



## تأثیر قرارگیری موش‌های سفید آزمایشگاهی بزرگ باردار در محیط غنی بر بهبود اختلالات شناختی و رفتاری ناشی از استرس در زاده‌های نوجوان

سید علی سیدی نیا<sup>۱</sup>، علی بیات<sup>۱</sup>، ایلیا اسدی<sup>۱</sup>، حسین محسنی<sup>۱</sup>، عباسعلی وفايي<sup>۱،۲</sup>، پیمان رایس-عبداللهی<sup>۱</sup>، علی رشیدی پور<sup>۱،۲\*</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

<sup>۲</sup> گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

\*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. پست الکترونیک: arashidy\_pour44@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷

### چکیده

**مقدمه:** مطالعات متعددی نشان داده‌اند که قرار گرفتن در محیط غنی عوارض استرس مزمن را کاهش می‌دهد.

**هدف:** این مطالعه اثر محیط غنی مادران بر اختلالات شناختی-رفتاری ناشی از محیط استرس‌زا در رت را بررسی می‌کند.

**مواد و روش‌ها:** پس از رویت پلاک واژینال و اطمینان از بارداری، ۱۶ موش مادر به دو گروه کنترل و محیط غنی تقسیم شدند. زاده‌های هر مادر به دو گروه نر و ماده و دوباره هر گروه به دو گروه استرس و غیراسترس تقسیم شدند. گروه‌های استرسی از روز ۳۰ پس از تولد (نوجوانی)، روزانه ۶ ساعت به مدت ۲۱ روز تحت استرس با مقیدکننده قرار گرفتند. سپس سطح کورتیکوسترون سرم سنجیده و آزمون‌های رفتاری انجام شد.

**نتایج:** استرس بی‌حرکتی سبب افزایش غلظت کورتیکوسترون سرم گردید ( $P\text{-value} < 0/05$ ). در ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع، مدت زمان حضور و تعداد دفعات ورود به بازوی باز و در تست جعبه‌ی تاریک و روشن، زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک و حضور در ناحیه روشن در زاده‌های هر دو جنس محیط غنی-استرسی افزایش یافت ( $P\text{-value} < 0/05$ ). در تست شنای اجباری زمان بی‌حرکتی در زاده‌های هر دو جنس گروه محیط غنی-استرسی نسبت به گروه استاندارد-استرسی کاهش یافته بود ( $P\text{-value} < 0/05$ ). در تست شاتل باکس زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک و کل زمان حضور در ناحیه روشن در زاده‌های هر دو جنس گروه محیط غنی-استرسی نسبت به استاندارد-استرسی افزایش یافته بود ( $P\text{-value} < 0/01$ ). در آزمون شناخت اشیا جدید زمان حضور در کنار شی جدید در زاده‌های هر دو جنس محیط غنی-استرسی نسبت به استاندارد-استرسی افزایش یافته بود ( $P\text{-value} < 0/01$ ).

**نتیجه گیری:** قرارگرفتن مادران در محیط غنی در طی بارداری موجب کاهش اختلالات شبه اضطرابی-افسردگی و نقایص شناختی ناشی از استرس در فرزندان نوجوان می‌شود.

**واژگان کلیدی:** محیط غنی، استرس، اختلالات شناختی، اضطراب، افسردگی.

### ۱. مقدمه

مقابله با استرس آماده می‌سازد (۲). در این زمان، افزایش کاتکول‌آمین‌ها و کورتیکواستروئیدها پاسخ به استرس را شروع می‌کنند. اگر استرس ادامه پیدا کرده و مزمن شود اثرات منفی بالقوه آن موجب بی‌خوابی، اختلالات گوارشی، اضطراب و افسردگی گشته، خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های روانی و سرطان افزایش میابد (۳).

استرس پاسخ فیزیولوژیک بدن به شرایط نامساعد، چالش‌برانگیز و دشوار است، که می‌توان به دو شکل حاد و مزمن دیده شود (۱). معمولاً شکل حاد استرس در شرایط اضطرابی ایجاد می‌شود. تغییرات در ساختار و عملکرد مولکول‌ها و بافت‌های خاص در مغز، مکانیسم‌هایی را در سیستم شناختی عاطفی فعال کرده و فرد را جهت

دریافت کرده بودند، این فرضیه را تایید کرد که فعال‌سازی سیستم ایمنی می‌تواند باعث افسردگی شود (۱۳). برای جلوگیری از عوارض استرس مزمن مانند افسردگی و دیگر اختلالات شناختی-رفتاری و یا کاهش اثرات منفی استرس بر بدن، جدا از دارو درمانی، اثرات محرک‌های خارجی مانند قرار گرفتن در محیط غنی و ورزش داوطلبانه بررسی شده‌اند. این محرک‌ها می‌توانند تغییرات نوروپلاستیک را در سطوح مختلف القا کرده و در نتیجه از ایجاد افسردگی و اختلالات شناختی-رفتاری ناشی از استرس، در چندین مدل حیوانی استرس جلوگیری کنند یا بهبود ببخشند (۱۴). اثر فلوکستین، ورزش و محیط غنی بر رفتار شبه افسردگی در مدل استرس انزوای اجتماعی بررسی شده است و گزارش شده که محیط غنی بیشتر از فلوکستین و ورزش بر کاهش رفتار شبه افسردگی موثر است (۱۵).

محیط غنی یک شرایط حسی، حرکتی، شناختی و اجتماعی بالقوه را برای حیوان فراهم می‌کند. در این محیط موش‌ها در قفس‌هایی با ابعادی بزرگ‌تر قرار می‌گیرند و تعدادی وسیله مانند چرخ‌های گردان، نردبان، لوله پلاستیکی برای پنهان شدن و اسباب‌بازی در داخل قفس موجود است. آن‌ها امکان انجام فعالیت‌های جستجوگرانه، بازی کردن با سایر موش‌ها و دیگر فعالیت‌های فیزیکی را نیز دارند. حتی دسترسی به آب و غذا برای این موش‌ها به نحوی است که باید جهت دستیابی به جستجو بپردازند. چنین شرایطی شباهت بیشتری به نحوه زندگی جوندگان در محیط‌های طبیعی دارد (۱۶). مطالعات مختلف از سال ۱۹۶۰ نشان داده‌اند که استفاده از محیط غنی در مدل‌های حیوانی باعث هماهنگی حرکتی، بهبود یادگیری و حافظه، افزایش رفتارهای اجتماعی، افزایش تراکم سیناپسی، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) و فاکتور رشد عصبی شده است (۱۷).

با وجود مطالعات فراوان در مورد اثر قرار گرفتن والدین در شرایط منفی مانند استرس بر نسل بعد، مطالعات چندانی در مورد قرار گرفتن در شرایط مثبت مانند محیط غنی بر نسل بعد وجود ندارد (۱۸). علی‌رغم وجود شواهد زیاد مبنی بر اثر قرار گرفتن در محیط غنی بر کاهش اثرات مخرب استرس بر مغز و اثرات مثبت در نسل بعد (۱۹)، تا زمان انجام پروژه ی حاضر، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات احتمالی قرار گرفتن رت‌های ماده در محیط غنی بر کاهش اختلالات شناختی-رفتاری ناشی از استرس در فرزندان وجود نداشت.

## ۲. اهداف

در این مطالعه، اثر قرار گرفتن مادر در محیط غنی بر

شواهد نشان داده که در دوره نوجوانی سیستم لیمبیک به ویژه هیپوکمپ، آمیگدال و قشر مغز بیشترین آسیب‌پذیری را در برابر استرس دارند و استرس مزمن در این دوره می‌تواند منجر به اختلالات شناختی متعدد از جمله افسردگی، اعتیاد و اختلالات دوقطبی گردد (۴، ۵). یکی از تغییراتی که منجر به این حساسیت می‌شود افزایش گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی این نواحی در دوران نوجوانی است (۶). استرس مزمن موجب تخریب حافظه فضایی و آتروفی دندریت‌ها در هیپوکمپ و قشر پیش‌پیشانی شده و از این‌رو، موجب کاهش نورون‌زایی و ایجاد اختلال در سیستم نوروترانسمیتری می‌گردد (۷). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که قرارگیری موش‌ها در محیط‌های پر استرس، ابتدا موجب افزایش غلظت گلوکوکورتیکوئیدها در خون شده و پس از تکرار ۲۱ روزه استرس، موجب تغییرات ساختاری، کاهش تعداد نورون‌ها و کاهش میزان نورون‌زایی در هیپوکمپ و شکنج دندان‌های و به‌دنبال آن نارسایی در حافظه و یادگیری در حیوانات می‌گردد (۸). در شرایط استرس، سیستم اتونوم و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis (HPA) به طور همزمان در بدن فعال می‌گردند. فعالیت سیستم سمپاتیک، باعث افزایش کاتکول‌آمین‌ها (اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین) در خون گردیده که با افزایش ضربان و قدرت انقباضی قلب، بدن را برای شرایط جنگ و گریز آماده می‌کند. فعال شدن محور HPA باعث افزایش سطح کورتیکوسترون در جوندگان و کورتیزول در انسان می‌شود (۹). گلوکوکورتیکوئیدها دو نوع گیرنده به نام گیرنده‌های مینرالوکورتیکوئیدی و گلوکوکورتیکوئیدی دارند (۱۰). گیرنده‌های مینرالوکورتیکوئیدی تمایل بالایی برای اتصال به کورتیکوسترون و کورتیزول دارند در حالی که گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی، تمایل کمتری به کورتیزول داشته و در تمام نواحی مغز پراکنده بوده و فقط در طی استرس و در اوج ریتم شبانه‌روزی، زمانی که غلظت گلوکوکورتیکوئیدها بالا است اشغال می‌گردند (۱۱). گلوکوکورتیکوئیدها بر مراحل مختلف حافظه شامل اکتساب، تثبیت و به‌خاطرآوری اثرات متفاوتی دارند به طوری که تثبیت حافظه را افزایش داده اما به‌خاطرآوری اطلاعات قبلی را مختل می‌کنند (۱۲). از طرفی اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین با فعال کردن گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنژیک سلول‌های ایمنی، باعث افزایش تولید سیتوکین‌های پیش التهابی، مانند فاکتور نکروز توموری آلفا، اینترلوکین ۱ و ۶ می‌شوند. همچنین این سیتوکین‌ها می‌توانند در موقعیت‌های استرس‌زا طولانی مدت مانند افسردگی افزایش پیدا کنند. مطالعات بعدی در مورد افسردگی در بیماران سرطانی که سیتوکین درمانی

بروز اختلالات شناختی-رفتاری ناشی از استرس زاده‌های نر و ماده در موش سفید بزرگ آزمایشگاهی بررسی گردید.

