ارزیابی استرس اکسیداتیو، یادگیری و حافظه فضایی به دنبال محرومیت از خواب رؤیا در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بالغ

زهرا سبحانی [۱]، سید بهنام‌الدین جامعی [۲]، علی ناصری [۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

زمینه و هدف: محرومیت از خواب تأثیرات منفی زیادی بر بدن و به خصوص فرآیندهای شناختی ناحیه هیپوکامپ دارد. استرس اکسیداتیو ناشی از این محرومیت نقش عمده‌ای در تحلیل رفتن سلول‌ها و تغییر رفتار حیوانات آزمایشگاهی و انسان‌ها ایفا می‌کند. از سوی دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز سلولی اولین سد دفاعی بدن در برابر حمله انواع رادیکال‌های آزاد می‌باشند. در تحقیق حاضر ارزیابی استرس اکسیداتیو ناحیه هیپوکامپ، یادگیری و حافظه فضایی به دنبال محرومیت از خواب رؤیا مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این تحقیق بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار که به طور تصادفی در ۵ گروه تقسیم شدند، انجام گرفت. با استفاده از تکنیک سکو محرومیت از خواب رؤیا به مدت ۷۲ ساعت القاء گردید، سپس از ماز آبی موریس جهت سنجش یادگیری و حافظه فضایی استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از اتمام آزمایش‌های رفتاری موش‌ها دیکاپیتیت گردیده، ناحیه هیپوکامپ از مغز جدا شده و عمل هموژنایز و سانتریفیوژ روی آن‌ها صورت پذیرفت، سپس از سوپرناتانت حاصل توسط دستگاه الایزا فلورسنت در طول موج ۳۴۰ نانومتر و منطبق با پروتکل پیشنهادی کیت سوپراکسید دیسموتاز، تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اندازه‌گیری شد. نتایج توسط نرم افزار آماری Spss۱۹ آنالیز شد و سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ برای نتایج معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که محرومیت از خواب رؤیا بر فرآیند استرس اکسیداتیو ناحیه هیپوکامپ تأثیر معنی‌داری نگذاشت ($P > ۰/۰۵$)، اما بر یادگیری و حافظه تأثیر معنی‌داری گذاشت ($P < ۰/۰۲۵$ و $P < ۰/۰۰۴$).

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این تحقیق تغییرات یادگیری و حافظه متعاقب محرومیت کوتاه مدت از خواب رؤیا با مکانیزم یا مکانیزم‌هایی غیر از مکانیزم استرس اکسیداتیو در ناحیه هیپوکامپ مربوط می‌باشد. همچنین برنامه‌ریزی جهت بهبود کیفیت خواب می‌تواند مزایای کوتاه مدت یا بلند مدتی برای ساختارهای هیپوکامپی و سلامت انسان‌ها در زمینه رفتار، یادگیری، حافظه، مدیریت استرس و ... داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: استرس اکسیداتیو، یادگیری و حافظه فضایی، محرومیت از خواب رؤیا، هیپوکامپ

ارجاع: سبحانی زهرا، جامعی سید بهنام‌الدین، ناصری علی. **ارزیابی استرس اکسیداتیو، یادگیری و حافظه فضایی به دنبال محرومیت از خواب رؤیا در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بالغ**. مجله تحقیقات علوم رفتاری ۱۳۹۴؛ ۱۳(۲): ؟؟

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۵/۰۳ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۴/۲۲

۱. کارشناس ارشد روان‌شناسی بالینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، فارس، ایران (نویسنده مسؤول)

Email: Zahrasobhani120@yahoo.com

۲. استاد آناتومی و علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳. استادیار روان‌شناسی سلامت، گروه روانشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فیروزآباد، فیروزآباد، ایران

مقدمه

استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) فرآیندی است که از طریق رادیکال‌های آزاد (اتم‌ها یا مولکول‌هایی که به خاطر داشتن الکترون منفرد بسیار واکنش‌پذیر بوده و دائماً در بدن در گردش هستند)، در سطح غشاء سلول ایجاد شده و سبب آسیب به غشاء سلول و اندامک‌های داخل سلولی به خصوص میتوکندری‌ها می‌شود. جهت مقابله با استرس اکسیداتیو تولید شده، سلول به خوبی به سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GSM-PX) و کاتالاز (CAT) سلولی که اولین سد دفاع در برابر حمله انواع رادیکال‌های اکسیژن فعال شده می‌باشند، تجهیز شده است (۱). در حالت عادی در بدن یک فرد سالم بین تولید رادیکال‌های آزاد و این سیستم توازن برقرار است اما اگر به هر دلیلی این تعادل بهم بخورد (مثلاً فرد بیمار شود)، استرس اکسیداتیو پیش می‌آید که این حالت در بیش از صد نوع بیماری مختلف دخالت دارد (۲).

محرومیت از خواب رؤیا به عنوان یک عامل قوی برای ایجاد استرس اکسیداتیو عمل می‌نماید. استرس اکسیداتیو به دنبال خواب رؤیا احتمالا نقش عمده‌ای در تغییر رفتار و عملکرد حیوانات آزمایشگاهی و نیز انسان‌ها ایفا می‌کند(۳). هیپوکامپ جایگاه یادگیری فضایی در مغز می‌باشد و تقویت بلندمدت (Long Term Potentiation) یکی از مهمترین مکانیسم‌های سلولی است که در فرآیند یادگیری و حافظه فضایی درگیر می‌باشد (۴، ۵). نشان داده شده است که مصرف آنتی اکسیدان‌ها سبب بهبود یادگیری فضایی و افزایش LTP در موش‌های مبتلا به بیماری آلزایمر می‌شود(۶). به طور کلی تولید رادیکال‌های آزاد در ارتباط با فرآیندهای معمول سلولی مانند متابولیسم سلولی، تنفس میتوکندریایی و غیره بوده (۷) که ممکن است در مغز افزایش یابند (۸). تفاوت در مقدار تولید رادیکال‌های آزاد در هر نقطه از مغز شاید به میزان مصرف اکسیژن آن ناحیه مربوط باشد(۹)، سلول‌های هیپوکامپی در جریان فعالیت‌هایی نظیر یادگیری، مصرف اکسیژن بیشتری داشته و در نتیجه تولید رادیکال آزاد بیشتری نموده و در مواجهه با تغییرات اکسیژن نسبت به مناطق دیگر مغز حساس‌ترند (۱۱-۱۰). به نظر می‌رسد شناسایی روند تغییرات مولکولی نواحی مرتبط با مراکز کنترل خواب و نحوه اثر گذاری روی هیپوکامپ و نهایتاً برنامه‌ریزی جهت کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود اختلالات خواب می‌تواند مزایای کوتاه مدت یا بلند مدتی را برای ساختارهای هیپوکامپی و سلامت در پی داشته باشد که شامل یادگیری، حافظه، رفتار، مدیریت استرس و ... می‌باشند. تحقیق حاضر نیز به منظور ارزیابی استرس اکسیداتیو و ویژگی‌های مدت زمان، مسافت طی شده برای رسیدن به سکو و سرعت شنا به عنوان شاخص‌های یادگیری و حافظه فضایی به دنبال محرومیت از خواب رؤیا انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح پژوهش

