



Comparison of the effect of iron oxide nanoparticles and bulk on the memory and associated alterations in dopamine and serotonin levels in the hippocampus of adult male rats

Marzieh Khorshidi¹, Mahnaz Kesmati^{1*}, Lotfollah Khajeh Pour¹, Hossein Najaf Zadeh Varzi²

1. Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

2. Dept. of Pharmacology & Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Received: 31 Dec 2012

Accepted: 15 May 2013

Abstract

Introduction: With the increasing development of nanotechnology, nanomaterials are used instead of conventional compounds. One of these nanomaterials that have many applications in the biomedical field, is iron oxide (Fe_2O_3) nanoparticles and there is not much research on its effects on the physiological features. So in this research, effect of iron oxide nanoparticles on short and long-term passive avoidance memory and levels of serotonin and dopamine in hippocampus was evaluated in comparison to the bulk type.

Methods: In this study, 80 male adult Wistar rats (220 ± 30 grams) were used and divided into 10 groups, and the study was performed in two parts in order to measure the behavioral changes and neurotransmitters levels. In the first part, animals received intraperitoneal injections of iron oxide nanoparticles and bulk at different doses (0.2, 1, 5 mg/kg) before training. Then, 90 minutes and 24 hours after training their memory was tested by a step-through instrument. In the second part of the study, right and left hippocampi of every group were extracted after receiving the effective dose (5 mg/kg) of iron oxide nanoparticles and bulk, and neurotransmitters levels were measured by an ELISA kit.

Results: Iron oxide nanoparticles caused a disruption in passive avoidance memory in a dose-dependent manner, while bulk iron oxide showed a non significant partial effect. Also both type of iron oxide reduced dopamine levels and increased serotonin levels significantly or relatively in both hippocampi.

Conclusion: It seems that iron oxide nanoparticles induce a disruption of memory, which is in part related to the alterations of neurotransmitters levels in hippocampus and the other is associated to its physicochemical properties.

Key words: memory, iron oxide nanoparticles, serotonin, dopamine

* Corresponding author e-mail: m.kesmati@scu.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

مقایسه اثر نانو اکسید آهن و اکسید آهن توده ای بر سطح دوپامین و سروتونین هیپوکمپ و رابطه اش با حافظه در موش صحرایی نر بالغ

مرضیه خورشیدی^۱، مهناز کسمتی^{۱*}، لطف الله خواجه پور^۱، حسین نجف زاده ورزی^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۲. گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

پذیرش: ۲۵ اردیبهشت ۹۲

دریافت: ۱۱ دی ۹۱

چکیده

مقدمه: با پیشرفت روز افزون نانو تکنولوژی، نانو مواد بجای ترکیبات معمولی مورد استفاده قرار می گیرند. یکی از نانو موادی که در زمینه زیست پزشکی کاربرد فراوان دارد، نانو اکسید آهن است که در زمینه اثرات و عوارض آن بر فاکتورهای فیزیولوژیک مطالعه چندانی صورت نگرفته است. در این مطالعه اثر نانو اکسید آهن در مقایسه با نوع توده ای آن بر حافظه احترازی غیر فعال کوتاه و بلند مدت و میزان سروتونین و دوپامین هیپوکامپ های طرفین بررسی شده است.

روش ها: در این مطالعه ۸۰ سر موش صحرایی نر بالغ در ۱۰ گروه با وزن 220 ± 30 گرم استفاده شد که به جهت سنجش رفتاری و تعیین نوروترانسمیترهای مغزی در دو بخش قرار گرفتند. در بخش اول، حیوانات مقادیر مختلف (۵، ۱۰، ۲۰ mg/kg) اکسید و نانو اکسید آهن را بصورت درون صفاقی پیش از آموزش دریافت کردند. سپس حافظه آنها ۹۰ دقیقه و ۲۴ ساعت بعد از آموزش با استفاده از دستگاه استپ ثرو ارزیابی شد. در بخش دوم، هیپوکامپ حیوانات هر گروه پس از دریافت مقدار موثر (۵ mg/kg) اکسید و نانو اکسید آهن خارج و سطح نوروترانسمیترهای آنها با کیت الایزا اندازه گیری شد.

یافته ها: نانو اکسید آهن بصورت وابسته به مقدار حافظه احترازی غیر فعال را مختل نمود در حالیکه اکسید آهن توده ای تاثیر جزئی غیر معنی داری نشان داد. هر دو اکسید آهن باعث کاهش سطح دوپامین و افزایش معنی دار و یا نسبی سروتونین هیپوکامپ های طرفین شدند.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که تخریب حافظه حاصل از نانو اکسید آهن بخشی مربوط به تغییر سطح نوروترانسمیترهای هیپوکمپ و بخشی مربوط به ویژگیهای فیزیوشیمیایی آن باشد.

واژه های کلیدی: حافظه، نانو اکسید آهن، سروتونین، دوپامین

مقدمه

بسته بندی، جذب و تجزیه ی نوروترانسمیترها به دیگر پروتئین های حاوی آهن، که ممکن است مستقیماً و یا غیر مستقیم عملکرد مغز را تغییر دهند، شرکت می کند [۱، ۲]. مغز به چند دلیل به آهن نیاز دارد از جمله: آهن در فنیل آلانین هیدروکسیلاز، تیروزین هیدروکسیلاز و همچنین در مسیر نوروترانسمیترهای دوپامینرژیک، میلین سازی، در میتوکندریها برای افزایش سطح تولید انرژی و برای همانندسازی DNA /چرخه سلولی مشارکت دارد [۱۱].

هومئوستاز آهن مغز برای عملکرد طبیعی آن ضروری

بیشتر موجودات زنده برای بقای خود به آهن نیاز دارند [۳۹]. آهن برای تکامل دستگاه عصبی مرکزی حیاتی است و در چندین فرایند متابولیک مغزی شرکت می کند [۸، ۲۲، ۲۴]. مطالعات اخیر گزارش کرده اند که آهن در سنتز [۳، ۹، ۴۴]،

m.kesmati@scu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

واسطه‌ی فعالیت‌های صنعتی، با افزایش سنتز طیف وسیعی از نانو مواد و همچنین افزایش استفاده‌شان خصوصاً مرتبط با سلامتی انسان همراه می‌باشد [۱۵، ۲۷، ۳۶]. بنابراین سؤال‌های زیادی در این مورد مطرح می‌شود؛ که آیا این چنین موادی وارد بدن انسان می‌شوند و آیا می‌توانند سلامتی را تحت تأثیر قرار دهند. در بین نانو مواد، نانواکسید آهن به دلیل ویژگی‌های سوپر پارامغناطیسی و کاربردهای بالقوه آن در بسیاری از زمینه‌ها توجهات را به طور گسترده به خود جلب کرده است. از جمله کاربرد نانوذرات اکسید آهن می‌تواند به استفاده آن در زمینه‌های مختلف زیست-پزشکی شامل: عکس برداری فلورسنت-مغناطیسی، درمان و تشخیص انواع بیماری‌ها از جمله: بیماری‌های تخریبی و التهابی، تومورها، اختلالات عصبی-عروقی [۴، ۱۰، ۳۵] اشاره کرد.