## ۳. مواد و روش‌ها

### ۱.۳. حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۱۶ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی مادر، نژاد ویستار، با محدوده وزنی ۲۰۰ - ۲۵۰ گرم و ۶۴ سر موش نر و ماده از فرزندان آن‌ها استفاده گردید. تمامی موش‌ها در درجه حرارت محیط ۲۲ - ۲۴ درجه سانتی‌گراد با دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، و با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی در محل نگهداری حیوان‌ها در دانشگاه علوم پزشکی سمنان نگهداری شدند. این مطالعه توسط هیئت بازبینی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی سمنان، ایران (با کد تاییدیه اخلاقی: IR.SEMUMS.REC.1397.171) تایید شد. همه آزمایش‌ها مطابق با راهنمای موسسه ملی بهداشت برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

### ۲.۳. محیط غنی

در ابتدا ۱۶ موش ماده به صورت تصادفی انتخاب شدند و برای جفت‌گیری در قفس‌های جداگانه قرار گرفتند. مشاهده پلاگ واژینال در موش‌های ماده به عنوان روز اول بارداری در نظر گرفته شد. سپس موش‌های باردار به طور تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم شدند: (۱) گروه مادران باردار نگهداری شده در محیط معمولی (۲) گروه مادران باردار نگهداری شده در محیط غنی ( $n = 8$ ).

در گروه اول (محیط معمولی)، هر ۴ موش باردار در یک قفس از جنس پلکسی‌گلاس معمولی به ابعاد  $40 \times 60 \times 25$  سانتی‌متر نگهداری شدند. در طول دوره نگهداری، آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار گرفت.

در گروه دوم (محیط غنی)، هر ۴ موش با هم در یک قفس بزرگتر از قفس استاندارد به ابعاد  $70 \times 60 \times 50$  سانتی‌متر نگهداری شدند. در این قفس اشیایی مانند نردبان (سطح شیب‌دار)، لوله‌های تو خالی، بلوک‌های چوبی و اسباب بازی‌های پلاستیکی قرار داده شد. وسایل مورد استفاده برای غنی کردن محیط، هر چند روز یک بار در بین قفس‌ها جابه‌جا شد تا به دلیل تازگی آن‌ها، حس کنجکاوی حیوانات بیشتر برانگیخته گردد. در طول دوره نگهداری، آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار گرفت. همچنین به منظور تحریک رفتار اکتشافی بیشتر حیوانات بطری آب هر هفته بین قفس‌ها جابه‌جا می‌شد. موش‌های باردار به مدت ۲۱ روز و تا زمان زایمان در این

شرایط قرار گرفتند.

### ۳.۳. القاء استرس مزمن در زاده‌ها

استرس مزمن از روز ۳۰ تا ۵۱ پس از تولد در گروه‌های مختلف زاده‌ها القا گردید. برای القای استرس از مقیدکننده‌هایی از جنس پلکسی‌گلاس استفاده شد که موش‌ها در آن‌ها امکان تحرک نداشتند. زاده‌ها روزانه ۶ ساعت و به مدت ۲۱ روز در این محفظه‌ها قرار گرفتند.

### ۴.۳. تست‌های رفتاری

#### ۱. ۴. ۳. ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع (Plus Elevated Maze)

در روز ۵۲ پس از تولد رفتارهای شبه‌اضطرابی با ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع ارزیابی شد که یک مدل استاندارد جهت بررسی سطح اضطراب در جوندگان است. این مدل تجربی سنجش اضطراب، غیر شرطی بوده و نیازی به آموزش و یادگیری حیوان ندارد. دستگاه ماز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع از چوب ساخته شده است و شامل دو بازوی باز (هر یک به ابعاد  $10 \times 50$  سانتی‌متر همراه با یک لبه ۵ میلی‌متری) و دو بازوی بسته (هر یک به ابعاد  $10 \times 40 \times 50$  سانتی‌متر) و یک کفه مرکزی ( $10 \times 10$  سانتی‌متر) به‌طوری که بازوهای باز روبروی یکدیگر قرار داشته و حدود ۵۰ سانتی‌متر از کف اتاق بالاتر قرار می‌گیرند. میزان نور محیط حدود ۲۰ لوکس بود. برای سنجش سطح اضطراب، حیوان در ماز به‌علاوه‌ای مرتفع (در قسمت کفه و رو به بازوی باز) قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه مدت زمان ماندن در بازوهای باز و بسته و صفحه مرکزی و تعداد کل ورود به بازوهای باز و بسته توسط دوربینی در بالای دستگاه ارزیابی و ثبت گردید (۲۰).

#### ۲. ۴. ۳. تست شناخت اشیاء جدید (Novel Object Recognition Test)

در روزهای ۵۳ تا ۵۵ پس از تولد میزان تمایل حیوانات برای حضور در کنار شیء جدید (ارزیابی شناخت) با جعبه میدان باز (Open Field) بررسی گردید. این دستگاه شامل یک محفظه خاکستری تیره  $45 \times 72 \times 72$  سانتی‌متری با یک کف سیاه است. روشنایی اتاق توسط یک لامپ بیست لوکس تامین گردید و برای ارزیابی شناخت از اشیای مشابه و اشیای جدید استفاده شد. هر حیوان قبل از شروع ثبت در مرکز جعبه قرار گرفت. کل مسافت طی شده توسط حیوان در مدت زمان ۲۰ دقیقه ثبت گردید (که شامل مدت زمان صرف‌شده در مرکز و محیط است). هرچه مدت زمان

حضور حیوان در کنار شی جدید افزایش می‌یافت به‌عنوان افزایش شناخت در نظر گرفته می‌شد (۲۱).

### ۳.۴.۳. تست حافظه اجتنابی غیرفعال

در روزهای ۵۶ تا ۵۸ پس از تولد حافظه اجتنابی غیرفعال در موش‌ها با استفاده از دستگاه شاتل باکس بررسی شد. این دستگاه از ۲ اتاقک مجزا با ابعاد  $30 \times 20$  و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر تشکیل شده‌است. دو اتاقک مذکور به وسیله یک دریچه گیوتینی از هم جدا می‌شوند که در هنگام باز بودن، حیوان می‌تواند از آن عبور کند. دیواره و کف یکی از اتاقک‌ها سفید (اتاقک روشن) و دیگری سیاه (اتاقک تیره) است. کف هر دو اتاقک دارای میله‌های فلزی موازی است که می‌توان با استفاده از استیمولاتور متصل به آن‌ها تحریک الکتریکی با ولتاژ و مدت زمان دلخواه را به پای حیوان وارد نمود. این آزمایش در ۳ مرحله انجام شد.

۱. مرحله سازگاری: در این مرحله حیوان به محیط آزمایشگاه آورده شده و پس از دست‌ورزی (handling)، در دستگاه شاتل باکس قرار می‌گرفت و در حالی که دریچه باز بود ۳ دقیقه بین ۲ اتاقک تاریک و روشن دستگاه حرکت کرده و با آن آشنا می‌شد. در این مرحله حیواناتی که در طول ۳ دقیقه وارد محفظه تاریک نمی‌شدند از آزمایشات کنار گذاشته شدند.

۲. مرحله آموزش: ۲۴ ساعت بعد، حیوان در داخل اتاقک روشن دستگاه قرار داده شده و هنگامی که به‌طور غریزی وارد اتاقک تاریک می‌شد دریچه گیوتینی بسته شده و پس از ۲۰ ثانیه با شوک الکتریکی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱/۵ میلی‌آمپر به مدت ۳ ثانیه به کف پای حیوان اعمال می‌گردید، لذا به‌طور شرطی یاد می‌گرفت که وارد اتاقک تاریک نشود. ۲۰ ثانیه بعد حیوان از دستگاه خارج گردیده و پس از ۱۲۰ ثانیه دوباره حیوان داخل دستگاه قرار داده می‌شد. چنانچه در مدت ۱۲۰ ثانیه پس از باز شدن درب گیوتینی حیوان وارد محفظه تاریک نشد آموزش انجام گرفته بود. در غیر این صورت دوباره شوک اعمال می‌گردید. در صورتی که حیوان پس از ۳ بار دریافت شوک همچنان وارد محفظه تاریک می‌شد از آزمایش‌ها کنار گذاشته شد.

۳. مرحله به‌خاطرآوری: این مرحله که اطلاعات لازم برای تجزیه و تحلیل آماری از آن به دست می‌آید ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش انجام شد. در این مرحله در حالی که دریچه گیوتینی بسته بود حیوان در داخل قسمت روشن دستگاه قرار می‌گرفت. پس از ۲۰ ثانیه دریچه باز شده و زمان تاخیر در قدم‌گذاری حیوان به محفظه تاریک (حداکثر ۶۰۰ ثانیه) به عنوان معیار حافظه تعیین و ثبت می‌گردید.

