

Cognitive Function and Hippocampal Glutathione and Malondialdehyde Levels in Paraoxon-intoxicated Rats

Sakineh Shafia¹,
Fatemeh Yazdani Azadboni²,
Zohreh Zare³,
Moslem Mohammadi⁴

¹ Assistant Professor, Department of Physiology, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Medical Student, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Physiology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 20, 2021; Accepted May 22, 2022)

Abstract

Background and purpose: Exposure to organophosphorus (OP) compounds may contribute to an increased risk of cognitive impairments and induction of oxidative stress. The present study was designed to evaluate the effects of exposure to paraoxon (the active metabolite of insecticide parathion) on cognitive function and oxidative stress biomarkers.

Materials and methods: Adult male Wistar rats (n= 56, 7 per group) were used in this study. Corn oil or paraoxon at 0.3, 0.7, or 1 mg/kg were intraperitoneally administrated. After 14 or 28 days, the animals were examined by Morris water maze to determine spatial learning and memory. The effects of paraoxon on hippocampal glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were also investigated.

Results: Escape latency and swimming distance significantly increased in animals that received 1 mg/kg of paraoxon at both time points ($P<0.001$ and $P<0.05$, respectively). In the probe test, animals intoxicated with paraoxon 1 mg/kg spent less time in the target zone and had lower swimming distance and swimming speed compared with the control group. No significant difference was observed in the performance of paraoxon-intoxicated animals in the water maze with visible platform compared with the control group ($P>0.05$). Exposure to paraoxon 1 mg/kg was associated with decreased GSH and increased MDA levels in the hippocampus.

Conclusion: The study showed that exposure to high dose of paraoxon (1 mg/kg) impaired spatial learning and memory independent of any changes in sensorimotor deficit. Induction of oxidative stress plays an important role in development of cognitive impairments caused by exposure to paraoxon.

Keywords: paraoxon, learning, memory, glutathione, malondialdehyde, hippocampus

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (209): 13-23 (Persian).

Corresponding Author: Moslem Mohammadi - Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: mohammadimo@yahoo.com)

عملکرد شناختی و سطوح گلو تاتیون و مالون دی آلدئید هیپوکامپ موش های صحرایی مسموم شده با پاراکسان

سکینه شفیعا¹
فاطمه یزدانی آزادینی²
زهره زارع³
مسلم محمدی⁴

چکیده

سابقه و هدف: مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره ممکن است منجر به افزایش خطر بروز اختلالات شناختی و القاء استرس اکسیداتیو شود. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات مواجهه با پاراکسان (متابولیت فعال حشره کش پاراتیون) بر عملکرد شناختی و بیومارکرهاي استرس اکسیداتیو طراحی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه از 56 سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (7 سر در هر گروه) استفاده شد. روغن ذرت یا یکی از دوزهای 0/3، 0/7 یا 1 (میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) پاراکسان به صورت داخل صفاقی تجویز شد. پس از 14 یا 28 روز، یادگیری و حافظه فضایی حیوانات با استفاده از ماز آبی موریس بررسی شد. اثرات پاراکسان بر سطوح گلو تاتیون (GSH) و مالون دی آلدئید (MDA) هیپوکامپ نیز بررسی شد.

یافته ها: افزایش قابل ملاحظه ای در زمان رسیدن به سکو و مسافت شنا کردن در حیوانات دریافت کننده دوز 1 میلی گرم پاراکسان در هر دو مقطع زمانی مشاهده شد (به ترتیب $P < 0/001$ و $P < 0/05$). در آزمون پروب، حیوانات مسموم شده با دوز 1 میلی گرم پاراکسان زمان کمتری را در ناحیه هدف سپری کردند و مسافت شنا و سرعت شنای کمتری نسبت به گروه کنترل داشتند. تفاوت معنی داری در عملکرد حیوانات مسموم با پاراکسان در ماز آبی با سکوی آشکار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ($P < 0/05$). مواجهه با دوز 1 میلی گرم پاراکسان با کاهش GSH و افزایش MDA هیپوکامپ همراه شد. **استنتاج:** نتایج نشان داد مواجهه با دوز بالای پاراکسان (1 میلی گرم) یادگیری و حافظه فضایی را مستقل از هرگونه تغییر در نقص حسی - حرکتی مختل می کند. القاء استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بروز اختلالات شناختی ناشی از مواجهه با پاراکسان دارد.

واژه های کلیدی: پاراکسان، یادگیری، حافظه، گلو تاتیون، مالون دی آلدئید، هیپوکامپ

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره پرکاربردترین آفت کش های مورد استفاده در کشاورزی هستند. برخی از این ترکیبات به عنوان عوامل اعصاب کاربرد جنگی دارند. مسمومیت حاد با این ترکیبات بر اثر فسفریلاسیون و مهار آنزیم استیل کولین استراز و کاهش هیدرولیز استیل کولین ایجاد می شود.

