

مقایسه استرس ملایم با استرس صدا بر حافظه و یادگیری در دوران نخست پس از تولد در موش های صحرایی نر

رضا قلم قاشی (PhD)*^۱، حسین ذاکر ممدوف (PhD)^۲، حسن عشایری (MD)^۲، زهره بهرامی (MSc)^۱

۱- انجمن توانبخشی قلب، عروق و ریه ایران

۲- گروه فیزیولوژی دانشگاه آذربایجان

۳- گروه مغز و اعصاب دانشکده توانبخشی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

دریافت: ۸۸/۴/۳۰، اصلاح: ۸۸/۷/۸، پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: محرک های استرس زای مختلف، اثرات متفاوتی بر حافظه و یادگیری دارند. با پیشرفت تکنولوژی انسان ها در معرض عوامل استرس زای گوناگونی قرار دارند. لذا این مطالعه به منظور مقایسه اثرات اعمال استرس ملایم همراه با استرس صدا بر حافظه و یادگیری در موشهای صحرایی با تست اجتنابی غیرفعال انجام شد. **مواد و روشها:** در این مطالعه از ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد وسیتار ۲۲ روزه به وزن تقریبی ۵۵ گرم استفاده شد. رتهای نر به چهار گروه شش تایی تقسیم شدند، گروه (I+H) تحت استرس تزریق زیرجلدی سدیم کلراید ۰/۹٪ با استرس هندلینگ، گروه (I+N) تحت استرس تزریق زیر جلدی سدیم کلراید ۰/۹٪ با هندلینگ به علاوه استرس صدا، گروه (N) تحت استرس صدا قرار گرفته و گروه کنترل (C) تحت هیچ استرس قرار گرفت. موشهای سه گروه اول روزانه به مدت ۴ هفته تحت استرس قرار داشتند. در پایان موشها تحت تست احترازی غیر فعال قرار گرفته و باهم مقایسه شدند. **یافته ها:** زمان تاخیر حیوانات در ورود به محفظه تاریک به طور معناداری در گروه (I+H) در مقایسه با گروه های (I+N) و (N) افزایش یافت ($p=0/001$)، اما استفاده از استرس صدا همراه با استرس تزریق - هندلینگ به طور معناداری سبب کاهش حافظه و یادگیری در گروه (I+N) در مقایسه با سه گروه دیگر شد ($p=0/01$). **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که استرس ملایم همراه با استرس صدا سبب کاهش یادگیری و حافظه در دوران نخست پس از تولد در موشهای صحرایی نر میشود.

واژه های کلیدی: دوران اولیه پس از تولد، یادگیری و حافظه، اجتنابی غیرفعال، موش، دستکاری + تزریق.

مقدمه

اثر استرس مزمن بر عملکرد یادگیری و حافظه، از بحث های مهم در علوم اعصاب است. محرک های استرس زای مختلف، اثرات متفاوتی بر یادگیری و حافظه دارند (۱). مطالعات انسانی و حیوانی، یافته های متنوعی را گزارش کرده اند که شامل افزایش حافظه، اختلال در آن و نداشتن تاثیر بر آن می باشد (۲) با پیشرفت چشمگیر در تکنولوژی، انسان ها در معرض انواع گوناگونی از عوامل استرس زا قرار دارند و بسیاری از مطالعات نشان داده اند که استرس مزمن برای سلامتی خطرناک بوده و با اثر بر عملکردهای شناختی مغز، منجر به اختلال در یادگیری و حافظه می شود (۳). مشکلات محیط اولیه پس از تولد، استعداد بروز اختلالات روانی نظیر اختلال استرس پس از صدمه (PTSD)، اعتیاد و افسردگی را در آینده ممکن می سازد. موش صحرایی، مدل حیوانی مناسبی برای مطالعه