مطالعه حاضر یک پژوهش کاربردی از نوع مداخله‌ای-آزمایشی بود.

حجم نمونه

جامعه آماری عبارت بود از موش‌های صحرائی نر بالغ نژاد ویستار و نمونه آماری عبارت بود از ۴۰ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۷۰-۲۰۰ گرم که از مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه گردیده، و با استفاده از روش تصادفی ساده به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. در طول آزمایش آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار گرفته و هر دو روز یکبار قفس آن‌ها تمیز می‌گردید. دمای مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات نیز بین ۳ ع ۲۲ درجه سانتیگراد بود. قبل از آزمایش به موش‌ها اجازه داده می‌شد خود را با شرایط آزمایشگاه تطبیق دهند. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام گردید و هر حیوان فقط یکبار مورد استفاده قرار گرفت. تمام مراحل آزمایش به صورت کور انجام شد و آزمایشگر از نام گروه‌ها بی اطلاع بود. همچنین موازین اخلاقی در پژوهش‌های حیوانی و نیز کدهای مربوط به معاهدات هلسینکی در خصوص کار با

حیوانات آزمایشگاهی مد نظر قرار گرفت و تأییدیه کمیته اخلاقی در پژوهش‌های زیستی از دانشگاه علوم پزشکی ایران اخذ گردید. گروه‌بندی حیوان‌ها بدین شرح بود: گروه اول (آزمایش A): همراه با محرومیت از خواب رؤیا و یادگیری ثانویه، گروه دوم (شاهد A): بدون محرومیت از خواب رؤیا، همراه با یادگیری ثانویه، گروه سوم (آزمایش B): همراه با یادگیری اولیه، محروم از خواب رؤیا و یادگیری ثانویه، گروه چهارم (شاهد B): همراه با یادگیری اولیه و ثانویه، بدون محرومیت از خواب رؤیا و گروه پنجم (کنترل G): عاری از هر نوع مداخله رفتاری که جهت بررسی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که طبقه‌بندی گروه‌های ۱ تا ۴ همانند طرح چهار گروهی سالمون بود.

روش ارزیابی‌های رفتاری

ماز آبی موریس (Moriss Water Maze) در سال ۱۹۸۲ جهت بررسی یادگیری و حافظه فضایی توسط موریس و همکارانش طراحی شد. ماز آبی موریس شامل یک حوضچه استوانه‌ای شکل سیاه رنگ با قطر ۱۳۶ سانتیمتر و ارتفاع ۶۰ سانتیمتر بود که تا ارتفاع ۲۷ سانتیمتری آن با آب ۱ع۲۰ درجه سانتیگراد پر می‌گردید. یک سکوی کوچک سیاه رنگ با قطر ۱۰ سانتیمتر درون حوضچه و یک سانتیمتری زیر سطح آب قرار داشت. توسط کامپیوتر حوضچه به ۴ ربع تقسیم می‌شد(شمال غربی، شمال شرقی، جنوب غربی و جنوب شرقی). در این تحقیق سکو در ربع شمال غربی قرار داشت. در بالای حوضچه یک دوربین فیلمبرداری قرار داشت که به کمک نور مادون قرمز از حرکات موش فیلمبرداری می‌کرد و اطلاعات را به کامپیوتر و نرم افزار مربوطه (Ethovision XT Version 5) منتقل می‌نمود. هر موش به مدت ۵ روز و هر روز یک بلوک (هر بلوک شامل ۴ کارآزمایی) مورد آزمایش قرار می‌گرفت. موقعیت سکوی نجات نیز در طول ۴ روز ابتدای آزمایش ثابت بود. در هر کارآزمایی حیوان به طوریکه صورتش رو به دیواره ماز بود توسط آزمایش‌گر به آب انداخته می‌شد، ربع‌های انتخابی به طور تصادفی توسط کامپیوتر معین می‌گردید. حیوان ۶۰ ثانیه فرصت داشت تا سکو را بیابد. در صورت پیدا نکردن سکو، حیوان توسط آزمایشگر به روی سکو هدایت می‌شد و پس از ۱۵ ثانیه استراحت از ناحیه دیگری به آب انداخته می‌شد. در طی این مدت شاخص‌های مسافت طی شده، زمان سپری گشته و سرعت شنای موش توسط کامپیوتر ثبت می‌گردید. پس از اتمام ۴ کارآزمایی هر حیوان، موش با حوله خشک گردیده به مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات منتقل می‌گردید. در روز پنجم، تست پروب/حافظه از حیوان گرفته می‌شد به این ترتیب که سکوی نجات را از ماز خارج نموده، حیوان یکبار و فقط از یک جهت به مدت ۶۰ ثانیه در آب رها می‌گردید. شاخص‌های مسافت، زمان و سرعت نیز توسط کامپیوتر ثبت می‌گردید. همانطور که گفته شد در مدل ماز آبی موریس از ویژگی‌های مدت زمان لازم و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو و سرعت شنای حیوان در طی روزهای آموزش (۴ روز اول) به عنوان شاخص‌های یادگیری فضایی استفاده می‌شود، به این مفهوم که چنانچه حیوان در روز آخر آموزش نسبت به روز اول می‌توانست سکوی نجات را در مدت زمان کمتر و طی مسافت کمتری پیدا نماید روند یادگیری فضایی در آنها مثبت ارزیابی می‌شد. این یافته‌ها هنگامی معنی پیدا می‌کرد که با کاهش سرعت شنا همراه نباشد. از طرف دیگر در مرحله پروب که با حذف سکوی نجات از ماز همراه بود چنانچه فرآیند تثبیت حافظه فضایی رخ داده باشد حیوان بایستی بیشترین زمان را در ربعی داشته باشد که در روزهای آزمایش، سکو در آنجا قرار داشت (ربع هدف). بنابراین در تحقیق حاضر از شاخص‌های مذکور جهت بررسی روند یادگیری و حافظه فضایی استفاده شد. در مدت آزمایش وسایل موجود در اتاق ماز آبی موریس ثابت بود و تمهیدات لازم جهت کنترل اثر متغیرهایی همچون دما، صدا و حرارت صورت پذیرفت. همچنین وضعیت بینایی موش‌ها توسط دامپزشک مرکز تحقیقات و نگهداری حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت، علاوه بر آن از موش‌ها تست بینایی نیز گرفته شد.

