Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(107): 35-48

Study of Melatonin Protective Effects on Learning and Memory Deficits Induced by Administration of Lead during Pregnancy and Postpartum in Rat: Behavioral and Biochemical Evaluations

Elham Soleimani[1], Iran Goudarzi[2*], Kataneh Abrari[2], Taghi Lashkarbolouki[3]

1- MSc Student in Anirmal Physiology, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Physiology, Damghan University, Damghan, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Biochemistry, Damghan University, Damghan, Iran.

Received: 21 Nov 2015, Accepted: 12 Jan 2016

Abstract

Background: Few studies have investigated the possible ways to prevent lead induced defects during gestation and lactation. The aim of this study was to investigate the effect of melatonin as a hormone with antioxidant properties on oxidative stress in the hippocampus and learning and memory impairment induced by administration of lead.

Materials and Methods: Pregnant rats were exposed to treatments of control, lead acetate (0.2% solution in water), lead acetate + melatonin and melatonin (10 mg / kg by oral gavage) from gestation day 6 until weaning. 21 days after birth, the activities of several antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT) as well as malondialdehyde levels in hippocampus of 23 male offspring rats were assayed. To behavioral studies, on postnatal day 30, 57 rats were trained 6 days in the Morris water maze and the probe test was performed 24 h later.

Results: The results showed that administration of lead during pregnancy and lactation could increase MDA levels and decrease glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase antioxidant enzymes activities in the hippocampus of male offspring. Also, this treatment significantly disrupted performance of the Morris water maze test and impaired learning and spatial memory in male offspring compared with control. Administration of melatonin attenuated lipid peroxidation and could improve learning and spatial memory deficits and the activity of antioxidant enzymes in lead exposure group.

Conclusion: Melatonin as a neuropotective drug can protect the hippocampus against the complications of lead exposure, in the course of development.

Keywords: Melatonin, Lead, Learning and Spatial Memory, Oxidative stress, Rat

*Corresponding Author:
Address: Department of Physiology, Damghan University, Damghan, Iran.
Email: irangoudarzi@du.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۲ (شماره پیاپی ۱۰۷)، اردیبهشت ۱۳۹۵، ۴۸-۳۵

بررسی اثرحفاظتی ملاتونین بر کاهش حافظه و یادگیری ناشی از تجویز سرب دردوران بارداری و پس از زایمان در موش صحرایی: ارزیابی رفتاری و بیوشیمیایی

الهام سلیمانی[۱]، ایران گودرزی[۲]*، کتانه ابراری[۲]، تقی لشکر بلوکی[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.

۳- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات کمی به بررسی راه‌های ممکن برای جلوگیری از نقص‌های ناشی از قرارگیری در معرض سرب طی دوره بارداری و شیردهی پرداخته‌اند. در این مطالعه اثرات ملاتونین به عنوان هورمونی با ویژگی آنتی‌اکسیدانتی بر روی استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ و اختلال یادگیری و حافظه ناشی ازتجویز سرب مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: موش‌های باردار از روز ۶ بارداری تا پایان شیردهی در معرض تیمارهای کنترل، استات سرب (۰/۲ درصد محلول در آب آشامیدنی)، استات سرب + ملاتونین و ملاتونین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ) قرار گرفتند. در روز ۲۱ پس از تولد، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و هم‌چنین میزان مالون‌دی‌آلدئید در هیپوکمپ ۲۳ موش نر سنجیده شد. جهت مطالعه رفتاری، ۳۰ روز پس از تولد، ۵۷ موش نر به مدت ۶ روز در ماز آبی موریس آموزش دیدند و ۲۴ ساعت بعد تست پروب جهت ارزیابی حافظه انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تجویز سرب در دوران بارداری و شیردهی می‌تواند سبب افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در فرزندان نر شود. هم‌چنین این تیمار باعث اختلال در اجرای تست ماز آبی موریس گردیده و یادگیری و حافظه فضایی را در فرزندان نر در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. تجویز ملاتونین میزان لیپید پراکسیداسیون را کاهش داد و اختلال یادگیری و حافظه فضایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را درگروه دریافت کننده سرب بهبود بخشید.

نتیجه‌گیری: ملاتونین می‌تواند به عنوان یک داروی نوروپروتکتیو از هیپوکمپ در مقابل عوارض ناشی از سرب در دوره تکوین محافظت کند.

واژگان کلیدی: ملاتونین، سرب، یادگیری و حافظه فضایی، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی

***نویسنده مسئول:** ایران، دامغان، دانشگاه دامغان، گروه فیزیولوژی

Email: irangoudarzi@du.ac.ir

مقدمه

سرب فلزی سنگین و سمی و از شایع‌ترین آلوده‌کننده‌های زیست محیطی است. این عنصر کاربرد وسیعی در صنایع مختلف دارد و از طریق غذا و آب و هوای آلوده به بدن انسان‌ها و حیوانات راه یافته و باعث ایجاد اثرات سمی در سیستم‌های مختلف بدن می‌شود(۱).

سرب عاملی نوروتوکسیک بوده و بیش‌ترین آسیب را بر سیستم عصبی مرکزی اعمال می‌کند(۱). سیستم عصبی مرکزی در حال تکوین به دلیل تکثیر بیش از حد، تمایز و سیناپتوژنز در این دوره، در مقابل اثرات سمی ناشی از سرب آسیب‌پذیرتر از مغز بالغ می‌باشد. قرارگیری مادر در معرض سرب طی دوران بارداری و شیردهی، با توجه به قابلیت عبور این عنصر از جفت و شیر مادر، اثرات سوئی بر جنین وارد می‌کند(۲). سرب بعد از ورود به بدن در رقابت با یون کلسیم از طریق پمپ CaATPase از سد خونی مغزی به راحتی عبور کرده، وارد مغز شده و منجر به تخریب نورون‌ها می‌شود(۳).

شواهد اپیدمیولوژیکی نشان‌دهنده اثرات مضر سرب از جمله اختلالات رفتاری و ذهنی، اختلال در حافظه و یادگیری و کاهش IQ در کودکان می‌باشد که این اختلالات در عملکرد سیستم عصبی مرکزی تا دوره بزرگسالی نیز ادامه می‌یابد. از این رو، آلودگی محیط زیست با سرب به عنوان یک مسئله اساسی در بهداشت عمومی جهان مطرح است(۱).

احتمالاً، یکی از مکانیسم‌های مولکولی درگیر در نوروتوکسیسیتی سرب، عدم تعادل بین عوامل پرواکسیدانت و آنتی‌اکسیدانت می‌باشد که از طریق تخریب اکسیداتیو بیومولکول‌های حیاتی هم‌چون لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA باعث آسیب به مغز می‌گردد. قرارگیری در معرض سرب، سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و استرس اکسیداتیو در CNS را افزایش می‌دهد. از آن‌جایی که مغز در حال تکوین غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع بوده، نسبت به لیپیدپراکسیداسیون ناشی از ROS آسیب‌پذیرتر است.

