اثر آلودگی صوتی بریادگیری احترازی غیر فعال و اندازه هیپوکامپوس رت

دکتر عبدالرضا صباحی*،دکتر محمد حسینی‌شریف‌آباد**

چکیده

هدف. هیپوکامپوس بخش کاملاً شناخته شده ای از مغز است که در یادگیری و حافظه دخالت دارد. علیرغم گزارشهای موجود درباره آسیب حافظه وابسته به هیپوکامپوس بعلت استرس صوتی، مطالعه‌ای در باره اثر آلودگی صوتی بر اندازه هیپوکامپوس صورت نگرفته است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات احتمالی مواجهه طولانی مدت با استرس صوتی روی یادگیری و اندازه هیپوکامپوس رت انجام گرفت.

روش‌ها. بیست رت نر ویستار بالغ بطور تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم شدند. گروه آزمایش روزانه ۳ نوبت و هر نوبت ۲۰ دقیقه، بمدت ۳ ماه در معرض صوتی به شدت ۴۰ دسی‌بل و فرکانس ۱۱۰۰ قرار گرفتند. درحالیکه در این مدت حیوانات کنترل در شرایط مشابه با گروه آزمایش ولی بدور از آلودگی صوتی نگهداری شدند. عملکرد یادگیری حیوان با آزمون یادگیری احترازی غیرفعال (Passive Avoidance Learning Test) ارزیابی گردید. سپس حیوانات را بیهوش نموده و با پرفیوژن محلول فیکساتیو ا ز طریق قلب، مغز آنها فیکس و بیرون آورده شد. نیمه راست مغز انتخاب و از هیپوکامپوس سکشنهای سریال به ضخامت ۲۵ میکرون تهیه شد. از هر ۲۰ سکشن، یکی به صورت تصادفی سیستماتک یکنواخت برداشته شد و مورد بررسی قرار گرفت. تخمین حجم با استفاده از اصل کاوالیه انجام شد.

نتایج. رتهای گروه استرس صوتی با تأخیر زمانی کمتر وارد بخش تاریک دستگاه شده که حاکی از یادگیری ضعیفتر آنها بود. همچنین رتهایی که در معرض صوت قرار داشتند در مقایسه با گروه کنترل، هیپ‌وکامپوس کوچکتری داشتند.

نتیجه‌گیری. کاهش اندازه هیپوکامپوس به احتمال زیاد تغییراتی را در مدارهای نورونی آن نشان میدهد.این تغییرات میتواند با اختلالات حافظه و یادگیری در حیوان متعاقب استرس صوتی مرتبط باشد.

واژه‌های کلیدی. آلودگی صوتی، هیپوکامپوس، یادگیری، استرس صوتی.

مقدمه

در بین عوامل استرس زا، آلودگی صوتی بعنوان یک استرس محیطی قوی و شایع هم برای انسان و حیوان مطرح میباشد و از مصادیق بارز مشکلات جوامع صنعتی بشمار میرود. شواهد روزافزونی وجود دارد که آلودگی صوتی ، به دستگاههای شنوایی، عصبی، اندوکرین و قلبی عروقی آسیب میرساند(۴-۱). همچنین بر فعالیت های شناختی منجمله یادگیری و حافظه و سایر رفتارهای فرد اثر منفی دارد(۷-۵). استرس صوتی همانند سایر عوامل استرس زا، طیفی از پاسخهای فیزیولوژیک را که بارزترین آن فعال نمودن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال و افزایش گلوکوکورتیکوئید های خون است بدنبال دارد(۸، ۹). هیپوکامپوس بخشی از سیستم لیمبیک در مغز است که بیشترین

* دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

** استادیار گروه مورفوآناتومی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد.

نویسنده رابط: Email: Sabahi@med.mui.ac.ir

تاریخ وصول: ۸۵/۴/۲۸ تصحیح نهائی: ۸۵/۸/۱۶ پذیرش مقاله: ۸۵/۸/۱۸

www.SID.ir

رسپتورهای گلوکوکورتیکوئیدی را در بین نواحی مختلف مغز را داراست(۱۰) و به استرس فوق‌العاده حساس می‌باشد(۱۱). هیپوکامپوس در روند یادگیری و حافظه نقشی اساسی بعهده دارد(۱۲) و سالم وکامل بودن مدارهای نورونی آن از عوامل مهم در روند یادگیری است(۱۳). علیرغم این واقعیات، مطالعه تجربی که تأثیر آلودگی صوتی را بر اندازه هیپوکامپوس سنجیده باشد در جستجوی ما یافت نشد. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر آلودگی صوتی برقوه یادگیری و اندازه هیپوکامپوس در رت انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۴ در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. رتهای نر دو ماهه از نژاد Wistar و در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم که در شرایط مناسب آب(لوله کشی شهر) و غذا(خوراک دام پارس) ، به دور از سر و صدا و در دمای اتاق ۲±۲۳ و دوره روشنایی ، تاریکی ۱۲ ساعته(روشنی ازساعت 7 تا ۱۹) پرورش یافته بودند ، بطور تصادفی در دو گروه ده تایی شاهد و نمونه قرار گرفتند.

گروه نمونه روزانه ۳ نوبت و هر نوبت ۲۰ دقیقه ، بمدت ۳ ماه در معرض صوتی به شدت ۴۰ دسی بل و فرکانس ۱۱۰۰ هرتز که توسط آمپلی فایر ایجاد می شد قرار گرفتند در حالیکه در این مدت حیوانات شاهد در شرایط مشابه از لحاظ آب و غذا و محل زندگی با گروه نمونه ولی بدور از آلودگی صوتی نگهداری شدند.

آزمون احترازی غیر فعال Active Avoidance Learning Test(۱۴): برای این آزمایش از دستگاه مخصوص استفاده شد. دستگاه از دو بخش ۱) جعبه آموزش و ۲) دستگاه استیمولاتور تشکیل شده است. جعبه آموزش دارای دو محفظه کوچکتر یکی روشن و دیگری تاریک میباشد که این دومحفظه توسط در گیوتینی(۸× ۸ سانتیمتر) متحرک با یکدیگر مرتبط میشوند. و کف بخش تاریک از صفحه مشبک فلزی تشکیل یافته بود. ابتدا به منظور عادت دادن، حیوان را در بخش روشن دستگاه قرار داده و پس از گذشت ۱۰ ثانیه در گیوتینی را به آرامی باز کرده و به محض ورود حیوان به بخش تاریک، در گیوتینی را بسته و حیوان از بخش تاریک خارج شد. این مرحله پس از گذشت ۳۰ دقیقه مجدداً تکرار شد. رتهایی که پس از گذشت ۱۰۰ ثانیه وارد بخش تاریک نشدند در ادامه آزمایشها مورد استفاده قرار نگرفتند.پس از گذشت ۳۰ دقیقه کف دست و پاهای حیوانات را به سرم فیزیولوژی آغشته نموده و به محض ورود حیوان به بخش تاریک در گیوتینی را بسته و بوسیله دستگاه استیمولاتور شوک ملایمی به شدت ۱ میلی آمپر و بمدت ۲ ثانیه به حیوان اعمال شد. پس از گذشت ۲۰ ثانیه حیوان را از بخش تاریک دستگاه خارج نموده و در مرحله بعد، پس از گذشت ۲ دقیقه مجدداً حیوان را در بخش روشن دستگاه قرار داده و در گیوتینی را به آرامی باز نموده و وقتی در طول مدت ۲ دقیقه حیوان وارد محفظه تاریک نگردید جلسه آموزش خاتمه یافت و در غیر اینصورت مراحل اعمال شوک مجدداً تکرار شد. برای تعیین میزان یاد آوری آموخته، ۴۸ ساعت پس از جلسه آموزش، حیوان دربخش روشن دستگاه قرار داده شد و پس از گذشت ۱۰ ثانیه در گیوتینی را باز نموده و تأخیر زمانی که حیوان وارد بخش تاریک می شد بعنوان Step Trough Latency (STL) ثبت شد.