شاخص‌های زیر در این تست ثبت می‌شوند:

۱. زمانی که طول می‌کشد تا موش وارد محفظه تاریک شود. (Step-through latency time, STLT)
  ۲. زمان گذرانده‌شده در قسمت روشن طی ۹ دقیقه. (Time spent in the light chamber, TSLC)
  ۳. تعداد دفعاتی که بین محفظه تاریک و روشن رفت و آمد می‌کند. (Number of transition, NT)
- شدت شوک و زمان انجام آزمایشات از مطالعات قبلی انتخاب شده بود (۲۲).

### ۵.۳. اندازه‌گیری کورتیکوسترون

در روز ۳۰ پس از تولد (قبل از شروع القای استرس) خونگیری از دم حیوانات انجام گردید. در روز ۵۹ (پس از پایان استرس و تست‌های رفتاری) حیوانات را با گاز CO<sub>2</sub> بی‌هوش کرده و سپس از قلب آن‌ها خون‌گیری انجام شد. نمونه‌های خون به‌وسیله دستگاه سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سرم به دست آمده تا زمان اندازه‌گیری کورتیکوسترون در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. برای اندازه‌گیری کورتیکوسترون کیت الیزا مورد استفاده قرار گرفت.

### ۶.۳. گروه‌بندی

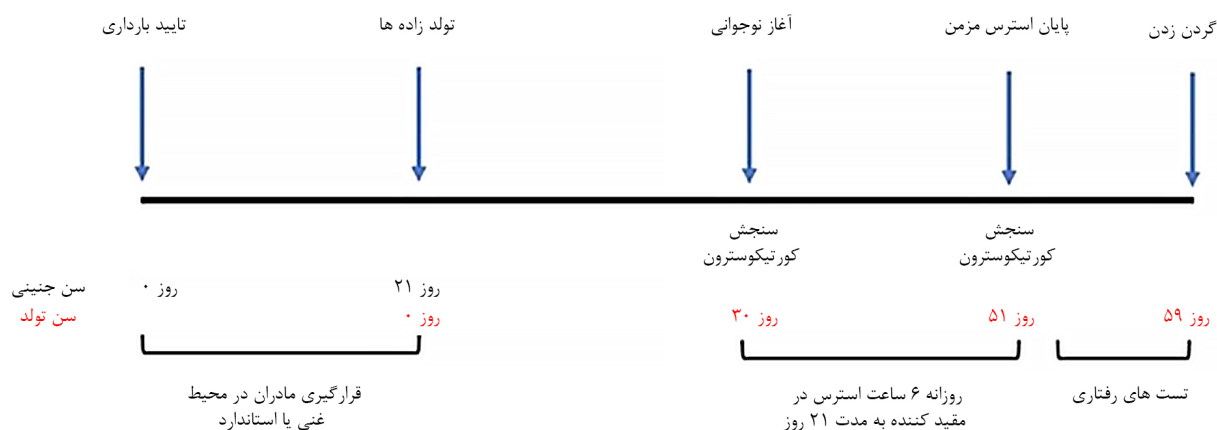
زاده‌های نوجوان گروه مادران محیط غنی و محیط استاندارد در ۸ گروه مساوی ۸ تاپی نر و ماده به طور تصادفی تقسیم شدند.

۱. Standard (STD)-St: ۸ سر موش نر یا ماده زاده‌ی مادران محیط استاندارد که از روز ۳۰ تولد به مدت ۲۱ روز استرس دریافت کرده‌اند و سپس تست‌های رفتاری بر روی آن‌ها انجام شد.

۲. STD-nonstress (nSt): ۸ سر موش نر یا ماده زاده‌ی مادران محیط استاندارد که استرس دریافت نکرده‌اند و تست‌های رفتاری بر روی آن‌ها انجام شد.

۳. Environmental enrichment (EE)-St: ۸ سر موش نر یا ماده زاده‌ی مادران محیط غنی که از روز ۳۰ تولد به مدت ۲۱ روز استرس دریافت کرده‌اند و سپس تست‌های رفتاری بر روی آن‌ها انجام شد.

۴. EE-nSt: ۸ سر موش نر یا ماده زاده‌ی مادران محیط غنی که استرس دریافت نکرده‌اند و تست‌های رفتاری بر روی آن‌ها انجام شد (تصویر ۱).



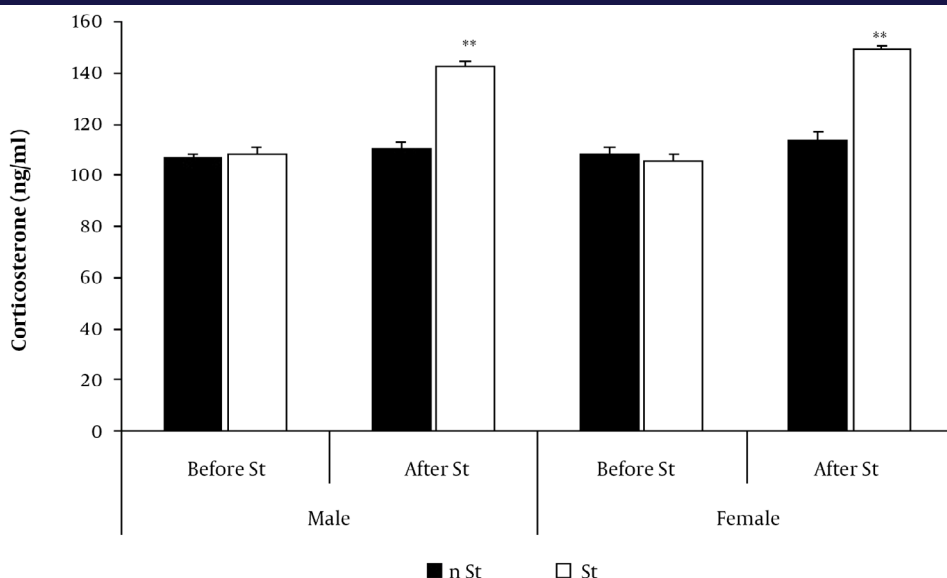
تصویر ۱. نمودار زمان بندی اجرای مطالعه.

## ۴. نتایج

### ۱.۴. میزان کورتیکوسترون سرم

تصویر ۲ سطح کورتیکوسترون سرم را در دو جنس و دو گروه غیراسترس (STD-nSt) و استرس (STD-St) که مادران آن‌ها در محیط استاندارد بودند، نشان می‌دهد. آنالیز واریانس یک طرفه با اندازه‌گیری داده‌های مکرر تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های مختلف نشان داد ( $P < 0.001$ ,  $F_{3,3} = 42/48$ ). مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که استرس بی‌حرکتی سبب افزایش غلظت کورتیکوسترون سرم در گروه STD-St نسبت به گروه STD-nSt در هر دو جنس می‌شود ( $P < 0.01$ ).

داده‌ها به صورت میانگین خطای استاندارد میانگین گزارش گردیده است. ابتدا توزیع نرمال بودن داده‌ها با تست Shapiro wilk بررسی شد و چون داده‌ها دارای توزیع نرمال بود از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سه‌طرفه و سپس تست تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری برابر ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد. اثر استرس دوره نوجوانی بر سطح کورتیکوسترون در موش‌های بالغ نر و ماده بررسی شد.



تصویر ۲: سطح کورتیکوسترون (نانوگرم بر میلی لیتر) در موش‌های نر (الف) و ماده (ب) که به مدت ۲۱ روز در دوره نوجوانی در معرض استرس قرار گرفتند. کورتیکوسترون در روزهای ۳۰ قبل از استرس و سپس در پایان استرس در دو گروه غیراسترس (STD-nSt) و استرس (STD-St) و در هر دو جنس نر و ماده مورد بررسی قرار گرفت. سطح کورتیکوسترون در گروه استرس (STD-St) نسبت به گروه غیراسترس (STD-nSt) افزایش معنی‌داری داشت.  $P < 0.01$  نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه استرس (STD-St) با گروه غیراسترس (STD-nSt) است.