با توجه به افزایش استفاده از نانومواد خصوصاً نانواکسید آهن در تولیدات صنعتی و مصرفی و در نظر داشتن آنها به عنوان امیدی در جهت بهبود تشخیص و درمان انواع بیماری‌های انسانی و با نگاه ویژه به نقش اساسی آهن در فرآیندهای فیزیولوژیکی بدن، ضروری است که بافت‌های پایه و اساسی (از جمله مغز) را تحت تأثیر این نانومواد قرار داده و چگونگی واکنش آنها در سیستم‌های بیولوژیک مورد ارزیابی و سنجش قرار گیرد. از آنجا که تا کنون مقایسه‌ای بین اثرات اندازه‌های مختلف اکسید آهن بر عملکرد مغز صورت نگرفته است لذا در این تحقیق اثر نانو ذرات اکسید آهن در مقایسه با نوع توده‌ای (معمولی) آن بر حافظه کوتاه و بلند مدت و سطح سروتونین و دوپامین موجود در هیپوکمپ، به عنوان مهم‌ترین مرکز دخیل در حافظه، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این کار پژوهشی ۸۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 30 ± 220 گرم از دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز تهیه شد. موش‌ها پس از انتقال به خانه‌ی حیوانات بصورت ۴ تایی در قفس‌ها توزیع شدند و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. دمای نگهداری حیوانات 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد بود. غذای حیوانات از کارخانه‌ی دام و طیور چاودانه

است؛ علی‌رغم اهمیت آن برای عملکرد طبیعی مغز، هومئوستازی آهن در دستگاه عصبی مرکزی به خوبی شناخته نشده است [۱۶]. تمایل آهن به کاتالیز شدن منجر به ایجاد رادیکال‌های آزاد سمی می‌شود [۳۹]. فعال شدن آهن فرو با پراکسید هیدروژن^۱ یا پراکسید های لیپیدی منجر به تولید آهن فریک، OH و رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل^۲ یا رادیکال‌های لیپیدی مانند LO^۰ و LOO^۰ می‌شود. این رادیکال‌ها باعث صدمه به غشاهای لیپیدی، پروتئین‌ها و اسید های نوکلئیک می‌شوند. بیشتر آثار پاتولوژیک افزایش عمومی آهن ناشی از تجمع آهن در بافت‌هاست [۱۴].

تغییر در غلظت آهن مغز با تأخیر در تکامل روانی-حرکتی و تخریب قابلیت‌های فکری در کودکان مرتبط است. کاهش غلظت آهن با تغییر در هدایت فیبرهای مغزی، تغییر در سیستم‌های نوروترانسمیتری دوپامینرژیک، سروتونرژیک، گابااژیک و همچنین تغییر در شکل‌گیری میلین همراه می‌باشد [۱]. افزایش محتوای آهن نیز در مناطق خاصی از مغز ممکن است رادیکال‌های آزاد سیتوتوکسیک تولید کند و منجر به چندین اختلال نورودژنراتیو دیگر مانند: پارکینسون، آلزایمر و بیماری هانگتینگتون شود [۸].

در مطالعات متعدد گزارش شده است که Fe⁺²، اکسیداسیون مونوآمین‌ها از قبیل دوپامین و سروتونین را افزایش می‌دهد. محصولات رادیکال آزاد اکسیژن تولید شده، می‌توانند با گروه سولفیدریل هم‌ظرفیت خود (جزئی از پروتئین‌هایی مانند پروتئین‌های باند شونده با سروتونین می‌باشد که در عصاره‌ی مغزی محلول وجود دارند) باند شوند. بنابراین آهن می‌تواند سمیت سلولی دوپامین را به واسطه‌ی افزایش در اکسیداسیونش بدون دخالت آنزیم B-اکسیدازمونوآمین، افزایش دهد. این مشاهدات به مکانیسمی که طی آن نورون‌های سیستم دوپامینرژیک در بیماری‌های نورودژنراتیو (از قبیل: بیماری پارکینسون) دچار تخریب می‌شود، مربوط می‌گردد [۹، ۳۸].

مشخص شده است که انسان برای یک مدت طولانی در تماس با نانو مواد موجود در هوا می‌باشد. تماس با نانو مواد به

1. H₂O₂
2. OH

بلافاصله به بخش تاریک می‌رود. در صورتیکه در این مکان به حیوان شوک وارد شود، بر خلاف میل ذاتی از رفتن به درون بخش تاریک اجتناب می‌کند. به عبارت دیگر یک یادگیری احترازی غیر فعال شکل می‌گیرد. این یادگیری می‌تواند به صورت کوتاه مدت یا طولانی مدت باشد و در اثر داروها تقویت یا تضعیف گردد. برای مطالعه حافظه کوتاه مدت (۹۰ دقیقه) و بلند مدت (۲۴ ساعت) در این روش یادگیری، آزمایش‌ها در سه مرحله انجام می‌گیرد. مرحله اول آموزش و مرحله دوم و سوم آزمون.

آموزش: در مرحله آموزش، هر حیوان به آرامی در بخش روشن دستگاه قرار می‌گیرد. بعد از مدت ۱۰ ثانیه دریچه باز می‌شود تا حیوان بر اساس تمایل ذاتی خود وارد بخش تاریک شود. به محض ورود حیوان به بخش تاریک حیوان از دستگاه خارج می‌گردد و زمان تأخیر ورود حیوان به داخل بخش تاریک ثبت می‌شود (اگر این زمان بیشتر از ۱۰۰ ثانیه بود حیوان از گروه آزمایش حذف می‌شود). بدین صورت حیوان با دستگاه آشنا می‌شود (سازگاری). بعد از ۳۰ دقیقه مجدداً حیوان به بخش روشن انتقال داده شده و پس از گذشت ۱۰ ثانیه دریچه باز می‌شود. بلافاصله پس از ورود حیوان به بخش تاریک، دریچه بسته شده و یک شوک الکتریکی به دست و پای حیوان داده می‌شود. در این حالت به علت بسته بودن سقف بخش تاریک، حیوان نمی‌تواند از دریافت شوک اجتناب کند. ۲۰ ثانیه بعد از دریافت شوک، حیوان از دستگاه خارج شده و به قفس خود منتقل می‌شود [۳۱].

برای بررسی حافظه کوتاه مدت حیوان، ۹۰ دقیقه بعد از مرحله آموزش، آزمون انجام می‌گیرد. در این مرحله شوک الکتریکی داده نمی‌شود. برای هر حیوان حداکثر زمان تأخیر ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شود. زمان تأخیر ورود حیوان به بخش تاریک به عنوان داده‌های آزمایش ثبت می‌شود.