جهت محروم نمودن موش از خواب رؤیا، از تکنیک سکو (Flower Pot technique) استفاده شد. سکو مکعبی به ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ سانتیمتر از جنس پلکسی گلاس بود که در وسط آن میله‌ای با ارتفاع ۱۰ سانتیمتر و صفحه‌ای به قطر ۷ سانتی‌متر وجود داشت که به وسیله آب احاطه شده بود. در این وضعیت حیوان توانایی بیداری، خواب غیر رؤیا و خواب رؤیا را داشت اما با توجه به اینکه با شروع خواب رؤیا عضلات گردن حیوان شل می‌گردید، پوزه حیوان با آب تماس پیدا می‌کرد و بیدار می‌شد.

روش اندازه گیری سوپراکسید دیسموتاز

۲۴ ساعت پس از آخرین آزمون رفتاری، با ترازوی مخصوص وزن کردن رت، وزن موش اندازه گرفته می‌شد، سپس حیوان با دوز بالای کتامین ۱۵۰ mg/kg و زایلازین ۱۵ mg/kg عمیقاً بیهوش می‌گشت و پس از اطمینان از بیهوشی کامل، سر حیوان از بدنش جدا گردیده، حداکثر ظرف مدت ۳ دقیقه مغز حیوان از جمجمه در آورده می‌شد، در نیتروژن مایع قرار می‌گرفت و نهایتاً در فریزر c۰ذ۸۰- جای می‌گرفت. جهت استخراج پروتئین از نمونه‌ها ابتدا لازم بود محلول‌های نرمال سالین، فسفات بافر سالین و ریپا تهیه گردند، پس از تهیه محلول‌ها، عمل استخراج پروتئین از نمونه‌ها بدین شرح صورت پذیرفت: ابتدا بافت هیپوکامپ را وزن نموده، با نرمال سالین و فسفات بافرسالین سه مرتبه آن‌را شستشو داده (به ازاء هر یک گرم بافت، ۳۰۰۰ λ ریپای سرد ریخته شد)، با هموژنایزر (Homogenizer) بافت مورد نظر را هموژنایز نموده به طوریکه بافت کاملاً یکسان شد، بافت هموژنایز شده را در یک میکروتیوپ ریخته، در طی ۳۰ دقیقه، هر ۵ دقیقه یکبار به مدت ۱ دقیقه بافت در ورتکس (Vortex) قرار داده می‌شد (پس از ورتکس نمودن هر میکروتیوب تا ورتکس بعدی، میکروتیوب محتوی بافت در یخ قرار می‌گرفت). به مدت ۲۰ دقیقه، بافت مورد نظر با دور ۱۳۰۰۰ در ثانیه در دستگاه سانتریفیوژ c۰ذ۴ قرار داده شده، سپس قسمت فوقانی بافت سانتریفیوژ شده را که سوپرناتانت نامیده می‌شد جهت انجام تست الیزا، به صورت کور با سمپلر (Sampler) برداشته، در میکروتیوب‌های کوچکتر الکوات (Alequate) نموده، استوک (stock) آن در فریزر c۰ذ۸۰- قرار داده شد. نهایتاً با استفاده از دستگاه الایزا فلورسنت (Elaiza FLX800) در طول موج ۳۴۰ نانومتر و منطبق با پروتکل پیشنهادی کیت سوپراکسید دیسموتاز تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

کلیه آنالیزهای آماری بر اساس Spss۱۹ صورت گرفت و سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ برای نتایج معنی‌دار تلقی گردید. همچنین به منظور بررسی تفاوت‌های موجود بین گروه‌های آزمایش، شاهد و کنترل از آزمون‌های آماری تحلیل چند متغیره (مانوا) و تحلیل واریانس یک طرفه استفاده گردید. جهت ارزیابی میزان استرس اکسیداتیو هیپوکامپ به دنبال محرومیت از خواب رؤیا مطابق با جدول ۱ از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه استفاده گردید.

نتایج جدول ۱ نشان داد که بین گروه‌های آزمایش و شاهد تفاوت معنی‌دار وجود ندارد (P>۰/۰۵). این بیانگر آنست که محرومیت از خواب رؤیا به مدت ۷۲ ساعت بر فرآیند استرس اکسیداتیو هیپوکامپ تأثیر معنی‌داری نگذاشته است. جهت ارزیابی میزان یادگیری و حافظه به دنبال محرومیت از خواب رؤیا ابتدا لازم بود پیش فرض تساوی کوواریانس‌ها بررسی گردد، نتایج آزمون باکس نشان داد که پیش فرض تساوی کوواریانس‌ها در شاخص‌های یادگیری رد نمی‌شود، بنابراین می‌توان از تحلیل چند متغیره (مانوا) برای تحلیل داده‌ها استفاده نمود.

نتایج جدول ۲ (تحلیل چند متغیره) نشان داد که بین سنتروئید (میانگین میانگین‌ها) سه متغیره در گروه‌های آزمایش و شاهد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P < ۰/۰۰۴). این بیانگر آنست که محرومیت از خواب رؤیا به مدت ۷۲ ساعت بر یادگیری اثرگذار بوده است، بنابراین لازم شد تک

تک شاخص‌های یادگیری مورد بررسی قرار گیرند که نتایج در جدول ۳ آمده است.