STD: Standard; St: Stress; nSt: Non-stress; EE: Environmental enrichment

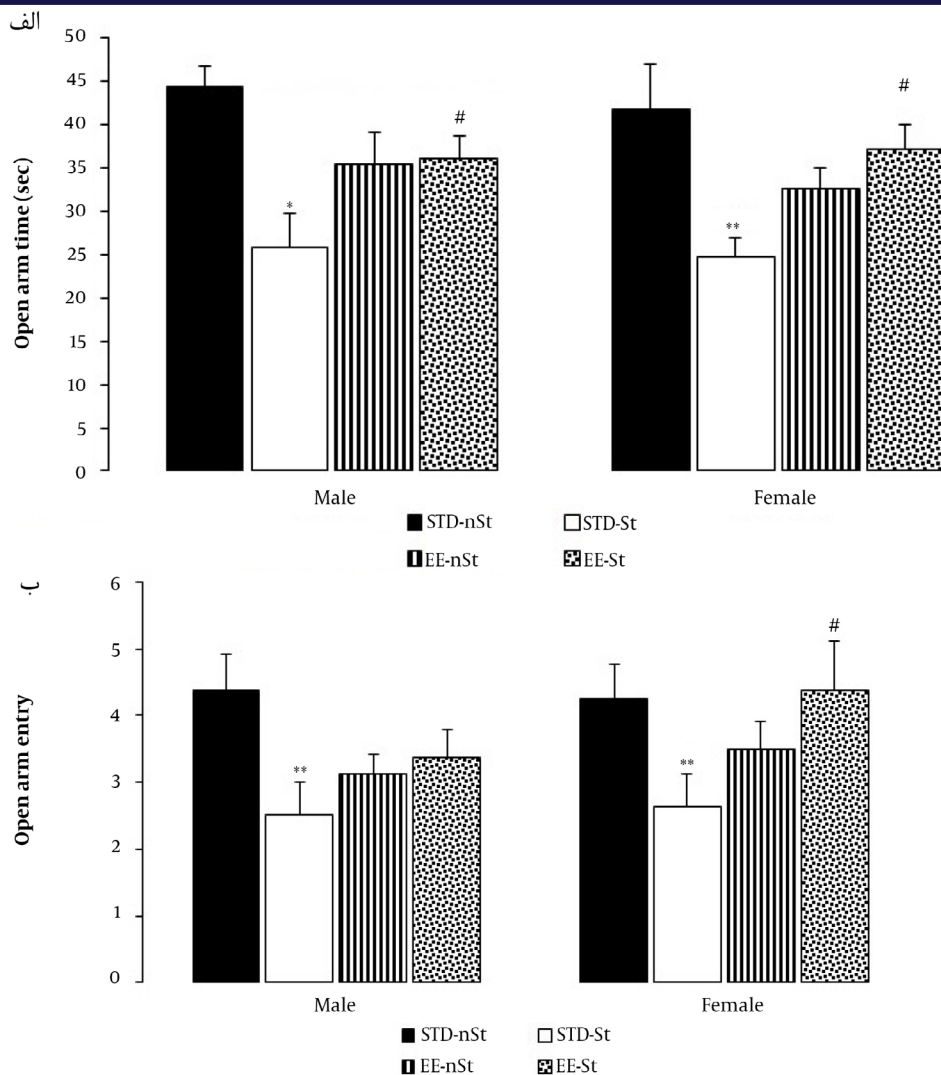
۰/۳۵،  $F_{1,56} = ۰/۰۳$ ،  $P\text{-value} = ۰/۴۳$  و اثر معنی‌دار استرس ( $F_{1,56} = ۰/۳۵$ ،  $P\text{-value} = ۰/۴۳$ )، عدم تعامل معنی‌دار جنس و محیط غنی ( $F_{1,56} = ۰/۷۵$ ،  $P\text{-value} = ۰/۴۵$ )، جنس و استرس ( $F_{2,3} = ۰/۰۹$ ،  $P\text{-value} = ۰/۰۰۰۱$ ) و تعامل معنی‌دار محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = ۲۱/۰۴$ ،  $P\text{-value} < ۰/۰۱$ ) و عدم تعامل معنی‌دار جنس، محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = ۰/۱۷$ ،  $P\text{-value} = ۰/۰۶۷$ ) است. مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که مدت زمان حضور در بازوی باز در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه STD-St نسبت به گروه STD-nSt کاهش یافته است ( $P\text{-value} < ۰/۰۵$ ) در زاده‌های نر و ( $P\text{-value} < ۰/۰۱$ ) در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه EE-St نسبت به گروه STD-St افزایش یافته است ( $P\text{-value} < ۰/۰۵$ ).

**۲.۴. آزمایش اول: اثر قرار گرفتن مادران بارداری در محیط غنی بر رفتارهای شبه اضطرابی و افسردگی ناشی از استرس در دوره نوجوانی در زاده‌های نر و ماده**

**۱.۲.۴. باز به‌علاوه‌ای شکل مرتفع (MPE)**

**۲.۲.۴. مدت زمان سپری‌شده در بازوی باز (Open Arm Time, OAT)**

مدت زمان حضور در بازوی باز در شکل ۳ الف نشان داده شده است. آنالیز واریانس سه‌طرفه بر مدت زمان حضور در بازوی باز نشان‌دهنده عدم اثر معنی‌دار جنس ( $P\text{-value} = ۰/۶۲$ )، محیط غنی ( $F_{1,56} = ۰/۲۴$ ،  $P\text{-value} < ۰/۵۵$ )،



**تصویر ۳.** سطح کورتیکوسترون (نانوگرم بر میلی لیتر) در موش‌های نر (الف) و ماده (ب) که به مدت ۲۱ روز در دوره نوجوانی در معرض استرس قرار گرفتند. کورتیکوسترون در روزهای ۳۰ قبل از استرس و سپس در پایان استرس در دو گروه غیراسترس (STD-nSt) و استرس (STD-St) و در هر دو جنس نر و ماده مورد بررسی قرار گرفت. سطح کورتیکوسترون در گروه استرس (STD-St) نسبت به گروه غیراسترس (STD-nSt) افزایش معنی‌داری داشت.  $P\text{-value} < ۰/۰۱$  \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه استرس (STD-St) با گروه غیراسترس (STD-nSt) است.

STD: Standard; St: Stress; nSt: Non-stress; EE: Environmental enrichment

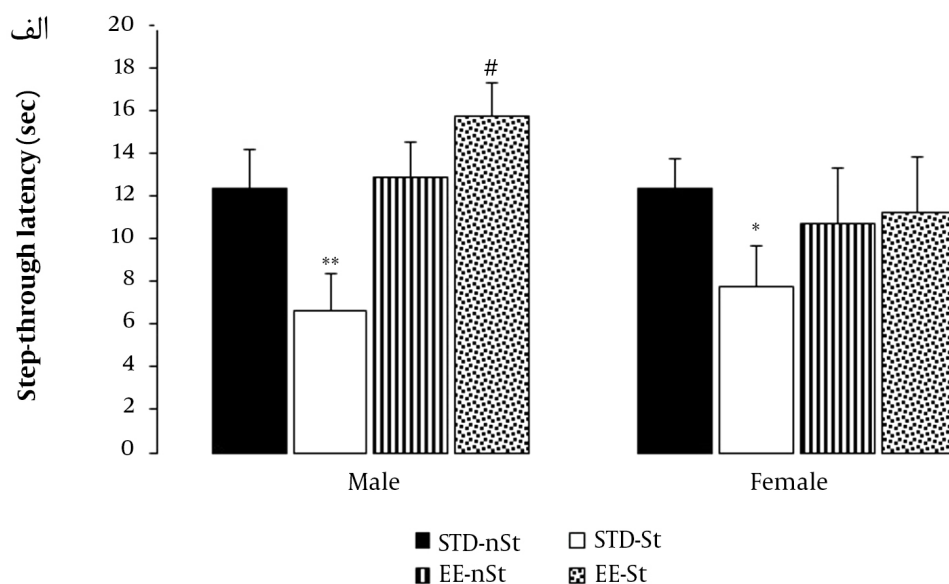
### ۳.۲.۴. تعداد دفعات ورود به بازوهای باز (Open Arms Entry, OAE)

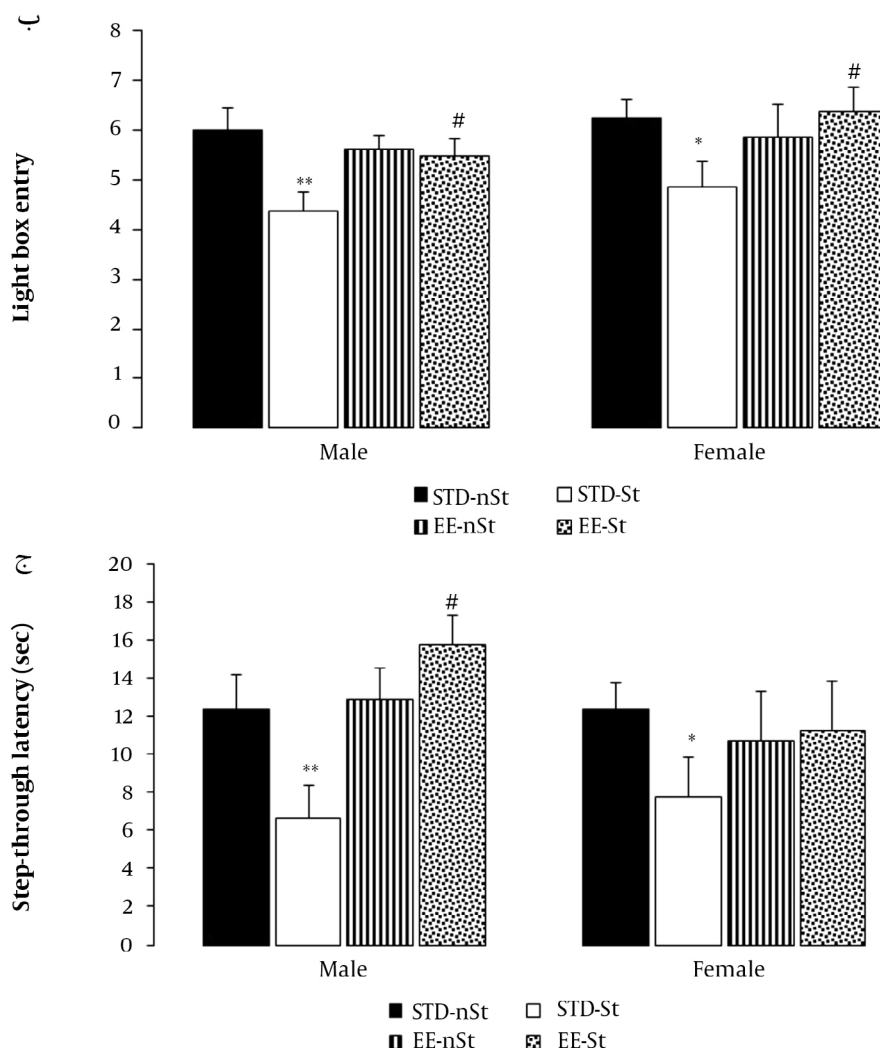
تعداد دفعات ورود به بازوی باز در تصویر ۳ ب نشان داده شده است. آنالیز واریانس سه طرفه بر تعداد دفعات ورود به بازوهای باز نشان دهنده عدم اثر معنی دار جنس ( $F_{1,56} = 0/27$ ) = محیط غنی ( $F_{1,56} = 1/22$ ,  $P\text{-value} = 0/57$ )، استرس ( $F_{1,56} = 1/78$ ,  $P\text{-value} = 0/18$ ) و عدم تعامل معنی دار جنس و محیط غنی ( $F_{1,56} = 1/22$ ,  $P\text{-value} = 0/27$ )، جنس و استرس ( $F_{1,56} = 0/97$ ,  $P\text{-value} = 0/32$ ) و تعامل معنی دار محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 13/41$ ,  $P\text{-value} < 0/0006$ ) و همچنین عدم تعامل معنی دار جنس، محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 0/39$ ,  $P\text{-value} = 0/53$ ) است. مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تعداد دفعات ورود به بازوی باز در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه STD-St نسبت به گروه STD-nSt کاهش یافته است ( $P\text{-value} < 0/01$ ). همچنین تعداد دفعات ورود به بازوی باز در زاده‌های ماده گروه EE-St نسبت به گروه STD-St افزایش یافته است ( $P\text{-value} < 0/05$ ). به طور خلاصه این یافته‌ها نشان می‌دهد که استرس موجب افزایش رفتارهای شبه‌اضطرابی در دوره نوجوانی می‌شود و قرار گرفتن مادر در طی بارداری در محیط غنی موجب کاهش معنی دار در رفتارهای شبه‌اضطرابی در زاده‌های گروه استرس می‌شود.