در انسان، دو سال اول و در موش صحرایی چهار هفته اول زندگی، به عنوان دوره بحرانی و حیاتی تکوین مغز شناخته شده است. در اوایل دوره تکوین، مغز دستخوش تغییرات عمده رشدی و بیوشیمیایی است. هم‌چنین هیپوکمپ که از لحاظ عملکردی به فعالیت‌های رفتاری حیاتی و فعالیت‌های ذهنی هم‌چون حافظه و یادگیری مربوط می‌شود، به میزان زیادی تحت تأثیر سرب واقع می‌شود (به ویژه در کودکان)(۱).

آنتی‌اکسیدانت‌ها نقش مفیدی را در پیش‌گیری و درمان مسمومیت با سرب دارند. ملاتونین (MT) به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت از سلول‌ها در مقابل اثرات سمی گونه‌های رادیکال آزاد و استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. ملاتونین هورمونی است که هر شب توسط غده پینه آل سنتز و ترشح می‌شود و در برخی از عملکردهای فیزیولوژیکی مهم از جمله ریتم شبانه‌روزی و الگوی عمومی خواب، سیستم تولیدمثل و سیستم ایمنی و غیره شرکت می‌کند(۴).

ملاتونین دارای خاصیت نوروپروتکتیو است و نه تنها در حفظ DNA و غشای لیپیدی در برابر آسیب اکسیداتیو نقش دارد، بلکه باعث تحریک و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نظیر سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز می‌گردد. ملاتونین تجویز شده به صورت اگزوژن به آسانی از طریق سد خونی مغزی جذب می‌شود و برای درمان اختلالات شبانه‌روزی و بی‌خوابی و هم‌چنین بهبود عملکرد شناختی در افراد مسن و بهبود اختلال در حافظه فضایی ناشی از موادی هم‌چون اتانول موثر است(۴).

با توجه به مطالب مذکور و نیز با نظر به این که ملاتونین اثرات اکسیداتیو ناشی از سرب را کاهش می‌دهد، اثرات حفاظتی ملاتونین بر کاهش حافظه و یادگیری ناشی از تجویز سرب طی دوره تکوین و استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ را مورد بررسی و ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از موش‌های بالغ نر و ماده نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم که از موسسه تحقیقات رازی کرج تهیه شدند، استفاده گردید. حیوانات پس از خریداری و انتقال به حیوان‌خانه جهت سازش با محیط جدید به مدت یک هفته نگه‌داری شدند. به منظور انجام طرح، تعدادی موش ماده و نر به تصادف انتخاب شدند و هر موش ماده به همراه یک موش نر در قفس جداگانه قرار گرفتند تا جفت‌گیری انجام شود. جهت تأیید جفت‌گیری، ۱۲ ساعت بعد تست اسمیر انجام گرفت. در صورت مثبت بودن آزمون، حیوان نر از ماده جدا شده و روز مشاهده پلاک واژینال به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. در تمام دوره آزمایش، حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای محیطی کنترل شده (۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. (اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات رعایت گردید).

در روز تولد نوزادان نر از ماده جدا شدند و به طور تصادفی به چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند:

۱)گروه کنترل: تغذیه مادران تحت شرایط مطلوب انجام شد و آب دو بار تقطیر جهت آشامیدن استفاده گردید (این گروه استرس گاواژ را نیز دریافت نمودند). سپس برای انجام آزمایشات مربوط به استرس اکسیداتیو (مطالعه بیوشیمیایی)، نیمی از نوزادان ۲۱ روزه نر را به صورت تصادفی انتخاب کردیم. پس از بی‌هوش کردن آن‌ها با کتامین و زایلیزین، سرشان را با گیوتین قطع نموده و هیپوکمپ آن‌ها را خارج کرده و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری نمودیم. هم‌چنین، نیمی دیگر از موش‌های نر در روز سی ام تحت مطالعه رفتاری قرار گرفتند.

۲) گروه در معرض استات سرب: تیمار مادر باردار با استات سرب ۰/۲ درصد محلول در آب دو بار تقطیر در روز ششم بارداری تا ۲۱ روز بعد از زایمان اعمال شد(۴). بنابراین، سرب از طریق جفت به جنین و از طریق شیر مادر به نوزاد منتقل شد و مشابه گروه کنترل، ۲۱ روز بعد از تولد، هیپوکمپ نیمی از موش‌های نر را جهت مطالعه بیوشیمیایی خارج کردیم. نیمی دیگر نیز در روز سی ام تحت مطالعه رفتاری قرار گرفت.

۳) گروه در معرض استات سرب + ملاتونین: مادر باردار علاوه برتیمار با استات سرب ۰/۲ درصد از روز ۶ بارداری تا ۲۱ روز بعد از زایمان، روزانه ملاتونین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در وزن را در سات ۱۶ به روش گاواژ دریافت کرد و مشابه گروه‌های قبل مورد مطالعه بیوشیمیایی و رفتاری قرار گرفت(۵).

۴) گروه در معرض ملاتونین: مادر در روز ششم بارداری تا ۲۱ روز بعد از زایمان، به صورت روزانه در ساعت ۱۶، ملاتونین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در وزن را در ساعت ۱۶ به روش گاواژ دریافت کرد و مشابه گروه‌های قبل مورد مطالعه بیوشیمیایی و رفتاری قرار گرفت.

مطالعه رفتاری

به منظور ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی حیوان از ماز آبی موریس استفاده شد. ماز متشکل از یک استخر دایره‌ای شکل به قطر ۱۲۰ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر مملو از آب می‌باشد که به ۴ قسمت تقسیم شده است. سکوی پرشی در وسط یکی از ربع‌ها و ۱/۵ سانتی‌متر زیر سطح آب قرار گرفت. دیواره‌ها، کف استخر و سکو به رنگ سیاه می‌باشند. اشکال و وسایل خارجی بر دیوار اتاق نصب گردید. ثبت داده‌ها، تجزیه و تحلیل اطلاعات و حرکات مختلف حیوان از جمله جا به جا شدن، سرعت، چرخش سر و غیره توسط دوربین متصل به رایانه مجهز به نرم افزار Ethovision صورت گرفت. پس از گذشت ۳۰ روز از تولد، زاده‌های نر تمامی گروه‌ها، به مدت ۶ روز تحت آموزش قرار گرفتند و در روز هفتم تست پروب از آن‌ها انجام گرفت. به منظور آشنایی با شرایط محیط، حیوان به مدت ۳ دقیقه در استخر پر آب فاقد سکو رها گردید. روز بعد از آماده‌سازی، آزمون فراگیری که شامل ۳۶ آزمون به صورت ۶ آموزش در هر

روز به مدت ۶ روز متوالی بود، انجام شد. موش‌ها از هر ۴ موقعیت به صورت تصادفی داخل آب رها شده و به آن‌ها اجازه داده شد که برای جستجوی سکوی مخفی به مدت ۶۰ ثانیه شنا کنند. در صورتی که موش‌ها سکو را بعد از ۶۰ ثانیه پیدا نمی‌کردند، به سمت سکو هدایت می‌شدند و به آن‌ها اجازه داده می‌شد که ۲۰ ثانیه روی سکو بمانند.

