

نقش حفاظتی ویتامین D بر اختلال یادگیری و حافظه ناشی از استرس مزمن در موش بزرگ آزمایشگاهی

سارا چوبدار (M.Sc)، عباسعلی وفایی (Ph.D)، علی رشیدی پور (Ph.D)، کتایون صداقت* (Ph.D)

مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۱۰

Katsedaghat@gmail.com

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۰۹۰۸۸۹۶۷

چکیده

هدف: استرس موجب افزایش رهایش گلوکوکورتیکوئیدها و اختلال در پلاستیسیته نورون‌ها به خصوص در هیپوکمپ شده که می‌تواند منجر به اختلال در حافظه و یادگیری شود. از آن‌جا که ویتامین D نقش محافظت‌کننده بر سیستم عصبی داشته و گیرنده‌های آن در هیپوکمپ حضور دارند، احتمال دارد بتواند در مقابل اثرات منفی استرس مزمن نقش محافظت‌کننده ایفا کند. بنابراین، هدف این مطالعه، بررسی اثرات محافظتی ویتامین D بر اختلال یادگیری و حافظه ناشی از استرس مزمن در موش بزرگ آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش‌ها: موش‌ها، (تعداد=۷۸)، به صورت تصادفی به گروه‌های استرس و کنترل (هر کدام با ۳ زیر گروه) تقسیم شدند. در گروه استرس حیوانات به مدت ۲۸ روز، روزی ۳ ساعت تحت استرس محدودکننده قرار گرفتند. گروه‌ها دو بار در هفته حلال ویتامین D یا ویتامین D در دو دوز ($10 \mu\text{g/kg}$ یا ۵) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. سپس سطح کورتیکوسترون پلاسمایی ارزیابی شد. برای سنجش یادگیری و حافظه آزمون‌های ماز آبی و سپس احترازی غیر فعال انجام شد.

یافته‌ها: گروه استرس سطح بالاتر کورتیکوسترون را نسبت به گروه کنترل در خون نشان دادند ($P < 0.0001$). در تست ماز آبی موریس تمام گروه‌ها محل سکو را در ۴ روز آموزش یاد گرفتند ($P = 0.0001$) تست حافظه فضایی نشان‌دهنده مدت زمان کم‌تر رسیدن به محل سکو برای موش‌های استرس دیده بود. دوز بالای ویتامین D موجب پیدا کردن زودتر سکو شد ($P = 0.0002$). در تست احترازی غیر فعال گروه استرس نسبت به گروه کنترل مدت زمان کم‌تری در ناحیه تاریک بود ($P = 0.0997$) دریافت ویتامین D تغییر قابل ملاحظه‌ای در نتیجه آزمون نداد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مدل استرس مزمن محدودکننده موجب افزایش سطح کورتیکوسترون خون و تغییر در رفتارهای ناشی از یادگیری بلند و کوتاه‌مدت فضایی و شرطی شد. درمان با ویتامین D کمک به کاهش سطح کورتیکوسترون پلاسمایی بهبود رفتارهای یادگیری فضایی گردید.

واژه‌های کلیدی: استرس محدودکننده، ویتامین D، موش صحرائی، آزمون احترازی غیر فعال، کورتیکوسترون، ماز آبی موریس

مقدمه

استرس که عامل قوی فعال‌کننده محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) است، منجر به افزایش رهایش گلوکوکورتیکوئیدها (GC) می‌گردد [۱]. استرس طولانی‌مدت موجب برهم خوردن تعادل محور HPA شده که در نتیجه آن مرفولوژی، بقا، تکثیر و پلاستیسیته نورون‌ها در نواحی متعدد مغز به خصوص هیپوکمپ و سایر اجزای سیستم لیمبیک مثل کورتکس پیشانی PFC و آمیگدال دچار اختلال می‌شوند [۲]. هیپوکمپ مرکز شکل‌گیری حافظه و یادگیری موجود زنده می‌باشد که نسبت به استرس مزمن بسیار آسیب‌پذیر بوده و دچار کاهش دندریته‌های نورونی، به خصوص در ناحیه CA3، کاهش

پلاستیسیته، اختلال در Long Term Potentiation, LTP و در نتیجه کاهش قدرت یادگیری و حافظه می‌گردد [۳-۵]. یکی از پروتئین‌هایی که بیان آن توسط کورتیکواسترون کنترل می‌شود، نوروتروفین Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) می‌باشد. کورتیکوسترون و استرس مزمن بیان این پروتئین را در هیپوکمپ کاهش می‌دهد [۶،۷].

ویتامین D یک هورمون استروئیدی است که علاوه بر نقش تنظیم‌کننده کلسیم آن در بدن، دارای نقش محافظت‌کننده سیستم عصبی نیز می‌باشد [۸،۹]. شواهد قوی وجود دارد که ۱۱ و ۲۵ دی هیدروکسی vitD در محافظت عصبی به وسیله تعدیل تولید رشد عصبی، کاهش بیان کانال کلسیمی نوع L [۹]، تنظیم سمیت

گونه‌های فعال با اکسیژن [۱۰]، فاکتورهای نوروتروفیک مانند فاکتور رشد عصبی [۱۱]، فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول‌های گلیال [۱۲]، سنتز نیتریک اکساید [۱۳] دخالت دارد. حضور گیرنده‌های ویتامین D در نواحی مختلف مغز و به‌خصوص هیپوکمپ و حضور آنزیم‌هایی که در ساخت و متابولیسم این ویتامین نقش دارند، نشانگر نقش مستقیم آن در حافظه و یادگیری است [۱۴، ۸]. گزارشات متعددی مبنی بر اثر محافظتی ویتامین D در حفظ توانایی شناختی و حافظه در انسان داده شده است. مثلاً کمبود ویتامین D منجر به کاهش توانایی به خاطر آوردن کلمات در آزمون کلامی [۱۵] یا کاهش پاسخ‌دهی در آزمون‌های روانی و حافظه به‌خصوص در افراد سالمند [۱۴] و با ارتباط کمبود این ویتامین با بیماری آلزایمر در سنین سالمندی [۱۷، ۱۶] و حیوانات [۱۸] ارائه شده است.

