس حاد، بلافاصله قبل از آموزش آزمون یادگیری، سبب افزایش معنادار عملکرد یادگیری می‌شود ($P < 0.01$). با افزودن غوطه‌وری موش‌ها در آب سرد به استرس محدودیتی، استرس تشدید و یادگیری دچار اختلال ($P < 0.01$) شد. یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که استرس بسته به میزان و زمان وقوع، نقش مهمی در تعدیل فازهای مختلف یادگیری اطلاعات تازه آموخته دارد. **واژگان کلیدی:** استرس، حاد، یادگیری، بی‌حرکتی، موش کوچک آزمایشگاهی.

مقدمه

یادگیری یکی از مباحث بنیادی در علم روان‌شناسی است. یادگیری یک فرایند است و عوامل بسیاری بر آن تاثیرگذار هستند. موقعیت، محیط یادگیری و شرایط یادگیرنده نظیر ترس، اضطراب، شک و تردید همه و همه می‌توانند در فعالیت‌های یادگیری موثر باشند. گاهی شرایطی به ظاهر منفی می‌تواند تلاش برای یادگیری و حل مسائل ذهنی را بیشتر تحریک سازد. تجربه دوره‌هایی از استرس با شدت‌های متفاوت، انواع تغییرات فیزیولوژیکی و روانی را در موجودات زنده به دنبال خواهد داشت (لی^۱، ۲۰۰۷). بنابراین موضوع استرس، یکی از مهمترین زمینه‌های پژوهش قرن حاضر در علوم مختلف به شمار می‌آید. استرس واکنش بدن به هر گونه تغییری است که نیازمند سازگاری یا پاسخ است. پاسخ بدن به این گونه تغییرات به صورت فیزیکی، ذهنی و هیجانی است. محرک‌های استرس‌زای مختلف اثرات متفاوتی بر یادگیری دارند. برخی از این مطالعات بیانگر اختلال حافظه ناشی از استرس و برخی دیگر بیانگر اثر مثبت آن بر حافظه هستند و یا حتی ممکن است هیچ اثر معناداری روی یادگیری و حافظه نداشته باشد. هیچگاه اثر دقیقی در هیچ زمینه‌ای برای آن ذکر نشده بطوری که مطالعات انسانی و حیوانی یافته‌های متنوعی را گزارش کرده‌اند (آتسک^۲، ۲۰۱۶).

القای استرس حاد از طرق مختلفی صورت می‌پذیرد که ویژگی مشترکشان زمان کوتاه مدت آن است ولی از نظر شدت انواع متفاوتی دارند. استرس بی‌حرکتی کوتاه مدت، یکی از روش‌های عملیاتی برای ایجاد استرس حاد است که برای مدت محدود، حداکثر یک ساعت و فقط برای یک مرتبه است. این روش عبارت است از نگه داشتن حیوان به مدت معلوم در قفس‌های تنگ از جنس پلاستیک شفاف که محدود کننده نام دارند و امکان حرکت و جابجایی ندارند، ولی امکان تنفس آزاد برایشان فراهم است (گومز^۳ و همکاران، ۲۰۱۳). طریقه دیگر که حیوان به مدت ده ثانیه در استخر آب با دمای بین ۲۳ تا ۲۶ درجه سانتیگراد یا بالعکس آب حدود ۴ تا ۵ درجه سانتیگراد در زیر آب نگه داشته، با ضربه زیر آب که یک موقعیت تهدید آمیز و ذاتاً ترس‌آور طبیعی محسوب می‌شود، ایجاد استرس می‌گردد. یا از روش‌های دیگری که برای ایجاد استرس عنوان شد ایجاد می‌شود (چو^۴ و همکاران، ۲۰۱۶).

در این مطالعه با توجه به گزارشات متفاوت و گاهی متناقض از تاثیر استرس بر جنبه‌های مختلف جسمی- روانی (ترینور^۵، ۲۰۱۱) از یک طرف و گزارشاتی از تاثیر جنسیت بر یادگیری، بر آن شدیم تاثیر استرس حاد و اثر زمان و شدت آن بر یادگیری در موش کوچک آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهیم.

