

اثر آلودگی صوتی بر یادگیری احترازی غیر فعال و اندازه هیپوکامپوس رت

دکتر عبدالرضا صباحی*، دکتر محمد حسینی شریف آباد**

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 بدون 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 از 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 سیستماتیک 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

عوامل استرس زا، طیفی از پاسخهای فیزیولوژیک را که بارزترین آن فعال نمودن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال و افزایش گلوکوکورتیکوئیدهای خون است بدنبال دارد (۸، ۹). هیپوکامپوس بخشی از سیستم لیمبیک در مغز است که بیشترین

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، اندوکراین 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

* دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

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

Email: Sabahi@med.mui.ac.ir

نویسنده رابط:

پدیرش مقاله: ۸۵/۸/۱۸

تصحیح نهائی: ۸۵/۸/۱۶

تاریخ وصول: ۸۵/۴/۲۸

رستورهای گلو کوریکوئیدی 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 و کامل 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 بر قوه 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 23 ± 2 و دوره روشنائی، تاریکی ۱۲ ساعته (روشنی از ساعت ۷ 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 می‌شد قرار گرفتند در حالیکه در این مدت حیوانات شاهد در شرایط مشابه از لحاظ آب و غذا و محل زندگی با گروه نمونه ولی بدون آلودگی صوتی نگهداری شدند.

آزمون احترازی غیرفعال 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 دو محفظه توسط در گیوتینی (8×8 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 نگردد 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 در بخش روشن دستگاه قرار داده شد و پس از گذشت ۱۰ ثانیه در گیوتینی را باز نموده و تأخیر زمانی که حیوان وارد بخش تاریک می‌شد بعنوان Step Trough Latency (STL) ثبت شد.

حیوانات با تزریق داخل صفاقی ۱ میلی لیتر 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 مغز را وزن نموده و ابعاد آن اندازه گیری 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، بر روی بخش عقبی مغز را که حاوی هیپوکامپوس است مراحل پروسسینگ بافت انجام گرفت. از قالبهای پارافینی مغز، برشهای

اساس روش Gundersen محاسبه شد (۱۷). داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS version 11.5 و آزمون t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج با $P < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

با آنکه حیوانات دو گروه در شروع مطالعه از لحاظ وزنی تفاوت معنی داری نداشتند (گروه شاهد 209 ± 8 و حیوانات نمونه 211 ± 6 اما در پایان، وزن حیوانات نمونه در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی دار داشت (297 ± 34 ، 359 ± 41 و $P = 0.0001$). یافته های این مطالعه نشان داد که رتهایی که در معرض آلودگی صوتی قرار داشته اند با میانگین تأخیر زمانی $38/2 \pm 6/25$ ثانیه وارد بخش تاریک دستگاه شدند درحالیکه در مورد رتهای شاهد این زمان $31/4 \pm 5/46$ ثانیه بود ($P < 0.01$). جدول شماره ۱ تأثیر معنی دار آلودگی صوتی را بر کاهش اندازه پارامترهای وزن، پهنا و ارتفاع مغز را نشان میدهد. همچنین داده ها نشان داد که حجم هیپوکامپوس حیوانات گروه استرس ($25/4 \pm 1/01$ و $CE = 7/9$) نسبت به گروه شاهد ($27/3 \pm 0/82$ و $CE = 7/8$) کوچکتر است و تفاوت معنی داری دارد ($P = 0.0001$).

نمونه برداری تصادفی سیستماتیک یکنواخت انتخاب و رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین صورت گرفت (۱۵). برای محاسبه (اندازه) حجم هیپوکامپوس از یکی از روشهای استریولوژی که تکنیکی بدون سو Unbiased و موثر برای سنجش مقادیر سه بعدی از برشهای بافت شناسی دو بعدی می باشد، استفاده گردید. به این منظور به کمک میکروسکوپ Microprojection تصویر برش بافتی را به روی سطح سفیدی انداخته و صفحه ای شفاف شطرنجی (گريد) حاوی نقاط با فواصل معین از هم دیگر بر روی تصویر منطبق گردید و تعداد نقاطی که با هیپوکامپوس برخورد کرده بودند (ΣP) شمرده شد و با در نظر گرفتن مساحت اطراف هر نقطه $A(P)$ ، سطح مقاطع را محاسبه نموده و با ضرب نمودن آن در فاصله بین برشهای انتخابی که ثابت بود ($d = 50.0 \mu m$)، حجم با استفاده از فرمول زیر بر طبق اصل کاوالیه (۱۶) دست آمد:

$$V = \Sigma P \cdot A(P) \cdot d$$

داده ها بصورت میانگین با مقادیر انحراف معیار ارائه شده است. مقدار ضریب خطای محاسبه (CE) Coefficient Error بر

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

وزن (g)	طول (mm)	پهنا (mm)	ارتفاع (mm)	
$1/54 \pm 0/05$	$14/5 \pm 0/38$	$14/8 \pm 0/35$	$9/60 \pm 0/23$	شاهد
$1/46 \pm 0/07$	$14/4 \pm 0/35$	$14/2 \pm 0/37$	$9/40 \pm 0/19$	نمونه
$P = 0/005$	$P = 0/442$	$P = 0/003$	$P = 0/011$	

بحث

(روزانه ۳ بار و هر نوبت ۲۰ دقیقه) به شدت ۴۰ دسی بل باعث کاهش یادگیری، کاهش وزن، پهنا و ارتفاع مغز رت میشود.

این مطالعه نشان داد که اعمال آلودگی صوتی بمدت سه ماه

نتایج آن منتشر شد، دریافتند که استرس صوتی باعث کاهش تعداد دندریتها در نواحی مغز منجمله CA1 و CA3 هیپوکامپوس میشود. که آتروفی هیپوکامپوس که از نتایج مطالعه حاضر است با یافته آنها همخوانی دارد (۶).

دریک بررسی که Kim و همکارانش برای مقایسه اثر آلودگی صوتی و موسیقی در دوره پیش از تولد بر روند نورون زایی در گروس دندانه ای هیپوکامپوس رت انجام دادند مشاهده شد که استرس صوتی در پیش از تولد هم موجب توقف پدیده نورون زایی در ناحیه گروس 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.

نتیجه گیری

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 نوراناتومیکی که ممکن است با اختلالات یادگیری و حافظه گزارش شده در انسان و حیوان متعاقب استرس صوتی مرتبط باشد را فراهم می نماید.

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 محور HPA 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 و کاهش یادگیری و حافظه میشود که این موضوع در مطالعات انسانی و حیوانی مکرراً گزارش شده است (۲۲-۱۸). بعنوان مثال، مطالعه Lupien و همکارانش در سال 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 بعلاوه مواجهه با استرس نیز از علل آتروفی سلولهای عصبی میباشد (۲۶).

در جستجوی 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

منابع

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, Jeya Parthasarathy 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 situ 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: Charchill 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.