

اثر مواجه مکرر فرمالدئید بر یادگیری، حافظه فضایی و رفتارهای شبه اضطرابی و وسواس در مدل حیوانی موش صحرایی

رضایی، آ.، نعیمی، س.*، یوسفی، م.، مهدوی، ع.، ع.، ع.

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸

خلاصه

فرمالدهید یک ماده‌ی آلی فرار است که در صنعت و پزشکی کاربرد فراوان دارد. طبق برخی مطالعات، فرمالدهید توان ورود به مغز را داشته و می‌تواند منجر به عوارض عصبی و اختلالات مربوط به حافظه و یادگیری شود. بعضی مطالعات نیز نشان داده‌اند که فرمالدهید در پروسه بیماری آلزایمر نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر فرمالدهید بر حافظه‌ی فضایی، میزان اضطراب و وسواس در موش صحرایی بود. بدین منظور ۲۴ سر رت بالغ نژاد ویستار به چهار گروه شامل: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه دریافت کننده‌ی فرمالدهید به مقدار ۱ppm، ۳- گروه دریافت کننده‌ی فرمالدهید به مقدار ۲ppm، و ۴- گروه دریافت کننده‌ی فرمالدهید به مقدار ۳ppm تقسیم شدند. گروه‌های تحت درمان هفت روز متوالی و روزانه شش ساعت مورد مواجهه با فرمالدهید قرار گرفتند. پس از اتمام دوره‌ی مواجهه و دوره‌های آموزش و تمرین، تست‌های رفتاری Open Field و ماز آبی موریس انجام شده و داده‌ها ثبت و آنالیز شد. در آزمون ماز آبی موریس، با افزایش دوز فرمالدهید، زمان رسیدن به محل سکوی پنهان و میزان حضور در ربع مخالف سکو افزایش، و مدت زمان حضور در بخش SE و تعداد دفعات ورود به آن کاهش یافت. در آزمون Open Field، مواجهه با فرمالدهید موجب افزایش معنی‌دار تعداد عبور از خطوط و رفتار نظافت و کاهش حرکت بلند شدن روی پاهای عقبی شد ($P < 0/05$). با توجه به یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، مواجهه با فرمالدهید استنشاقی می‌تواند بر حافظه و یادگیری اثر مخرب داشته و موجب افزایش اضطراب و وسواس شود.

واژه‌های کلیدی: فرمالدهید، حافظه، یادگیری، اضطراب، موش صحرایی

۱- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۳- گروه علوم دامی، تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

* نویسنده مسئول naeimis@semnan.ac.ir

مواد و روش کار

حیوانات و شرایط نگهداری

برای انجام این تحقیق ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۰۰ گرم و با سن حدود دو الی سه ماه از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی شهیرزاد تهیه، و به آزمایشگاه تحقیقات رفتاری دانشکده دامپزشکی سمنان منتقل شد. کلیه حیوانات در دمای $2 \pm$ ۲۲ درجه سانتیگراد و دوره تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعته و در قفس های مخصوص یه صورت گروه های شش تایی نگهداری شدند. حیوانات به صورت آزادانه به جز در هنگام آزمایش های رفتاری به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. نگهداری و درمان حیوانات مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده کمیته اخلاق در پژوهش های زیستی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان بوده و دارای کد اخلاق ۶۷-۲۳-۷-۹۷ می باشد. پس از طی دوره ی سازش پذیری، حیوانات به گروه های زیر تقسیم شدند: گروه یک: گروه کنترل: دریافت کننده نرمال سالین به صورت استنشاقی، گروه دو: دریافت کننده فرمالدهید به مقدار ۱ ppm، گروه سوم: دریافت کننده فرمالدهید به مقدار ۲ ppm، گروه چهارم: دریافت کننده فرمالدهید به مقدار ۳ ppm. زمان اکسپوزر از ۸:۳۰ صبح الی ۲:۳۰ عصر به مدت شش ساعت در روز به مدت هفت روز بود. در طول اکسپوزر حیوانات اجازه دریافت غذا و آب نداشتند. محفظه ی مواجهه با فرمالدهید به ابعاد ۹۸×۵۱×۵۱ سانتی-متر ساخته شد. به منظور کنترل بهتر شرایط محیطی، محفظه به خوبی با پلاستیک ضخیم پوشانده شد. در دوره ی مواجهه، فرمالدهید با توجه به ابعاد محفظه و دوز تعیین شده برای هر گروه در محفظه قرار داده شد. زمان اکسپوزر از ۸:۳۰ صبح الی ۲:۳۰ عصر به مدت شش ساعت در روز به مدت هفت روز متوالی بود. در طول اکسپوزر حیوانات اجازه دریافت غذا و آب نداشتند و در محفظه و تحت نظارت قرار می گرفتند. طبق برخی مطالعات این زمان اکسپوزر مشابه شرایط مختلف مواجهه ی شغلی انسان با این ماده بود (Nogueira و همکاران، ۱۹۹۷). برای اندازه گیری میزان فرمالدهید مایع مورد نیاز برای رسیدن به دوز استنشاقی مورد نظر برای هر گروه در دمای اتاق (۲۵ درجه) از فرمول $\text{mg/m}^3 = (\text{ppm}) \times (\text{molecular weight of the compound}) / (24.45)$ استفاده شد (EPA، ۱۹۹۲).

