دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هفدهم– شماره ۸۷
تیر ۱۳۸۹

وصول: ۸۸/۱۲/۱۵
آخرین اصلاحات: ۸۹/۴/۲
پذیرش: ۸۹/۴/۲۶

بررسی اثر استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون بر اکتساب حافظه در موش‌های صحرایی نر

مهدی صابری*[۱]، شروین قلی‌زاده مقدم [۲]،محمد شریف‌زاده[۳]

۱- دانشیار- گروه فارماکولوژی و سم شناسی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی،دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)

۲- داروساز- گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- استاد- گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول: E-mail: m_s_saber@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: مغز در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر بوده و تداخل ارگانوفسفات‌ها با سیستم آنتی‌اکسیدان بدن می‌تواند سبب نوروپاتی و اختلال در حافظه شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی استرس اکسیداتیو ناشی از حداقل دوز سمی‌دیازینون در مغز و خون و اثر آن بر اکتساب حافظه در موش‌های صحرایی نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: دیازینون (۲۵ mg/kg خوراکی) به مدت ۲، ۴ و ۶ هفته تجویز شد. اکتساب حافظه موش‌ها از طریق دستگاه Morris Water Maze بررسی شد و سپس استرس اکسیداتیو از طریق اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدهاید (MDA) و تعیین مقدار و ظرفیت کامل آنتی‌اکسیدانت پلاسما و مغز ارزیابی شد.

نتایج: بین گروه‌های دریافت کننده دیازینون و کنترل اختلاف معناداری در فاکتورهای زمان، مسافت و سرعت شنای حیوان برای یافتن سکوی پنهان مشاهده نشد اما مصرف دیازینون به مدت ۲، ۴ و ۶ هفته، افزایش معناداری را در فعالیت آنتی‌اکسیدانت پلاسما و مغز به‌صورت وابسته به مدت زمان مصرف نشان داد. همچنین دیازینون مقدار MAD را در پلاسما و مغز، در گروه ۶ هفته‌ای نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش داد.

نتیجه‌گیری: اکسیداتیو استرس ناشی از دیازینون در رت‌ها بر پارامترهای اکتساب حافظه تأثیر نداشته است. با توجه نقش استیل‌کولین در بهبود حافظه عدم مشاهده تغییر محسوس در اکتساب حافظه را می‌توان به اثر همزمان عامل اکسیدانت در تضعیف و اثر استیل کولین در بهبود حافظه مربوط دانست.

واژگان کلیدی: ارگانو فسفره، استرس اکسیداتیو، اکتساب حافظه، دیازینون، MWM

مقدمه

ارگانوفسفات‌ها دسته‌ای از آفت‌کش‌ها هستند که به‌طور وسیعی در کشاورزی، دامپزشکی، صنعت، منازل و نیز به‌عنوان عوامل عصبی جنگی استفاده می‌شوند. این ترکیبات بیشترین مسمومیت‌های اتفاقی را سبب شده که عوارض آن به‌صورت حاد یا مزمن آشکار می‌شود (۱). از جمله عوارض مزمن سمیت بر سلول‌های عصبی و ایجاد نروپاتی است (۲).

ارگانوفسفات‌ها با مهار آنزیم کولین‌استراز سبب افزایش استیل‌کولین و بنابراین تحریک رسپتورهای نیکوتینی و موسکارینی می‌شوند (۳). نوعی آنزیم کربوکسیل استراز به نام استراز هدف نوروپاتی (Neuropathy Target Esterase) توسط برخی ارگانوفسفات‌ها قابل مهار است و به احتمال در ایجاد پلی‌نوروپاتی تأخیری ناشی از این سموم نقش دارد (۲،۱). در مسمومیت حاد و مزمن با سومان تحلیل عصبی و نکروز بافت‌های مخاطی هسته آمیگدال، هیپوکامپ و هسته‌های تالاموسی در موش صحرایی مشاهده شده است. ترکیبات آنتی‌کولین استراز مانند سومان، سارین، دی‌ایزوپروپیل فلوئوروفسفات می‌توانند سبب ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه در انسان و حیوان شوند (٤).

دیازینون یک ارگانوفسفره تماسی است که به‌طور گسترده به‌عنوان حشره‌کش، آفت‌کش و به‌عنوان داوری ضدکرم در دامپزشکی استفاده می‌شود. اثرات سمی‌برخی از ارگانوفسفره‌ها (دیازینون و کلرپریفوس) محدود به مهار آنزیم کولین‌استراز نیست، بلکه به دنبال بحران کلینرژیک تغییراتی مانند آسیب به غشاهای سلولی، تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن نیز مشاهده می‌شود (۵، ۲،۱). در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرایند موجب استرس اکسیداتیو خواهد شد. افزایش استرس اکسیداتیو گلوتاتیون بافتی را تخلیه کرده و به افزایش رادیکال‌های آزاد منجر می‌شود (٦).