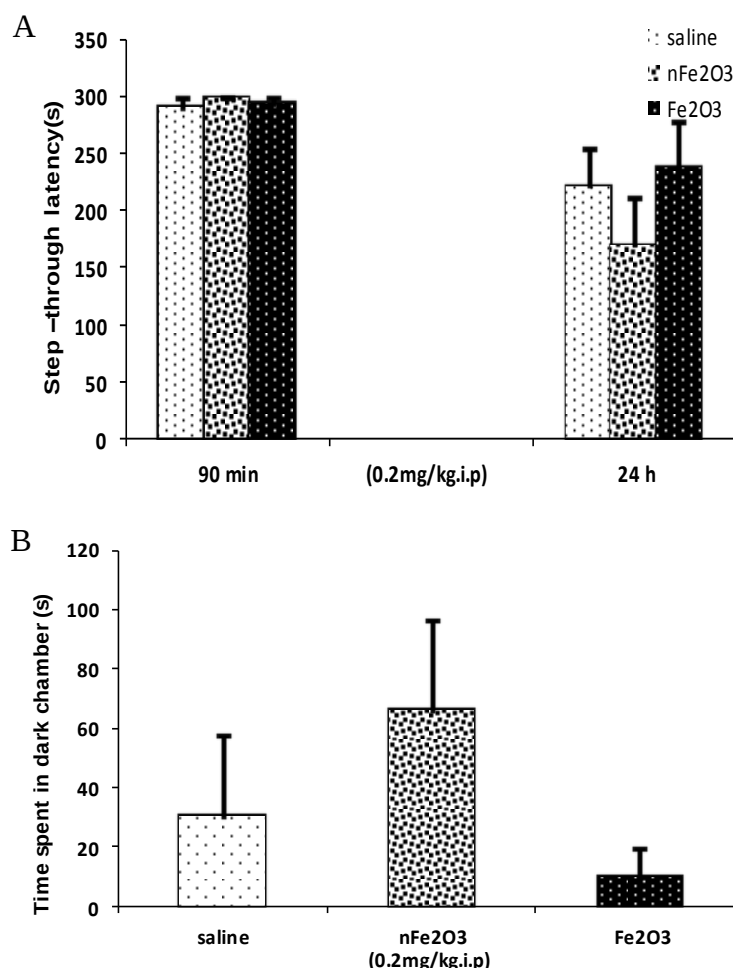
برای بررسی حافظه بلند مدت ۲۴ ساعت پس از آموزش آزمونی مشابه با آزمون کوتاه مدت انجام می‌شود. زمان تأخیر ورود حیوان به خانه تاریک ثبت می‌گردد [۳۱، ۱۹]. به خاطر آوری دریافت شوک در بخش تاریک، موجب مهار تمایل ذاتی حیوان برای ورود به بخش تاریک و اجتناب از ورود به آن می‌شود. افزایش زمان تأخیر ورود حیوان در مرحله آزمون، نشان دهنده تقویت حافظه بوده و کاهش آن تضعیف حافظه را

اصفهان تهیه شد. برای آسان شدن کار و سازش با شرایط محیط و آزمایش کننده، حیوانات سه روز قبل از آموزش، روزانه به مدت ۳ تا ۵ دقیقه دست آموز شدند. آموزش و آزمون در دوره‌ی روشنایی و در محدوده‌ی ساعت ۹ تا ۱۴ انجام می‌گرفت. در بخش اول ۶ گروه از حیوانات مقادیر مختلف (5 mg/kg ، ۱، ۲/۰) [۳۰] نانو اکسید آهن و اکسید آهن معمولی (حل شده در سالیان) را بصورت تزریق حاد درون صفاقی با حجم 10 ml/kg ، نیم ساعت پیش از آموزش دریافت کردند و سپس پروتکل سنجش حافظه احترازی غیر فعال انجام شد. گروه شاهد سالیان دریافت کردند.

در بخش دوم، ۲ گروه از حیوانات دوز موثر اکسید آهن توده ای و نانو اکسید آهن را به صورت فوق قبل از آموزش دریافت نمودند. گروه شاهد سالیان دریافت کردند. نیمی از حیوانات هر گروه ۹۰ دقیقه و نیمی دیگر ۲۴ ساعت پس از تزریق آسان کشی شده و هیپوکامپ آنها جهت تعیین تغییرات نوروترانسمیترهای مغزی استخراج گردید. از داده‌های روز اول و دوم هر گروه میانگین بدست آورده تا نمودار حاصله میانگین داده‌های حیوانات در هر دو زمان باشد.

در این تحقیق از نانوذرات اکسید آهن با سایز متوسط ۲۵ نانومتر استفاده شد. اکسید و نانو اکسید آهن در سرم فیزیولوژی ایجاد سوسپانسیون می‌کند. بنابراین ابتدا توسط همزن برای چند دقیقه هم زده شده، سپس توسط یک ویبره کننده (نوسان ساز) اولتراسونیک برای ۱۵ دقیقه پراکنده شدند [۴۱].

در این مطالعه جهت سنجش حافظه‌ی احترازی غیر فعال از دستگاه استپ- ثرو (Step-through) استفاده گردید. این دستگاه جعبه‌ای از جنس پلکسی گلاس و متشکل از دو بخش سفید (روشن) و سیاه (تاریک) است. دریچه‌ای که در بین دو بخش قرار دارد، در مواقع لزوم باز شده و حیوان می‌تواند از یک بخش به بخش دیگر برود. بخش تاریک توسط سقف سیاه رنگی پوشیده می‌شود. در کف آن نیز میله‌های فولادی تعبیه شده که توسط کابل ارتباطی به استیمولاتور متصل است. این دستگاه قادر است یک جریان الکتریکی به شدت یک و نیم میلی آمپر به مدت سه ثانیه با فرکانس ۵۰ هرتز را در این میله‌ها رها کند که موجب وارد شدن شوک الکتریکی به دست و پای حیوان می‌گردد. وقتی حیوان در بخش روشن قرار گیرد بر اساس تمایل ذاتی به تاریکی،



شکل ۱- مقایسه اثر تزریق پیش از آموزش دوز ۰/۲ mg/kg اکسید و نانواکسید آهن بر حافظه کوتاه مدت و بلند مدت؛ a- زمان تأخیر در ورود به اتاق تاریک و b- زمان سپری شدن در اتاق تاریک. در هر گروه ۸ سر موش آزمایش شده است.

نشان می‌دهد [۳۱].