آزمون Open Field

آزمون Open Field یا فضای باز در آزمایشگاه به منظور بررسی حافظه ی فضایی که نوعی حافظه ی اخباری ست و

فرمالدئید یک ماده باکتری کش و نگهدارنده بافت متداول است که به طور گسترده در صنعت و در آزمایشگاه های آناتومی، پاتولوژی و بافت شناسی استفاده می شود (Aslan و همکاران، ۲۰۰۶). فرمالدئید بسیار واکنش پذیر است، با پروتئین، DNA، RNA و اسیدهای چرب غیراشباع واکنش داده و منجر به سمیت سلولی، اثرات جهش زایی و سرطان می شود (Tang و همکاران، ۲۰۱۲). در سال ۲۰۰۴، آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) فرمالدئید را به عنوان یک سرطان زا برای انسان طبقه بندی کرد (LU و همکاران، ۲۰۰۸). مواجهه کوتاه مدت با فرمالدئید می تواند باعث سوزش و تحریک گلو، چشم ها و مخاط بینی، سرفه، عطسه، تنگی نفس و آسم شود (Kilburn و همکاران، ۱۹۸۵). فرمالدئید قادر است از سد خونی مغزی (BBB) عبور کند و پتانسیل ایجاد سمیت عصبی و تحریک سلول های عصبی را دارد (Li و همکاران، ۲۰۱۶؛ Tang و همکاران، ۲۰۱۲). بر اساس گزارش های اپیدمیولوژیک، مواجهه شغلی با فرمالدئید منجر به اختلال خواب، از دست دادن حافظه، اختلال در تعادل، تغییرات رفتاری و عاطفی، سوء هاضمه، حالت تهوع و سردرد در برخی افراد می شود (Kilburn و همکاران، ۱۹۸۵). افراد با مواجهه شغلی طولانی مدت با فرمالدئید (شیمیدان ها، داروسازان، تکنسین های آزمایشگاهی، دامپزشکان، پزشکان، دندانپزشکان، آرایشگران، عکاسان، کارگران صنعت) ۳۴ درصد بیشتر از اسکروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) دارند (Kim و همکاران، ۲۰۱۱). فرمالدئید درون زا در خون انسان در شرایط عادی ۰.۱۷-۰.۱۴۳ میلی مولار تعیین شده است. افزایش سطح فرمالدئید درون زا می تواند به آسیب شناسی بیماری آلزایمر (AD) کمک کند (Tang و همکاران، ۲۰۱۲). فرمالدئید ممکن است منجر به آسیب های جدی در افراد شود. به عنوان مثال، در یک مطالعه، قرار گرفتن در معرض فرمالدئید اثرات نامطلوبی بر خون سازی در کارگران کارخانه رزین های فرمالدئید ملامین داشت و آنها را مستعد ابتلا به سرطان خون کرد. (Zhang و همکاران، ۲۰۱۷).

در مطالعه حاضر اثرات مواجهه مکرر فرمالدئید بر حافظه فضایی، رفتار و فعالیت حرکتی در حیوانات بررسی شد. دوزهای آزمایشی مطابق با روند مواجهه شغلی با فرمالدئید انسان انتخاب شدند (Nogueira و همکاران، ۱۹۹۷). در این مطالعه قرار گرفتن در معرض فرمالدئید شغلی انسان شبیه سازی شد. هدف از این مطالعه بررسی اثر فرمالدئید بر حافظه فضایی و میزان اضطراب در مدل حیوانی است.

دوربین و نرم افزار نورو ویژن ثبت و آنالیز گشت. زمان رسیدن رت به محل سکو، مدت زمان شنا در ربع دارای سکو، تعداد ورود به آن و مدت زمان حضور در ربع مخالف سکو ثبت و آنالیز شد.

آنالیز آماری

برای سنجش آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. تمام نتایج به دست آمده به صورت $Mean \pm SD$ ارائه گشت. برای مقایسه‌ی گروه‌ها از آزمون آماری ANOVA یک طرفه و به دنبال آن تست دانکن برای آزمون تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد.

نتایج

نمودار (۱) - آزمون Open Field : محور عمودی نشان دهنده: تعداد خطوط طی شده توسط حیوانات (a)، تعداد دفعات بلند شدن رت روی دو پای عقب (b) و رفتار نظافت (c) در مدت پنج دقیقه و محور افقی گروه‌های مورد مواجهه با فرمالدهید می‌باشد. داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. حروف نامشابه در هرستون بیانگر اختلاف آماری معنی دار در سطح ۵٪ است.