آزمون‌های رفتاری

روز بعد آزمون ماز آبی موریس (Morris water maze) برای سنجش حافظه فضایی و سپس آزمون احترازی غیر فعال (passive avoidance test) برای یادگیری و حافظه شرطی انجام شدند.

ماز آبی موریس از یک حوضچه استوانه‌ای شکل با قطر ۲ متر و ارتفاع ۴۵ سانتی‌متر تشکیل شده که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری با آب (۱±۰.۲۴) درجه سانتی‌گراد پر می‌شود. یک سکوی سیاه‌رنگ با قطر ۱۱ سانتی‌متر درون حوضچه، ۱/۵ سانتی‌متری زیر سطح آب در مرکز یکی از چهار ربع حوضچه قرار می‌گیرد. این آزمایش طی ۹ روز انجام شد: روز اول تا چهارم آموزش بوده و سکو در ناحیه سوم قرار داشت. (ارزیابی حافظه رفتاری) تست پروب در روز پنجم انجام شد. برای ارزیابی حافظه کوتاه یا کاری، روز ششم سکو در ناحیه ۴، روز هفتم سکو در ناحیه ۱، روز هشتم سکو در ناحیه ۲، روز نهم دوباره سکو در ناحیه ۳ قرار داده شد. در هر بررسی رفتار حیوان به وسیله یک دوربین که در بالای حوضچه نصب شده فیلم‌برداری شده و توسط نرم‌افزار ردیاب ابتدا پردازش و اطلاعاتی نظیر سرعت شنا کردن، زمان سپری شده برای یافتن سکو، مسافت طی شده برای یافتن سکو و درصد زمان طی شده در ربع هدف (ربعی که سکو در آن قرار داشته) استخراج گردید [۴].

ارزیابی حافظه احترازی غیر فعال: این دستگاه از ۲ محفظه تاریک و روشن تشکیل شده است. یک درب گیوتینی خودکار برای ایزوله کردن محفظه‌ها وجود دارد. این آزمون شامل ۲ مرحله فراگیری و آزمایش است. در طی مرحله فراگیری (آموزش) موش در محفظه روشن قرار می‌گیرد و در را باز می‌گذاریم که موش وارد محفظه تاریک شود و در را می‌بندیم. در این مرحله شوک الکتریکی خفیفی از طریق کف محفظه اعمال می‌کنیم.

مرحله به‌خاطرآوری ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش انجام می‌شود. در این مرحله مدت تأخیر ثبت می‌شود و اگر موش در طی ۱۰۰ ثانیه وارد محفظه تاریک نشود [۲۱، ۲۰] یعنی موش یاد گرفته است که در ناحیه تاریک شوک دریافت کرده است و وارد ناحیه تاریک نمی‌شود.

با توجه به اثرات مخربی که استرس مزمن تکرارشونده روی شکل‌گیری و برقراری حافظه و یادگیری دارد و در مقابل اثرات محافظتی ویتامین D بروی سیستم عصبی، هدف این مطالعه بررسی امکان پیشگیری یا متعادل‌سازی و تقلیل اثرات استرس بروی اعمال شناختی چون حافظه و یادگیری می‌باشد. در این مطالعه از مدل استرس محدودکننده برای القاء استرس مزمن و ایجاد اختلال در فرایند حافظه استفاده شد و سپس نقش ویتامین D در متعادل‌سازی این سیستم بررسی گردید.

با توجه به اثرات مخربی که استرس مزمن تکرارشونده روی شکل‌گیری و برقراری حافظه و یادگیری دارد و در مقابل اثرات محافظتی ویتامین D بروی سیستم عصبی، هدف این مطالعه بررسی امکان پیشگیری یا متعادل‌سازی و تقلیل اثرات استرس بروی اعمال شناختی چون حافظه و یادگیری می‌باشد. در این مطالعه از مدل استرس محدودکننده برای القاء استرس مزمن و ایجاد اختلال در فرایند حافظه استفاده شد و سپس نقش ویتامین D در متعادل‌سازی این سیستم بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات و داروها

در این مطالعه تجربی از ۷۸ موش نر بزرگ آزمایشگاهی با وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم از نژاد Wistar استفاده شد. حیوانات در قفس‌های ۳ تایی و در یک اتاق با درجه حرارت ثابت (۲۲±۲) و با شرایط مناسب از نظر نور و صدا نگهداری می‌شدند و آب و غذای کافی در اختیار داشتند. کلیه آزمایشات بین ساعت ۹ صبح تا ۱ بعد از ظهر انجام می‌شد.

استرس محدودکننده Restraint stress

مدل استرس مزمن محدودکننده حرکتی برای گروه مداخله به کار برده شد. حیوانات گروه استرس به مدت ۲۸ روز هر روز ۳ ساعت در Restraint بدون آب و غذا قرار گرفتند. در این مدت ۴ هفته، هر هفته ۲ بار موش‌ها دارو (حلال ویتامین D و ویتامین D در دو دوز ۵ و ۱۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند [۱۹].

