

## ارزیابی استرس مزمن بر حافظه فضایی با بهره‌گیری از آزمون ماز آبی موریس در مدل حیوانی

- مریم احمدنژاد\*: گروه بیوشیمی، پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
- سیروس خدادادی: گروه بیوشیمی، پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
- محمدعلی نصیری خلیلی: گروه بیوشیمی، پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
- نرگس ملک‌ثابت: گروه بیوشیمی، پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۹

### چکیده

استرس از مهم‌ترین عوامل ناپایدارکننده درونی، اثرات منفی برجسته‌ای بر کارکردهای شناختی برجای گذاشته است. القاء استرس با بهره‌گیری از مدل استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی به‌طور گسترده‌ای به‌منظور بررسی تأثیر قرار گرفتن در معرض استرس، در چندین مدل حیوانی مورد پژوهش قرار گرفته است که شامل مواجهه با عوامل استرس‌زا به‌صورت تصادفی، متناوب و غیرقابل پیش‌بینی در طی چندین روز می‌باشد. مطالعات بیان می‌کنند که استرس مزمن احتمالاً موجب اختلال در عملکرد حافظه می‌شود. هدف از مطالعه، بررسی بروز اختلال در یادگیری و حافظه فضایی در آزمون ماز آبی موریس پس از القاء استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی در ۶ روز متوالی می‌باشد. موش‌های صحرایی نر بالغ به‌طور تصادفی به دو گروه شاهد (عدم القاء استرس مزمن) و استرس (القاء استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی به‌مدت ۶ روز متوالی) تقسیم شدند. استرس، یادگیری و حافظه فضایی حیوانات به‌ترتیب توسط ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع و ماز آبی موریس مورد بررسی قرار گرفت. استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی موجب کاهش عملکرد در یادگیری و حافظه فضایی شد. مدت زمان و مسافت سپری شده برای رسیدن به سکوی پنهان در گروه استرس در مقایسه با گروه شاهد در مجموع چهار روز آموزشی روندی افزایشی را نشان داد. به‌طوری‌که در روزهای چهارم افزایش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در هر دو پارامتر مشاهده شد. هم‌چنین، القاء استرس منجر به کاهش معنی‌دار در درصد مدت زمان حضور در ربع هدف در مقایسه با گروه شاهد شد ( $P < 0.01$ ). در آزمون ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع، گروه استرس کاهش معنی‌داری را در درصد زمان ماندن در بازوی باز در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). مطالعه حاضر با قرار دادن موش‌های نر در معرض استرس غیرقابل پیش‌بینی به‌مدت ۶ روز بیان داشت که احتمالاً به‌دلیل کارآمد واقع شدن استراتژی‌های القاء استرس به‌کار گرفته شده، دستیابی به مکان سکوی پنهان در ماز آبی موریس در مدت زمان و مسافت پیش‌تری صورت گرفته است.

**کلمات کلیدی:** استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی، حافظه، ماز آبی موریس، موش صحرایی



**مقدمه**

امروزه انسان‌ها در مواجهه با استرس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ناپایدارکننده درونی، دچار تغییرات قابل توجهی در سبک زندگی فردی می‌شوند. محرک‌های عاطفی و فیزیکی، زمینه‌ساز بروز استرس در افراد است. بی‌قراری، اضطراب، بیماری‌های فیزیکی، ناتوانی در کنترل استرس و تغییرهایی در رفتار، هیجان، عملکردهای شناختی و فیزیولوژی از جمله شرایطی هستند که در صورت مواجهه شدن با استرس مزمن در فرد بروز می‌یابند (Hammen, 2005). اختلال در عملکردهای شناختی هم‌چون یادگیری و حافظه، حاکی از اثرات پیچیده استرس مزمن بر مغز و شناخت در انسان‌ها و حیوانات می‌باشد (McEwen و Sapolsky, 1995). عواملی هم‌چون تضعیف طولانی مدت (Long-term potentiation یا LTP) در هیپوکامپ، آشبار استرسی شبکه آندوپلاسمی، التهاب عصبی و آپوپتوز در مغز به‌ویژه در ناحیه هیپوکامپ، اختلال در حافظه را با خود به‌همراه دارند (Jangra و همکاران، 2017؛ Zhang و همکاران، 2014؛ Alvarez و همکاران، 2014). مطالعات حاکی از کاهش عملکردهای شناختی هم‌چون حافظه در افراد بزرگسالی است که در طول زندگی در معرض استرس مزمن قرار دارند و یا مرتبط با قشر اقتصادی-اجتماعی و بیماری روانی خاص هستند (Lynch و همکاران، 1997؛ Sauro و همکاران، 2003) به‌همین ترتیب، چونندگان تحت استرس مزمن، اختلال‌های مرتبط با سنجش یادگیری و حافظه را نشان می‌دهند. چنان‌که، القاء استرس مزمن به‌مدت 21 روز با استفاده از دستگاه مقیدکننده (Restrainer)، نقص‌های شناختی مرتبط با آزمایش‌های ماز شعاعی 8 بازویی، ماز Y شکل و آزمون تشخیص شی (Object Recognition) را در عملکرد موش‌ها نشان داد (Beck و Luine, 2002؛ Conrad و همکاران، 1996؛ Luine و همکاران، 1994). موش‌هایی که برای 12 هفته تحت استرس مزمن شنای آب سرد (15 دقیقه در روز) قرار گرفتند، دچار نقص عملکرد در مرحله اکتساب حافظه به‌وسیله آزمون ماز شعاعی 8 بازویی شدند (Nishimura و همکاران، 1999). هم‌چنین، ارزیابی موش‌هایی که به‌مدت 12-4 هفته در معرض نمونه‌های دیگری از استرس مزمن قرار گرفتند، موجب بروز نقص عملکرد در ماز شعاعی 8 بازویی و ماز T شکل شد (Mizoguchi و همکاران، 2000؛ Park و همکاران، 2001). در روشی مشابه، نتایج حاصل از القاء استرس‌زاهای فیزیکی مزمن در طی 28 روز یا 6 ماه، نقص در یادگیری و حافظه فضایی در پی استفاده از ماز آبی موریس (Morris Water Maze) را نشان داد (Bodnoff و همکاران، 1995؛ Sousa و همکاران، 2000). Venero و همکاران (2002)، نیز نشان دادند قرار گرفتن در معرض استرس مزمن بی‌حرکتی (6 ساعت در روز) طی 7 روز متوالی، موجب عدم تغییرات معنی‌داری در بروز اختلال