حیوانات با تزریق داخل صفاقی ۱ میلی‌لیتر یوروتان بیهوش شدند و با پرفیوژن فرمالین ۴٪ از طریق قلب، پس از تثبیت بافت مغز، آنرا خارج نموده و در ظرفهای محتوی ماده نگهدارنده بمدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس پیاز بویایی، مخچه و ساقه مغز را از آن جدا نموده و مغزرا وزن نموده و ابعاد آن اندازه‌گیری شد. با یک برش میانی مغز را به دو نیمکره تقسیم کرده و نیمکره راست برای بررسی میکروسکوپی انتخاب شد و با بریدن قطب پیشانی، برروی بخش عقبی مغز را که حاوی هیپوکامپ‌وس است مراحل پروسسینگ بافت انجام گرفت. از قالبهای پارافینی مغز، برشهای

Archive of SID
www.SID.ir

نمونه‌برداری تصادفی سیستماتیک یکنواخت انتخاب و رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین صورت گرفت(۱۵).

برای محاسبه (انـدازه) حجـم هیپوکـامپوس از یکـی از روشـهای اسـتریولوژی کـه تکنیکـی بـدون سـو Unbiased و مـوثر بـرای سنجش مقادیر سه بعدی از برشهای بافـت شناسـی دو بعـدی مـی باشد ، استفاده گردید . بـه ایـن منظـور بـه کمـک میکروسـکوپ Microprojection تصویر برش بافتی را به روی سـطح سـفیدی انداختـه و صـفحه ای شـفاف شـطرنجی (گریـد) حـاوی نقـاط بـا فواصل معین از هم دیگر بر روی تـصویر منطبـق گردیـد و تعـداد نقاطی که با هیپوکامپوس برخورد کرده بودند (ΣP) شمرده شد و با در نظر گرفتن مساحت اطراف هر نقطه A(P)، سـطح مقـاطع را محاسبه نمـوده و بـا ضـرب نمـودن آن در فاصـله بـین برشـهای انتخابی که ثابت بود (d=۵۰۰µm)، حجم بااستفاده از فرمول زیـر بر طبق اصل کاوالیه(۱۶)دست آمد:

حجم $V = \Sigma P.A(P).d$

داده ها بصورت میانگین با مقادیر انحراف معیار ارائه شـده اسـت. مقـدار ضـریب خطـای محاسـبه(Coefficient Error (CE بـر اساس روش Gundersen محاسبه شد(۱۷). داده ها با اسـتفاده از نرم افزار آماری SPSSversion11.5 وآزمـون t مـورد تجزیـه و تحلیل قرار گرفت و نتایج با P<۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

با آنکه حیوانات دو گروه در شروع مطالعه از لحاظ وزنی تفـاوت معنـی داری نداشـتند (گـروه شـاهد ۸±۲۰۹ و حیوانـات نمونـه ۶±۲۱۱ اما در پایان، وزن حیوانات نمونه در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشت (۳۴±۲۹۷، ۴۱±۳۵۹ و P=۰/۰۰۰۱).

یافته های این مطالعه نشان داد که رتهایی که در معرض آلـودگی صوتی قرار داشته اند با میانگین تـأخیر زمـانی ۶/۲۵ ± ۳۸/۲ ثانیـه وارد بخش تاریک دستگاه شدند درحالیکه در مورد رتهای شاهد این زمان ۵/۴۶ ± ۳۱/۴ ثانیـه بـود (P < ۰/۰۱). جـدول شـماره ۱ تأثیر معنـی‌دار آلـودگی صـوتی را بـر کـاهش انـدازه پارامترهـای وزن، پهنا و ارتفاع مغز را نشان میدهد. همچنین داده هـا نـشان داد که حجـم هیپوکـامپوس حیوانـات گـروه اسـترس (۱/۰۱±۲۵/۴ و ۸٪=CE) نـسبت بـه گـروه شـاهد (۰/۸۲±۲۷/۳ و ۹٪=CE) کوچکتر است و تفاوت معنی‌داری دارد (P=۰/۰۰۰۱).

جدول ۱- اثر آلودگی صوتی بر شاخصهای بیومتریک مغز (در هر گروه ۱۰ رت، میانگین ± انحراف معیار)

	وزن (g)	طول(mm)	پهنا(mm)	ارتفاع(mm)
شاهد	۱/۵۴ ± ۰/۰۵	۱۴/۵ ± ۰/۳۸	۱۴/۸ ± ۰/۳۵	۹/۶۰ ± ۰/۲۳
نمونه	۱/۴۶ ± ۰/۰۷	۱۴/۴ ± ۰/۳۵	۱۴/۲ ± ۰/۳۷	۹/۴۰ ± ۰/۱۹
	P= ۰/۰۰۵	P = ۰/۴۴۲	P = ۰/۰۰۳	P = ۰/۰۱۱

بحث

این مطالعه نشان داد کـه اعمـال آلـودگی صـوتی بمـدت سـه مـاه (روزانه ۳ بار و هر نوبت ۲۰ دقیقه) به شـدت ۴۰ دسـی بـل باعـث کاهش یادگیری، کـاهش وزن، پهنـا و ارتفـاع مغـز رت میـشود.

