



بررسی اثر محافظتی اریتروپوئیتین بر بهبود اختلال شناختی ناشی از سرب با مهار دژنراسیون

هیپوکامپی در موش صحرایی نر

سینا واحدی^۱، مهدی خاکساری^{۲*}، شهرام شرفی^۳، ویدا حجتی^۴، ناهید مسعودیان^۳

۱- دانشجوی دکترای تخصصی - گروه زیست‌شناسی - واحد دامغان - دانشگاه آزاد اسلامی دامغان - دامغان - ایران.

۲- استاد فیزیولوژی - گروه فیزیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی شاهرود - شاهرود - ایران.

۳- استادیار - گروه زیست‌شناسی - واحد دامغان - دانشگاه آزاد اسلامی - دامغان - ایران.

۴- دانشیار - گروه زیست‌شناسی - واحد دامغان - دانشگاه آزاد اسلامی - دامغان - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۶

چکیده

مقدمه: سرب، به‌عنوان یک نوروٹوکسین قوی، با القای نورودژنراسیون و مرگ سلولی، موجب تخریب قابل‌توجه ساختار هیپوکامپ می‌شود و اختلال در یادگیری و حافظه وابسته به این ناحیه را به دنبال دارد. اریتروپوئیتین، هورمونی گلیکوپروتئینی با توانایی بالقوه در افزایش بقاء نورونی، به‌عنوان گزینه‌ای امیدوارکننده برای کاهش انواع آسیب‌های ناشی از سمیت عصبی مطرح است. هدف این مطالعه بررسی اثرات نور حفاظتی اریتروپوئیتین بر آسیب‌های هیپوکامپی القا شده توسط سرب در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها: حیوانات به چهارگروه (کنترل، سرب، سرب+اریتروپوئیتین با دوز ۱۰۰۰ کیلوگرم/واحد بین‌الملل و سرب+اریتروپوئیتین با دوز ۲۵۰۰ کیلوگرم/واحد بین‌الملل) تقسیم شدند. استات سرب با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت سه روز و اریتروپوئیتین طی هفت روز پس از آن به‌صورت تزریق داخل صفاقی تجویز شدند. آزمون شناسایی شیء جدید عملکرد حافظه شناختی را سنجید و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین برای ارزیابی دژنراسیون نورونی به‌کار رفت.

نتایج: مواجهه با سرب موجب افت معنادار عملکرد حافظه شناسایی و افزایش شاخص‌های دژنراسیون نورونی در هیپوکامپ شد ($P < 0.001$)، در حالی‌که تجویز اریتروپوئیتین در هر دو دوز ۱۰۰۰ کیلوگرم/واحد بین‌الملل و ۲۵۰۰ کیلوگرم/واحد بین‌الملل به‌ترتیب، با بهبود معنی‌دار شاخص تمایز ($P < 0.001$)، کاهش بروز پیکنوزیس ($P < 0.001$)، کاهش میزان واکوئلاسیون ($P < 0.001$) و افزایش درصد نورون‌های سالم ($P < 0.001$) همراه بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد اریتروپوئیتین از طریق مهار دژنراسیون، اثرات حفاظتی قابل‌توجهی از جمله بهبود عملکرد شناختی در برابر سمیت عصبی القا شده توسط سرب اعمال می‌کند.

واژه‌های کلیدی: نوروٹوکسیسیته سرب، اریتروپوئیتین، دژنراسیون، آزمون شناسایی شیء جدید.

*نویسنده مسئول: شاهرود-میدان هفت تیر- دانشگاه علوم پزشکی- دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۲۳۳۹۵۰۵۴، نمابر: ۳۳۳۹۵۰۵۴، Email: Khaksari417@yahoo.com

ارجاع: واحدی سینا، خاکساری مهدی، شرفی شهرام، حجتی ویدا، مسعودیان ناهید. بررسی اثر محافظتی اریتروپوئیتین بر بهبود اختلال شناختی ناشی از سرب با مهار دژنراسیون هیپوکامپی در موش صحرایی نر. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۴؛ ۲۰(۳): ۱۸-۲۵.



مقدمه

مواجهه با مواد مضر و فلزات سنگین در دنیای معاصر، یکی از تهدیدهای جدی و فزاینده برای سلامت انسان محسوب می‌شود (۱ و ۲). سرب از جمله سمی‌ترین و خطرناک‌ترین عناصر در میان فلزات سنگین به شمار می‌آید، به‌طوری که سازمان ثبت مواد سمی و بیماری‌زای ایالات متحده آمریکا، آن را در رتبه دوم فهرست مواد خطرناک قرار داده است و تنها آرسنیک در جایگاهی بالاتر از آن قرار دارد (۳). مواجهه با سرب عوارض جدی برای سلامت از جمله اختلال در عملکرد کلیه و کبد، افزایش فشار خون و بیماری‌های قلبی عروقی، ناباروری و افزایش خطر ابتلا به برخی سرطان‌ها را به دنبال دارد (۴). همچنین، سرب به‌عنوان یک ماده نوروٹوکسیک بسیار قوی شناخته شده است. تحقیقات نشان داده‌اند که سرب به‌طور انتخابی مناطق خاصی از سیستم عصبی مرکزی را هدف قرار می‌دهد و تمایل بالایی برای اتصال به آن نواحی دارد. به‌طور خاص، سرب با اتصال به گیرنده‌های ان-متیل-دی-آسپاراتات (NMDA) در ناحیه هیپوکامپ به‌عنوان یک آنتاگونیست قوی برای این گیرنده‌ها عمل می‌کند. در واقع گیرنده‌های NMDA نقش کلیدی در ایجاد تقویت بلندمدت (LTP) دارند که فرآیندی مهم در یادگیری و حافظه است. بلوک فعالیت گیرنده‌های NMDA به‌دلیل اثرات آنتاگونیستی سرب، موجب مهار LTP و در نتیجه تضعیف یادگیری و حافظه وابسته به هیپوکامپ می‌شود (۵ و ۶). علاوه بر این، سرب می‌تواند زنجیره‌ای از اثرات سمی عصبی را القاء کند که در نهایت منجر به از دست رفتن نورون‌های نواحی مختلف هیپوکامپ و نقص در عملکردهای مرتبط با این ناحیه شود (۶). مطالعات زیادی تخریب انواع مختلف حافظه و یادگیری را به دنبال قرارگیری در معرض این فلز سنگین گزارش و این نقایص را به دلیل از دست رفتن سلول‌های عصبی ناحیه هیپوکامپ عنوان کرده‌اند (۶). یافته‌های اخیر توسط کائو و همکاران نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض سطوح پایین سرب در طولانی‌مدت در موجب مرگ نورونی گسترده از نوع آپوپتوز، نکروز و فروپتوز در ناحیه هیپوکامپ موش‌های نژاد C57BL/6J و اختلال عملکرد شناختی در آزمون تشخیص شیء جدید شده است. علاوه بر این، مشخص شده است که به‌دنبال افزایش شاخص‌های استرس اکسیداتیوی به‌واسطه سرب و تخریب نورونی، تراکم نورون‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی ویستار به شکل قابل توجهی کاهش یافته است که این کاهش با نقص در عملکرد حافظه بلندمدت و کوتاه مدت حیوان همراه بوده است (۷). افزون بر این، براساس مطالعه زوو و همکاران مواجهه با سرب علاوه بر آسیب به اتصالات عصبی نواحی CA1 و DG هیپوکامپ موش‌های نژاد Thy1-cre، منجر به اختلال در مسیرهای تحریکی مناطق مذکور

