

اثر زهر خام و فراکسیون حاوی آگاتوکسین عنکبوت *Agelena labyrinthica* بر آسیب شناختی ناشی از کاینیک اسید در رت

زهر تقوی^۱، محمدرضا مفید^۲، مجید مرادمند^۳، علی حسینی شریف‌آباد^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تحریک بیش از حد برخی از کانال‌های کلسیمی، می‌تواند علت بسیاری از ناهنجاری‌های عصبی باشد. زهر خام عنکبوت *Agelena labyrinthica*، حاوی ترکیباتی است که می‌تواند این کانال‌ها را مهار نماید. آگاتوکسین یکی از مهم‌ترین این ترکیبات به شمار می‌رود. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات پیشگیرانه و درمانی زهر خام و فراکسیون آگاتوکسین عنکبوت *Agelena labyrinthica* بر فراموشی ناشی از کاینیک اسید انجام شد.

روش‌ها: عنکبوت *Agelena labyrinthica* از استان مازندران جمع‌آوری و زهر خام آن جداسازی گردید. فراکسیون آگاتوکسین به روش ژل فیلتراسیون تخلیص شد. زهر خام و یا فراکسیون آگاتوکسین به صورت قبل و یا بعد از تزریق کاینیک اسید به داخل هیپوکمپ رت‌ها تزریق گردید. از ممانتین به صورت داخل صفاقی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. یک هفته پس از اتمام تزریق داروها، حیوانات مورد ارزیابی حافظه با روش Morris water maze (MWM) قرار گرفتند.

یافته‌ها: کاینیک اسید باعث کاهش معنی‌داری در زمان سپری شده در ربع دایره‌ی هدف (Target quadrant یا TQ) در MWM نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0/001$). تزریق داخل هیپوکمپ زهر خام و همچنین، فراکسیون آگاتوکسین قبل و بعد از تزریق کاینیک اسید، باعث افزایش قابل توجهی در شاخص ذکر شده نسبت به گروه کاینیک اسید شد ($P < 0/001$)، اما تجویز این مواد به شکل پیش‌درمانی، TQ را در مقایسه با تجویز پس‌درمانی بیشتر افزایش داد. فراکسیون آگاتوکسین منجر به افزایش معنی‌داری در TQ نسبت به زهر خام گردید.

نتیجه‌گیری: زهر خام و فراکسیون آگاتوکسین، اثرات مفید قابل توجهی در پیشگیری از تخریب حافظه‌ی ناشی از سمیت بیش‌تحریکی کاینیک اسید دارند. تأثیر فراکسیون آگاتوکسین در این مورد از زهر خام بیشتر می‌باشد. این دو ماده زمانی که پس از تزریق کاینیک اسید تجویز شوند، اثر بهبود دهنده‌ی کمتری نشان می‌دهند.

واژگان کلیدی: کانال کلسیم وابسته به ولتاژ؛ امگا آگاتوکسین؛ کاینیک اسید؛ ممانتین؛ زهر عنکبوت

ارجاع: تقوی زهر، مفید محمدرضا، مرادمند مجید، حسینی شریف‌آباد علی. اثر زهر خام و فراکسیون حاوی آگاتوکسین عنکبوت *Agelena labyrinthica* بر

آسیب شناختی ناشی از کاینیک اسید در رت. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۴۳): ۷۱۴-۷۲۲.

ایتولوژی این بیماری‌هاست (۴). در فراموشی‌های ناشی از سن بالا، ایسکمی و یا ضربه و خونریزی سر، فعالیت بیش از حد گیرنده‌های گلوتامات (N-methyl-D-aspartate receptor یا NMDAR) که با عنوان سمیت تهییجی شناخته می‌شود و همچنین، تحریک بیش از حد کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ همچون کانال کلسیمی نوع P/Q، از مکانیسم‌های درگیر در بروز این وقایع می‌باشد (۵-۶). پیامد این فعالیت‌ها، ورود بیش از حد یون کلسیم به داخل نورون‌ها و فعال نمودن

مقدمه

بیماری‌های نورودژنراتیو، به مجموعه‌ای از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی اطلاق می‌گردد که منجر به از بین رفتن نورون‌ها می‌شود. آلزایمر و دیگر اختلالات شناختی، در زمره‌ی این بیماری‌ها قرار می‌گیرد (۱-۲). عوامل متفاوت ژنتیکی و محیطی در بروز این اختلالات دخیل می‌باشد (۳)، اما فارغ از علت بروز آن‌ها، اختلال در عملکرد گیرنده‌های یونی و یا کانال‌های یونی سیستم عصبی، یکی از مهم‌ترین موارد مطرح در

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: علی حسینی شریف‌آباد: دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: ahosseinisharifabad82@gmail.com

روش‌ها

جمع‌آوری عنکبوت و استخراج زهر: عنکبوت‌های بالغ و ماده‌ی خانواده‌ی *Agelenidae* گونه‌ی تور قیفی *Agelena labyrinthica* در تیرماه سال ۱۳۹۷ بر اساس کلید شناسایی و تأیید استاد راهنما از شهر آمل استان مازندران جمع‌آوری شد. عنکبوت‌ها با اتر بیهوش شدند و پروزوما (سر سینه) از اپیستوزوما (شکم) جدا گردید. پروزوما در زیر استرومیروسکوپ مشاهده و سپس نیش‌های متصل به کیسه‌ی زهر از پروزوما خارج شد (۲۰). کیسه‌های زهر از نیش‌ها جدا و در فریزر برای خشک گردید و برای انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر با دمای -۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (زال تجهیز، ایران) نگهداری گردید.

خالص‌سازی آگاتوکسین به روش ژل فیلتراسیون: ۱۰۰ میلی‌گرم از زهر خام خشک شده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (Phosphate buffered saline یا PBS) حل شد و در هاون کاملاً کوبیده شد تا زهر درون آن‌ها آزاد گردد. سپس رسوبات سلولی به دنبال سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد جدا و مایع رویی با سرنگ ۰/۲ فیلتر شد. در آخر، ۱/۵ میلی‌لیتر از این مایع فیلتر شده به دستگاه کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین (Secom، آلمان) مسلح به ستون Hiload Superdex 75 PE تزریق گردید. برنامه‌ی بارگیری به صورت ایزوکراتیک برای ۳۰۰ دقیقه با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و تشخیص اشعه‌ی ماورای بنفش در ۲۸۰ نانومتر اعمال شد. همچنین، PBS به عنوان بافر اجرا استفاده شد و از آغاز تشکیل قله‌ها روی نمودار، جزء‌ها در یک لوله جداگانه جمع‌آوری گردید (۲۱).