۱. روش پژوهش

در این پژوهش تجربی، از ۶۴ سر موش کوچک آزمایشگاهی بالغ نژاد NMRI از جنس نر و ماده استفاده شد که در محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم قرار داشتند. موش‌ها از انستیتو رازی تهیه شدند و در قفس‌هایی از جنس پلاستیک شفاف در یک اتاق با درجه حرارت محیطی (۲۵±۲°C) و با شرایط مناسب و استاندارد از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت (۵۵±۵ درصد)، در حیوانخانه بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، نگهداری شدند. در طول آزمایشات، دسترسی کامل به آب و غذا برای موش‌ها وجود داشت. در این مطالعه، کلیه مسایل مرتبط با قوانین حقوقی و نیز کدهای مربوط به معاهدات هلسینکی رفتار و مطالعه روی حیوانات رعایت شد و کلیه آزمایشات تحت قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی حاکم در دانشکده اجرا شد.

دو هفته پس از سازش با شرایط محیطی، حیوانات در گروه‌های کنترل (که هیچ نوع استرسی دریافت نمی‌کردند) و گروه‌های استرس حاد ملایم (۳۰ دقیقه محدودیت حرکتی) و استرس حاد شدید (۳۰ دقیقه محدودیت حرکتی + ۱۰ ثانیه غوطه‌وری در آب سرد) تحت استرس قرار گرفتند. در گروه‌های آزمایش وجه تمایز، زمان مواجهه با استرس و شدت آن بود. بر اساس محاسبات فرمول تعیین تعداد نمونه، در هر گروه ۸ موش به طور تصادفی قرار گرفت.

حیوانات یک ساعت قبل از شروع آزمون به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا به شرایط آزمایشگاه عادت کنند. برای بررسی روند یادگیری از دستگاه احترازی غیر فعال استفاده شد که یک محفظه شیشه‌ای مکعب مستطیل است و به دو بخش تاریک و روشن تقسیم شده و توسط یک درب گیوتینی متحرک از هم تفکیک شده است. میله‌های کف قسمت تاریک دستگاه به وسیله سیم رابط به دستگاه استیمولاتور (Grass S44, West Wamc, RI. USA) متصل می‌شود که با روشن شدن کلید مدار، جریان الکتریکی با جریان مشخص (فرکانس ۵۰ هرتز، شدت ۰/۷ میلی آمپر و به مدت ۳ ثانیه) از کف آن عبور می‌کند. دستگاه در یک محل ساکت و بدون رفت و آمد قرار می‌گیرد و ضمناً باز

¹ Learning

² Li X.H.

³ Atsak P.

⁴ Gomez J

⁵ Chu X

⁶ Trainor B.C.

شدن درب گیوتینی و سنجش زمان‌های حضور حیوان در نواحی تاریک و روشن به صورت تعریف شده و اتوماتیک انجام می‌شد. مراحل انجام کار به این ترتیب است:

۱-۱. مرحله سازش

به منظور سازش یا عادت حیوان با محیط، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش حیوان در محیط آزمایشگاه قرار می‌گرفت. ابتدا موش مورد آزمایش در قسمت روشن دستگاه پشت به درب قرار داده می‌شد و بعد از ۱۰ ثانیه درب گیوتینی باز شده و اجازه داده می‌شد حیوان وارد قسمت تاریک شود. بلافاصله درب بسته می‌شد و مدت زمانی که طول می‌کشید تا حیوان وارد اتاق تاریک شود ثبت می‌گردید. حیوان پس از چند ثانیه از قسمت تاریک برداشته و به قفس باز گردانیده می‌شد. این روش برای دو بار دیگر در فواصل ۲ دقیقه‌ای تکرار می‌شد.

۲-۱. آموزش (اکتساب یادگیری)

۳۰ دقیقه بعد از مرحله سازش، مرحله اکتساب یادگیری انجام می‌شد. حیوان به طور غریزی از محیط روشن تنفر دارد و دوری می‌کند. ابتدا حیوان مانند مرحله سازش، در قسمت روشن دستگاه پشت به درب قرار داده شده و بعد از ۱۰ ثانیه درب گیوتینی باز می‌شد. ولی به دنبال وارد شدن موش به قسمت تاریک درب بسته شده و شوک الکتریکی از طریق سیم‌های استیل تعبیه شده در کف قسمت تاریک به حیوان اعمال می‌شود. ۲۰ ثانیه پس از شوک حیوان از دستگاه برداشته و به قفسه منتقل می‌شد. دو دقیقه بعد، مجدداً همین فرایند تکرار می‌شد. چنانچه حیوان وارد اتاق تاریک نمی‌شد، پس از ۱۲۰ ثانیه حیوان از دستگاه برداشته و به قفسه منتقل می‌شد. این آزمایش حداکثر سه بار تکرار شد.