زمان سپری شده، مسافت طی شده و سرعت شنا کردن برای رسیدن به سکوی مخفی، پارامترهای ارزیابی یادگیری حیوان هستند که از طریق سیستم ثبت شدند.

برای ارزیابی حافظه سکو را از ماز خارج کردیم. حیوان از ناحیه‌ای حد وسط ربع هدف و ربع متضاد رها شده و به مدت ۶۰ ثانیه در آب شنا کرد. در همه‌ی گروه‌ها، این تست ۲۴ساعت پس از آخرین جلسه آموزش انجام گرفت و زمان سپری شده در ربع هدف (ربعی که سکو در طی روزهای آموزش در آن قرار داشت)، زمان رسیدن به سکو، سرعت شنا، فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو و دفعات ورود حیوان به محل سکو، به عنوان پارامترهای توان به یادآوری حیوان در نظر گرفته شد. در پایان آخرین تست، حیوان را خشک کرده و به درون قفس منتقل کردیم.

مطالعه بیوشیمیایی

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در هیپوکمپ تعیین گردید.

جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، ابتدا بافت هیپوکمپ با ۱ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات (PH=۷/۲، ۱۰ میلی مولار) هموژنه گردید. بدین منظور، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول بافر را در میکروتیوپ حاوی بافت ریخته و با هموژنایزر دستی بافت لیز گردید تا کاملاً در محلول حل گردد و سپس بافت لیز شده به مدت ۱۵ دقیقه و با دور g×۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (ependorph مدل 5415R) شد و از سوپرناتانت بافت (محلول رویی) جهت سنجش آنزیم استفاده گردید.

سنجش سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

فعالیت SOD با احیا فتوشیمیایی (NBT) نیتروبلو تترازولیوم در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مواد واکنش به این ترتیب آماده گردید: بافر پتاسیم فسفات (PH=۷/۲، ۱۰ میلی مولار)، ریبوفلاوین (۲/۲میکرومولار)، NBT (۸۲/۵ میکرومولار)، متیونین (۱۴/۳ میلی مولار).

جهت سنجش فعالیت آنزیم ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از محلول آماده شده در تاریکی به عنوان بلانک قرار داده شد. در یک چاهک پلیت ۲۰۰ میکرولیتر محلول آماده شده بدون نمونه به عنوان کنترل استفاده شد. در بقیه چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر از نمونه حاوی آنزیم و سپس ۱۵۰ میکرولیتر از محلول آماده شده ریخته شد و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه با فاصله ۲۰ سانتی‌متر زیر دو لامپ فلورسنت ۴۰ وات قرار داده شد. سپس میزان جذب گروه‌های مختلف مورد آزمایش در طول موج ۵۶۰ نانومتر از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتر (Power wave،Biotec، مدلXS) اندازه‌گیری شد. فعالیت بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌گردد.

سنجش گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)

فعالیت GPX با استفاده از ترابوتیل هیدروپراکسید به عنوان سوبسترا و مصرف NADPH در طول موج ۳۴۰ نانومتر، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. ابتدا مواد واکنش به این ترتیب آماده گردید: گلوتاتیون احیا (۲ میلی مولار)، آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز(۰/۱۵ واحد بر میلی لیتر)، سدیم آزید (۰/۴ میلی‌مولار)، ترابوتیل هیدروپراکسید (۰/۵ میلی‌مولار)، NADPH (۰/۳ میلی‌مولار) و بافر پتاسیم فسفات (PH=۷/۲، ۱۰ میلی مولار).

جهت سنجش فعالیت GPX، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول آماده شده به همراه ۵۰ میکرولیتر نمونه حاوی آنزیم در پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۱۰ دقیقه خوانده شد. فعالیت Gpx بر حسب تغییرات جذب بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌گردد(۶).

سنجش کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم توسط آب اکسیژنه (H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا مواد واکنش به این ترتیب آماده شد: H_2O_2 (۳۰ میلی مولار)، بافر پتاسیم فسفات (pH=۷/۲، ۱۰ میلی مولار) جهت سنجش فعالیت آنزیم، ۲۰۰ میکرولیتر نمونه را به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق اضافه کرده و جذب آن را طی ۲ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر خواندیم. فعالیت CAT با استفاده از ضریب جذب مولی H_2O_2 و هم‌چنین با توجه به میزان پروتئین اندازه‌گیری و در هر نمونه محاسبه شد(۷).

سنجش مالون دی آلدئید (MDA)

برای بررسی لیپید پراکسیداسیون جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو، از اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) تولید شده در فرآیند لیپید پراکسیداسیون استفاده می‌گردد. میزان تولید MDA با شکست و تفکیک اسیدهای چرب غیراشباع متناسب است. از این‌رو، اندازه‌گیری MDA شاخص مناسبی برای لیپید پراکسیداسیون است(۸). محلول‌های مورد نیاز عبارت اند از: سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۸/۱ درصد، اسیداستیک ۲۰ درصد (PH=۳)، تیوباربیتوریک اسید ۰/۸ درصد، هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار (BHT) ۰/۷۶ درصد و MDA ۱۲۵ میکرومولار.

محلول حاصل پس از ورتکس شدن به مدت یک ساعت در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از ۱۰ دقیقه که لوله‌ها سرد شدند، سانتریفوژ (۲۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه) انجام شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی لوله‌ها در پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و در طول موج ۵۳۰ نانومتر جذب خوانده شد. میزان MDA بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

تحلیل آماری

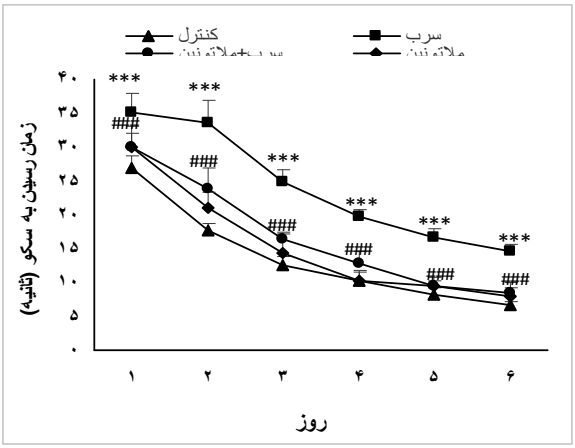
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. محاسبات آماری برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و دو طرفه و به دنبال آن آزمون تکمیلی توکی و یا LSD انجام گرفت و سطح معنی‌داری نیز $p\leq$۰/۰۵ در نظر گرفته شد. در نهایت نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم گردیدند.