شناسایی توسط ژل الکتروفورز: اجزای تخلیص شده از روش قبل با کمک تست Bradford به میزان ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین غلظت شدند (۲۲). سپس جهت تأیید وزن مولکولی، با استفاده از روش ژل الکتروفورز (Bio-Rad، آلمان) در خانه‌های ژل پلی‌آکریل آمید ۱۵ درصد کاشته شدند (۲۳). ابتدا جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر به نمونه‌ها القا گردید و پس از عبور نمونه‌ها از ژل متراکم‌کننده‌ی ۵ درصد، جریان به ۳۰ میلی‌آمپر کاهش یافت. نشانگر مورد استفاده دارای پروتئین‌های با وزن مولکولی کم و زیاد بود.

حیوانات: رت‌های نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۳۰ گرم از لانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خریداری گردید و در شرایط استاندارد از نظر دما، رطوبت و دوره‌های تاریکی/روشنایی نگهداری شدند و دسترسی کافی به آب و غذا داشتند. تمام مراحل آزمایش در مرحله‌ی روشن چرخه انجام گرفت. با حیوانات بر اساس پروتکل مصوب کمیته‌ی اخلاق در پژوهش‌های زیستی برخورد شد و تحقیق با کد اخلاق IR.MUI.RESEARCH.REC.1398.088 تصویب گردید.

فرایندهای سمیت سلولی و التهاب در آن‌ها است. کلسیم بیش از حد در داخل نورون‌ها، باعث فعال نمودن آنزیم‌های آسیب‌رسان مانند سیکلواکسیژناز ۲ (Cyclooxygenase-2 یا COX-2) و نیتریک اکسید سنتتاز می‌شود (۷-۸) و در نهایت، می‌تواند باعث التهاب نورونی، تجمع پپتید آمیلوئید بتا و کلاف‌های نوروفیبریلاری و یا حتی آپوپتوز نورون‌ها (۹) و در نتیجه، فراموشی و زوال عقل گردد (۱۰).

با توجه به مطالب گفته شده، در صورتی که بتوان فعالیت بیش از حد کانال‌های کلسیم مغزی را در وقایع فوق کاهش داد و یا مهار نمود، ورود و تجمع کلسیم در داخل نورون‌ها کاهش و فرایندهای پاتولوژیک ذکر شده تخفیف می‌یابد. امروزه از برخی مهارگرهای NMDAR و یا کانال‌های کلسیم جهت مقابله با آلزایمر به ویژه انواع ناشی از سن بالا و یا ناشی از فرایند سمیت تهییجی استفاده می‌شود (۱۱-۱۲). یکی از این داروها، نماتین است. در حال حاضر، نماتین یک آنتاگونیست NMDAR و مورد تأیید سازمان غذا و دارو آمریکا می‌باشد و با بلاک کردن این نوع از کانال‌های کلسیمی، می‌تواند مسمومیت بیش‌تریکری را مهار کند (۱۳)، اما این ترکیب افینیتی چندانی بالایی ندارد (۱۴) و تأثیر ملایمی در درمان آلزایمر خفیف تا متوسط دارد (۱۵). همچنین، آنتاگونیست غیر انتخابی است و می‌تواند عوارض جانبی ناخواسته تولید کند (۱۶، ۲).

از دیرباز، استفاده از مهارکننده‌های طبیعی کانال‌های یونی که در زهر مار، عقرب، ماهی و یا حتی سم باکتری‌ها موجود می‌باشد، به منظور اقدامات تحقیقاتی و حتی درمانی رواج داشته است. اجزای این زهرها بیشتر از نظر عملکرد پرفردت و انتخابی روی کانال‌های یونی حایز اهمیت هستند (۱۷-۱۸). شاید در این بین، استفاده از اجزای زهر عنکبوت‌ها نسبت به بقیه مغفول مانده است. طبق پژوهش‌های انجام شده، زهر خام عنکبوت‌های خانواده‌ی *Agelenidae* دارای پپتیدی به نام آگاتوکسین می‌باشد که آنتاگونیست قدرتمند و گزینشی برای کانال‌های کلسیمی نوع P/Q به شمار می‌رود (۱۹). بنابراین، به نظر می‌رسد که استفاده از آگاتوکسین در دز مناسب، پتانسیل مقابله و یا درمان آسیب‌های عصبی ناشی از سمیت تهییجی و ورود بیش از حد کلسیم به داخل نورون‌ها را داشته باشد. بدیهی است در صورت اثبات این ادعا، دریچه‌ی جدیدی در درمان اختلالات مغزی ناشی از سمیت تهییجی به دنبال تروما، خونریزی و ایسکمی باز می‌شود.

مطالعه‌ی حاضر ابتدا با تجویز کاینیک اسید به عنوان محرک NMDAR، مدل حیوانی اختلال شناختی ناشی از سمیت تهییجی را ایجاد کرد. سپس تأثیر زهر خام استخراج شده از عنکبوت *Agelena Labyrinthica* و فراکسیون تخلیص شده‌ی آگاتوکسین آن را در حفاظت نورونی رت‌ها که به صورت یادگیری و حافظه بروز می‌یابد، بررسی گردید.

