

اثر ان استیل سیستئین بر به‌خاطرآوری حافظه، سلول‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و برخی فاکتورهای استرس اکسیداتیو در سطح سرمی خون موش‌های صحرایی تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی

نیلوفر دربندی^{۱*}، سهیلا خسروی^۲، حمیدرضا مومنی^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۰۱/۲۶ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۰۴/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: نانو ذرات اکسید روی به دلیل اندازه‌ی نانو از سدخونی- مغزی عبور کرده و وارد سلول‌های مغز می‌شوند و اثرات مخربی بر بخش‌های مختلف سیستم عصبی دارند. در مطالعه حاضر اثر ان استیل سیستئین بر به‌خاطرآوری حافظه، سلول‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و برخی فاکتورهای استرس اکسیداتیو در سطح سرمی خون موش‌های صحرایی تیمار شده با نانوذرات اکسید روی بررسی شده است.

مواد و روش کار: ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار شامل ۶ گروه: کنترل، گروه‌های نانوذرات اکسید روی (۲/۵، ۱/۲۵، ۱، ۰/۵) و گروه ان استیل سیستئین (۳۰۰ mg/kg) به همراه نانوذرات اکسید روی (۱/۲۵ mg/kg). در کلیه‌ی گروه‌ها سالیین یا نانوذرات اکسید روی ۳۰ دقیقه قبل از آموزش به صورت درون صفاقی تزریق شد. در گروه ان استیل سیستئین به همراه نانوذرات اکسید روی، تزریق ان استیل سیستئین ۵ دقیقه قبل از تزریق نانوذرات اکسید روی انجام شد. پس از آزمون رفتاری مغز حیوانات فیکس و تعداد نورون‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ شمارش شد. در گروه‌های کنترل، نانوذرات اکسید روی (۱/۲۵ mg/kg) و گروه ان استیل سیستئین (۳۰۰ mg/kg) به همراه نانوذرات اکسید روی (۱/۲۵ mg/kg) سطح آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز سرم خون اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: تزریق نانوذرات اکسید روی به طور معناداری به‌خاطرآوری حافظه و تعداد نورون‌های سالم ناحیه‌ی CA1 را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ($P < 0/001$). استفاده از ان استیل سیستئین اثرات ناشی از نانوذرات اکسید روی را بر به‌خاطرآوری، تعداد نورون‌های سالم در ناحیه‌ی CA1 و سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز سرم خون در مقایسه با گروه نانوذرات اکسید روی بهبود بخشید ($P < 0/001$).

بحث و نتیجه‌گیری: بنظر می‌رسد نانوذرات اکسید روی از طریق افزایش استرس اکسیداتیو سبب کاهش به‌خاطرآوری حافظه و مرگ سلولی در نورون‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 می‌شود. ان استیل سیستئین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی از طریق کاهش گونه‌های فعال اکسیژن از اثرات مخرب نانوذرات اکسید روی بر حافظه و نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ جلوگیری می‌نماید.

کلیدواژه‌ها: کاتالاز، ناحیه CA1 هیپوکامپ، به‌خاطرآوری حافظه، ان استیل سیستئین، سوپراکسیددیسموتاز، نانوذرات اکسید روی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره ششم، ص ۴۶۳-۴۵۰، شهریور ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کد پستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶، تلفن: ۰۸۶-۳۴۱۷۳۳۱۷

Email: N-Darbandi@araku.ac.ir

مقدمه

الگوهای رفتاری متعددی برای سنجش حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد. یک مدل رفتاری برای سنجش اثر داروها بر حافظه، مدل یادگیری اجتنابی مهاري (غیرفعال) است که به صورت گسترده در مطالعات فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی، جهت

حافظه قابلیت کسب، نگه‌داری و بازیابی اطلاعات است که به روش‌های مختلف طبقه‌بندی می‌گردد. مکانیسم‌های پیچیده‌ای در فرآیند حافظه و یادگیری نقش دارند که در نهایت منجر به تغییرات فیزیولوژیکی در سطح سیناپسی و شبکه‌های عصبی می‌گردد (۱).

^۱ استادیار فیزیولوژی جانوری، دانشگاه اراک، اراک، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه اراک، اراک، ایران

^۳ دانشیار فیزیولوژی جانوری، دانشگاه اراک، اراک، ایران

بررسی حافظه بلندمدت و اثر نوروترانسمیترها استفاده می‌شود (۲-۳).

اگرچه حافظه در ارتباط با قسمت‌های مختلفی از سیستم عصبی مرکزی است، اما به نظر می‌رسد، قسمت‌هایی از سیستم لیمبیک مانند هیپوکامپ نقش بسیار مهمی را در حافظه کوتاه‌مدت و بلندمدت ایفا می‌کنند. هیپوکامپ با ساختمان هلالی شکل که در کف بطن چهارم قرار دارد یکی از ساختارهای قدیمی در مغز انسان است. شواهد زیادی در دست است که نئوکورتکس، قشرهای ارتباطی و برخی ساختارهای دیانسفال مانند سابیکولوم، قشر انتورینال، قشر پراهیپوکامپال و به‌خصوص هیپوکامپ برای تشکیل حافظه ضروری هستند (۴).

نانوذرات اکسید روی یکی از پرکاربردترین نانوذراتی است که در حوضه‌ی صنعت، پزشکی و بهداشت مورد استفاده‌ی زیادی دارد (۵). این ذرات در حال حاضر در بسیاری از محصولات مانند خمیردندان، محصولات زیبایی، کرم‌های ضدآفتاب، منسوجات، رنگ دیوار و ساختمان کاربرد دارد. نانوذرات به‌علت سایز کوچکتر نسبت به نوع معمولی خود توانایی بیش‌تری برای عبور از سد‌های بیولوژیکی دارند و به‌راحتی وارد مغز می‌شوند (۵). نانوذرات اکسیدروی به‌دلیل خواص منحصربه‌فرد خود جزء مهم‌ترین ترکیبات پرمصرف دارویی است. برای نمونه به‌عنوان حامل داروهای مختلف، عوامل تحریک‌کننده‌ی رشد نورون‌ها، به‌عنوان میکروبوکس در داروهای ضدباکتری به‌کار رفته و به‌تازگی اثر ضد دردی آن نشان داده شده است (۶). نتایج مطالعات حیوانی اثرات سمیت نانوذرات اکسیدروی را بر ریه‌ها، کبد، کلیه، معده، پانکراس، طحال، بیضه، تیموس، قلب، مغز و خون نشان داده و کاربرد آن را به‌عنوان یک روش درمان سرطان و بیماری‌های خود ایمنی در نظر گرفته است (۶). مشخص شده که این نانوذرات می‌تواند در حیوانات پس از تجویز خوراکی و یا استنشاقی به مغز رسیده و با تغییر شکل‌پذیری سیناپسی سبب القاء تغییرات در توانایی یادگیری و حافظه فضایی شود (۷). نانوذرات اکسید روی سبب کاهش قابل توجه در میزان بازیابی حافظه درازمدت در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال درموش‌های صحرایی می‌شود (۵، ۷، ۸، ۹). نانوذرات اکسیدروی قادر است حافظه فضایی را در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در ماز آبی موریس مختل کند (۱۰-۱۱).

ان‌استیل‌سیستئین یکی از مشتقات استیل‌هی اسیدآمینو سیستئین است که امروزه در درمان روان‌پریشی و بیماری‌های نورولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان داده است که این ماده ممکن است فرآیندهای پاتوفیزیولوژیکی مانند استرس اکسیداتیو، دژنره‌شدن نورون‌ها، آپوپتوزیس، نقص عملکرد میتوکندریایی، تورم نورونی و نقص در تنظیم سیستم‌های

انتقال‌دهنده عصبی دوپامین و گلوتامات را تعدیل نماید (۱۲-۱۳). مطالعات زیادی در خصوص تاثیرات ان‌استیل‌سیستئین در یادگیری و حافظه انجام شده که نشان دهنده اثر مثبت این ترکیب شیمیایی در کاهش پارامترهای استرس اکسیداتیو و مارکرهای التهابی، همچنین بهبود حافظه و یادگیری در مازهای مختلف حافظه است (۱۲، ۱۴، ۱۵).