سنجش سطح کورتیکو استرون پلاسمایی

پس از بی‌هوش کردن سطحی حیوانات با اتر، نمونه خون با بریدن نوک دم حیوان جمع‌آوری شد. برای سنجش سطح کورتیکواسترون، از کیت ELISA برای کورتیکواسترون موش

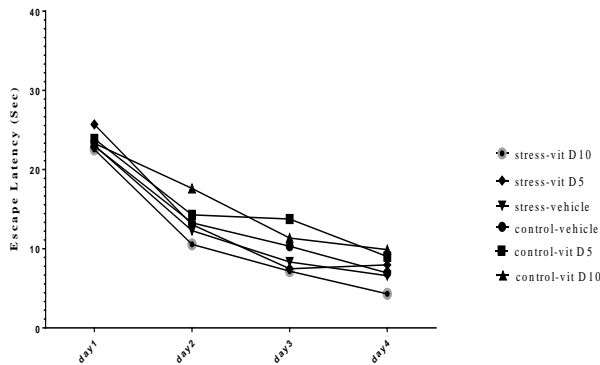
بررسی‌های آماری
آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Prism (version 6.00) و SPSS (version 16.0) انجام شد. برای آنالیز داده‌ها در چهار روز تعلیم ماز آبی از آزمون ANOVA سه طرفه repeated measure و برای آنالیز سایر داده‌ها و رسم نمودارها از ANOVA دو طرفه استفاده شد. برای آنالیز داده‌های حاصل از آزمون احترازی غیر فعال از ANOVA یک‌طرفه استفاده گردید. مبنی معنی‌دار بودن آنالیز $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر استرس مزمن محدودکننده بر سطح کورتیکواسترون

پلاسمایی

این مطالعه نشان داد که استرس محدودکننده مزمن توانست سطح کورتیکواسترون پلاسمایی را به صورت معنی‌داری نسبت به موش‌هایی که در معرض استرس قرار نگرفته بودند (کنترل) افزایش دهد ($P < 0.001$) ویتامین D با غلظت ($1.0 \mu\text{g/kg}$) توانست سطح کورتیکواسترون را در گروه استرس نسبت به موش‌هایی که حلال ویتامین D را دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری کاهش دهد ($P < 0.05$) (شکل ۱).



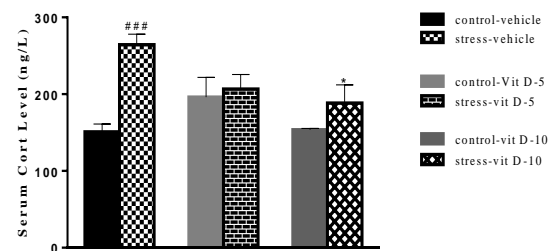
شکل ۲. این شکل نشان دهنده زمان رسیدن به سکو (Latency) و اثر معنی‌دار روزهای آموزش ($P=0.001$) و فاکتور استرس ($P=0.025$) می باشد.

ب- فاصله و سرعت رسیدن به سکو (Distance and

velocity)

الگوی مسافت شنا کردن در طی فاز اکتساب یادگیری مشابه با الگوی میزان تاخیر در رسیدن به سکوی مخفی بود. نتایج به دست آمده از مقایسه درون گروهی با اندازه‌گیری تکراری حاکی از این است که همه گروه‌ها با پیشرفت روزهای آموزش، مسافت کمتری را جهت رسیدن به سکو طی نمودند ($P < 0.0001$). اما آنالیز واریانس سه طرفه و آزمون تعقیبی توکی در مقایسه بین گروه‌ها در عامل استرس $P = 0.106$. $F(3, 192) = 132/0.74$ تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد و مقایسه گروه‌های درمان تفاوت در حدود معنی‌دار است $P = 0.642$. $F(2, 64) = 0.477$ سرعت شنا کردن همه گروه‌ها با پیشرفت روزهای آموزش نیز افزایش یافت $P = 0.0001$. اما آنالیز واریانس سه طرفه در مقایسه بین گروه‌های استرس $P = 0.106$. $F(3, 192) = 132/0.74$ و درمان $P = 0.642$. $F(2, 64) = 0.477$ تفاوت معنی‌دار نشان نداد.

احتمالاً کاسته شدن از مسافت طی شده و تسریع حرکت موش‌ها برای رسیدن به سکو طی ۴ روز یادگیری ناشی از تسهیل در تکرار برای همه گروه‌ها بوده است (شکل ۳ و ۴).



شکل ۱. سطح سرمی کورتیکواسترون در گروه‌های آزمایشی مقایسه گروه استرس-ویکل نسبت به گروه کنترل-وهیکل اثر معنی‌داری نشان داد ($###P < 0.0001$). مقایسه گروه استرس-ویتامین D ۱۰ نسبت به گروه استرس-وهیکل اثر معنی‌داری نشان داد ($*P < 0.05$).

اثر استرس مزمن محدودکننده بر یادگیری فضایی در ماز

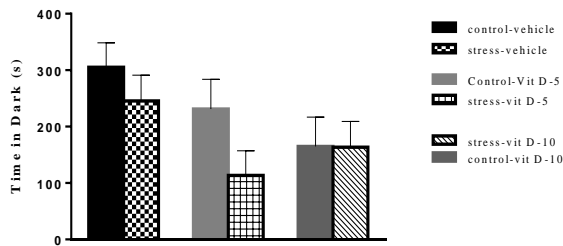
آبی موریس

دوره آموزش Training

الف- زمان رسیدن به سکو (Latency)