E-mail: mohammadimo@yahoo.com

مؤلف مسئول: مسلم محمدی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی

1. استاد بار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات ایمونونوتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استادیار، گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. دانشیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1400/12/1 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/12/22 تاریخ تصویب: 1401/3/1

تحریک بیش از حد گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتینی به دنبال تجمع استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک منجر به ایجاد بحران کولینرژیک و ظهور علایمی مانند ترشح بیش از حد اشک و بزاق، اسهال و تشنج می‌شود (21). اگرچه علائم بحران کولینرژیک ناشی از مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره در اکثر موارد با گذشت زمان از بین می‌رود، آسیب و کاهش سلول‌های عصبی مغز به دنبال مواجهه با این ترکیبات می‌تواند منجر به ایجاد نقایص نورولوژیکی بلندمدت و پایدار مانند اختلالات شناختی و خلقی و نقایص حرکتی شود (3،4). سیستم عصبی کولینرژیک نواحی مختلف مغز از جمله تشکیلات لیمبیک اهمیت زیادی در فرایندهای یادگیری و حافظه دارد. گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتینی استیل کولین در رمزگذاری خاطرات نقش دارند (5). استفاده از آگونیست‌های گیرنده‌های استیل کولین منجر به تقویت اتصالات سیناپسی مرتبط با یادگیری و حافظه می‌شود (6). در مقابل، اختلال رمزگذاری خاطرات جدید، یادگیری فضایی و حافظه کاری به دنبال مهار گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتینی استیل کولین گزارش شده است (7-9). با توجه به نقش استیل کولین در فرایندهای یادگیری و حافظه، می‌توان انتظار داشت تغییرات عملکرد سیستم کولینرژیک مغز به دنبال مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره منجر به تغییر اعمال شناختی گردد. مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز ممکن است از چند روز تا چند هفته پس از مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره تداوم داشته باشد. این آنزیم علاوه بر شرکت در انتقال کولینرژیک، اعمال دیگری را نیز در سیستم عصبی مرکزی به عهده دارد. در حضور آنتاگونیست‌های گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتینی استیل کولین، به کار بردن مستقیم استیل کولین استراز مستقیماً و مستقل از گیرنده‌های کولینرژیک منجر به تقویت طولانی‌مدت در برش‌های بافتی هیپوکامپ شد. بنابراین، استیل کولین استراز می‌تواند از طریق القاء تقویت طولانی‌مدت در نورون‌های پیرامیدال هیپوکامپ در پیشبرد اعمال شناختی

نقش داشته باشد (10). اثرات ترکیبات ارگانوفسفره به سیستم کولینرژیک محدود نمی‌شود و فراخوانی سیستم‌های نوروترانسمیتری دیگری مثل گلو تاما ترژیک و گابا ارژیک نیز در بروز این اثرات نقش دارند (11،12). بنابراین مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره می‌تواند از طریق اثر بر مجموعه‌ای از سیستم‌های نوروترانسمیتری مغز منجر به تغییر فرایندهای شناختی شود. گلو تامات به عنوان مهم‌ترین نوروترانسمیتر تحریکی مغز، نقش مهمی در فرایندهای یادگیری و حافظه دارد (13). تغییر در بیان ترانسپورترهای گلو تامات مغز و کاهش رفتارهای اضطرابی به دنبال مواجهه با دوزهای تشنج‌زای پاراکسان نشان داده شده است (14). سمیت و آسیب عصبی ناشی از مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره نیز می‌تواند منجر به اختلال در یادگیری، از دست دادن حافظه، افسردگی و حتی برخی نشانه‌های بیماری نورودژنراتیو شود (15-17). نتایج مطالعه‌ای که توسط Deshpande و همکاران (2014) به منظور بررسی اثرات بلندمدت مواجهه با پاراکسان (متابولیت فعال حشره کش پاراتیون) صورت گرفت، از کاهش حافظه شناختی و افزایش سطح اضطراب در موش‌های صحرایی حکایت داشت (18). در مطالعات قبلی ما، مواجهه با دوزهای تشنج‌زای پاراکسان منجر به القاء فرایند آپوپتوز و آسیب بافتی در هیپوکامپ و قشر پره‌فرونتال به عنوان دو ساختار مرتبط با اعمال شناختی شد (19،20). از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات مواجهه با پاراکسان بر عملکرد شناختی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو طراحی شد. با توجه به حساسیت یادگیری و حافظه فضایی به تغییرات سیستم کولینرژیک (21)، از ماز آبی موریس (Morris water maze) برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی (Spatial learning and memory) استفاده شد. به منظور بررسی شاخص‌های استرس اکسیداتیو، غلظت گلو تاتیون (GSH) به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم غیر آنزیمی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بافت هیپوکامپ اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از 56 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (7 سر در هر گروه) در محدوده وزنی 200 تا 220 گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران نگهداری می‌شدند و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمامی آزمایشات با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران (IR.MAZUMS.4.REC.1400.11583) انجام شد. محلول‌های پاراکسان (Diethyl p-nitrophenyl phosphate، شرکت سیگما) به گونه‌ای با روغن ذرت (حامل) تهیه می‌شدند که با حجم یک میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شوند. به منظور مواجهه با پاراکسان، یک دوز غیر تشنج‌زا (0/3 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) یا یکی از دوزهای تشنج‌زای (0/7 یا 1 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پاراکسان به صورت داخل صفاقی به حیوانات در سه گروه تجربی تزریق شد. در گروه کنترل، حیوانات حجم مشابهی از روغن ذرت دریافت می‌کردند. از آنجایی که ضعف حرکتی ناشی از مواجهه با دوزهای تشنج‌زای پاراکسان می‌توانست در نتایج مطالعه اختلال ایجاد نماید، آزمون‌های رفتاری پس از ریکاوری کامل عملکرد حرکتی و پس از 14 یا 28 روز آغاز شدند. دوزهای پاراکسان و زمان‌های مورد مطالعه براساس مطالعه قبلی تعیین گردید (14). از ماز آبی موریس برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی استفاده شد. ماز شامل مخزن فلزی استوانه‌ای مشکی به قطر 150 سانتی‌متر و ارتفاع 50 سانتی‌متر می‌شود که تا ارتفاع 30 سانتی‌متر با آب $25 \pm 2^\circ\text{C}$ پر می‌شد. مخزن به چهار ربع مساوی تقسیم شد و در طول آزمایش سکویی مدور به قطر 12 سانتی‌متر در مرکز ربع هدف (Target) قرار می‌گرفت. فرد آزمایش کننده، رایانه و شکل‌های راهنمایی که در خارج ماز قرار داشتند در سراسر آزمایش ثابت بودند و