با توجه به نقش کلیدی هیپوکامپ در حافظه و یادگیری، در پژوهش حاضر اثر نانوذرات اکسید روی بر به‌خاطرآوری حافظه و سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین جهت تشخیص مکانیسم احتمالی نانوذرات اکسید روی برخی از آزمون‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سرم خون نیز به‌طور هم‌زمان مورد ارزیابی قرار گرفته است

مواد و روش کار

حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری:

در این مطالعه پژوهشی اصیل (تجربی) از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۲۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد شامل دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات یک هفته پیش از شروع آزمایش هر روز دست‌آموز می‌شدند تا در زمان آزمایش استرس ناشی از گرفتن و کار با آنها وجود نداشته باشد. کلیه آزمایش‌ها در زمان معینی از روز (۱۶-۱۱) انجام شد. هشت حیوان به‌طور تصادفی در هر گروه تجربی قرار داشت و هر حیوان فقط یک‌بار آزمایش می‌شد. در راستای انجام این تحقیق کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مدنظر قرار گرفته شد (شماره کد اخلاقی: ۱۳۹۵، ۳۶۳).

داروها:

نانوذرات اکسید روی (ساخت شرکت Tecnan اسپانیا با خلوص ۹۹/۹٪ و اندازه‌ی ۳۰-۲۰ نانومتر) در دوزهای مورد نیاز به‌صورت روزانه و ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش در سرم فیزیولوژیک ۰/۹٪ حل و به کمک حمام اولتراسونیک (مدل PARSONIC 2600s) - شرکت پارس سهند ایران) پراکنده و قبل از هر بار تزریق نیز ترکیب مجدداً به مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه شیکر (مدل ZX3 - ایتالیا)، مخلوط می‌شد (۸). ان‌استیل‌سیستئین (سیگما-آمریکا) به‌صورت محلول در نرمال سالین با دوز (۳۰۰ mg/kg) به‌صورت درون صفاقی مورد استفاده قرار گرفت (۱۴، ۱۶).

گروه‌های آزمایشی و آزمایشات انجام شده:

حیوان وارد خانه سیاه شود ثبت می‌گردد. اما این بار بلافاصله پس از ورود کامل حیوان به خانه سیاه و پایین آوردن درب گیوتینی با روشن کردن استیمولاتور، تحریک الکتریکی به مدت ۳ ثانیه به پاهای موش وارد می‌شود. با توجه به بسته بودن سقف این بخش، موش نمی‌تواند از شوک الکتریکی اجتناب کند (شوک اجتناب ناپذیر). پس از ۲۰ ثانیه موش از این محیط خارج و به قفس نگهداری منتقل می‌گردد. دو دقیقه بعد این مراحل تکرار می‌شود. اگر حیوان قبل از ۱۲۰ ثانیه وارد خانه سیاه می‌شود برای بار دوم تحریک الکتریکی (با شدت کمتر) دریافت می‌کند، در غیر این صورت یادگیری اجتنابی غیرفعال درحافظه موش شکل گرفته بود از این رو، حیوان به قفس مربوطه منتقل می‌شود. حداکثر دفعات آموزش به هر حیوان ۳ بار می‌باشد، در صورتیکه بعد از سه بار آموزش حیوان دوباره وارد خانه سیاه شود از ادامه روند آزمایشات حذف می‌شود (۱۷).

مرحله آزمون ۲۴ ساعت بعد از مرحله آموزش و بدون تحریک انجام می‌شود. در این مرحله همانند روز آموزش حیوان در قسمت روشن دستگاه قرار می‌گردد و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز شده و زمان تأخیر حیوان برای ورود به قسمت تاریک STL^۱ و کل مدت زمان ماندن حیوان در قسمت تاریک TDC^۲ به عنوان معیاری برای میزان به یادآوری حافظه ثبت می‌شود. بیشترین زمان تأخیر برای ورود به قسمت تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شود. در روز آزمون هیچ‌گونه شوکی به حیوان وارد نمی‌شود (۱۴، ۱۷).

پرفیوژن قلبی و مطالعه بافت شناسی:

پس از پایان تیمار و انجام آزمون رفتاری پرفیوژن مغزی آغاز شد. برای انجام این مرحله ابتدا حیوانات بی‌هوش شدند، سپس با تشخیص محل استخوان جناغ، پوست و سپس ماهیچه‌های روی آن با کمک قیچی بریده شد. برای دسترسی آسان به قلب پرده دیافراگم بریده شده و ابتدا سرم فیزیولوژیکی ۰/۹ درصد و سپس محلول پارافرمالدهید ۴۰ درصد به‌عنوان فیکساتیو به بطن چپ تزریق و دهلیز راست برای خروج خون از بدن با کمک قیچی برش داده شد. پس از اتمام پرفیوژن به کمک استخوان‌شکن سر حیوان جدا و مغز از مجامه خارج شد. مغز فیکس شده در محلول فیکساتیو به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری شد. پس از آن تمام مراحل پاساژ بافتی شامل قرارگیری نمونه‌ها در دستگاه پاساژ (Leica, Histokinette) - آلمان، بلوک‌گیری (DS-L4)، برش‌گیری بافتی در ناحیه CA1 هیپوکامپ توسط میکروتوم (Leitz 1512) و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با کمک روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و در نهایت مشاهده

الف) گروه کنترل: این گروه ۳۰ دقیقه قبل از آموزش سالیین (۱ ml/kg) را به‌صورت درون صفاقی دریافت کرد.

ب) گروه‌های دریافت کننده نانوذرات اکسید روی: در چهار گروه آزمایشی به ترتیب دوزهای ۲/۵ mg/kg و ۱/۲۵، ۱، ۰/۵ نانوذرات اکسید روی به‌صورت درون‌صفاقی نیم ساعت قبل از آموزش تزریق شد. در گروه پنجم ابتدا آن‌استیل‌سیستین (۳۰۰ mg/kg) به‌صورت درون‌صفاقی به حیوانات تزریق شد. پس از گذشت ۵ دقیقه نانوذرات اکسید روی با غلظت ۱/۲۵ mg/kg به‌صورت درون صفاقی تزریق و پس از ۳۰ دقیقه حیوانات وارد مرحله‌ی آموزش شدند.

کلیه‌ی حیوانات در گروه‌های کنترل و آزمایشی ۲۴ ساعت بعد مورد آزمون حافظه قرار گرفتند، سپس حیوانات در هر گروه به‌صورت تصادفی به دو گروه ۴ تایی تقسیم شدند. یک گروه جهت پرفیوژن مغزی و مطالعات بافتی و گروه دیگر جهت آزمایش‌های اندازه‌گیری متغیرهای سرم خون مورد استفاده قرار گرفت.

روش ارزیابی حافظه: دستگاه سنجش حافظه از جنس

پلکسی گلاس (ساخت شرکت برج صنعت تهران) و دارای دو سمت مجزا یکی به رنگ سیاه (۳۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر) و دیگری به رنگ سفید (۳۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر) است که توسط یک درب گیوتینی (۷×۹ سانتی‌متر) واقع در دیواره میانی این دو بخش به یکدیگر راه دارند. در کف بخش سیاه‌رنگ میله‌های فلزی به قطر ۲/۵ میلی‌متر و فواصل ۱ سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفته است. هنگامی که دستگاه روشن می‌شود یک جریان الکتریکی به مدت ۳ ثانیه و شدت ۱ میلی‌آمپر در میله‌های فلزی برقرار می‌شود (۱۷).