آنالیز واریانس سه طرفه با اندازه‌گیری تکراری (روزهای آموزش×درمان×استرس) نشان داد که کلیه گروه‌ها (استرس و کنترل) محل سکو را طی ۴ روز متوالی آموزش یاد گرفتند که این یادگیری با کاهش مدت زمان رسیدن به سکو در طول روزهای آموزش همراه بود $P = 0.0001$. $F(3, 192) = 133/0.81$ همچنین این آزمون نشان داد که موش‌های دریافت‌کننده استرس در مجموع سریع‌تر از موش‌های کنترل محل سکو را می‌یافتند

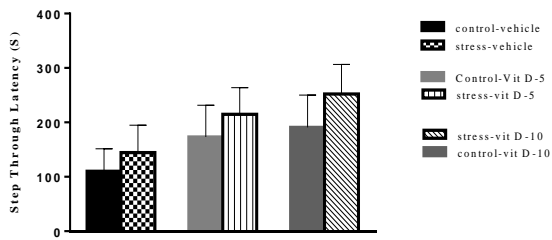
دریافت‌کننده ویتامین نشان می‌دهد $P=0/047$
 $F(2/149)=3/149$ (شکل ۹).



شکل ۹: این شکل نشان دهنده زمان گذرانده شده در ناحیه تاریک در آزمون احترازی غیر فعال است. علی‌رغم اینکه نمودار نشان دهنده یک روند کاهشی وابسته به میزان دریافت ویتامین D در مدت زمان سپری شده در تاریکی است، ولی اختلاف معنی داری را بین گروه‌ها نشان نمی‌دهد.

اولین زمان ورود به محفظه تاریک (Step through latency)

مقایسه گروه‌ها $P=0/278$, $F(1/88)=1/143$ و درمان $P=0/176$, $F(2/88)=1/769$ اثر معنی داری نشان نداد (شکل ۱۰).

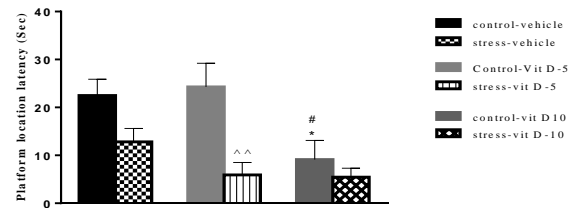


شکل ۱۰: این شکل نشان دهنده اولین زمان ورود به محفظه تاریک در آزمون احترازی غیر فعال است. نمودار نشان دهنده یک روند افزایشی وابسته به میزان دریافت ویتامین D در مدت زمان سپری شده در اولین زمان ورود به محفظه تاریک است، ولی اختلاف معنی داری را بین گروه‌ها وجود نداشته است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه از استرس مزمن محدودکننده استفاده شد، به این صورت که ۲۸ روز حیوان در Restraint به مدت ۳ ساعت قرار می‌گرفت. نتایج نشان داد که استرس توانست سطح پلاسمایی کورتیکوسترون را به طور معنی داری افزایش دهد. این نتیجه مطابق نتایج مطالعات گذشته است که بنا به گزارش استرس مزمن سطح پلاسمایی کورتیکوسترون را افزایش داده بود. در همین رابطه Kondam و همکاران اثرات استرس محدودکننده بی‌حرکتی را بر شاخص‌های رفتاری-عصبی موش‌ها بررسی کردند. در این مطالعه حیوانات را ۲۱ روز به مدت ۶ ساعت در restraint قرار می‌گرفتند. آن‌ها نتیجه گرفتند که استرس بی‌حرکتی در موش‌ها از طریق مکانیسم‌های التهابی در مغز و در نتیجه تغییرات رفتاری-عصبی، موجب تغییر رفتار حیوانات می‌شود. پاسخ فیزیولوژیکی به استرس شامل فعال شدن محور HPA و انتشار

آنالیز واریانس دو طرفه هیچ اثر معنی داری در مقایسه گروه‌ها یا اثر دارویی در هیچ کدام از فاکتورهای مجاورت با سکو، زمان سپری شده در ناحیه هدف یا سرعت شنا نشان نداد.

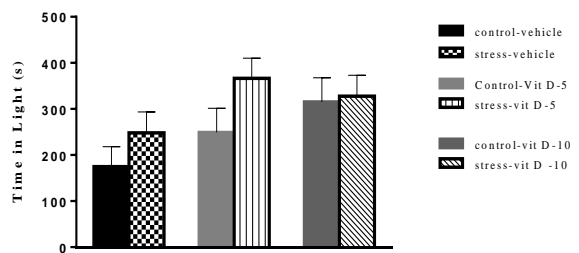


شکل ۷: این شکل نشان دهنده زمان رسیدن به محل سکو در طی تست پروب (Latency) در خصوص حافظه کاری کوتاه مدت است. مقایسه گروه کنترل- ویتامین D ۱۰ نسبت به گروه کنترل- و هیپکل اثر معنی داری نشان داد ($P<0.05$). مقایسه گروه کنترل- ویتامین D ۱۰ نسبت به گروه کنترل- ویتامین D ۵ اثر معنی داری نشان داد ($P<0.05$). مقایسه گروه استرس- ویتامین D ۵ نسبت به گروه کنترل- ویتامین D ۵ اثر معنی داری نشان داد ($P<0.001$). ویتامین D ۵ اثر معنی داری نشان داد ($P<0.001$).

اثر استرس بر حافظه و یادگیری در طی آزمون احترازی غیر فعال (Passive-Avoidance)

زمان گذرانده شده در ناحیه روشن (Time spent in Light)

مقایسه گروه کنترل و استرس تفاوت معنی داری را نشان نداد $F(1/88)=3/114$, $P=0/081$ در مقایسه گروه درمانی تفاوت معنی داری نشان داده شد $F(2/88)=3/367$, $P=0/039$ به نظر می‌رسد گروه درمانی استرس + ویتامین D ($5\mu\text{g}/\text{kg}$) نسبت به سایر گروه‌ها مدت بیشتری در ناحیه روشن مانده بوده است (شکل ۸).