استرس اکسیداتیو در نتیجه تخریب اکسیداتیو ماکرومولکول‌های بیولوژیک مانند اسیدنوکلئیک، پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها توسط رادیکال‌های آزاد ایجاد شده و بنابراین اثرات سایتوتوکسیک ایجاد می‌شود (۷). هرچند آثار اکسیداتیو استرس دیازینون در مدل‌های درون‌تن (۷) و برون‌تن (۸) به اثبات رسیده است اما این آثار در تماس طولانی‌مدت مشخص نشده است.

به‌طور کلی، مغز در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است. تحقیقات اخیر، نقش اساسی رادیکال‌های آزاد را در ایجاد مشکلات در نورون‌های مغزی و حتی مرگ آن‌ها نشان می‌دهد. از جمله نقش استرس اکسیداتیو در بیماری‌هایی همچون آلزایمر، پارکینسون و همچنین پیر شدن مغز ثابت شده است (۹). این عوارض در طولانی‌مدت اتفاق می‌افتند و از طریق سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بدن (کاتالاز، سوپراکسایددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز) (۱۰) یا محصولات ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیو مانند MDA (محصول نهایی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها) یا تعیین مقدار محصولات ناشی از پراکسیداسیون پروتئین‌ها قابل بررسی است (۷، ۵).

بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی چگونگی القاء استرس اکسیداتیو با حداقل دوز سمی‌دیازینون در طولانی‌مدت به عنوان یک عامل اکسیدانت در مغز و خون و اثر مزمن آن بر اکتساب حافظه در موش‌های صحرایی نر است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

موش‌های سفید صحرایی نر بالغ از نژاد Albino به وزن ۲۳۰-۱۸۰ گرم از دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تهیه شدند. محل نگه‌داری حیوانات دارای دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس بود، آب و غذا به مقدار کافی در اختیار حیوان قرار داشت.

اجزای دستگاه MWM (Morris Water Maze)

این دستگاه به منظور ارزیابی حافظه فضایی موش‌های صحرایی است که شامل اجزای زیر است:

۱- حوضچه آب: استوانه‌ای شکل، سیاه رنگ با قطر ۱۳٦ Cm و ارتفاع ٦۰Cm که تا ارتفاع ۲۵ Cm آن با آب ۲۳±۱ درجه سلسیوس پر می‌شود. سکوی کوچکی از جنس پلکسی گلاس شفاف با قطر ۱۰ سانتیمتر که یک سانتیمتر زیر سطح آب در ناحیه خاصی از حوضچه قرار گرفته، حیوان برای فرار از آب به آن پناه می‌برد؛

۲- منبع تولید نور مادون قرمز؛

۳- دوربین مخصوص تصویربرداری؛

٤- دستگاه Power Supply و

۵- کامپیوتر شامل سخت‌افزار و نرم‌افزار.

مواد به کار رفته در انجام آزمون‌ها

شامل دیازینون، اتر، هپارین، اسیدکلریدریک، استات سدیم ($C_2H_3Na_3,3H_2O$)، اسیداستیک گلاسیال ($C_2H_2O_2$)، کلراید آهن ($FeCl_3$,$6H_2O$)، TPTZ، سولفات آهن ($FeSO_4,7H_2O$)، اسیدسولفوریک، اسید فسفو تنگستیک، تیوباربیتوریک اسید (TBA) و n- بوتیل الکل از کارخانهMerck خریداری شده اند.

روش تهیه دیازینون

دوز مورد استفاده ۲۵ mg/kg است. این دوز با توجه به مطالعاتی که در گذشته انجام گرفته و در آن‌ها این دوز، هیچ‌گونه اثر توکسیک نداشته اما به‌طور کامل توانسته آنزیم کولین استراز را مهار کند (۱۱)، انتخاب شد. برای تهیه ۱/۵ کیلوگرم غذای آغشته به دیازینون، ٤۷۰mg از دیازینون، نخست در ۱۰ ml روغن ذرت و سپس در تمام روغن ذرت رقیق شده (برای اختلاط بهتر دارو با غذای حیوان) و به‌طور کامل با غذای حیوان آغشته شد. غذای حیوانات هر ۳ روز یک بار تهیه می‌شد (۱۱).

آموزش موش‌های صحرایی

نخست حوضچه آب را تا ارتفاع ۲۵ سانتیمتر با آب ۲۳±۱ درجه سلسیوس پر کرده، به‌طور فرضی حوضچه به ٤ ربع دایره تقسیم می‌شود و در طول ٤ روز آموزش محل سکو در مرکز ربع دایره شمال شرقی ثابت می‌ماند. یک فرستنده امواج مادون قرمز به حیوان متصل شده و مسیر حرکت حیوان با یک دوربین مداربسته به وسیله ردیابی نور مادون قرمز به کامپیوتر منتقل می‌شد. هر موش به مدت ٤ روز و هر روز در یک نوبت شامل ٤ تجربه تحت آموزش قرار گرفت. در هر تجربه، حیوان به‌طوری که صورتش به طرف دیوار باشد از یکی از چهار نقطه شروع (شمال، جنوب، شرق و غرب) در آب رها شد، هر یک از چهار نقطه شروع در هر نوبت یک‌بار استفاده شد و ترتیب آن به صورت تصادفی و با کامپیوتر تعیین می‌شد.