یافته‌ها

به منظور بررسی اثر سرب بر روند یادگیری، حیوانات روزانه ۶ جلسه به مدت ۶ روز تحت آموزش در ماز آبی موریس قرار گرفتند. در روزهای آموزش زمان رسیدن به سکو، سرعت شنای حیوانات و مسافت پیموده شده مورد سنجش قرار گرفت. نتایج به دست آمده در روزهای آموزش در نمودار ۱ (A, B, C) نشان داده شده است. طبق نمودار ۱ A زمان رسیدن به سکو در حیوانات آموزش دیده در ۶ روز متوالی روند کاهشی را نشان داد.

تحلیل واریانس دو طرفه داده‌های زمان رسیدن به سکو (روز × گروه) حاکی از اثرات معنی‌دار روزها [F_{5} , $_{53}$= 1855 p=0.000]، گروه‌ها [F_{3} , $_{53}$= 767.648 p=0.000] و تعامل بین روزها و گروه‌ها [F_{15} , $_{53}$= 14.436 , p=0.000] می‌باشد. هم‌چنین آزمون تکمیلی توکی نشان داد که مدت زمان رسیدن به سکو در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل در روزهای اول تا ششم آموزش افزایش معنی‌داری دارد($p<$۰/۰۰۱).

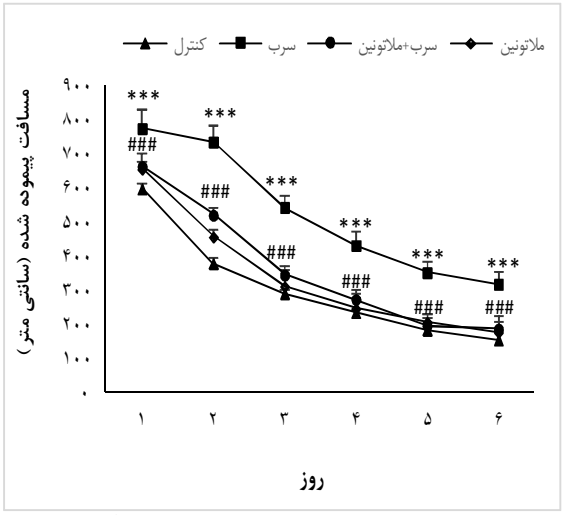
از طرفی مدت زمان رسیدن به سکو در حیوانات گروه سرب + ملاتونین طی روزهای آموزش کاهش معنی‌داری نسبت به گروه سرب نشان داد($p<$۰/۰۰۱) و این بیان‌گر آن است که ملاتونین نقص یادگیری ناشی از سرب را کاهش می‌دهد(نمودار۱ A).



نمودار A۱. زمان رسیدن به سکو در چهار گروه آزمایشی. زمان رسیدن به سکو در حیوانات آموزش دیده در ۶ روز متوالی روند کاهشی را نشان داد. مدت زمان رسیدن به سکو در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل در روزهای اول تا ششم آموزش افزایش معنی‌داری دارد. از طرفی مدت زمان رسیدن به سکو در حیوانات گروه سرب + ملاتونین طی روزهای آموزش کاهش معنی‌داری نسبت به گروه سرب نشان داد.

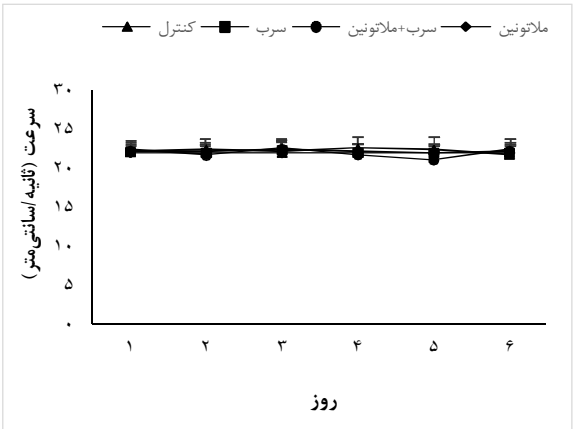
تحلیل واریانس دو طرفه داده‌های مسافت پیموده شده (روز × گروه) حاکی از اثرات معنی‌دار روزها , F_5] [F3 , 53= 500.444 ,p=0.000] گروه‌ها , $_{53}$= 1272 ,p=0.000] و تعامل بین روزها و گروه‌ها F_{15} , $_{53}$= 10.95] p=0.000] , می‌باشد. آزمون تکمیلی توکی نشان داد که مسافت پیموده شده در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل در روزهای اول تا ششم آموزش افزایش معنی‌داری دارد(p<۰/۰۰۱).

مسافت پیموده شده در حیوانات گروه سرب + ملاتونین طی روزهای آموزش کاهش معنی‌داری نسبت به گروه سرب نشان داد(نمودار۱ B).



نمودار B۱. مسافت پیموده شده در چهار گروه آزمایشی. مسافت پیموده شده در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل در روزهای اول تا ششم آموزش افزایش معنی‌داری دارد. مسافت پیموده شده در حیوانات گروه سرب + ملاتونین طی روزهای آموزش کاهش معنی‌داری نسبت به گروه سرب نشان داد.

تحلیل واریانس دو طرفه داده‌های سرعت شنای حیوانات (روز × گروه) حاکی از فقدان اثرات معنی‌دار روزها [F_5 , $_{53}$=0.321 , p= 0.9]، گروه‌ها [F_3 , $_{53}$=0.656 , p=0.58] و هم‌چنین فقدان تعامل بین روزها و گروه‌ها [F_{15} , $_{53}$=0.516 , p= 0.932] است(نمودار۱ C).