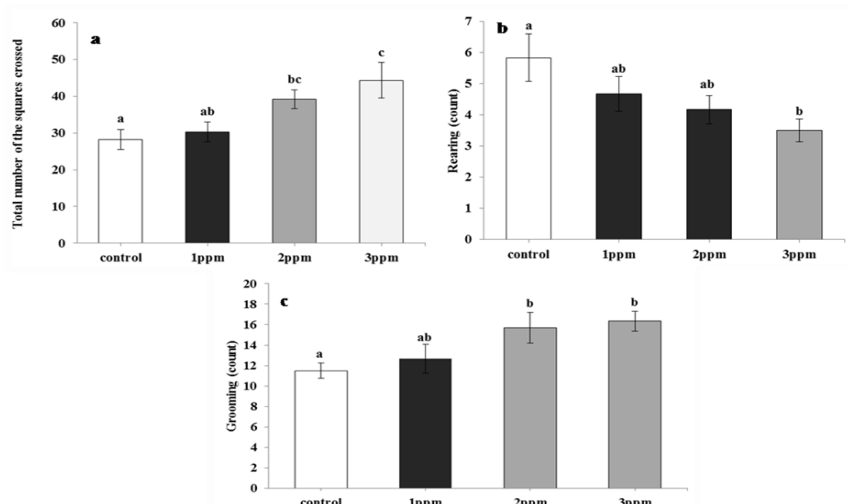
موش صحرایی در محوطه ی تست Open Field رها شده و رفتار حیوان، در مدت پنج دقیقه ثبت و آنالیز شد. اثر غلظت های مختلف فرمالدهید بر میزان تحرک و خطوط طی شده (نمودار 1-a)، رفتار بلند شدن روی دویای عقبی (نمودار 2-b) و تعداد دفعات انجام رفتار نظافت (نمودار 3-c) بررسی شد.

همچنین سنجش میزان استرس حیوان انجام می شود. این آزمون به صورت قراردادن حیوان در یک فضای باز در یک محیط جدید بدون هیچ تحریک خوشایند یا ناخوشایند بوده و به حیوان اجازه داده می شود تا در یک زمان مشخص محوطه را آزادانه جست و جو کند. در این آزمون محوطه مربع شکل بوده و کف آن توسط خطوطی به مربع های مساوی تقسیم شده بود. در ابتدای آزمایش موش صحرایی به آرامی در مرکز محوطه رها شده و در مدت زمان پنج دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای رفتاری نظافت^۱، تعداد بلند شدن^۲ و تعداد عبور کامل از خطوط کف محوطه^۳ بررسی و ثبت شد. پس از خروج هر رت محیط ضد عفونی شده و حیوان بعدی وارد گردید.

آزمون ماز آبی موریس (Morris water maze)

دستگاه ماز آبی موریس برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی به طور گسترده در تحقیقات به کار می رود. این دستگاه شامل یک تانک آب با قطر ۱۸۰ و عمق ۷۰ سانتی متر است و تقریباً نیمی از آن از آب پر می شود. ماز به طور فرضی به چهار ربع مساوی شمالی، جنوبی، شرقی و غربی تقسیم شده و یک سکوی نجات با ارتفاع ۲۵ سانتی متر در وسط یکی از این چهار مربع قرار می گیرد؛ به طوری که حدود ۱/۵ سانتی متر زیر سطح آب واقع می شود و از بیرون قابل دیدن نیست. برای انجام آزمون هر موش به مدت پنج روز و چهار بار در روز در حوضچه در اتاق با دیوارهای علامت‌گذاری شده قرار داده شد. در هر تمرین^۴ حیوان به طوریکه صورتش به طرف دیواره حوضچه باشد، از یکی از چهار نقطه شروع شمال شرقی، شمال غربی، جنوب شرقی یا جنوب غربی در آب رها شد. از هر چهار نقطه در هر روز یک بار استفاده شد و ترتیب آن‌ها به صورت تصادفی توسط کامپیوتر تعیین گشت. یک تمرین زمانی تمام می شد که موش صحرایی بر روی سکو رفته یا ۶۰ ثانیه از شروع گذشته باشد. سپس ۳۰ ثانیه به حیوان فرصت داده می شد تا در روی سکو قرار گیرد و پس از آن تمرین بعد شروع می گشت. حیواناتی که محل سکو را پیدا نمی کردند، به روی سکو منتقل شده و ۳۰ ثانیه در آنجا می ماندند. پس از اتمام تمرین چهارم رت‌ها به آرامی خشک شده و به قفس بازگردانده شدند. در پایان روز پنجم آزمون اصلی^۵ اجرا شد. بدین ترتیب که سکو از حوضچه خارج شده و مسیر حرکت حیوان به مدت ۶۰ ثانیه با