حیوان می‌بایست پس از رها شدن در مخزن محل سکو را با توجه به این علائم یاد می‌گرفت و روی آن قرار می‌گرفت. مراحل مختلف آزمایش به ترتیب و به شکل زیر انجام شد: الف) عادت کرن (Habituation): به منظور عادت کردن به ماز آبی، حیوانات یک‌روز قبل از آزمون یادگیری (روز 14 یا 28 پس از مواجهه) به مدت 1 دقیقه داخل مخزن فاقد سکو رها می‌شدند تا آشنا کنند.

ب) آزمون یادگیری (Learning test): پس از عادت کردن، حیوان در 4 روز متوالی و در هر روز 4 بار پسایی در مخزن رها می‌شد (روزهای 15 تا 18 یا 29 تا 32) تا پس از پیدا کردن سکوی پنهانی (Hidden platform) که به طور ثابت در مرکز ربع هدف و 2 سانتی‌متر زیر آب قرار داشت، روی آن قرار گیرد. حیوان در هر بار آزمایش در یک ربع مخزن رها و اجازه داده می‌شد تا 60 ثانیه به جستجوی سکو بپردازد. پس از یافتن سکو، به حیوان اجازه داده می‌شد 30 ثانیه روی آن باقی بماند و با دیدن علائم بیرون ماز، تصویری فضایی از محیط اطراف به دست آورد. در صورتی که حیوان نمی‌توانست در این زمان سکو را پیدا کند، توسط شخص آزمایش کننده به طرف سکو هدایت می‌شد و به مدت 30 ثانیه روی آن باقی می‌ماند. آزمایش‌های روزانه با فاصله 30 ثانیه‌ای انجام می‌شدند و در پایان آن، حیوان به آرامی خشک و به قفس برگردانده می‌شد. حرکات حیوان در طول آزمایش توسط دوربین بالای مخزن، فیلم‌برداری و شاخص‌های یادگیری فضایی شامل زمان رسیدن به سکو (Escape latency)، مسافت طی شده تا رسیدن به سکو و سرعت شنا کردن توسط نرم‌افزار ردیاب (ساخت شرکت برج صنعت)، ثبت و از میانگین اطلاعات برای آنالیز آماری و بررسی یادگیری فضایی استفاده می‌شد. کاهش زمان و مسافت پیموده شده تا رسیدن به سکو و افزایش سرعت شنا کردن در طول روزهای آزمایش از بهبود یادگیری فضایی حکایت دارد.

ج) آزمون پروب (Probe test): یک‌روز پس از آزمون یادگیری (روز 19 یا 33 پس از مواجهه)، از آزمون

پروپ برای بررسی حافظه فضایی استفاده شد. در این مرحله، سکو از داخل مخزن برداشته می شد و در یک آزمون 60 ثانیه ای و به دنبال رها کردن حیوان در ربع مقابل ربع هدف، زمان حضور در ربع هدف، مسافت پیموده شده و سرعت شنا کردن برای بررسی حافظه فضایی اندازه گیری شد.