اکتساب حافظه فضایی با آزمون ماز آبی موریس شد. درمقابل، اثرات متضادی در نتیجه قرارگیری تحت عوامل استرس‌زا گزارش شده است، به‌طوری‌که دیگر مطالعات حاکی از افزایش اکتساب حافظه پس از مواجهه با دوره‌ای از استرس مزمن است. چنان‌که، Luine و همکاران (1996)، نشان دادند القاء استرس مزمن بی‌حرکتی به‌مدت 13 روز متوالی موجب تسهیل در اکتساب حافظه به‌وسیله آزمون ماز شعاعی 8 بازویی درمقایسه با القاء آن به‌مدت 7 روز متوالی شد. هم‌چنین، پژوهش‌های Isgor و همکاران (2004)، حاکی از کاهش مدت زمان سپری شده جهت یافتن سکوی پنهان (Escape Latency) در آزمون ماز آبی موریس به‌دنبال القاء عوامل استرس‌زای فیزیکی و اجتماعی در چونندگان به‌مدت 28 روز متوالی بود. بنابراین، اگرچه برخی از انواع استرس‌های مزمن باعث کاهش عملکرد در وظایف مرتبط با حافظه می‌شوند، برخی دیگر نیز تسهیل در اکتساب و عملکرد حافظه را به دنبال دارند. به‌وسیله منحنی U شکل معکوس که بیان‌کننده ارتباط میان استرس (سطح گلوکوکورتیکونید) و یادگیری است، این نتایج متضاد قابل توجیه‌اند. به‌طوری‌که مواجهه با استرس خفیف باعث افزایش یادگیری می‌شود، درحالی‌که قرار گرفتن در معرض استرس مزمن شدید اختلال در یادگیری را به‌دنبال دارد (Shors, 2003؛ Sapolsky, 2004). بااین‌حال، تعیین این‌که کدام نوع استرس خفیف، متوسط و یا شدید در نظر گرفته‌شود، دشوار است زیرا پارامترهایی هم‌چون سطح هورمون کورتیکوسترون، مورفولوژی هیپوکامپ و ... بلافاصله پس از مواجهه با هر نوع استرس، ارزیابی نشده است. یکی از روش‌های مؤثر در القاء استرس، بهره‌گیری از استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی (Chronic Unpredictable Stress) است. بررسی‌ها نشان داده است که القاء استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی به‌مدت 6 روز متوالی، موجب افزایش در مدت زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان در ماز آبی موریس در ارزیابی حافظه فعال و مرجع می‌شود. درحالی‌که، در حجم و یا تعداد نورون‌های نواحی مدیال پری‌فرونتال و سابیکولوم مغز تغییر مؤثری بروز نمی‌دهد (Cerqueira و همکاران، 2007). طبق شواهد، آزمایشی مبتنی بر ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی چونندگان پس از طی 6 روز القاء استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی صورت نپذیرفته است. بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی تأثیرات استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی به‌عنوان یک پروتکل استرس فیزیکی و روانی بر اکتساب و حفظ حافظه فضایی در ماز آبی موریس بوده است.

**مواد و روش‌ها**

**حیوان‌ها:** 12 رأس موش صحرایی نر نژاد SD به وزن  $20 \pm 20$  گرم از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج) خریداری شده

است. چهار بازو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متر منتهی می‌شود. ماز به وسیله پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار می‌گیرد. برای انجام آزمون، حیوان درون محدوده مرکزی و رو به یکی از بازوهای باز قرار گرفت و در مدت ۵ دقیقه اجازه داده شد تا به‌طور آزادانه به جستجوگری در قسمت‌های مختلف ماز بپردازد. در این آزمون رفتاری پارامترهای تعداد دفعات ورود حیوان به بازوی باز و بسته و مدت زمان ماندن در بازوی باز و بسته، به‌روش اندازه‌گیری مشاهده شد. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته قرار گرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر است. برای هر حیوان درصد ورود به بازوی باز و درصد زمان ماندن در بازوی باز با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد. کاهش معنی‌دار این دو پارامتر نشان‌دهنده افزایش میزان استرس است.