شده است که در نتیجه آن کاهش توانایی یادگیری فضایی و ایجاد نقص حافظه در آزمون ماز آبی موریس و آزمون ماز بارنز اتفاق افتاده است (۸). در مجموع پژوهش‌های پیشین حکایت از حساسیت بالای ساختار هیپوکامپ نسبت به مواجهه با سرب و تخریب انواع حافظه مرتبط با آن دارد (۸). لازم به ذکر است که سرب از طریق مکانیسم‌های متعددی از جمله برهم‌زدن تعادل سیستم اکسیدان/آنتی‌اکسیدان و تحریک التهاب عصبی عمل می‌کند و هم‌افزایی این مکانیسم‌ها به مرگ نورونی گسترده در هیپوکامپ منجر می‌شود (۷ و ۸). مطالعات نشان داده‌اند که برخی داروهای دارای اثر محافظت‌کننده عصبی قوی می‌توانند در بازگرداندن یا کاهش آسیب‌های ناشی از سمیت عصبی سرب مؤثر باشند (۹). اریتروپوئیتین هورمونی گلیکوپروتئینی است که به‌دلیل توانایی‌اش در افزایش بقای نورونی و کاهش مرگ سلولی به‌عنوان یک گزینه امیدوارکننده و راهکار درمانی بالقوه در مدل‌های مختلف سمیت عصبی مطرح شده است. تا دهه‌های پیش این تصور وجود داشت که اریتروپوئیتین صرفاً در کلیه و کبد سنتز می‌شود و نقش آن محدود به بلوغ و تکوین سلول‌های خونی و هماتوپوئزی است، اما مطالعات فعلی نشان می‌دهند که اریتروپوئیتین در بافت‌های عصبی نیز بیان شده و عملکردهایی فراتر از تولید سلول‌های خونی دارد (۱۰). در واقع، پژوهش‌های اخیر وجود اریتروپوئیتین و گیرنده آن را در سیستم عصبی مرکزی تأیید کرده‌اند که بیانگر عملکردهای زیستی گسترده‌تر این سیستم است. نکته جالب توجه این است که در هیپوکامپ، که ناحیه اصلی مغز برای عملکردهای حافظه، یادگیری، جهت‌یابی و شناخت می‌باشد، سیگنال‌دهی سیستم اریتروپوئیتینی بسیار گسترده است (۱۱). در واقع میزان بالای تعامل اریتروپوئیتین و رسیپتور آن در هیپوکامپ نشان‌دهنده رابطه بین سیستم اریتروپوئیتینی و عملکردهای مغزی است که به این ناحیه مرتبط هستند (۱۲). با توجه به پیشینه‌ی موجود درباره‌ی اثرات محافظتی اریتروپوئیتین و همچنین بر اساس اثرات نامطلوب سرب بر جنبه‌های مختلف حوزه‌های شناختی و حافظه‌ای این مطالعه طراحی گردید. این مطالعه برای نخستین بار تأثیر درمانی این دارو را بر سمیت عصبی ناشی از مواجهه با سرب مورد ارزیابی قرار داده است. به‌طور خاص هدف این پژوهش بررسی تأثیر احتمالی اریتروپوئیتین در بهبود اختلال حافظه شناختی ناشی از تماس با سرب و نقش احتمالی آن در بقای نورونی از طریق کاهش نورودژنراسیون و حفظ تراکم سلولی در هیپوکامپ بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر بر روی ۶۰ موش صحرایی نر از نژاد ویستار انجام شد. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور تهران تهیه