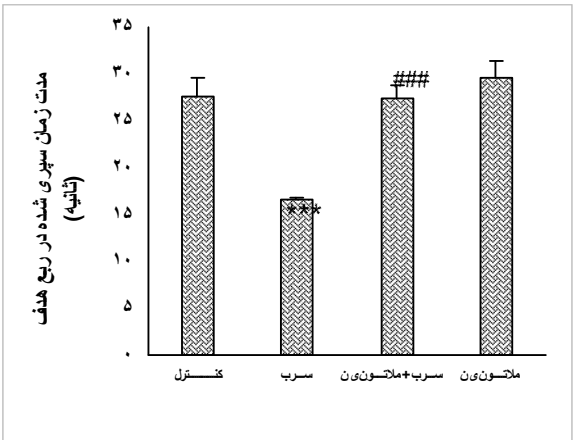
نمودار C۱. سرعت شنای چهار گروه آزمایشی

در همه‌ی گروه‌ها، جهت ارزیابی حافظه فضایی تست پروب ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه آموزش انجام گردید. برای انجام این تست به حیوانات اجازه داده شد که ۶۰ ثانیه در ماز بدون سکو شنا نمایند. زمان سپری شده در

ربع هدف (ربعی که سکو در طی روزهای آموزش در آن قرار داشت)، زمان رسیدن به موقعیت سکو، سرعت شنا، فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو و دفعات ورود حیوان به ربع هدف مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مدت زمان سپری شده در ربع هدف

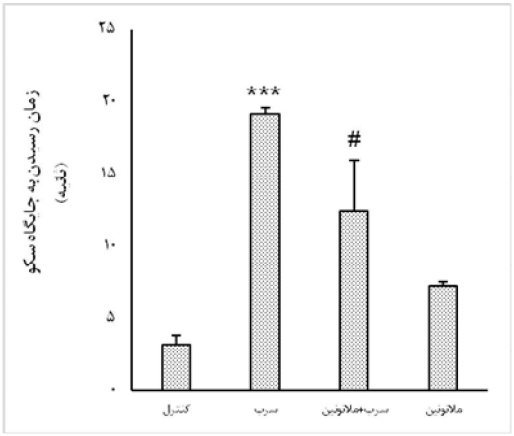
آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین چهار گروه در مدت زمان سپری شده در ربع هدف وجود دارد [$F_{3\ ,\ 53}$ =12.006 , P=0.000]. آزمون تکمیلی توکی نشان داد که کاهش معنی‌داری در مدت زمان سپری شده در ربع هدف در گروه سرب نسبت به گروه کنترل وجود دارد(P<۰/۰۰۱). مدت زمان سپری شده در ربع هدف در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب، افزایش معنی‌داری نشان را می‌دهد(P≤۰/۰۰۰۱). (نمودار ۲ A)



نمودار A۲. مدت زمان سپری شده در ربع هدف. کاهش معنی‌داری در مدت زمان سپری شده در ربع هدف در گروه سرب نسبت به گروه کنترل وجود دارد. مدت زمان سپری شده در ربع هدف در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

زمان رسیدن به جایگاه سکو

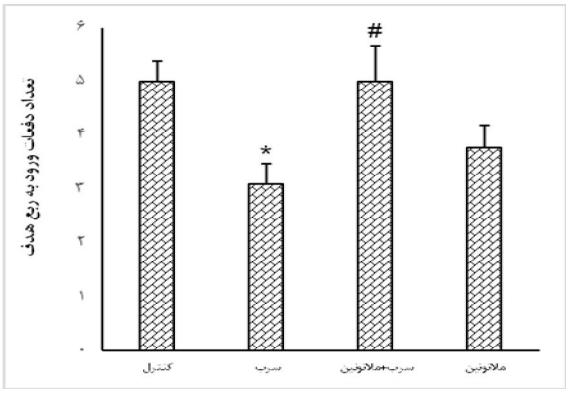
آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مشخص کرد که اختلاف معنی‌داری بین چهار گروه در مدت زمان یافتن جایگاه سکو وجود دارد [$F_{3\ ,\ 53}$ = 16.498 , p=0.000]. آزمون تکمیلی توکی نشان داد که زمان رسیدن به جایگاه سکو در گروه سرب در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد(p≤۰/۰۰۱) که بیان‌گر کاهش حافظه در فرزندان موش صحرایی می‌باشد. هم‌چنین گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب کاهش معنی‌داری را در زمان رسیدن به جایگاه سکو نشان می‌دهد(p≤۰/۰۵)(نمودار B2).



نمودار B2. زمان رسیدن به جایگاه سکو. زمان رسیدن به جایگاه سکو در گروه سرب در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد که بیان‌گر کاهش حافظه در فرزندان موش صحرایی می‌باشد. هم‌چنین گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب کاهش معنی‌داری را در زمان رسیدن به جایگاه سکو نشان می‌دهد.

تعداد دفعات ورود به ربع هدف

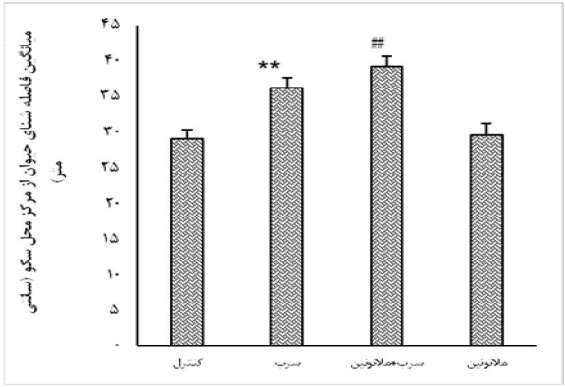
آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مشخص کرد که اختلاف معنی‌داری بین چهار گروه در تعداد دفعات ورود به ربع هدف وجود دارد [$F_{3\ ,\ 53}$ = 3.727 , p=0.017]. آزمون تکمیلی توکی نشان داد که تعداد دفعات ورود به ربع هدف در گروه سرب در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد(p≤۰/۰۵) که بیان‌گر کاهش حافظه در فرزندان موش صحرایی می‌باشد. تعداد دفعات ورود به ربع هدف در گروه ملاتونین + سرب نسبت به گروه سرب افزایش معنی‌داری یافته است(p≤۰/۰۵)(نمودار ۲ C).



نمودار C۲. تعداد دفعات ورود به ربع هدف. تعداد دفعات ورود به ربع هدف در گروه سرب در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد که بیان‌گر کاهش حافظه در فرزندان موش صحرایی می‌باشد. تعداد دفعات ورود به ربع هدف در گروه ملاتونین + سرب نسبت به گروه سرب افزایش معنی‌داری یافته است.

میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو

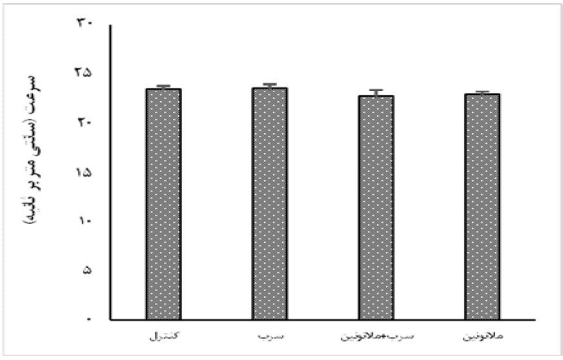
آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مشخص کرد که اختلاف معنی‌داری بین چهار گروه در میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو وجود دارد [$F_{3\ ,\ 53}$= 5.236 ,p=0.003]. آزمون تکمیلی توکی نشان داد که میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو در گروه سرب در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری دارد($p\leq$۰/۰۰۱). میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو در گروه ملاتونین + سرب نسبت به گروه سرب کاهش معنی‌داری یافته است($p\leq$۰/۰۱)(نمودار D۲).



نمودار D۲. میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو. میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو در گروه سرب در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری دارد. میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو در گروه ملاتونین + سرب نسبت به گروه سرب کاهش معنی‌داری یافته است.

نتایج سرعت چهار گروه آزمایشی

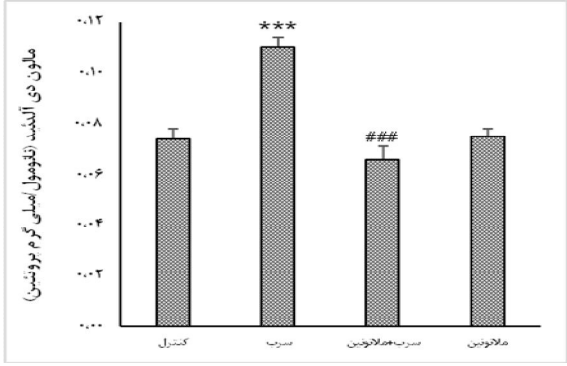
آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مشخص کرد که اختلاف معنی‌داری بین چهار گروه در سرعت شنای حیوانات وجود ندارد [$F_{3\ ,\ 53}$= 0.979 , p=0.41] (نمودار E۲).



نمودار E۲. سرعت شنا در چهار گروه آزمایشی

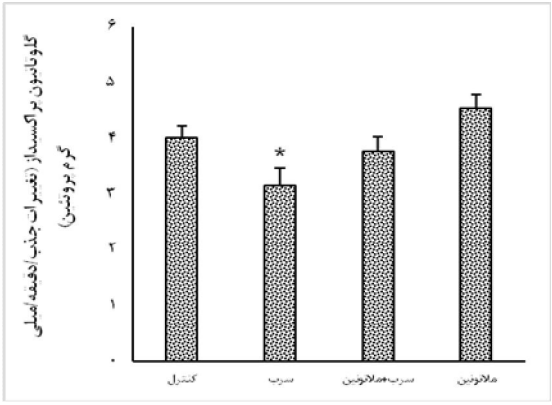
نتایج مطالعه بیوشیمیایی

آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان مالون‌دی‌آلدئید بین گروه‌ها وجود دارد [$F_{3\ ,\ 19}$=17.825 ,p=0.000]. نتایج به دست آمده در نمودار A ۳ نشان داده شده است. آزمون تکمیلی LSD نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد($p\leq$۰/۰۰۱). از طرفی میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد($p\leq$۰/۰۰۱).



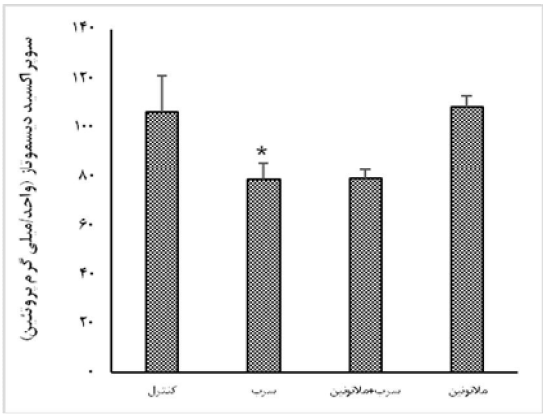
نمودار A۳ . میزان مالون‌دی‌آلدئید در هیپوکمپ چهار گروه آزمایشی. میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد. از طرفی میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بین گروه‌ها وجود دارد [$F_{3,19}=5.036$, $p=0.01$]. نتایج به دست آمده در نمودار B ۳ نشان داده شده است. آزمون تکمیلی LSD نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است($p\leq ۰/۰۵$). از طرفی میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب افزایش یافته است، اما معنی‌دار نمی‌باشد.



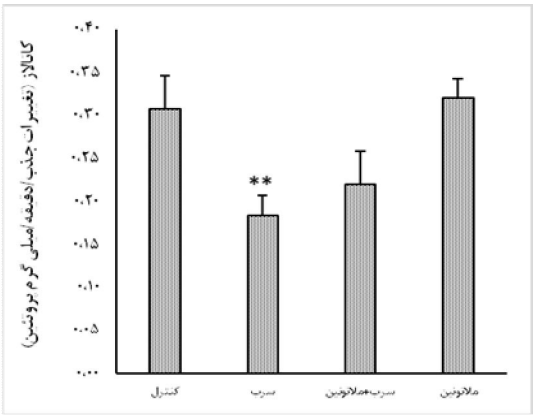
نمودار B۳ . میزان گلوتاتیون پراکسیداز در هیپوکمپ چهار گروه آزمایشی. میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است. از طرفی میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب افزایش نشان می‌دهد که معنی‌دار نمی‌باشد.

آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بین گروه‌ها وجود دارد [$F_{3,18}=4.299$, $p=0.018$]. نتایج به دست آمده در نمودار ۳ C نشان داده شده است. آزمون تکمیلی LSD نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد($p\leq ۰/۰۵$). از طرفی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.



نمودار C۳. میزان سوپراکسید دیسموتاز در هیپوکمپ چهار گروه آزمایشی. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p\leq ۰/۰۵$). از طرفی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گروه ملاتونین+سرب در مقایسه با گروه سرب تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بین گروه‌ها وجود دارد [$F_{3,19}=4.589$, $p=0.014$]. نتایج به دست آمده در نمودار D ۳ نشان داده شده است. آزمون تکمیلی LSD نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد($p\leq ۰/۰۱$). هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب افزایش نشان می‌دهد، اما معنی‌دار نمی‌باشد.



نمودار D۳. میزان کاتالاز در هیپوکمپ چهار گروه آزمایشی. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه سرب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب افزایش یافته است، اما معنی‌دار نمی‌باشد.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که قرارگرفتن در معرض استات سرب در دوران بارداری و شیردهی منجر به نقص در تشکیل حافظه و یادگیری فرزندان می‌شود و از طرفی یافته‌های حاصل از مطالعه بیوشیمیایی حاکی از آن است که سرب باعث کاهش میزان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از جمله کاتالاز، سوپراکسیدیسموتاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز شده و تولیدات پراکسیداسیون لیپیدی هم‌چون مالون‌دی‌آلدئید را افزایش می‌دهد.