تهیه عصاره هیپوکامپ

برای بررسی تغییر سطح نوروترانسمیترها مانند سروتونین، دوپامین درون هیپوکامپ، ابتدا عصاره‌ی هیپوکامپ تهیه شد. برای این منظور ابتدا حیوانات هر گروه پس از دریافت مقدار موثر (۵ mg/kg) اکسید و نانو اکسید آهن، در دو زمان ۹۰ دقیقه و ۲۴ ساعت پس از تزریق آسان کشی شده و پس از جدا کردن سر حیوان از بدن (بوسیله اسکالپل)، مراحل جداسازی هیپوکامپ با نهایت دقت و ظرافت انجام شد. هیپوکامپ استخراج شده ابتدا وزن شده، سپس در میکروتیوپ حاوی ۱ میلی لیتر از محلول اسید فرمیک ۰/۵ مولار سرد قرار گرفت و هموژنیزه گردید [۳۳]. سپس محلول آماده شده به دستگاه سانتریفیوژ (۲۰ دقیقه - دمای ۴ درجه سانتی‌گراد- دور ۱۴۰۰۰) منتقل شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول سفید رنگ

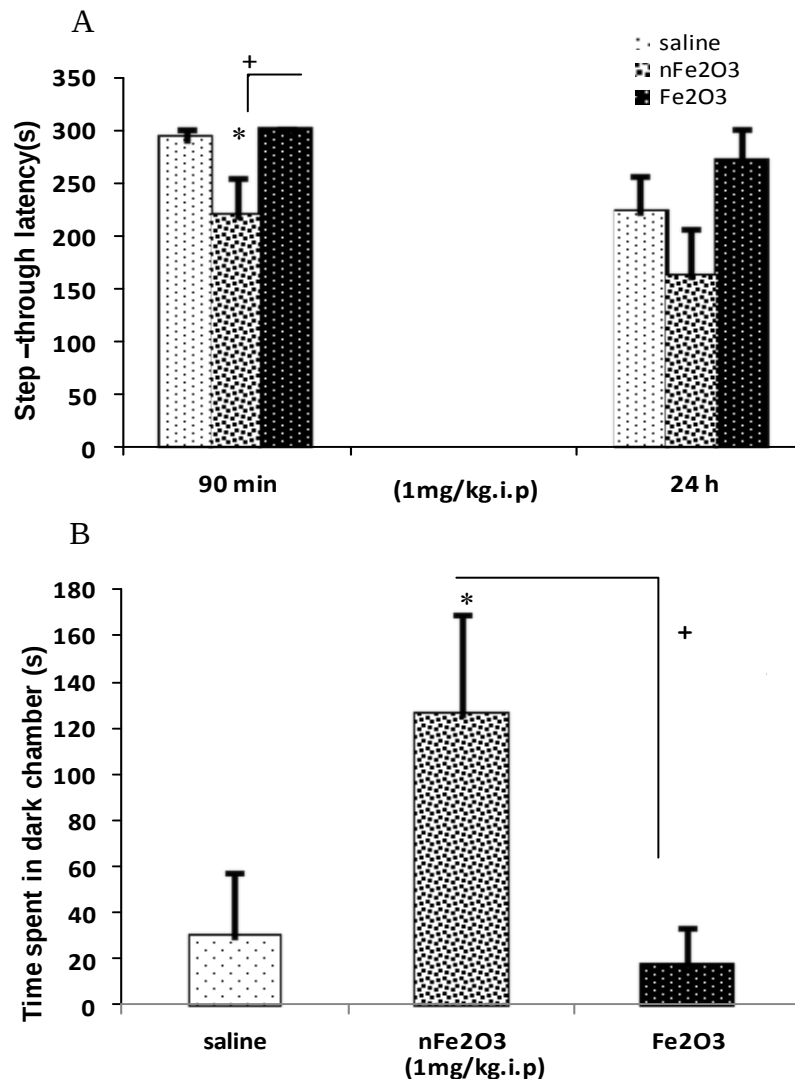
و شفافی که در قسمت بالایی میکروتیوپ قرار داشت به میکروتیوپ جدید منتقل گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شد. در نهایت نمونه‌ها با کیت الایزای (کیت اختصاصی سروتونین، دوپامین) تهیه شده، بررسی شدند. به منظور بررسی داده‌های حاصل از این پژوهش از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. داده‌ها بر اساس آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون LSD و بر مبنای $\alpha = 0.05$ بررسی گردید.

یافته‌ها

بخش اول: مقایسه اثر تزریق پیش از آموزش اکسید و

نانواکسید آهن بر حافظه کوتاه مدت و بلند مدت

شکل ۱-۱، زمان تأخیر در ورود به اتاق تاریک (شکل ۱-۱)



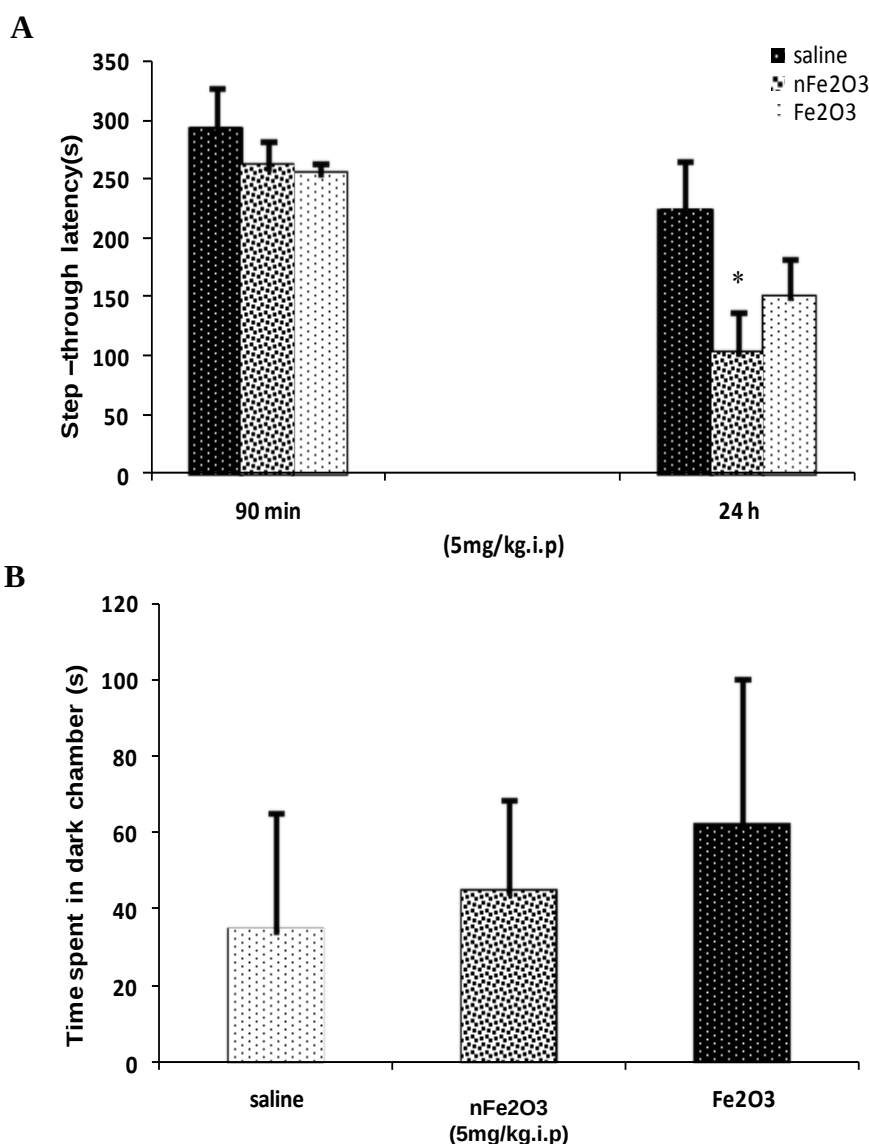
شکل ۲- مقایسه اثر تزریق پیش از آموزش دوز ۱ mg/kg اکسید و نانواکسید آهن بر حافظه کوتاه مدت و بلند مدت؛ a- زمان تأخیر در ورود به اتاق تاریک و b- زمان سپری شدن در اتاق تاریک. در هر گروه ۸ سر موش آزمایش شده است. $p < 0.05$ * در مقایسه با گروه کنترل و $p < 0.05$ + در مقایسه با گروه های دریافت کننده دارو.