1 Grooming
 2 Rearing
 3 Crossing
 4 Trial/Training
 5 Probe Trial
 6 Escape Latency



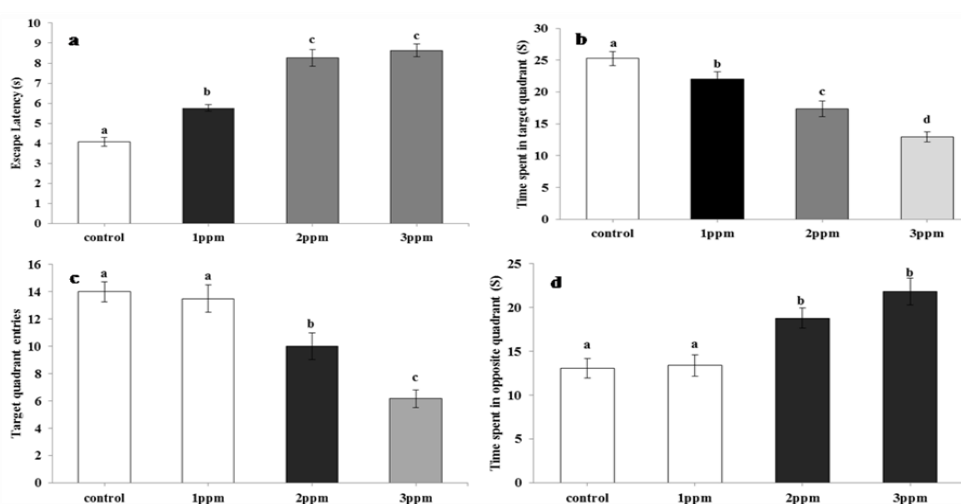
نمودار (۱) - آزمون Open Field: محور عمودی نشان دهنده: تعداد خطوط طی شده توسط حیوانات (a)، تعداد دفعات بلند شدن روی دو پای عقب (b) و رفتار نظافت (c) در مدت پنج دقیقه و محور افقی گروه‌های مورد مواجهه با فرمالدهید می‌باشد. داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. حروف نامشابه در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی دار در سطح ۵٪ است.

موش صحرایی در محوطه ی تست Open Field رها شده و رفتار حیوان، در مدت پنج دقیقه ثبت و آنالیز شد. اثر غلظت های مختلف فرمالدهید بر میزان تحرک و خطوط طی شده (نمودار 1-a)، رفتار بلند شدن روی دوپای عقبی (نمودار 2-b) و تعداد دفعات انجام رفتار نظافت (نمودار 3-c) بررسی شد.

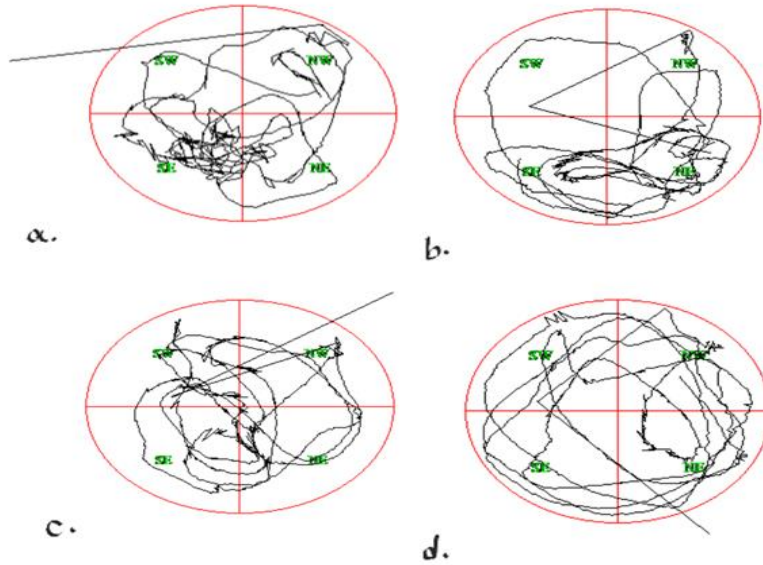
ماز آبی موریس (Morris water maze)

سپس با کمک نرم‌افزار بررسی و آنالیز شد. اثر غلظت‌های مختلف فرمالدهید در زمان رسیدن به محل سکو (نمودار 2-a)، زمان ماندن در ربع سکوی پنهان (نمودار 2-b)، تعداد عبور از محل سکوی پنهان (نمودار 2-c) و مدت زمان ماندن در ربع مخالف سکوی پنهان (نمودار 2-d) نشان داده شده است.

پس از طی دوره‌ی آموزشی که در روش کار توضیح داده شد، حیوانات از جهت SW در ماز آبی موریس رها شده و زمان رسیدن به به سکوی پنهان (بخش SE) توسط دوربین ثبت و



نمودار (2): ماز آبی موریس. محور عمودی زمان رسیدن به سکوی پنهان بر حسب ثانیه (a)، زمان ماندن در ربع سکوی پنهان (b)، تعداد عبور از محل سکوی پنهان (c)، مدت زمان ماندن در ربع مخالف سکوی پنهان (d) و محور افقی گروه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد. داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. حروف نامشابه در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است.



شکل (3): مقایسه الگوی شنای حیوانات تحت درمان با فرمالدهید در ماز آبی و مقایسه با گروه کنترل: a: گروه کنترل، b: گروه دریافت کننده فرمالدهید به میزان 1ppm، c: گروه دریافت کننده فرمالدهید به میزان 2ppm، d: گروه دریافت کننده فرمالدهید به میزان 3ppm

بحث

فرمالدهید یک ماده‌ی آلی بوده و در صنعت و علم پزشکی کاربرد دارد (Aslan و همکاران، ۲۰۰۶). طبق مطالعات فرمالدهید در پروسه‌ی ابتلا به آلزایمر نیز دخالت دارد. میزان فرمالدهید در ادرار، پلاسما و مایع مغزی نخاعی و هیپوکمپ افراد مبتلا به آلزایمر بالاتر از افراد عادی می‌باشد. فرمالدهید با تشکیل پلاک‌های Amyloid-AB در خارج سلول و تجمع پروتئین‌های Tau و پروتئین‌های رشته‌ای NFT در داخل سلول‌ها، بویژه در سلول‌های عصبی، در روند آلزایمر و سایر اختلالات حافظه نقش دارد. با این وجود این مطالعات بیشتر در مورد فرمالدهید تولید شده در بدن بطور طبیعی بوده و مطالعات کمی پیرامون اثرات دراز مدت مواجهه با فرمالین به صورت محیطی انجام گرفته است (Yang و همکاران، ۲۰۱۴).