یک تجربه زمانی وقتی تمام می‌شد که موش روی سکو رفته، یا ٦۰ ثانیه از زمان شروع تجربه گذشته باشد. پس از آن ۳۰ ثانیه به حیوان فرصت استراحت داده می‌شد و سپس تجربه بعدی شروع می‌شد. موش‌هایی که محل سکو را در مدت ٦۰ ثانیه پیدا نمی‌کردند، روی سکو منتقل شده و اجازه داشتند ۳۰ ثانیه در آنجا بمانند. پس از اتمام تجربه چهارم، موش‌ها را از حوضچه خارج و خشک می‌کردند (۱۲).

این آزمایش در اتاق مخصوصی انجام می‌شد که علائم قابل رؤیتی مانند صفحه کامپیوتر، نور چراغ مطالعه، در و... در آن وجود داشت و حیوان می‌توانست با استفاده از این علائم موقعیت سکوی پنهان را پیدا کند.

روز اول، حیوان زمان و مسافت زیادی را برای یافتن سکو صرف می‌کرد، روز دوم و سوم این دو پارامتر کاهش یافته و روز چهارم به حداقل می‌رسید. به این ترتیب، در عرض ٤ روز محل سکوی پنهان را یاد گرفته و به خاطر می‌سپرد.

در تمام مدتی که حیوان در تانک برای یافتن سکوی پنهان تلاش می‌کرد، یک منبع نور مادون قرمز به وسیله

کش به بدن حیوان متصل بود و تمامی‌اطلاعات مربوط به حرکت حیوان با یک دستگاه دریافت کننده امواج مادون قرمز جمع‌آوری و در کامپیوتری که به همین منظور برنامه‌ریزی شده بود، ثبت می‌شد.

این اطلات شامل طول زمان یافتن سکو (Escape Latency)، درصد زمان حضور در هر ربع تانک، مسافتی که حیوان سپری می‌کرد، درصد مسافتی که در هر ربع پیموده، درصد ورود به هر ربع تانک، سرعت شنای حیوان و زاویه‌ای که حیوان با آن حرکت خود را آغاز نموده، می باشند.

تیمار حیوانات

حیوانات به مدت ۲، ٤ یا ٦ هفته در شرایط کاملاً یکسان با غذای معمولی آغشته به روغن (بدون دارو) یا غذای آغشته به دارو (گروه تست) تحت تیمار قرار گرفتند، بنابراین ٦ گروه (N=۱۰ در هر گروه) تحت درمان و بررسی قرار گرفتند.

برای بررسی اثر دیازینون روی حافظه جانوران، ٦ گروه از داده‌ها شامل زمان صرف شده برای یافتن سکو، مسافتی که حیوان سپری می‌کرد، سرعت شنای جانور، زمان سپری شده در ربع هدف، مسافت طی شده در ربع هدف و همچنین تعداد دفعاتی که حیوان به ربع هدف وارد شده در گروه‌های مصرف کننده دارو در مقایسه با گروه‌های کنترل مطالعه شد. به محض اتمام دوره چهار روزه آموزش، حیوان برای عملیات خونگیری و نیز خارج کردن مغز آماده شد.

تهیه نمونه‌های خونی از حیوانات

نخست حیوانات به وسیله اتر بیهوش شدند، در موقعیت به پشت خوابیده ثابت شده، با سرنگ ۵ml از قلب آن‌ها خونگیری انجام شد. خون گرفته شده در لوله‌های از هپارینه (۱ ml) وارد شد. سرم خون با کمک دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه جدا شد و در میکروتیوپ‌های دربسته در دمای ۲۰- برای انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد.

تهیه نمونه‌های مغزی

به وسیله اتر، حیوان را کشته و با کمک قیچی مخصوص، انبر و تیغ مخصوص جراحی مغز خارج شد. پس از شستن مغزها با نرمال سالین، هر کدام را در ml ۲۰ بافر استات هموژنایز نموده، سپس مخلوط را در ٦۰۰۰RPM سانتریفوژ کرده و مایع رویی برای انجام مراحل بعدی آزمایش نگه‌داری شد (۱۳).

تهیه معرف FRAP و سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدان

با مخلوط کردن ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات (M ۰/۳ با pH ۳/٦) و ۲/۵ میلی‌لیتر کلریدفریک (M ۰/02) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ M ۰/۰۱۰) TPTZ در اسید کلریدریک M ۰/۰٤) معرف FRAP تهیه شد. این محلول باید تازه تهیه شود و پس از مدت ۳۰ دقیقه کدر می‌شود و دیگر قابل استفاده نیست (۱۳،۱٤).