۳-۱. آزمون (مرحله به خاطر آوری)

۲۴ ساعت بعد از آموزش، آزمون به خاطر آوری انجام می‌شود. ابتدا حیوان مانند مرحله سازش، در قسمت روشن دستگاه پشت به درب قرار داده شده و بعد از ۱۰ ثانیه درب گیوتینی باز می‌شد. به دنبال وارد شدن موش به قسمت تاریک درب بسته می‌شد. زمانی که طول می‌کشید تا حیوان وارد قسمت تاریک شود و یا به عبارت دیگر، زمان تاخیر برای ورود به محفظه تاریک؛ (LTC)، به طور اتوماتیک توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شد. در این مرحله هیچگونه شوک بر حیوان وارد نمی‌شود. در این مرحله زمان LTC می‌تواند تا ۳۰۰ ثانیه هم باشد و بعد از آن آزمایش خاتمه داده می‌شد. معمولاً در موش‌هایی که از لحاظ یادگیری و حافظه مشکلی نداشته باشند، به علت آشنایی ذهنی با موقعیت داخل محفظه تاریک و استرس شوک بر پا، LTC طولانی‌تر می‌شود.

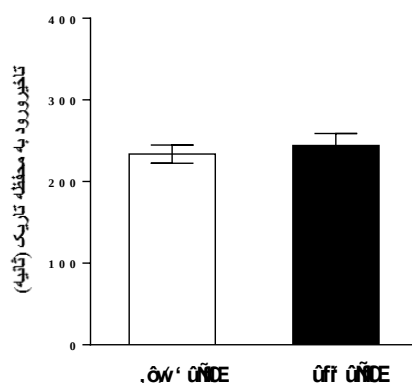
در این پژوهش، داده‌ها به دقت جمع‌آوری و ثبت شد. تمامی نتایج بصورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ($M \pm SEM$) با نرم‌افزار SPSS بررسی شد. پس از تأیید نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه میانگین اثرات متغیر مستقل استرس حاد بر یادگیری (متغیر وابسته) و مقایسه آن با گروه کنترل، از آنالیز آماری واریانس یک طرفه و آزمون t استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

همچنین اثرات در دو جنس نر و ماده از آنالیز آماری واریانس دو طرفه استفاده شد. آزمون تعقیبی توکی post-hoc به منظور مقایسه گروه‌ها نیز در ادامه انجام شد. در تمامی آزمایشات p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اثر معنادار تلقی شد.

۲. نتایج و بحث

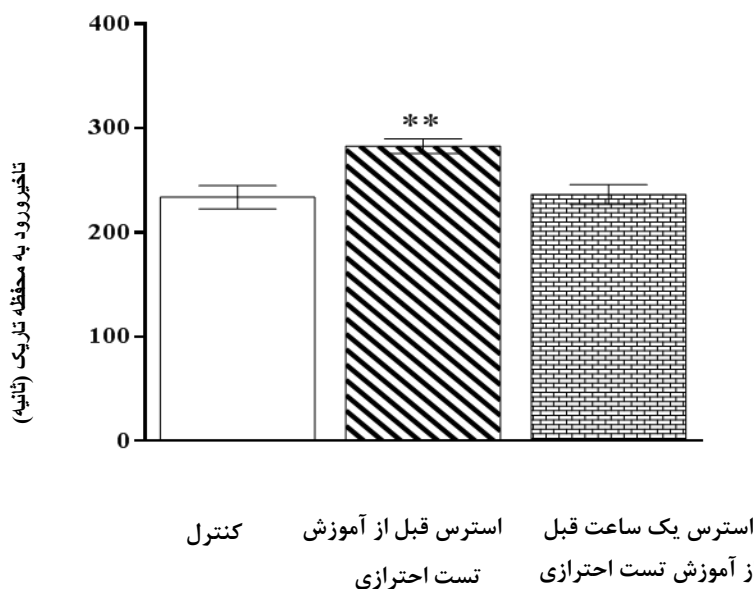
همانطور که شکل ۱ نشان می‌دهد، یادگیری در دو جنس نر و ماده در گروه کنترل که هیچ گونه استرسی را متحمل نشده بودند، تفاوت معناداری نشان نمی‌دهد ($P=0.58$). این مطلب می‌تواند نشان دهد که در شرایط معمولی با وجود تفاوت هورمون‌ها در دو جنس، تفاوت یادگیری در دو جنس نر و ماده معنادار نیست. حال در صورت وقوع تغییر شرایط محیطی تفاوت می‌تواند محرزتر شود یا علت دیگری می‌تواند دخیل باشد مثلاً اگر تعداد نمونه‌ها بیشتر بود شاید در نتیجه تأثیر می‌گذاشت.

¹ latency to cross



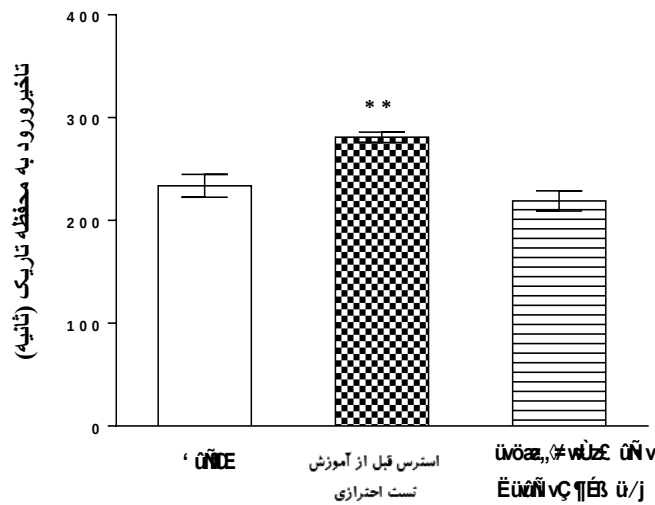
شکل ۱: مقایسه میزان یادگیری در دو جنس نر و ماده در گروه‌های کنترل در مدل یادگیری احترازی

برای بررسی تاثیر استرس حاد بر یادگیری، از روش القای ۳۰ دقیقه محدودیت بی حرکتی استفاده شد. برای بررسی تاثیر زمان اثر استرس بر نمونه، بین استرس و یادگیری و به خاطر آوری، چند گروه مختلف استرس حاد در نظر گرفته شد که گروهی بلافاصله قبل از مراحل یادگیری، گروهی یک ساعت قبل و گروه دیگر با فاصله ۳۰ دقیقه بعد از مراحل یادگیری استرس حاد به آنها وارد شد. شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نشان می‌دهد در گروهی که ۳۰ دقیقه محدودیت حرکتی را قبل از شروع مرحله آموزش یادگیری داشتند، در هر دو جنس ماده و نر یادگیری به طور معناداری نسبت به کنترل، افزایش می‌یابد ($P < 0.01$). چنانچه با همین شدت استرس، زمان وارد آمدن استرس بیشتر از یک ساعت قبل از مرحله آموزش و یا حتی اگر استرس وارد شده بعد از مرحله آموختن و آموزش باشد، یادگیری با گروه کنترل، هیچ تفاوتی ندارد. نتایج مطالعات کنراد نیز نشان دادند اگر موجود زنده قبل از اکتساب یادگیری تحت استرس شدید و حاد قرار گیرد یاد گرفته‌ها دچار اختلال می‌شود در حالی که استرس ملایم موجب تسهیل یاد گرفته‌ها می‌شود.



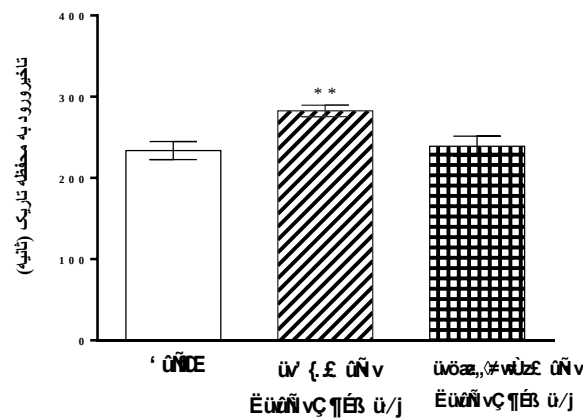
شکل ۲: مقایسه تغییرات یادگیری در موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده بر اثر استرس حاد اعمال شده ۶۰ دقیقه قبل و بلافاصله قبل از مرحله آموزش در مقایسه با کنترل

**نشاندهنده $P < 0.01$. تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۸ است. مقادیر ارائه شده براساس $M \pm S.E.M$ است.



شکل ۳: مقایسه تغییرات یادگیری در موش‌های کوچک آزمایشگاهی بر اثر استرس حاد اعمال شده ۶۰ دقیقه قبل و بلافاصله قبل از مرحله آموزش در مقایسه با کنترل

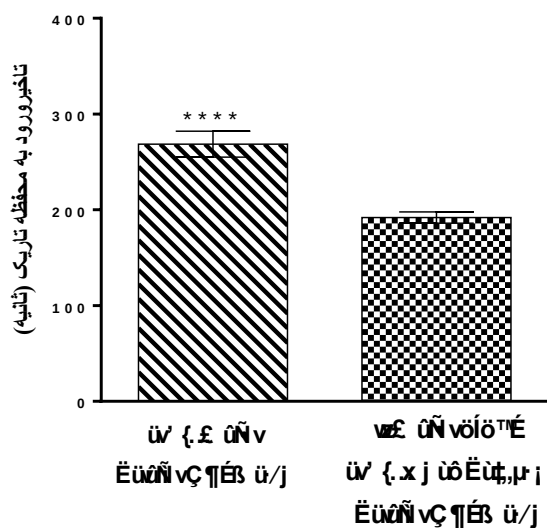
** نشاندهنده $P < 0.01$ تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۸ است. مقادیر ارائه شده براساس $M \pm S.E.M$ است



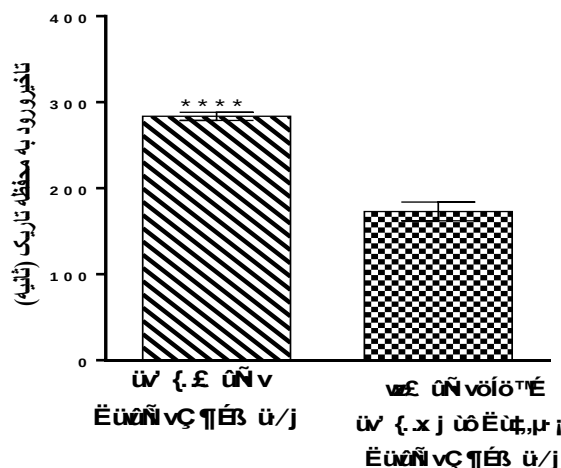
شکل ۴: مقایسه یادگیری موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده بر اثر استرس حاد اعمال شده بلافاصله قبل با بعد از مرحله آموزش با کنترل تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۸ است.

** نشاندهنده $P < 0.01$ تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۸ است. مقادیر ارائه شده براساس $M \pm S.E.M$ است

همچنین در آزمایش‌ها نشان داده شد، اگر استرس وارده تشدید شود و علاوه بر محدودیت حرکتی ۳۰ دقیقه، برای مدت ده ثانیه قبل از شروع مرحله آموزش، غوطه‌وری در آب ۴ درجه داشته باشند، یادگیری در نمونه‌های ماده و نر ($P < 0.0001$) کاهش می‌یابد (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۵: مقایسه یادگیری موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده بر اثر استرس حاد اعمال شده بلافاصله قبل از مرحله آموزش در گروه استرس بی حرکتی و گروه بی حرکتی همراه با غوطه‌وری در آب در مقایسه با کنترل تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۸ سر است. ****نشان‌دهنده $P < 0.0001$ مقادیر ارائه شده بر اساس $M \pm S.E.M$ است.



شکل ۶: مقایسه یادگیری موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بر اثر استرس حاد اعمال شده بلافاصله قبل از مرحله آموزش در گروه استرس بی حرکتی و گروه بی حرکتی همراه با غوطه‌وری در آب در مقایسه با کنترل تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۸ سر است. ****نشان‌دهنده $P < 0.0001$ مقادیر ارائه شده بر اساس $M \pm S.E.M$ است.

این یافته‌ها موافق با نتایج تحقیقات کلنروا^۱ و همکارانش در ۲۰۰۲ روی موش صحرایی است با این تفاوت که او استرس را با فاصله زمانی بیشتری القا کرده بود. بروگرز و همکارانش^۲ در ۲۰۱۴ بر روی موش‌های کوچک آزمایشگاهی تحقیق خود را انجام دادند و به مدت ۳۰ دقیقه استرس بی حرکتی به آنها اعمال کردند. در مورد گروهی که با فاصله زمانی قبل از آموزش، استرس حاد بی حرکتی که استرسی ملایم محسوب می‌شود دریافت کردند، از نظر یادگیری تفاوتی با گروه کنترل نداشتند. آنها با استفاده از روش ماز آبی موریس و اثر دو دمای مختلف آب بر روی فاز اکتساب را بررسی کردند و غلظت کورتیکوسترون خون موش‌ها (که افزایش آن نشانه زیاد شدن استرس

¹ Klenerova V.

² Krugers H.J.

است) را اندازه‌گیری کردند، نتایج نشان داد که موش‌هایی که در آب ۱۹ درجه سانتیگراد آموزش دیده بودند نسبت به موش‌های آموزش دیده در آب ۲۵ درجه سانتیگراد به خاطرآوری بهتری از خود نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

چنانچه قبل از اکتساب یادگیری، استرس شدید اعمال شود، یاد گرفته‌ها دچار اختلال می‌شوند، در حالی که استرس ملایم که فاصله کمی با فرایند یادگیری داشته باشد، موجب تسهیل یاد گرفته‌ها می‌شود.

بنابراین در زندگی که استرس و عوامل استرس‌زا جزء لاینفک آن هستند، فرایندهای یادگیری و حافظه متاثر از آنها هستند. بر خلاف آنچه اکثر افراد تصور می‌کنند، این آثار همیشه آسیب‌زا نیستند و به تعدادی از عوامل، از جمله نوع عامل استرس‌زا، طول، شدت و عواملی دیگر بستگی دارند. استرس گاهی می‌تواند موتور محرک باشد و اگر به عنوان نمونه نگرانی و اضطراب از وجود خطرها نبود، انسان به این درجه از پیشرفت نمی‌رسید که تمدن ایجاد کند و شهرنشینی و ساخت تجهیزات مدرن و پیشرفته رخ نمی‌داد.

منابع و مراجع

- [1] Li XH, Liu N.B. and Zhang, MH., 2007, Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats, Chin Med Journal, vol. 120(8):, pp 669-74.
- [2] Atsaka P., Guenzel F.M. and Kantar-Gok D, 2016, Glucocorticoids mediate stress-induced impairment of retrieval of stimulus-response memory, .Psychoneuroendocrinology, vol. 67, pp 207-15.
- [3] Gomez J., Lewis M., Sebastian V., Serrano P. and Luine V., 2013, Alcohol administration blocks stress induced impairments in memory and anxiety, and alters hippocampal neurotransmitter receptor expression in male rats, Horm Behav., vol. 63(4), pp 659-66.
- [4] Chu X., Zhou Y., Hu Z., Lou J. and Song W., 2016, 24-hour-restraint stress induces long-term depressive-like phenotypes in mice, NCBI, vol. 120(8), pp 669-74.
- [5] Trainor C.B. and Laman-Maharg A., 2016, Stress, sex, and motivated behaviors, NCBI, vol. 95(1-2), pp 83-92.
- [6] Klenerova V., Kaminsky O., Sida P. and Hynie S., 2002, Impaired passive avoidance acquisition in Sprague-Dawley and Lewis rats after restraint and cold stress, Behavioural Brain Research, vol. 136(1), pp 21-29.
- [7] Krugers H.J., Joels M., Arp M. and Oitz M.S., 2014, Mineralocorticoid receptors guide spatial and stimulus-response learning in mice, PLOS ONE, vol. 9, pp 6236.