یادگیری اجتنابی غیرفعال به‌روش گذر از یک بخش دستگاه به بخش دیگر (Step through) برای بررسی حافظه در موش‌های آزمایشگاهی در دو روز پشت سر هم انجام می‌شود. روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوانات در دستگاه می‌باشد، روز دوم یا روز آزمون شامل بررسی میزان حافظه حیوانات آموزش دیده است. در روز آموزش هر حیوان به‌آرامی در بخش روشن دستگاه قرار گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز شد. مدت زمانی که طی شد تا موش وارد خانه سیاه شود، ثبت گردید. حیواناتی که بیشتر از ۱۰۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک تأخیر داشته باشند، از ادامه آزمایش حذف می‌شوند. زمانی که حیوان با ۴ پا وارد خانه سیاه شد، درب گیوتینی پایین آمده و حیوان به قفس خود برگردانیده می‌شود. سی دقیقه بعد دوباره حیوان درخانه سفید قرار می‌گردد و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی بالا رفته و مدت زمانی که طول می‌کشد تا

یافته‌ها

آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مکمل Tukey داده‌های حاصل از تزریق نانوذرات اکسید روی نشان داد که تزریق نانوذرات اکسید روی (۲/۵، ۱/۲۵، ۱، ۰/۵) ۳۰ دقیقه از آموزش، به‌طور وابسته به دوز باعث کاهش زمان ورود به اتاق تاریک (STL) (نمودار ۱- الف) [$F(۵,۳۸)=۱۷۷/۳۵$, $P<۰/۰۰۱$] و همچنین افزایش مجموع مدت زمان باقی‌ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC) (نمودار ۱- ب) [$F(۵,۳۸)=۱۰/۶۴$, $P<۰/۰۰۱$]. نسبت به گروه کنترل می‌شود که به معنی تخریب حافظه است.

آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از تزریق داروی ان‌استیل‌سیستئین به‌همراه نانوذرات اکسید روی نشان داد که تزریق ان‌استیل‌سیستئین (۳۰۰ mg/kg)، ۵ دقیقه قبل از تزریق نانوذرات اکسید روی (۱/۲۵ mg/kg) قادر است نقص حافظه‌ی ناشی از نانوذرات اکسید روی را جبران نماید ($P<۰/۰۰۱$). آزمون مکمل Tukey نشان داد که تزریق ان‌استیل‌سیستئین، ۵ دقیقه قبل از تزریق نانوذرات اکسید روی قادر است به‌طور معناداری باعث افزایش تأخیر در ورود به خانه تاریک (STL) (نمودار ۲- الف) [$P<۰/۰۰۱$], $F(۲,۱۷)=۲۶۴/۷۸$ و همچنین باعث کاهش مجموع زمان باقی‌ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC) (نمودار ۲- ب) [$P<۰/۰۰۱$], $F(۲,۱۷)=۱۸/۹۹$ نسبت به گروه دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی شد و این مقادیر را به حد گروه کنترل رساند.

برش‌های بافتی حاصل از گروه کنترل نشان داد سلول‌های موجود در ناحیه CA1 هیپوکامپ در این گروه به‌صورت دایره‌های منظم با هسته‌ای در مرکز آن است و تراکم نورون‌ها در این لایه زیاد است (شکل ۱A). همچنین این نورون‌ها در مغز موش‌های صحرایی گروه دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی با مقادیر ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تغییر معناداری نسبت به گروه کنترل نشان نداد (شکل ۱B و ۱C) ($P>۰/۰۵$). در حالی که تراکم این نورون‌ها در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی با مقادیر ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به‌صورت معناداری کاهش یافته و نورون‌ها دچار مرگ سلولی و تغییر حالت شده بود. (شکل D1 و E1) ($p<۰/۰۰۱$). برش‌های بافتی حاصل از گروه تیمار با ان‌استیل‌سیستئین (۳۰۰ mg/kg)، به‌همراه تزریق نانوذرات اکسید روی (۱/۲۵ mg/kg) نشان داد، تعداد نورون‌های سالم در برش‌های بافتی به‌طور معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی (۱/۲۵ mg/kg) افزایش یافت و به حد گروه کنترل رسید (شکل F1) ($p<۰/۰۰۱$).

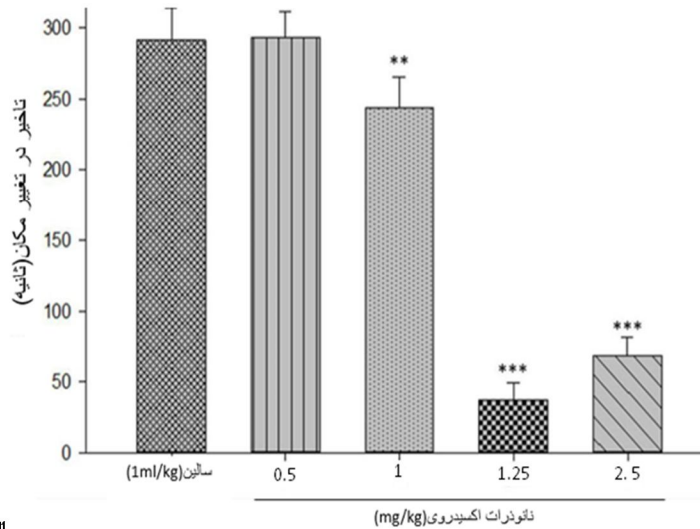
نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX41TE) انجام شد. جهت شمارش نورونی از نرم‌افزار image استفاده شد. در این روش حداقل از چهار میدان دید در هر لام به‌صورت تصادفی عکس گرفته شد و سپس به کمک نرم افزار تعداد نورون‌های سالم و نورون‌هایی که دچار مرگ سلولی شده بودند شمارش شد. به دلیل رنگ‌آمیزی مشخص و وضوح نورون‌ها و به دلیل استفاده از نرم افزار مذکور اختلاف بین نورون‌ها به‌صورت کمی بررسی و گزارش شد.

خون‌گیری و تهیه‌ی سرم:

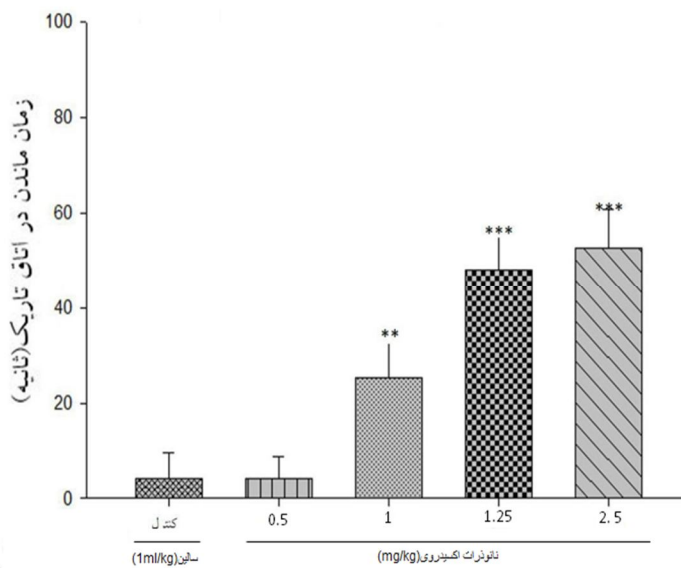
پس از انجام آزمون رفتاری، حیوانات توسط دی‌اتیل‌تری‌هوش و با استفاده از سرنگ ۵ سی‌سی خون‌گیری از بطن راست قلب انجام گرفت. خون به کمک دستگاه سانتریفوژ (مدل universal - آلمان) با دور ۱۳۳۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس با استفاده از سمپلر سرم خون جدا و مجدداً با دور ۱۳۳۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سرم حاصل بر حسب مقادیر مورد نیاز تقسیم‌بندی و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان خواندن طول موج به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (T80+, PG Instrument Ltd - لندن) نگهداری شد. اندازه‌گیری سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به کمک ترکیبی به نام پیروگالول اندازه‌گیری شد، که در محلول آبی یا قلیایی به‌سرعت اتواکسیداسیون می‌شود. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از اتواکسیداسیون پیروگالول جلوگیری می‌کند از این اصل برای اندازه‌گیری سطح این آنزیم در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده می‌شود (۱۸). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز در سرم خون از روش Aebi استفاده شد. این روش بر اساس سنجش اسپکتروفتومتری تجزیه H_2O_2 است که مستقیماً با کاهش جذب آن در ۲۴۰ نانومتر در واحد زمان و در فواصل زمانی صفر و سه دقیقه همراه می‌باشد (۱۹).