کوتاه مدت نشان می‌دهد ($p < 0.05$). همچنین مدت زمان سپری شده در اتاق تاریک در گروه دریافت کننده نانواکسید آهن نسبت به کنترل و اکسید آهن توده ای در حافظه بلند مدت افزایش معنی داری را نشان می‌دهد ($p < 0.05$)؛ بدین ترتیب نانواکسید آهن در این مقدار نسبت به نوع معمولی در تخریب حافظه مؤثرتر است.

شکل ۳، زمان تأخیر در ورود به اتاق تاریک (شکل ۳-ا) و زمان سپری شدن در اتاق تاریک (شکل ۳-ب) بین گروههای دریافت کننده مقدار (۵ mg/kg) اکسید و نانو اکسید آهن و کنترل را مقایسه می‌کند. آنالیز آماری تفاوت معنی داری را بین گروه های دریافت کننده اکسید و نانو اکسید آهن نسبت به گروه کنترل در شاخص زمان تأخیر ورود در حافظه

(a) و زمان سپری شدن در اتاق تاریک (شکل ۱-ب) بین گروههای دریافت کننده مقدار (۰/۲ mg/kg) دارو و کنترل را مقایسه می‌کند که تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد. به نظر می‌رسد که تزریق پیش از آموزش مقدار ۰/۲ mg/kg اکسید و نانواکسید آهن تأثیری معنی داری بر حافظه کوتاه و بلند مدت ایجاد نمی‌کند.

در شکل ۲، زمان تأخیر ورود به اتاق تاریک (شکل ۲-ا) و زمان سپری شدن در اتاق تاریک (شکل ۲-ب) بین گروههای دریافت کننده مقدار (۱ mg/kg) اکسید و نانو اکسید آهن و کنترل مقایسه شده است. آنالیز واریانس یک طرفه تفاوت معنی داری را بین گروههای دریافت کننده نانو اکسید آهن نسبت به گروه کنترل و اکسید آهن توده ای در حافظه



شکل ۳- مقایسه اثر تزریق پیش از آموزش دوز ۵ mg/kg اکسید و نانو اکسید آهن بر حافظه کوتاه مدت و بلند مدت؛ a- زمان تأخیر در ورود به اتاق تاریک و b- زمان سپری شدن در اتاق تاریک. در هر گروه ۸ سر موش آزمایش شده است. $p < 0.05$ * در مقایسه با گروه کنترل

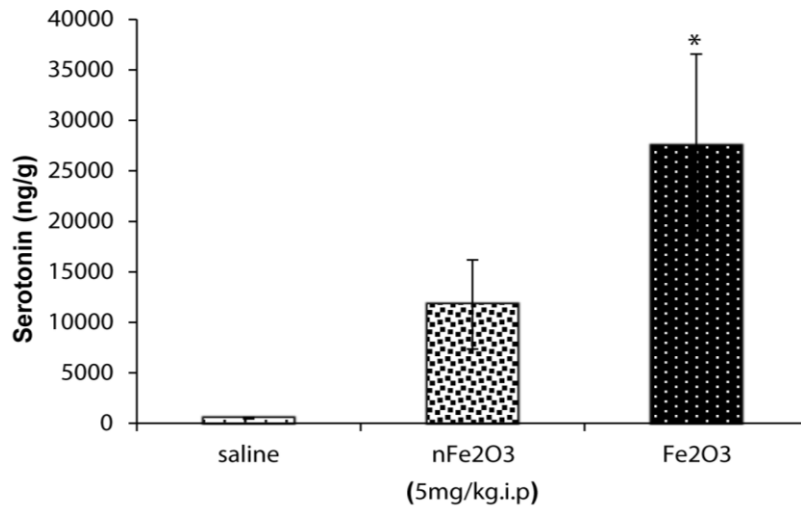
تأخیر ورود و افزایش نسبی سپری شدن اثرات تخریبی جزئی نیز نشان داده است (مقایسه نمودارهای ۱-۱، ۲-۱، ۳-۱) لذا برای ادامه کار یعنی سنجش نوروترانسمیترهای هیپوکامپ در گروههای بعدی، از دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم اکسید و نانو اکسید آهن استفاده شد.

بخش دوم: بررسی اثر اکسید و نانو اکسید آهن بر سطح

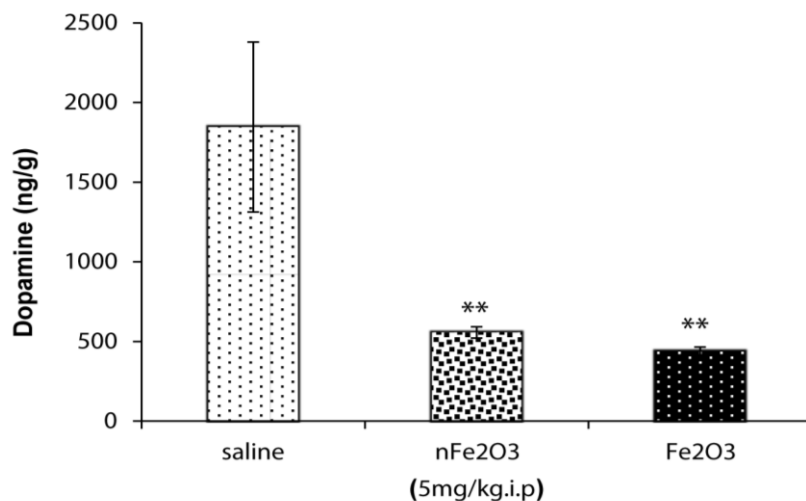
نوروترانسمیترهای درون دو نیم کره هیپوکامپ