به ۵۰ میکرولیتر از نمونه پلاسما، ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف آماده FRAP اضافه کرده، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷°C نگه‌داری شد. سپس شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک (۱/۵ml معرف FRAP) خوانده شد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدها

۵۰ میکرولیتر از نمونه سرمی‌هر گروه در لوله آزمایش جداگانه ریخته شده، به هر کدام از لوله‌ها ml ٤ اسید سولفوریک ۰/۰۵M اضافه کرده، به آرامی تکان می‌دهیم، به مخلوط فوق ۰/۵ml اسید فسفو تنگستیک درصد۱۰ اضافه کرده، ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C نگه‌داری شد. سپس مخلوط را در ۳۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب به دست آمده را با ۲ml آب مقطر به‌صورت سوسپانسیون درآورده، ۱ml محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA) درصد ۰/٦۷ به آن اضافه کرده، ٦۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۵°C حرارت داده، سپس در دمای اتاق قرار داده شد تا سرد شود. به هر یک از نمونه‌های حاصل ۲/۵ml n- بوتانل اضافه شده، با همزن برقی به شدت هم زده شد. سپس

نمونه‌ها در ۳۰۰۰RPM به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز بالایی حاوی n- بوتانل است که برای اندازه‌گیری TBA در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک (n- بوتانل) خوانده شد (۱۵).

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

نخست داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way-ANOVA) مقایسه شوند. سپس، برای داده‌های مربوط به تغییرات رفتاری، آزمون multiple Newman-Keuls comparison و برای داده‌های حاصل از بررسی استرس اکسیداتیو، آزمون توکی انجام شد. ۰/۰۵ >Pبه‌عنوان معیار اختلاف معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی اثر آموزش (Training) بر اکتساب حافظه حیوان

تمامی‌گروه‌ها اعم از گروه‌های تستی که دیازینون دریافت کردند و گروه کنترلی که غذای آن‌ها فقط آغشته به روغن ذرت بود، طی چهار روز آموزش در MWM محل سکوی پنهان را به خوبی فرا گرفتند. همان‌طور که در جدول ۱-۳ مشاهده می‌شود، کاهش معناداری بین روز اول و چهارم از نظر زمان (Escape Latency) و مسافت پیموده شده برای یافتن سکوی پنهان در MWM در هر کدام از ٤ گروه مشاهده می‌شود (P< ۰/۰۰۱). با وجود این، تفاوتی در سرعت شنای حیوانات در چهار روز آموزش ایجاد نشده است.

جدول ۱: بررسی اثر آموزش (Training) بر زمان (Escape Latency) ، مسافت طی شده (Traveled Distance) و سرعت یافتن سکوی پنهان (Speed) در Morris water maze.

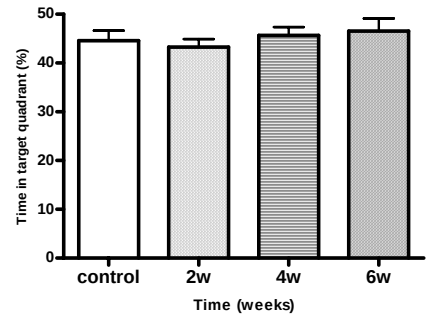
روزهای آموزش	Escapelatency (sec) زمان	Traveled distance(cm)طی مسافت	سرعت شنا(cm/sec)
۱	٤۰/٦٤ ±٥/۱۱	٥۸۲/۳±۱۰٤/۲	۲۰/۳۳±۲/۰۱
۲	۲٤/۸۱±٤/۳۲	٥٥۳/۰±۸٥/۰٥	۲۲۲۲/۸۰±۱
۳	۱٥/۱۲±۳/۰۰	۳۲۹/٥±۷۰/٦۲	۲۳/۱۰±۱/۳۱
٤	۹/۲۸±۲/۰۸***	۲۳۱/۸±٥۱/۲٤***	۲۱/۹۰±۱/٤٦

داده‌ها بر حسب میانگین ± انحراف معیار بیان شده اند.حیوانات گروه کنترل (روغن ذرت) طی چهار روز آموزش در MWM محل محل سکوی پنهان را بخوبی فرا گرفتند و کاهش معنی داری بین روز اول و چهارم از نظر زمان و مسافت پیموده شده جهت یافتن سکوی پنهان مشاهده می شود. (*** P< ۰/۰۰۱, n=10).

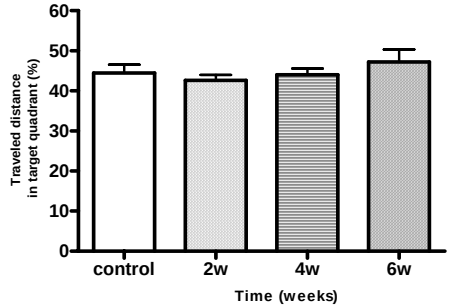
بررسی اثر تجویز دیازینون بر آموزش و بر اکتساب حافظه حیوان

بررسی اثر تجویز دیازینون بر زمان و مسافت طی شده در ربع هدف و تعداد دفعات ورود حیوان به ربع هدف مقایسه داده‌های گروه‌های تحت تیمار با دیازینون با گروه‌های کنترل مربوطه نشان داد، تجویز دیازینون در دوره‌های زمانی ۲، ٤ و ٦ هفته، تفاوت معناداری در پارامترهای زمان صرف شده در ربع هدف، مسافت طی شده در ربع هدف و تعداد دفعات ورود حیوان به ربع هدف را ایجاد نکرده است (نمودار ۲).