نتایج جدول ۳ نشان داد که بین نمرات مسافت در گروه‌های آزمایش و شاهد تفاوت به سطح معنی‌دار رسیده است (P< ۰/۰۰۰۱)، میزان تأثیر ۰/۴۸ بوده است (۴۸ از تغییرات مربوط به عضویت گروهی بوده است). بین نمرات زمان یادگیری در گروه‌های آزمایش و شاهد نیز تفاوت به سطح معنی‌دار رسیده است (P< ۰/۰۰۰۱)، میزان تأثیر ۰/۵۲ بوده است (۵۲ از تغییرات مربوط به عضویت گروهی بوده است). اما بین نمرات سرعت یادگیری در گروه‌های آزمایش و شاهد تفاوت به سطح معنی‌دار نرسید (P> ۰/۰۵). همچنین نتایج آزمون باکس نشان داد که پیش فرض تساوی کوواریانس‌ها در شاخص‌های حافظه رد نمی‌شود، بنابراین می‌توان از تحلیل چند متغیره (مانوا) برای تحلیل داده‌ها استفاده نمود.

نتایج جدول ۴ (تحلیل چند متغیره) نشان داد که بین سنتروئید (میانگین میانگین‌ها) سه متغیره در گروه‌های آزمایش و شاهد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P< ۰/۰۲۵). این بیانگر آنست که محرومیت از خواب رؤیا به مدت ۷۲ ساعت بر حافظه اثرگذار بوده است، بنابراین لازم شد تک تک شاخص‌های حافظه مورد بررسی قرار گیرند که نتایج در جدول ۵ آمده است.

نتایج جدول ۵ نشان داد که بین نمرات شاخص‌های مسافت، زمان و سرعت حافظه در گروه‌های آزمایش و شاهد تفاوت به سطح معنی‌دار نرسید (P> ۰/۰۵). همچنین نتایج میانگین و انحراف معیار پس‌آزمون‌های شاخص‌های یادگیری و حافظه در گروه‌های آزمایش و شاهد به ترتیب در نمودارهای ۱ ، ۲، ۳ ، ۴، ۵ و ۶ توصیف شده است.

جدول ۱. تحلیل واریانس یک طرفه بر میزان استرس اکسیداتیو به‌دنبال ۷۲ ساعت محرومیت از خواب رؤیا

منابع تغییر	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	مقدار F	سطح معنی‌داری
بین گروهی	۸۲۶/۸۵۷	۷	۱۱۸/۱۲۲	۰/۶۹۲	۰/۶۸۲
درون گروهی	۱۰۲۴/۸۵۷	۶	۱۷۰/۸۱۰		
کل	۱۸۵۱/۷۱۴	۱۳			

جدول ۲. تحلیل چند متغیره (مانوا) بر میزان شاخص‌های یادگیری

شاخص	مقدار F	درجه آزادی	سطح معنی‌داری	ضریب اِتا
لامبدای ویلکس	۳/۱۰۲	۳	۰/۰۰۴	۰/۲۶۵

جدول ۳. تحلیل کوواریانس نمرات شاخص‌های یادگیری در گروه‌های آزمایش و شاهد

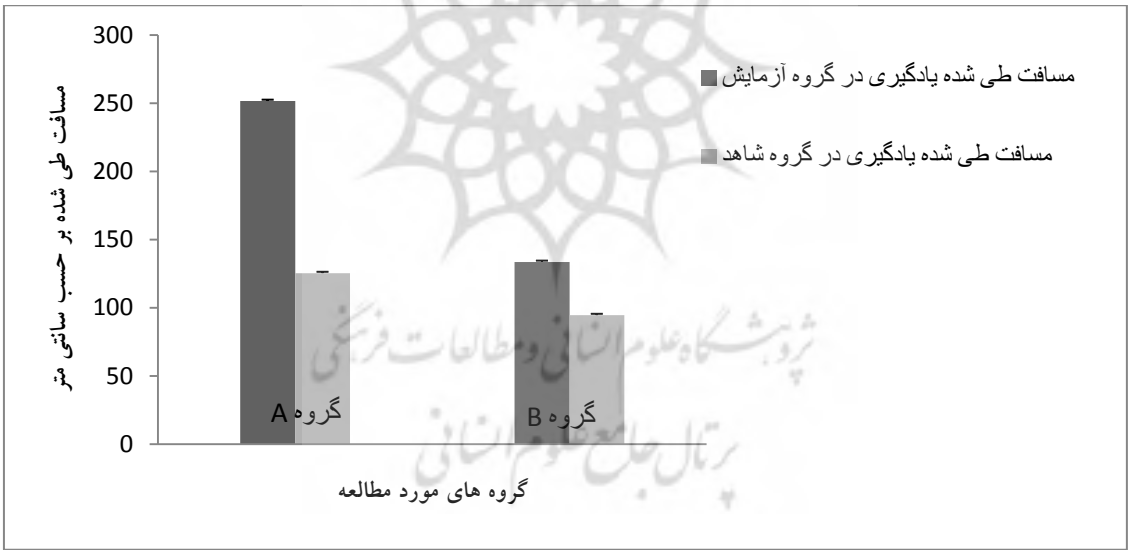
شاخص	منابع تغییر	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	مقدار F	سطح معنی‌داری	ضریب اِتا
مسافت یادگیری	گروه	۱۱۴۰۶۳/۱۲۸	۳	۳۸۰۲۱/۰۴۳	۸/۸۴۹	۰/۰۰۰۱	۰/۴۸۷
	خطا	۱۲۰۳۰۶/۹۴۲	۲۸	۴۲۹۶/۶۷۷			
	کل	۹۶۵۹۳۰/۱۰۲					
زمان یادگیری	گروه	۷۱۰/۵۷۳	۳	۲۳۶/۸۵۸	۱۰/۳۳۳	۰/۰۰۰۱	۰/۵۲۵
	خطا	۶۴۱/۸۶۴	۲۸	۲۲/۹۲۴			
	کل	۸۰۸۸/۲۶۹					
سرعت یادگیری	گروه	۱۳/۴۱۷	۳	۴/۴۷۲	۱/۱۴۲	۰/۳۴۹	۰/۱۰۹
	خطا	۱۰۹/۶۵۵	۲۸	۳/۹۱۶			
	کل	۲۶۷۸/۴۸۳					