شکل ۴ اثر تزریق مقدار ۵ mg/kg اکسید و نانو اکسید آهن بر سطح سروتونین درون دو نیم کره هیپوکامپ و مقایسه آنها با گروه کنترل را نشان می دهد. آنالیز واریانس یک طرفه تغییر معنی داری را در سطح سروتونین هیپوکامپ در گروه

کوتاه مدت نشان نداد در حالیکه نانو اکسید آهن باعث کاهش این شاخص در حافظه بلند مدت شد و اکسید آهن توده ای بطور نسبی آن را کاهش داد. ضمناً در شاخص زمان سپری شدن در اتاق تاریک هر دو اکسید آهن تغییر معنی داری ایجاد ننموده هرچند که اکسید آهن توده ای افزایش نسبی را در این شاخص نشان داد. بررسی نتایج حاصل از مقایسه دوزهای مختلف اکسید و نانو اکسید آهن بر دو فاکتور مذکور نشان داد که اثر تخریبی نانو اکسید آهن از مقدار ۱ میلی گرم شروع شده و در مقدار ۵ میلی گرم، زمان تأخیر ورود به اتاق تاریک کاهش بیشتری یافته لذا اثر مخربتری اعمال نموده است. ضمناً اکسید آهن توده ای در این مقدار با کاهش نسبی زمان



شکل ۴- اثر تزریق مقدار ۵ mg/kg اکسید و نانواکسید آهن بر سطح سروتونین درون دو نیم کره ی هیپوکامپ. هر ستون نمایانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار میانگین. $p < 0.05$ * در مقایسه با گروه کنترل.



شکل ۵- اثر تزریق مقدار ۵ mg/kg اکسید و نانواکسید آهن بر سطح دوپامین درون دو نیم کره ی هیپوکامپ. هر ستون میانگین $\pm$ انحراف معیار میانگین. $p < 0.01$ ** در مقایسه با گروه کنترل.

می‌دهند.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانواکسید آهن بعضاً باعث اختلال در حافظه کوتاه و یا بلند مدت شده که این امر اگرچه در گروه دریافت کننده اکسید آهن (در مقدار ۵ میلی گرم) بطور نسبی مشاهده شد اما معنی دار نبود. این در حالی است که هر دو ترکیب با اندکی تفاوت بصورت نسبی یا معنی دار سطح دوپامین و سروتونین درون دو نیم کره ی هیپوکامپ را تغییر دادند. بدین صورت که باعث افزایش معنی دار و نسبی

دریافت کننده اکسید آهن نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ($p < 0.05$). در گروه دریافت کننده نانو اکسید آهن نیز سطح سروتونین افزایش یافته است، که این افزایش معنی دار نمی‌باشد ($p < 0.06$).

سطح دوپامین درون دو نیم کره ی مغز در گروه های دریافت کننده مقدار ۵ mg/kg اکسید و نانواکسید آهن در مقایسه با گروه کنترل در شکل ۵ نشان داده شده است. بررسی آماری داده‌ها تغییر معنی داری ($p < 0.01$) را در گروه های دریافت کننده دارو نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. بدین ترتیب اکسید و نانواکسید آهن در دوز ۵ mg/kg سطح دوپامین درون دو نیم کره ی هیپوکامپ را در طی یک روز کاهش

سروتونین و باعث کاهش دوپامین شدند.

اثر تخریبی نانو اکسید آهن بر حافظه با نتایج برخی مطالعات که اکسید و یا نانو اکسید آهن را به شکل های مختلف و به منظور بررسی اثرات آنها بر حافظه شناختی و سیستم عصبی مدل های حیوانی بکار برده بودند هم خوانی دارد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ توسط دی لیما و همکارانش صورت گرفت، بیان کردند که تیمار با آهن در دوره نوزادی حافظه شناختی بلند مدت را در موش های صحرایی بالغ تخریب می کند و در نواحی خاصی از مغز که در شکل گیری حافظه نقش دارد، آسیب های اکسیداتیو ایجاد می کند [۶]. همچنین در مطالعه ای دیگر نشان دادند که تیمار با آهن در دوره نوزادی منجر به پراکسیداسیون لیپید ها و کربونیلایسیون پروتئین ها در هیپوکامپ، قشر مغز و جسم سیاه می شود که نهایتاً منجر به ضعف شناختی می گردد [۷].

همچنین مشاهدات بافت شناسی حاصل از تجویز درون بینی نانواکسید آهن به صورت مزمن نشان داد که میلین نورون ها در ناحیه هیپوکامپ دچار تخریب شده است. نتایج به دست آمده از مطالعه آنها نشان دهندهی اثر مضر استشمام نانوذرات Fe_2O_3 در مغز می باشد [۳۸]. در این رابطه گزارشی نشان می دهد که عدم تعادل فلزات موثر (Cu, Zn, Fe) در نواحی زیر مغزی موش کوچک آزمایشگاهی، به وسیلهی هر دو اندازه میکرو و نانو اکسید آهن القا می شود [۳۹].

شواهد زیادی نشان می دهد که افزایش سطح آهن در ساقه مغز با بسیاری از انواع بیماری های تخریب کننده عصبی از جمله آلزایمر و پارکینسون مرتبط می باشد [۹، ۱۳، ۲۱، ۴۱]. مطالعات نشان داده است که استرس اکسیداتیو به طور عمده به وسیلهی هردو اندازه Fe_2O_3 القا می شود؛ اما اندازه نانو تغییرات عمده تری را القا کرده و پاسخ دوز موثر آن نسبت به اندازه میکرون معنی دارتر می باشد. به دنبال تجویز هر دو اندازه Fe_2O_3 اختلالات مشخصی در ترشح نوروترانسمیترهای مونوآمین هیپوکامپ یافت شده است [۴۰].

بدین ترتیب هم اکسید و هم نانو اکسید قابلیت سمی داشته و باعث اختلال در روندهای عصبی خواهند شد. اما چرا در این مطالعه دوزهای بکار رفته اکسید آهن تأثیر معنی داری را ایجاد نکرد به نظر می رسد یا دوز آن باید افزایش یابد و یا مدت زمان بیشتری باید داده شود تا اثر رفتاری دارو بر حافظه

اخترازی غیر فعال نمایان شود. اما اینکه چرا نانو اکسید آهن موثر تر بوده است دلایلی دارد که برخی در بالا اشاره شد. اضافه بر آن برخی تحقیقات نشان داده اند که نانو داروها نسبت به داروهای معمولی دارای ویژگی ها و مزیت های خاصی هستند. در واقع خصوصیت مهم نانو داروها بالاتر بودن نسبت سطح به حجم آن ها در مقایسه با داروهای معمولی است که این افزایش نسبی، واکنش شیمیایی و بیولوژیکی آن ها را با سایر مواد موجود در بدن تسهیل می کند. از سوی دیگر کوچک تر شدن اندازه ذره، به افزایش سرعت جذب و عبور راحت تر آن ها از سد خونی مغزی کمک می کند [۱۸، ۲۵]، البته شایان ذکر است که این امر گاهی می تواند باعث تولید بیشتر رادیکال های آزادی مانند رادیکال آزاد اکسیژن شود. به همین دلیل توجه به عوارض و سمیت نانو داروها نیز از جمله موارد مهمی است که در به کار گیری آن ها، باید مورد توجه خاص قرار گیرد [۳۱].