گروه پس‌درمانی ممانتین: دریافت داخل هیپوکمپ کاینیک اسید و ۳۰ دقیقه پس از آن، دریافت داخل صفاقی ممانتین

دستگاه Morris water maze (MWM): ۸ روز پس از اتمام تزریق داروها، حیوانات مورد ارزیابی حافظه‌ی فضایی با دستگاه MWM (برج صنعت، ایران) قرار گرفتند. این دستگاه شامل یک مخزن گرد تیره (قطر ۱۴۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۵۵ سانتی‌متر) می‌باشد که تا عمق ۳۰ سانتی‌متری از آب با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد پر می‌شود و یک سکو با قطر ۱۱ سانتی‌متر به فاصله‌ی ۱ سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز یکی از ربع دایره‌ها واقع می‌شود. پروتکل استفاده شده در مطالعه‌ی حاضر، ۵ روز است. ۴ روز ابتدایی به حیوان آموزش داده شد که برای نجات از استخر شنا، بر روی سکوی فرار قرار گیرد و در روز پنجم، حافظه‌ی حیوان در استخر بدون سکوی فرار مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور آموزش حیوانات، سکوی فرار در وسط ربع جنوب شرقی قرار گرفت. هر گروه از حیوانات، چهار بار آموزش در روز را برای چهار روز متوالی دریافت کردند. هر آموزش شامل رهاسازی تصادفی رت از یک قطب تانک بود که به آن‌ها ۶۰ ثانیه فرصت داده می‌شد تا شنا کنند و سکوی پنهان را پیدا نمایند. رت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه روی سکو می‌ماندند تا محل سکو را یاد بگیرند و به خاطر بسپارند. جهت سنجش حافظه در روز پنجم، سکوی فرار برداشته شد و به رت‌ها ۶۰ ثانیه اجازه‌ی شنا در ماز بدون سکو داده می‌شد (تست Probe). زمان سپری شده جهت یافتن سکو در مرحله‌ی یادگیری و زمان سپری شده در ربع دایره‌ی هدف (Target quadrant یا TQ) (ربع دایره‌ای که پیش‌تر سکو در آن واقع شده بود)، در تست Probe با نرم‌افزار EthoVision نسخه‌ی ۱۱ مورد ارزیابی و محاسبه قرار گرفت (۲۵).

نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA در نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه‌ی ۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه‌ی آماری نتایج گروه‌های مختلف پس از آزمون One-way ANOVA، از تست تعقیبی Tukey استفاده شد. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جداسازی اجزای زهر خام به روش زل فیلتراسیون: کروماتوگرافی زل فیلتراسیون ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام عنکبوت *Agelena labyrinthica* بر روی ستون Hiload Superdex 75 pg انجام شد. پروتئین‌های زهر خام بر اساس وزن مولکولی به ۹ جزء مشخص تفکیک و به ترتیب وزن مولکولی از ستون خارج شدند. پروتئین‌های ابتدایی دارای وزن مولکولی زیاد بودند و پروتئین‌های بعدی وزن مولکولی کمتری داشتند که به ترتیب خروج از ستون F1-F9 نامگذاری شدند (شکل ۱).

جراحی: مواد مورد مطالعه در پژوهش به داخل هیپوکمپ تزریق شد. بنابراین، برای دستیابی به این قسمت، نیاز به جراحی حجمه حیوانات به روش استریوتاکسی بود. بدین منظور، ابتدا حیوانات تحت بیهوشی متعادل با مخلوط ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین قرار گرفتند. سپس سر حیوان در داخل دستگاه استریوتاکسی (Kopf، آمریکا) ثابت شد. با مشاهده‌ی نقطه‌ی مبدأ Bregma که بر روی حجمه قرار دارد و با استفاده از اطلس Watson و Paxinos، مختصات ناحیه‌ی CA3 هیپوکمپ شامل $AP = -3/3$ از برگما، $ML = +3$ از خط وسط، $DV = -3/5$ از سطح سخت شامه مشخص شد. این نقطه با مته‌ی مخصوص سوراخ شد و بر اساس گروه‌بندی حیوانات، مواد در نظر گرفته شده به صورت یک‌طرفه و با سرنگ (Hamilton، آمریکا) در این ناحیه تزریق گردید.

گروه‌های مورد مطالعه: رت‌ها به صورت تصادفی به ۱۰ گروه شش تایی تقسیم شدند و تجویز مواد بر اساس پروتکل ذکر شده در ذیل انجام شد. حجم تمام تزریقات داخل هیپوکمپ، ۲ میکرولیتر و داخل صفاقی، ۱ میلی‌لیتر بود. غلظت محلول‌های کاینیک اسید (Sigma، آمریکا)، زهر خام و فراکسیون آگاتوکسین، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲۴)، غلظت PBS، ۱ مولار و دز ممانتین، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. تزریق‌های داخل هیپوکمپ در یک حیوان به فاصله‌ی ۳۰ دقیقه از هم صورت گرفت.

گروه شش: این حیوانات فقط جراحی استریوتاکس و جهت تزریق داخل صفاقی با دست کنترل شدند، اما ماده‌ای را دریافت نکردند.

گروه شاهد: دریافت داخل هیپوکمپ نرمال سالیین و همچنین، PBS به فاصله‌ی ۳۰ دقیقه از هم و سپس دریافت داخل صفاقی نرمال سالیین.

گروه پیش‌درمانی کاینیک اسید: دریافت داخل هیپوکمپ PBS و سپس دریافت کاینیک اسید.

گروه پس‌درمانی کاینیک اسید: دریافت داخل هیپوکمپ کاینیک اسید و سپس دریافت PBS

گروه پیش‌درمانی زهر خام: دریافت داخل هیپوکمپ زهر خام و سپس دریافت کاینیک اسید

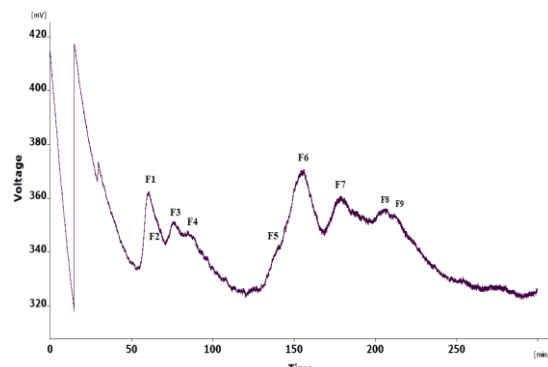
گروه پس‌درمانی زهر خام: دریافت داخل هیپوکمپ کاینیک اسید و سپس دریافت زهر خام