(د) آزمون سکوی آشکار (Visible platform test): از آنجایی که اختلال دقت بینایی و توانایی حسی-حرکتی می تواند نتایج حاصل از آزمون شناختی را تحت تأثیر قرار دهد، یک روز پس از آزمون پروپ (روز 20 یا 34 پس از مواجهه) از آزمون سکوی آشکار که به جهت گیری فضایی نیاز ندارد برای بررسی احتمال تداخل این عوامل بر توانایی حیوان در رسیدن به سکو استفاده شد. این آزمون همانند آزمون سکوی پنهان انجام شد با این تفاوت که سکو یک سانتی متر بالاتر از سطح آب و در ربع مقابل ربع هدف قرار می گرفت و زمان رسیدن به سکو اندازه گیری می شد (22).

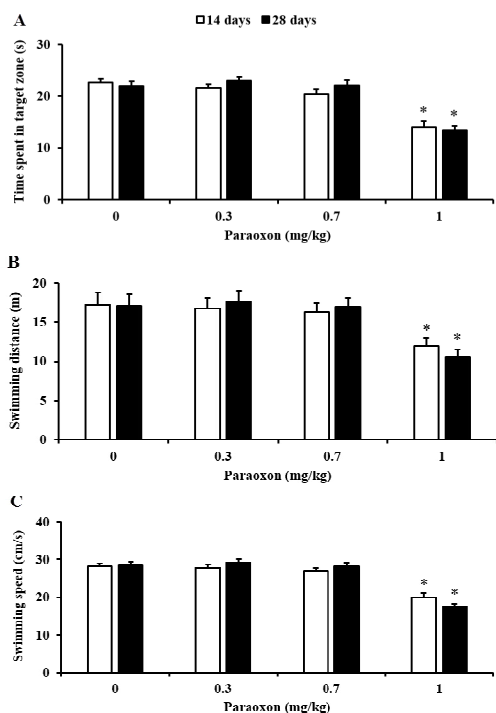
پس از اتمام آزمون رفتاری، حیوانات به دنبال القاء بی هوشی و بی دردی با ترکیبات کتامین (80 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) کشته شدند و پس از جداسازی هر دو هیپوکامپ و قرار دادن آن ها در نیتروژن مایع، نمونه های بافتی تا زمان اندازه گیری پارامترهای مورد نظر در 80°C نگهداری شدند.

برای اندازه گیری غلظت گلو تاتیون و مالون دی آلدید، نمونه های بافتی هیپوکامپ با نسبت وزنی -حجمی 1 به 10 در بافر فسفات هموژن شدند. پس از سانتریفیوژ هموژن بافتی به مدت 15 دقیقه در $14000 \times g$ ، محلول رویی جداسازی شد تا برای اندازه گیری غلظت پروتئین، گلو تاتیون و مالون دی آلدید استفاده شود. از واکنش محلول رویی هموژن شده بافت هیپوکامپ با 5 و 5'-دی تیوبیس 2-نیتروبنزوتیک اسید (DTNB) برای اندازه گیری غلظت گلو تاتیون استفاده شد. حاصل این واکنش ماده ای زرد

رنگ است که در طول موج 412 نانومتر، خوانده و غلظت گلو تاتیون برحسب nmol/mg protein محاسبه شد. از معرف تیوباریتوریک اسید (TBA) برای اندازه گیری غلظت MDA بافت هیپوکامپ استفاده شد. حاصل واکنش TBA با اسیدهای چرب یک کمپلکس بنفش رنگ است که میزان جذب آن در طول موج 532 نانومتر، خوانده و غلظت MDA برحسب nmol/mg protein محاسبه شد (23). برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های آنالیز واریانس با اندازه گیری های مکرر (Repeated measures ANOVA) و آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. در صورت معنی دار بودن، از آزمون های تعقیبی بونفرونی (Bonferroni) یا توکی (Tukey) برای مقایسه بعدی استفاده شد. تأثیر زمان مواجهه با استفاده از آزمون تی مستقل (Independent t-test) بررسی شد. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شدند و $P < 0/05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

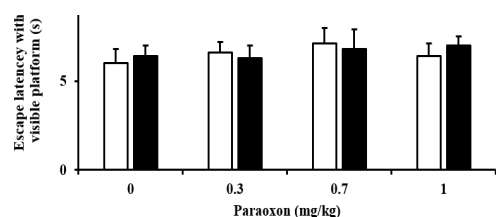
یافته ها

یادگیری فضایی در 4 روز متوالی توسط ماز آبی مورس بررسی شد و نتایج آن در نمودار شماره 1 نشان داده شده است. کاهش معنی داری در زمان مسافت طی شده تا رسیدن به سکوی پنهان طی روزهای آموزش در همه گروه ها مشاهده شد. همان طور که در نمودار شماره A1 نشان داده شده است، زمان رسیدن به سکو در حیوانات دریافت کننده دوز 1 میلی گرم پاراکسان در مقایسه با گروه کنترل در هر دو زمان مطالعه بیش تر بود ($P < 0/05$). حیوانات دریافت کننده دوز 1 میلی گرم پاراکسان طی روزهای آموزش مسافت بیش تری را برای رسیدن به سکو شنا کردند (نمودار شماره B1)، با این وجود تفاوت معنی داری در سرعت شنا کردن بین گروه ها مشاهده نشد (نمودار شماره C1).