با محلول اتانول ۷۵ درصد ضدعفونی شدند. این آزمون در سه مرحله متوالی شامل مرحله عادت‌دهی، مرحله آشنایی با اشیاء و مرحله آزمون انجام شد. در مرحله عادت‌دهی هر حیوان به‌صورت انفرادی به مدت ۵ دقیقه در محفظه خالی قرار داده شد تا آزادانه محیط را بررسی و کاوش کند. روز بعد که مرحله آشنایی با اشیاء بود دو شیء کاملاً یکسان از نظر شکل، جنس، اندازه و رنگ در داخل محفظه قرار داده شد. سپس موش در حضور این دو شیء به مدت ۵ دقیقه در جعبه قرار داده شد و پس از آن به قفس خود بازگردانده شد. پس از گذشت ۶۰ دقیقه دوباره حیوان به محفظه آزمایش جهت اجرای مرحله آزمون انتقال داده شد، اما این بار یکی از اشیاء قبلی با یک شیء جدید جایگزین شده بود. حیوان مجدداً به مدت ۵ دقیقه فرصت داشت تا اشیاء را بررسی کند. رفتارهایی نظیر بوکشیدن و لمس کردن اشیاء از فاصله کمتر از یک سانتی‌متر به‌عنوان رفتارهای کاوشی تعریف شدند. رفتارهایی مانند پریدن روی اشیاء یا جویدن آن‌ها در معیارهای کاوش لحاظ نشدند. به‌منظور سنجش گرایش حیوان به شیء جدید، شاخص تمایز محاسبه گردید. این شاخص از اختلاف زمان کاوش شیء جدید و شیء آشنا، تقسیم بر مجموع این دو زمان در مرحله آزمون به‌دست می‌آید. افزایش مقدار این شاخص نشان‌دهنده ترجیح حیوان برای کاوش شیء جدید و در نتیجه عملکرد بهتر حافظه تشخیص شیء می‌باشد (۱۵).

یک روز پس از انجام آزمون شناسایی شیء جدید، حیوانات تحت بیهوشی عمیق با تزریق داخل‌صفاقی زایلازین ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و کتامین ۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم قرار گرفتند. سپس پرفیوژن ترانس‌کاردیال با محلول فیزیولوژیک انجام شد و پس از آن، سر حیوانات با گیوتین جدا و مغز آن‌ها استخراج گردید (۱۶). بافت مغز به مدت ۲۴ ساعت در محلول فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. نمونه‌ها سپس به مدت ۷۲ ساعت در پارافین مذاب تثبیت و قالب‌گیری شدند. با توجه به نقشه اطلس پاکسینوس، برش‌های کرومال ۵ میکرومتری از ناحیه هیپوکامپ، توسط میکروتوم تهیه شدند. برای رنگ‌آمیزی، برش‌ها ابتدا دیارافینه و آب‌گیری معکوس شده، سپس با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند تا هسته‌ها به رنگ آبی _ بنفش نمایان گردند. پس از شست‌وشو، مقاطع با اتوزین رنگ‌آمیزی شدند تا سیتوپلاسم به رنگ صورتی قابل مشاهده شود. ارزیابی میکروسکوپی در بزرگنمایی‌های X400 انجام گرفت و تغییرات مورفولوژیک شامل پیکنوزیس (افزایش غیرطبیعی بازوفیلیته و رنگ‌پذیری بیش از حد سلولی)، واکوئلاسیون (تشکیل فضاهای خالی بین سلولی به دنبال از دست رفتن اجسام سلولی پس از مرگ نورونی) و وضعیت غیردژنره/سالم (نورون‌هایی با نمای طبیعی) به‌عنوان شاخص‌های

شده و برای آماده‌سازی پیش از اجرای آزمایش، به مدت یک هفته در اتاق حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شاهرود نگهداری شدند. در آغاز مطالعه، موش‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن‌کشی شده و میانگین وزن آن‌ها بین ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم بود. در طول مدت آزمایش، حیوانات از رژیم غذایی استاندارد برخوردار بودند و غذا و آب به‌صورت آزادانه و بدون محدودیت در دسترس آن‌ها قرار داشت. دمای محیط به شکل استاندارد بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای حفظ شرایط فیزیولوژیک طبیعی حیوانات رعایت شد. در شروع آزمایش، حیوانات به شکل تصادفی در چهار گروه ۱۲‌تایی به شرح زیر قرار داده شدند:

گروه اول - گروه کنترل: حیوانات این گروه هیچ‌گونه دارویی دریافت نکردند و تنها با آب مقطر به‌صورت تزریق داخل‌صفاقی تحت تیمار قرار گرفتند.

گروه دوم - گروه سرب: حیوانات این گروه استات سرب با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم را به‌صورت تزریق داخل‌صفاقی، به مدت سه روز متوالی دریافت کردند (۱۳).

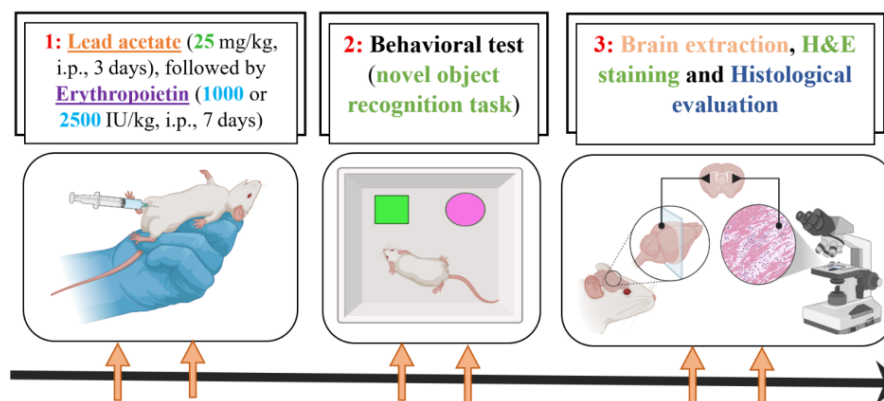
گروه سوم - گروه سرب + اریترپوئیتین: حیوانات این گروه ابتدا استات سرب با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم را به‌صورت تزریق داخل‌صفاقی و به مدت سه روز متوالی دریافت کردند. بعد از آخرین تزریق سرب، اریترپوئیتین با دوز ۱۰۰۰ کیلوگرم/واحد بین‌الملل، به‌صورت تزریق داخل‌صفاقی و به مدت هفت روز متوالی تجویز شد (۱۰).