شکل ۸: این شکل نشان دهنده زمان گذرانده شده در ناحیه روشن در آزمون احترازی غیر فعال است. علی‌رغم اینکه نمودار نشان دهنده یک روند افزایشی وابسته به میزان دریافت ویتامین D در مدت زمان سپری شده در روشنایی است، ولی اختلاف معنی داری را بین گروه‌ها نشان نمی‌دهد.

زمان گذرانده شده در ناحیه تاریک (Time spent in Dark)

مقایسه گروه کنترل و استرس تفاوت معنی داری را نشان نداد $F(1/88)=2/768$, $P=0/099$ در حالی که مقایسه گروه درمانی کاهش قابل ملاحظه ماندگاری در تاریکی را برای گروه‌های

کورتیکوسترون است که تولید رادیکال‌های آزاد را سرعت می‌بخشد [۲۲]. تجارب استرس‌زا با فعال کردن محور HPA موجب افزایش گلوکوکورتیکوئیدها و افزایش کاتکول آمین‌ها می‌شود. نکته جالب توجه در این مطالعه این بود که مدل استرس محدودکننده در این مطالعه ۳ ساعت در روز به مدت ۲۸ روز بود که با مدل‌های معمول استرس محدودکننده که ۶ ساعت در روز به مدت ۲۱ روز است، متفاوت بود ولی نتایج تاثیرگذاری بر سطح کورتیکواسترون مشابه گزارشات مبتنی بر مطالعات پیشین بوده است. استرس با تاثیر بر ناحیه اطراف بطنی هیپوتالاموس (Paraventricular nucleus of hypothalamus, PVN) افزایش بیان ژن و پروتئین هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (CRH) موجب فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال شده و باعث افزایش آزادی کورتیکواسترون از غده آدرنال می‌گردد [۲۳]. دلیل تاثیر کاهنده ویتامین D بر سطح کورتیکواسترون چندان روشن نیست، ولی این اثر به احتمال زیاد توسط گیرنده‌های آن در ناحیه هیپوتالاموس اعمال می‌گردد [۲۴].

در ماز آبی موریس تفاوت معنی‌داری در یادگیری فضایی بین گروه‌های استرس، کنترل و دریافت یا عدم دریافت‌کننده ویتامین D مشاهده نشد. به طور کلی به نظر می‌رسد که در این مطالعه در روزهای آموزش فاکتورهای ذکر شده تاثیری بر مدت یافتن سکو توسط موش نداشته است، اما در این رابطه در سال ۲۰۰۴ Abidin و همکارانش با مطالعه بر روی استرس محدودکننده حرکتی از ۲ مدل استرس استفاده کردند: گروه اول روزی ۱ ساعت استرس و به مدت ۲۱ روز دریافت کردند ولی گروه دوم ۱ ساعت در روز استرس را به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. پس از انجام آزمایش ماز آبی و مقایسه این دو گروه با گروه کنترل مشاهده کردند که موش‌های دریافت‌کننده استرس مدت زمان بیشتری را سپری می‌کنند تا سکو را پیدا کنند [۲۵].

همچنین در سال ۲۰۰۳ Sandi و همکاران با اعمال استرس ۶ ساعت در روز به مدت ۲۱ روز اعلام کردند که موش‌های گروه استرس در مقایسه با گروه کنترل مدت زمان بیشتری شنا کردند تا سکو پنهان را بیابند [۴]. تفاوت در نتیجه این مطالعه با مطالعه ما شاید به علت متفاوت بودن شرایط محیطی یا مدل به‌کارگیری استرس بوده باشد. بررسی نتایج در این مطالعه نشان می‌دهد که استرس تا حدودی روند یادگیری فضایی را تسریع کرده است و اگرچه ویتامین D اثر افزایشی بر آن داشته ولی قابل ملاحظه نبوده است. بعضی مطالعات گذشته اشاره به اثر مثبت استرس ملایم بر پیشرفت یادگیری در حیوانات جوان و مسن داشته‌اند [۲۶]. استرس ملایم در صورتی که جنبه تحریکی داشته باشد (موجب ایجاد ترس یا تهدید و تحریک منفی نشود)، می‌تواند موجب تسهیل در یادگیری و ایجاد حافظه شود. مکانیسم‌های مختلفی برای این اثر بیان شده است مثل اشغال متوسط گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی (در مقابل اشغال وسیع آن‌ها هنگام استرس شدید) زمانی که رهایش یا میزان ورود GC اندکی بیش از مقدار پایه یا فیزیولوژیک آن باشد، که مجموعاً به اثر "U" شکل معروف است [۲۷]. در مورد استرس ملایم همچنین بیان شده است که استرس ملایم مزمن که به صورت روزانه تکرار شده باشد می‌تواند موجب تسهیل در ایجاد یادگیری و ایجاد حافظه شود. اجرای ۵ دقیقه استرس محدودکننده به مدت ۲۸ روز توانسته بود تا عملکرد موش بزرگ آزمایشگاهی را در Elevated plus maze و آزمون شنای اجباری بهبود بخشد [۲۸]. همچنین نتایج مطالعاتی بر روی اثر استرس ملایم به صورت محدودیت حیوان به مدت ۷ یا ۱۳ روز بر روی آزمون حافظه T-maze نشان‌دهنده اعمال بهبود عملکرد یا نبود تاثیر استرس بر عملکرد حیوان بوده است. در کل، نوع، شدت، مدت و نوع نژاد حیوان از عوامل موثر در پاسخ حیوان در آزمون‌های شناختی نسبت به استرس مزمن می‌باشند. برای مثال بعضی مطالعات نشان داده‌اند اگرچه آزمون ماز آبی موریس در بسیاری از مطالعات اختلال در یادگیری و حافظه را بر اثر استرس مزمن، مثل استرس محدودکننده ۶ ساعت در روز به مدت ۲۱ روز، را گزارش کرده‌اند، ولی در مقابل مطالعاتی بوده‌اند که تسهیل یادگیری را توسط همان آزمون برای همان نوع استرس ذکر کرده‌اند. بنابراین، گفته می‌شود که نتایج آزمون ماز آبی موریس برای ارزیابی حافظه فضایی در ارتباط با استرس مزمن تا حدودی نامشخص و مورد تردید است [۲۹].