تحلیل آماری:

آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش‌های رفتاری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ صورت گرفت و با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way Anova) و آزمون توکی (Tukey-test) سطح معنادار بودن آن‌ها تعیین شد. آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش‌های بافتی توسط نرم افزار Prisme و با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه صورت گرفت. سطح معناداری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

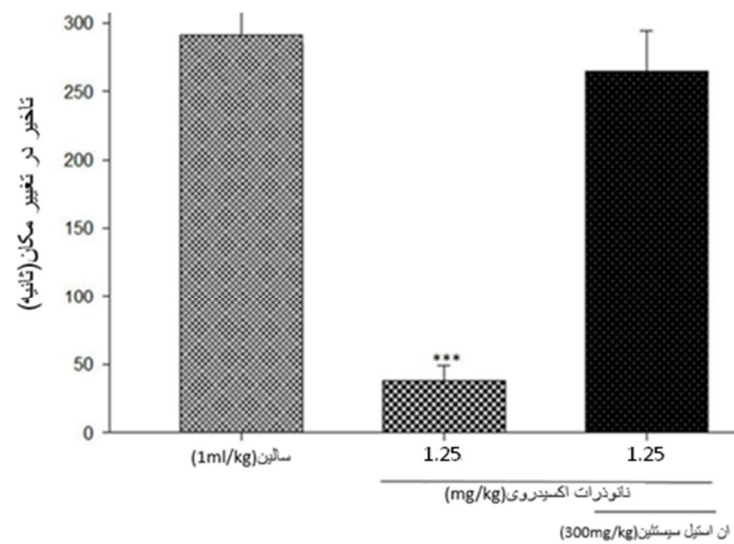


الف

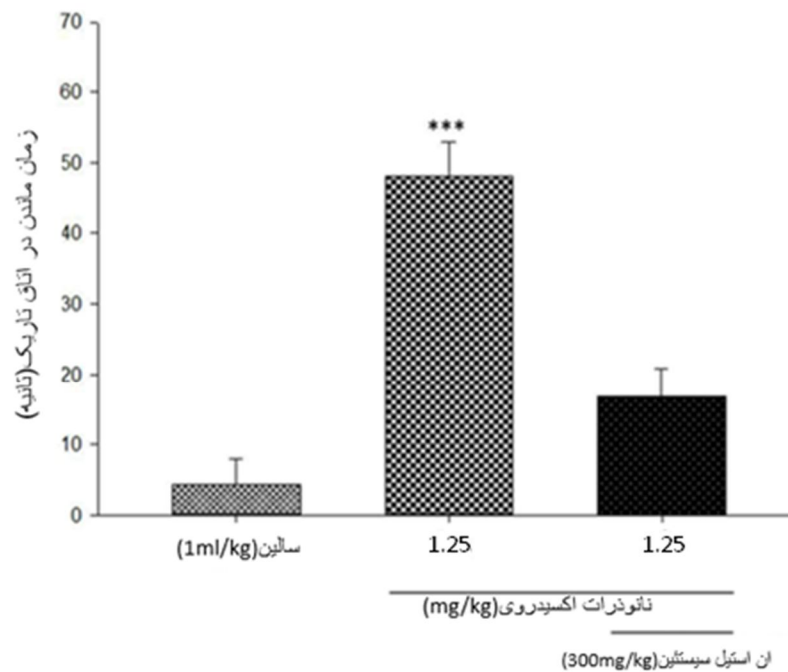


ب

نمودار (۱): اثر نانوذرات اکسید روی بر تخریب حافظه در مقایسه با گروه کنترل. این نمودار نشان می‌دهد که تزریق نانوذرات اکسید روی ۳۰ دقیقه قبل از آموزش، به‌طور وابسته به دوز سبب افزایش تأخیر در ورود به اتاق تاریک (STL)، (نمودار الف) و کاهش مجموع مدت زمان باقی‌ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC)، (نمودار ب) نسبت به گروه کنترل می‌شود. نتایج به صورت (Mean±SEM) و با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مکمل Tukey برای هشت سر حیوان می‌باشد ($P < 0.001$ و $P < 0.01$).