جدول ۴. تحلیل چند متغیره (مانوا) بر میزان شاخص‌های حافظه

شاخص	مقدار F	درجه آزادی	سطح معنی‌داری	ضریب اِتا
لامبدای ویلکس	۲/۳۱۹	۳	۰/۰۲۵	۰/۲۰۶

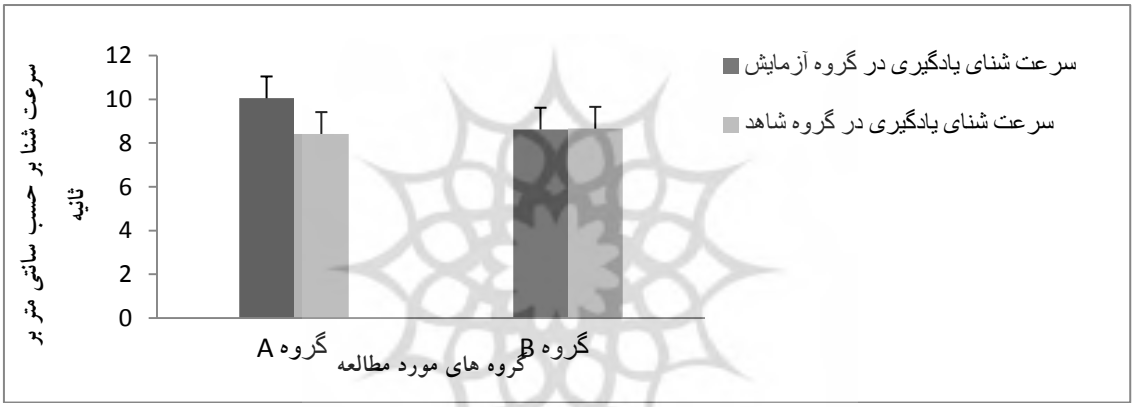
جدول ۵. تحلیل کوواریانس نمرات شاخص‌های حافظه در گروه‌های آزمایش و شاهد

شاخص	منابع تغییر	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	مقدار F	سطح معنی‌داری	ضریب اِتا
مسافت حافظه	گروه	۳۵۹۴۷/۵۴۳	۳	۱۱۹۸۲/۵۱۴	۰/۳۲۴	۰/۸۰۸	۰/۰۳۴
	خطا	۱۰۳۶۸۳۳/۵۷۶	۲۸	۳۷۰۲۹/۷۷۱			
	کل	۲۴۱۴۲۰۳۰					
زمان حافظه	گروه	۱۳۶/۱۸۲	۳	۴۵/۳۹۴	۱/۰۸۳	۰/۳۷۲	۰/۱۰۴
	خطا	۱۱۷۳/۶۶۱	۲۸	۴۱/۹۱۶			
	کل	۱۰۶۷۹/۲۷۸					
سرعت حافظه	گروه	۱۹/۷۲۶	۳	۶/۵۷۵	۰/۶۰۲	۰/۶۱۹	۰/۰۶۱
	خطا	۳۰۵/۹۳۵	۲۸	۱۰/۹۲۶			
	کل	۷۳۵۳/۳۰۵					

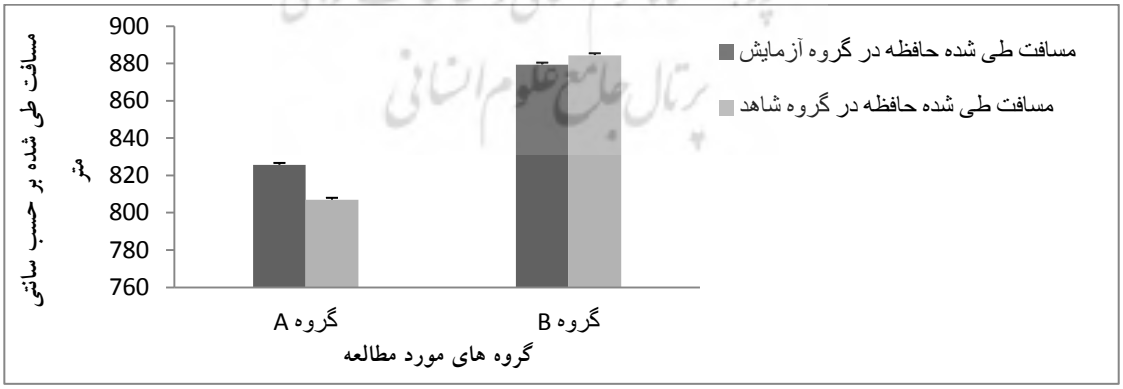


نمودار ۱: میانگین و انحراف معیار پس‌آزمون‌های شاخص مسافت طی‌شده یادگیری در گروه‌های آزمایش و شاهد

نمودار ۲: میانگین و انحراف معیار پس‌آزمون‌های شاخص زمان سپری شده یادگیری در گروه‌های آزمایش و شاهد

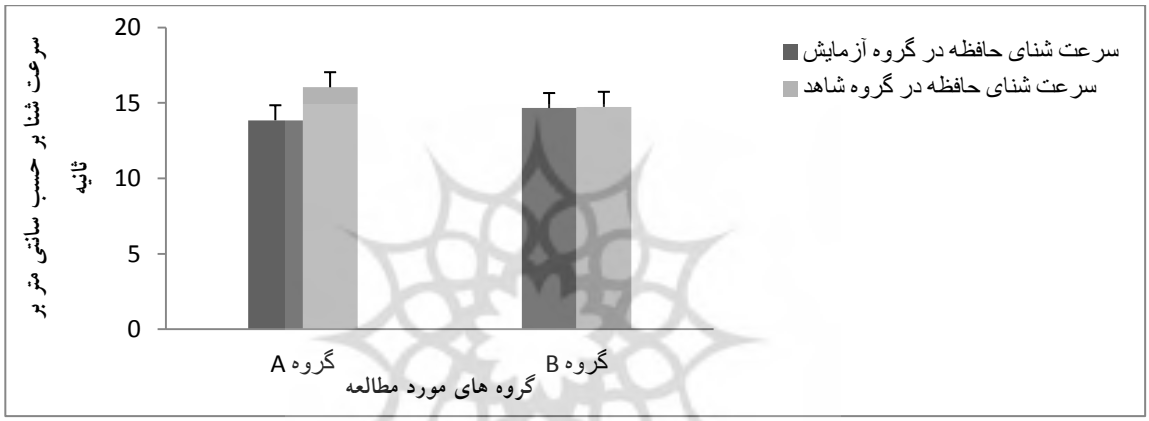


نمودار ۳: میانگین و انحراف معیار پس‌آزمون‌های شاخص سرعت شنای یادگیری در گروه‌های آزمایش و شاهد