اگرچه انجام این مطالعه از نظر شرایط آزمایشی و هدف کار با بعضی از مطالعات پیشین متفاوت است، ولی ایجاد تسهیل در فرایند اکتساب و یادگیری توسط مدل استرس ۳ ساعت استرس محدودکننده / ۲۸ روز، در این مطالعه، احتمالاً از مکانیسم‌های مشابه‌ای پیروی کرده است که در مورد اثرات استرس مزمن ملایم در بالا بیان گردید: به این صورت که تسهیل پاسخ در آزمون ماز آبی موریس (اگرچه از نظر آماری معنی‌دار نبوده است) و عدم تفاوت در پاسخ در آزمون احترازی غیر فعال توسط حیوانات گروه استرس نسبت به کنترل، احتمالاً می‌تواند به دلیل مکانیسم‌های مربوط به اثرات استرس مزمن ملایم بر یادگیری و حافظه فضایی و شرطی باشد.

بعضی از مطالعات گذشته مانند مقاله تقی‌زاده و همکاران، اشاره به نقش پررنگ ویتامین D در ایجاد حافظه فضایی دارند [۳۰]. در این مطالعه، ویتامین D تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر حافظه بلندمدت فضایی نداشت ولی در مقابل تاثیر ویژه ویتامین D بر تثبیت حافظه کاری (کوتاه‌مدت) نشان داد که غلظت پایین ویتامین موجب کاهش زمان رسیدن به سکو شد که این اثر با افزایش

کورتیکوسترون است که تولید رادیکال‌های آزاد را سرعت می‌بخشد [۲۲]. تجارب استرس‌زا با فعال کردن محور HPA موجب افزایش گلوکوکورتیکوئیدها و افزایش کاتکول آمین‌ها می‌شود. نکته جالب توجه در این مطالعه این بود که مدل استرس محدودکننده در این مطالعه ۳ ساعت در روز به مدت ۲۸ روز بود که با مدل‌های معمول استرس محدودکننده که ۶ ساعت در روز به مدت ۲۱ روز است، متفاوت بود ولی نتایج تاثیرگذاری بر سطح کورتیکواسترون مشابه گزارشات مبتنی بر مطالعات پیشین بوده است. استرس با تاثیر بر ناحیه اطراف بطنی هیپوتالاموس (Paraventricular nucleus of hypothalamus, PVN) افزایش بیان ژن و پروتئین هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (CRH) موجب فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال شده و باعث افزایش آزادی کورتیکواسترون از غده آدرنال می‌گردد [۲۳]. دلیل تاثیر کاهنده ویتامین D بر سطح کورتیکواسترون چندان روشن نیست، ولی این اثر به احتمال زیاد توسط گیرنده‌های آن در ناحیه هیپوتالاموس اعمال می‌گردد [۲۴].

در ماز آبی موریس تفاوت معنی‌داری در یادگیری فضایی بین گروه‌های استرس، کنترل و دریافت یا عدم دریافت‌کننده ویتامین D مشاهده نشد. به طور کلی به نظر می‌رسد که در این مطالعه در روزهای آموزش فاکتورهای ذکر شده تاثیری بر مدت یافتن سکو توسط موش نداشته است، اما در این رابطه در سال ۲۰۰۴ Abidin و همکارانش با مطالعه بر روی استرس محدودکننده حرکتی از ۲ مدل استرس استفاده کردند: گروه اول روزی ۱ ساعت استرس و به مدت ۲۱ روز دریافت کردند ولی گروه دوم ۱ ساعت در روز استرس را به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. پس از انجام آزمایش ماز آبی و مقایسه این دو گروه با گروه کنترل مشاهده کردند که موش‌های دریافت‌کننده استرس مدت زمان بیشتری را سپری می‌کنند تا سکو را پیدا کنند [۲۵].

همچنین در سال ۲۰۰۳ Sandi و همکاران با اعمال استرس ۶ ساعت در روز به مدت ۲۱ روز اعلام کردند که موش‌های گروه استرس در مقایسه با گروه کنترل مدت زمان بیشتری شنا کردند تا سکو پنهان را بیابند [۴]. تفاوت در نتیجه این مطالعه با مطالعه ما شاید به علت متفاوت بودن شرایط محیطی یا مدل به‌کارگیری استرس بوده باشد. بررسی نتایج در این مطالعه نشان می‌دهد که استرس تا حدودی روند یادگیری فضایی را تسریع کرده است و اگرچه ویتامین D اثر افزایشی بر آن داشته ولی قابل ملاحظه نبوده است. بعضی مطالعات گذشته اشاره به اثر مثبت استرس ملایم بر پیشرفت یادگیری در حیوانات جوان و مسن داشته‌اند [۲۶]. استرس ملایم در صورتی که جنبه تحریکی داشته باشد (موجب ایجاد ترس یا تهدید و تحریک منفی نشود)، می‌تواند