گروه چهارم - گروه سرب + اریترپوئیتین: حیوانات این گروه ابتدا استات سرب با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت تزریق داخل‌صفاقی و به مدت سه روز متوالی دریافت کردند. پس از آخرین تزریق سرب، اریترپوئیتین با دوز ۲۵۰۰ کیلوگرم/واحد بین‌الملل، به‌صورت تزریق داخل‌صفاقی و به مدت هفت روز متوالی تجویز شد (۱۴). این پژوهش تحت پروتکل‌های استاندارد اخلاق انجام شده است و دارای کد اخلاق IR.SHMU.AEC.1402.017 می‌باشد.

آزمایش‌شناسایی شیء جدید: این آزمون به‌عنوان یک روش معتبر و رایج جهت ارزیابی حافظه شناختی غیرفضایی در جوندگان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آزمون بر پایه تمایل طبیعی حیوانات برای کاوش اشیاء جدید طراحی شده است و بدون استفاده از هرگونه تقویت مثبت یا منفی انجام می‌شود. محفظه آزمون شامل یک جعبه مکعبی سیاه‌رنگ از جنس پلکسی گلس با ابعاد ۶۰×۶۰×۳۰ سانتی‌متر (طول × عرض × ارتفاع) بود. اشیاء مورد استفاده از جنس پلکسی گلس رنگی ساخته شده و به کف جعبه فیکس شده بودند تا از جابجایی آن‌ها توسط حیوان جلوگیری شود. جهت حذف سرنخ‌های بویایی، پیش از انجام هر آزمون، تمامی تجهیزات و اشیاء

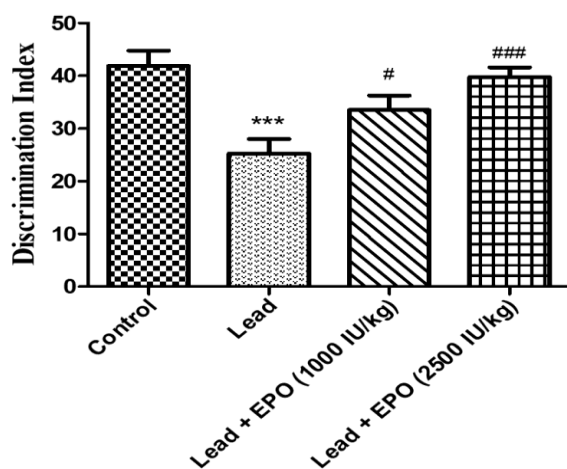
دژنراسیون/عدم دژنراسیون ثبت و تحلیل گردیدند (۱۷ و ۱۸). زمانبندی و مراحل انجام آزمایش در شکل ۱ آورده شده است.

دارای پیکنوزیس در گروه دریافت کننده سرب به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.001$). تجویز اریتروپوئیتین با دوزهای ۱۰۰۰



شکل ۱- زمانبندی و مراحل انجام آزمایش

کیلوگرم/واحد بین الملل و ۲۵۰۰ کیلوگرم/واحد بین الملل به ترتیب موجب کاهش قابل توجه بروز پیکنوزیس در ناحیه هیپوکمپ در مقایسه با گروه دریافت کننده سرب شد ($P < 0.001$, $P < 0.05$; نمودار ۳).



نمودار ۱- آزمون تشخیص شیء جدید

نمودار مقایسه ای شاخص تمایز در بین گروه های آزمایشی کنترل، گروه سرب، گروه سرب + اریتروپوئیتین ۱۰۰۰ و گروه سرب + اریتروپوئیتین ۲۵۰۰. *** اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0.001$), ### اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه سرب ($P < 0.001$), # اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه سرب ($P < 0.05$).

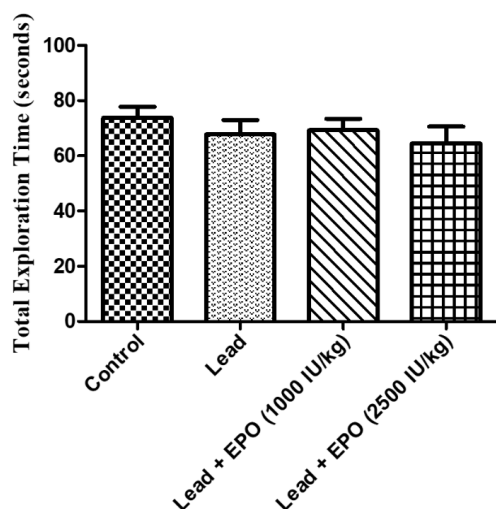
همچنین، نسبت نورون های واکوئله شده در گروه دریافت کننده سرب به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود ($P < 0.01$). درمان با اریتروپوئیتین با دوزهای ۱۰۰۰ کیلوگرم/واحد بین الملل و ۲۵۰۰ کیلوگرم/واحد بین الملل به ترتیب این شاخص را به طور معنی داری نسبت به گروه دریافت کننده سرب کاهش داد ($P < 0.01$, $P < 0.05$; نمودار ۳). در مقابل، نسبت نورون های سالم یا غیردژنره، که فاقد پیکنوزیس یا

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار پرسم انجام شد و برای مقایسه گروه ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. نتایج به صورت میانگین به همراه خطای معیار ارایه شد و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

تحلیل آماری در مرحله آزمون تشخیص شیء جدید، نشان داد که شاخص تمایز در گروه دریافت کننده استات سرب به طور معناداری پایین تر از گروه کنترل بود ($P < 0.001$). در مقابل، این شاخص در گروه های دریافت کننده اریتروپوئیتین با دوزهای ۱۰۰۰ کیلوگرم / واحد بین الملل و ۲۵۰۰ کیلوگرم / واحد بین الملل نسبت به گروه سرب به ترتیب به طور معنی داری افزایش داشت ($P < 0.05$, $P < 0.001$; نمودار ۱). افزون بر این، نتایج نمودار ۲ نشان داد که در زمان کل کاوش میان گروه ها، تفاوت معناداری وجود نداشت. این یافته ها تأیید می کند که مواجهه با سرب موجب اختلال قابل توجه در حافظه شناسایی اشیاء می شود که مداخله با اریتروپوئیتین عملکرد کاوش شیء جدید را بهبود و شاخص تمایز را افزایش داد. این نتیجه، بیانگر اثر محافظتی این دارو در برابر آسیب های شناختی ناشی از سرب است.