در مطالعه‌ی حاضر از ۲۴ سر موش صحرایی نر و بالغ نژاد ویستار در چهار گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده‌ی 1، 2 و 3 ppm فرمالدهید استفاده شد. در آزمون ماز آبی موریس، حافظه‌ی فضایی موش‌ها پس از طی کردن دوره‌ی مواجهه با فرمالدهید و سپس طی پنج روز دوره‌ی آموزش مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. بر اساس نمودار (2-a)، مواجهه با فرمالدهید موجب افزایش زمان پیدا کردن محل سکوی پنهان در ماز آبی شد. این افزایش در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). اما با وجود افزایش زمان پیدا کردن سکو در گروه دریافت کننده‌ی 3 ppm

مقایسه با گروه دریافت کننده‌ی 2 ppm، این افزایش معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). بر اساس نمودار (2-b)، مواجهه با فرمالدهید موجب کاهش زمان سپری شده در ربع SE در آزمون ماز آبی موریس شد. این کاهش با دوز نسبت عکس داشته و در تمام غلظت‌ها، در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). یعنی با افزایش دوز، زمان کل شنا کردن در ربع SE و اطراف محل سابق سکو در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. شکل (3) نیز تغییرات الگوی شنای رت‌های مواجهه یافته با فرمالدهید را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. طبق شکل، موش‌های صحرایی با افزایش دوز فرمالدهید زمان کمتری را در ربع SE و اطراف محل سابق سکوی پنهان شنا کردند. نتایج حاصل از پارامترهای اندازه‌گیری شده با سایر مطالعات هم‌راستا بوده و نشان‌دهنده‌ی تخریب حافظه‌ی فضایی حیوانات مواجهه یافته با فرمالدهید می‌باشد. (Lu و همکاران، ۲۰۰۸؛ Liu و همکاران، ۲۰۱۰؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۴). در مطالعه‌ی Lu و همکاران در سال ۲۰۰۸، گروه موش‌های مواجهه یافته با فرمالدهید استنشاقی، بویژه در دوز 3 mg/m^3 ، در تست ماز آبی موریس عملکرد ضعیفتری نسبت به گروه کنترل داشته، در روز آزمون محل سکو را دیرتر از موش‌های گروه کنترل پیدا کرده و همچنین زمان بیشتری را در ربع‌های غیر از ربع سکو شنا کردند. این تغییرات وابسته به دوز بود (Lu و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه‌ی Liu و همکاران نیز، موش-

های صحرایی به مدت ۱۴ روز و روزی یک ساعت تحت تماس با فرمالدهید استنشاقی قرار گرفته و تست ماز آبی موریس برای آن‌ها انجام گرفت. رت‌های مواجهه یافته با فرمالدهید در تست ماز آبی نتایج ضعیف‌تری داشتند که حاکی از کاهش یادگیری و حافظه‌ی فضایی ناشی از مواجهه با فرمالدهید بود. این رت‌ها محل سکو را دیرتر از رت‌های گروه کنترل پیدا کردند (Liu و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه‌ی فرمالدهید به میزان ۰/۵mm در دوره‌های قبل و بعد از آموزش ماز آبی موریس به هیپوکمپ رت‌های مورد مطالعه تزریق شد. در آزمون ماز آبی موریس میزان شنا در ربع دارای سکو و زمان پیدا کردن سکو کاهش یافت. هم راستا با مطالعه ما، فرمالدهید در رت‌های مورد مطالعه موجب تخریب حافظه‌ی فضایی و کاهش یادگیری شد (Tong و همکاران، ۲۰۱۵). احتمال دارد که این نتایج و تخریب حافظه‌ی فضایی مشاهده شده در مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات، حاصل تاثیرات نوروتوکسیک فرمالدهید بر دستگاه عصبی و بویژه هیپوکمپ باشد. علت اصلی هنوز مشخص نبوده و به مطالعات گسترده‌تری احتیاج است. با این حال برخی مطالعات به بررسی علل احتمالی این امر پرداخته اند.