اختلالات روانی دوران اولیه حیات می باشد (۴و۵). هندلینگ (منظور استرس اعمال شده به صورت گرفتن حیوان در دست می باشد) دوران نوزادی سبب کاهش اختلالات همراه با افزایش سن در مدل های مطالعه با ماز "تی" و ماز شعاعی می گردد (۶). تغییر در محیط اولیه پس از تولد سبب القای رفتار اضطراب در دوران بلوغ شده است (۷-۹). همچنین مطالعات نشان داده که وقوع رویدادهای استرس زا در دوران اولیه پس از تولد، سبب تغییرات روان شناختی در آینده می شود. علاوه بر این هندلینگ در سه هفته نخست پس از تولد سبب افزایش حافظه فضایی موشها می گردد. علاوه بر این، هندلینگ دوران اولیه پس از تولد، سبب کاهش در ترشح کورتیزول، در پاسخ به استرس و افزایش تعداد رستورهای هیپوکامپ در رتهای بالغ می شود (۱۰-۱۲). قرار گرفتن در معرض استرس، پس

* مسئول مقاله:

e-mail: rghalamghash@icra.ir

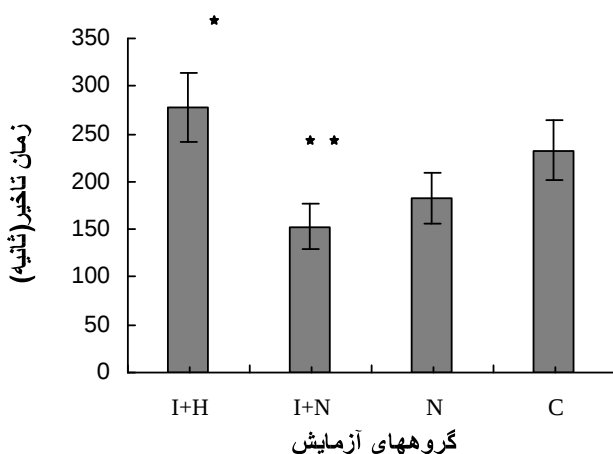
آدرس: تهران، خیابان فلسطین، خیابان صدیقی پلاک ۱۹، انجمن توانبخشی قلب، عروق و ریه ایران. تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۹۳۱۸

می شد. سپس در باز شده و حیوان از محفظه برداشته و به درون قفس انتقال داده می شد. تمرین سازگاری، یکبار دیگر، پس از ۳۰ دقیقه تکرار شد. بعد از بار دوم سازگاری، آموزش اجتنابی غیرفعال صورت گرفت. ابتدا موش در محفظه روشن قرار داده شد تا ۳۰ ثانیه این قسمت را تجربه کند و سپس در گیوتینی باز شده و حیوان، آزادانه، می توانست بین دو قسمت تاریک و روشن رفت و آمد کند. وقتی که حیوان وارد محفظه تاریک می شد، در گیوتینی بسته شده و ۳۰ ثانیه بعد یک شوک ۰/۴ میلی آمپری به مدت ۳ ثانیه به پای حیوان فرستاده می شد. ۳۰ ثانیه بعد موش برداشته شده و به قفس خود بازگردانده می شد. در روز انجام تست (۲۴ ساعت پس از آموزش)، موش را در قسمت روشن قرار داده و پس از ۵ ثانیه در گیوتینی باز شد. وقتی که حیوان وارد محفظه تاریک شد، در گیوتینی بسته و زمان تاخیر در ورود به محفظه تاریک ثبت شد. پس از آن موش به درون قفس خود باز گردانده شد. در این مرحله از هیچ شوک الکتریکی استفاده نشد.