میزان نورودژنراسیون در ناحیه هیپوکمپ با بررسی میکروسکوپی مقاطع رنگ شده با همتوکسیلین _ اتوزین تعیین شد. شاخص های دژنراسیون شامل پیکنوزیس (افزایش بازوفیلیته و رنگ پذیری سلولی)، واکوئلاسیون (تشکیل فضاهای خالی بین سلولی به دنبال از دست رفتن اجسام سلولی پس از مرگ نورونی) و وضعیت غیردژنره/سالم (نورون هایی با نمای طبیعی) در نظر گرفته شد (شکل ۲). براساس نتایج، درصد نورون های



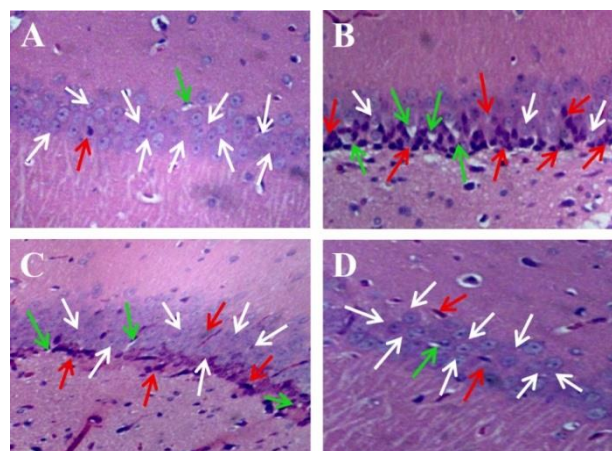
نمودار ۳- اثرات اریتروپوئیتین بر نورودژنراسیون سلول‌های ناحیه هیپوکمپ نمودار مقایسه‌ای شاخص تمایز در بین گروه‌های آزمایشی کنترل، گروه سرب، گروه سرب + اریتروپوئیتین ۱۰۰۰ و گروه سرب + اریتروپوئیتین ۲۵۰۰. *** اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0.001$), ** اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0.01$), ### اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سرب ($P < 0.001$), ## اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سرب ($P < 0.01$), # اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سرب ($P < 0.05$).

بحث

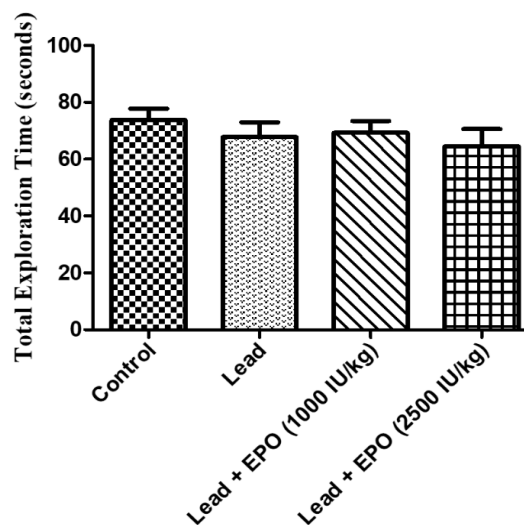
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه با سرب باعث کاهش معنی‌دار عملکرد حافظه شناسایی و افزایش شاخص‌های دژنراسیون نورونی در ناحیه هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر شد. در مقابل، تجویز اریتروپوئیتین در هر دو دوز آزمایشی، موجب بهبود قابل توجه عملکرد شناختی، کاهش میزان نورون‌های پیکنوتیک و واکوتله، و افزایش درصد نورون‌های سالم گردید. این یافته‌ها به‌طور کلی حاکی از آن است که اریتروپوئیتین توانسته با مهار فرآیندهای دژنراتیو، آسیب‌های ناشی از سمیت عصبی سرب را کاهش دهد و کارکردهای وابسته به هیپوکمپ را حفظ نماید.

در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، نورودژنراسیون در ناحیه هیپوکمپ معمولاً با تغییرات میکروسکوپی مشخص در مورفولوژی نورون‌ها قابل شناسایی است. از برجسته‌ترین این تغییرات، پیکنوزیس است که طی آن هسته نورون کوچک، فشرده و به‌شدت بازوفیلیک شده و نشان‌دهنده فرآیند چروکیدگی هسته در مراحل نهایی مرگ سلولی می‌باشد. در مراحل پیشرفته‌تر، واکوتله‌شدن نورونی مشاهده می‌شود که به‌صورت تشکیل فضاهای خالی بین سلولی تظاهر می‌یابد. این پدیده غالباً در پی حذف اجسام سلولی نورون‌های دژنره و باقی‌ماندن فضاهای بینابینی غیرطبیعی در بافت رخ می‌دهد. حضور این حفره‌ها بیانگر از دست رفتن

واکوتله‌شدن بوده و از نظر ظاهری ساختار طبیعی خود را حفظ کرده بودند، در گروه سرب به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($P < 0.001$), در حالی که درمان با اریتروپوئیتین در هر دو دوز یادشده، به‌ترتیب، این میزان را به‌طور قابل توجهی افزایش داد ($P < 0.001$, $P < 0.01$; نمودار ۳).



نمودار ۲- نمودار مقایسه‌ای زمان کل کاوش در آزمون تشخیص شیء جدید در بین گروه‌های آزمایشی کنترل، گروه سرب، گروه سرب + اریتروپوئیتین ۱۰۰۰ و گروه سرب + اریتروپوئیتین ۲۵۰۰.