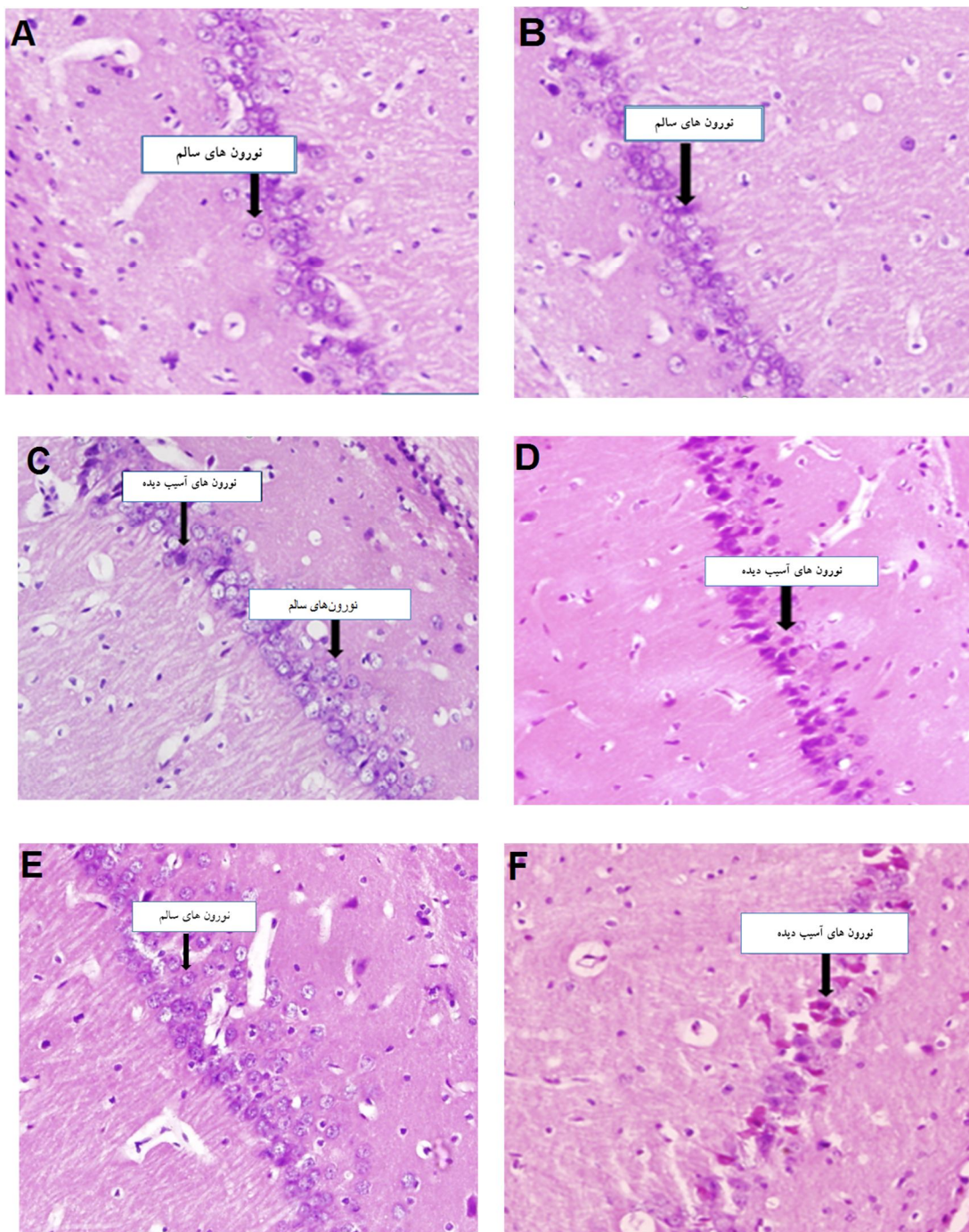


الف



ب

نمودار (۲): اثر تزریق ان استیل سیستین بر نقص حافظه ناشی از نانوذره‌ی اکسید روی در مقایسه با گروه کنترل. این نمودار نشان می‌دهد که تزریق ان استیل سیستین، ۵ دقیقه قبل از تزریق نانوذرات اکسید روی قادر است به طور معناداری باعث افزایش تأخیر در ورود به اتاق تاریک (STL)، (نمودار الف) و کاهش مجموع زمان باقی ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC)، (نمودار ب) نسبت به گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید روی شد و این مقادیر را به حد گروه کنترل رساند. نتایج به صورت (Mean±SEM) و با کمک آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مکمل Tukey برای هشت سر حیوان می‌باشد ($P < 0.001$).



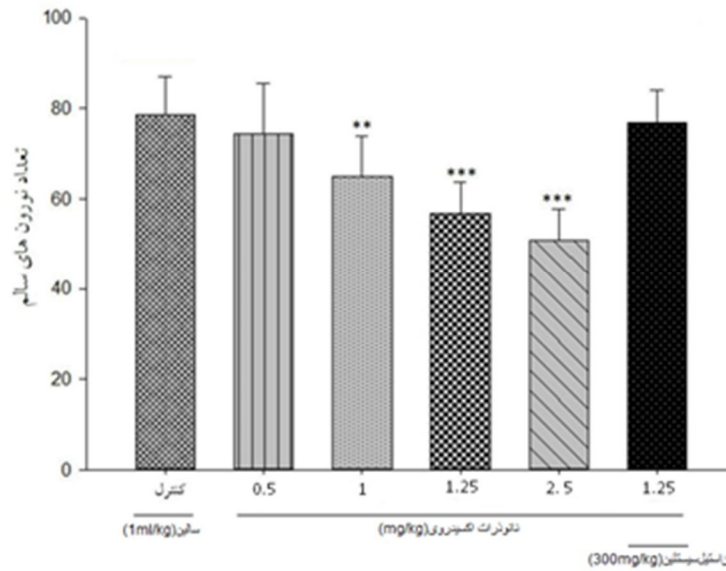
شکل (۱): برش‌های بافتی از ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در گروه‌های آزمایشی: گروه کنترل (A)، گروه‌های تیمار شده با نانوذرات اکسید روی (۲/۵، ۱/۲۵، ۱، ۰/۵) به ترتیب (B-E) و گروه تیمار شده با ان‌استیل‌سیستئین (۳۰۰ mg/kg) به‌همراه نانوذرات اکسید روی (۱/۲۵ mg/kg) (F) (بزرگنمایی $\times 400$).

سالم در گروه‌های تیمار شده با نانوذرات اکسید روی (۲/۵ mg/kg)، ۱/۲۵، ۱، ۰/۵) به‌طور وابسته به دوز نسبت به گروه کنترل کاهش

شمارش تعداد نورون‌های سالم در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در برش‌های بافتی گروه‌های مختلف نشان داد که تعداد نورون‌های

منجر به افزایش معنادار تعداد نوروں‌های سالم نسبت به گروه نانوذرات اکسید روی ($1/25\text{mg/kg}$) شد و به حد گروه کنترل رسید ($p < 0/05$) (نمودار ۳).

یافته است. در گروه تیمار هم‌زمان اناستیل‌سیستین (300mg/kg) و نانوذرات اکسید روی ($1/25\text{mg/kg}$)، تزریق اناستیل‌سیستین ۵ دقیقه قبل از تزریق نانوذرات اکسید روی



نمودار (۳): مقایسه تعداد نوروں‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مختلف. این نمودار نشان دهنده تفاوت در تعداد سلول‌های سالم در گروه کنترل با گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای مختلف نانوذرات اکسید روی است. تعداد نوروں‌های سالم در گروه دریافت‌کننده اناستیل‌سیستین به همراه نانوذرات اکسید روی ($1/25\text{mg/kg}$) تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت. نتایج به صورت $(\text{Mean} \pm \text{SEM})$ و با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مکمل Tukey برای هشت سر حیوان می‌باشد ($P < 0/01$ و $P < 0/001$).

داده‌های حاصل از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد تزریق نانوذرات اکسید روی ($1/25\text{mg/kg}$) به صورت درون‌صفافی منجر به کاهش معنادار سطح آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز [$F(3, 8) = 490/68, p < 0/001$] و کاتالاز [$F(3, 8) = 46/97, p < 0/001$] سرم خون نسبت به گروه دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی ($1/25\text{mg/kg}$) شد و آن را به حد گروه کنترل رساند (جدول ۱).

داده‌های حاصل از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد تزریق نانوذرات اکسید روی ($1/25\text{mg/kg}$) به صورت درون‌صفافی منجر به کاهش معنادار سطح آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز سرم خون در مقایسه با گروه کنترل می‌شود ($p < 0/001$). تزریق درون‌صفافی اناستیل‌سیستین

نمودار (۱) (ردیف اول): ارزیابی آنزیم سوپراکسیددیسموتاز سرم خون (U/ml) در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل، (ردیف دوم): ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز سرم خون (U/ml) در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل. مقادیر به صورت $(\text{Mean} \pm \text{SEM})$ برای چهار سر حیوان بیان شده است ($P < 0/001$).

گروه‌ها/فاکتور	کنترل	نانوذرات اکسید روی ($1/25\text{mg/kg}$)	اناستیل‌سیستین (300mg/kg) + نانوذرات اکسید روی ($1/25\text{mg/kg}$)
آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (U/ml)	$10/6 \pm 0/187$	$5/57 \pm 0/272^{***}$	$10/25 \pm 0/164$
آنزیم کاتالاز (U/ml)	$6/0 \pm 4/281$	$4/5 \pm 0/187^{***}$	$6/0 \pm 4/104$

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر استفاده از مواد در مقیاس نانو به‌سرعت توسعه یافته و عناصر اکسید شده مانند اکسید روی به‌صورت نانوذره تولید و در موارد گوناگون استفاده می‌گردند. استفاده وسیع از این نانوذرات سبب شده تا به‌سرعت وارد محیط زیست و زندگی انسان گردند. نانوذرات به‌علت سایز کوچکتر نسبت به نوع معمولی خود توانایی بیش‌تری برای عبور از سد‌های بیولوژیکی دارند و به راحتی وارد مغز می‌شوند. شواهد تجربی نشان می‌دهد که آغاز و ترویج بیماری‌های عصبی با تجمع و انباشتگی غلظت بالای فلزات آهن، روی و مس همراه بوده و سبب از دست دادن عمل‌کردهای مغزی و همچنین آسیب به سلول‌های مغزی می‌شوند. (۷، ۲۰، ۲۱) به این ترتیب بررسی اثرات این نانوذرات بر سیستم عصبی بسیار پر اهمیت به‌نظر می‌رسد.