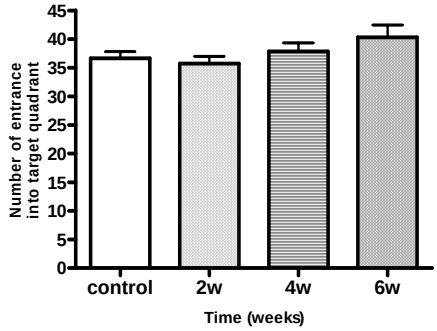
تجویز دیازینون در دوره‌های زمانی ۲، ٤ و ٦ هفته، تفاوت معناداری در پارامترهای زمان و مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در مقایسه با گزوه کنترل نشان نمی‌دهد. همچنین سرعت شنای حیوانات در ۳ گروه ۲و ٤ و ٦ هفته‌ای مصرف کننده دیازینون، تفاوت معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان نمی‌دهند (نمودار ۱).



a



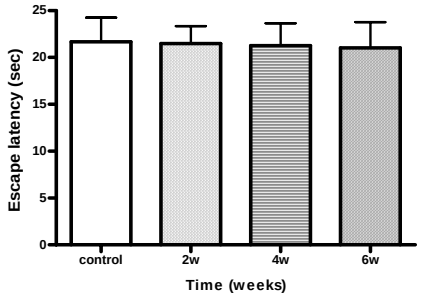
b



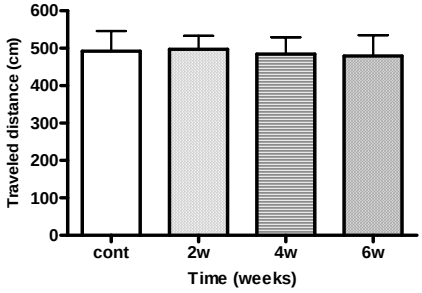
c

نمودار۲: بررسی اثر تجویز دیازینون در دوره‌های زمانی ۲ و ۴ و ۶ هفته بر(a) : زمان ، (b) : مسافت طی شده در ربع هدف و (c): تعداد دفعات ورود حیوان به ربع هدف در Morris water maze

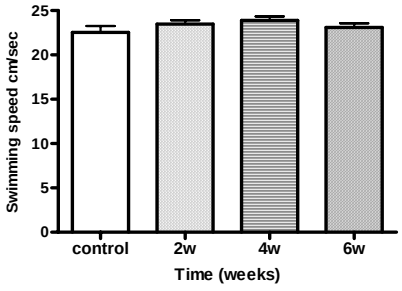
داده‌ها بر حسب mean ±SEM بیان شده و n=۱۰ می باشد.



a



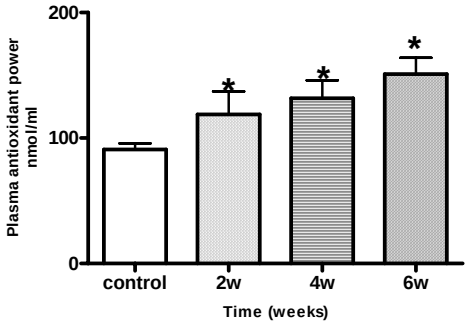
b



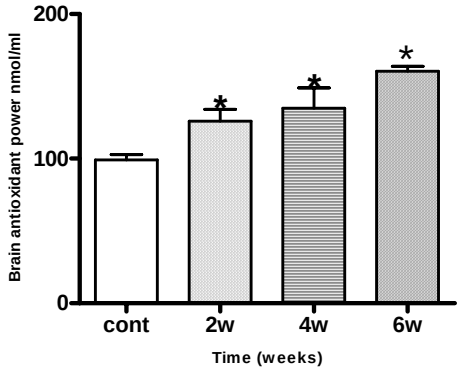
c

نمودار۱: بررسی اثر تجویز دیازینون در دوره‌های زمانی ۲ و ۴ و ۶ هفته بر (a): زمان (Escape Latency) ، (b): مسافت طی شده (Traveled Distance) و (c): سرعت یافتن سکوی پنهان (Speed) در Morris water maze

داده‌ها بر حسب mean ±SEM بیان شده و n=۱۰ می‌باشد.



a



b

نمودار۳: بررسی اثر تجویز دیازینون بمدت ۲و ۴ و۶ هفته برفعالیت آنتی اکسیدانتی (a)پلاسما و (b)مغز.