نمودار ۴. میانگین و انحراف معیار پس آزمون‌های شاخص مسافت حافظه در گروه‌های آزمایش و شاهد

نمودار ۵. میانگین و انحراف معیار پس آزمون‌های شاخص زمان حافظه در گروه‌های آزمایش و شاهد



نمودار۶. میانگین و انحراف معیار پس آزمون‌های شاخص سرعت حافظه در گروه‌های آزمایش و شاهد

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه که به منظور ارزیابی استرس اکسیداتیو، یادگیری و حافظه فضایی به دنبال محرومیت از خواب رؤیا در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بالغ انجام گرفت مشاهده گردید که یادگیری و حافظه به دنبال محرومیت از خواب مختل می‌شود اما آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز بعد از محرومیت ۷۲ ساعته از خواب رؤیا کاهش پیدا نکرده است و مغز به خوبی توانسته در مقابل استرس اکسیداتیو مقاومت کند. شواهد نشان می دهند که خواب رؤیا یک پدیده فیزیولوژی ضروری به حساب می آید، معمولاً موش های آزمایشگاهی حدود ۱۲ ساعت در روز می خوابند که از این میان ۱۵ تا ۲۰٪ زمان خواب آن ها به مرحله خواب رؤیا مربوط می‌باشد (۱۲). محرومیت از خواب رؤیا به عنوان یک عامل ایجاد کننده استرس و تنش به حساب می آید که با توجه به سطوح کورتیکواستروئیدهای افزایش یافته پلاسما قابل مشاهده است (۱۴-۱۳). Reimund نشان داده است که رادیکال های آزاد و یا گونه های اکسیژن فعال تولید شده در بیداری، در طول خواب از بین می‌روند (۱۵). خواب کارکرد آنتی اکسیداتیو دارد و حفظ غلظت ثابت رادیکال های آزاد از جمله عوامل ضروری برای کارکرد کامل ارگانیزم های هوازی به شمار می آید (۱۶) و تغییرات در این زمینه به صورت بالقوه قادر به القای تغییرات در فیزیولوژی سلولی شامل تولید رادیکال‌های آزاد خواهد شد و مکانیزم های هموستازی بدنی نیز از استرس اکسیداتیو تأثیر می پذیرند (۳). افزایش در سطح

مالون دی‌آلدئید (MDA) می‌تواند منجر به افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد و آسیب ناشی از آن نسبت داده شود که با افزایش یافتن دوره محرومیت از خواب رؤیا نیز رابطه مستقیم دارد (۱۷). محرومیت از خواب رؤیا می‌تواند به افت حافظه حاصل از تخریب عصبی و بیماری آلزایمر بیانجامد. محرومیت از خواب و یا بیدار ماندن طولانی مدت سبب می‌شود که در عملکرد شناختی کاهشی اتفاق افتد که شامل اختلال در عملکرد انسان می‌باشد (۱۸).

بررسی‌های رفتاری این مطالعه نیز نشان داد که به دنبال محرومیت ۷۲ ساعته از خواب رؤیا یادگیری و حافظه با اختلال مواجه شده است. تحقیقات نشان داده‌اند که یادگیری فضایی در هیپوکامپ رخ می‌دهد و یکی از راه‌های اکتساب یادگیری، افزایش کارآیی پایدار در انتقال سیناپسی و استفاده مکرر از سیناپس می‌باشد. یادگیری و حافظه به دنبال محرومیت از خواب مختل می‌شود. مطالعات انجام شده بر روند یادگیری و حافظه نشان دادند که هیپوکامپ یکی از مهمترین مراکز درگیر در این فرآیند می‌باشد (۱۹). ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ اطلاعات فضایی را آنالیز می‌کند و بین یادگیری در محیطهای پیچیده فضایی با تراکم خارهای دندریتی نورون‌های ناحیه CA_1 هیپوکامپ ارتباط وجود دارد (۲۰). بنابراین هرگونه تغییر در هیپوکامپ ساختار و عملکرد آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین محرومیت از خواب سبب کاهش در میزان فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی ساقه مغز و هیپوکامپ می‌گردد (۱۸) و استرس ناشی از محرومیت از خواب رؤیا موجب تخریب حافظه می‌گردد (۲۱). مکانیزم‌های درگیر در خواب نیز با یادگیری و حافظه در ارتباط بوده و محرومیت از خواب منجر به افزایش زمان خواب آلودگی و ضعف در اعمال شناختی شده و در نتیجه نقص یادگیری فضایی می‌شود (۲۲). بر طبق مطالعات پیشین خواب رؤیا به طور مستقیم در تبدیل حافظه کوتاه مدت به حافظه بلند مدت نقش داشته و در حیواناتی که در آن‌ها یادگیری صورت پذیرفته است افزایش خواب رؤیا دیده می‌شود (۲۳).

در میان آنزیم‌های آنتی اکسیدان دو آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) نقش مهمی در حمایت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ایفا می‌کنند (۲۴). آنتی اکسیدان‌ها و دوزهای پایین SOD و کاتالاز در حفاظت از بروز نقائص اعمال شناختی ناشی از استرس اکسیداتیو در سیستم عصبی مؤثر هستند (۲۵). چرخه التهابی اکسیداتیو در عروق مغزی می‌تواند نتایج زیان باری برای شناخت داشته باشد (۲۶). استفاده مکرر از آسپارات منجر به عملکرد ناقص حافظه در ماز آبی موریس و افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش گلوکز در مغز می‌شود (۲۷). رادیکال‌های آزاد شکل‌پذیری سیناپسی را در هیپوکامپ کاهش داده و از تقویت طولانی مدت جلوگیری می‌کنند (۲۸). مصرف آنتی اکسیدان‌ها سبب بهبود یادگیری فضایی و افزایش القاء LTP در موش‌های مبتلا به بیماری آلزایمر می‌شود (۲۹). گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌توانند در مغز با اسیدهای چرب اشباع نشده واکنش داده و پراکسیداسیون لیپیدها را افزایش دهند (۳۰). آنتی اکسیدان‌ها نیز سبب کاهش در پراکسیداسیون لیپیدها شده و از این طریق سبب کاهش اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد در کاهش پلاستیسیتی سیناپسی و تقویت طولانی مدت هیپوکامپ می‌شوند (۳۱).