Archive of SID
www.SID.ir

همچنین داده های این مطالعه که با استفاده از روشهای بدون تورش(Unbiased) و دقیق استریولوژی بدست آمده ، نشان داد که حجم کل هیپوکامپوس متعاقب آلودگی صوتی کاهش یافته است. در توضیح علل این کاهشها چنین میتوان گفت که بررسیهای قبلی نشان داده است که مواجهه با استرس صوتی باعث افزایش فعالیت محورHPA و در نتیجه بالا رفتن سطح گلوکوکورتیکوئید های خون میشود(۸، ۹) و مقادیر بالای این هورمونها اثرات سوئی بر مغز و علی الخصوص هیپوکامپوس میگذارد. معلوم شده است که هیپوکامپوس بیشترین گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی را در مقایسه با سایر بخشهای مغز داشته(۱۰) و به اثر این هورمونها حساستر میباشد. بطوریکه افزایش گلوکوکورتیکوئید موجب بروز آتروفی و تغییرات دژنراتیو نورونهای هیپوکامپی وکاهش یادگیری و حافظه میشود که این موضوع در مطالعات انسانی و حیوانی مکرراً گزارش شده است(۲۲-۱۸). بعنوان مثال، مطالعه Lupien و همکارانش درسال ۱۹۹۸ نشان داد که افزایش سطح کورتیزول خون باعث کاهش ۱۴ درصدی در حجم هیپوکامپوس و نیز اختلال حافظه نسبت به افرادی که میزان کورتیزول طبیعی دارند شده است(۲۲). گرچه مکانیسم دقیق چگونگی وقوع دژنراسیون نورونها کاملاً معلوم نیست اما گفته میشود که افزایش اکسیدانت ها متعاقب انواع استرس منجمله آلودگی صوتی منجر به آسیب و دژنراسیون نورون می شود(۶ و ۲۵-۲۳). علاوه بر این کاهش نوروتروفینها بعلت مواجهه با استرس نیز ازعلل آتروفی سلولهای عصبی میباشد(۲۶).

درجستجوی متون، مطالعات معدودی که تغییرات ساختمان هیپوکامپوس متعاقب استرس صوتی را بررسی کرده بودند، یافت شد که به آن اشاره میشود.

Manikandan و همکارانش در مطالعه ای بر روی رت که اخیراً نتایج آن منتشر شد، دریافتند که استرس صوتی باعث کاهش تعداد دندریتها در نواحی مغز منجمله CA3 و CA1 هیپوکامپوس میشود. که آتروفی هیپوکامپوس که از نتایج مطالعه حاضراست با یافته آنها همخوانی دارد(۶).

دریک بررسی که Kim وهمکارانش برای مقایسه اثر آلودگی صوتی و موسیقی در دوره پیش از تولد بر روند نورون زایی در گیروس دندانه ای هیپوکامپوس رت انجام دادند مشاهده شد که استرس صوتی در پیش از تولد هم موجب توقف پدیده نورون زایی در ناحیه گیروس دندانه ای شده است(۲۸).

Saljo و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۲ گزارش نموده بودند که استرس صوتی در فعال نمودن ژنهایی که منجر به مرگ نورونی و آپوپتزی در همه نواحی هیپوکامپوس میشود نقش دارد (۲۹). بهر حال اینکه آیا کاهش حجم صرفاً ناشی از تغییراتی است که در اجزای سیناپسی، آکسونی و دندریتی مدارهای هیپوکامپی رخ میدهد یا اینکه مرگ نورونی نیز در این روند دخالت دارد به مطالعه بیشتر و محاسبه استریولوژیک و مقایسه تعداد کل نورون در هر یک از زیر نواحی هیپوکامپوس در دو گروه مورد مطالعه دارد. در هر صورت، مدت زمان مواجهه با استرس، نوع و نژاد حیوان و دوره‌ای از زندگی که حیوان تحت استرس قرار میگیرد از عوامل تعیین کننده در این زمینه هستند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه با استفاده از متد بدون تورش استریولوژیک نشان داد که مواجهه طولانی مدت با آلودگی صوتی میتواند باعث کاهش حجم هیپوکامپوس شود. این نتایج یک مبنای نورآناتومیکی که ممکنست با اختلالات یادگیری و حافظه گزارش شده در انسان و حیوان متعاقب استرس صوتی مرتبط باشد را فراهم می نماید.