شدت مسمومیت با سرب به عوامل متفاوتی از جمله دوز، سن فرد و مدت زمان قرار گیری در معرض سرب بستگی دارد. مسمومیت سرب با افزایش سن کاهش یافته و بیشترین سمیت سرب در دوران جنینی و به دنبال آن در دوره کودکی است، به طوری که جذب این عنصر در دوره تکوین و تمایز ارگانیسم پنج برابر بیشتر از سایر مراحل زندگی است(۹).

مقایسه نتایج حاصل از آزمون ماز آبی موریس نشان می‌دهد که حیوانات تیمار شده با استات سرب در مقایسه با گروه کنترل زمان بیش‌تری را برای رسیدن به سکوی مخفی سپری می‌کنند که حاکی از اختلال در یادگیری موش‌های تیمار شده با سرب است. در راستای یافته‌های روزهای آموزش، نمودارهای تست پروب نیز نشان می‌دهند که مدت زمان سپری شده در ربع هدف و تعداد دفعات ورود به ربع هدف در گروه سرب نسبت به کنترل کاهش یافته است، از طرفی مدت زمان یافتن جایگاه سکوو میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو در گروه سرب نسبت به کنترل افزایش پیدا کرده است. یافته‌ها بیان‌گر این مطلب است که استات سرب تأثیر منفی بر حافظه و یادگیری دارد. مقایسه سرعت شنا برای رسیدن به سکو در روزهای آموزش و تست پروب، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها نشان نداد که بیان‌گر این است که اثر مخرب سرب بر یادگیری و حافظه فضایی، ناشی از تغییر در فعالیت حرکتی یا حالت انگیزشی حیوانات به واسطه سرب نمی‌باشد.

یافته‌های ما در مورد اثرات سرب در راستای مطالعات یانگ و همکاران در سال۲۰۰۳ (۱۰)، کیم و همکاران در سال ۲۰۰۲(۱۱)، لانقیر و همکاران در سال ۲۰۰۰(۱۲)، رامبیا و همکاران در سال۲۰۰۱(۱۳)، نیهی و همکاران در سال ۲۰۰۰(۱۴)، میلتیک و زایسر در سال ۱۹۹۷(۱۵)، جیان ژو و همکاران در سال ۲۰۰۹(۱۶)، بذرگر و همکاران در سال ۲۰۱۴ و رائو بارکور و همکاران در سال ۲۰۱۲ می‌باشد که نشان دادند قرار گرفتن در معرض سرب طی دوران بارداری و شیردهی، حافظه فضایی فرزندان را مختل می‌کند و منجر به عیوب شناختی می‌شود. مطالعات حاکی از آن است که سطح سرب در بند ناف و شیر مادر بسیار نزدیک به سطح سرب در خون مادر است و با توجه به توانایی عبور سرب از جفت و شیر مادر، قرار گرفتن در معرض سرب در طی دوران بارداری و شیردهی برای جنین و نوزاد بسیار خطرناک است(۱۷).

در بررسی‌های بیوشیمیایی که در این مطالعه انجام شد، طبق نمودارهای ۳ A، ۳ B، ۳ C و ۳ D دریافتیم که به ترتیب میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون‌پراکسیداز، سوپراکسیدیسموتاز و کاتالاز به عنوان سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی بدن در گروه تحت تیمار با استات سرب کاهش و از طرفی مالون‌دی‌آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی افزایش یافته است که در نهایت این تغییرات منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شوند.

استرس اکسیداتیو مهم ترین مکانیسم درگیر در تخریب دستگاه عصبی ناشی از سرب است که در نتیجه عدم تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد رخ می دهد(۱۸). مغز به دلیل مصرف بالای اکسیژن، محتوای بالای اسیدهای چرب غیر اشباع با قابلیت اکسید شدن، سرعت رشد پایین، غلظت کم آنتی اکسیدان و مقادیر بالای فلزات فعال اکسایشی مانند آهن و مس که کاتالیزور واکنش‌های تولید کننده یون هیدروکسیل هستند، نسبت به استرس اکسیداتیو آسیب پذیری بالایی دارد(۱۹).

لو و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که با تجویز سرب ۰/۱ و۰/۲ درصد، سطح ROS و درنتیجه

استرس اکسیداتیو افزایش یافته و آپوپتوز تسهیل می‌شود. هم‌چنین نتایج نشان داد که قرارگیری در معرض سرب منجر به کاهش قابل ملاحظه فعالیت SOD در هیپوکمپ می‌شود(۱).

در این مطالعه از ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در برابر سمیت ناشی از سرب به عنوان یک عامل اکسیدانت استفاده گردید. ملاتونین هورمونی است که به علت دارا بودن ساختمان حلقوی غنی از الکترون قابلیت حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد را دارد. هم‌چنین به علت کوچک بودن مولکول و غیر سمی بودن آن به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت وسیع الطیف شناخته شده است(۲۰).

مقایسه نتایج حاصل از آزمون ماز آبی موریس نشان می‌دهد که حیوانات تیمار شده با ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب زمان کم‌تری را برای رسیدن به سکوی مخفی سپری می‌کنند (نمودار۱ A). در راستای با یافته‌های روزهای آموزش، نمودارهای تست پروب نیز نشان می‌دهند که مدت زمان سپری شده در ربع هدف (نمودار۲ A) و تعداد دفعات ورود به ربع هدف (نمودار۲ C) در گروه ملاتونین + سرب نسبت به گروه سرب افزایش یافته است. از طرفی مدت زمان یافتن جایگاه سکو (نمودار۲ B) و میانگین فاصله شنای حیوان از مرکز محل سکو (نمودار۲ D) در گروه ملاتونین + سرب نسبت به گروه سرب کاهش نشان می‌دهد. این نتایج حاکی از اثرات مفید ملاتونین در کاهش اثرات مخرب سرب در یادگیری و حافظه فضایی موش‌ها می‌باشد.

طبق تحقیقات دانشمندان، ملاتونین بر حافظه، یادگیری و شکل‌پذیری سیناپسی موثر است. توژو و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ملاتونین باعث بهبود اختلالات یادگیری و حافظه فضایی در موش‌های دیابتیک می‌شود(۲۱). بایداس و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که تجویز هم‌زمان ملاتونین با الکل به مدت ۴۵ روز در بهبود اختلالات یادگیری و حافظه فضایی موش‌های صحرایی موثر است(۲۲).