Ramanathan و همکارانش تغییرات بیوشیمیایی مشابهی را در ناحیه هیپوکمپ مغز موش‌ها نشان دادند (۱۸). همچنین تالاموس و هیپوتالاموس آسیب پذیری بیشتری نسبت به آسیب ناشی از رادیکال های آزاد پس از محرومیت از خواب رؤیا دارند که با کاهش استرس اکسیداتیو در این مناطق قابل مشاهده است (۳۲). به نظر می‌رسد آنتی اکسیدان‌های طبیعی سیستم عصبی مثل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون و کاتالاز وظیفه مراقبت از هیپوکامپ در برابر این استرسور را بر عهده دارند. در این مطالعه همانطور که اشاره شد سوپراکسید دیسموتاز بعد از محرومیت از خواب کاهش پیدا نکرده است و به خوبی توانسته در مقابل استرس اکسیداتیو مقاومت کند. بنابراین احتمالا استرس اکسیداتیو از مسیری دیگر غیر از سوپراکسید دیسموتاز بر این ناحیه اثر می‌کند و تولید

نورون‌های جدید را با مشکل مواجه می‌سازد. در مطالعهٔ Gopalakrishnan و همکاران که با هدف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تولید ROS-RNS سلولی در مغز و بافت‌های محیطی به دنبال محرومیت از خواب صورت پذیرفت هیچ مدرکی دال بر آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو دیده نشد (۳۳). اما برخی از مطالعات نشان داده‌اند که محرومیت ۹۶ ساعته از خواب رؤیا سبب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۲). بدین ترتیب محرومیت طولانی مدت از خواب سبب افزایش نرخ متابولیکی و در مقابل افزایش تنش اکسیداتیو خواهد شد. بر اساس یافته‌های این تحقیق تغییرات یادگیری و حافظه متعاقب محرومیت کوتاه مدت از خواب رؤیا با مکانیزم یا مکانیزم‌هایی غیر از مکانیزم استرس اکسیداتیو در ناحیه هیپوکامپ مربوط می‌باشد.

مطالعات انسانی نشان داده‌اند که محرومیت از خواب و بهم خوردن نظم طبیعی و فیزیولوژیک آن بسته به مدت و نوع محرومیت سبب بروز عواقبی چون خستگی، تحریک پذیری، کاهش دقت و تمرکز، افزایش فراموشی و آسیب به حافظه در دانشجویان می‌شود (۳۴). کم خوابی مزمن و خستگی اثرات نامطلوبی بر خلق و خو، رفتار، روابط اجتماعی، کیفیت زندگی، قدرت یادگیری، تصمیم گیری و مراقبت از بیماران در دستیاران جراحی عمومی دارد (۳۵) و درصد بالایی از افرادی که کیفیت خواب پایین دارند، با اشکال در زمینه تمرکز و توجه در روز روبرو هستند (۳۶). هم چنین به نظر می‌رسد شناسایی روند تغییرات مولکولی نواحی مرتبط با مراکز کنترل خواب در انسان و نحوه اثر گذاری روی هیپوکامپ و نهایتاً برنامه‌ریزی جهت کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود کیفیت خواب می‌تواند مزایای کوتاه مدت یا بلند مدتی را برای ساختارهای هیپوکامپی و سلامت افراد که شامل یادگیری، حافظه، رفتار، مدیریت استرس و ... می‌باشند، داشته باشد. یکی از مهمترین محدودیت‌های این پژوهش اثر تحریم‌ها بر دسترسی به مواد و داروها بود. همچنین پیشنهاد می‌گردد مطالعات ساختاری و فراساختاری سایر نواحی مغز که درگیر در فرآیندهای شناختی مانند یادگیری و حافظه می‌باشند، صورت پذیرد.

تقدیر و تشکر

از زحمات و همکاری بی‌دریغ هیأت رئیسه محترم، فرهیختگان هیأت علمی و کارکنان زحمتکش دانشگاه علوم پزشکی ایران تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Rumly AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity inclinical biochemistry. Annclin Biochem. 1998; 35:181-200.
2. Halliwell B. Antioxidant characterization, methodology & mechanisms. Biochem Phamacol. 1995; 49(2):1341-8.
3. Mathangi DC, Shyamala R , Subhashini AS. Effect of REM sleep deprivation on the antioxidant status in the brain of Wistar rats. Annals of Neurosciences. 2012; 19(4): 161-164.
4. Dupret D, O'Neill J, Pleydell-Bouverie B, Csicsvari J. The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memoryperformance. Nat Neurosci. 2010; 13: 995-1002.
5. Lynch MA. Long-term potentiation and memory. Physiol Rev. 2004; 84: 87-136.
6. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain, Frontiers in Aging. Neuroscience. 2010; 2(12).
7. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress,glutamate, and neurodegenerative disorders. Science. 1993; 262: 689-95.
8. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease:free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 47:412-426.
9. Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. Int J Dev Neurosci. 2005; 23: 501-507.
10. Arkhipov VI, Budantsev A, Azarashvili AA. Study of the energy metabolism of the sensomotor cortex and hippocampus by the (14C)2- deoxyglucose method during the development of dissociated states. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova. 1986; 36: 576-578.
11. Floyd RA, Carney JM. Age influence onoxidative events during brain ischemia/reperfusion. Arch Gerontol Geriatr. 1991; 12: 155-157.