برای مثال نشان داده شده که فلزات موثر به ویژه آهن و مس می توانند تبدیل O_2^- (آنیون رادیکال سوپراکسید) یا H_2O_2 (پراکسید هیدروژن) را به OH° (رادیکال آزاد هیدروکسید) به وسیلهی واکنش های فنتون یا هابرویس^۱ انجام دهند [۵، ۹، ۴۲]. بنابراین تولید گونه های اکسیژن واکنشی اثرات سمی نانوذرات را موجب می شود [۲۶، ۴۲]. اخیراً در مطالعه ای دیگر نشان داده شده است که تجویز درون بینی نانوذرات اکسید آهن Fe_2O_3 می تواند منجر به تغییر پاتولوژیکی در پیاز بویایی، هیپوکامپ و استریاتوم شود. بعلاوه مشاهده شده است که تجویز نانواکسید آهن منجر به تکثیر و فعال سازی سلول های میکروگلیال در CNS شده و آزاد سازی گونه های اکسیژن واکنشی و نیتریک اکساید را القا می کند [۴۳].

در رابطه با نقش نوروترانسمیترهای دوپامین و سروتونین در حافظه و اثرات ترکیبات آهن بر آنها نیز شواهدی وجود دارد که نشان می دهد سیستم دوپامینرژیک نیز نقش مهمی را در یادگیری، حافظه و فرآیندهای توجه ایفا می کند [۱۲، ۲۸] و مشخص شده آهن اثرات سیتوتوکسیک بر هیپوکامپ داشته و می تواند به طور غیر مستقیم نواحی دیگر مغز را تحت تأثیر

1. Fenton or Haber Weiss reactions

و...) در بعضی نواحی مغزی مرتبط با شکل گیری حافظه از جمله هیپوکامپ باشد و بخشی دیگر مربوط به اندازه ذرات داروهای مذکور باشد که در این راستا نانو ذرات اکسید آهن نسبت به اکسید آهن توده ای بدلیل ویژگیهای فیزیکوشیمیایی خاص خود اثرات وسیع تری را ایجاد می نمایند.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پایان نامه بوده و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز بصورت گرانت (شماره ۹۰/۰۲/۱۸۶۷۲) انجام پذیرفته است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد.

قرار دهد. به عنوان مثال سیستم دوپامینرژیک در جسم سیاه به وسیله تجمع آهن آسیب می بیند. چون این ناحیه از مغز از ساختارهای لیمبیک، قشر مغز و به ویژه هیپوکامپ راه هایی دریافت می کند. این امر می تواند تأثیر جدی بر پاسخ های نواحی مغز که در فرایندهای یادگیری، حافظه و هیجان درگیر هستند، اعمال نماید. بنابراین تجمع آهن در جسم سیاه ممکن است رادیکال های آزاد سیتوتوکسیک ایجاد کند و منجر به آسیب دوپامینرژیک و متعاقباً آسیب های رفتاری شود [۲۲].

در مطالعه ای دیگر نیز گزارش شده است که در موشهای بیمار شده با آهن، سروتونین، دوپامین و کروم موجود در سرم به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش پیدا کرده است و این امر در شرایطی بوده که حجم پراکسیداسیون لپیدی مغز، آهن و روی سرم به صورت معنی داری افزایش یافت [۹]. بنابراین افزایش سطح آهن عامل پراکسیداسیون لپید ها (افزایش استرس اکسیداتیو) [۹، ۲۹، ۳۸] می باشد و ممکن است باعث تسریع اکسیداسیون دوپامین و متعاقب آن تشکیل کوئینون^۱ گردد [۹].

مشاهدات نشان می دهد، باند شدن سروتونین به پروتئین های باندشونده با آن به واسطه ی Fe^{+2} (ولی نه به واسطه ی Fe^{+3}) افزایش می یابد. همچنین مونوآمین ها پیوندهای کوردیناسیونی را با به دام انداختن آهن تشکیل داده و منجر به تغییر شارژ عملکردهای پروتئین های باندشونده با سروتونین می شوند. این یافته ها نشان می دهد که استرس اکسیداتیو القا شده به وسیله ی آهن به شکل مضری نوروترانسمیترها را تحت تأثیر قرار داده و ممکن است منجر به نورودژنراسیون گردد [۹، ۱۷].

بر طبق این مطالب اختلال در سطح نوروترانسمیترهایی مانند سروتونین و دوپامین و متابولیت های اکسید شده شان ممکن است با اختلالات نورودژنراتیو همراه باشد [۲، ۸].

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق بنظر می رسد نانو ذرات اکسید آهن باعث تخریب حافظه احترازی غیر فعال شده و بر اساس گزارش های حاصل از مطالعات قبلی پیشنهاد می شود که اختلال در حافظه احتمالاً بخشی به دلیل اختلال در سیستم های نوروترانسمیتری (سروتونرژیک و دوپامینرژیک