گروه پیش‌درمانی فراکسیون آگاتوکسین: دریافت داخل هیپوکمپ فراکسیون آگاتوکسین و سپس دریافت کاینیک اسید

گروه پس‌درمانی فراکسیون آگاتوکسین: دریافت داخل هیپوکمپ کاینیک اسید و سپس دریافت فراکسیون آگاتوکسین

گروه پیش‌درمانی ممانتین: دریافت داخل صفاقی ممانتین و ۳۰ دقیقه پس از آن، دریافت داخل هیپوکمپ کاینیک اسید

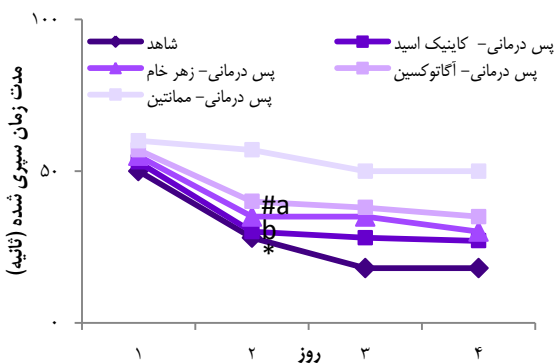
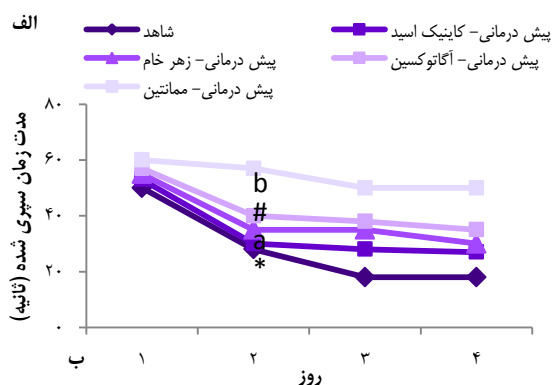
زمانی که ممانتین قبل و یا بعد از تجویز کاینیک اسید به حیوانات تزریق شد، زمان یافتن سکو توسط آن‌ها در روز دوم نسبت به روز اول، به میزان قابل توجهی کاهش یافت ($P < 0/001$). این زمان در گروه‌های دریافت‌کننده ممانتین در روزهای دوم تا چهارم نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده کاینیک اسید تنها نیز کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۳، قسمت‌های A و B). در روز تست Probe، حیوانات دریافت‌کننده کاینیک اسید، زمان به مراتب کمتری را نسبت به گروه شاهد در TQ سپری نمودند ($P < 0/001$). تزریق ممانتین هم به صورت پیش‌درمانی و هم پس‌درمانی، زمان طی شده در TQ را نسبت به حیوانات گروه کاینیک اسید به طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۴) ($P < 0/001$).



شکل ۱. کروماتوگرام تخلیص فراکسیون آگاتوکسین با استفاده از ستون

Hiload superdex 75 pg

پروتئین‌های زهر خام بر اساس وزن مولکولی به ۹ جزء مشخص تخلیص شدند که به ترتیب خروج از ستون F1-F9 نامگذاری شدند.



شکل ۳. تأثیر تجویز مواد مورد مطالعه قبل (الف) و بعد (ب) از کاینیک اسید

بر مدت زمان سپری شده جهت یافتن سکو طی ۴ روز متوالی

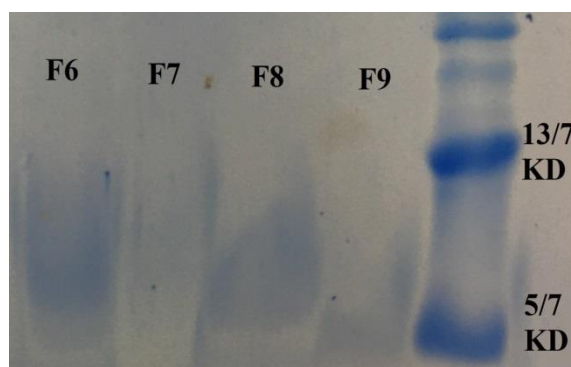
داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است.

ab# نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/001$ نسبت به روز اول خود است.

تأثیر پیش‌درمانی زهر خام و فراکسیون آگاتوکسین بر فرایند یادگیری رت‌ها در
رت‌ها و زمان سپری شده در TQ: زهر خام و یا فراکسیون آگاتوکسین زمانی که قبل از کاینیک اسید به حیوانات تجویز گردید، باعث کاهش معنی‌داری در زمان پیدا کردن سکوی پنهان در روز دوم نسبت به روز اول خود ($P < 0/001$) و همچنین، نسبت به روز دوم گروه‌های کاینیک

ژل الکتروفورز اجزا با وزن مولکولی کم: ژل الکتروفورز آکریل

آمید ۱۵ درصد برای اجزای ۹-۶ انجام شد. این جزءها خروجی نهایی ژل فیلتراسیون و دارای وزن مولکولی پایین‌تری بودند. بر اساس نشانگر پروتئینی مورد استفاده، جزءهای ۹-۶ در محدوده وزنی ۵/۷-۱۳/۷ کیلوالتون قرار داشتند که جزء شماره ۸ با وزن مولکولی ۵/۷-۱۰ کیلوالتون در محدوده وزن مولکولی آگاتوکسین می‌باشد. این جزء جداسازی شد و برای بررسی اثرات فارماکولوژیکی در تست حیوانی به کار گرفته شد (شکل ۲).



شکل ۲. ژل الکتروفورز جزء شماره ۶ تا ۹ زهر خام

همه‌ی جزءها در محدوده وزنی ۵/۷-۱۳/۷ کیلوالتون بودند. جزء شماره ۸ با وزن مولکولی بین ۵/۷-۱۰ کیلوالتون، در محدوده وزن مولکولی آگاتوکسین می‌باشد.