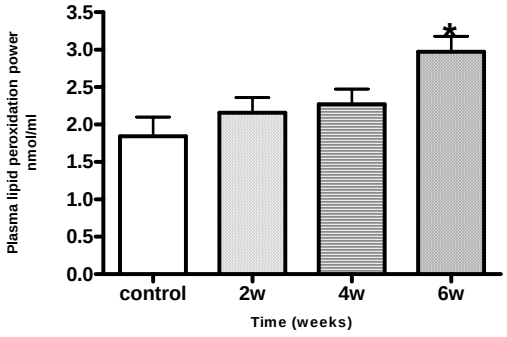
(*) فعالیت آنتی اکسیدانتی پلاسما و نیز مغز در حیواناتی که بمدت۲و ۴و ۶ هفته غذای آغشته به دیازینون مصرف کردند افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد.(P value < ۰/۰۵).داده‌ها بر حسب mean ±SEM بیان شده و n=۱۰ می باشد.

بررسی اثر تجویز دیازینون بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در پلاسما و مغز

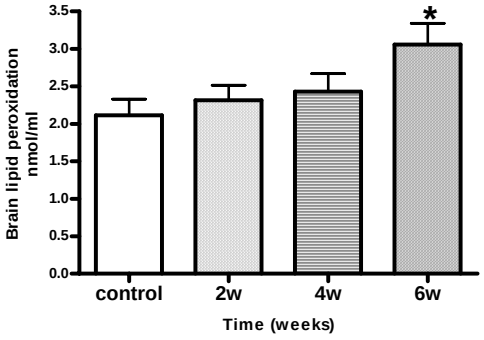
در این بررسی، بلافاصله پس از اتمام آموزش (در انتهای روز چهارم آموزش) از قلب حیوانات در تمامی‌گروه‌ها خونگیری شد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی پلاسما بررسی شد. سپس بلافاصله پس از اتمام خونگیری، اقدام به خارج کردن مغز موش‌ها شد. همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، تجویز دیازینون به مدت۲، ٤ و ٦ هفته نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را در فعالیت آنتی‌اکسیدانتی پلاسما و مغز ایجاد کرده است که این افزایش با مدت زمان مصرف دیازینون ارتباط دارد.

بررسی اثر تجویز دیازینون بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی در پلاسما و مغز

مقایسه داده‌های گروه‌های تحت تیمار با دیازینون با گروه‌های کنترل مربوطه نشان داد، تجویز دیازینون به مدت ٦ هفته افزایش معناداری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی پلاسما و مغز ایجاد می‌نماید. اما، با مصرف دیازینون به مدت ۲ و ٤ هفته، اختلاف معناداری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی در مغز و پلاسما نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی‌شود (نمودار ٤).



a



b

نمودار ۴: بررسی اثر تجویز دیازینون بمدت ۲و ۴ و ۶ هفته بر میزان پر اکسیداسیون لیپیدی (a) پلاسما و (b) مغز. (*)میزان پر اکسیداسیون لیپیدی پلاسما و مغز در حیواناتی که بمدت ۶ هفته غذای آغشته به دیازینون مصرف کردند افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد. ولی در کروه ۲و ۴ هفته اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی شود.(P value < ۰/۰۵). داده‌ها بر حسب mean ±SEM بیان شده و n=۱۰ می باشد.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد، هر چند دیازینون با حداقل دوز سمی‌می‌تواند اکسیداتیو استرس ایجاد می‌کند، اما حتی در طولانی‌مدت تأثیری بر آموزش و اکتساب حافظه نداشته است. در ضمن، آثار اکسیداتیو استرس به تدریج افزیش یافته و در انتها بر پراکسیداسیون چربی نیز سرایت می‌کند.

براساس مطالعات انجام شده، یکی از دلایل تخریب حافظه، عوامل اکسیداتیو استرس است (۱،۸،۱۶،۱۷،۱۸). برعکس، مطالعات بسیاری نقش عوامل آنتی‌اکسیدانت را بر بهبود حافظه نشان داده‌ند (۳،۱۹). از طرفی، نقش استیل‌کولین نیز در بهبود حافظه به اثبات رسیده است (۲۰،۲۱). در این مطالعه تلاش شد، نقش دیازینون به،عنوان یک عامل اکسیدانت و سمی‌بر حافظه در تماس مزمن بررسی شود.

مطالعه حاضر اثر دیازینون را در افزایش ظرفیت و قدرت آنتی،اکسیدانت‌های پلاسما نشان می‌دهد. همچنین این بررسی نشان داد، با مصرف طولانی‌تر آن، مقادیر بیشتری از عوامل آنتی‌اکسیدانت بدن شروع به فعالیت می‌کنند، به طوری که در هفته ششم، بیشترین مقدار فعال‌سازی عوامل آنتی‌اکسیدانت بدن مشاهده می‌شد. این نتیجه ثابت می‌کند، پروسه فعال‌سازی عوامل آنتی‌اکسیدانت بدن در مقابل عوامل استرس اکسیداتیو یک پروسه وابسته به زمان و طول مصرف ارگانوفسفره است.