### ۴.۲.۴. جعبه تاریک و روشن

#### ۱.۴.۲.۴. زمان اولین ورود به جعبه تاریک (Step-through Latency)

زمان اولین ورود به جعبه تاریک در موش‌های ۳۰ روزه در تصویر ۴ الف نشان داده شده است. آنالیز واریانس سه طرفه بر زمان اولین ورود به جعبه تاریک نشان دهنده عدم اثر معنی دار جنس ( $F_{1,56} = 1/03$ ,  $P\text{-value} = 0/31$ )، اثر معنی دار محیط غنی ( $F_{1,56} = 4/78$ ,  $P\text{-value} = 0/03$ )، عدم اثر معنی دار استرس ( $F_{1,56} = 1/61$ ,  $P\text{-value} = 0/20$ ) و تعامل معنی دار جنس و محیط غنی ( $F_{1,56} = 2/08$ ,  $P\text{-value} = 0/15$ ) و جنس و استرس ( $F_{1,56} = 0/85$ ,  $P\text{-value} = 0/37$ ) و تعامل معنی دار محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 6/98$ ,  $P\text{-value} = 0/01$ ) و همچنین عدم تعامل معنی دار جنس، محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 0/54$ ,  $P\text{-value} = 0/37$ ) است. مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که زمان طی شده برای اولین ورود به جعبه تاریک در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه STD-St به نسبت به زاده‌های گروه STD-nSt کاهش یافته است ( $P\text{-value} < 0/01$ ). همچنین زمان اولین ورود به جعبه تاریک در زاده‌های نر گروه EE-St نسبت به زاده‌های گروه STD-St به طور معنی داری افزایش یافت ( $P\text{-value} < 0/05$ ).





**تصویر ۴. الف:** اثر استرس بر زمان تاخیر ورود به جعبه تاریک (الف)، تعداد دفعات ورود به جعبه روشن (ب) و کل زمان سپری شده در جعبه روشن (ج) در آزمون جعبه تاریک-روشن در زاده‌های نر و ماده نوجوان.  $P\text{-value} < 0.01$  \*\* در مقایسه با گروه محیط استاندارد-غیراسترس.  $P\text{-value} < 0.05$  # در مقایسه با گروه محیط غنی-استرس.

جنس نر و ماده گروه STD-St نسبت به گروه STD-nSt به‌طور معنی‌داری کمتر بود ( $P\text{-value} < 0.01$ ). همچنین تعداد دفعات ورود به جعبه روشن در زاده‌های نر گروه EE-St نسبت به زاده‌های گروه STD-St به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P\text{-value} < 0.01$ ).

#### ۳.۴.۲.۴. زمان سپری شده در جعبه روشن

زمان سپری شده در جعبه روشن در موش‌های ۳۰ روزه در تصویر ۴ ج نشان داده شده است. آنالیز واریانس سه‌طرفه بر زمان سپری شده در جعبه روشن عدم اثر معنی‌دار جنس ( $F_{1,56} = 2/25, P\text{-value} = 0/13$ )، محیط غنی ( $F_{1,56} = 0/45, P\text{-value} = 0/45$ )، استرس ( $F_{1,56} = 30/61, P\text{-value} = 0/57$ )، عدم تعامل معنی‌دار جنس و محیط غنی ( $F_{1,56} = 0/23, P\text{-value} = 0/43$ )، جنس و استرس ( $F_{1,56} = 1/46, P\text{-value} = 0/43$ )، و تعامل معنی‌دار محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 0/62, P\text{-value} = 0/05$ ) را نشان داد.

#### ۲.۴.۲.۴. تعداد دفعات ورود به جعبه روشن

تعداد دفعات ورود به جعبه روشن در موش‌های ۳۰ روزه در تصویر ۴ ب نشان داده شده است. آنالیز واریانس سه‌طرفه بر تعداد دفعات ورود به جعبه روشن نشان‌دهنده عدم اثر معنی‌دار جنس ( $F_{1,56} = 2/62, P\text{-value} = 0/11$ )، محیط غنی ( $F_{1,56} = 2/62, P\text{-value} = 0/11$ )، استرس ( $F_{1,56} = 0/09, P\text{-value} = 0/81$ )، عدم تعامل معنی‌دار جنس و محیط غنی ( $F_{1,56} = 2/81, P\text{-value} = 0/68$ )، جنس و استرس ( $F_{1,56} = 0/16, P\text{-value} = 0/25$ )، تعامل معنی‌دار محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 10/03, P\text{-value} < 0/0025$ ) و همچنین عدم تعامل معنی‌دار جنس، محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 0/45, P\text{-value} = 0/55$ ) است.

مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تعداد دفعات ورود به جعبه روشن در زاده‌های هر دو



۵ نشان داده شده است. آنالیز واریانس سه طرفه بر زمان بی حرکتی نشان دهنده اثر معنی دار جنس ( $P = 0.02$ )،  $F_{1,56} = 5.65$ ،  $P\text{-value} = 0.10$ ، عدم اثر معنی دار محیط غنی ( $P = 0.02$ )،  $F_{1,56} = 2.64$ ، اثر معنی دار استرس ( $P = 0.02$ )،  $F_{1,56} = 5.23$  و تعامل معنی دار جنس و محیط غنی ( $P = 0.186$ )،  $F_{1,56} = 0.02$ ، عدم تعامل معنی دار جنس و استرس ( $P = 0.72$ )،  $F_{1,56} = 0.12$  و تعامل معنی دار محیط غنی و استرس ( $P = 0.04$ )،  $F_{4,21} = 4.21$ ،  $P = 0.04$ ) و همچنین عدم تعامل معنی دار جنس، محیط غنی و استرس ( $P = 0.65$ )،  $F_{1,56} = 0.19$  است.

مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که زمان بی حرکتی در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه STD-nSt نسبت به گروه STD-St افزایش یافته است ( $P < 0.01$ ). همچنین زمان بی حرکتی در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه EE-St نسبت به گروه STD-St کاهش یافته است ( $P < 0.01$ ).

به طور خلاصه این یافته‌ها نشان می‌دهد که استرس موجب افزایش رفتارهای شبه‌افسردگی در دوره نوجوانی می‌شود. قرار گرفتن مادر در طی بارداری در محیط غنی موجب کاهش معنی دار در رفتارهای شبه‌افسردگی در زاده‌های گروه استرس می‌شود.

( $P\text{-value} < 0.008$ )،  $F_{1,56} = 8.25$  و همچنین عدم تعامل معنی دار جنس، محیط غنی و استرس ( $P = 0.88$ )،  $F_{1,56} = 0.02$  را نشان می‌دهد.

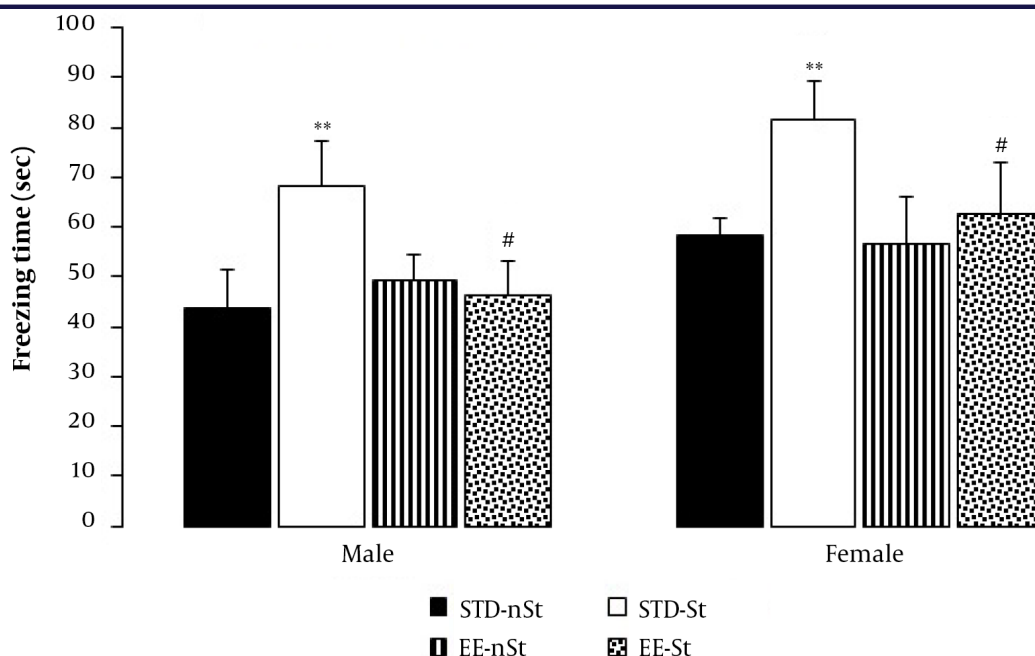
مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که زمان سپری شده در جعبه روشن در در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه STD-St نسبت به گروه STD-nSt به‌طور معنی داری کمتر بود ( $P < 0.01$ ) در زاده‌های نر و  $P < 0.05$  در زاده‌های ماده). همچنین زمان سپری شده در جعبه روشن در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه EE-St نسبت به گروه STD-St افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ).