در تحقیق حاضر تزریق نانوذرات اکسید روی ۳۰ دقیقه قبل از آموزش، به‌طور وابسته به دوز باعث کاهش زمان ورود به اتاق تاریک (STL) و همچنین افزایش مجموع مدت زمان باقی‌ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC) نسبت به گروه کنترل شد که به‌معنی تخریب حافظه است. همچنین شمارش تعداد نورون‌های سالم در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در برش‌های بافتی گروه‌های مختلف نیز نشان دهنده کاهش تعداد نورون‌های سالم در گروه‌های تیمار شده با نانوذرات اکسید روی در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. تحقیقات گذشته نیز در جهت تأیید نتایج حاصل از این تحقیق است. نانوذرات اکسیدروی ($\Delta\text{mg/kg}$) سبب کاهش قابل توجه در میزان بازیابی حافظه درازمدت در مدل یادگیری اجتنابی غیرفعال درموش‌های صحرایی می‌شود (۸-۹). در تحقیقات دیگری که با استفاده از حافظه اجتنابی مهاری مدل Step down انجام گرفت، مشخص شد نانوذرات اکسید روی (5 و $2/5$ mg/kg) سبب آسیب شناخت فضایی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار می‌شود (۵-۷). نانوذرات اکسیدروی قادر است حافظه فضایی را در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در ماز آبی موریس مختل کند (۱۰-۱۱). یون روی آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی است. نانوذرات اکسید روی سبب کاهش فعالیت گیرنده NMDA و در نتیجه اختلال در عمل‌کرد حافظه می‌گردد (۸-۲۲). تحقیقات نشان داده است این یون قادر است از مسیرهای مختلف از جمله: گیرنده‌های گلوتاماتی و کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L^2 وارد نورون شود. یون روی در مقادیر کم موجب یادگیری و حافظه شده اما زمانی که مقدار آن از حد مشخصی بیشتر شود، سبب تخریب

نورون و کاهش حافظه و یادگیری می‌شود. افزایش یون روی و گلوتامات در فضای سیناپسی با تأثیر بر گیرنده‌های گلوتاماتی و کانال‌های کلسیمی سبب ورود یون‌های مثبت از جمله روی و کلسیم به داخل سلول می‌گردند. افزایش یون کلسیم با به‌راه‌اندازی واکنش‌ها و مکانیسم‌های مخصوص به خود سبب مرگ نورون می‌شود (۲۲). از طرفی تحقیقات نشان داده است نانوذرات اکسید روی با حمله به سلول‌های بتای پانکراس، سبب تخریب این سلول‌ها و کاهش هورمون انسولین در بدن می‌شود. با کاهش انسولین، فسفریلاسیون پروتئین کینازهای JNK⁴ و GSK-3 β ⁵ در سلول کاهش یافته و سبب افزایش کلاف‌های نوروفیبریلی و پلاک‌های آمیلوئیدی و به‌دنبال آن آتروفی و مرگ نورونی در نواحی مختلف مغز از جمله هیپوکامپ می‌شود (۲۳). این نانوذرات در سلول با اثر بر اندامک میتوکندری سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و مرگ سلولی می‌شوند. قرار گرفتن در معرض مقادیر مختلف نانوذرات اکسید روی سبب ایجاد استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب غشای سلولی و آسیب به DNA می‌شود (۲۴-۲۵). در سال‌های اخیر، شواهد زیادی نشان داده است مواد نانو، از جمله نانوذرات اکسید روی ممکن است اثرات سمی بر سیستم عصبی مرکزی داشته و منجر به سمیت سلولی، سمیت ژنتیکی، القاء استرس اکسیداتیو و التهاب می‌گردد (۷-۲۱). علاوه بر آن افزایش یون روی در خون سبب آسیب به گلبول‌های خون شده و ایسکمی را به‌همراه دارد. ایسکمی حاصل به بخش‌های مختلف بدن از جمله مغز، نخاع، کبد، کلیه و مثانه آسیب وارد می‌نماید. آسیب وارد شده به مغز می‌تواند سبب مرگ نورون و کاهش توانایی حافظه و یادگیری گردد (۸).

نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر همچنین نشان داد تزریق ان‌استیل‌سیستین (300 mg/kg)، ۵ دقیقه قبل از تزریق نانوذرات اکسید روی ($1/25$ mg/kg) قادر است به‌طور معناداری باعث افزایش تأخیر در ورود به خانه‌ی تاریک (STL) و کاهش مجموع زمان باقی‌ماندن حیوان در اتاق تاریک (TDC) نسبت به گروه کنترل شود. به این ترتیب ان‌استیل‌سیستین قادر است نقص حافظه‌ی ناشی از نانوذره‌ی اکسید روی را جبران نماید. همچنین در گروه تیمار همزمان ان‌استیل‌سیستین و نانوذرات اکسید روی تعداد نورون‌های سالم نسبت به گروه نانوذرات اکسید روی به‌طور معناداری افزایش یافت و به حد گروه کنترل رسید. پژوهش‌های گذشته نیز در جهت تأیید نتایج حاصل از این پژوهش می‌باشند. تزریق خوراکی ان‌استیل‌سیستین (50 mg/kg) در طی ۹ روز در موش منجر به

5 - Glycogen synthase kinase β

3 voltage-gated L-type Ca channels

4 - jun-N-terminal kinase

بنای لنفوسیتی BCL-2⁺ شود. این پروتئین‌ها از طریق حفاظت از نورون‌ها و کاهش آپوپتوزیس سبب افزایش نورون‌زایی می‌گردند. ان استیل‌سیستئین دارای خواص ضد التهابی است که این خواص به مسیرهای اکسیداتیو متصل است (۲۹). همچنین از آنجا که افزایش بیش از حد کلسیم در سیتوپلاسم به‌عنوان یکی از عوامل مرگ سلولی محسوب می‌شود، ان استیل‌سیستئین با تأثیر بر میتوکندری سبب افزایش کلسیم درون این اندامک و در نتیجه کاهش کلسیم درون سیتوپلاسم می‌شود که در نهایت از مرگ سلولی جلوگیری خواهد کرد (۳۰).

داده‌های حاصل از تحقیق حاضر همچنین نشان داد تزریق درون‌صفاقی نانوذرات اکسیدروی (۱/۲۵mg/kg)، منجر به کاهش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز سرم خون در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. تزریق درون‌صفاقی ان استیل‌سیستئین (۳۰۰mg/kg)، ۵ دقیقه قبل از تزریق نانوذرات اکسیدروی به‌طور معناداری سطح این آنزیم‌ها را در سرم خون نسبت به گروه دریافت‌کننده نانوذرات اکسیدروی افزایش داد و به حد گروه کنترل رسانید. پژوهش‌های گذشته نیز در جهت تایید نتایج حاصل از این پژوهش می‌باشد. کاهش غلظت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون، گلوکاتیون پراکسیداز و افزایش غلظت مالون‌دی‌الدهید در سرم خون موش‌های تیمار شده با نانوذرات اکسید روی گزارش شده است (۸-۲۸). مطالعات نشان داده است تیمار با نانوذرات اکسیدروی سبب کاهش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و افزایش مالون‌دی‌الدهید و کاهش شاخص FRAP در سرم خون موش‌های صحرایی مورد آزمایش می‌شود (۳۱-۳۲). در تحقیقات دیگر نشان داده شد تزریق نانوذرات اکسیدنقره و اکسیدروی در موش‌های صحرایی نر سبب تغییر در میزان شاخص‌های مالون‌دی‌الدهید و FRAP در بافت مغزی این حیوانات می‌شود (۲۳). مطالعات Kamboj و همکاران نشان داد تزریق ان استیل‌سیستئین به مدت ۸ هفته قادر است منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در کورتکس مخچه، مخچه و ساقه مغزی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده استریپتوزوتوسین شود (۲۶). استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تولید انواع مختلف اکسیژن فعال (ROS^۱) و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است. مطالعات اخیر محققین نشان می‌دهد کاتیون‌های روی آزاد شده از نانوذرات در سلول سبب شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژن و رهایش آن‌ها از میتوکندری می‌شود. سطوح بیش از حد و عمدتاً

بهبود حافظه و یادگیری در آزمون اجتنابی غیرفعال و آزمون مازآبی می‌شود (۱۲). در تحقیق دیگری ان استیل‌سیستئین توانست به‌طور چشم‌گیری به‌خاطر آوری حافظه را بهبود بخشد و پارامترهای آسیب اکسیداتیو و مارکرهای التهابی را کاهش دهد (۱۵). پژوهش‌های kamboj و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان تزریق ان استیل‌سیستئین (۱/۴mg/kg) طی هشت هفته به‌صورت خوراکی باعث بهبود حافظه و کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر می‌شود (۲۶). در مطالعات قبلی ما نیز تزریق ان استیل‌سیستئین (۳۰۰mg/kg) به‌همراه استریپتوزوتوسین (۳mg/kg) در موش‌های صحرایی، توانست بازخوانی حافظه و تعداد نورون‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ را به‌طور معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده استریپتوزوتوسین افزایش دهد (۱۴).