تأثیر تجویز کاینیک اسید و ممانتین بر فرایند یادگیری رت‌ها در

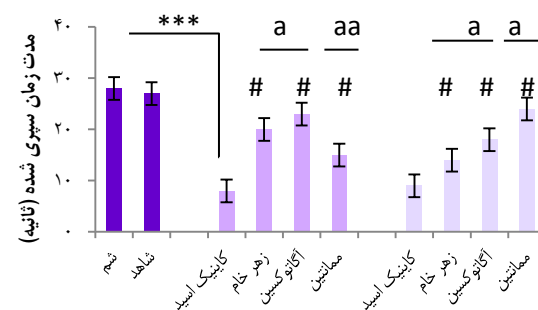
ماز آبی و زمان سپری شده در TQ: تجویز کاینیک اسید چه قبل از PBS و چه بعد از آن، باعث تغییر معنی‌داری در زمان یافتن سکو توسط حیوان بین ۴ روز آموزش نشد؛ در حالی که در گروه‌های شاهد و شم، از روز دوم آموزش اختلاف قابل ملاحظه‌ای در زمان پیدا کردن سکو توسط حیوان نسبت به روز اول مشاهده شد ($P < 0/001$).

اسید شد ($P < 0/001$). این اختلاف با گروه کاینیک اسید تا آخرین روز آموزش ثابت بود (شکل ۳، قسمت A).

در روز تست، هم زهر خام و هم فراکسیون آگاتوکسین، زمان سپری شده در TQ را نسبت به حیوانات دریافت‌کننده‌ی کاینیک اسید به صورت قابل توجهی افزایش دادند ($P < 0/001$). این زمان در حیوانات دریافت‌کننده‌ی فراکسیون آگاتوکسین از حیوانات دریافت‌کننده‌ی زهر خام بیشتر بود ($P < 0/050$). زمان سپری شده در TQ توسط حیواناتی که چه زهر خام و چه فراکسیون آگاتوکسین را به شکل پیش‌درمانی با کاینیک اسید دریافت کرده بودند، نسبت به حیواناتی که ممانتین را قبل از کاینیک اسید دریافت کردند، بیشتر بود (به ترتیب $P < 0/050$ و $P < 0/010$) (شکل ۴).

مقایسه‌ی تأثیر تجویز زهر خام، فراکسیون آگاتوکسین و ممانتین

قبل و یا بعد از کاینیک اسید بر زمان سپری شده در TQ: هم زهر خام و هم فراکسیون آگاتوکسین وقتی که قبل از کاینیک اسید تجویز شدند، افزایش معنی‌داری را در زمان سپری شده در TQ نسبت به زمانی که هر کدام بعد از کاینیک اسید تجویز شدند، نشان دادند ($P < 0/050$). این معیار در حیواناتی که ممانتین را به صورت پیش‌درمانی دریافت کردند، نسبت به آن‌هایی که ممانتین را قبل از کاینیک اسید دریافت نمودند، به طور قابل توجهی بیشتر بود ($P < 0/010$) (شکل ۴).



شکل ۴. تأثیر تجویز مواد مورد مطالعه قبل و بعد از کاینیک اسید بر مدت زمان سپری شده در

Target quadrant (TQ) در تست Probe

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است.

*** وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/001$ نسبت به گروه‌های شاهد و شم،
وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/001$ نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی کاینیک اسید،
به ترتیب نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/050$ و $P < 0/010$ نسبت به گروه‌های نشان‌داده شده است.

تأثیر پس‌درمانی زهر خام و فراکسیون آگاتوکسین بر فرایند

یادگیری رت‌ها و زمان سپری شده در TQ: زهر خام و یا فراکسیون آگاتوکسین زمانی که پس از کاینیک اسید به حیوانات تجویز گردید، باعث کاهش معنی‌داری در زمان پیدا کردن سکوی پنهان در روز دوم نسبت به روز اول خود ($P < 0/001$) و همچنین، نسبت به روز دوم گروه‌های کاینیک اسید شد ($P < 0/001$). این اختلاف با گروه کاینیک اسید تا آخرین روز آموزش ماندگار بود (شکل ۳، قسمت B). در روز تست، هم زهر خام و هم فراکسیون آگاتوکسین - که به صورت پس‌درمانی با کاینیک اسید تجویز شده بودند - زمان سپری شده در TQ را نسبت به حیوانات دریافت‌کننده‌ی کاینیک اسید به صورت قابل توجهی افزایش دادند ($P < 0/001$). این زمان در حیوانات دریافت‌کننده‌ی فراکسیون آگاتوکسین از حیوانات دریافت‌کننده‌ی زهر خام بیشتر بود ($P < 0/050$). زمان سپری شده در TQ توسط

بحث

پژوهش حاضر ضمن جداسازی زهر خام از عنکبوت *Agelena labyrinthica*، به خالص‌سازی فراکسیون آگاتوکسین پرداخت. یافته‌ها نشان داد که محصول ژل فیلتراسیون ۱۰۰ میلی‌گرم زهر خام و الکتروفورز آن از طریق ژل آکریل آمید ۱۵ درصد، فراکسیون شماره ۹-۶ با وزن مولکولی بین ۱۳۷-۵۷۷ کیلودالتون، در محدوده‌ی وزنی آگاتوکسین می‌باشند. نتایج مطالعات حاکی از آن است که این توکسین دارای وزن مولکولی بین ۵/۲ تا ۱۲ است (۱۷). با توجه به این که آگاتوکسین انواع متنوعی دارد و تنها نوع امگا آگاتوکسین بر روی پستانداران از جمله رت تأثیر می‌گذارد، پپتیدهای دارای زنجیره‌ی سنگین و یون‌های موجود درون زهر خام که به عنوان مواد مزاحم به شمار می‌روند، جداسازی شد (۲۶-۲۷) و فراکسیون شماره ۸ با محدوده‌ی وزنی ۱۰-۵۷۷ کیلودالتون به عنوان فراکسیون حاوی آگاتوکسین انتخاب گردید و در تست حیوانی به کار گرفته شد. در تحقیق حاضر، به منظور ایجاد آسیب شناختی در رت، از روش تزریق در ناحیه‌ی CA3 هیپوکمپ کمک گرفته شد. مدل‌ها، داده‌های رفتاری و اطلاعات الکتروفیزیولوژیک نشان می‌دهد که ناحیه‌ی CA3 هیپوکمپ از چندین فرایند مهم برای تشکیل حافظه‌ی فضایی پشتیبانی می‌کند. این ناحیه با رمزگذاری و بازیابی بعدی، موجب ارتباط یک محرک با یک مکان فضایی می‌شود و از این طریق، منجر به تشخیص و تفکیک یک مکان فضایی از سایر مکان‌ها می‌گردد. علاوه بر این، می‌تواند بر اساس ورودی‌های هر چند جزئی و ناقص، حافظه‌ی فضایی مشخصی را بازیابی کند (۲۸). برای ارزیابی حافظه‌ی فضایی در پژوهش حاضر، از تست رفتاری MWM که یکی از دقیق‌ترین و پرکاربردترین مازها در سنجش حافظه‌ی فضایی است، بهره گرفته شد. بنابراین، تست مذکور می‌تواند با کارایی و دقت بالایی، عملکرد

ناحیه CA3 هیپوکمپ را مورد بررسی قرار دهد (۲۹).