سپس اطلاعات بدست آمده با استفاده از آزمونهای آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تی مستقل تجزیه و تحلیل شده و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج بدست آمده از آزمون اجتنابی غیرفعال نشان داد که حیوانات گروه (I+H)، افزایش معنی داری را در زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک نسبت به گروه های (I+N) و (N) داشتند ($P = 0.001$). زمان تاخیر در گروه (I+H)، 275 ± 26 ثانیه و در گروههای (I+N)، (N) به ترتیب 153 ± 24 ، 183 ± 27 ثانیه بود. میزان تاخیر ورود به محفظه تاریک در گروه (I+H) بیشتر از گروه (C) بود اما این اختلاف معنی دار نبود. همچنین گروه (I+N) که تحت استرس هندلینگ و تزریق به همراه استرس صدا بودند، کاهش معنی داری را در زمان ورود به محفظه تاریک نسبت به سه گروه دیگر نشان دادند ($P = 0.01$) (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه زمان تاخیر ورود به محفظه تاریک بین گروههای آزمایش با تست اجتنابی غیر فعال. تحت استرس تزریق زیرجلدی سدیم کلراید ۰/۹٪ با استرس هندلینگ (I+H)، استرس تزریق زیر جلدی سدیم کلراید ۰/۹٪ با هندلینگ بعلاوه استرس صدا (I+N)، استرس صدا (N) و گروه کنترل (C). $P = 0.001$ بین گروه (I+H) در مقایسه با گروههای (I+N) و (N). $P = 0.01$ بین (I+N) در مقایسه با گروههای (I+H)، (N) و (C).

از تولد می تواند باعث القای آسیب پذیری به اختلالات رفتاری در آینده شود. منشا بسیاری از بیماری های دوران بلوغ نظیر افسردگی، اضطراب و اختلال وسواس اجباری می تواند در دوران ابتدایی زندگی جستجو شود (۱۴ و ۱۳). مطالعات مختلف حاکی از این مطلب است که استرس در دوران قبل و پس از تولد می تواند توانایی های سازگاری را در دوران بلوغ تغییر دهد و همچنین هندلینگ دوران نوزادی از تغییرات نوراندوکراین و رفتاری که در نتیجه افزایش سن ایجاد می شوند، ممانعت می کند، همچنین هندلینگ دوران نوزادی، تأثیری بر حافظه فضایی در دوران بلوغ ندارد (۱۵). در بین فاکتورهای القا کننده استرس، صدا از عواملی است که بر رفتار و فیزیولوژی بدن تأثیرات زیادی می گذارد. اثرات اختلال صدا، به شدت، فرکانس، حساسیت فرد، سن و جنسیت بستگی دارد. صدا نه تنها بر سیستم عصبی فرد تأثیر می گذارد بلکه باعث اختلالات شناختی متعددی نیز می گردد. صدا از دیرباز برای انسان یک مشکل محیطی مهمی بود. در میان فاکتورهای شناختی، خواندن، توجه و تمرکز، حل مساله و حافظه به میزان زیادی تحت تأثیر صدا می باشند (۱۶). از آنجاییکه اثرات ترکیبی استرس صدا همراه با استرس ملایم تا به حال بررسی نشده است، در این مطالعه اثر همزمان استرس صدا با استرس ملایم (استرس هندلینگ - تزریق)، بر یادگیری و حافظه موشهای ویستار در دوران اولیه پس از تولد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

حیوانات و طراحی آزمایش: در این مطالعه از، ۲۴ سر موش

صحرائی نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۵۵ گرم که همگی ۲۲ روزه بوده و از انسیتو پاستور ایران خریداری شدند، استفاده گردید. موشها در شرایط دمایی ۲۴ درجه سانتیگراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه I+H تحت استرس تزریق با سدیم کلراید ۰/۹٪ و هندلینگ، گروه I+N تحت استرس تزریق با سدیم کلراید ۰/۹٪ و هندلینگ همراه با استرس صدا و گروه N تحت استرس صدا قرار گرفتند و به گروه کنترل (C) هیچ استرس وارد نشد. مدت مطالعه، ۴ هفته بود. حیوانات گروه (I+H) و (I+N)، را هر روز از قفس برداشته و به مدت ۱۵ دقیقه در دست نگه داشته می شدند و بعد از آن به قفس بازگردانده می شدند (استرس هندلینگ).