شکل ۲- فوتومیکروگراف از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین در ناحیه هیپوکمپ پس از ایجاد نوروتوکسیته ناشی از سرب: (A) گروه کنترل، (B) گروه سرب، (C) گروه سرب + اریتروپوئیتین ۱۰۰۰، (D) گروه سرب + اریتروپوئیتین ۲۵۰۰.

پیکان‌ها با رنگ سفید نمایش‌دهنده نورون‌های طبیعی، پیکان‌ها با رنگ قرمز نمایش‌دهنده نورون‌های پیکنوتیک، پیکان‌ها با رنگ سبز نمایش‌دهنده واکوتلاسیون نورونی

مرتبط با تخریب نورونی شامل p53، کاسپاز-3 و Bax همراه با افزایش مارکر بقای سلولی Bcl-2، توصیف شده است (۲۲).

علاوه بر ویژگی‌های ضدآپوپتوتیک، اریتروپوئیتین با کاهش بیان نشانگرهای مرتبط با نورودژنراسیون ناشی از اتوفاژی، از جمله P62، در ناحیه هیپوکامپ، فرآیندهای تخریب نورونی را مهار کرده و در نتیجه شاخص‌های شناختی همچون یادگیری و حافظه را بهبود می‌بخشد. در راستای تأیید این آثار نورحفاظتی، ژوو و همکاران گزارش کرده‌اند که تجویز دی اریتروپوئیتین، پپتیدی مشتق از اریتروپوئیتین، موجب کاهش اختلالات حافظه‌ی فضایی و کاهش اضطراب در مدل دمانس عروقی در موش می‌شود، اثری که احتمالاً از طریق فعال‌سازی گیرنده‌ی اریتروپوئیتین و آغاز آبشارهای سیگنال‌دهی حامی بقا شامل مسیرهای JAK2/STAT5/AKT رخ داده و در نهایت با حفظ یکپارچگی نورون‌های هیپوکامپی همراه بوده است (۲۳).

به‌طور کلی، شواهد حاصل از این پژوهش و مطالعات پیشین تصویر روشنی از نقش چندوجهی و قوی اریتروپوئیتین در حفاظت عصبی ترسیم می‌کنند (۲۴). در این مطالعه، همبستگی معنادار میان کاهش نورون‌های پیکنوتیک و واکوئل و همچنین افزایش بقای سلول‌های عصبی هیپوکامپی با بهبود شاخص تشخیص در آزمون شناسایی شیء جدید، نشان داد که اریتروپوئیتین قادر است روند دژنراسیون ناشی از سمیت سرب را مهار کرده و مانع افت عملکرد شناختی ناشی از آن شود. این هم‌زمانی تغییرات ساختاری و عملکردی، علاوه بر تأیید مکانیزم‌های چندگانه حفاظت عصبی توسط اریتروپوئیتین، جایگاه آن را به‌عنوان یک مداخله بالقوه در پیشگیری و تعدیل آسیب‌های ناشی از مواجهه با سرب برجسته می‌سازد. به‌عنوان نمونه، کارگران معادن سرب به‌دلیل تماس روزانه و مزمن با این نوروتوکسین در معرض خطر بالای اختلالات شناختی و دژنراسیون هیپوکامپی قرار دارند، وضعیتی که می‌تواند موجب کاهش کارایی حافظه، افت عملکردهای وابسته به هیپوکامپ و افزایش احتمال بروز بیماری‌های نورودژنراتیو شود. یافته‌های این پژوهش بر ضرورت انجام مطالعات انسانی در جمعیت‌های شغلی پرخطر برای ارزیابی نقش اریتروپوئیتین در ارتقاء و بازتوانی عملکردهای شناختی تأکید دارد. همچنین، با توجه به شواهد مطالعه حاضر، بررسی ظرفیت نورحفاظتی اریتروپوئیتین در مدل‌های آسیب ناشی از سایر آلاینده‌ها و فلزات سنگین نیز در آینده می‌تواند ارزشمند و مفید باشد، لذا پرداختن به آن در پژوهش‌های آتی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمام افرادی که در اجرای این مطالعه همراهی کردند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

ملاحظات اخلاقی

این طرح دارای کد اخلاق IR.SHMU.AEC.1402.017 می‌باشد.

نورون‌های عملکردی و تخریب قابل ملاحظه شبکه عصبی است (۱۸). یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد قرارگیری در معرض سرب باعث بروز تغییرات پاتومورفولوژیک گسترده در نورون‌های هیپوکامپی شامل افزایش واکوئالاسیون و پیکنوزیس نورونی و همچنین کاهش قابل توجه نورون‌های دارای ساختار طبیعی می‌شود. پژوهش پیش رو نشان داد تجویز اریتروپوئیتین، به‌ویژه در دوز بالاتر، با کاهش شاخص‌های دژنراسیون و افزایش درصد نورون‌های سالم، از تخریب عصبی ساختار هیپوکامپ در برابر سرب جلوگیری کرده و به‌دنبال آن، عملکرد شناختی وابسته به این ساختار را در آزمون شناسایی شیء جدید بهبود می‌دهد.