از دیگر آزمون‌های رفتاری انجام شده در حیوانات مطالعه‌ی حاضر آزمون Open Field بود. دستگاه Open Field، وسیله‌ی استاندارد برای بررسی رفتار حرکتی و اکتشافی حیوان در یک محیط باز در آزمایشگاه می‌باشد (Quillfeldt، ۲۰۱۶). در این مطالعه سه پارامتر رفتاری تعداد مربع‌های طی شده، تعداد دفعات بلند شدن حیوان روی پاهای عقبی و نظافت مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی در آزمون Open Field حرکت حیوان در محیط و اطراف محوطه بیانگر اضطراب، بی‌قراری و خواست حیوان برای فرار، و رفتن حیوان به بخش‌های مرکزی محوطه به‌عنوان رفتار کنجکاوانه تلقی می‌شود. داروهای ضد اضطراب مانند پروپرانولول و بوسپیرون میزان حرکت حیوان در حاشیه و میزان کلی تحرک را کاهش می‌دهند و در واقع موجب کاهش بی‌قراری و تقلای حیوان برای فرار می‌شوند (Angrini و همکاران، ۱۹۹۸). بر اساس نمودار (I-a)، مواجهه با فرمالدهید موجب افزایش تحرک و تعداد خطوط طی شده توسط حیوان در آزمون Open Field شد. این افزایش در غلظت‌های ۲ و ۳ ppm در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$). این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز مقادیر مختلف فرمالدهید منجر به افزایش جابجایی حیوان و افزایش تعداد مربع‌های طی شده در آزمون Open Field می‌شود. به عبارتی به نظر می‌رسد که فرمالدهید موجب افزایش فعالیت حرکتی و اضطراب حیوان شده است. در مطالعه‌ی Sorg و همکاران نیز فرمالدهید در

موش صحرایی منجر به تقویت اثر افزایش فعالیت حرکتی ناشی از کوکابین گردید (Sorg و همکاران، ۱۹۹۹). این یافته در تضاد با برخی مطالعات بود (Li و همکاران، ۲۰۱۶؛ Unasmaz و همکاران، ۲۰۰۲). در گروهی از مطالعات در اثر مواجهه با فرمالدهید به‌صورت تک دوز نیز، کاهش فعالیت حرکتی و کاهش تعداد مربعات طی شده توسط حیوان در آزمون Open Field مشاهده شد (Malek و همکاران، ۲۰۰۳؛ Malek و همکاران، ۲۰۰۴). با این وجود بیشتر مطالعات نام برده شده در موش سوری بوده و ممکن است این اختلاف به دلیل تفاوت بین گونه‌ی حیوانات مورد مطالعه یا تفاوت در مدت‌زمان مواجهه باشد. در برخی از مطالعات نیز اختلاف معنی‌داری در فعالیت‌های حرکتی گروه‌های دریافت کننده‌ی فرمالدهید در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد (Pitten و همکاران، ۲۰۰۰؛ Makowski و Ordonez، ۱۹۸۱). بر اساس نمودار (I-b)، مواجهه با فرمالدهید موجب کاهش تعداد حرکات بلند شدن حیوان در آزمون Open Field شده است. گرچه این کاهش فقط در غلظت ۳ ppm در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در گروه دریافت‌کننده‌ی فرمالدهید با غلظت ۲ ppm نیز در مقایسه با گروه کنترل، تعداد حرکات بلند شدن در حیوان کاهش یافت، اگرچه این کاهش معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

در Open Field، بلند شدن روی پاهای عقبی بیانگر رفتار کنجکاوانه و اکتشافی حیوان مورد آزمایش می‌باشد (Quillfeldt، ۲۰۱۶). مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که تجویز مقادیر مختلف فرمالدهید منجر به کاهش رفتار کنجکاوانه‌ی حیوان در آزمون Open Field شده است. این یافته با سایر مطالعات مطابقت داشت (Malek و همکاران، ۲۰۰۳؛ Malek و همکاران، ۲۰۰۴). طبق مطالعات برخی از داروهای دارای اثر ضد اضطراب مانند پروپرانولول و بوسپیرون موجب کاهش رفتار بلند شدن روی پاها در حیوان می‌شوند. با این حال برخی سوبه‌های حساس-تر چونندگان ممکن است همچنان در این آزمون تعداد دفعات بلند شدن بیشتری داشته باشند (Angrini و همکاران، ۱۹۹۸).

در مطالعه‌ی دیگر نیز با افزایش دوز فرمالدهید استنشاقی در آزمون Open Field، از میزان تحرک موش‌ها و همچنین میزان بلند شدن روی پاهای عقبی کاسته شده و میزان بو کردن زمین در آن‌ها، تمیز کردن خود و دفع مدفوع افزایش یافت. در این مطالعه از فرمالدهید استنشاقی به-صورت تک‌دوز، با غلظت‌های ۱/۱، ۲/۳، ۵/۲ ppm و به-مدت دو ساعت استفاده شد. در این مطالعه مواجهه با

فرمالدهید در موش موجب کاهش فعالیت حرکتی و رفتار کنجکاوانه شد (Malek و همکاران، ۲۰۰۴).