در مطالعه‌ی حاضر، تزریق داخل هیپوکمپ کاینیک اسید، باعث اختلال در یادگیری و آسیب به حافظه‌ی حیوانات شد. اختلال شناختی به دنبال تجویز کاینیک اسید، در تحقیقات متعدد گزارش شده بود (۳۱-۳۰) که نتایج آن‌ها تأییدکننده‌ی یافته‌های بررسی حاضر می‌باشد. فعال‌سازی گیرنده‌ی کاینیک اسید، منجر به دپلاریزاسیون غشایی و در نهایت، افزایش کلسیم داخل نورونی می‌شود. تجمع کلسیم داخل نورونی، یکی از ملزومات تحریک آبشار مرگ نورونی است. علاوه بر این، مقادیر زیاد کاینیک اسید، سبب تحریک مکرر گیرنده‌ی گلوتامات و هجوم کلسیم به داخل نورون و در نتیجه، آپوپتوز نورونی و اختلال عملکرد شناختی می‌شود. همچنین، کاینیک اسید منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و گونه‌های ازت و اکشن‌پذیر (Reactive nitrogen species یا RNS) می‌شود. ثابت شده است که رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در آسیب عصبی دارند (۷).

یافته‌ها نشان می‌دهد که تجویز زهر خام عنكبوت، فراکسیون حاوی آگاتوکسین و یا ممانتین هر کدام به تنهایی، آسیب‌های ناشی از کاینیک اسید به یادگیری و حافظه‌ی حیوانات زمانی که قبل و یا بعد از کاینیک اسید تجویز شوند را به صورت قابل توجه، اما با درجات متفاوتی بهبود می‌بخشند. در روش پیش‌درمانی، بیشترین بهبود به دنبال تجویز فراکسیون حاوی آگاتوکسین حاصل می‌شود. در این اثر پیشگیرانه، پس از فراکسیون حاوی آگاتوکسین، زهر خام نیز توانست یادگیری و حافظه‌ی مختل شده توسط کاینیک اسید را به حیوانات برگرداند. عنكبوت‌های خانواده‌ی *Agelenidae*، دارای چندین گروه آگاتوکسین هستند که بر روی کانال‌های یونی تأثیر می‌گذارد. آگاتوکسین آلفا باعث فلج فوری در حشرات می‌شود و با مسدود کردن کانال‌های کلسیمی پیش‌سیناپسی، پتانسیل‌های بیش‌تحریکی برانگیخته شده در اعصاب عضلانی خرنج را مهار می‌کند. این توکسین هیچ فعالیتی در پستانداران نشان نداده است و تأثیری بر کانال‌های کلسیم ولتاژدار پستانداران ندارد (۳۲).

آگاتوکسین مو که تمام زیرگروه‌های آن وزن مولکولی حدود ۴ کیلو دالتون دارند، موجب فلج اسپاستیک در حشرات *Lepidoptera* و *Flies* می‌شود و آزادسازی انتقال دهنده‌های عصبی را در پایانه‌های پیش‌سیناپسی افزایش می‌دهد. همچنین، به طور اختصاصی روی کانال‌های سدیمی حشرات تأثیر می‌گذارد (۲۶).

آگاتوکسین امگا به طور انتخابی موجب مهار کانال‌های کلسیم وابسته به ولتاژ نوع P/Q در پستانداران و حشرات می‌شود و از آزادسازی انتقال دهنده‌های عصبی و نقل و انتقال سیناپسی جلوگیری می‌کند (۲۹). کانال‌های کلسیمی نوع P/Q در ترمینال‌های عصب پیش‌سیناپسی بیان می‌شوند و نقشی حیاتی در کنترل آزادسازی سریع

انتقال دهنده‌های عصبی مانند گابا و گلوتامات دارند. تنظیم این انتقال دهنده‌های عصبی، بر عملکرد سیناپسی و در نتیجه، پتانسیل عمل تأثیر می‌گذارد (۳۳). بنابراین، بلاک کانال‌های کلسیمی P/Q به وسیله امگا آگاتوکسین، می‌تواند روی پتانسیل عمل سلول تأثیر بگذارد و مهار این کانال‌ها توسط امگا آگاتوکسین، می‌تواند وقایع بعدی ناشی از کاینیک اسید را مهار کند. نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده است که امگا آگاتوکسین انتقال دهنده‌های عصبی را در پایانه‌های کورتیکواستریال سرکوب می‌کند (۳۳) و در غلظت ۱۰۰ نانومولار، وجود گلوتامات در سلول‌های هیپوکمپ و سیناپتوزوم را کاهش می‌دهد (۳۴). همچنین، ۲۰۰ نانومولار امگا آگاتوکسین، باعث کاهش جریان کلسیم در سیناپتوزوم‌های موش صحرایی و سلول‌های عصبی پورکنژ مخچه می‌گردد (۳۵).

در مطالعه‌ای، تزریق امگا آگاتوکسین ۱۰ دقیقه قبل از اسکمی، سلول‌های هیپوکمپ را از تخریب محافظت کرد و ۸۴ درصد هجوم کلسیم، سمیت بیش‌تحریکی در سلول‌های هیپوکمپ را تسکین می‌دهد (۳۶). پاسخ‌های بهتر فراکسیون حاوی آگاتوکسین در تحقیق حاضر (امگا آگاتوکسین) نسبت به زهر خام، می‌تواند به دلیل وجود مقادیر بیشتر امگا آگاتوکسین در فراکسیون حاوی آگاتوکسین نسبت به زهر خام و در واقع، دز بالاتر آن باشد. ممانتین نیز توانست آسیب‌های شناختی ناشی از کاینیک اسید را هم در مراحل پیش‌درمانی و هم پس‌درمانی بهبود بخشد. ممانتین با ورود به کانال یونی گیرنده‌های NMDA، آن را مهار و از تحریک آن توسط کاینیک اسید و ورود کلسیم و بروز وقایع بعدی جلوگیری می‌کند. این اثرات ممانتین علیه آسیب‌های کاینیک اسید، در پژوهش *Danysz* و *Parsons* نیز نشان داده شده بود (۳۷).

به طور کلی، اثرات بهبود دهنده‌ی ناشی از فراکسیون حاوی آگاتوکسین و زهر خام در پیش‌درمانی با کاینیک اسید نسبت به زمانی که بعد از کاینیک اسید تجویز شوند، به طور قابل توجهی بیشتر بود. این اتفاق می‌تواند به این دلیل باشد که تمایل و قدرت اتصال امگا آگاتوکسین به کانال‌های کلسیم غیر فعال بیشتر از انواع فعال آن‌ها است (۳۵، ۱۷). بر عکس اثرات مقابله‌کننده‌ی ممانتین در مرحله‌ی پس‌درمانی به طور معنی‌داری بهتر از زمانی بود که ممانتین قبل از کاینیک اسید تجویز شده بود و این اتفاق نیز می‌تواند به این علت باشد که ممانتین به کانال یونی گیرنده‌های NMDA فعال به مراتب بهتر از انواع غیر فعال آن‌ها وارد می‌شود و آن‌ها را مهار می‌کند و آبشارهای کلسیمی مخرب نورون را در مراحل ابتدایی محدود می‌نماید (۳۸).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تزریق داخل هیپوکمپ

درمانی ممانتین از همه بهتر بود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد سم‌شناسی با شماره‌ی ۳۹۷۷۸۷، مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد و تحت حمایت مالی دانشگاه انجام گرفت. بدین وسیله از معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و همچنین، حمایت‌ها و راهنمایی‌های خانم دکتر شاکریان دانشجوی علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

کاینیک اسید، موجب ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه‌ی فضایی رت‌ها می‌شود. تجویز هر کدام از مواد ممانتین، زهر خام عنكبوت *Agelena labyrinthica* و یا فراکسیون حاوی آگاتوکسین به تنهایی، چه قبل از تزریق کاینیک اسید و چه بعد از تزریق آن، سبب پیشگیری و یا درمان آسیب شناختی ناشی از کاینیک اسید می‌شود. در واقع، تجویز زهر خام و یا فراکسیون حاوی آگاتوکسین به صورت پیش‌درمانی با کاینیک اسید، اثرات بهتری را نسبت به حالت پس‌درمانی دارد. در حالت پیش‌درمانی، فراکسیون حاوی آگاتوکسین بهترین اثرات پیشگیرانه را نشان داد. در حالت پس‌درمانی با کاینیک اسید، پاسخ‌های

References

- Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian A, Zamani Z. Effect of Royal Jelly (RJ) on Learning and Memory in Rats after Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin (icv-STZ). *J Isfahan Med Sch* 2011; 28(123): 1825-34. [In Persian].
- Olivares D, Deshpande VK, Shi Y, Lahiri DK, Greig NH, Rogers JT, et al. N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *Curr Alzheimer Res* 2012; 9(6): 746-58.
- Hosseini-Sharifabad A, Rabbani M, Seyed-Yousefi Y, Safavi M. Magnesium increases the protective effect of citicoline on aluminum chloride-induced cognitive impairment. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2020; 18(2): 241-8.
- Chamorro A, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol* 2016; 15(8): 869-81.
- Hosseini-Sharifabad A, Rabbani M, Sheikh-Darani A. The effect of long-term pregabalin administration on memory of rat in object recognition task. *J Isfahan Med Sch* 2020; 38(575): 325-31. [In Persian].
- Bourinet E, Zamponi GW. Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. *Neuropharmacology* 2017; 127: 109-15.
- Zhang XM, Zhu J. Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9(2): 388-98.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2014; 115: 157-88.
- Zamani N, Moazedi AA, Eskandary A. The effects of vitamin B12 on spatial learning and memory in adult male rats model of Alzheimer's disease. *J Isfahan Med Sch* 2018; 35(463): 1949-55. [In Persian].
- Norouzi-Kakhki R, Saghebjo M, Seghatolslami A. Effect of aerobic training and omega-3 intake on nerve growth factor in the hippocampus of healthy male rats and rats with homocysteine induced Alzheimer's model. *J Isfahan Med Sch* 2016; 34(379): 392-400. [In Persian].
- Tong BC, Wu AJ, Li M, Cheung KH. Calcium signaling in Alzheimer's disease and therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018; 1865(11 Pt B): 1745-60.
- Amani M, Zolghadrasab M, Salari AA. NMDA receptor in the hippocampus alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiol Behav* 2019; 202: 52-61.
- Peskind ER, Potkin SG, Pomara N, Ott BR, Graham SM, Olin JT, et al. Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: A 24-week randomized, controlled trial. *Am J Geriatr Psychiatry* 2006; 14(8): 704-15.
- Dobrek L, Thor P. Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2011; 65: 338-46.
- Thomas SJ, Grossberg GT. Memantine: A review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Interv Aging* 2009; 4: 367-77.
- Danysz W, Parsons CG. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine-searching for the connections. *Br J Pharmacol* 2012; 167(2): 324-52.
- Pringos E, Vignes M, Martinez J, Rolland V. Peptide neurotoxins that affect voltage-gated calcium channels: A close-up on omega-agatoxins. *Toxins (Basel)* 2011; 3(1): 17-42.
- Shapira A, Benhar I. Toxin-based therapeutic approaches. *Toxins (Basel)* 2010; 2(11): 2519-83.
- Kiskin NI, Chizhnikov IV, Tsyndrenko AY, Mueller AL, Jackson H, Krishtal OA. A highly potent and selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonist from the venom of the *Agelenopsis aperta* spider. *Neuroscience* 1992; 51(1): 11-8.
- Goudarzi H. *Araneology: Biology, medical importance*. 1st ed. Tehran, Iran: Sepehr Publications; 2015. p.140. [In Persian].
- Jafari S, Babaeipour V, Seyed HA, Rahaie M, Mofid MR, Haddad L, et al. Recombinant production of mecasermin in *E. coli* expression system. *Res Pharm Sci* 2014; 9(6): 453-61.
- Ranjbari J, Babaeipour V, Vahidi H, Moghimi H, Mofid MR, Namvaran MM, et al. Enhanced production of insulin-like growth factor I protein in *Escherichia coli* by optimization of five key factors. *Iran J Pharm Res* 2015; 14(3): 907-17.
- Kahaki FA, Babaeipour V, Memari HR, Mofid MR. High overexpression and purification of optimized bacterio-opsin from *Halobacterium Salinarum* R1 in *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 174(4): 1558-71.
- Miltiadous P, Stamatakis A, Stylianopoulou F.