یافته‌های حاصل از مطالعات متنوع، از کشت‌های سلولی کنترل‌شده تا مدل‌های حیوانی پیچیده، نشان می‌دهد که اریتروپوئیتین با فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی حامی بقاء نورونی و تعدیل پاسخ‌های التهابی - اکسیداتیو، نه‌تنها روند دژنراسیون را سرکوب می‌کند بلکه از بروز آسیب‌های ساختاری و عملکردی نورون‌ها پیشگیری نیز می‌کند (۱۹). این همگرایی شواهد در سطوح مولکولی و بافتی، جایگاه اریتروپوئیتین را به‌عنوان یک عامل نورحفاظتی چندوجهی در شرایط نوروتوکسیسیته به اثبات رسانیده است. به‌طور مثال، مطالعه‌ای پیشگام توسط چونگ و همکاران نشان داد که در پی مواجهه با اریتروپوئیتین، نورون‌های هیپوکامپی اولیه که در معرض بتا-آمیلوئید قرار داشتند، توانستند یکپارچگی DNA ژنومی و تقارن غشای سلولی خود را حفظ کنند و از آسیب آپوپتوتیک مصون بمانند (۲۰). علاوه بر این، شواهد نشان می‌دهد که اریتروپوئیتین با مهار GSK-3 β و سرکوب فعالیت کاسپاز-3، مسیرهای تخریب سلولی را مسدود کرده و از مرگ نورون‌های قشری مغز رت در برابر نوروتوکسیسیته القا شده توسط کتامین پیشگیری می‌کند (۲۰). همچنین، شواهد جالبی وجود دارد که نشان می‌دهد تجویز اریتروپوئیتین پیش از بروز آسیب نورونی، با افزایش بیان گیرنده‌ی اختصاصی آن در نورون‌ها، از بروز فرآیندهای دژنراتیو پیشگیری می‌کند. این پدیده با افزایش میزان Bcl-xL که یک پروتئین ضدآپوپتوز و شاخص بقای سلولی است همراه بوده است (۲۱ و ۲۲).

همچنین، پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند که اریتروپوئیتین و آنالوگ‌های آن با مهار دژنراسیون نورون‌های هیپوکامپی، موجب تقویت بقاء نورونی و بهبود شاخص‌های شناختی و حافظه‌ای وابسته به هیپوکامپ می‌شوند. در همین راستا، صبری و همکاران گزارش کرده‌اند که اریتروپوئیتین اختلالات حافظه و یادگیری القا شده توسط داروی متوترکسات را در رت‌های ویستار کاهش می‌دهد، یافته‌ای که با نتایج آزمون‌های رفتاری شناختی ماز آب موریس و ماز Y شکل تأیید شده است. لازم به ذکر است که آثار تقویت‌کننده حافظه و شناخت اریتروپوئیتین در برابر نوروتوکسیسیته ناشی از متوترکسات، با کاهش سطوح نشانگرهای

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تضاد بالقوه منافع را اعلام نکردند.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول و مسئول: طراحی و اجرای پژوهش

نویسنده سوم: نگارش مقاله

نویسنده چهارم: ویرایش مقاله

نویسنده پنجم: تجزیه و تحلیل آماری نتایج

حمایت مالی

حامی مالی ندارد.