بر اساس نمودار (1-c)، مواجهه با فرمالدهید منجر به افزایش رفتار نظافت در آزمون Open Field شد. این افزایش در غلظت ۱ و ۲ ppm در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). غلظت ۱ ppm گرچه رفتار نظافت را در حیوان افزایش داد، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. مواجهه با فرمالدهید موجب افزایش وابسته به دوز رفتار نظافت در آزمون Open Field شد. یعنی با افزایش دوز، میزان رفتار نظافت حیوان در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. گرچه این افزایش در غلظت ۱ ppm معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

در آزمون Open Field، رفتار نظافت بیانگر افزایش اضطراب و رفتار وسواس‌گونه در حیوان مورد آزمایش می‌باشد (Olivier و همکاران، ۲۰۱۱)، (Angrini و همکاران، ۱۹۹۸). مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که تجویز مقادیر مختلف فرمالدهید منجر به افزایش رفتار نظافت در آزمون Open Field می‌شود. یعنی به احتمال زیاد در اثر اضطراب، حرکات وسواس‌گونه‌ی حیوان افزایش پیدا کرده است. در مطالعات مشابه، ترکیبات دارای اثر ضد اضطراب از جمله پروپرانولول و بوسپیرون، بنزودیازپین‌ها و داروهای گابائترژیک مانند باربیتال و کلونازپام موجب کاهش رفتار نظافت در آزمایش Open Field شد (Angrini و همکاران، ۱۹۹۸)، (Moody و همکاران، ۱۹۸۸)، (Barros و همکاران، ۱۹۹۴).

در مقابل تجویز نوروپپتیدهایی مانند ACTH، وازوپرسین، بمبسین و اکسی‌توسین موجب افزایش تحرک و افزایش نظافت در موش صحرایی شدند که به احتمال زیاد افزایش استرس حیوان و برخی گیرنده‌ها از جمله رسپتورهای دوپامینی و نورآدرنژیک در این روند موثرند (Moody و همکاران، ۱۹۸۸)، (Dunn و همکاران، ۱۹۸۱). آنتاگونیست‌های دوپامینی مانند فلوفنازین و هالوپریدول، آنتاگونیست‌های اویپوتیدی مانند نالوکسان و نالوکسازون و آگونیست‌های نورآدرنژیک مانند کلونیدین توانایی کاهش رفتار نظافت ناشی از ACTH را دارند (Moody و همکاران، ۱۹۸۸). بنزودیازپین‌ها نیز با کاهش ترشح ناشی از استرس ACTH از غده‌ی هیپوفیز به مایع مغزی ممکن است بر رفتار نظافت اثر کاهنده داشته باشند (Dunn و همکاران، ۱۹۸۱).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، مواجهه مکرر فرمالدهید به صورت استنشاقی در موش صحرایی می‌تواند منجر به ایجاد اختلال و کاهش یادگیری و حافظه‌ی بلند مدت، افزایش میزان فعالیت حرکتی، اضطراب و رفتار وسواس شود. این روند با افزایش دوز فرمالدهید نسبت مستقیم دارد.

تشکر و قدردانی

از زحمات کارشناس محترم آزمایشگاه فارماکولوژی، سرکار خانم الهه تعقلی تشکر و قدردانی می‌شود.



The effect of repeated exposure to formaldehyde on learning, spatial memory and anxiety-like and obsessive behaviors in the rat animal model

Resae, A.¹, Naeimi, S.^{2*}, Yousefi, M.², Mahdavi, A.³

Received: 19.05.2021

Accepted: 08.01.2022

Abstract

Formaldehyde is a volatile organic substance that is widely used in industry and medicine. According to some studies, formaldehyde has the ability to enter the brain and can lead to neurological complications and disorders related to memory and learning. Some studies have also shown that formaldehyde plays a role in the process of Alzheimer's disease. The aim of this study was to investigate the effect of formaldehyde on spatial memory, anxiety and obsession in rats. For this purpose, 24 adult Wistar rats were divided into four groups including: 1- control group, 2- group receiving formaldehyde in the amount of 1 ppm, 3-group receiving formaldehyde in the amount of 2 ppm, and 4- group receiving formaldehyde in the amount of 3 ppm. The treated groups were exposed to formaldehyde for seven consecutive days and six hours a day. After the completion of the exposure period and the training and training courses, Open Field and Morris water maze behavioral tests were performed and the data were recorded and analyzed. In the Morris water maze test, with increasing formaldehyde dosage, the time to reach the hidden platform and the amount of presence in the opposite quadrant of the platform increased, and the duration of presence in the SE section and the number of times to enter it decreased. In the Open Field test, exposure to formaldehyde caused a significant increase in the number of crossing lines and grooming behavior and a decrease in the lifting movement on the hind legs ($P < 0.05$). According to the findings of the present study, exposure to inhaled formaldehyde can have a destructive effect on memory and learning and can increase anxiety and obsession.

Keywords: Formaldehyde, memory, learning, anxiety, rat

¹ Student Member of Young Club, Semnan University, Semnan, Iran.

² Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

³ Department of Animal nutrition, rearing and breeding, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: naeimis@semnan.ac.ir

Angrini, M., Leslie, J.C., Shephard, R.A. (1998). Effects of Propranolol, Buspirone, pCPA, Reserpine, and Chlordiazepoxide on Open-Field Behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **59**(2), 387–397.

Aslan, H., Songur, A., Tunc, A.T., Ozen, O.A., Bas, O., Yagmurca, M., Turgut, M., Sarsilmaz, M., Kaplan, S. (2006) Effects of formaldehyde exposure on granule cell number and volume of dentate gyrus: a histopathological and stereological study. *Brain Res* **1122**, 191–200.

Barros, H. M., Tannhauser, S. L., Tannhauser, A. L., Tannhauser, M. (1994) The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field. *Pharmacol. Toxicol.* **74**:339–344.