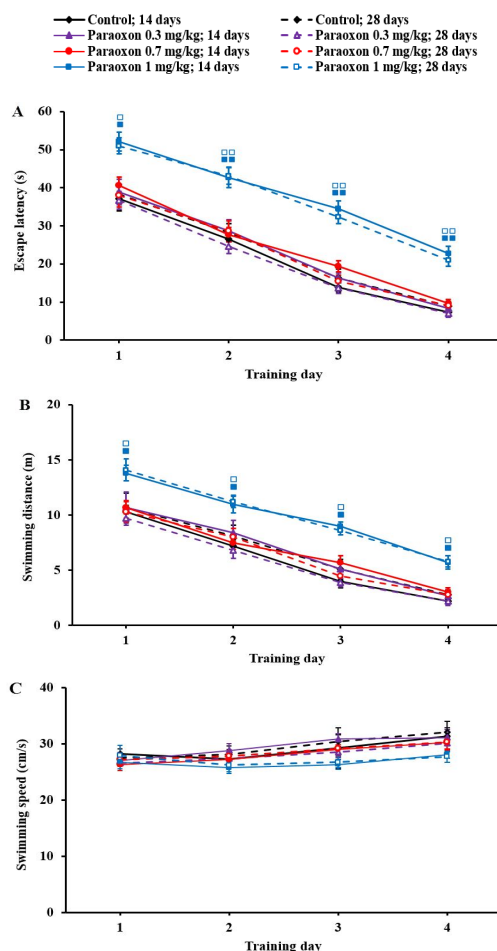


نمودار شماره 2: اثر پاراکسان بر (A) زمان حضور در ربع هدف؛ (B) مسافت شناکردن و (C) سرعت شناکردن که در آزمون پروب با استفاده از ماز آبی موریس اندازه‌گیری شده است. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است (7 سر موش صحرایی در هر گروه). $P < 0/05$ * در مقایسه با گروه کنترل (0 mg/kg) مربوطه

دقت بینایی و توانایی حسی - حرکتی حیوانات با استفاده از آزمون سکوی آشکار بررسی شد و نتایج آن در نمودار شماره 3 نشان داده شده است. اختلاف آماری معنی‌داری در زمان رسیدن به سکوی آشکار بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد.



نمودار شماره 3: اثر پاراکسان بر زمان رسیدن به سکوی آشکار که در آزمون سکوی آشکار با استفاده از ماز آبی موریس اندازه‌گیری شده است. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است (7 سر موش صحرایی در هر گروه).



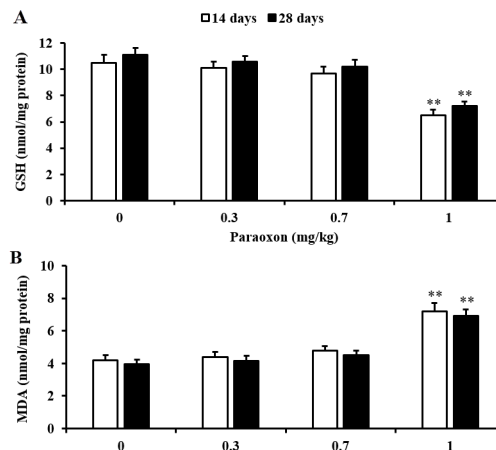
نمودار شماره 1: اثر پاراکسان بر (A) زمان رسیدن به سکوی (Escape latency)؛ (B) مسافت شناکردن تا رسیدن به سکوی و (C) سرعت شناکردن که در آزمون یادگیری با استفاده از ماز آبی موریس اندازه‌گیری شده است. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است (7 سر موش صحرایی در هر گروه). $P < 0/05$ * و $P < 0/001$ ** در مقایسه با گروه کنترل مربوطه

نتایج بررسی بررسی حافظه فضایی در آزمون پروب در شکل شماره 2 نشان داده شده است. در هر دو زمان مورد مطالعه، حیوانات دریافت‌کننده دوز 1 میلی‌گرم پاراکسان در مقایسه با حیوانات گروه کنترل زمان کمتری را در ربع هدف حضور داشتند (نمودار شماره A2). در مقایسه با گروه کنترل، حیوانات دریافت‌کننده دوز 1 میلی‌گرم پاراکسان مسافت کمتری را با سرعت کم‌تر شنا کردند (نمودار شماره B2 و C).