ان استیل‌سیستئین پس از ورود به سلول‌های گلیا سریعاً به سیستئین (پیش‌ساز گلوکاتیون) آزاد هیدرولیز می‌شود (۱۳). افزایش فعالیت انتقال‌دهنده سیستئین-گلوکاتامات نیز منجر به افزایش گلوکاتامات خارج سلولی می‌شود. به این ترتیب از طریق ان استیل‌سیستئین تنظیم سطوح خارج سلولی گلوکاتامات صورت می‌گیرد. میزان سیستئین موجود در سیستم، از طریق تولید گلوکاتیون به واسطه نورون‌ها چرخه فیدبکی را ایجاد می‌کند که مستقیماً میزان گلوکاتامات فضای خارج سلولی را تنظیم نموده و سبب افزایش حافظه طولانی مدت می‌شود (۱۶-۲۷). همچنین ان استیل‌سیستئین با جلوگیری از کاهش میزان استیل‌کولین در هیپوکامپ و کورتکس یادگیری را تسهیل کرده و باعث رمزگذاری اطلاعات جدید می‌شود. ان استیل‌سیستئین جذب گلوکز در هیپوکامپ را تسهیل کرده که از این طریق با افزایش ساخت آدنوزین تری فسفات رهایش انتقال‌دهنده‌های عصبی بهتر صورت می‌گیرد (۲۸). ان استیل‌سیستئین سبب کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی از جمله اینترلوکین‌ها می‌شود، این سیتوکین‌ها سبب آسیب در سلول‌ها، صدمه‌ی مغزی و افزایش روند ایجاد آلزایمر و بیماری‌های مربوط به حافظه و یادگیری می‌شوند. تزریق ان استیل‌سیستئین منجر به افزایش TNF-a^۲ در موش‌های صحرایی می‌شود. این فاکتور سبب مرگ عوامل ایجادکننده تومور در سلول‌ها می‌گردد. تزریق ان استیل‌سیستئین با فسفوریلاسیون پروتئین CREB^۳ می‌تواند منجر به رونویسی از ژنوم و در نهایت منجر به سنتز پروتئین‌های محافظت‌کننده نورونی مثل فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز BDNF^۴ و پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند سلول‌های

9 - Beta Cells Lymphocytus2

10- Reactive Oxygen Species

14 - Glutathione disulfide

6 - Tumor Necrotic Factor

7 - cAMP response element-binding protein

8 - Brain Derivative Natriuretic factor

در مجموع گرچه مکانیسم‌های متعددی برای روند کاهش حافظه ناشی از نانوذرات اکسیدروی ارائه شده است اما با توجه به تحقیق حاضر به‌نظر می‌رسد نانوذرات اکسیدروی از طریق افزایش استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های اکسیژن فعال، سبب کاهش بازخوانی حافظه، سمیت سلولی و مرگ سلولی در نورون‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ شده است. ان استیل‌سیستین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی از طریق کاهش گونه‌های فعال اکسیژن توانسته است از اثرات مخرب نانوذرات اکسیدروی بر نقص حافظه و تخریب نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ جلوگیری نماید. لذا در حالی‌که افراد در معرض آلاینده‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی قرار دارند، با مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توان از اثرات سوء این ماده تا حدی جلوگیری کرد.

با توجه به محدودیت‌هایی که در روند انجام این تحقیق وجود داشت در ادامه روند این تحقیق در آینده می‌توان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شاخص استرس‌اکسیداتیو را در نورون‌های هیپوکامپ اندازه‌گیری و بررسی نمود. همچنین اندازه‌گیری و بررسی آنزیم‌های گلوکوتایون‌ردوکتاز و گلوکوتایون پراکسیداز در سرم خونی در حیوانات در معرض نانوذره‌ی اکسیدروی و اندازه‌گیری سطح انتقال‌دهنده‌های عصبی گلوتامات و استیل‌کولین در هیپوکامپ حیوانات در معرض نانوذره‌ی اکسیدروی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارشناسان و مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه اراک تشکر و قدردانی می‌شود.

شکل افراطی از این رادیکال‌ها، می‌تواند منجر به آسیب شدید به DNA، RNA و پروتئین‌های سلولی و آپاپتوز نورون‌ها گردد (۸). گونه‌های اکسیژن فعال با ایجاد سمیت سلولی سبب آسیب به همه‌ی سلول‌ها از جمله نورون‌ها می‌شوند. تجمع گونه‌های اکسیژن فعال منجر به استرس اکسیداتیو شده که عامل اصلی در اختلالات مرتبط با حافظه است (۳۳). نانوذرات اکسیدروی از طریق استرس اکسیداتیو سبب سمیت سلولی و آپاپتوز می‌شوند. در واقع قرار گرفتن در معرض مقادیر مختلف نانوذرات اکسید روی سبب استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب غشای سلولی و آسیب به DNA می‌شود. زمانی که ان استیل‌سیستین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی در فضای خارج سلولی قرار می‌گیرد، سیستین (Cys) از آن جدا شده و از طریق ناقل ویژه (Cys-Cys)، با از طریق انتشار از غشا عبور و وارد سلول می‌شود. سیستین در ساخت گلوکوتایون (GSH) شرکت دارد. گلوکوتایون به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم سبب خنثی‌شدن گونه‌های اکسیژن و نیتروژن فعال می‌شود. از آنجا که ان استیل‌سیستین پیش‌ساز گلوکوتایون می‌باشد، زمانی‌که سیستین جدا شده از آن وارد سلول می‌شود، چرخه‌ی بازسازی گلوکوتایون به‌وسیله $GSSG^{11}$ به راه افتاده که در این چرخه، گلوکوتایون‌ردوکتاز و گلوکوتایون پراکسیداز نیز شرکت دارند. گلوکوتایون پراکسیداز تخریب H_2O_2 را کاتالیز کرده و گلوکوتایون‌ردوکتاز به NADPH وابسته بوده و باعث حفظ گلوکوتایون می‌شود. لذا سیستین رها شده از ان استیل‌سیستین سبب افزایش تولید گلوکوتایون و در نتیجه کاهش گونه‌های اکسیژن و نیتروژن فعال می‌گردد (۳۴).

References:

- 1- Ghadiri T, Modarres Mousavi SM, Alipour F, Sadeghi M S. Cellular and Molecular Pathways of Learning and memory. *Int J Nanomedicine* 2014; 12: 2-6.
- 2- Saadipour K, Sarkaki A, Alaei H, Badavi M, Rahim F. Forced exercise improves passive avoidance memory in morphine-exposed rats. Elsevier Academic Press 2009; 12: 1206-11.
- 3- Forehand R. Helping the noncompliant child. *Child Psychopatology Institute. University of Southern Maine* 2003; 6, 25-6.
- 4- De Hoz L, Moser EI, Morris RG. Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal networks. *European Journal of Neuroscience* 2005; 22: 745-54.
- 5- Kesmati M, Torabi M, Ghandizadeh-Dezfuli M. Nanoparticles of zinc oxide reduces acute somatic pain in adult female wistar rats. *Zahedan J Res Med Sci* 2014; 16: 24-8. (Persian)
- 6- Handy RD, Von Der Kammer F, Lead JR, Hasselov M, Owen R, Crane M. The eco toxicity and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* 2008; 17: 287-314.