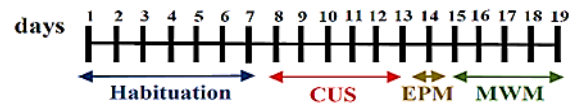
$$\text{درصد ماندن در بازوی باز} = \left( \frac{\text{مدت ماندن در بازوی باز}}{\text{مدت ماندن در بازوی باز} + \text{مدت ماندن در بازوی بسته}} \right) \times 100$$

$$\text{درصد ورود به بازوی باز} = \left( \frac{\text{تعداد ورود به بازوی باز}}{\text{تعداد ورود به بازوی باز} + \text{تعداد ورود به بازوی بسته}} \right) \times 100$$

**ماز آبی موریس:** یکی از معمول‌ترین آزمون‌ها در علوم اعصاب شناختی است که در سال ۱۹۸۲ توسط موریس و همکاران ابداع شده (Alfarez و همکاران، ۲۰۰۳) و به‌منظور ارزیابی حافظه و یادگیری فضایی در جوندگان مورد استفاده قرار می‌گیرد. ماز آبی موریس یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره سیاه رنگ به قطر ۲۰۰-۱۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۵۰-۶۰ سانتی‌متر می‌باشد که با آبی به عمق ۳۰-۲۵ سانتی‌متر پر می‌شود. دمای بهینه آب ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. یک سکو از جنس پلاکسی‌گلاس شفاف با سطح مقطع ۱۰×۱۰ سانتی‌متر در فاصله ۵-۱ سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز یکی از چهار ربع شمال شرقی، جنوب شرقی، شمال غربی یا جنوب غربی قرار داده می‌شود. لازم است دیوارهای اطراف ماز دارای اجسام، علائم و نشانه‌هایی از قبیل پوستر، قفسه، پنجره و ... باشد که موش بتواند به‌کمک آن‌ها محل سکو را در آب پیدا کند. یک دوربین ویدیویی که در بالای استخر نصب می‌شود، مسیر حرکت حیوان را ردیابی کرده و به رایانه انتقال می‌دهد و در نهایت داده‌ها توسط سیستم نرم‌افزاری تحلیل می‌گردند.

**مراحل انجام آزمایش ماز آبی موریس:** الف- مرحله یادگیری یا آموزش: طی این مرحله، موش‌ها به‌مدت ۴ روز و در هر روز ۴ بار تحت آموزش و تمرین قرار گرفتند. هر حیوان در هر تمرین، از چهار منطقه جغرافیایی متفاوت درحالی‌که صورت آن به‌طرف دیواره ماز بود، در استخر آب رهاگردید. ترتیب رهاسازی در استخر، در هر روز آموزشی متفاوت بود. حداکثر زمان آزمایش در هر تمرین، ۱۲۰ ثانیه در نظر گرفته شد تا حیوان به‌صورت آزادانه در آب به‌دنبال یافتن سکو شنا

و در هر قفس به تعداد یک سر حیوان در شرایط استاندارد (دمای ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آسان به آب و غذا) نگهداری شدند. حیوانات به‌طور تصادفی به ۲ گروه تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد: عدم القاء استرس مزمن (CO)، ۲- گروه تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی (CUS)



شکل ۱: طرح شماتیک از مراحل انجام آزمایش (منبع: نگارنده)

**طراحی آزمایش:** مراحل انجام آزمایش در طرح شماتیک شکل ۲ نشان داده شده است. حیوانات پس از ۷ روز خونگیری با محیط آزمایشگاه علوم شناختی دانشگاه صنعتی مالک اشتر، در گروه CUS، تحت القاء استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی به‌مدت ۶ روز متوالی قرار گرفتند. سپس، آزمون ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع در روز ۱۴م و آزمون ماز آبی موریس به‌مدت ۵ روز متوالی به‌ترتیب، با هدف ارزیابی میزان استرس القاء شده، یادگیری و حافظه فضایی بر روی حیوانات انجام شد.

**روش القاء استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی:** در این آزمایش به حیوانات گروه CUS به‌ترتیب در روز اول: استرس بی‌حرکتی (دمای اتاق/ ۳ ساعت/ نوبت عصر)، روز دوم: ازدحام جمعیت (Crowding stress) (۸-۶ سر حیوان در قفس/ ۲۴ ساعت/ صبح) و بستر خیس (Wet bedding) (۴۵۰ میلی‌لیتر آب/ ۶ ساعت/ عصر)، روز سوم: محرومیت از غذا (۲۴ ساعت) و شنای اجباری (Forced Swim) (-۱۵) ۱۰ درجه سانتی‌گراد/ ۱۰ دقیقه/ نوبت عصر)، روز چهارم: استرس بی‌حرکتی (دمای اتاق/ ۳ ساعت/ نوبت عصر)، روز پنجم: محرومیت از آب (۲۴ ساعت) و القاء شوک الکتریکی (شوک ۱ میلی‌آمپر به‌مدت ۱ ثانیه بافاصله زمانی ۶ ثانیه/ ۱۵ دقیقه/ نوبت عصر) و روز ششم: استرس بی‌حرکتی (دمای اتاق/ ۳ ساعت/ نوبت عصر) القاء شد.

#### آزمون ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع و نحوه انجام تست رفتاری:

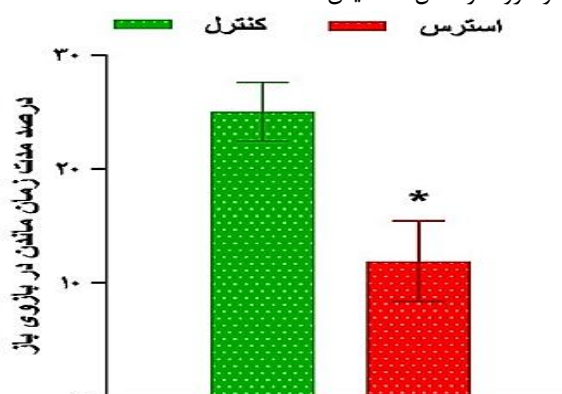
این آزمون به‌منظور ارزیابی رفتارهای مرتبط با استرس و اضطراب در مدل‌های حیوانی استفاده می‌شود. اساس این آزمون بر پایه دو گزینه حس جستجوگرانه جوندگان و احتراز از محیط‌های باز و روشن طراحی شده است. در این روش حیوان با توجه به‌میزان استرس القاء شده، بیش‌تر تمایل به ماندن در بازوهای بسته را دارد. این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو، دو بازوی باز و دو بازوی بسته به ابعاد ۱۰×۵ سانتی‌متر، به شکل به‌علاوه (+) می‌باشد. بازوهای بسته از دو طرف و انتها توسط دیوارهایی به بلندی ۴۰ سانتی‌متر احاطه شده است. هم‌چنین، در دو طرف او انتهای بازوهای باز لبه‌هایی به ارتفاع یک سانتی‌متر به‌منظور جلوگیری از سقوط حیوان، تعبیه شده



نسبت به گروه شاهد نشان داد (شکل ۲). در مقابل، اختلاف معنی‌داری برای درصد ورود به بازوی باز (OAE%) در بین دو گروه مشاهده نشد (شکل ۳).

### نتایج آزمون ماز آبی موریس

**مرحله یادگیری یا آموزش:** آنالیز واریانس دوطرفه داده‌های حاصل از آزمون ماز آبی موریس تفاوت معنی‌داری را از نظر مسافت پیموده شده در مجموع چهار روز آموزشی بین دو گروه مورد مطالعه (روز×گروه) نشان نداد [F(۳,۴۰)=۰/۶۰۶۲, P=۰/۶۱۴۸]. در مقابل، مقایسه درون گروهی در گروه‌های مورد آزمایش بیان داشت که اختلاف بین روزهای آزمایش معنی‌دار است [F(۳,۴۰)=۱۶/۱۳, P<۰/۰۰۰۱]. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری را نشان داد [P<۰/۰۰۰۱]. آزمون تکمیلی Tukey افزایش معنی‌داری را در روز چهارم آموزش برای مسافت طی شده جهت یافتن سکو در گروه تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی (P<۰/۰۵)، نسبت به گروه شاهد نشان داد. نمودار مسافت طی شده توسط حیوانات هر دو گروه در شکل ۴ نمایش داده شده است. آنالیز واریانس دوطرفه داده‌های حاصل از آزمون ماز آبی موریس تفاوت معنی‌داری را از نظر زمان سپری شده در مجموع چهار روز آموزشی بین دو گروه مورد مطالعه (روز×گروه) نشان نداد [F(۳,۴۰)=۱/۶۱۲, P=۰/۲۰۱۸]. در مقابل، مقایسه درون گروهی در گروه‌های مورد آزمایش بیان داشت که اختلاف بین روزهای آزمایش معنی‌دار است [F(۳,۴۰)=۱۱/۰۴, P<۰/۰۰۰۱]. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری را نشان داد [P<۰/۰۰۰۱]. آزمون تکمیلی Tukey افزایش معنی‌داری را در روزهای چهارم و دوم آموزش برای زمان طی شده جهت یافتن سکو در گروه تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی (P<۰/۰۵)، نسبت به گروه شاهد نشان داد. نمودار مدت زمان طی شده توسط حیوانات هر دو گروه در شکل ۵ نمایش داده شده است.



شکل ۲: نمودار درصد مدت زمان ماندن در بازوی باز در ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع توسط حیوانات گروه‌های تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی و شاهد

کند. در صورت یافتن سکوی پنهان توسط حیوان، اجازه داده می‌شد تا به منظور یادگیری موقعیت سکو و برقراری ارتباط بین نشانه‌ها، به مدت ۳۰ ثانیه بر روی آن باقی بماند. اگر حیوان، در مدت تعیین شده قادر به یافتن سکوی هدف نمی‌شد، توسط آزمایشگر از آب استخر خارج شده و بلافاصله بر روی سکو قرار می‌گرفت. پس از طی این زمان، حیوان از سکو برداشته شده و بعد از خشک شدن با یک حوله به قفس خود برگردانده می‌شد. پس از ۱۵ ثانیه آزمایش مجدداً تکرار می‌گردید، با این تفاوت که محل رها شدن موش در ماز نسبت به تمرین قبل متفاوت بود. لازم به ذکر است که نشانه‌های فضایی موجود در محل آزمایش و جایگاه سکو در آزمایش‌ها ثابت بود. به‌طور معمول در جلسات ابتدایی مرحله یادگیری، حیوان برای فرار از آب در کناره دیواره ماز به شنا می‌پردازد اما، به مرور در جلسات بعدی به بخش‌های میانی تر نیز وارد می‌شود. در این مرحله مدت زمان و مسافت طی شده جهت یافتن سکو در مدت چهار روز آموزشی، معیار میزان یادگیری قرار گرفت. ب- مرحله فراخوانی یا پروب (Probe trail): مرحله پروب یا بازیابی حافظه در روز پنجم انجام گردید. در این مرحله (باتوجه به این که حیوان محل سکوی پنهان را می‌داند) سکو از ماز برداشته شده و ۳۰ ثانیه فرصت شنا کردن به هر حیوان داده می‌شد و در نهایت به دلیل عدم وجود سکو، پس از پایان زمان طی شده موش از ماز برداشته می‌شد. این مرحله از آزمایش برای هر موش یک‌بار انجام گردید و میزان درصد حضور حیوان در ربع صحیح ماز (که پیش از آن در مرحله آموزش واجد سکو بود)، به عنوان معیاری از اکتساب و فراخوانی حافظه فضایی در نظر گرفته شد.

### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج به صورت میانگین ± میانگین

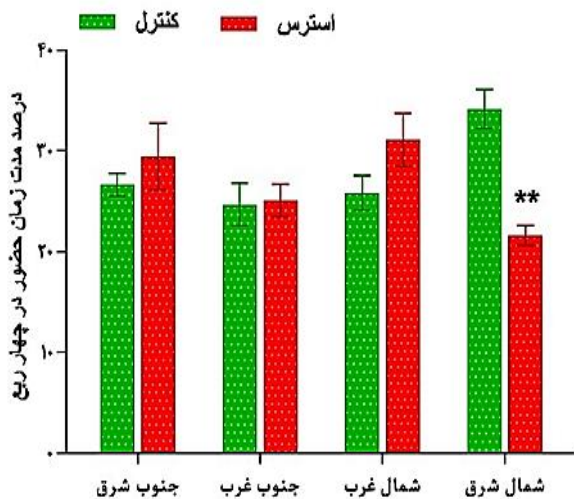
خطای استاندارد (Mean±SEM) بیان شده‌اند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ صورت گرفت. تفاوت بین گروه‌ها در آزمون ماز آبی موریس با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) مشخص گردید و به دنبال آن آزمون مقایسه میانگین‌ها با آنالیز واریانس با اندازه‌گیری توکی (Tukey) بررسی شد. هم‌چنین برای مقایسه پارامترهای حاصل از آزمون ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع از آزمون t استفاده شد. حداقل تفاوت معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## نتایج

### نتایج آزمون ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع: تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمون ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع با استفاده از آزمون t، کاهش معنی‌داری را برای درصد مدت زمان ماندن در بازوی باز (OAE%) در گروه تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی (P<۰/۰۵)،

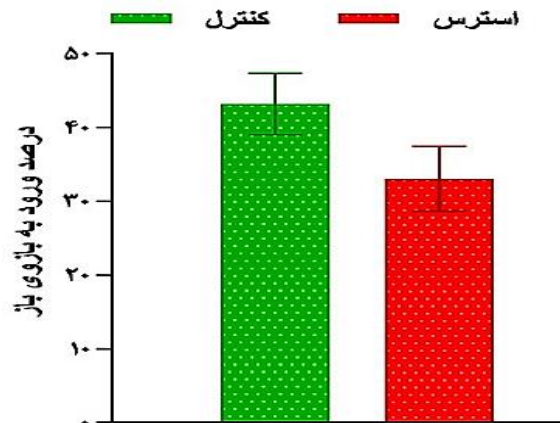
مقایسه مدت زمان طی شده در چهار ربع ماز آبی: در این مرحله، درصد مدت زمانی که حیوانات مورد مطالعه در ربع دارای سکو در مرحله قبل (شمال شرق) گذراندند، با درصد حضورشان در مناطق دیگر ماز مورد مقایسه قرار گرفت. تحلیل آماری داده‌های حاصل از مرحله بازخوانی، تفاوت معنی‌داری را از نظر درصد مدت زمان حضور در چهار ربع در روز پنجم آزمایش میان دو گروه مورد مطالعه (ربع «گروه») نشان داد [F(۳,۴۰)=۷/۴۸۳, P=۰/۰۰۰۴]. آزمون تکمیلی Tukey کاهش معنی‌داری را در گروه تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی ( $P < 0/01$ )، نسبت به گروه شاهد برای درصد زمان حضور در ربع هدف (شمال شرقی) نشان داد. نمودار مسافت طی شده توسط حیوانات هر دو گروه در شکل ۶ نمایش داده شده است.



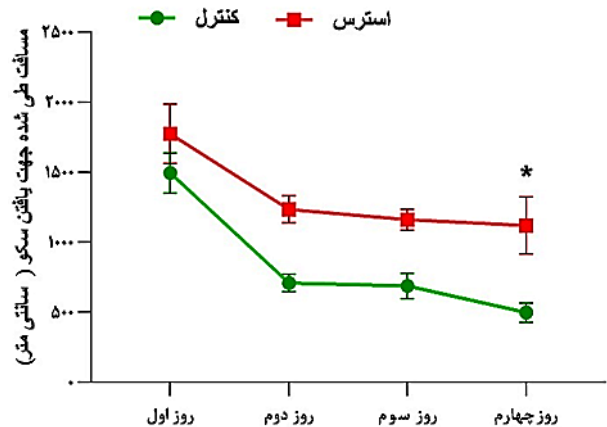
شکل ۶: نمودار مقایسه درصد مدت زمان حضور در چهار ربع ماز آبی موریس در مرحله بازخوانی توسط حیوانات گروه‌های تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی و شاهد در روز پنجم

## بحث

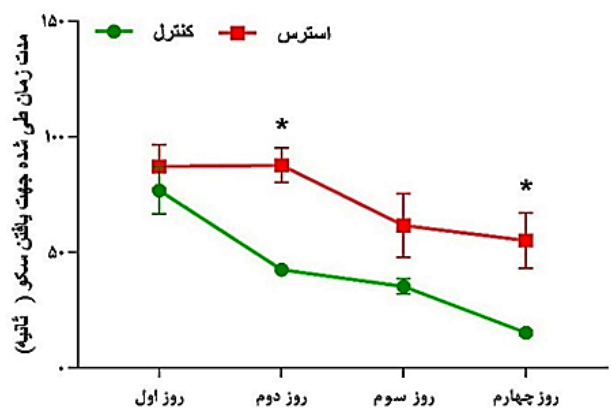
مطالعه حاضر نشان داد که درصد زمان ماندن در بازوی باز در آزمون ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع که به‌عنوان معیاری برای بیان القاء استرس مورد سنجش قرار می‌گیرد، با کاهش معنی‌داری در گروه تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی همراه است. کاهش این فاکتور دلیلی بر القاء استرس بر حیوانات تلقی می‌گردد. هم‌چنین، قرارگیری در معرض استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی به مدت ۶ روز، موجب تأخیر در فرآیند یادگیری و نقص در بازبایی حافظه فضایی در آزمون ماز آبی موریس می‌شود؛ بدین معنی که موش‌های تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی نسبت به گروه شاهد، به‌منظور یافتن سکوی پنهان مسافت و زمان بیشتری را در ماز سپری کردند. به‌گونه‌ای که این



شکل ۳: نمودار درصد ورود به بازوی باز در ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع توسط حیوانات گروه‌های تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی و شاهد



شکل ۴: نمودار مسافت پیموده شده در ماز آبی موریس به منظور یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات گروه‌های تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی و شاهد در روزهای مختلف آزمایش



شکل ۵: نمودار مدت زمان سپری شده در ماز آبی موریس به منظور یافتن سکوی پنهان توسط حیوانات گروه‌های تحت استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی و شاهد در روزهای مختلف آزمایش



می‌باشد. به‌طوری‌که قرارگیری مزمن در معرض کورتیکوسترون و یا القاء استرس در یک دوره طولانی مدت، شکل‌گیری LTP را در تمامی نواحی هیپوکامپ هم‌چون CA1، CA3 و DG مختل می‌کند. (Bliss و همکاران، ۱۹۹۳). در شرایط طبیعی، هیپوکامپ در تنظیم محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal) و رهاسازی هورمون کورتیکوسترون، اثر تنظیمی مهاری بر هسته پاراونتریکولار دارد. در مقابل، شرایط استرس‌زای مزمن موجب افزایش رشد و حجم غده آدرنال، افزایش ترشح کورتیکوسترون و به‌دنبال آن آسیب به نورون‌های CA1 و CA3 می‌گردد که دلیلی بر کاهش اثر مهاری هیپوکامپ بر سلول‌های پاراونتریکولار هیپوتالاموس در شرایط استرس مزمن می‌باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً استرس با اعمال تغییر بر مجموعه‌ای از این عوامل موجب شده حیوانات در تست پروب، که به‌نوبه خود عملی استرس‌زا برای حیوان محسوب می‌شود، کورتیکوسترون بیش‌تری را ترشح نمایند. در صورتی‌که در حیوانات گروه شاهد به‌دلیل عملکرد طبیعی محور HPA این افزایش رخ نمی‌دهد. درک رابطه بین مواجه شدن با استرس‌های مختلف و عملکرد شناختی، مسئله‌ای مهم اما پیچیده است. مطالعه حاضر با قراردادن موش‌های نر در معرض استرس مزمن غیرقابل پیش‌بینی به‌مدت ۶ روز بیان داشت که احتمالاً به‌دلیل کارآمد واقع شدن استراتژی‌های القاء استرس به‌کار گرفته شده، دستیابی به مکان سکوی پنهان در ماز آبی موریس در مدت‌زمان و مسافت بیش‌تری صورت گرفته است.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از استادان و کارشناسان محترم مرکز علوم شناختی دانشگاه صنعتی مالک اشتر که در مراحل علمی این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تشکر می‌گردد.

## منابع

- Alfarez, D.N.; Joëls, M. and Krugers, H.J., 2003. Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus in vitro. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 17, pp: 1928-1934.
- Beck, K.D. and Luine, V.N., 2002. Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions. *Physiology & behavior*. Vol. 75, pp: 661-673.