به طور خلاصه این یافته‌ها نشان می‌دهد که استرس موجب افزایش رفتارهای شبه‌اضطرابی در دوره نوجوانی می‌شود. قرار گرفتن مادر در طی بارداری در محیط غنی، موجب کاهش معنی دار رفتارهای شبه‌اضطرابی در دوره نوجوانی در زاده‌های گروه استرس می‌شود.

#### ۵.۲.۴. آزمون شنای اجباری (Force Swimming Test, FST)

#### ۱.۵.۲.۴. زمان بی حرکتی در FST

زمان بی حرکتی در FST در موش‌های ۳۰ روزه در تصویر



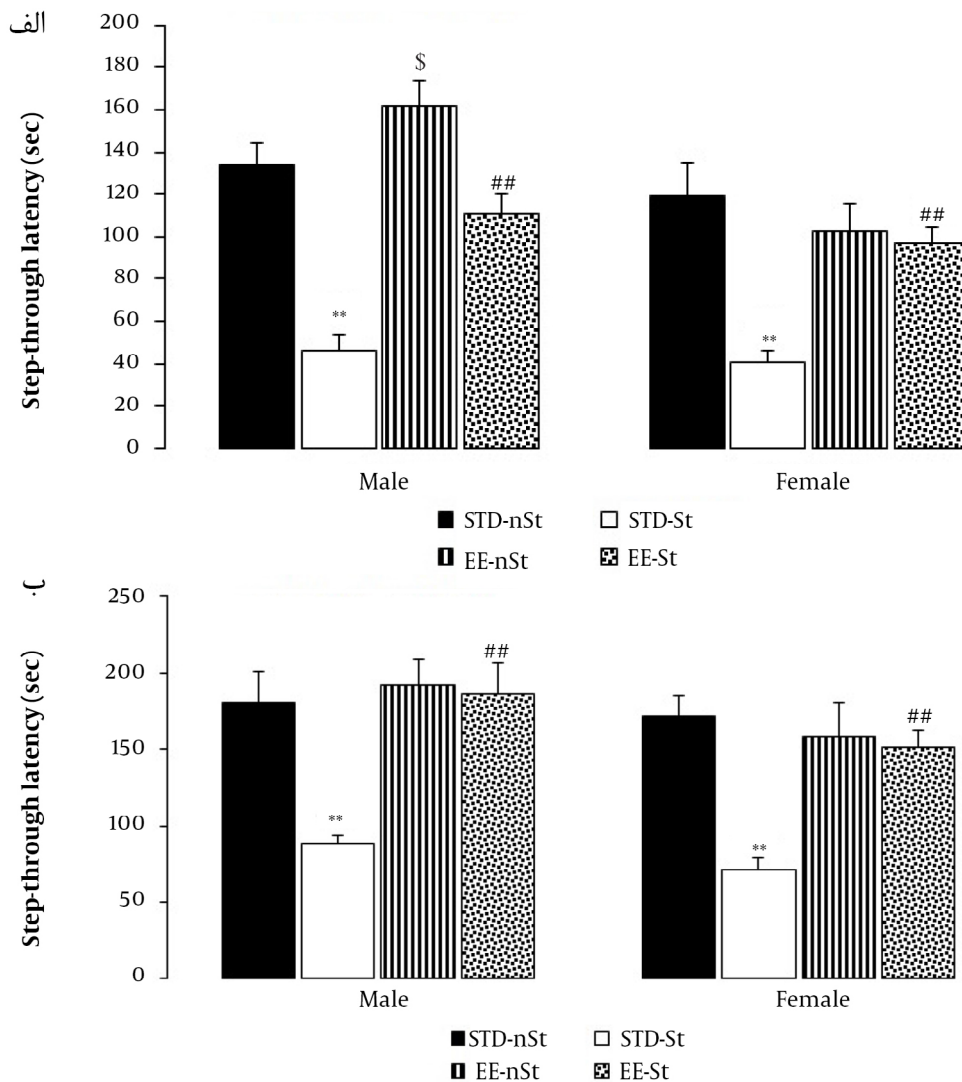
تصویر ۵. اثر استرس بر زمان بی حرکتی در آزمون شنای اجباری در زاده‌های نر و ماده نوجوان.  $P < 0.01$  \*\* در مقایسه با گروه محیط استاندارد-غیراسترس.  $P < 0.05$  # در مقایسه با گروه محیط غنی-استرس.

۳.۴. آزمایش دوم: اثر قرار گرفتن مادران باردار در محیط غنی بر تغییرات حافظه اجتنابی و حافظه فضایی ناشی از استرس در دوره نوجوانی در زاده‌های نر و ماده

۱.۳.۴. شاتل باکس

۲.۳.۴. زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک (Step Through Latency Time)

زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک در تصویر ۶ الف نشان داده شده است. آنالیز واریانس سه‌طرفه بر زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک نشان‌دهنده اثر معنی‌دار جنس ( $P < 0.003$ )، عدم اثر معنی‌دار محیط غنی ( $F_{1,56} = 9/65, P < 0.0001$ )، اثر معنی‌دار استرس ( $F_{1,56} = 19/38, P < 0.0001$ )، عدم تعامل معنی‌دار جنس و محیط غنی ( $F_{1,56} = 54/45, P < 0.0001$ ) و جنس و محیط غنی ( $F_{1,56} = 3/23, P < 0.07$ )، جنس و استرس ( $F_{1,56} = 3/64, P < 0.06$ )، تعامل معنی‌دار محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 14/30, P < 0.0004$ ) و همچنین عدم تعامل معنی‌دار جنس، محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 1/74, P < 0.19$ ) است. مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه STD-St نسبت به گروه EE-nSt کاهش یافته است ( $P < 0.01$ )، همچنین زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک در زاده‌های نوجوان هر دو جنس نر و ماده گروه EE-St نسبت به گروه STD-St افزایش یافته است ( $P < 0.01$ ).



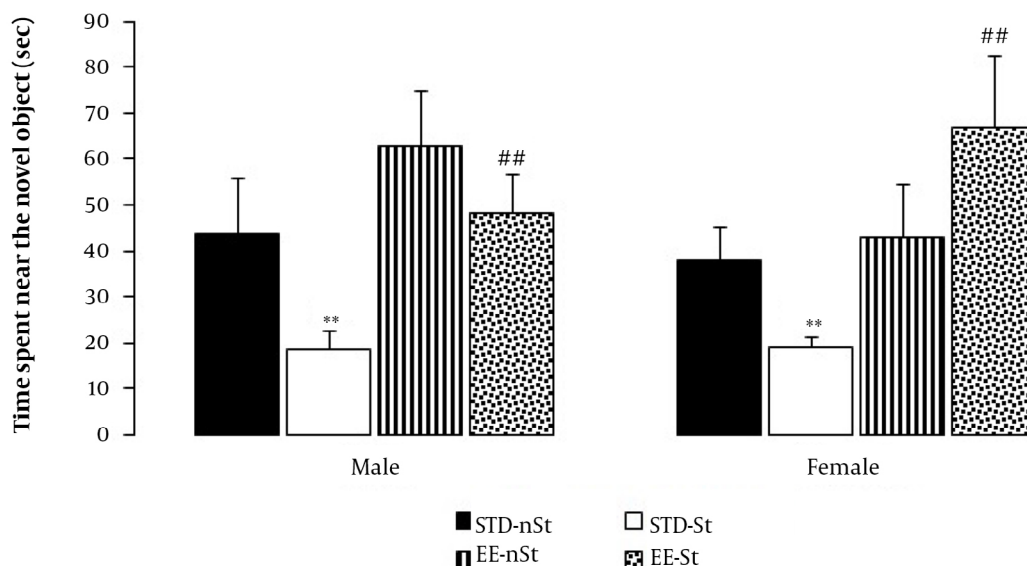
تصویر ۶. الف: اثر استرس بر زمان تاخیر ورود به ناحیه تاریک (الف)، کل زمان حضور در ناحیه روشن (ب) در آزمون حافظه ترس اجتنابی در زاده‌های نر و ماده نوجوان.  $P < 0.01$  \* در مقایسه با گروه محیط استاندارد-غیراسترس.  $P < 0.05$  # در مقایسه با گروه محیط غنی-استرس.

### ۳.۳.۴. کل زمان حضور در ناحیه روشن

حضور در ناحیه روشن در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه STD-St نسبت به گروه STD-nSt به طور معنی‌داری کاهش یافته است ( $P\text{-value} < 0/01$ ). همچنین کل زمان حضور در ناحیه روشن در زاده‌های هر دو جنس نر و ماده گروه EE-St نسبت به گروه STD-St افزایش یافته است ( $P\text{-value} <$

به طور خلاصه این یافته‌ها نشان داد که با وجود تاثیر استرس بر کاهش حافظه اجتنابی در دوره نوجوانی، قرار گرفتن مادر در طی بارداری در محیط غنی موجب بهبود حافظه ترس اجتنابی در زاده‌های گروه استرس می‌شود.