12. Velazquez MJ, Salazar ED, Retana-Marquez S. Effects of short and long term REM sleep deprivation on sexual behavior in male rats. Physiol Behav. 1996; 59(2): 277˚281.
13. Sheeladevi R, Maheswari KS, Namasivayam A. Immunity and REM sleep deprivation. Med Sci Res. 1994; 22:753˚755.
14. Leproult R, Copinsch O, Boxton EV. Sleep loss results in an elevation of corticol levels the next evening. Sleep. 1997; 20: 865˚970.
15. Reimund E. The free radical flux theory of sleep. Med Hypothesi. 1994; 43(4): 231˚233.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. NEW YORK: Oxford Univ Press. 1999.
17. Thamaraiselvi K , Mathangi DC, Subhashini AS. Effect of increase in duration of REM sleep deprivation on lipid peroxidation. Int J Biol Med Res. 2012; 3(2):1754-1759.
18. Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM. Sleep deprivation decreases superoxidedismutase activity in rat hippocampus and brainstem. Neuroreport. 2002; 13:1387-1390.
19. Williams OL, Bannister, LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE. Gray s Anatomy. In: Nervous system, 38th. London, Churchill Livingston. 1995: 1123-1129.
20. Moser EI, Moser MB. Functional differentiation in the hippocampus. Hippocampus. 1998; (6): 608-619.
21. Mattew P, Walker R, stickgold R. Sleep dependent learning and memory consolidation. Nuron. 2004; 44:121-33.
22. Guzman-Marin R, Bashir T, Suntsova N, Szymusiak R, MCGinty D. Adult hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in the adult rat. Neuroscience. 2007; 148(1): 325-333.
23. Wagner BJ. Memory consodilation during sleep: interactive effects of sleep stages an HPA regulation. Stress. 2007; 11(1):28-41.
24. Pejic S, Kasapovic J, Todorovic A, Stojiljkovic V, Pajoric SB. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of patients with uterine myoma, endometrial polypus, hyper plastic and malignant endometrium. Biol Ress. 2006; 39(4):619-629.
25. Zhang R, Lu H, Tians YJ, Chen Q, MaL B, et.al. Projective effects of pre-germinated brow rice diet on low levels of Pb-induced learning and memory deficits in developing rat. Chem boil Internet. 2010; 184(3):166-170.
26. Evola M, Hall A, Wall T, Young A, Grammas P. Oxidative Stress Impairs Learning and Memory in apoE Knockout Mice. Pharmacol Biochem Behav. 2010; 96(2):181-186.
27. Abdel-Salam OME, Salem NA, EL-SHamarka MES, Hussein JS, Ahmed NAS, EL-Nagar MES. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. Medical and Pharmacological Sciences. 2012; 16: 2092-2101.
28. Kiray M, Bagriyanik HA, Pekcetin C, Ergur BU, Uysal N, Ozyurt D, et.al. (2006). Deprenyl and the relationship between its effects on spatial memory, oxidant stress and hippocampal neurons in aged male rats. Physiol Res. 2006; 55: 205-212.
29. Li J, Wang C, Zhang JH, Cai JM, Cao YP, Sun XJ. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. Brain Res. 2010; 1328: 152-161.
30. Mecocci P, Mariani E, Cornacchiola V, Polidori MC. Antioxidants for the treatment of mildcognitive impairment. Neurol Res. 2004; 26: 598-602.
31. Serrano F, Klann E. Reactive oxygen speciesand synaptic plasticity in the aging hippocampus. Ageing Res Rev. 2004; 3: 431-443.
32. D'Almeida V, Hipolide DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VB, Tufik S. Absence ofoxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. Neurosci Lett. 1997; 235: 25-28.
33. Gopalakrishnan A, Ji LL, Cirelli MD. Sleep Deprivation and Cellular Responses to Oxidative Stress. Sleep. 2004; 27: 27-35.
34. Nabavi SM, Boheyraee R. Study of sleep disorders and risk factors in students. Daneshvar Med. 1382; 10(45): 15-22.
35. Soroush AR, Hamediseresht E, Dabiran S. Assessment of sleep deprivation and fatigue among general surgery residents: Is it necessary to reduce residents' work hours?. Hakim Research J. 1387; 11(3).
36. Pagal JF, Kwaitkowski CF. Sleep complaints affecting school performance at different educational levels. Front Neurol. 2010; 16(125).

Evaluation of oxidative stress, spatial learning & memory following REM sleep deprivation in hippocampus of adult male rats

Zahra Sobhani [1], Seyed Behnamedin Jameie [2], Ali Naseri [3]

Original Article

Abstract

Aim and Background: Sleep deprivation has many negative effects on body and specialy cognitive proceses of hippocampus. Oxidative stress due to this deprivation has a critical role in cell degeneration and behavioral changes in experimental animals and humans.On the other hand antioxidants such as superoxide dismutase, glutathione peroxides, catalane are the first body defense against free radicals. Present research was designed in order to evaluate oxidative stress in hippocampus, spatial learning and memory following rapid eye movement sleep deprivation in adult male rats.

Methods and Materials: Forty Sprague-. Dawelyadult male rats were used in this study. The animals randomly divided in five groups of trials and control. Flower pot technique was used for REM-SD of 72 hours. After REM-SD behavioral study was done by using Morris Water Maze. To study the oxidative stress the animals were decapitated 24 hours after behavioral experiments, hippocampus was separated, then homogenized and centrifuged. After those change in SOD activity was measured in supernatant accordance with proposed protocol of SOD kit (by Eliza fluorescent in 340 nm). Data analyzed by SPSS19 and the results presented in the form of Mean ± SD, $P< 0.05$ considered significant..

Findings: Our finding showed that short term REM-SD dose not lead to significant decrease of oxidative stress in hippocampus of trial groups comparing trials ($P< 0.05$). It is also showed that REM-SD significantly affected the learning and memory indexes in REM-SD groups than control animals ($P<0.004$, $P<0.025$)

Conclusions: Based on our findings it changes in learning and memory following short term REM-SD due to mechanisms except oxidative stress in hippocampus. Also planning to improve sleep quality could have short-term or long-term benefits for hippocampus structures and human health in behavior, learning, memory, stress management & etc.

Keywords: Oxidative stress, Spatial Learning and Memory, REM-SD, Hippocampus

Citation: Sobhani Z, Jameie S B, Naseri A. **Evaluation of oxidative stress, spatial learning & memory following REM sleep deprivation in hippocampus of adult male rats**. J Res Behave Sci 2015; 13(2): ??

Received: 25.07.2014 Accepted: 13.07.2015

1. MSc in Clinical Psycology, Science and Research Branch,Islamic Azad University, Fars, Iran.(Correponding Athor) E-mail: Zahrasobhani120@yahoo.com
2. Professor of Anatomy & Neuroscience, Department of Medical Basic Sciences, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Iran, Tehran.
3. Assistant Proffessor of Health Psychology, Department of Psychology, Islamic Azad University, Firoozabad Branch, Firoozabad, Iran