گروه های تحت استرس صدا (N) و (I+N)، روزانه به مدت ۳ دقیقه در معرض صوت با شدت ۱۰۰۰ دسی بل و فرکانس ۳۵۰ هرتز از نوع White noise قرار گرفتند (s.no-f02199;cygnet systems, gurgaon, Haryana). صدا از دستگاه مولد صدا تولید و توسط یک بلندگو در اتاق پخش می شد. دستگاه آموزش اجتناب غیرفعال از یک جعبه دو قسمتی تاریک و روشن با اندازه یکسان ۲۶×۲۶ سانتیمتر تشکیل شده بود که توسط یک درب گیوتینی از هم جدا شده بودند. (Coulbourn Instruments Inc., PA, USA) بخش روشن توسط یک لامپ ۴۰ واتی نوردهی می شد. از سطح محفظه تاریک شوک الکتریکی فرستاده و آموزش و آزمایش بین ساعت ۸ تا ۱۳ انجام می شد. برای عادت کردن حیوان به دستگاه، در روز سازگاری، موش به مدت ۳۰ ثانیه در محفظه روشن قرار داده می شد تا محفظه را تجربه کند. سپس درب گیوتینی بین دو محفظه تاریک و روشن باز می شد تا موش آزادانه بتواند بین دو قسمت رفت و آمد کند. وقتی که موش وارد محفظه تاریک می شد، در بسته

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که به کار بردن همزمان استرس ملایم و استرس صدا در مراحل نخست تولد به طور بارزی یادگیری و حافظه را کاهش می دهد. تست اجتنابی غیرفعال، مدل مناسبی برای بررسی اثر انواع مختلف عوامل استرس زا بر یادگیری و حافظه می باشد. تاکنون مطالعه ای مبنی بر اثر همزمان استرس ملایم با استرس صدا در دوران اولیه پس از تولد بر یادگیری و حافظه در موش صحرایی انجام نشد. Meaney و همکارانش نشان دادند که هندلینگ در دوران اولیه زندگی به طور بارزی عملکرد سیستم عصبی مرکزی (CNS) که تنظیم کننده محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) می باشد را دچار تغییر می کند. هر چند که این اثر ممکن است وابسته به جنس باشد، اما در هر دو جنس نر و ماده، هندلینگ از افزایش ترشح آدرنال در دوران اولیه پس از تولد جلوگیری می کند (یا میزان آن را کاهش می دهد) و همچنین سبب کاهش تخریب سلولهای هیپوکامپ و اختلال در حافظه فضایی می شود (۱۷).

Nunez و همکاران نشان دادند که هندلینگ در دوران نوزادی سبب افزایش یادگیری شرطی فعال می گردد (۱۸). در این مطالعه مشخص شد که قرارگرفتن در معرض استرس ملایم (هندلینگ - تزریق) در به خاطر سپردن مهارت تعلیم داده شده اثر معنی داری ندارد. که با برخی مطالعات انجام شده (۱۷ و ۱۸) همخوانی ندارد. اعمال استرس هندلینگ پس از تولد، می تواند در جلوگیری از اختلالات همراه با افزایش سن که منجر به برهم زدن عملکرد محور HPA میگردد، نقش داشته باشد. حیواناتی که در ابتدای تولد در معرض استرس هندلینگ بودند، در سن ۴ ماهگی سطوح کمتری از کورتیزول را در پاسخ به استرس نسبت به گروه کنترل ترشح کردند (۱۵). Kosten و همکارانش نشان دادند که اعمال استرس در ابتدای تولد (ایزوله کردن نوزادی، هندلینگ، جدا کردن از مادر) شرطی سازی را در موش های بالغ دچار اختلال می کند (۱۹). مطالعه دیگری که توسط Levine انجام شد نشان داد که هندلینگ نوزادی اثری بر یادگیری و حافظه ندارد (۱۰) که با یافته های حاصل از این مطالعه شباهت دارد. در مورد اثرات استرس صدا بر ایجاد اختلال در شناخت، خواندن، توجه، حل مساله، یادگیری و حافظه مطالعات گوناگونی انجام شده است (۱۶ و ۳) در این

مطالعه اعمال همزمان استرس ملایم با استرس صدا سبب کاهش معنی دار یادگیری و حافظه نسبت به گروههای دیگر شد.