اثر خاص گروه استرس نبود. همچنین ویتامین D توانست باعث کاهش سطح کورتیکواسترون خون در گروه استرس گردد. به نظر می‌رسد ویتامین D بتواند موجب کنترل نشانه‌های رفتاری استرس مزمن از طریق مداخله با سیستم HPA گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از منبع حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی سمنان مربوط به طرح پایان نامه دانشجویی به شماره A-10-335-3-2017 نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

منابع

- [1] Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res* 2005; 156: 105-114.
- [2] Nowacka M, Obuchowicz E. BDNF and VEGF in the pathogenesis of stress-induced affective diseases: an insight from experimental studies. *Pharmacol Rep* 2013; 65: 535-546.
- [3] Radahmadi M, Hosseini N, Nasimi A. Effect of chronic stress on short and long-term plasticity in dentate gyrus; study of recovery and adaptation. *Neuroscience* 2014; 280: 121-129. (Persian).
- [4] Sandi C, Davies HA, Cordero MI, Rodriguez JJ, Popov VI, Stewart MG. Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2447-2456.
- [5] Najjar M, Hassan Vaezi G, Rashidy-Pour A, Vafaei AA. Effects of glucocorticoids on memory retrieval and reconsolidation of recent and remote memories in mice. *Koomesh* 2013; 14: 512-520. (Persian).
- [6] Radahmadi M, Alaei H, Sharifi MR, Hosseini N. Effects of different timing of stress on corticosterone, BDNF and memory in male rats. *Physiol Behav* 2015; 139: 459-467. (Persian).
- [7] Pluchino N, Russo M, Santoro AN, Litta P, Cela V, Genazzani AR. Steroid hormones and BDNF. *Neuroscience* 2013; 239: 271-279.
- [8] Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 100-105.
- [9] Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001; 21: 98-108.
- [10] Ibi M, Sawada H, Nakanishi M, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, et al. Protective effects of 1 alpha,25-(OH) (2) D (3) against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. *Neuropharmacology* 2001; 40: 761-771.
- [11] Wion D, MacGrogan D, Neveu I, Jehan F, Houlgatte R, Brachet P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent inducer of nerve growth factor synthesis. *J Neurosci Res* 1991; 28: 110-114.
- [12] Naveilhan P, Neveu I, Wion D, Brachet P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroreport* 1996; 7: 2171-2175.
- [13] Garcion E, Sindji L, Montero-Menei C, Andre C, Brachet P, Darcy F. Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Glia* 1998; 22: 282-294.
- [14] Przybelski RJ, Binkley NC. Is vitamin D important for preserving cognition? A positive correlation of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with cognitive function. *Arch Biochem Biophys* 2007; 460: 202-205.
- [15] Maddock J, Geoffroy MC, Power C, Hypponen E. 25-Hydroxyvitamin D and cognitive performance in mid-life. *Br J Nutr* 2014; 111: 904-914.
- [16] Annweiler C. Vitamin D in dementia prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2016; 1367: 57-63.
- [17] McCann JC, Ames BN. Is there convincing biological or behavioral evidence linking vitamin D deficiency to brain dysfunction? *FASEB J* 2008; 22: 982-1001.

غلظت هم‌چنان باقی ماند. با وجود کاهش این زمان در گروه استرس دریافت‌کننده ویتامین با ویکل، ولی این تفاوت زمانی معنی‌دار نبوده است. همچنین اثر ویتامین D منحصر به گروه استرس نبوده و در گروه کنترل نیز موجب کاهش زمان تاخیر رسیدن به سکو شده بوده است. اثر ویژه ویتامین D بر حافظه کوتاه‌مدت در راستای گزارش مشابه در یک مطالعه بر روی یادگیری و حافظه موش‌های مسن و نقش ویتامین D بر بهبود عملکرد یادگیری آن‌ها بوده است [۲۲]. در آن مطالعه نیز در آزمون ماز آبی موریس اثر ویتامین بر روی حافظه فضایی بلندمدت چندان واضح نبوده ولی تاثیر مثبت قابل ملاحظه‌ای بر روی حافظه کاری اعمال کرده بوده است.

آزمون شرطی شدن احترازی غیر فعال در این مطالعه نشان داد که استرس محدودکننده توانسته است تاثیر قابل ملاحظه‌ای در شرطی شدن یادگیری حیوانات بگذارد ولی دریافت ویتامین D موجب افزایش یادگیری ترس از دریافت شوک الکتریکی در ناحیه تاریک شده است. بنابراین به نظر می‌رسد ویتامین D به طور مستقل از تغییرات حاصل از استرس، حافظه شرطی را بهبود بخشیده است. در مطالعه‌ای بر روی موش‌هایی که با اختلال محدودیت رشد داخل رحمی (FGR) روبرو بودند متوجه شدند که ویتامین D توانست موجب بهبود عملکرد حیوانات در آزمون‌های ماز آبی موریس و به‌ویژه آزمون احترازی غیر فعال بشود به‌گونه‌ای که موش‌های دریافت‌کننده ویتامین تعداد کم‌تری شوک الکتریکی در ناحیه تاریک نسبت به موش‌های درمان‌نشده دریافت کردند (زمان ماندگاری در تاریکی آن‌ها کاهش یافته بوده است) [۳۱].