- Neuroprotective effects of IGF-I following kainic acid-induced hippocampal degeneration in the rat. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30(3): 347-60.
25. Shakerin Z, Esfandiari E, Ghanadian M, Razavi S, Alaei H, Dashti G. Therapeutic effects of *Cyperus rotundus* rhizome extract on memory impairment, neurogenesis and mitochondria in beta-amyloid rat model of Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* 2020; 35(3): 451-61.
 26. Skinner WS, Adams ME, Quistad GB, Kataoka H, Cesarin BJ, Enderlin FE, et al. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *J Biol Chem* 1989; 264(4): 2150-5.
 27. Adams ME. Agatoxins: Ion channel specific toxins from the American funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon* 2004; 43(5): 509-25.
 28. Gilbert PE, Brushfield AM. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33(5): 774-81.
 29. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006; 1(2): 848-58.
 30. Kumar A, Prakash A, Pahwa D, Mishra J. Montelukast potentiates the protective effect of rofecoxib against kainic acid-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 103(1): 43-52.
 31. Kumar A, Prakash A, Pahwa D. Galantamine potentiates the protective effect of rofecoxib and caffeic acid against intrahippocampal Kainic acid-induced cognitive dysfunction in rat. *Brain Res Bull* 2011; 85(3-4): 158-68.
 32. Yamaji N, Sugase K, Nakajima T, Miki T, Wakamori M, Mori Y, et al. Solution structure of agelenin, an insecticidal peptide isolated from the spider *Agelena opulenta*, and its structural similarities to insect-specific calcium channel inhibitors. *FEBS Lett* 2007; 581(20): 3789-94.
 33. Barral J, Poblette F, Mendoza E, Pineda JC, Galarraga E, Bargas J. High-affinity inhibition of glutamate release from corticostriatal synapses by omega-agatoxin TK. *Eur J Pharmacol* 2001; 430(2-3): 167-73.
 34. Knaack GL, Charkkar H, Hamilton FW, Peixoto N, O'Shaughnessy TJ, Pancrazio JJ. Differential responses to omega-agatoxin IVA in murine frontal cortex and spinal cord derived neuronal networks. *Neurotoxicology* 2013; 37: 19-25.
 35. McDonough SI, Mintz IM, Bean BP. Alteration of P-type calcium channel gating by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Biophys J* 1997; 72(5): 2117-28.
 36. Asakura K, Matsuo Y, Oshima T, Kihara T, Minagawa K, Araki Y, et al. omega-agatoxin IVA-sensitive Ca(2+) channel blocker, alpha-eudesmol, protects against brain injury after focal ischemia in rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 394(1): 57-65.
 37. Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18(Suppl 1): S23-S32.
 38. Johnson JW, Kotermanski SE. Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(1): 61-7.

The Effect of *Agelena Labyrinthica* Total Venom and its Agatoxin Fraction on the Kainic Acid-Induced Cognitive Disorder in Rat

Zahra Taghva¹, Mohammad Reza Mofid², Majid Moradmand³, Ali Hosseini-Sharifabad⁴

Original Article

Abstract

Background: Overactivation of P/Q type of calcium channels leads to neurological disorders. The venom of *Agelena labyrinthica* consists of substances which can inhibit this channel. One of the most important compounds is agatoxin. This study aimed to investigate the preventive and therapeutic effects of total venom or agatoxin component on kainic acid-induced amnesia.

Methods: The spider, *Agelena labyrinthica*, was collected from Mazandaran Province, Iran, and their total venom was extracted. The agatoxin fraction was purified using the fast protein liquid chromatography (FPLC) method. The total venom or agatoxin was injected into the rat hippocampus before or after injection of kainic acid. A week after the drug injection, the memory of animals was assessed using Morris water maze (MWM) task.

Findings: Kainic acid significantly reduced the time spent in the target quadrant (TQ) in water maze compared to the control group ($P < 0.001$). Intra-hippocampal injection of total venom or agatoxin fraction either before or after kainic acid caused a significant increase in TQ time compared to kainic acid group ($P < 0.001$). Of note, their injection before the kainic acid increased the TQ time more than injection after the kainic acid. In comparison to total venom, agatoxin fraction remarkably increased the TQ time.

Conclusion: Total venom and agatoxin fraction prevented the memory impairment due to the excitotoxicity of kainic acid. The effect of agatoxin was greater than total venom. These two substances showed less ameliorative effect when administered after kainic acid injection.

Keywords: Voltage-Dependent calcium channel; Omega-Agatoxins; Kainic acid; Memantine; Spider venoms

Citation: Taghva Z, Mofid MR, Moradmand M, Hosseini-Sharifabad A. **The Effect of *Agelena Labyrinthica* Total Venom and its Agatoxin Fraction on the Kainic Acid-Induced Cognitive Disorder in Rat.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(643): 714-22.

1- MSc Student, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant and Animal Biology, School of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Ali Hosseini-Sharifabad, Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: ahosseinisharifabad82@gmail.com