برای رسیدن به سکوی پنهان در حیوانات دریافت کننده دوزهای 0/3 و 0/7 میلی گرم پاراکسان، افزایش این پارامترها در گروه 1 میلی گرم پاراکسان از اختلال در یادگیری فضایی این حیوانات در مقایسه با گروه کنترل حکایت داشت. اختلال در حافظه فضایی حیوانات دریافت کننده دوز 1 میلی گرم پاراکسان نیز با کاهش زمان حضور در ربع هدف مشخص شد. از عدم اختلاف معنی دار در زمان رسیدن به سکوی آشکار بین گروه‌های مورد مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد اختلال یادگیری و حافظه فضایی مشاهده شده در حیوانات دریافت کننده دوز 1 میلی گرم پاراکسان بر اثر اختلال در عملکرد شناختی و نه اختلالات حسی - حرکتی حاصل شده است. در مطالعه حاضر که با تمرکز بر روی بررسی اثرات شناختی پاراکسان صورت گرفت، به منظور عدم تداخل اثرات سایر داروها از رژیم درمانی دیگری استفاده نشد. در مطالعه دیگری که به منظور بررسی اختلالات شناختی ناشی از مسمومیت با پاراکسان صورت گرفت، موش‌های صحرایی بلافاصله پس از تزریق زیر جلدی دوز بالای پاراکسان (4 mg/kg) با تجویز ترکیبی از آتروپین، پرایدوکسیم کلرید و دیازپام از مرگ نجات می‌یافتند. پس از گذشت سه ماه، عملکرد شناختی حیوانات با استفاده از آزمون تشخیص شیء جدید (Novel object recognition test) که به بررسی عملکرد قشر پره فرونتال می‌پردازد، بررسی شد. عدم اختلاف معنی دار در مدت زمان جستجو در اطراف اشیاء جدید و آشنا از کاهش حافظه شناختی در این حیوانات حکایت داشت (18).

نتایج مطالعاتی که به منظور بررسی مواجهه با کلرپیرفوس (Chlorpyrifos) بر عملکرد شناختی صورت گرفت تا حدودی متناقض است. به دنبال مواجهه مکرر با دوزهای مختلف کلرپیرفوس به مدت 4 هفته، علی‌رغم عدم وجود اختلاف معنی دار در یادگیری فضایی، کاهش وابسته به دوز حافظه فضایی در حیوانات دریافت کننده کلرپیرفوس در مقایسه با گروه کنترل در

مواجهه با دوز 1 میلی گرم پاراکسان منجر به کاهش غلظت GSH و افزایش غلظت MDA بافت هیپوکامپ در هر دو زمان مواجهه شد (نمودار شماره 4).



نمودار شماره 4: اثر پاراکسان بر غلظت‌های (A) گلو تاتیون (GSH) و (B) مالون‌دی‌آلدهید (MDA) بافت هیپوکامپ. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است (7 سر موش صحرایی در هر گروه). $0/001 < P^{**}$ در مقایسه با گروه کنترل (0 mg/kg) مربوطه

بحث

از آنجایی که فرایندهای عصبی-رفتاری متفاوتی ممکن است در آزمون‌های رفتاری مختلف دخیل باشند، انتخاب آزمون‌های مناسب و حساس برای بررسی تظاهرات عصبی رفتاری ترکیبات مختلف اهمیت بسزایی دارد. ماز آبی موریس کاربرد گسترده‌ای در مطالعه یادگیری و حافظه فضایی دارد و به نظر می‌رسد برای بررسی اثرات ترکیبات ارگانوفسفره بر عملکرد شناختی مناسب باشد (24، 25)، از این رو در این مطالعه از ماز آبی موریس به منظور بررسی عملکرد شناختی حیوانات مسموم شده با پاراکسان استفاده شد. در آزمون یادگیری، همه حیوانات توانستند محل سکوی پنهان را یاد بگیرند و مسافت طی شده و زمان رسیدن به سکو در طول روزهای تمرین در تمامی گروه‌ها کاهش یافت. علی‌رغم عدم اختلاف معنی دار در مسافت طی شده و زمان لازم

آزمون ماز آبی موریس مشاهده شد (25). با این وجود، علی‌رغم مهار 85 درصدی فعالیت کولین استراز مغز موش‌های صحرایی به دنبال تیمار 4 هفته‌ای با کلریپرفوس، تغییر معنی‌داری در قابلیت حفظ اطلاعات و حافظه کوتاه مدت حیوانات مشاهده نشد (26).

تجمع سطوح بالای استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک به دنبال مواجهه با دوزهای بالای ترکیبات ارگانوفسفره با آغاز فعالیت‌های سیزری (Seizure) به سرعت به صرع پایدار (Status epilepticus) پیشرفت می‌کند (27). صرع پایدار با آسیب نواحی مستعد مغز مثل هیپوکامپ و تغییر شبکه‌های نورونی عملکردی آن می‌تواند منجر به ایجاد اختلالات شناختی شود (21). مطالعات حیوانی و انسانی نشان دادند سمیت عصبی ناشی از مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره می‌تواند منجر به اختلال در یادگیری، از دست دادن حافظه، افسردگی و حتی برخی نشانه‌های بیماری نورودژنراتیو گردد (15-17). علاوه بر تحریک بیش از حد گیرنده‌های استیل کولین، مکانیسم‌های دیگری مثل القاء آپوپتوز و نکروز و استرس اکسیداتیو نیز ممکن است در آسیب عصبی ناشی از مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره نقش داشته باشد. اگرچه براساس مطالعات قبلی (19، 20)، القاء فرایند آپوپتوز و کاهش تعداد نورون‌ها در قشر پره‌فرونتال و هیپوکامپ موش‌های صحرایی مسموم شده با هر دو دوز تشنج‌زای پاراکسان (0/7 و 1 میلی گرم) اتفاق افتاد، اختلالات یادگیری و حافظه فضایی در مطالعه حاضر تنها در حیوانات دریافت‌کننده دوز 1 میلی گرم پاراکسان که علائم بحران کولینرژیک و آسیب عصبی شدت بیش‌تری داشت، مشاهده شد. بنابراین، به نظر می‌رسد شدت فعالیت تشنجی و آسیب عصبی حاصل از مواجهه با پاراکسان در بروز اختلالات شناختی حائز اهمیت باشد.