رویدادهای اولیه زندگی، از جمله استرس، اثرات دراز مدتی بر سیستم عصبی دارند. استرس بر ساختار و عملکرد نرون های هیپوکامپ تاثیر می گذارند (۲۰). افزایش سطوح کورتیکواستروئیدها در نتیجه اعمال استرس، موجب آتروفی دندریتهای CA3 پیرامیدال و مهار نورونز در دوران بلوغ در dentate gyrus و اختلال در یادگیری وابسته به هیپوکامپ می گردد (۲۱). رویدادهای آسیب زنده در ابتدای تولد همراه با افزایش ریسک ابتلا به اختلالات روانی در دوران بلوغ می باشند. رسپتورهای 5HT1-A نقش مهمی را در مکانیسم های سروتونرژیک در زمان اختلالات ناشی از استرس ایفا می کنند. هندلینگ در هفته سوم پس از تولد سبب کاهش در عملکرد رسپتورهای 5HT1-A در کورتکس پری فورتال میانی در زمان بلوغ و همچنین سبب مهار فیدبکی هسته راف از طریق رسپتورهای پس سیناپی 5-HT (1A) می شود (۲۲). نتایج مطالعه نشان داد که استرس ملایم همراه با استرس صدا موجب کاهش یادگیری و حافظه در دوران نخست پس از تولد می شود اما از آنجائیکه در این مطالعه از مدل حیوانی استفاده شد، نتایج آن را به طور قطعی نمی توان به مطالعات انسانی تعمیم داد. چون ممکن است نتایج مطالعه حیوانی متفاوت از مطالعه انسانی باشد. به همین دلیل لازم است مطالعات بیشتری در این زمینه برای کسب نتایج دقیق تر انجام شود. علاوه بر این، در این مطالعه تغییرات سیستم سروتونرژیک و عملکرد محور HPA در گروه های مورد مطالعه بررسی نشد. بنابراین لازم است مطالعات دیگری انجام شود تا مکانیسم دقیق اثر استرس در مراحل نخست تولد بر حافظه و یادگیری مشخص گردد. به علاوه در این تحقیق اثر استرس ملایم با استرس صدا مورد بررسی قرار گرفت، که پیشنهاد می شود در مطالعات آینده اثر استرس های دیگر بر یادگیری و حافظه در حیوان و انسان مورد سنجش قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از انجمن توانبخشی قلب، عروق و ریه ایران تشکر می گردد.

Comparison of Handling-Injection Stress with Noise Stress on Learning and Memory in the Early Life of Male Rats

R. Ghalamghash (PhD)^{1*}, H. Zaker Mamedouf (PhD)², H. Ashayeri (MD)³, Z. Bahrami (MSc)¹

1. Iranian Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation Association (ICRA), Tehran, Iran

2. Neurology Department, Azarbayjan University, Azerbaijan

3. Neuroscience Department, Faculty of Rehabilitation, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: Jul 21st 2009, Revised: Sep 30th 2009, Accepted: Mar 10th 2010.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Various stressful stimuli have different effects on memory and learning. With technology development, the human exposes to different stressful factors. The aim of this study was to investigate the combined effects of handling-injection stress with noise stress in the passive avoidance task in rats.