کد اخلاق

IR.SHMU.AEC.1402.017

References

- hippocampus. *Peptides* 2025;186:171368. doi: 10.1016/j.peptides.2025.171368:
- Newton SS, Sathyanesan M. Erythropoietin and non-erythropoietic derivatives in cognition. *Frontiers in Pharmacology* 2021;12:728725. doi: 10.3389/fphar.2021.728725
- Garmabi B, Mohaddes R, Rezvani F, Mohseni F, Khastar H. Erythropoietin improve spatial memory impairment following methamphetamine neurotoxicity by inhibition of apoptosis, oxidative stress and neuroinflammation in CA1 area of hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2022;124:102137. doi: 10.1016/j.jchemneu.2022.102137
- Rafaeie R, Khastar H, Garmabi B, Taleb M, Norouzi P, Khaksari M. Hydrogen sulfide protects hippocampal CA1 neurons against lead mediated neuronal damage via reduction oxidative stress in male rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2021;112:101917. doi: 10.1016/j.jchemneu.2020.101917
- Moallem SA, Mohamadpour AH, Abnous K, Sankian M, Sadeghnia HR, Tsatsakis A, et al. Erythropoietin in the treatment of carbon monoxide neurotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology* 2015;86:56-64. doi: 10.1016/j.fct.2015.09.015
- Mohseni F, Khaksari M, Rafaeie R, Rahimi K, Norouzi P, Garmabi B. Apelin 13 improves anxiety and cognition via hippocampal increases BDNF expression and reduction cell death in neonatal alcohol exposed rats. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2021;27:1351-62.
- Sabzali M, Eidi A, Khaksari M, Khastar H. Anti-inflammatory, antioxidant, and antiapoptotic action of metformin attenuates ethanol neurotoxicity in the animal model of fetal alcohol spectrum disorders. *Neurotoxicity Research* 2022;40:605-13.
- Erfani S, Aboutaleb N, Oryan S, Shamsaei N, Khaksari M, Kalalian-Moghaddam H, et al. Visfatin inhibits apoptosis and necrosis of hippocampus CA3 cells following transient global ischemia/reperfusion in rats. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2015;21:223-8.
- Wick MR, editor *The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology-An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory. Seminars in diagnostic pathology*; 2019: doi:10.1053/j.semdp.2019.06.003
- Rafaeie R, Mohseni F. Erythropoietin Attenuates Anxiety and Neurodevelopmental Neurotoxicity in Male Rats with Fetal Alcohol Spectrum Disorder via Increased BDNF-Positive Cells, Astroglial Suppression, and Reduced Hippocampal Cell Death. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs* 2025;jsad. 24-00389. doi: 10.15288/jsad.24-00389
- Chong ZZ, Li F, Maiese K. Erythropoietin requires NF- κ B and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during β -amyloid toxicity. *Current Neurovascular Research* 2005;2:387-99. doi: 10.2174/156720205774962683
- Sabry NC, Michel HE, Menze ET. Repurposing of erythropoietin as a neuroprotective agent against methotrexate-induced neurotoxicity in rats. *Journal of Psychopharmacology* 2025;39:147-63.
- Yang J, Huang Y, Yu X, Sun H, Li Y. Erythropoietin preconditioning suppresses neuronal death following status epilepticus in rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2007;67:141-8. doi: 10.1177/02698811241295379
- Zhou Z, Ma Y, Wu T, Xu T, Wu S, Yang G-Y, et al. A novel neuroprotective derived peptide of erythropoietin improved cognitive function in vascular dementia mice. *Molecular Neurobiology* 2025;62:6014-26.
- Gheibi M, Nazari S, Mohseni F, Salehi Sangani P, Felekhari F, Niknamfar S, et al. Coenzyme Q10 ameliorates anxiety and depression-like behavior associated with chronic opioid use and increases GDNF expression in the hippocampus of morphine-dependent rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2025;85:94-104. doi: 10.55782/ane-2025-2581
- Mohseni F, Khaksari M, Khoramrooz M, Rafaeie R, Mirrezaie SM. Emerging Risk of Ethanol-related Outbreak via Clandestine Alcohol Consumption During Pregnancy: An Alarming Note on Prevention of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in Iran. *International Journal of High Risk Behaviors and Addiction* 2023;12. doi: 10.5812/ijhrba-131881
- Mohseni F, Rahimi K, Sarvandani MN, Jamali Z, Tamijani SMS, Rafaeie R. Lapse and relapse rates in narcotics anonymous versus methadone maintenance treatment: A 12-month prospective study. *Iranian Journal of Psychiatry* 2022;17:1. doi: 10.18502/ijps.v17i1.8044
- Shah A, Arjunan A, Baroutaji A, Zakharova J. A review of physicochemical and biological contaminants in drinking water and their impacts on human health. *Water Science and Engineering* 2023;16:333-44. doi: 10.1016/j.wse.2023.04.003
- Steenland K, Boffetta P. Lead and cancer in humans: where are we now? *American Journal of Industrial Medicine* 2000;38:295-9. doi: 10.1002/1097-0274(200009)38:3<295
- Hori N, Büsselberg D, Matthews M, Parsons P, Carpenter D. Lead blocks LTP by an action not at NMDA receptors. *Experimental Neurology* 1993;119:192-7. doi: 10.1006/exnr.1993.1020
- Lasley SM, Gilbert ME. Glutamatergic components underlying lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity. *Neurotoxicology* 2000;21:1057-68.
- Cao Y, Zhao W, Zhong Y, Jiang X, Mei H, Chang Y, et al. Effects of chronic low-level lead (Pb) exposure on cognitive function and hippocampal neuronal ferroptosis: An integrative approach using bioinformatics analysis, machine learning, and experimental validation. *Science of the Total Environment* 2024;917:170317. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.170317
- Zou R-X, Gu X, Huang C, Wang H-L, Chen X-t. Chronic Pb exposure impairs learning and memory abilities by inhibiting excitatory projection neuro-circuit of the hippocampus in mice. *Toxicology* 2024;502:153717. doi: 10.1016/j.tox.2023.153717
- Mehrjerdi FZ, Niknazar S, Yadegari M, Akbari FA, Pirmoradi Z, Khaksari M. Carvacrol reduces hippocampal cell death and improves learning and memory deficits following lead-induced neurotoxicity via antioxidant activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2020;393:1229.
- Rafaeie R, Mohseni F, Garmabi B, Masoudi A, Jamali Z, Mohammadi S, et al. Erythropoietin improves spatial and nonspatial memory defects by suppressing oxidative damage, inflammation and apoptosis against ethanol neurotoxicity in the developing male rat



Erythropoietin Ameliorates Lead-Induced Cognitive Impairment Through Attenuation of Hippocampal Neurodegeneration in Male Wistar Rats

Sina Vahedi (Ph.D. Student)¹, Mehdi Khaksari (Ph.D.)^{2*}, Shahram Sharafi (Ph.D.)¹, Vida Hojati (Ph.D.)¹, Nahid Masoudian (Ph.D.)¹

1- Department of Biology, Da.C., Islamic Azad University, Damghan, Iran.

2- School of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran.

Received: 2 September 2025, Accepted: 28 September 2025

Abstract:

Introduction: Lead, as a potent neurotoxin, induces neurodegeneration and cell death, leading to significant structural damage of the hippocampus and impairments in hippocampal dependent learning and memory. Erythropoietin (EPO), a glycoprotein hormone with a strong potential to enhance neuronal survival, has emerged as a promising candidate for mitigating various forms of neurotoxic injury. This study aimed to evaluate the neuroprotective effects of EPO against lead induced hippocampal damage in male Wistar rats.

Methods: Animals were randomly allocated into four groups: control, lead, lead + EPO (1000 IU/kg), and lead + EPO (2500 IU/kg). Lead acetate (25 mg/kg) was administered intraperitoneally for three consecutive days, followed by EPO for seven days. Cognitive performance was assessed using the Novel Object Recognition test, and neurodegeneration was evaluated by hematoxylin-eosin staining.

Results: Lead exposure significantly impaired recognition memory and increased hippocampal neurodegeneration indices ($P < 0.001$). Administration of EPO at both 1000 IU/kg and 2500 IU/kg significantly improved the discrimination index ($P < 0.001$, $P < 0.05$), reduced pyknotic neurons ($P < 0.001$, $P < 0.05$), decreased vacuolization ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and increased the percentage of morphologically intact neurons ($P < 0.001$, $P < 0.01$) relative to the lead group.

Conclusion: These findings suggest that EPO confers significant protective effects, including improvement of cognitive performance, against lead induced neurotoxicity through attenuation of hippocampal neurodegeneration.

Keywords: lead neurotoxicity, Erythropoietin, Neurodegeneration, Novel object recognition test.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Khaksari, Email: Khaksari417@yahoo.com

Citation: Vahedi S, Khaksari M, Sharafi Sh, Hojati V, Masoudian N. Erythropoietin ameliorates lead-induced cognitive impairment through attenuation of hippocampal neurodegeneration in male wistar rats. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2025;20(3):18-25.