در بررسی میزان لیپید پراکسیداسیون در ۲ تا ٤ هفته اول، افزایشی در میزان آن در پلاسما و مغز رت‌ها مشاهده نمی‌شود که این توانایی بدن را در تولید عوامل آنتی‌اکسیدانت (۲۲) و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی طی این دوره نشان می‌دهد. اما با ادامه مصرف عامل اکسیدانت به مدت ٦ هفته، بدن همچنان در تلاش برای افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها است که به احتمال این میزان فعالیت برای مهار اثرات مخرب رادیکال‌های اکسیژن ایجاد شده ناشی از مصرف دیازینون کافی نبوده، در نتیجه همزمان با افزایش مدت مصرف آن، افزایش در میزان پراکسیداسیون لیپیدی مشاهده می‌شود. مطالعات پیشین ثابت کرده، استرس اکسیداتیو تولید شده توسط ارگانوفسفره‌ها از جمله دیازینون در رت‌ها (۲۰،۲۳) و انسان‌ها (۲٤،۷) کاملاً به ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن و همچنین پراکسیداسیون لیپیدی مربوط است. این نکته تأیید

می‌کند، با مصرف محدود عامل اکسیدانت، بدن به تنهایی قادر به مقابله با اثرات اکسیداتیو استرس ناشی از آن بوده (۲۲) اما تلاش آنتی‌اکسیدانت‌های بدن در درازمدت به شکست منجر می‌شود و میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از استرس اکسیداتیو افزایش معناداری را نشان می‌دهد. این موضوع با تحقیقات قبلی انجام شده نیز توافق دارد (۲۵).

در بررسی اثر دیازینون بر حافظه انتظار می‌رفت، دیازینون به‌عنوان یک عامل استرس اکسیداتیو بتواند باعث تغییر پارامترهای مربوط به اکتساب حافظه شود. در این مطالعه از Morris water maze برای سنجش حافظه فضایی استفاده شد زیرا انجام فعالیت‌های لازم در این سیستم، نیازمند عملکرد درست حافظه است (۱۲). مطالعات پیشین، اثر عوامل اکسیداتیو را به شکل تخریب و تضعیف حافظه نشان داده‌اند (۱۶،۸،۴). ما نیز انتظار داشتیم، اثر دیازینون را به شکل تخریب حافظه در هفته ششم و در نتیجه افزایش زمان و مسافت طی شده برای یافتن سکو در آن دوره زمانی ببینیم اما به نظر می‌رسد، به‌رغم اثر عامل اکسیدانت بر بدن رت‌ها، این عامل نتوانسته بر پارامترهای اکتساب حافظه اثر بگذارد. در توضیح این نتیجه، دو نکته قابل تأمل است.

اول، مطالعات قبلی نشان داده، تجویز دوز ۲۵ mg/kg دیازینون به رت‌ها اثرات توکسیک نداشته، در عین‌حال می‌تواند به‌طور معناداری فعالیت آنزیم کولین‌استراز را کاهش دهد (۲۱،۲۵،۲۰). به طوری که انتظار می‌رود، در پایان هفته ششم با توجه به نقش استیل‌کولین در بهبود حافظه (۲۶،۲۴)، عدم مشاهده تغییر محسوس در حافظه را به اثر همزمان عامل اکسیدانت در تخریب و همچنین استیل‌کولین در بهبود حافظه مربوط دانست.

نکته دیگر، اهمیت فاکتور زمان در اثرگذاری عامل اکسیدان بر فرایند تخریب حافظه است. در بیشتر بررسی‌های انجام شده، نقش عامل اکسیداتیو بر تخریب حافظه در درازمدت بررسی شده است و شاید ٦ هفته مصرف دیازینون به‌عنوان یک عامل اکسیدان برای مشاهده اثرات آن بر حافظه کافی نباشد.

در مجموع، این مطالعه نشان داد، دیازینون به‌صورت مرکزی و محیطی در موش‌های صحرایی نر سبب اکسیداتیو استرس شده، اما بر پارامترهای اکتساب حافظه تأثیر نداشته و به احتمال اثر همزمان عامل اکسیدانت در تضعیف حافظه با اثر استیل‌کولین (افزایش‌یافته با دیازینون) در بهبود حافظه تداخل داشته است.

منابع

1- Ta CK. Organophosphate pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology. Therap durg Monit. 2002; 24: 144-9.

2- Slotkin TA, Seidler FJ. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate in vivo: transcriptional response of pathways for brain cell development, cell signaling, citotoxicity and neurotransmitter systems. Brain Res Bul. 2007; 72: 232-74.

3- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editors. Principle of neural science. 4th ed. New York: Mc Graw – Hill; 2000: p. 1225-46.

4- Ferslew KE, Hagardon AN, Mc Cormic WF. Poisoning from oral ingestion of carbofuran (Furadan 4F), a cholinesterase inhibiting carbamate insecticide and its effects on cholinesterase activity in various biological fluid. J forens Sci. 1992; 37: 337-44.

5- Peter H, Edward R. Free radicals and disease in man. Physiol Chem physics and medical NMR. 1984; 16: 175-95.

6-Chumnantana R, Yokochi N, Yagi T. Vitamin B6 compounds prevent the death of yeast cells due to menadoine, a reactive oxygen generator. J cell physiol. 2005; 2: 84-91. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A. Pestisides and oxidative stress: a review. Med Sci Monit. 2004; 10: RA 141-7.