علاوه بر موارد بحث شده در بالا در مورد تفاوت بین نتایج حاصله از این مطالعه با مطالعات مشابه پیشین، هم‌چنین می‌توان به مشکلاتی اشاره کرد که در کار با حیوانات و استفاده از امکانات موجود می‌توانسته رخ دهد. این مدل استرس با ساعات روزانه کم‌تر و دوره طولانی‌تر نسبت به کارهای گذشته، برای بار نخست در این آزمایشگاه انجام شده است و با وجود افزایش سطح خونی کورتیکواسترون، اثرات رفتاری قابل ملاحظه‌ای ایجاد نکرد. مطالعات در سطح سلولی و سنجش پروتئین فاکتورهای مثل نوروتروفین مغزی BDNF تا حدود وسیع‌تری خواهند توانست اثرات این مدل استرس مزمن و ویتامین D را بر عملکرد هیپوکمپ نشان دهد.

مدل استرس محدودکننده در این مطالعه سبب افزایش سطح کورتیکواسترون خون شد در حالی که در سطح رفتاری سبب شد حیوان در آزمون تست فضایی انجام شده یادگیری بهتری نسبت به گروه کنترل نشان دهد. در سطح رفتاری استفاده از ویتامین D با غلظت بالا موجب افزایش میزان یادگیری گردید که البته این

- [25] Abidin I, Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Aydin S, Ozturk O, Sahin E. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int J Neurosci* 2004; 114: 683-699.
- [26] Adlard PA, Engesser-Cesar C, Cotman CW. Mild stress facilitates learning and exercise improves retention in aged mice. *Exp Gerontol* 2011; 46: 53-59.
- [27] Sapolsky RM. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res* 2003; 28: 1735-1742.
- [28] Parihar VK, Hattiangady B, Kuruba R, Shuai B, Shetty AK. Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. *Mol Psychiatry* 2011; 16: 171-183.
- [29] Conrad CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34: 742-755.
- [30] Taghizadeh M, Talaei SA, Salami M. Vitamin D deficiency impairs spatial learning in adult rats. *Iran Biomed J* 2013; 17: 42-48.
- [31] Zong L, Chu P, Huang P, Guo Y, Lv Y. Effect of vitamin D on the learning and memory ability of FGR rat and NMDA receptor expression in hippocampus. *Exp Ther Med* 2017; 14: 581-586.
- [18] Latimer CS, Brewer LD, Searcy JL, Chen KC, Popovic J, Kraner SD, et al. Vitamin D prevents cognitive decline and enhances hippocampal synaptic function in aging rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E4359-4366.
- [19] Sedaghat K, Yousefian Z, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Parsaei H, Khaleghian A, Choobdar S. Mesolimbic dopamine system and its modulation by vitamin D in a chronic mild stress model of depression in the rat. *Behav Brain Res* 2019; 356: 156-169. (Persian).
- [20] Shiga T, Nakamura TJ, Komine C, Goto Y, Mizoguchi Y, Yoshida M, et al. A single neonatal injection of ethinyl estradiol impairs passive avoidance learning and reduces expression of estrogen receptor alpha in the hippocampus and cortex of adult female rats. *PLoS One* 2016; 11: e0146136.
- [21] Dehbashi F, Alizadeh N, Rashidy-Pour A, Vafaei AA. Effects of acute stress and corticosterone on fear memory extinction in mice. *Koomesh* 2012; 13: 375-381. (Persian).
- [22] Kondam A, Gajalakshmi G, Chandrashekar M. Effect of subacute restraint stress on mice in various neurobehavioral parameters. *Indian J Basic Appl Med Res* 2013; 859-864.
- [23] Herman JP, Tasker JG. Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Front Endoc (Lausanne)* 2016; 7: 137.
- [24] Bertone-Johnson ER. Vitamin D and the occurrence of depression: causal association or circumstantial evidence? *Nutr Rev* 2009; 67: 481-492.

Protective role of vitamin-D on chronic stress induced-learning and memory deficits in rats

Sara Choobdar (M.Sc), Abbas-Ali Vafaei (Ph.D), Ali Rashidy-Pour (Ph.D), Katayoun Sedaghat (Ph.D)*
Research Center of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

* Corresponding author. +98 9109088967 Katsedaghat@gmail.com

Received: 13 Oct 2018; Accepted: 30 Apr 2019

Introduction: Long-term stress disturbs HPA axis and increases glucocorticoids release, which disturbs neural plasticity in the hippocampus and may lead to learning and memory deficits. Noticeably, vitamin D plays a protective role in the nervous system and has receptors in the hippocampus. This behavioral study investigates the possible protective role of vitamin-D against the negative effects of chronic stress on learning and memory.

Materials and Methods: All the Rats were randomly divided to two groups; stress and control groups (each had 3 subgroups). Stress-group animals were exposed to restraint stress for 28 days, 3 hours/day. During 28 days, vitamin D (5 or 10 mg/kg), or vehicle was injected (IP) twice weekly to both groups. At day 29, blood sample collected for serum corticosterone assay. Morris water maze (MWM) test was performed in the order of 4 days training, one-day probe testing and finally working memory test. Passive avoidance test was performed after MWM.

Results: Stress group revealed higher levels of serum corticosterone ($P < 0.0001$) relative to controls. In MWM test, all groups learned the location of the platform during training. Latency in reaching the platform was reduced by the training days ($P = 0.0001$) for all the groups. Probe test indicated that stress groups reached the platform sooner than the control groups. Higher dose of vitamin D reduced this latency ($P = 0.0002$). Conversely, in passive avoidance test, stress groups spent less time in the dark than the control group ($P = 0.0997$). Vitamin D (10 $\mu\text{g} / \text{kg}$) did not change the results.

Conclusion: In this study, chronic restraint stress increased blood corticosterone levels and changed the behavioral effects of long and short term spatial and conditional memory. Treatment with vitamin D improved spatial learning.

Keywords: Chronic Limiting Stress, Hippocampus, Memory, Learning, Vitamin D, Corticosterone, Morris Water Maze, Passive-avoidance Test.