هیپوکامپ به عنوان یکی از نواحی اصلی سیستم لیمبیک نقش مهمی در تثبیت اطلاعات و حافظه دارد (28). به منظور ارزیابی استرس اکسیداتیو و ارتباط آن با عملکرد شناختی حیوانات مسموم شده با پاراکسان،

غلظت‌های GSH و MDA هیپوکامپ اندازه‌گیری شد. GSH در پیشگیری از آسیب سلولی ناشی از گونه‌های اکسیژن واکنشی (Reactive oxygen species: ROS) مانند رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها نقش دارد (29). MDA نشانگر پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد و میزان آن به طور غیرمستقیم بیانگر استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی است (30). کاهش غلظت GSH و افزایش غلظت MDA در هیپوکامپ حیوانات دریافت‌کننده دوز 1 میلی گرم پاراکسان در هر دو زمان مورد مطالعه از القاء استرس اکسیداتیو حکایت داشت. تولید رادیکال‌های آزاد توسط پاراکسان ممکن است مسئول کاهش سطح GSH بافت هیپوکامپ در حیوانات دریافت‌کننده دوز 1 میلی گرم پاراکسان باشد. بنابراین اختلال در سیستم دفاعی سلول‌ها می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی شود (23). در توافقی با یافته‌های مطالعه حاضر، 24 ساعت پس از تزریق دوزهای 0/7، 1 و 1/5 (میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) پاراکسان نیز کاهش سطح GSH و افزایش سطح MDA در مغز موش صحرایی گزارش شده است (23). علاوه، مواجهه با سه آفت کش ارگانوفسفره کلریپرفوس، متیل‌پاراتیون و مالاتیون نیز از طریق افزایش MDA و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر به القاء استرس اکسیداتیو در بافت‌های عصبی و غیرعصبی موش صحرایی گردید (31). نتایج مطالعه‌ای که توسط Imam و همکاران (2018) صورت گرفت نیز از ارتباط اختلالات شناختی موش‌های صحرایی مواجهه شده با دو ترکیب ارگانوفسفره کلریپرفوس و دیکلرووس (Dichlorvos) با آسیب اکسیداتیو و کاهش تعداد سلول‌های عصبی در هیپوکامپ و آمیگدال حکایت داشت (32).

بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد، اختلالات یادگیری و حافظه فضایی در حیوانات مسموم شده با دوز بالا و تشنج‌زای پاراکسان (1 میلی گرم) مستقل از اختلالات حسی و حرکتی اتفاق افتاد. با توجه به اهمیت شدت فعالیت‌های تشنجی و القاء استرس

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم فاطمه یزدانی آزادبُنی دانشجوی رشته پزشکی (کد تصویب: 6598) می‌باشد که با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد.

اکسیداتیو در بروز اختلالات شناختی ناشی از مواجهه با پاراکسان، پیشگیری یا درمان فوری فعالیت‌های تشنجی نقش مهمی در جلوگیری از بروز این اختلالات دارد.

References

1. Carr RL, Richardson JR, Guarisco JA, Kachroo A, Chambers JE, Couch TA, et al. Effects of PCB exposure on the toxic impact of organophosphorus insecticides. *Toxicol Sci* 2002; 67(2): 311-321.
2. Chowdhary S, Bhattacharyya R, Banerjee D. Acute organophosphorus poisoning. *Clin Chim Acta* 2014; 431: 66-76.
3. Chen Y. Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. *Neurotoxicology* 2012; 33(3): 391-400.
4. Naughton SX, Terry AV Jr. Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology* 2018; 408: 101-112.
5. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16(6): 710-715.
6. Buccafusco JJ, Letchworth SR, Bencherif M, Lippiello PM. Long-lasting cognitive improvement with nicotinic receptor agonists: mechanisms of pharmacokinetic-pharmacodynamic discordance. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26(7): 352-360.
7. Atri A, Sherman S, Norman KA, Kirchhoff BA, Nicolas MM, Greicius MD, et al. Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behav Neurosci* 2004; 118(1): 223-236.
8. Elvander E, Schött PA, Sandin J, Bjelke B, Kehr J, Yoshitake T, et al. Intraseptal muscarinic ligands and galanin: influence on hippocampal acetylcholine and cognition. *Neuroscience* 2004; 126(3): 541-557.
9. Green A, Ellis KA, Ellis J, Bartholomeusz CF, Illic S, Croft RJ, et al. Muscarinic and nicotinic receptor modulation of object and spatial n-back working memory in humans. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81(3): 575-584.
10. Appleyard ME. Acetylcholinesterase induces long-term potentiation in CA1 pyramidal cells by a mechanism dependent on metabotropic glutamate receptors. *Neurosci Lett* 1995; 190(1): 25-28.
11. McDonough JH Jr, Shih TM. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21(5): 559-579.
12. Zare Z, Tehrani M, Rafiei A, Valadan R, Mohammadi M. Differential expression of glutamate transporters in cerebral cortex of paraoxon-treated rats. *Neurotoxicol Teratol* 2017; 62: 20-26.
13. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65(1): 1-105.
14. Zare Z, Tehrani M, Rezaei N, Dana Ghalebarzand B, Mohammadi M. Anxiolytic activity of paraoxon is associated with