اختلاف در روز چهارم آموزش به‌طور معنی‌داری قابل مشاهده است. به‌علاوه در روند بازیابی حافظه، گروه تحت استرس نسبت به گروه شاهد مدت زمان کم‌تری را در روز پروب به‌دنبال یافتن سکو در ربع هدف سپری کرد. بنابراین، مشاهده روند کاهش در آزمون پروب را می‌توان ناشی از تأثیر القاء استرس بر مرحله اکتساب تفسیر نمود که به‌دنبال آن، فراخوانی حافظه نیز به‌صورت معنی‌داری کاهش یافته است. به‌دلیل نقش حیاتی هیپوکامپ در یادگیری فضایی و احتمال آسیب آن تحت شرایط استرس، اکثر مطالعات به‌بررسی آن پرداخته‌اند. هیپوکامپ نقش کلیدی در حافظه فضایی دارد، چراکه نقص در هیپوکامپ موجب اختلال در حافظه فضایی در حیوانات آزمایشگاهی و انسان می‌شود. محتمل است که استرس مزمن با مکانیسم‌هایی هم‌چون تغییر شکل نورون‌های CA3 و کاهش فعالیت سیناپسی و تغییر در نورون‌زایی، موجب اختلال در عملکردهای هیپوکامپی شود (Gould و همکاران، ۲۰۰۰؛ Wright و همکاران، ۲۰۰۶؛ Watanabe و همکاران، ۱۹۹۲). بروز نقص در عملکردهای هیپوکامپ هم‌چون اختلال در حافظه فضایی موش‌های صحرایی نر در ماز آبی موریس، به‌دنبال تغییرات القاء شده توسط استرس در دندریت‌های رأسی ناحیه CA3 گزارش شده است (Herbert و همکاران، ۲۰۰۶). هم‌چنین Bodnoff و همکاران (۱۹۹۵)، نشان دادند تغییرات ساختاری در هیپوکامپ باعث نقص در حافظه فضایی می‌گردد. به‌علاوه، القاء استرس منجر به کاهش نورون‌زایی در قشر پری‌فرونتال میانی می‌گردد و احتمالاً اختلال حافظه و یادگیری، ناشی از کاهش نورون‌زایی می‌باشد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند، حیواناتی که ۲۱ روز، روزانه ۶ ساعت تحت استرس مزمن بی‌حرکتی بوده‌اند تغییرات بیش‌تری را در ساختار نورون‌های هیپوکامپ نسبت به گروه‌های دیگر که ۱۰ روز، روزانه ۲ یا ۶ ساعت و ۲۱ روز، روزانه ۲ ساعت تحت استرس بی‌حرکتی بوده‌اند، نمایان می‌کنند. به‌عبارت دیگر، نقص در حافظه فضایی را ناشی از کاهش انشعابات دندریتی و نورون‌ها در این نواحی بیان می‌کنند (Luine و همکاران، ۱۹۹۶؛ Watanabe و همکاران، ۱۹۹۲؛ Magarin و McEwen، ۱۹۹۵؛ McLaughlin و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kleen و همکاران، ۲۰۰۶). گلوکوکورتیکوئیدها عوامل دیگری هستند که با برقراری ارتباط میان استرس و حافظه نقش مهمی در عملکرد هیپوکامپ ایفا می‌کنند. کورتیکوسترون اثرات تسهیل‌کنندگی و تخریبی بر حافظه و شکل‌پذیری سیناپسی هیپوکامپی را نشان می‌دهد (Bliss و همکاران، ۱۹۷۳؛ Bliss و همکاران، ۱۹۹۳). سطوح پایه کورتیکوسترون در شکل‌گیری حافظه حائز اهمیت است، چنان‌که فقدان کورتیکوسترون نیز موجب نقص در آن می‌گردد (de Kloë و همکاران، ۱۹۹۹). پژوهش‌ها حاکی از ایجاد تغییرات قابل‌توجهی در عملکردهای سلولی و شبکه‌های نورونی به موازات القاء استرس مزمن با سطوح بالای کورتیکوسترون



- stress-induced behavioral deficits: implication of oxidoreductive, endoplasmic reticulum stress cascade, and neuroinflammation. *Cellular and molecular neurobiology*. Vol. 37, pp: 65-81.
۱۴. **Kleen, J.K.; Sitomer, M.T.; Killeen, P.R. and Conrad, C.D., 2006.** Chronic stress impairs spatial memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore. *Behavioral neuroscience*. Vol. 120, pp: 842.
۱۵. **Luine, V.; Martinez, C.; Villegas, M.; Magariños, A.M. and McEwen, B.S., 1996.** Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiology and behavior*. Vol. 59, pp: 27-32.
۱۶. **Luine, V.; Villegas, M.; Martinez, C. and McEwen, B.S., 1994.** Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain research*. Vol. 639, pp: 167-170.
۱۷. **Lynch, J.W.; Kaplan, G.A. and Shema, S.J., 1997.** Cumulative impact of sustained economic hardship on physical, cognitive, psychological, and social functioning. *New England Journal of Medicine*. Vol. 337, pp: 1889-1895.
۱۸. **Magarin, A.M. and McEwen, B.S., 1995.** Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*. Vol. 69, pp: 89-98.
۱۹. **McEwen, B.S. and Sapolsky, R.M., 1995.** Stress and cognitive function. *Current opinion in neurobiology*. Vol. 5, pp: 205-216.
۲۰. **McLaughlin, K.J.; Gomez, J.L.; Baran, S.E. and Conrad, C.D., 2007.** The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain research*. Vol. 1161, pp: 56-64.
۲۱. **Mizoguchi, K.; Yuzurihara, M.; Ishige, A.; Sasaki, H.; Chui, D.H. and Tabira, T., 2000.** Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *Journal of Neuroscience*. Vol. 20, pp: 1568-1574.
۲۲. **Nishimura, J.I.; Endo, Y. and Kimura, F., 1999.** A long term stress exposure impairs maze learning performance in rats. *Neuroscience letters*. Vol. 273, pp: 125-128.
۲۳. **Park, C.R.; Campbell, A.M. and Diamond, D.M., 2001.** Chronic psychosocial stress impairs learning and memory
۳. **Bliss, T.V. and Collingridge, G.L., 1993.** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. Vol. 361, pp: 31-39.
۴. **Bliss, T.V. and Lomo, T., 1973.** Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*. Vol. 232, pp: 331-356.
۵. **Bodnoff, S.R.; Humphreys, A.G.; Lehman, J.C.; Diamond, D.M.; Rose, G.M. and Meaney, M.J., 1995.** Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *Journal of Neuroscience*. Vol. 15, pp: 61-69.
۶. **Cerqueira, J.J.; Mailliet, F.; Almeida, O.F.; Jay, T.M. and Sousa, N., 2007.** The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *Journal of Neuroscience*. Vol. 27, pp: 2781-2787.
۷. **Conrad, C.D.; Galea, L.A.; Kuroda, Y. and McEwen, B.S., 1996.** Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine treatment. *Behavioral neuroscience*. Vol. 110, p: 1321.
۸. **de Kloet, E.R.; Oitzl, M.S. and Joëls, M., 1999.** Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in neurosciences*. Vol. 22, pp: 422-426.
۹. **Gould, E.; Tanapat, P.; Rydel, T. and Hastings, N., 2000.** Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biological psychiatry*. Vol. 48, pp: 715-720.
۱۰. **Hammen, C., 2005.** Stress and depression. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* Vol. 1, pp: 293-319.
۱۱. **Herbert, J.; Goodyer, I.M.; Grossman, A.B.; Hastings, M.H.; De Kloet, E.R.; Lightman, S.L.; Lupien, S.J.; Roozendaal, B. and Seckl, J.R., 2006.** Do corticosteroids damage the brain? *Journal of neuroendocrinology*. Vol. 18, pp: 393-411.
۱۲. **Isgor, C.; Kabbaj, M.; Akil, H. and Watson, S.J., 2004.** Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus*. Vol. 14, pp: 636-648.
۱۳. **Jangra, A.; Sriram, C.S.; Dwivedi, S.; Gurjar, S.S.; Hussain, M.I.; Borah, P. and Lahkar, M., 2017.** Sodium phenylbutyrate and edaravone abrogate chronic restraint