کل زمان حضور در ناحیه روشن در تصویر ۶ ب نشان داده شده است. آنالیز واریانس سه‌طرفه بر کل زمان حضور در ناحیه روشن نشان‌دهنده اثر معنی‌دار جنس ( $F_{1,56} = 4/43, P\text{-value} = 0/03$ )، محیط غنی ( $F_{1,56} = 4/43, P\text{-value} < 0/003$ )، استرس ( $F_{1,56} = 19/96, P\text{-value} < 0/0001$ ) و عدم تعامل معنی‌دار جنس و محیط غنی ( $F_{1,56} = 0/92, P\text{-value} = 0/91$ )، جنس و استرس ( $F_{1,56} = 16/89, P\text{-value} < 0/0001$ ) و همچنین عدم تعامل معنی‌دار جنس، محیط غنی و استرس ( $F_{1,56} = 0/06, P\text{-value} < 0/80$ ) است. مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی نشان داد که کل زمان



تصویر ۷. اثر استرس بر مدت زمان سپری‌شده در مجاورت شی جدید در زاده‌های نر و ماده نوجوان.  $P\text{-value} < 0/01$  \*\* در مقایسه با گروه محیط استاندارد-غیراسترس.  $P\text{-value} < 0/01$  \*\* در مقایسه با گروه محیط غنی-استرس.

طی بارداری موجب بهبود حافظه فرزندان در دوره نوجوانی گردید.

۳. استرس مزمن سبب افزایش علائم شبه افسردگی در دوره نوجوانی گردید. قرار گرفتن مادران در محیط غنی طی بارداری موجب بهبود رفتارهای شبه افسردگی فرزندان در دوره نوجوانی گردید.

۴. استرس مزمن سبب کاهش رفتارهای جستجوگرانه و اختلال در شناخت در دوره نوجوانی می‌شود. قرار گرفتن مادران در محیط غنی طی بارداری موجب بهبود رفتارهای جستجوگرانه فرزندان در دوره نوجوانی گردید.

در مطالعه حاضر، برای سنجش صحت مدل استرس مزمن با مقیدکننده، کورتیکوسترون سرم سنجیده شد که زاده‌های استرسی مادران محیط استاندارد نسبت به زاده‌های غیراسترسی مادران محیط استاندارد در هر دو

به طور خلاصه این یافته‌ها نشان می‌دهد که استرس موجب کاهش رفتارهای جستجوگرانه و اختلال در شناخت در دوره نوجوانی می‌شود. قرار گرفتن مادر در طی بارداری در محیط غنی موجب افزایش معنی‌دار در شناخت اشیای جدید در زاده‌های گروه استرس می‌شود.

## ۵. بحث

یافته‌های کلیدی و مهم این مطالعه عبارتند از:

۱. استرس مزمن منجر به افزایش رفتارهای شبه اضطرابی در دوره نوجوانی گردید. قرار گرفتن مادران در محیط غنی طی بارداری موجب بهبود رفتارهای اضطرابی فرزندان در دوره نوجوانی گردید.

۲. استرس مزمن سبب اختلال حافظه اجتنابی غیر فعال در دوره نوجوانی گردید. قرار گرفتن مادران در محیط غنی

جنس افزایش معنی‌داری در کورتیکوسترون سرم داشتند. این یافته همسو با نتایج سایر مطالعات مشابه است (۲۳). هم‌راستا با نتایج مطالعه Zhang و همکاران، نتایج ما نشان داد که استرس مزمن در دوران نوجوانی باعث افزایش رفتارهای شبه اضطرابی می‌شود و قرار گرفتن مادران در محیط غنی سبب کاهش بروز این رفتارها در زاده‌ها می‌شود (۲۴). بیان مولکول Ninjurin2 که واسطه چسبندگی سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارج سلولی است با خطر بیماری آلزایمر مرتبط است و بیان اینترفرون ۷ در زاده‌های مادران محیط غنی افزایش پیدا کرده است. در حال حاضر بین افزایش بیان اینترفرون ۷ و کاهش رفتارهای شبه اضطرابی ارتباطی وجود ندارد. نتایج مطالعه ما نشان داد که قرار گرفتن در شرایط استرس‌زا در دوران نوجوانی سبب اختلال در حافظه و یادگیری می‌گردد که در زاده‌های مادران گروه محیط غنی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. نتایج مطالعه‌ای نشان می‌دهد که قرار گرفتن والدین در محیط غنی باعث بهبود یادگیری و افزایش نورونز در زاده‌های مادران و پدران محیط غنی نسبت به گروه کنترل می‌شود. این مساله به کاهش فراگیر متیلاسیون DNA در هیپوکمپ و قشر پیشانی نسبت داده شده است، زیرا کاهش متیلاسیون DNA موجب افزایش بیان ژن گردیده و احتمالاً از این طریق موجب بهبود یادگیری می‌گردد (۱۹). سطوح بالایی از رفتارهای مراقبتی مادران، مانند لیس زدن نوزادان در هفته اول زندگی، از طریق مکانیسم اپی‌ژنتیکی شامل متیلاسیون DNA و تغییرات بعدی در بیان ژن‌های خاصی که پاسخ استرس را تنظیم می‌کنند، به فرزندانشان منتقل می‌شود. این رفتارهای مراقبتی در مادران محیط غنی نسبت به مادران محیط استاندارد افزایش می‌یابد (۲۵).

در مطالعه‌ی ما استرس در دوران نوجوانی سبب افزایش علائم افسردگی در دوره نوجوانی گردید که در زاده‌های مادران محیط غنی به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ولی در مطالعه Weller و Rosenfeld قرار گرفتن مادران در محیط غنی سبب کاهش بروز علائم افسردگی در نوجوانی نشد که می‌تواند به علت تفاوت در طراحی مطالعه باشد (۲۶). به طور کلی مطالعات قبلی نشان داده‌اند که محیط زندگی والدین بر رفتار فرزندان آن‌ها تأثیر می‌گذارد. اگرچه در این مطالعه، اثر قرارگیری موش‌های پدر را در محیط غنی بررسی نشده است اما شواهد نشان می‌دهد که قرار گرفتن پدر در محیط غنی ۲۸ روز قبل از جفت‌گیری سبب کاهش بروز علائم افسردگی در نسل دوم بعد از خود شده است (۱۸). نتایج مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۷ بر روی موش [C57Bl/6] انجام شد نشان می‌دهد که قرار گرفتن پدر در محیط غنی به مدت ۴ هفته قبل از جفت‌گیری با

مادر محیط استاندارد، تأثیری در رفتارهای شبه اضطرابی و افسردگی در نسل اول ندارد. همچنین در رفتارهای اضطرابی نسل دوم نیز تفاوتی وجود نداشت ولی در آزمون شنای اجباری، موش‌هایی که پدر بزرگ آن‌ها در محیط غنی بودند بی‌حرکتی کمتری نسبت به گروه کنترل داشتند (۱۸). شواهد نشان می‌دهد که وراثت بین نسلی پدر به فرزند با اصلاح اپی‌ژنتیکی از جمله الگوهای بیانی تغییر یافته RNA های کوچک غیر کد کننده در اسپرم، منتقل می‌شود (۲۷). نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ بر روی گورخرماهی انجام شد نشان داد که قرار گرفتن پدر در محیط غنی باعث افزایش طول بدن ماهی‌ها و همچنین افزایش حرکات ماهی‌ها در دو نسل بعد می‌گردد که بیان‌گر تأثیر محیط غنی بر ژنوم اسپرم است که موجب تغییر رفتار و آناتومی در نسل بعد می‌گردد (۲۸). برای درک بهتر نحوه تأثیر محیط غنی در نسل بعد نیاز به مطالعات بعدی است. محدودیت تأثیرگذاری در این مطالعه وجود نداشت.

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قرار گرفتن موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی در دوره‌ی نوجوانی در شرایط استرس مزمن موجب بروز رفتارهای شبه اضطرابی و شبه‌افسردگی، و همچنین اختلالات شناختی و حافظه می‌شود. قرار گرفتن مادران در محیط غنی در طی بارداری باعث پیشگیری و کاهش بروز این اختلالات شناختی-رفتاری ناشی از استرس می‌شود.

### مشارکت نویسندگان:

عباس علی وفایی و علی رشیدی پور آزمایش را طراحی کردند. سید علی سیدنی، حسین محسنی، ایلین اسدی، علی بیات و عباس علی وفایی انجام تحقیق، جمع‌آوری داده‌ها و انجام کارهای آزمایشگاهی را بر عهده داشتند. عباس علی وفایی و علی رشیدی پور تجزیه و تحلیل آماری را انجام داد و بیشتر نسخه خطی را تهیه کردند. پیمان رایس-عبداللهی، عباس علی وفایی و علی رشیدی پور مطالعه را هماهنگ و نظارت کرد. همه نویسندگان مقاله را تایید کردند.

### حمایت مالی/معنوی:

این مطالعه با حمایت مالی از دانشگاه علوم پزشکی سمنان (سمنان، ایران، ۶۲-۴۳) انجام شد.