Dunn, A. J., Guild, A. L., Kramarcy, N. R., Ware, M.D. (1981) Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTH or beta-endorphin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **15**:605–608.

Kilburn KH, Seidman BC, Warshaw R (1985) Neurobehavioral and respiratory symptoms of formaldehyde and xylene exposure in histology technicians. *Arch Environ Health*, **40**, 229–233

KIM, K. H., S. A. JAHAN, J. T. LEE (2011): Exposure to formaldehyde and its potential human health hazards. *J. Environ. Sci. Health C.* **29**(4), 277–299.

Li Y, Song Z, Ding Y, Xin Y, Wu T, Su T, He R, Tai F, Lian Z (2016) Effects of formaldehyde exposure on anxiety-like and depression-like behavior, cognition, central levels of glucocorticoid receptor and tyrosine hydroxylase in mice. *Chemosphere*, **144**, 2004–2012.

Liu Y, Ye Z, Yang H, et al. (2010). Disturbances of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment proteins in hippocampal synaptosomes contribute to cognitive impairment after repetitive formaldehyde inhalation in male rats. *Neuroscience*, **169**, 1248–1254.

Lu, Z., Li, C.M., Qiao, Y., Yan, Y., Yang, X. (2008) Effect of inhaled formaldehyde on learning and memory of mice. *Indoor Air*, **18**, 77–83.

Malek, F.A., Moritz, K.U., Fanghanel, J. (2003). Formaldehyde inhalation & open field behaviour in rats. *Indian J Med Res*, **118**, 90–96.

Malek, F.A., Moritz, K.U., Fanghanel, J. (2004). Effects of a single inhalative exposure to formaldehyde on the open field behavior of mice. *Int J Hyg Environ Health*, **207**, 151–158.

Makowski, E.C., Ordonez, L.A. (1981). Behavioral alterations induced by formaldehyde-derived tetrahydroisoquinolines. *Pharmacol Biochem Behav*, **14**, 639–643.

Moody, T. W., Merali, Z., Crawley, J. N. (1993). The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. *Ann. NY Acad. Sci.* **90**:281–290.

Nogueira, M. I., C. BARBIERI, R. VIEIRA, E. R. MARQUES, J. E. MORENO (1997): A practical device for histological fixative procedures that limits formaldehyde deleterious effects in laboratory environments. *J. Neurosci. Methods* 72(1), 65–70.

Olivier, J.D.A., Valles, A., Van Heesh, F., Afrasiab-Middleman, A., Roelofs, J.J.P.M., Jonkers, M., Peeters, E.J., Korte-Bouws, G.A.H., Dederen, J.P., Kiliann, A.J., Martens, G.J., Schubert, D., Homberg, J.R. (2011). Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring. *Psychopharmacology*, **217**, 419–432.

Pitten, F.A., Kramer, A., Herrmann, K., Bremer, J., Koch, S., 2000. Formaldehyde neurotoxicity in animal experiments. *Pathol. Res. Pract*, **196**, 193–198.

Quillfeldt, J.A. (2016). *Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats*. Springer International Publishing Switzerland, 271–311.

Sorg, B.A., Hochstatter, T. (1999). Behavioral Sensitization After Repeated Formaldehyde Exposure in Rats. *Toxicology and Industrial Health*, **15**, 346–355.

Tang, X.Q., Ren, Y.K., Chen, R.Q., Zhuang, Y.Y., Fang, H.R., Xu, J.H., Wang, C.Y., Hu, B. (2012). Hydrogen sulfide prevents formaldehyde-induced neurotoxicity to PC12 cells by attenuation of mitochondrial dysfunction and pro-apoptotic potential. *Neurochemistry International* **61**, 16–24.

Tong, Z., Han, C., Qiang, M., Wang, W., Lv, J., Zhang, S., Luo, W., Li, H., Luo, H., Zhou, J., Wu, B., Su, T., Yang, X., Wang, X., Liu, Y., He, R. (2015). Age-related formaldehyde interferes with DNA methyltransferase function, causing memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* xxx, 1–11.

Unasmaz, S.E., Akarsu, E.S., Vular, Nevin. (2002). Neurotoxic Effects of Acute and Subacute Formaldehyde Exposures in Mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11**, 93–100.

Wang, F., Li, C., Liu, W., Jin, Yihe. (2014). Potential mechanisms of neurobehavioral disturbances in mice caused by sub-chronic exposure to low-dose VOCs. *Inhal Toxicol*, 2014; **26(4)**, 250–258.

Yang, M., Lu, J., Miao, J., Rizak, J., Yang, J., Zhai, R., Zhou, J., Qu, J., Wang, J., Yang, S., Ma, Y., Hu, X., He, R. (2014). Alzheimer's Disease and Methanol Toxicity (Part 1): Chronic Methanol Feeding Led to Memory Impairments and Tau Hyperphosphorylation in Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, **41**, 1117–1129.

Zang, Z. J., Fang, Y.Q., Ji, S.Y., Gao, Y., Zhu, Y.Q., Xia, T.T., Jiang, M.H., Zhang, Y.N. (2017). Formaldehyde Inhibits Sexual Behavior and Expression of Steroidogenic Enzymes in the Testes of Mice. *J Sex Med*, **14**, 1297–1306.