8- Saberi M, Baghlani KZ, Zarei A. Effect of diazinone-induced oxidative stress in neuroglial $U_{373}MG$ cell line and its interaction with pyridoxine. Kowsar. 2009;14:1-10.

9- Castellano C, Cabis S, Puglisi-Allegra S. Psychopharmacology of memory modulation: evidence for multiple interactions among neurotransmitters and hormones. Behave Brain Res. 1996; 77: 1-21.

10- Tabor H, Tabor CW, editors. Methods in enzymology. USA: Academic Press; 1971: p 782-8.

11- Wu, H.X., Erreux-Gors, C., Descotes, J., 1996. Diazinon toxicokinetics. tissue distribution and anticholinesterase activity in the rat. Biomed. Environ. Sci. 9, 359 69.

12- McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. Brain Res Rev. 1993; 18: 33-49.

13- Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate- induced effects on antioxidant status of brain of rats following sub chronic exposure. Toxicology 2005; 215: 173-81.

14- Singh M, Sandhir R, Kiran R. Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphate pesticides. India J Exp Biol. 2006; 44: 580-3.

15- Brocardo PS, Pandolfa P. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and /or zinc chloride toxicology. 2005; 207: 283- 91.

16- Delcomyn F, editor, Foundation of neurobiology. New York: W.H. Freeman andCo; 1998: p. 554-80.

17- Levitan I, Kaczmarek LK, editors. The neuron cell and molecular biology. 2nd ed. USA: Oxford University Press Inc;1997: p. 475-507.

18- Shepherd GM, editor. Neurobiology 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1994: p. 585-602.

19- Bliss Tup. Young receptors make smart mice. Nature. 1999; 401: 25-7.

20- Albuquerque EX, Alkondon M, Peria EFR, Gastro NO, Schattenholz A, Barbosa CTF, et al. Properties of neural nicotinic acetylcholine receptor: Pharmacological characterization and modulation of synaptic function. J Pharmacol exp ther. 1997; 289: 1117-36.

21- Blokand A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory. Brain Res Rev. 1996; 21: 283-300.

22- Saberi M, Zarei A. The Protective Effects of N-Acetl-Cysteine, Oxo-Thiazolidine-Carboxylate, Acetaminophen and Their Combinations against Sulfur Mustard Cytotoxicity on Human Skin Fibroblast Cell Line (HF2FF) Iranian Biomedical Journal. 2009;14: 149-155.

23- Baskys A. Remington G, editors. Brain Mechanisms and psychotropic drugs. UK: CRC Press; 1996: p. 73-116.

24- Changeusx JP, Bertrand D, Corringer DJ, Dehaene S, Delstein S, Lena C, et al. Brain nicotinic receptors: Structure and regulation, role in learning and reinforcement. Brain Res Rev. 1998; 26: 198-216.

25- Giordano G, Afsharinejad Z. Organophosphorus insecticides cholorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. Toxicol Appl pharmacol. 2006; 10: 1-2.

26- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, editors. Chemical control of brain and behavior. Neuroscience Exploring the Brain. New York: Williams and Wilkins; 1996: p. 402-32.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.87 June, July 2010

Assessment of diazinone-induced oxidative stress on memory acquisition in male rats

Mahdi Saberi[1*], Shervin Gholizadeh Moghadam[2], Mohammad Sharifzadeh[3]

1- Associate Professor - Department of Pharmacology and Toxicology and Applied Neuroscience Research Center, Baghiatollah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Professor - Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: m_s_saber@yahoo.com

Background and Objective: The brain is vulnerable to the oxidative stress and organophosphates (OP) interaction with the body antioxidant system can induce neuropathy and memory disturbance. Evaluation of minimum toxic dose of diazinone (DZ)-induced oxidative stress and its effects on memory acquisition in male rats.

Materials and Methods: DZ (25 mg/kg, oral) was administered for 2, 4 and 6 weeks. The memory acquisition of the rats were assessed in the Morris water maze (MWM) and then the oxidative stress was evaluated by determination of the malondialdehide (MDA) concentration and measurement of total plasma and brain antioxidant power.

Results: There was not a significant difference between the control and DZ treated groups for time, distance and swimming speed parameters to find invisible stair. However, DZ administration for 2, 4 and 6 weeks time-dependently caused significant increment of antioxidant powers of plasma and brain. Also, DZ could significantly increase the MDA levels of plasma and brain in 6 weeks treated group in comparison with the control.

Conclusion: DZ-induced oxidative stress had no effect on memory acquisition parameters in rats. Regarding the role of acetylcholine in memory improvement, insignificant change in memory acquisition could be related to the concomitant role of oxidative agent in destruction and acetylcholine in amelioration of the memory.

Key words: Organophosphates, Oxidative stress, Memory acquisition, Diazinone, Morris water maze

Received: 6/3/2010
Last revised: 23/6/2010
Accepted: 17/7/2010