محققان دیگر نیز اثرات تجویز ملاتونین بر بهبود نقایص حافظه و یادگیری ناشی از قرار گرفتن طولانی مدت در معرض تینر(۲۳)، افزایش هموسیستئین خون(۲۴)، تجویز بتا آمیلوئید(۲۵) و وارد شدن ضربه به سر(۲۶) را گزارش کرده‌اند.

آرگیریو و همکاران در سال ۱۹۹۸ بیان کردند که تزریق داخل بطنی ملاتونین، تشکیل حافظه کوتاه مدت را در موش صحرایی تسهیل می‌کند(۲۷). گروه دیگری از محققان نیز اثر تسهیلی ملاتونین بر تقویت بلند مدت را گزارش نموده‌اند(۲۸). بابایی و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که ملاتونین از طریق کاهش استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ موش‌های دیابتی، حافظه را بهبود می‌بخشد(۲۹).

نتایج مطالعه بیوشیمیایی نیز مطالب فوق را تایید می‌کند، چنان که می‌بینیم، در بررسی‌های بیوشیمیایی که انجام شد، طبق نمودارهای ۳ A، ۳ B، ۳ C و ۳ D به ترتیب میزان و فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون‌پراکسیداز، سوپراکسیدیسموتاز و کاتالاز در گروه تحت تیمار با ملاتونین + سرب در مقایسه با گروه سرب افزایش (معنی دار نمی باشد) و از طرفی مالون‌دی‌آلدئید بطور معنی داری کاهش یافته است که احتمالا ملاتونین از طریق قابلیت حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد توانسته است استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد و به این نحو اثرات سوء سرب را خنثی می‌کند.

در نهایت تحقیق حاضر نشان داد که ملاتونین می‌تواند از نقص یادگیری و حافظه ناشی از سرب و استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ جلوگیری کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی دانشگاه دامغان در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

1. Lu X, Jin C, Yang J, Liu Q, Wu S, Li D, et al. Prenatal and lactational lead exposure enhanced oxidative stress and altered apoptosis status in

element research. 2013; 151(1):75-84.
2. Antonio MT, Corredor L, Leret ML. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. Toxicology letters. 2003; 143(3):331-40.
3. Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. Reviews on environmental health. 2009; 24(1):15-46.
4. Xiu-Jing C, Ming W, Wei-Heng C, Da-Miao Z, Jia-Qi S, Di-Yun R. Effects of chronic administration of melatonin on spatial learning ability and long-term potentiation in lead-exposed and control rats. Biomedical and Environmental Sciences. 2009; 22(1):70-5.
5. Mukherjee D, Ghosh AK, Bandyopadhyay A, Basu A, Datta S, Pattari SK, et al. Melatonin protects against isoproterenol-induced alterations in cardiac mitochondrial energy-metabolizing enzymes, apoptotic proteins, and assists in complete recovery from myocardial injury in rats. Journal of pineal research. 2012; 53(2):166-79.
6. Wendel A. Glutathione peroxidase. Methods in enzymology. 1981;77:325-33.
7. Aebi H. Catalase in vitro. Methods in enzymology. 1984; 105:121-6.
8. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry. 1979; 95(2):351-8.
9. Mycyk MB, Leikin JB. Combined exchange transfusion and chelation therapy for neonatal lead poisoning. Annals of Pharmacotherapy. 2004; 38(5):821-4.
10. Yang Y, Ma Y, Ni L, Zhao S, Li L, Zhang J, et al. Lead exposure through gestation-only caused long-term learning/memory deficits in young adult offspring. Experimental neurology. 2003; 184(1):489-95.
11. Kim DY, Staley F, Curtis G, Buchanan S. Relation between housing age, housing value, and childhood blood lead levels in children in Jefferson County, Ky. American Journal of Public Health. 2002; 92(5):769-72.
12. Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations< 10 microg/dL in US children and adolescents. Public health reports. 2000; 115(6): 521-9.
13. Rumbeiha WK, Braselton WE, Donch D. A retrospective study on the disappearance of blood lead in cattle with accidental lead toxicosis. Journal of veterinary diagnostic investigation. 2001; 13(5):373-8.
14. Nihei M, Desmond N, McGlothan J, Kuhlmann A, Guilarte T. N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. Neuroscience. 2000; 99(2):233-42.
15. Zaiser AE, Miletic V. Prenatal and postnatal chronic exposure to low levels of inorganic lead attenuates long-term potentiation in the adult rat hippocampus in vivo. Neuroscience letters. 1997; 239(2):128-30.
16. Xu J, Yan HC, Yang B, Tong LS, Zou YX, Tian Y. Effects of lead exposure on hippocampal metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 7 in developmental rats. Journal of negative results in biomedicine. 2009; 8(1):1-2.
17. Ong C, Phoon W, Law H, Tye C, Lim H. Concentrations of lead in maternal blood, cord blood, and breast milk. Archives of disease in childhood. 1985; 60(8):756-9.
18. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions. 2006; 160(1):1-40.
19. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Molecular aspects of medicine. 1985; 8(2):89-193.
20. Allegra M, Reiter R, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea M. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. Journal of pineal research. 2003; 34(1):1-10.
21. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. European journal of pharmacology. 2006; 537(1):106-10.
22. Baydas G, Yasar A, Tuzcu M. Comparison of the impact of melatonin on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young and aged rats. Journal of pineal research. 2005; 39(4):346-52.

23. Baydas G, Ozveren F, Akdemir I, Tuzcu M, Yasar A. Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. Journal of pineal research. 2005; 39(1):50-6.
24. Baydas G, Özer M, Yasar A, Tuzcu M, Koz ST. Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. Brain research. 2005; 1046(1):187-94.
25. Shen Y, Wei W, Yang J, Liu C, Dong C, Xu S. Improvement of melatonin to the learning and memory impairment induced by amyloid beta-peptide 25-35 in elder rats. Acta pharmacologica Sinica. 2001; 22(9):797-803.
26. Ozdemir D, Tugyan K, Uysal N, Sonmez U, Sonmez A, Acikgoz O, et al. Protective effect of melatonin against head trauma-induced hippocampal damage and spatial memory deficits in immature rats. Neuroscience letters. 2005; 385(3):234-9.
27. Argyriou A, Prast H, Philippu A. Melatonin facilitates short-term memory. European journal of pharmacology. 1998; 349(2):159-62.
28. El-Sherif Y, Hogan MV, Tesoriero J, Wieraszko A. Factors regulating the influence of melatonin on hippocampal evoked potentials: comparative studies on different strains of mice. Brain research. 2002; 945(2):191-201.
29. Babaei-Balderlou F, Zare S, editors. Melatonin improves spatial navigation memory in male diabetic rats. Veterinary Research Forum; 2012: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.[Persian]