### کد اخلاق:

هیئت بازبینی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی سمنان، پروتکل آزمایشی را تایید کرد. همه آزمایش‌ها با توافق با راهنمای مؤسسه ملی بهداشت برای مراقبت و استفاده از

## References

- Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol.* 2005;1:607-28. [PubMed ID:17716101]. [PubMed Central ID:PMC2568977]. <https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.144141>.
- RaiseAbdullahi P, Vafaei AA, Ghanbari A, Dadkhah M, Rashidy-Pour A. Time-dependent protective effects of morphine against behavioral and morphological deficits in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Behav Brain Res.* 2019;364:19-28. [PubMed ID:30753875]. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.058>.
- Dai S, Mo Y, Wang Y, Xiang B, Liao Q, Zhou M, et al. Chronic Stress Promotes Cancer Development. *Front Oncol.* 2020;10:1492. [PubMed ID:32974180]. [PubMed Central ID:PMC7466429]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01492>.
- Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm Res.* 2003;59(4):161-79. [PubMed ID:12649570]. <https://doi.org/10.1159/000069325>.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol.* 2013;106-107:1-16. [PubMed ID:23583307]. [PubMed Central ID:PMC3737272]. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>.
- Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):78-84. [PubMed ID:9023876]. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(96\)10069-2](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(96)10069-2).
- Het S, Wolf OT. Mood changes in response to psychosocial stress in healthy young women: effects of pretreatment with cortisol. *Behav Neurosci.* 2007;121(1):11-20. [PubMed ID:17324047]. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.1.11>.
- McEwen BS. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;933:265-77. [PubMed ID:12000027]. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05830.x>.
- Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol. *Neurosci Lett.* 2004;362(1):61-4. [PubMed ID:15147781]. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.067>.
- Meamar M, Rashidy-Pour A, Vafaei AA, Raise-Abdullahi P. beta-adrenoceptors of the infra-limbic cortex mediate corticosterone-induced enhancement of acquisition and consolidation of fear memory extinction in rats. *Behav Brain Res.* 2023;442:114310. [PubMed ID:36706807]. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114310>.
- Conrad CD. The Relationship between Acute Glucocorticoid Levels and Hippocampal Function Depends

حیوانات آزمایشگاهی تکمیل شد

(NO: IR.SEMUMS.REC.1397.171)

### تضاد منافع:

نویسندگان اظهار داشتند که فاقد هرگونه تضاد منافع هستند.

- Upon Task Aversiveness and Memory Processing Stage. *Nonlinearity Biol Toxicol Med.* 2005;3(1):57-78. [PubMed ID:16601824]. [PubMed Central ID:PMC1431575]. <https://doi.org/10.1080/15401420490900245>.
- Sazma MA, Shields GS, Yonelinas AP. The effects of post-encoding stress and glucocorticoids on episodic memory in humans and rodents. *Brain Cogn.* 2019;133:12-23. [PubMed ID:31178013]. [PubMed Central ID:PMC6559250]. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2018.10.005>.
  - Won E, Kim YK. Stress, the Autonomic Nervous System, and the Immune-kynurenine Pathway in the Etiology of Depression. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(7):665-73. [PubMed ID:27640517]. [PubMed Central ID:PMC5050399]. <https://doi.org/10.2174/1570159x146666151208113006>.
  - Vega-Rivera NM, Ortiz-Lopez L, Gomez-Sanchez A, Oikawa-Sala J, Estrada-Camarena EM, Ramirez-Rodriguez GB. The neurogenic effects of an enriched environment and its protection against the behavioral consequences of chronic mild stress persistent after enrichment cessation in six-month-old female Balb/C mice. *Behav Brain Res.* 2016;301:72-83. [PubMed ID:26721469]. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.028>.
  - Brenes JC, Fornaguera J, Sequeira-Cordero A. Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. *Front Pharmacol.* 2020;11:804. [PubMed ID:32547399]. [PubMed Central ID:PMC7272682]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00804>.
  - Ahmadalipour A, Sadeghzadeh J, Vafaei AA, Bandegi AR, Mohammadkhani R, Rashidy-Pour A. Effects of environmental enrichment on behavioral deficits and alterations in hippocampal BDNF induced by prenatal exposure to morphine in juvenile rats. *Neuroscience.* 2015;305:372-83. [PubMed ID:26272536]. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.015>.
  - Kondo M, Gray LJ, Pelka GJ, Christodoulou J, Tam PP, Hannan AJ. Environmental enrichment ameliorates a motor coordination deficit in a mouse model of Rett syndrome-Mecp2 gene dosage effects and BDNF expression. *Eur J Neurosci.* 2008;27(12):3342-50. [PubMed ID:18557922]. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06305.x>.
  - Yeshurun S, Short AK, Bredy TW, Pang TY, Hannan AJ. Paternal environmental enrichment transgenerationally alters affective behavioral and neuroendocrine

- phenotypes. *Psychoneuroendocrinol.* 2017;77:225-35. [PubMed ID:28104556]. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.013>.
19. Mychasiuk R, Zahir S, Schmold N, Ilnytsky S, Kovalchuk O, Gibb R. Parental enrichment and offspring development: modifications to brain, behavior and the epigenome. *Behav Brain Res.* 2012;228(2):294-8. [PubMed ID:22173001]. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.036>.
20. Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Taherian AA. Peripheral injection of dexamethasone modulates anxiety related behaviors in mice: an interaction with opioidergic neurons. *Pak J Pharm Sci.* 2008;21(3):285-9. [PubMed ID:18614426].
21. Ghodrati-Jaldbakhan S, Khalil Khalili M, Vafaei AA, Miladi-Gorji H, Bandegi AR, Rashidy-Pour A. [Effects of different intensities levels of treadmill exercise on cognitive functions and BDNF levels in prefrontal cortex of morphine dependent rats]. *Koomesh.* 2016;17(3):e151215. Persian.
22. Omoumi SAMIRA, Rashidy-Pour A, Shafiee M, Vafaei AA. [Effects of activation and inactivation of glucocorticoid receptors of basolateral amygdala on fear memory extinction in rats]. *Koomesh.* 2014;15(3):405-401. Persian.
23. Lepsch LB, Gonzalo LA, Magro FJ, Delucia R, Scavone C, Planeta CS. Exposure to chronic stress increases the locomotor response to cocaine and the basal levels of corticosterone in adolescent rats. *Addict Biol.* 2005;10(3):251-6. [PubMed ID:16109586]. <https://doi.org/10.1080/13556210500269366>.
24. Zhang XG, Zhang H, Lin L, Yang YQ, Deng TT, Liu Q, et al. Genes underlying positive influence of prenatal environmental enrichment and negative influence of prenatal earthquake simulation and corrective influence of Chinese herbal medicine on rat offspring: *Irf7* and *Ninj2*. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014;11(2):367-76. [PubMed ID:25435624]. [PubMed Central ID:PMC4202648]. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i2.24>.
25. Zuena AR, Zinni M, Giuli C, Cinque C, Alemà GS, Giuliani A, et al. Maternal exposure to environmental enrichment before and during gestation influences behaviour of rat offspring in a sex-specific manner. *Physiol Behav.* 2016;163:274-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.010>.
26. Rosenfeld A, Weller A. Behavioral effects of environmental enrichment during gestation in WKY and Wistar rats. *Behav Brain Res.* 2012;233(2):245-55. [PubMed ID:22595039]. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.006>.
27. Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci.* 2014;17(5):667-9. [PubMed ID:24728267]. [PubMed Central ID:PMC433222]. <https://doi.org/10.1038/nn.3695>.
28. Green MR, Swaney WT. Interacting effects of environmental enrichment across multiple generations on early life phenotypes in zebrafish. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2023;340(5). [PubMed ID:36479827]. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23184>.



## Research Article

## The Effect of Environmental Enrichment on Pregnant Adult Rats in Improving Stress-Induced Cognitive and Behavioral Disorders in Adolescent Offspring

Seyed Ali Seyedinia<sup>1</sup>, Ali Bayat<sup>1</sup>, Ilia Asadi<sup>1</sup>, Hossein Mohseni<sup>1</sup>, Abbas Ali Vafaei<sup>1,2</sup>, Payman Raise-Abdullahi<sup>1</sup>, Ali Rashidy Pour<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

<sup>2</sup>Department of Physiology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

\*Corresponding Author: Research Center of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. Email: arashidy\_pour44@yahoo.com

Received 17/01/2024; Accepted 17/03/2024

### Abstract

**Background:** Numerous studies have demonstrated that environmental enrichment (EE) can mitigate the impacts of chronic stress. In this study, we explored the influence of maternal environmental enrichment on cognitive-behavioral disorders stemming from stress in the offspring rats.

**Methods:** Upon confirmation of pregnancy through the presence of vaginal plaque, the mother rats were randomly assigned to two groups: Control and enriched environment. The male and female pups were subsequently categorized into stress and non-stress groups. The stress groups experienced 6 hours of daily restraint stress for 21 days starting from the 30th day post-birth (adolescence). Serum corticosterone levels were measured after this period, and behavioral tests were conducted.

**Results:** Restraint stress resulted in elevated serum corticosterone levels ( $P$ -value  $< 0.05$ ). Data analysis from the elevated plus maze and light-dark box revealed an increase in the time spent and the number of entries into open arms in the offspring of the EE-St group compared to the STD-St group ( $P$ -value  $< 0.05$ ). Light-dark box results demonstrated an increase in step-through latency and the number of entries into the lightbox in the offspring of the EE-St group compared to the STD-St group ( $P$ -value  $< 0.05$ ). During the forced swimming test, immobility time was decreased in the offspring of the EE-St group compared to the STD-St group ( $P$ -value  $< 0.01$ ). In the shuttle box test, step-through latency and the total time spent in the light compartment increased in the offspring in the EE-St group compared to the STD-St group ( $P$ -value  $< 0.01$ ). Lastly, in the novel object recognition test, the time spent next to the new object increased in the EE-St offspring compared to the STD-St offspring ( $P$ -value  $< 0.01$ ).

**Conclusion:** Environmental enrichment during pregnancy diminished anxiety and depression-like disorders as well as cognitive defects induced by stress in the adolescent offspring rats.

**Keywords:** Environments, Enrichment, Stress, Cognitive Dysfunction, Anxiety, Depression.