- alterations in rat brain glutamatergic system. *Neurotoxicol Teratol* 2019; 71: 32-40.
15. Aldridge JE, Levin ED, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ Health Perspect* 2005; 113(5): 527-531.
 16. Hancock DB, Martin ER, Mayhew GM, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, et al. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol* 2008; 8: 6.
 17. Valvassori SS, Fortunato JJ, Gomes KM, Réus GZ, Martins MR, Gavioli EC, et al. Acute and subacute exposure to malathion impairs aversive but not non-associative memory in rats. *Neurotox Res* 2007; 12(1): 71-79.
 18. Deshpande LS, Phillips K, Huang B, DeLorenzo RJ. Chronic behavioral and cognitive deficits in a rat survival model of paraoxon toxicity. *Neurotoxicology* 2014; 44: 352-357.
 19. Zare Z, Tehrani M, Zarbakhsh S, Farzadmanesh H, Shafia S, Abedinzade M, et al. Effects of paraoxon exposure on expression of apoptosis-related genes, neuronal survival, and astrocyte activation in rat prefrontal cortex. *Neurotox Res* 2020; 37(2): 356-365.
 20. Zare Z, Zarbakhsh S, Tehrani M, Mohammadi M. Paraoxon-induced damage in rat hippocampus is associated with alterations in the expression of apoptosis-related proteins. *Pestic Biochem Physiol* 2020; 166: 104580.
 21. Terry AV Jr, Beck WD, Warner S, Vandenhuerk L, Callahan PM. Chronic impairments in spatial learning and memory in rats previously exposed to chlorpyrifos or diisopropylfluorophosphate. *Neurotoxicol Teratol* 2012; 34(1): 1-8.
 22. Mohammadi M, Zare Z. Effects of treadmill exercise on cognitive functions and anxiety-related behaviors in ovariectomized diabetic rats. *Physiol Behav* 2020; 224: 113021.
 23. Jafari M, Salehi M, Asgari A, Ahmadi S, Abbasnezhad M, Hajihoosani R, et al. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 34(3): 876-887.
 24. Cañadas F, Cardona D, Dávila E, Sánchez-Santed F. Long-term neurotoxicity of chlorpyrifos: spatial learning impairment on repeated acquisition in a water maze. *Toxicol Sci* 2005; 85(2): 944-951.
 25. Yan C, Jiao L, Zhao J, Yang H, Peng S. Repeated exposures to chlorpyrifos lead to spatial memory retrieval impairment and motor activity alteration. *Neurotoxicol Teratol* 2012; 34(4): 442-449.
 26. Maurissen JP, Shankar MR, Mattsson JL. Chlorpyrifos: lack of cognitive effects in adult Long-Evans rats. *Neurotoxicol Teratol* 2000; 22(2): 237-246.
 27. Shih TM, McDonough JH, Jr. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *J Appl Toxicol* 1997; 17(4): 255-264.
 28. Molitor RJ, Sherrill KR, Morton NW, Miller AA, Preston AR. Memory reactivation during learning simultaneously promotes dentate gyrus/CA(2,3) pattern differentiation and CA(1) memory integration. *J Neurosci* 2021; 41(4): 726-738.
 29. Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-

- related enzymes. J Nutr Biochem 2005; 16(10): 577-586.
30. Mao C, Yuan JQ, Lv YB, Gao X, Yin ZX, Kraus VB, et al. Associations between superoxide dismutase, malondialdehyde and all-cause mortality in older adults: a community-based cohort study. BMC Geriatr 2019; 19(1): 104.
 31. Ojha A, Yaduvanshi SK, Srivastava N. Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. Pestic Biochem Physiol 2011; 99(2): 148-156.
 32. Imam A, Sulaiman NA, Oyewole AL, Chengetanai S, Williams V, Ajibola MI, et al. Chlorpyrifos-and dichlorvos-induced oxidative and neurogenic damage elicits neuro-cognitive deficits and increases anxiety-like behavior in wild-type rats. Toxics 2018; 6(4): 71.