منابع

Archive of SID
www.SID.ir

1. Gloag D. Noise: hearing loss and psychological effect. Br Med J 1980; 281: 1325-1327.
2. Alario P, Gamallo A, Beato MJ, Trancho G. Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. Physiol Behav 1987, 40: 29-32.
3. Spreng M. Central nervous system activation by noise. Noise Health 2000; 2: 49-58.
4. Babisch W. Stress hormone in the research on cardiovascular effect of noise. Noise Health 2003; 5: 1-11.
5. Prior H. Effects of predictable and unpredictable intermittent noise on spatial learning in rats. Behav Brain Res. 2002, 133(2): 117-124.
6. Manikandan S, Padma MK, Srikumar R, Jeva Parthasarathv N, Muthuvel A, Sheela Devi R. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. Neurosci Lett 2006, 399(1-2): 17-22.
7. Haines MM, Brentnall SL, Stansfeld SA, Klineberg E. Qualitative responses of children to environmental noise. Noise Health 2003, 19:19-30.
8. Spreng M. Possible health effect of noise induced cortisol increase. Noise Health 2000, 2: 59-64.
9. Spreng M. Cortical excitations, cortisol excretion and estimation of tolerable nightly over-flights. Noise Health 2002, 4: 39-46.
10. Sousa RJ, Tannary NH, Lafer EM. In situe hybridisation mapping of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain. Mol Endocrinol 1989, 3: 481- 494.
11. Sapolsky RM. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. Stress 1996, 1: 1-19.
12. Eichenbaum H, Oto T. The hippocampus – what does it do? Behav. Neuroal Biol 1992, 57: 2-36.
13. Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter LG, Bliss TVP et al. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. Neuroscience 1997, 80: 69-77.
14. Yu Z, Cheng G, Hu B. Mechanism of colchicines impairment on learning and memory, and protective effect of CGP36742 in mice. Brain Res. 1997, 750: 53-58
15. Bancroft JD, Steven A. Theory and practice of histological techniques, 3rd ed: Cherchill Livingstone; UK; 1991.
16. Mayhew TM. The new stereological method for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. Exp Physiol 1991, 76:639-665.
17. Gundersun HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc 1987, 147: 229-263.
18. McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. Hum Psychopharmacol 2001, 16: 7-19.
19. McKittrick CR, Magarinos AM, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. Synapse 2000, 36(2): 85-94.
20. Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. Biol Psychiatry 1999, 46: 1472–1479.
21. Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: comparison of stressors. Neuroscience 1995, 69: 83-88.
22. Lupien SJ, DeLeon MJ, De Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NPV, et al. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. Nature Neurosci 1998, 1: 69-73.
23. Manikandan S, Srikumar R, Jeya Parthasarathy N, Sheela Devi R. Protective effect of Acorus calamus LINN on free radical scavengers and lipid peroxidation in discrete regions of brain against noise stress exposed rat Biol Pharm Bull. 2005, 28(12): 2327-2330.
24. Liu J, Mori A. Stress, aging, and brain oxidative damage. Neurochem Res 1999, 24:1479–1497.
25. McIntosh LJ, Sapolsky RM. Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. Neurotoxicology 1996, 17: 873–882.
26. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus, J. Neurosci 1995, 15: 1768-1777.
27. Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. Endocrinology. 1985, 117(6): 2505-2511.
28. Kim H, Lee MH, Chang HK, Lee TH, Lee HH, Shin MC, et al. Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. Brain Dev. 2006, 28(2):109-114.
29. Saljo A, Bao F, Jingshan S, Hamberger A, Hansson HA, Haglid KG. Exposure to short-lasting impulse noise causes neuronal c-Jun expression and induction of apoptosis in the adult rat brain. J Neurotrauma 2002, 19(8): 985-991.

Archive of SID

www.SID.ir