1. Quinone

References

- [1] Batra J, Seth PK, Effect of iron deficiency on developing rat brain. *Indian J Clin Biochem* 17 (2002) 108-114.
- [2] Beard JL, Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning. *J Nutr* 131 (2001) 568-579.
- [3] Burke WJ, Lis W, Chung HD, Ruggiero DA, Kristal BS, Johnson EM, Lampe p, Kumar VB, Franko M, Williams EA, Zahm DS, Neurotoxicity of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology* 25 (2004) 101-115.
- [4] Cengelli F, Maysinger D, Tschudi-Monnet F, Montet X, Corot C, Petri-Fink A, Hofmann H, Juillerat-Jeanneret L, Interaction of Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Brain Structures. *J Pharmacol Exp Ther* 318 (2006) 108-116.
- [5] Cornett CR, Markesbery WR, Ehmann WD, Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicol* 19 (1998) 339-345.
- [6] De Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Grazziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F, Bromberg E, Schröder N, Selegiline protects recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol* 196 (2005) 177-183.
- [7] De Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F, Grazziotin MM, Scalco FS, Guimarães MR, Bromberg E, Franke SI, Henriques JA, Schröder N, Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rat. *Eur J Pharmacol* 570 (2007) 111-114.
- [8] de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS, Roesler R, Schröder N, Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipam in rats. *Neuropharmacology* 55 (2008) 788-792.
- [9] Elseweidy MM, Abd El-Baky AE, Effect of dietary iron overload in rat brain: oxidative stress, neurotransmitter level and serum metal ion in relation to neurodegenerative disorders. *Indian J Exp Biol* 46 (2008) 855-858.
- [10] Faraji AH, Wipf P, Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 17 (2009) 2950-2962.
- [11] Garick MD, Garick LM, Cellular iron transport. *Biochim Biophys Acta* 1790 (2009) 309-325.
- [12] Georgieff MK, The role of iron in neurodevelopment: fetal iron deficiency and the developing hippocampus. *Biochem Soc Trans* 36 (2008) 1267-1271.
- [13] Gotz ME, Double K, Gerlach M, Youdim MBH, Riiederer P, The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinsons disease. Redox-active metals in neurological disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1012 (2004) 193-208.
- [14] Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC, Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117 (2004) 285-297.
- [15] Hoet PH, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV, Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* 2 (2004) 1-15.
- [16] Jellen LC, Beard JL, Jones BC, Systems genetic analysis of iron regulation in the brain, *Biochimie* 91 (2009) 1255-1259.
- [17] Jimenez Del Rio M, Velez Pardo C, Pinxteren J, De Potter W, Ebinger G, Vauquelin G, binding of serotonin and dopamine to serotonin binding proteins in bovine frontal cortex: evidence for iron-induced oxidative mechanisms, interaction with serotonin and catecholamines. *Eur J Pharmacol* 274 (1993) 11-21.
- [18] Jitianu M, Goia DV, Zinc oxide colloids with controlled size, shape, and structure. *J Colloid Interface Sci* 309 (2007) 78- 85.
- [19] Khajepour L, Rezayof A, Zarrindast MR, Involvement of dorsal hippocampal nicotinic receptors in the effect of morphine on memory retrieval in passive avoidance task, *Eur J Pharmacol* 584 (2008) 343-351.
- [20] Konoha K, Sadakane Y, Kawahara M, Zinc neurotoxicity and its role in neurodegenerative disease. *J Health Sci* 52 (2006) 1-8.
- [21] Korczynski RE, Occupational health concerns in the welding industry. *Appl Occup Environ Hyg* 15 (2000) 936-945.
- [22] Maaroufi K, Ammari M, Jeljeli M, Roy V, Sakly M, Abdelmelek H, Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult wistar rats by ferrous sulfate. *Physiol Behav* (2009) 343-349.
- [23] Moos T, Morgan EH, The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: Review.

- Ann N Y Acad Sci* 1012 (2004) 14-26.
- [24] Murray-Kolb LE, Beard JL, Iron treatment normalizes cognitive functioning in young women. *Am J Clin Nutr* 85 (2007) 778-787.
- [25] Nations S, Wages M, Jaclyn E, Maul J, Theodorakis C, Cobb GP, Acute effects of Fe₂O₃, TiO₂, ZnO and CuO nano materials on *Xenopus laevis*. *Chemosphere* 83 (2011) 1053-1061.
- [26] Nel A, Xia T, Madler L, Li N, Toxic potential of materials at the Nanolevel *Sci* 311 (2006) 622-627.
- [27] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113 (2005) 823-839.
- [28] Otero GA, Pliego-Rivero FB, Contreras G, Ricardo J, Fernández T, Iron supplementation brings up P300 in iron deficiency children. *Clin Neurophysiol* 115 (2004) 2259-2266.
- [29] Ponka P, Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1012 (2004) 267-281.
- [30] Samal NK, Paulraj R. Combined role of magnetic iron oxide nanoparticles and 2.45 GHz microwave radiation on antioxidant enzymes of mice. *ICEAA* (2010) 313-316.
- [31] Santhakumar V, Wallner M, Otis TS, Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. *Alcohol* 41 (2007) 211-221.
- [32] Schröder N, Fredriksson A, Vianna MR, Roesler R, Izquierdo I, Archer T, Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav Brain Res* 124 (2001) 77-85.
- [33] Schwarting R, Huston JP, dopamine and serotonin metabolism in brain site ipsi-and contralateral to direction of conditioned turning in rats. *J neurochem* 48 (1987) 1473-1479.
- [34] Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A, DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Lett* 185 (2009) 211-218.
- [35] Thorek DLJ, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging. *Ann Biomed Eng* 34 (2006) 23-38.
- [36] Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, Santamaria AB, Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci* 89 (2006) 42-50.
- [37] Velez-Pardo C, Del Rio MJ, Ebinger G, Vauquelin G, Monoamine and Iron-Related Toxicity: From "Serotonin-Binding Proteins" to Lipid Peroxidation and Apoptosis in PC12 Cells. *Gen Pharmacol* 31 (1998) 19-24.
- [38] Velez-Pardo C, Jimenez Del Rio M, Verschueren H, Ebinger G, Vauquelin G, Dopamine and iron induce apoptosis in PC12 cells. *Pharmacol Toxicol* 80 (1997) 76-84.
- [39] Walker BL, Tiong JW, Jefferies WA, Iron metabolism in mammalian cell. *Int Rev Cytol* 211 (2001) 241-278.
- [40] Wang B, Feng W, Zhu M, Wang Y, Wang M, Gu Y, Ouyang H, Wang H, Li M, Zhao Y, Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice. *J Nanopart Res* 11 (2009) 41-53.
- [41] Wang B, Feng WY, Wang M, Shi JW, Zhang F, Ouyang H, Zhao YL, Chai ZF, Huang YY, Xie YN, Wang HF, Wang J, Transport of intranasally instilled fine Fe₂O₃ particles into the brain: micro-distribution, chemical states, and histopathological observation. *Biol Trace Elem Res* 118 (2007) 233-243.
- [42] Wang B, Wang Y, Feng W, Zhu M, Wang M, Ouyang H, Wang H, Li M, Zhao Y, Chai Z, Trace Metal Disturbance in Mice Brain after Intranasal Exposure of Nano- and Submicron-Sized Fe₂O₃ Particles. *Chem Anal (Warsaw, pol)* 53 (2008) 927-942.
- [43] Wang Y, Wang B, Zhu MT, Li M, Wang HJ, Wang M, Ouyang H, Chai ZF, Feng WY, Zhao YL, Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure. *Toxicol Lett* 205 (2011) 26-37.
- [44] Wu LJ, Leenders AG, Cooperman S, Meyron-Holtz E, Smith S, Land W, Tsai RY, Berger UV, Sheng ZH, Rouault TA. Expression of the iron transporter ferroprotein in synaptic vesicle and the blood-brain-barrier. *Brain Res* 1001 (2004) 108-117.
- [45] Zheng W, Aschner M, Gherzi-Egea JF, Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol Appl Pharmacol* 192 (2003) 1-11.