- and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. *Biological psychiatry*. Vol. 50, pp: 994-1004.
۲۴. **Sapolsky, R.M., 2003.** Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochemical research*. Vol. 28, pp: 1735-1742.
۲۵. **Sauro, M.D.; Jorgensen, R.S. and Teal Pedlow, C., 2003.** Stress, glucocorticoids, and memory: a meta-analytic review. *Stress*. Vol. 6, pp: 235-245.
۲۶. **Shors, T.J., 2004.** Learning during stressful times. *Learning & memory*. Vol. 11, pp: 137-144.
۲۷. **Sousa, N.; Lukoyanov, N.V.; Madeira, M.D.; Almeida, O.F.X. and Paula-Barbosa, M.M., 2000.** Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. Vol. 97, pp: 253-266.
۲۸. **Venero, C.; Tilling, T.; Hermans-Borgmeyer, I.; Schmidt, R.; Schachner, M. and Sandi, C., 2002.** Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neuroscience*. Vol. 115, pp: 1211-1219.
۲۹. **Wright, R.L.; Lightner, E.N.; Harman, J.S.; Meijer, O.C. and Conrad, C.D., 2006.** Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 24, pp: 595-605.
۳۰. **Watanabe, Y.; Gould, E.; Cameron, H.A.; Daniels, D.C. and McEwen, B.S., 1992.** Phenytoin prevents stress-and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus*. Vol. 2, pp: 431-435.
۳۱. **Zhang, Y.; Liu, W.; Zhou, Y.; Ma, C.; Li, S. and Cong, B., 2014.** Endoplasmic reticulum stress is involved in restraint stress-induced hippocampal apoptosis and cognitive impairments in rats. *Physiology and behavior*. Vol. 131, pp: 41-48.





## Evaluation of chronic stress on spatial memory using Morris water maze test in animal model

- **Maryam Ahmadnezhad\***: Department of Biochemistry, Research Institute of Biological Sciences and Technologies, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
- **Sirus Khodadadi**: Department of Biochemistry, Research Institute of Biological Sciences and Technologies, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
- **Mohammad Ali Nasiri Khalili**: Department of Biochemistry, Research Institute of Biological Sciences and Technologies, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
- **Narges Maleksabet**: Department of Biochemistry, Research Institute of Biological Sciences and Technologies, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Received: August 2020

Accepted: November 2020

**Keyword:** Chronic unpredictable stress, Memory, Morris water maze, Rats

### Abstract

Stress is one of the most important internal destabilizing factors and has significant negative effects on cognitive functions. Stress induction using the chronic unpredictable stress (CUS) model has been extensively studied in several animal models to investigate the effect of stress exposure, including exposure to stressors randomly, intermittently and unpredictably. CUS has probably been shown to induce memory dysfunction of the chronic stress response. The aim of this study was to investigate the incidence of learning and spatial memory impairment in the Morris water maze (MWM) test after induction of CUS for 6 consecutive days. Adult male rats were randomly divided into control groups (without CUS) and stress (induction of CUS for 6 consecutive days). Animal stress, learning, and spatial memory were assessed by the elevated plus maze (EPM) and the MWM, respectively. CUS reduced performance in spatial learning and memory. The time and distance spent to reach the hidden platform in the stress group compared to the control group in a total of four training days showed an increasing trend. So that in the fourth days, a significant increase ( $P < 0.05$ ) was observed in both parameters. Also, induction of stress led to a significant reduction in the percentage of time in the target quadrant compared with the control group ( $P < 0.01$ ). In the EPM, the stress group showed a significant decrease in the percentage of time spent in the open arm compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The present study, by exposing male mice to unpredictable stress for 6 days, stated that, due to the ineffectiveness of the stress induction strategies used, achieving a hidden platform location in the MWM over time and distance more has been done.

\* Corresponding Author's email: maryamahmadnezhad91@gmail.com