METHODS: Twenty-four male Wistar rats (22 days aged) with weight of 55gr were used. Male Wistar rats were divided into 4 groups, of 6 animals for 4 weeks: subcutaneous injection of sodium chloride 0.9% and handling stress (I+H), subcutaneous injection of sodium chloride 0.9% and handling with noise exposure (I+N), noise exposure (N) and control (C). After 4 weeks, we studied passive avoidance conditioning test in a shuttle box.

FINDINGS: The step-through latency after training animals significantly increased in (I+H) group as compared with (I+N) and (N) groups ($p=0.001$). But using noise stress with handling-injection stress significantly attenuated learning and memory in the (I+N) group than other 3 groups ($p=0.01$).

CONCLUSION: The data suggested that using moderate stress with sound stress decreases learning and memory in the early life of male Wistar rats.

KEY WORDS: *Early life, Learning and memory, Passive avoidance, Rat, Handling-injection stress.*

*Corresponding Author;

Address: No: 19, Iranian Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation Association (ICRA), Sadighi Ave., Palestine St., Tehran, Iran

Tel: +98 21 66493118

E-mail: rghalamghash@icra.ir

References

1. Li XH, Liu NB, Zhang MH, et al. Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats. *Chin Med J (Engl)* 2007;120 (8):669-74.
2. Yang Y, Cao J, Xiong W, et al. Both stress experience and age determine the impairment or Enhancement effect of stress on spatial memory retrieval. *J Endocrinol* 2003;178(1):45-54.
3. Cui B, Wu M, She X. Effects of chronic noise exposure on spatial learning and memory of rats in relation to neurotransmitters and NMDAR2B alteration in the hippocampus. *Occup Health* 2009;51(2):152-8.
4. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 2001;49(12):1023-39.
5. Kendler K.S, Bulik C.M, Silberg J, Hettema J.M, Myers J, Prescott C.A. Childhood sexual abuse and adult psychiatric and substance use disorders in women: an epidemiological and cotwin control analysis. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57(10):953-9.
6. Orvaschel H. Early onset psychiatric disorder in high risk children and increased familial morbidity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1990; 29(2):184-8.
7. Levine S, Haltmeyer G, Karas G, Denenberg VH. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav* 1967;2:55-9.
8. Fernandez-Teruel, A, Escorihuela RM, Nunez JF, Goma M, Driscoll P, Tobena A. Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett* 1992;137(2):185-8.
9. Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress induced-corticosterone secretion. *J Neuros* 1997;17(7):2626-36.
10. Levine S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science* 1962;135:795-6.
11. Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muneoka K, Mori KJ, Takahashi K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field induced behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49(4):961-7.
12. Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology* 1989;50(5):597-604.
13. Meaney MJ, Aitken DH. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Brain Res* 1985; 354(2):301-4.
14. Todeschin AS, Winkelmann-Duarte E, Jacob MH, et al. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav* 2009;56(1):93-100.
15. Vallee M, Maccari S, Dellu F, Simon H, Moal M, Mayo W. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci* 1999;11(8):2906-16.
16. Sarkaki A, Karami K. Impaired learning due to noise stress during pregnancy in rats offspring. *J Res Med Sci* 2004; 9(6):275-9.
17. Meaney MJ, Aitken DH, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol Aging* 1991;12(1):31-8.
18. Nunez JF, Ferre P, Garcia E, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Tobena A. Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active. *Physiol Behav* 1995;57(5):831-5.

19. Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Res* 2007;1154:144-53.
20. Fenoglio KA, Brunson KL, Baram TZ. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Front Neuroendocrinol* 2006; 27(2):180-92.
21. Karten YJ, Olariu A, Cameron HA. Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood. *Trends Neurosci* 2005; 28(4):171-2.
22. Matsuzaki H, Izumi T, Matsumoto M, Togashi H, et al. Early postnatal stress affects 5-HT(1A) receptor function in the medial prefrontal cortex in adult rats. *Eur J Pharmacol* 2009;615(1-3):76-82.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.