- 7- Han D, Tian Y, Zhang T, Ren G, Yang Zh. Nano-zinc oxide damages spatial cognition capability via over-enhanced long-term potentiation in hippocampus of Wistar rats, *Int J Nanomedicine*, 2011; 6: 1453-61.
- 8- Valipour S, Hoseini SE, Vahdati A, Kesmati M. The effects of acute administration of zinc oxidenanoparticles on long term memory in the presence and absence of vitamin C in adult male rat. *Adv Environ Biol* 2014; 8: 260-6.
- 9- Zito w, Sayon I, Uanon K. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential. *Drug Delivery Applications* 2009; 14: 25-9.
- 10- Yongling X, Yiyi W, Tao Zh, Guogang R, Zhuo Y. Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors. *J Biomedical Sc* 2012; 15: 32-98.
- 11- Salem A, Imen Ben S, Karim O, Lassaad EL, Khemais Ben Rh, Hafedh A, et al. Effects of nanoparticle zinc oxide on emotional behavior and trace elements homeostasis in rat brain. *Neuroscience* 2013; 50: 69-102.
- 12- Costa M, Bernardi J, Fiuza T, Costa L, Brandão R, Pereira ME. N-acetylcysteine protects memory decline induced by streptozotocin in mice. *Chemico-Biological Interactions* 2016, 235, 10-7.
- 13- Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neuroscience* 2011; 36(2): 78-86.
- 14- Darbandi N, Momeni H, Tajiani M. The Effect of N-acetyl-cysteine on Memory Retrieval and the Number of Intact Neurons of Hippocampal CA1 Area in Streptozotocin-induced Alzheimeric Male Rats. *Arak Med Univ J* 2018; 20(127): 40-51. (Persian)
- 15- Prakash A, Kalra JK, Kumar A. Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine against streptozotocin-induced memory dysfunction and oxidative damage in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2015; 26(1): 13-23.
- 16- Zaeri S, Emamghoreishi M. Acute and chronic effects of N-acetylcysteine on pentylenetetrazole-induced seizure and neuromuscular coordination in mice. *Iran J Med Sci March* 2015; 40(2): 118-24.
- 17- Zarrindast MR, Bakhsha A, Rostami P, Shafaghi B. Effects of intrahippocampal injection of drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *J Psychopharmacol* 2002; 16(4): 313-9.
- 18- Marklund S, Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur J Biochem* 1974; 47: 469-74.
- 19- Aebi H. In: *Catalase in Vitro Methods in Enzymology*. Colowick SP Kaplan Florida Acad Press 1984; 105: 114-121.
- 20- Adamcakova-Dodd A, Stebounova LV, Sung Kim J, Vorrink SU, Ault AP, O'Shaughnessy PT, et al. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models *Particle and Fibre Toxicology* 2014; 23: 11-5.
- 21- Valdiglesias V, Costa C, Kiliç G, Costa S, Pásaro E, Laffon B, Teixeira JP. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environ Int* 2013; 55: 92-100.
- 22- Ebuehi OAT, Akande GA. Effect of zinc deficiency on memory oxidative stress and blood chemistry in rats. *Int J Bio Chem Sci* 2009; 3, 513-23.
- 23- Afifi M, Abdelazim AM. effect of zinc oxide and silver nanoparticles on antioxidant system in the brain of diabetic rats. *Life Sci* 2015; 5: 874-7.
- 24- Fei G, Ningjie M, Hong Zh, Qing W, Hao Zh, Pu W, et al. Zinc oxide nanoparticles-induced epigenetic change and G2/M arrest are associated with apoptosis in human epidermal keratinocytes, 2016; 11: 3859-3874.

- 25-Chang YN, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles, *Materials* 2012; 5: 71-50.
- 26-Kamboj SS, Kanwaljit Chopra K, Rajat Sandhir R. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Metabolic Brain Disease* 2008; 23: 427-32.
- 27- Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2013; 1830(8): 4117-29.
- 28- Tian L, Lin B, Wu L, Li K, Liu H, Yan J, et al. Neurotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015; 10: 69-93.
- 29- Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and Behavior* 2014; 4(2): 108-22.
- 30-Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(8): 4117-29.
- 31-Lu PJ, Huang SC, Chen YP, Chiueh LC, Shih DY. Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *J Food Drug Anal* 2015; 23: 587-94.
- 32- Yongyi W, Yang L, Jianbo J, Yiguo J, Bin Zh, Qiu Zh, et al. Aggravated hepatotoxicity occurs in aged mice but not in young mice after oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Current Neurovascular Research* 2016; 56: 1-11.
- 33- Babaei Abraki SH, Chavoshi-Nezhad S. Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Shefa Neuroscience Res Center* 2014; 10(8): 2.
- 34- Kívia Q, Andrade F, Andréa M, John M, Orlando R, Pimentel A, et al. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases. *J Korean Med Sci* 2015; 53: 59-64.

EFFECT OF N-ACETYL CYSTEINE ON MEMORY RETRIEVAL, HIPPOCAMPAL CA1 PYRAMIDAL NEURONS AND SOME BLOOD SERUM OXIDATIVE STRESS FACTORS IN MALE WISTAR RATS TREATED WITH ZINC OXIDE NANOPARTICLES

Niloufar Darbandi^{1*}, Soheila Khosravi², Hamid Reza Momeni³

Received: 15 Apr, 2018; Accepted: 26 Jun, 2018

Abstract

Background & Aims: Due to the fact that nanoscale zinc oxide nanoparticles can pass through the blood brain barrier and have devastating effects on various posts of nervous system, the present study investigated the effects of N-Acetyl cysteine on memory retrieval, hippocampal CA1 pyramidal neurons and some blood serum oxidative stress factors on male Wistar rats treated with zinc oxide nanoparticles.

Materials & Methods: The study was conducted on 48 male Wistar rats in 6 groups: Control, ZnO NPs groups (0.5, 1, 1.25, 2.5 mg/kg) and N-Acetyl cysteine (300 mg/kg) with ZnO NPs (1.25 mg/kg) group. In all groups, saline or ZnO NPs were injected intraperitoneally 30 minutes before the training. In the group of NAC (300mg/kg) with ZnO NPs, the injection of NAC (300mg/kg) was done 5 minutes before injection of nanoparticles. After the memory test animals brain were fixed and the the number of healthy neurons in the CA1 region of the hippocampus were counted. In the groups of control, ZnO NPs (1.25mg/kg) and NAC (300mg/kg) with ZnO NPs (1.25mg/kg), the blood serum were measured for levels of catalase and superoxide dismutase.

Results: Injections of ZnO NPs significantly reduced memory retrieval and the number of healthy neurons in the CA1 region compared to the control group ($P < 0.001$). The use of NAC significantly improved the effects of ZnO NPs on memory deficits, the number of healthy neurons in the CA1 region, and the level of antioxidant enzymes of catalase and superoxide dismutase in serum compared with the ZnO NPs group ($P < 0.001$).

Conclusion: It seems that ZnO NPs decrease the memory retrieval, and cause cell death in the pyramidal neurons of the CA1 region of the hippocampus by increasing the oxidative stress. NAC, as a potent antioxidant by reducing the active oxygen species can prevent the harmful effects of ZnO NPs on memory and neurons of the hippocampal CA1 area.

Keywords: Catalase, Hippocampus CA1 area, Memory retrieval, N-Acetyl cysteine, Superoxide dismutase, Zinc oxide nanoparticles

Address: Department of Biology, School of Science, Arak University, Arak, Iran

Tel: +988634173317

Email: N-Darbandi@araku.ac.ir

¹ Assistant Professor, PhD in Animal Physiology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran (Corresponding Author)

² MSc in Animal Physiology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran

³ Associate Professor, PhD in Animal Physiology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran