Archive of SID

IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۳۹۹، دوره ٤، شماره ۳ و ٤، پیاپی ١٤، صفحه ۱۳۰-۱۱۸

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین بر حافظه، میزان گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن میتوکندری مغز و تعداد پلاک‌های بتاآمیلوئیدی در هیپوکمپ موش‌های صحرایی

مژده انجمنی[۱]، افسانه الیاسی[۱،۲،*]، رسول قاسمی[۱]، جواد فحانیک بابایی[۲،۳]

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران ، ایران
۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران ، ایران
۳. مرکز تحقیقات الکتروفیزیولوژی، پژوهشکده علوم اعصاب (بازتوانی عصبی)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران ، ایران

دریافت: ۱۵ فروردین ۱۴۰۰ پذیرش: ۶ تیر ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر شایع‌ترین بیماری تخریب عصبی است که با اختلالات شناختی و رفتاری همراه است و شیوع آن به سرعت در حال افزایش است. آلزایمر علاوه بر اثرات مخرب بر یادگیری و حافظه، میتوکندری به‌عنوان اندامک حیاتی سلول و بافت هیپوکمپ به‌عنوان محل یادگیری و حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این مطالعه اثرات هم‌زمان استرپتوزوتوسین بر حافظه فضایی، تولید گونه‌های واکنش‌پذیراکسیژن میتوکندری و بافت هیپوکمپ در مراحل اولیه بیماری آلزایمر در موش‌صحرایی بررسی شد.

روش‌ها: حیوانات به طور تصادفی در گروه‌های کنترل، شاهد و استرپتوزوتوسین قرارگرفتند. دوزهای ۲ ، ۳ ، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین از راه داخل بطنی تزریق شد. ۱۴ روز بعد، میزان یادگیری و حافظه فضایی موش‌ها با ماز آبی موریس سنجیده شد. همچنین میزان تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در میتوکندری مغز (به روش رنگ‌سنجی) و میزان پلاک‌های آمیلوئیدبتا در بافت هیپوکمپ (با استفاده از رنگ قرمز کنگو) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: تزریق دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین داخل بطنی، دوز مؤثر و پایه برای ایجاد اختلالات حافظه و یادگیری در کوتاه‌ترین زمان ممکن (۱۴ روز) است. با این دوز علائم اولیه شروع بیماری آلزایمر شامل ظهور پلاک‌های آمیلوئیدبتا در هیپوکمپ و افزایش تولید گونه‌های واکنش‌پذیراکسیژن در میتوکندری مغز موش‌ها مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: تاییدیه‌های رفتاری، بافت‌شناسی و بیوشیمیایی بدست آمده از مطالعه حاضر، دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین داخل بطنی را به‌عنوان دوز مناسب جهت ایجاد مدل بیماری آلزایمر در کوتاه‌ترین زمان ممکن (۱۴ روز) در موش‌های صحرایی پیشنهاد می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، استرپتوزوتوسین، حافظه، گونه‌های واکنش‌پذیراکسیژن، قرمز کنگو، میتوکندری

مقدمه

آلزایمر (AD)[۱] به عنوان شایع‌ترین بیماری تحلیل برنده عصبی است که با اختلالات شناختی و رفتاری همراه بوده و شیوع آن به شدت رو به افزایش است. آلزایمر اغلب بسیار دیر تشخیص داده می‌شود و عدم آگاهی از ابتلا به آلزایمر باعث می‌شود که درمان به موقع آغاز نشود. از مشخصه‌های بارز این بیماری، تجمع و رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی[۲] در فضای داخل و خارج سلولی است و پروتئین آمیلوئیدبتا (Aβ)[۳] از اجزای اصلی تشکیل‌دهنده این پلاک‌ها می‌باشد [۱]. مطالعات قبلی نشان داده است که اختلال در عملکرد میتوکندری به‌دنبال تجمع پروتئین آمیلوئیدبتا یکی از مکانیسم‌های مطرح در

[1] Alzheimer's Disease (AD)

[2] Amyloid Beta Plaque
[3] Amyloid precursor protein (Aβ)

* نویسنده مسئول مکاتبات: af.eliassi@sbmu.ac.ir, afseliassi@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-2499-3430)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

بیماری آلزایمر می‌باشد که می‌تواند منجر به بروز سمیت و اختلال در عملکرد میتوکندری از طریق افزایش سطح رادیکال‌های آزاد گردد. علاوه بر این در طول زنجیره تنفسی، همواره تولید ROS[4] (گونه‌های واکنش‌پذیراکسیژن) را خواهیم داشت که توسط مکانسیم‌های دفاعی موجود از محیط حذف می‌شوند. ولی تحت شرایطی که شاهد اختلال در زنجیره تنفسی هستیم، تولید این رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و در ادامه منجر به بروز اثرات سوء بر عملکرد میتوکندری و در نهایت اختلال در هومئوستاز سلول و بروز بیماری‌های مختلف می‌گردد [۲]. بنابراین به نظر می‌رسد، حفظ هومئوستاز داخلی میتوکندری از جنبه‌های مختلف در پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر از اهمیت بالایی برخوردار باشد.

بیماری آلزایمر به دو صورت اسپورادیک[5] (دیررس) و فامیلی[6] (زودرس) بروز می‌کند. نوع دیررس در افراد ۶۰ سال به بالا رخ داده و شایع‌تر می‌باشد و ۹۵٪ موارد آلزایمر را شامل می‌شود [۳]. روش‌های چندی برای ایجاد مدل‌های مختلف بیماری آلزایمر وجود دارد؛ تشکیل یک مدل مناسب برای فازهای اولیه بیماری آلزایمر اسپورادیک قدم اولیه در شناسایی و شروع درمان اختلالات حافظه زودرس می‌باشد. مدل‌های حیوانی متعددی طراحی شده‌اند که در میان آن‌ها تزریق داخل بطنی[7] استرپتوزوتوسین[8] (STZ) مدلی مناسب برای بررسی مکانیسم پیشرفت بیماری آلزایمر از نوع اسپورادیک می‌باشد.

استرپتوزوتوسین با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی غیرطبیعی در مغز، یک مدل متابولیکی از بیماری آلزایمر می‌باشد. پیشگام مدل استرپتوزوتوسین داخل بطنی پروفسور هویر[9] است. مطالعات او و همکارانش پیشنهاد می‌کند که icv-STZ مدل غیرژنتیکی و یک مدل متابولیکی از آلزایمر اسپورادیک است [۴].

در همین راستا، در تحقیق دیگری براساس بررسی دقیق علائم بین بیماران انسانی آلزایمری و موش‌های تحت تزریق icv-STZ، پیشنهاد گردید که icv-STZ می‌تواند به عنوان مدل غیر ترانس ژنیک بیماری آلزایمر اسپورادیک درنظر گرفته شود [۵]. این که چگونه icv-STZ می‌تواند مدلی برای آلزایمر تلقی شود، مطالعات نشان می‌دهند که icv-STZ می‌تواند بعضی از ویژگی‌های بیماری آلزایمر اسپورادیک از جمله اختلال در بعضی جنبه‌های یادگیری[10] و حافظه[11] را شبیه‌سازی کرده و همچنین سبب استرس اکسیداتیو[12] و التهاب عصبی[13] زمینه‌ای گردد که آن نیز به نوبه خود باعث مرگ نورون‌ها می‌شود [۶]. دوزها و تعداد دفعات تزریق STZ متفاوتی جهت ایجاد مدل آلزایمر استفاده می‌شود. برای مثال کوریرا[14] و همکارانش دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به صورت تک‌تزریق در مدت یک ماه [۲]، کومار[15] و همکارانش دوز ۶ را به صورت دوبار تزریق در مدت ۱۸ روز [۷]، رستمی و همکاران دوز ۰/۵، ۱، ۳ را به صورت تزریق در یکی از بطن‌های جانبی مغز در مدت ۳ تا ۱۵ هفته [۸] ، دهقان و همکاران دوز های ۱/۵، ۲/۲۵، ۳ را به صورت محلول در aCSF[16] در مدت ۷ روز بررسی کردند [۹]. در اکثر مطالعات به بررسی دوزها و تعداد دفعات تزریق پرداخته شده ولی دوز واحدی در دوره مشخص معرفی نشده است؛ اطلاعات چندانی در خصوص میزان دوز و تعداد دفعات تزریق icv-STZ برای ایجاد مدل آلزایمری که مناسب برای بررسی‌های علائم اولیه این بیماری در روزهای آغازین باشد، مشخص نشده است؛ همچنین بررسی‌های کمی بر روی میتوکندری به عنوان ارگانل مهم و مؤثر در بیماری آلزایمر صورت گرفته است. بنابراین، در مطالعه حاضر با توجه به مطالعات پیش زمینه‌ای صورت گرفته، ابتدا به ارزیابی دوز کم و پایه STZ برای بروز علائم اولیه در مدت ۱۴ روز پرداخته شد تا مدل آلزایمری مناسب پروژه تثبیت شود؛ سپس به بررسی بافت هیپوکمپ و همچنین ROS میتوکندری مغز پرداختیم تا تغییرات ۱۴ روزه آن‌ها مشخص شود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار[17] با محدوده وزنی ۲۵۰–۲۲۰ گرم استفاده شد، که از مرکز پرورش

[4] Reactive oxygen species (ROS)
[5] Sporadic Alzheimer's Disease (sAD)
[6] Familial Alzheimer's disease (fAD)
[7] Intracerebroventricular
[8] Streptozotocin
[9] Hoyer

[10] Learning
[11] Memory
[12] Oxidative stress
[13] Neuroinflammation
[14] Correia
[15] Kumar
[16] Artificial Cerebrospinal Fluid (aCSF)
[17] Male Wistar rats

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

حیوانات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شدند. حیوانات در حیوانخانه گروه فیزیولوژی در شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. حیوانات به آب تصفیه شده شهری و غذای آماده (ساخت کارخانه خوراک دام پارس) دسترسی آزاد داشتند. آزمایشات رفتاری بین ساعت ۱۰ صبح تا ۳ بعد از ظهر انجام می‌شد. کلیه آزمایشات این پروژه طبق مفاد مطرح شده در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد اخلاق IR.SMBU.MSP.REC.1398.296 صورت گرفت.

گروه‌های آزمایشی

حیوانات به‌طور تصادفی به گروه‌های کنترل، شاهد (Sham) و STZ تقسیم شدند و با لحاظ نمودن ۶ موش در هر گروه به شرح زیر تحت تیمار قرار گرفتند: ۱) گروه کنترل بدون هیچ گونه مداخله، ۲) گروه شاهد دریافت کننده محلول نرمال سالین (به میزان۴ میکرولیتر درهر یک از بطن‌های جانبی مغز) بعد از جراحی استریوتاکسی، ۳) گروه‌های STZ دریافت کننده دوزهای ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک تزریق (STZ حل شده در نرمال سالین، به میزان ۴ میکرولیتر در هر بطن) بعد از جراحی استریوتاکسی، ۵) گروه‌های STZ دریافت کننده دوز های ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت دوبار تزریق، هر بار نصف دوز ذکر شده در روز جراحی و نصف دیگر ۳ روز بعد (STZ حل شده در نرمال سالین، به میزان۴ میکرولیتر در هر بطن)، ۶) گروه STZ دریافت کننده دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک تزریق و اندازه‌گیری ROS میتوکندری ۷) گروه STZ دریافت کننده دوز ۳ میلی-گرم بر کیلوگرم به صورت تک تزریق و بررسی بافت شناسی با رنگ‌آمیزی هیپوکمپ و شمارش تعداد پلاک‌های بتاآمیلوئید.

استریوتاکسی[18]

حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از بیهوشی کامل، جمجمه حیوان در دستگاه استریوتاکسی ثابت گردید. با استفاده ازبازوهای دستگاه استریوتاکس و براساس مختصات اطلس پاکسینوس و واتسون محل بطن‌های جانبی مغز در سطح جمجمه علامتگذاری شد (در مختصات ۰/۰۸ میلی‌متر به طرف عقب از برگما، ۱/۵میلی‌متر از خط میانی، و عمق ۳ میلی‌متر از سطح جمجمه) [۱۰]. از سر سوزن شماره ۲۳ به طول ۱ سانتی‌متر بعنوان کانول تزریق استفاده شد. یک سوراخ سطحی هم در سطح جمجمه برای قرار دادن پیچ ایجاد شد. پس از تعبیه کردن دو کانول داخل بطن‌های جانبی و یک پیچ در سطح جمجمه با سیمان دندانپزشکی کانول‌ها و پیچ در جای خود محکم شدند.

نحوه تهیه محلول‌ها و روش تزریق

تزریق STZ (خریداری شده از شرکت سیگما آلمان) به صورت محلول در سالین با دوزهای ۲، ۳، ۴، ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت تک تزریق[19] و یا به صورت دوبار تزریق[20] (تزریق‌ها روز اول و سوم، در هربار نصف دوز ذکر شده) انجام شد. محلول STZ بلافاصله پیش از تزریق آماده می‌شد. تزریق توسط سوزن دندانپزشکی شماره ۳۲[21]و لوله پلی‌اتیلن و توسط سرنگ همیلتون ۵ میکرولیتری صورت گرفت. حجم تزریق در هر بطن ۴ میکرولیتر بود. تزریق به آرامی و ظرف مدت ۵ دقیقه صورت می گرفت. تمامی موش‌ها پس از جراحی استریوتاکسی به مدت ۱۳ روز جهت ریکاوری و تا زمان شروع تست به حیوانخانه منتقل می‌شدند.

بررسی حافظه فضایی با استفاده از آزمون رفتاری ماز آبی موریس[22]

این تست رفتاری طبق پروتکل ۴ روزه انجام شد [۱۱]. ماز آبی موریس ما یک مخزن استوانه‌ای سیاه رنگ با قطر ۱/۵ متر و ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر بود که تا ارتفاع حدود ۰/۵ متر آب پر شده بود. به منظور تسهیل موقعیت یابی سکو توسط حیوان، شکل های هندسی ساده در دیوار چهار طرف تانک قرار داشت. این تست در محیط نسبتا تاریک و بدون تغییر در شرایط بصری اتاق طی ۴ روز انجام گرفت. در سه روز اول یک سکوی غیر قابل رویت در ربع جنوب غربی تانک، حدود ۱/۵ سانتی‌متر زیر سطح آب قرار می‌گرفت و جایگاه آن در طول این سه روز ثابت می‌ماند. هر روز آموزش متشکل از ۴ کارآزمایی بود و در هر

[18] Stereotactic

[19] single dose
[20] *double dose*
[21] 23-gauge
[22] Morris Water Maze

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

کارآزمایی حیوان به گونه‌ای که صورتش به طرف دیوار تانک باشد، از یکی از چهار منطقه (شمال، جنوب، شرق یا غرب) در آب رها شده و به حیوان اجازه داده شد ۹۰ ثانیه شنا کرده تا سکوی پنهان را بیابد. پس از یافتن سکو به حیوان اجازه داده شد ۲۰ ثانیه روی آن بماند و سپس کارآزمایی بعدی آغاز می‌شد. پس از اتمام ۴ کارآزمایی، حیوان با حوله خشک شده و به قفس بازگردانده می‌شد. در روز چهارم، سکوی پنهان برداشته شده و به حیوان ۶۰ ثانیه زمان داده می‌شد تا در تانک شنا کند و باتوجه به حافظه خود، برای اولین بار به محل سکو برسد. در طول این ۴ روز، کارآزمایی‌ها توسط دوربین، فیلم برداری شده و برای آنالیز از برنامه اتوویژن نسخه ۱۱ استفاده می‌شد. پارامترها ی مهم در این آزمون، میانگین مدت زمان رسیدن به سکو و میانگین سرعت در سه روز متوالی بود که مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین در روز چهارم یا به اصطلاح تست پروب، مدت زمان شنا در ربع هدف، مدت زمان رسیدن به سکو برای اولین بار و تعداد دفعات عبوری حیوان از محل سکو بررسی شد.

جداسازی میتوکندری

میتوکندری‌ها طبق پروتکل شرح داده شده توسط ناوارو[23] استخراج شدند [۱۲]. به‌طورخلاصه، مغز موش‌ها در یک بافر جداسازی میتوکندری هموژنیزه شدند و با دور ۷۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی جمع‌آوری شده و با دور g ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از آن، محلول محتوی میتوکندری جدا شده و در یک محیط حاوی بافر جداسازی نگهداری گردید. غلظت پروتئین نمونه‌ها با روش بردفورد ارزیابی شد [۱۳]. غلظت پروتئین کل میتوکندری ۰/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

سنجش ROS میتوکندری مغز

تولید ROS میتوکندری مغز با استفاده از ۲'، ۷'–دی-کلروفلورسین دی‌استات (DCFH-DA) به عنوان ماده غیر فلورسانس که می‌تواند به آسانی از طریق غشای میتوکندری عبور کند و در حضور اکسیژن فعال تبدیل به دی‌کلروفلورسین (DCF) اکسید شده فلورسانس شود، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. برای این منظور پس از انکوباسیون نمونه‌های میتوکندری جدا شده (۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین) به همراه DCFH-DA در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه ای در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ دقیقه، فلورسانس با استفاده از دستگاه میکرو پلیت‌ریدر چند حالته (Multi-Mode Microplate reader)، (synergy TM HTX) با تحریک ۴۸۵ نانومتر و طول موج انتشار ۵۲۸ نانومتر اندازه گیری شد[۱۴].

رنگ آمیزی قرمز کنگو[24]

پس از اتمام تست ماز آبی موریس، حیوانات با کتامین و زایلازین بیهوش شدند. هر موش ابتدا با ۲۰۰ میلی‌لیتر نرمال-سالین و سپس با ۱۵۰ میلی‌لیتر پارافرمالدهید ۴٪ از راه قلب پرفیوژن شد. در پایان پرفیوژن مغزها خارج شده و به مدت ۱۰ روز در پارافرمالدهید ۴٪ و در یخچال نگه داری شدند تا مراحل فیکس کردن بافت مغز به طور کامل انجام شود [۱۵]. پس از گذشت ۱۰ روز، بافت مغز جهت مراحل آب‌گیری، آغشته‌سازی و قالب‌گیری آماده‌سازی گردید [۱۶]. پس از آماده سازی بافت مغز، مغزها توسط پارافین ذوب شده قالب‌گیری شده و قالب‌ها توسط میکروتوم و در ضخامت ۷ میکرومتر برش زده شد. مقاطع یکسان، جهت مقایسه گروه‌ها بر روی لام‌های پوشیده شده با گلایسین و زرده تخم‌مرغ چسبانده شد.

ارزیابی بافت مغز

به منظور این کار از کیت رنگ‌آمیزی قرمز کنگو شرکت شیمی پژوهش آسیا استفاده گردید و طبق دستورالعمل، لام‌ها رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگ نمایی ۱۰ و ۴۰ میکرومتر تصاویری از قسمت هیپوکمپ نمونه‌ها گرفته شد. به منظور شمارش پلاک‌ها از نرم افزار Image J استفاده شد [۱۷].

آنالیز اطلاعات

جهت آنالیز اطلاعات و رسم نمودارها از نرم‌افزار Graph pad prism 6 استفاده شد. برای مقایسه تاثیر دوز و زمان درآزمون رفتاری مازآبی موریس از آنالیز واریانس دوطرفه و برای مقایسه میزان ROS میتوکندری و شمارش پلاک گروه‌های مختلف، از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی

[23] Navarro

[24] Congo red staining

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

توکی استفاده شد. $p <$ ۰/۰۵ معنی دار محسوب گردید. تعداد نمونه ها در هر گروه ۶ بود.

یافته‌ها

به دلیل نتایج یکسانی که از تزریق دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک تزریق و دو تزریق به دست آمد و هم‌چنین برای جلوگیری از شلوغی نمودار، در گزارش آزمون ماز آبی موریس فقط حالت تک تزریق دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای مقایسه آورده شد.

میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو طی سه روز متوالی

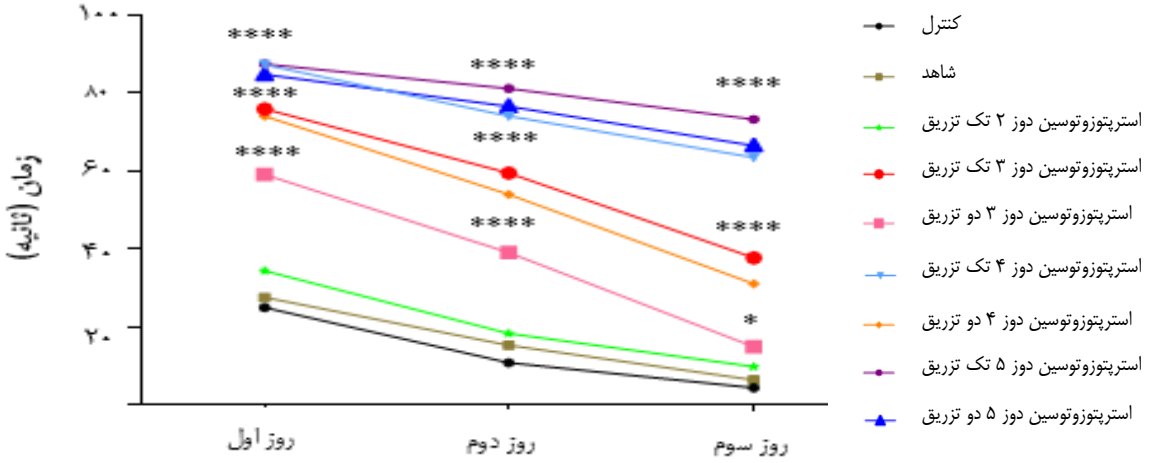
همچنان که نمودار ۱ نشان می‌دهد تفاوت معنی‌دار در میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو طی سه روز متوالی بین گروه‌های کنترل و شاهد وجود ندارد (p = ۰/۷۴، $F_{۲,۲۰}$ = ۰/۲۹)؛ و STZ با دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز نتوانسته تاثیر معنی‌داری بر میانگین زمان سپری شده طی سه روز متوالی داشته باشد (p = ۰/۵۵، $F_{۴,۳۰}$ = ۰/۷۷). این درحالی است که دوزهای ۳ (به صورت تک تزریق)، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (به صورت تک و دو تزریق) استرپتوزوتوسین به‌طور وابسته به دوز توانسته اند بر کاهش یادگیری و حافظه حیوان در طی سه روز (کوتاه مدت) مؤثر باشند (p = ۰/۰۰۰۱، $F_{۲,۷۰}$ = ۳۸۹).

دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم دو بار تزریق در روز سوم بر خلاف سایر نتایج با $p <$ ۰/۰۵ $F_{۱۰,۲۰}$ = ۲/۷۶۷ معنی‌دار بود.

شیب کاهشی نمودارها در طی روزهای آموزش نشان دهنده یادگیری و به‌خاطرآوری حیوان طی روزهای متوالی می‌باشد. همچنان که منحنی‌های مربوط به STZ دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم چه به صورت تک‌تزریق و چه بصورت دوبار تزریق (هر بار ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نشان می‌دهد این دوز سبب آسیب حافظه و یادگیری حیوان می‌گردد ($p <$ ۰/۰۰۰۱، $F_{۲,۲۰}$ = ۷۵/۴۰). نکته جالبی که در منحنی مشاهده می‌شود مقایسه هر یک از دوزها در شرایط تک‌تزریق آن با حالت دوبار تزریق آن می‌باشد. همان‌طور که نمودار ۱ نشان می‌دهد به‌کارگیری تک‌تزریق یک دوز از STZ پاسخ کاهشی بالاتری را در حافظه و یادگیری حیوان در مقایسه نسبت به دوبار تزریق آن دوز از STZ نشان می‌دهد.

توانایی حرکتی حیوان در گروه‌های مختلف طی سه روز متوالی

جهت مقایسه توانایی حرکتی حیوان در گروه‌های مختلف و مشاهده اثر STZ بر آن، میانگین سرعت حیوانات طی سه روز بررسی شد (نمودار ۲). داده ها تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده STZ در دوزهای ۲، ۳، ۴ و۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت تک‌تزریق و دوبار تزریق با گروه‌های شاهد وکنترل نشان نداد که می توان نتیجه گرفت تزریق STZ بر سرعت و قدرت حرکت حیوان اثری نداشته است ($p <$ ۰/۰۹۶، $F_{۸,۴۵}$ = ۰/۳۰۰۸).

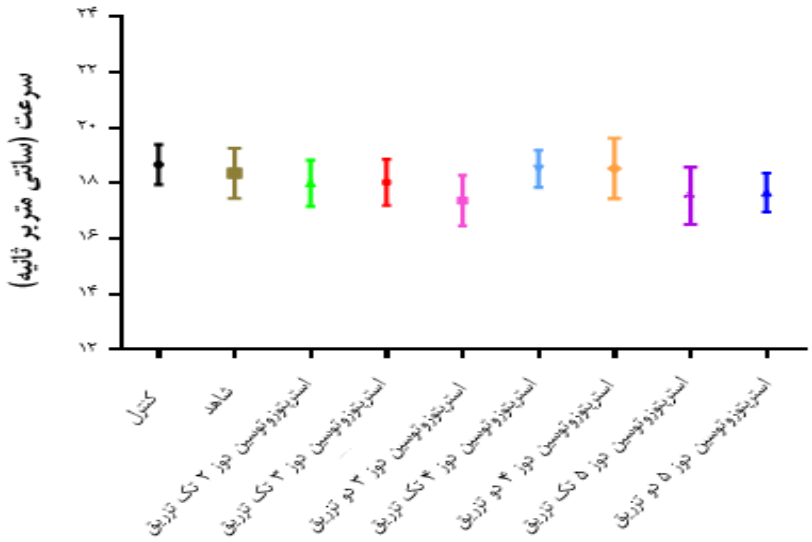


نمودار ۱– مقایسه میانگین زمان رسیدن به سکو طی سه روز متوالی آموزش در گروه‌های مختلف. نقاط نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار از میانگین برای ۶ موش می‌باشند. *: $p <$ ۰/۰۵ و ****: $p <$ ۰/۰۰۰۱ در مقایسه با کنترل و شاهد همان روز. داده ها با آنالیز واریانس دوطرفه آنالیز شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021



نمودار ۲- مقایسه میانگین سرعت شنا طی سه روز متوالی آموزش در گروه‌های مختلف. میانگین سرعت شنای حیوانات دریافت‌کننده دوزهای مختلف استرپتوزوتوسین در مقایسه با گروه کنترل و شاهد اختلاف معناداری نداشت. نقاط نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار از میانگین برای ۶ موش می‌باشند. داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند.

نتایج روز پروب

مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف

ربع دایره هدف ربعی است که سکو در آنجا قرار داشته است. هم‌چنان که نمودار ۳-الف نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین گروه دریافت کننده دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین با گروه‌های کنترل و شاهد وجود ندارد ($F_{۲,۱۵}$ = ۱/۳۵ ،p < ۰/۲۸)، درحالی که مدت زمان سپری شده در ربع هدف توسط دوزهای ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. اثر دوزهای یک بار تزریق نسبت به دوزهای دو بار تزریق به‌طور معنی‌داری متفاوت است به نحوی که یک تزریق منفرد دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به دوبار تزریق آن (هر بار ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با p < ۰/۰۵ معنی‌داری بود. نتایج مشابهی برای به‌کارگیری دوزهای ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز مشاهده شد ($F_{۳,۱۸}$ = ۶۱/۰۹ ،p = ۰/۱۶).

زمان رسیدن به سکو در روز پروب

تاخیر در رسیدن به محل سکو، مدت زمانی است که طول می‌کشید تا حیوان برای اولین بار به محل سکو برسد نتایج مطالعه در نمودار ۳-ب نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین گروه دریافت کننده دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین با گروه‌های کنترل و شاهد وجود ندارد ($F_{۲,۱۵}$ = ۰/۴۲ ،p = ۰/۶۵). در حالی که مدت زمان رسیدن به سکو توسط دوزهای ۳، ۴، و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. اثر دوزهای یک بار تزریق نسبت به دوزهای دو بار تزریق به‌طور معنی‌داری بیشتر است به نحوی که یک تزریق منفرد دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به دو بار تزریق آن (هر بار ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با p < ۰/۰۱ معنی‌داری بود ($F_{۲,۱۵}$ = ۳۵/۹۲ ،p = ۰/۰۰۱۹). همچنین تفاوت معناداری در دفعات تزریق دوز ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد ($F_{۲,۱۵}$ = ۴/۹۲۹ ،p = ۰/۰۲۲۶).

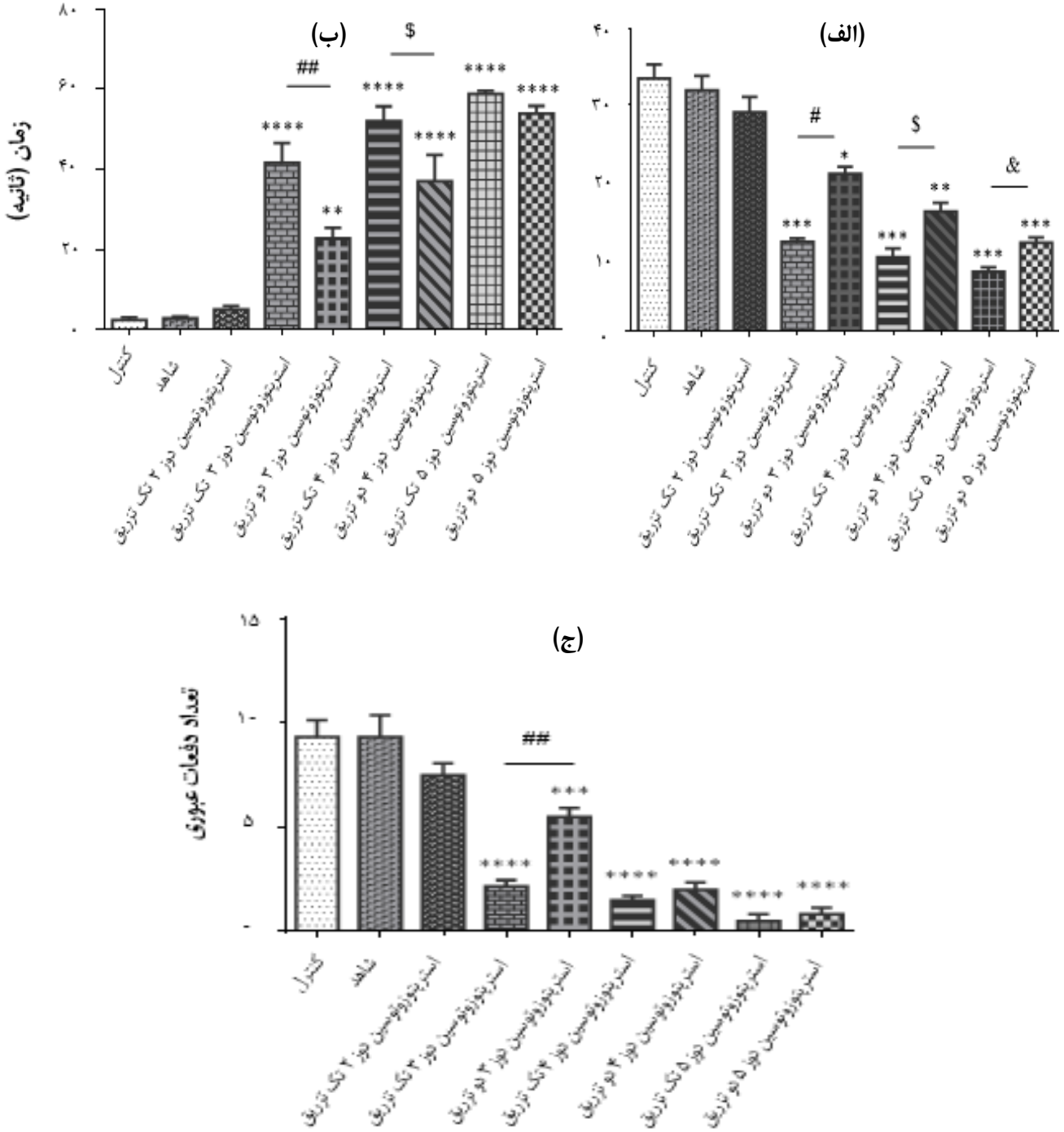
تعداد دفعات عبور حیوان از محل سکو

همان‌طور که نمودار ۳-ج نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری در تعداد دفعات عبور حیوان از محل سکو بین گروه دریافت کننده دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین با گروه‌های کنترل و شاهد وجود ندارد ($F_{۲,۱۵}$ = ۱/۶۲ ،p = ۰/۲۳). درحالی که تعداد دفعات عبور حیوان از محل سکو توسط دوزهای ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. اثر یک‌بار تزریق نسبت به دوبار تزریق دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم (هر بار ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با p < ۰/۰۱ معنی‌دار بود ($F_{۲,۱۵}$ = ۵/۲۷۰).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021



نمودار ۳- نتایج پروب آزمون رفتاری ماز آبی موریس. الف- مدت زمان سپری شده در ربع دایره هدف در پروب. ب- مدت زمان رسیدن به محل سکو در پروب. ج- تعداد دفعات عبور حیوان از محل سکو. هر ستون نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار از میانگین برای ۶ موش می‌باشند. داده ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند. *: $p < ۰/۰۵$ ،**: $p < ۰/۰۱$ ،***: $p < ۰/۰۰۱$ ،****: $p < ۰/۰۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل و شاهد. #: معنی‌دار با $p < ۰/۰۵$ مقایسه بین تک تزریق و دوبار تزریق دوز ۳ میلی‌گرم برکیلوگرم استرپتوزوتوسین. $: معنی‌دار با $p < ۰/۰۵$ مقایسه بین تک تزریق و دوبار تزریق دوز ۴ میلی‌گرم برکیلوگرم استرپتوزوتوسین. & : معنی‌دار با $p < ۰/۰۵$ مقایسه بین تک تزریق و دوبار تزریق دوز ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم استرپتوزوتوسین.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

با توجه به نتایج حاصل از آزمون رفتاری ماز آبی موریس، دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک تزریق را به عنوان کم-ترین دوز مؤثر در مدت ۱۴ روز انتخاب کردیم و ادامه روند تحقیقات شامل اندازه‌گیری ROS میتوکندری و بررسی بافت هیپوکمپ را با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم تک تزریق ادامه دادیم.

میزان تولید ROS میتوکندری

هم چنانکه نمودار ۴ نشان می‌دهد سرعت تولید ROS در گروه استرپتوزوتوسین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و شاهد افزایش یافت ($F_{۳,۲۴}$ = ۴۹/۶۹ ،p < ۰/۰۰۰۱). همچنین گروه کنترل و شاهد اختلاف معناداری نداشتند ($F_{۲,۱۸}$ = ۲/۴۱ ،p < ۰/۱۱).

تعداد پلاک‌های آمیلوئیدبتا در ناحیه هیپوکمپ

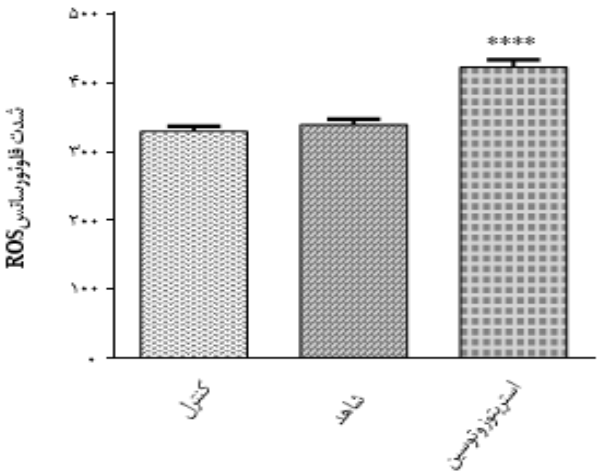
تصویر ۱الف و ۱ب دو مقطع یکسان از ناحیه هیپوکمپ لایه مغزی را نشان می‌دهد. درشکل الف نمونه هیپوکمپ گروه کنترل نشان داده شده که در آن پلاکی مشاهده نمی‌گردد. درشکل ب نمونه یک هیپوکمپ گروه استرپتوزوتوسین ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم یک‌بار تزریق نشان داده شده که تعدادی پلاک آمیلوئیدبتا در آن قابل رویت است. در قسمت ج تعداد پلاک‌های آمیلوئیدبتا رویت شده در ناحیه هیپوکمپ گروه کنترل و گروه STZ در دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم را نشان می دهد و بیانگر افزایش معنی‌دار پلاک‌ها در گروه دریافت کننده STZ می‌باشد ($F_{۲,۱۵}$ = ۹۴/۵۵ ،p < ۰/۰۰۰۱).

بحث

همان‌طور که مشخص شده، آلزایمر با شروع دیررس یا اسپورادیک (sAD) ۹۵ درصد موارد ایجاد بیماری آلزایمر را شامل می‌شود و تشکیل یک مدل مناسب برای فازهای اولیه بیماری آلزایمر اسپورادیک قدم اولیه در شناسایی مکانیسم‌های درگیر در پاتولوژی بیماری و یافتن راه درمان می‌باشد [۴, ۵].
مدل های حیوانی متعددی طراحی شده‌اند که در میان آن‌ها تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین (icv-STZ) مدلی مناسب برای بررسی مکانیسم پیشرفت بیماری آلزایمر اسپورادیک می باشد [۱۳, ۱۴]. به کارگیری icv-STZ در مغز جوندگان به طور مداوم در جذب گلوکز مغزی اختلال ایجاد می‌کند و ویژگی‌های مولکولی و پاتولوژیک sAD را تولید می‌نماید [۱۸]. این مدل برای آزمایش رویکردهای درمانی جدید برای درمان sAD بسیار مهم است.

مطالعات مبتنی بر icv-STZ، بازه زمانی گسترده‌ای پس از تزریق icv-STZ را به عنوان زمان بررسی علائم و تظاهرات بالینی آن ارائه داده‌اند [۱۹] . بر اساس زمینه تحقیقاتی ما که مکانیسم‌های سلولی و مولکولی اولیه بیماری آلزایمر در طی ۱۴ روز پس از القا آلزایمر در نظر گرفته شده است، ضرورتا باید به دنبال دوز و تعداد تزریق مناسب icv-STZ برای القای کاهش شناختی به عنوان یکی از ویژگی‌های sAD در این بازه زمانی باشیم.

تاکنون اثرات رفتاری، مولکولی و نوروپاتولوژیک در تحقیقات، تا ۱۵ هفته پس از تزریق دوزهای مختلف icv-STZ مورد بررسی قرار گرفته‌است. به طور مثال، اثرات سه دوز مجزا icv-STZ (۰/۵، ۱ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در سه بازه زمانی پس از تزریق، از جمله کوتاه مدت (۳–۵ هفته)، میان مدت (۹–۱۱ هفته) و اثرات طولانی مدت (۱۳–۱۵ هفته) مقایسه شده است. داده‌های جمع‌آوری شده نشان داد که اختلالات شناختی icv-STZ وابسته به دوز و مدت زمان سپری شده پس از تزریق است؛ به نحوی که دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم icv-STZ، ۲/۵ ماه پس از تزریق باعث اختلال در حافظه فضایی در آزمون ماز آبی موریس شد [۸]. درحالی‌که نتایج ما

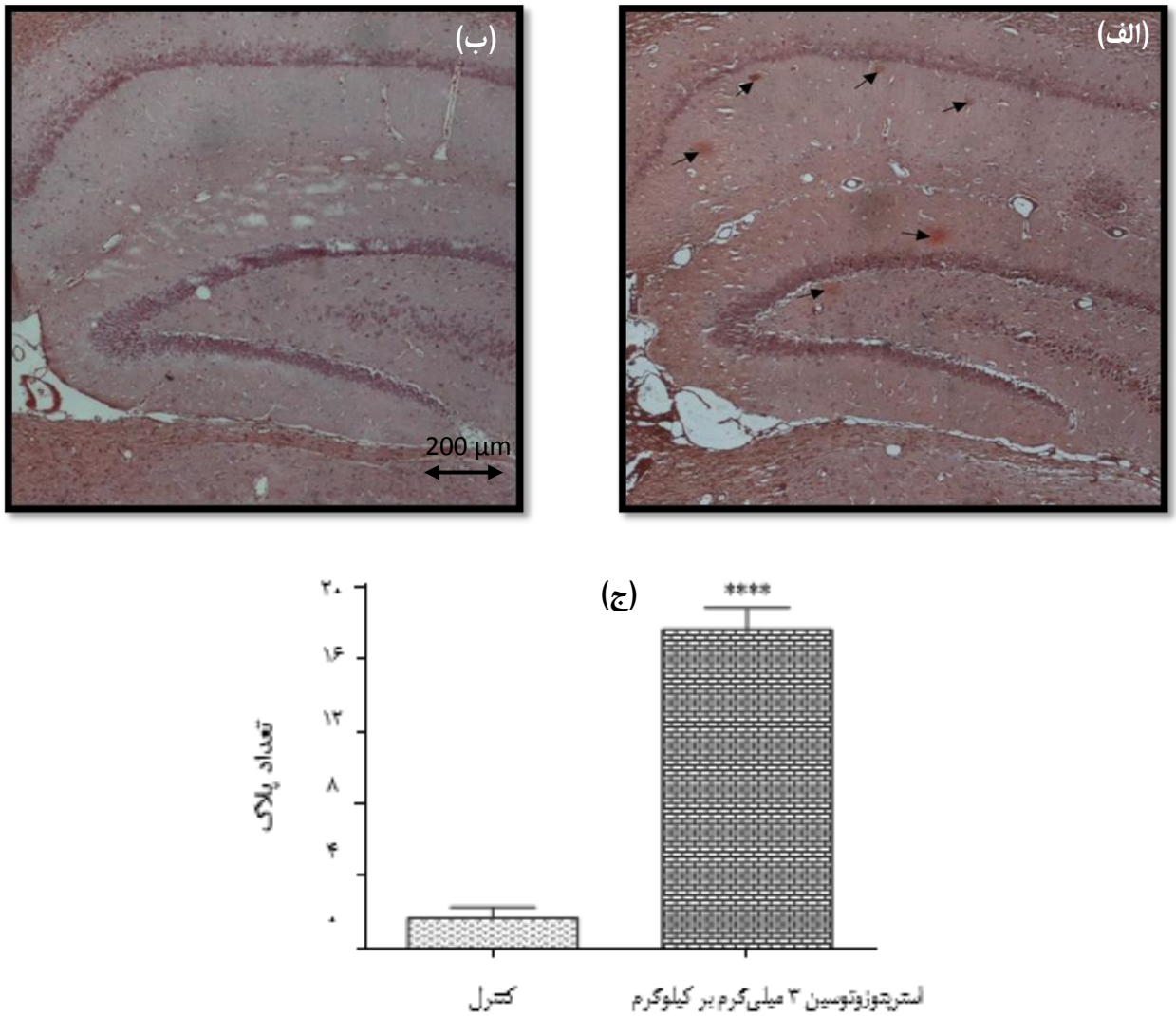


نمودار ٤– میزان تولید ROS (گونه های فعال اکسیژن) میتوکندری مغز پس از تزریق استرپتوزوتوسین ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم. هر ستون نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار از میانگین برای ۶ موش می‌باشند. داده ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند.****: p <۰/۰۰۰۱ در مقایسه با کنترل و شاهد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021



تصویر ۱- تعداد پلاک آمیلوئیدبتا پس از تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین. الف و ب. تصویر برشی از ناحیه هیپوکمپ رنگ‌آمیزی شده با قرمز کنگو. پیکان‌های سیاه رنگ محل پلاک‌ها را نشان می‌دهند. الف: کنترل، ب: استرپتوزوتوسین، ج: نمودار مقایسه تعداد پلاک آمیلوئیدبتا در گروه‌های تیمار. ****: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۰۱$. هر ستون نمایانگر میانگین ± انحراف معیار از میانگین و ۶ موش در هر گروه می‌باشد. داده‌ها توسط آنایز واریانس یک‌طرفه آنالیز شد. مقیاس خطی (Scale bar) ۲۰۰ میکرومتر. گروه کنترل (شکل الف) و گروه استرپتوزوتوسین ۳ میلی‌گرم برکیلوگرم (شکل ب) با بزرگنمایی ۴۰×.

نشان می‌دهدکه تزریق icv-STZ یادگیری فضایی و حافظه موش را به صورت وابسته به دوز در مدت مطالعه ۱۴ روز (۲ هفته) کاهش می‌دهد. در این راستا، مطالعه حاضر نشان داد که سه دوز مشخص از icv-STZ (۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اما نه ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر رفتارهای شناختی حیوان تأثیر می‌گذارد که ما دوز حداقل و پایه را برای ادامه روند تحقیقات انتخاب کردیم.

در مورد علت انتخاب مدت زمان ۱۴ روزه میتوان گفت که در مطالعات پیش زمینه‌ای که انجام گرفت، دوز های ذکر شده را در مدت یک هفته‌ای به کار گرفتیم و هیچ گونه تغییری در حافظه و یادگیری حیوان مشاهده نشد که نتیجه گرفتیم بازه زمانی یک هفته برای بررسی اثرات بالینی استرپتوزوتوسین مناسب نبود.

دهقان و همکارانش که بر خلاف روش تزریقی آزمایش‌های ما دوزهای مختلف STZ را به صورت محلول در aCSF به کار برده بوده اند، نتایج مشابهی از تست رفتاری گرفتند به طوری که تزریق STZ دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم در آزمون ماز آبی موریس موجب اختلال حافظه و یادگیری

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

حیوان شد. آن‌ها همچنین مشاهده نمودند که هایپرفسفریلاسیون پروتئین های تاو در مناطق خاصی از هیپوکمپ اتفاق میفتد. این نتایج در راستای نتایج حاصل از مشاهدات تحقیقات ما بوده و با رویت پلاک های آمیلوئیدبتا در این نواحی هم‌خوانی دارد [۹].

برخی مطالعات نشان داده‌اند که icv-STZ دوز ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم (دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم که دوبار در روز اول و روز سوم تزریق می‌شود) باعث آتروفی شدید ناحیه اطراف بطن‌های جانبی پس از ۲۱ روز شده و ضایعات به صورت خلفی تا شکنج دندانه دار ادامه می‌یابد [۷] . در مطالعه حاضر نیز، مشاهده کردیم که icv-STZ دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک‌تزریق و دوبار تزریق (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم که در روز اول و روز سوم تزریق می‌شد) باعث اختلال شدید در یادگیری و حافظهپس از ۱۴ روز (۲ هفته) می‌شود. بدیهی است که دوز های بالاتر چه به صورت تک تزریق و یا دو تزریق در بازه زمانی دو هفته‌ای مؤثر خواهند بود و نتایج مشابهی انتظار می‌رود. ماز آبی موریس یک آزمون حافظه وابسته به هیپوکمپ است. در حقیقت، مطالعات نشان داده است که نوروژنز هیپوکمپ بزرگسالان نقش مهمی در حافظه فضایی طولانی مدت دارد و مهار نوروژنز بزرگسالان اختلالات رفتاری ایجاد می‌کند که منجر به اختلال در یادگیری و حافظه می‌شود [۲۰]. در این زمینه رستمی و همکاران ثابت کردند که تزریق استرپتوزوتوسین ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند ۹ ماه پس از تزریق باعث رسوب آمیلوئیدبتا هیپوکمپ شود. علاوه براین، تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی مغز نشان می‌دهد که تزریق STZ در مغز پس از ۳ هفته باعث بیان بیش از حد پروتئین تاو و آمیلوئیدبتا در هر دو قسمت قشر مغز و هیپوکمپ می‌شود [۸]. برای اولین بار، ما افزایش رسوب آمیلوئیدبتا هیپوکمپ را دو هفته پس از تزریق icv-STZ دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده کردیم. بنابر این، یافته مطالعه حاضر، ۲ هفته پس از تزریق STZ در دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک تزریق را به عنوان دوز و زمان مناسب برای بررسی مرحله اولیه اختلال شناختی sAD پیشنهاد می‌نماید که همزمان با اختلالات رفتاری شاهد افزایش ROS میتوکندری مغز و پیدایش پلاک های آمیلوئیدبتا خواهیم بود. شواهد حاکی از وجود برخی علائم عصبی–روانپزشکی غیرشناختی در بیماران مبتلا به sAD است. علی‌رغم مطالعاتی که ادعا می‌شود icv-STZ فعالیت حرکتی حیوان را افزایش می‌دهد [۲۱]، مطالعه حاضر و شواهد دیگران نشان می‌دهد که حیوانات تحت القا icv-STZ دارای فعالیت حرکتی طبیعی هستند [۲۲].

یافته دیگر مطالعه حاضر این بود که جهت ایجاد اختلال شناختی در طی ۱۴ روز، روش تک‌تزریق icv-STZ در دوزهای ۳ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری مؤثرتر از دوبار تزریق آن در همان دوز و همان مدت زمان است. در یک مطالعه توتا[25] و همکاران گزارش داده‌اند که ۲۱ روز پس از دو بار تزریق دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم icv-STZ ، حافظه فضایی موش دست نخورده باقی مانده و دچار اختلال نشده است [۱۳]. رستمی و همکاران همان اثر را با تک تزریق ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم icv-STZ مشاهده کرده و عنوان کردند دو تزریق ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، همان اثر تک تزریق ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم icv-STZ را دارد. این در حالی است که نتایج ما روش تک تزریق icv-STZ به‌طور معنی‌داری اختلال شناختی شدیدتری را در مقایسه با دو بار تزریق دارو نشان می‌دهد. همچنین با توجه به نتایج مطالعه حاضر و بررسی سایر مقالات [۱, ۷] میزان تولید ROS میتوکندری در اثر استرس اکسیداتیو و پاسخ سلولی افزایش یافته است که دلیل دیگری بر شروع فرآیند آلزایمر در مغز است.

در حال حاضر، ما توضیح روشنی نداریم که چرا افزایش دفعات تزریق یک دوز باعث اختلال کمتری در رفتار شناختی می شود. شاید میزان التهابی که به‌دنبال میزان بالاتر دارو در تک تزریق صورت می‌گیرد شدید تر از میزان التهاب آن در همان دوز اما تقسیم شده در دو مرحله از تزریق باشد. این تئوری نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

اما اینکه مکانیزم احتمالی icv-STZ در ایجاد اختلال شناختی چگونه است، به عنوان یک مکانیسم احتمالی پیشنهاد می‌شود که تزریق icv-STZ احتمالاً می‌تواند مقاومت به انسولین مرکزی را القا کند، با این حال این مکانیسم هنوز توسط داده های تجربی پشتیبانی نشده است. همچنین با توجه به افزایش تولید ROS، استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی متعاقب آن که منجربه مرگ نورونی می‌شود. دومین مکانیسم پیشنهادی محل تزری‌ق است که icv-STZ می‌باشد. در این رابطه نشان داده شده است تجویز (STZ دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در

[25] Tota

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

جوندگان منجر به افزایش کلی پروتئین تاو و آمیلوئیدبتا در مغز می‌شود که آن نیز به نوبه خود روند التهابی و تشکیل رادیکال های آزاد را افزایش می‌دهد [۲۳].

به طور خلاصه، با وجود گذشت بیش از دو دهه از معرفی مدل icv-STZ ، پیشرفت بیماری با دوزهای پیشنهاد شده STZ و بازه های زمانی تحقیق به درستی تقلید نشده است. در این‌جا، ما شواهدی ارائه نمودیم که STZ با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت تک تزریق و در بازه زمانی ۲ هفته می تواند یک دوز مناسب برای بررسی اختلالات شناختی اولیه بر طبق مشاهدات بالینی sAD، یعنی مراحل ابتدائی آلزایمر باشد. بنابراین، این قبیل مطالعات می‌تواند برای ارزیابی تأثیرات بالقوه عوامل مختلف ذاتی یا خارجی در توسعه دانش ما و همچنین پیشگیری از علائم شناختی sAD مفید باشد. این مشاهدات یک یافته اولیه بوده و برای تأیید این یافته ها به مطالعات بیشتری نیاز است.

نتیجه‌گیری

تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت تک تزریق در کوتاه ترین زمان ممکن (دو هفته) توانست موجب کاهش حافظه فضایی، افزایش تولید ROS میتوکندری و تشکیل پلاک های آمیلوئیدبتا در بافت هیپوکمپ شود و علائم اولیه آلزایمر بروز پیدا کند. می‌توان نتیجه گرفت که هم‌زمان با تغییرات رفتاری که مشهود است، تغییراتی نیز در سطح های مولکولی و بافتی دچار شکل‌گیری بوده چه بسا تغییرات مربوط به بافت و ارگانل ها زودتر از علائم بالینی آغاز شده باشد.

ملاحظات مالی

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد. از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بابت تامین تجهیزات و هزینه مالی قدردانی می‌گردد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

م.ا: انجام مطالعه، نگارش مقاله، طراحی و آنالیز آماری؛ ا.ا: نظارت بر حسن اجرای مقاله؛ ر.ق: نظارت بر اجرا و آنالیز آماری تست های رفتاری؛ ج.ف.ب: همکاری و نظارت بر اجرا و آنالیز بافتی و استخراج میتوکندری.

فهرست منابع

[1] Weerateerangkull P, Praputpittaya C,Banjerdpongchai R, Effects of Ascorbic acid on streptozotocin-induced oxidative stress and memory impairment in rats. ***Thai J Physiol Sci*** 20 (2008) 54-61.

[2] Correia SC, Santos RX, Santos MS, Casadesus G, LaManna JC, Perry G, Smith MA,I Moreira P, Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. ***Curr Alzheimer Res*** 10 (2013) 406-419.

[3] Piaceri I, Nacmias B,Sorbi S, Genetics of familial and sporadic Alzheimer’s disease. ***Front Biosci (Elite Ed)*** 5 (2013) 167-177.

[4] Hoyer S, Lee SK, Löffler T,Schliebs R, Inhibition of the neuronal insulin receptor An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? ***Ann N Y Acad Sci*** 920 (2000) 256-258.

[5] Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S,Riederer P, What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer’s disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer’s research. ***J Neural transm (Vienna)*** 120 (2013) 233-252.

[6] Shi L, Zhang Z, Li L,Hölscher C, A novel dual GLP-1/GIP receptor agonist alleviates cognitive decline by re-sensitizing insulin signaling in the Alzheimer icv. STZ rat model. ***Behav Brain Res*** 327 (2017) 65-74.

[7] Mishra SK, Singh S, Shukla S,Shukla R, Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. ***Neurochem Int*** 113 (2018) 56-68.

[8] Rostami F, Javan M, Moghimi A, Haddad-Mashadrizeh A, Fereidoni M, Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. ***Life Sci*** 188 (2017) 172-185.

[9] Dehghan-Shasaltaneh M, Naghdi N, Choopani S, Alizadeh L, Bolouri B, Masoudi-Nejad A,Riazi GH, Determination of the best concentration of streptozotocin to create a diabetic brain using histological techniques. ***J Mol Neurosci*** 59 (2016) 24-35.

[10] Paxinos G, Watson C. The Rat brain in stereotaxic

www.SID.ir

Archive of SID

coordinates 6th edition. Academic press. 2007.
[11] Iloun P, Abbasnejad Z, Janahmadi M, Ahmadiani A,Ghasemi R, Investigating the role of P38, JNK and ERK in LPS induced hippocampal insulin resistance and spatial memory impairment: effects of insulin treatment. ***EXCLI J*** 17 (2018) 825.
[12] Navarro A, Torrejón R, Bández MJ, López-Cepero JM, Boveris A, Mitochondrial function and mitochondria-induced apoptosis in an overstimulated rat ovarian cycle. ***Am J Physiol Endocrinol Metabol*** 289 (2005) E1101-E1109.
[13] Tota S, Awasthi H, Kamat PK, Nath C,Hanif K, Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. ***Behav Brain Res*** 209 (2010) 73-79.
[14] Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N,Chattipakorn SC, Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. ***Life sci*** 91 (2012) 409-414.
[15] Gage GJ, Kipke DR,Shain W, Whole animal perfusion fixation for rodents. ***J Vis Exp*** 65 (2012) 3564.
[16] Naderi Y, Parvardeh S, Zanjani TM, Sabetkasaei M, Neuroprotective effect of paroxetine on memory deficit induced by cerebral ischemia after transient bilateral occlusion of common carotid arteries in rat. ***Iran J Pharm Res*** 17 (2018) 215-224.
[17] Han J, Oh J-P, Yoo M, Cui C-H, Jeon B-M, Kim S-C,Han J-H, Minor ginsenoside F1 improves memory in Ba. APP/PS1 mice. ***Mol Brain*** 12 (2019) 77.
[18] Labak M, Foniok T, Kirk D, Rushforth D, Tomanek B, Jasiński A,Grieb P. Metabolic changes in rat brain following intracerebroventricular injections of streptozotocin: a model of sporadic Alzheimer's disease. In: Czernicki Z, Baethmann A, Ito U, Katayama Y, Kuroiwa T, Mendelow D. Eds, Brain Edema XIV. Springer, 2009: 177-181.
[19] Barilar JO, Knezovic A, Perhoc AB, Homolak J, Riederer P, Salkovic-Petrisic M, Shared cerebral metabolic pathology in non-transgenic animal models of Alzheimer's and Parkinson's disease. ***J Neural Transm*** 127 (2020) 231-250.
[20] Cameron HA, Glover LR, Adult Neurogenesis: Beyond Learning and Memory. ***Ann Rev Psychol*** 66 (2015) 53-81.
[21] Chen Y, Guo Z, Mao Y-F, Zheng T, Zhang B, Intranasal insulin ameliorates cerebral hypometabolism, neuronal loss, and astrogliosis in streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. ***Neurotox Res*** 33 (2018) 716-724.
[22] Gutierres JM, Carvalho FB, Schetinger MRC, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, Rubin MA, Schmatz R, da Silva CR,Cognato GdP, Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. ***Life Sci*** 96 (2014) 7-17.
[23] Bluchnejadmojarad T, Roghani M, Effect of naringenin on intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in rat: a behavioral analysis. ***Pharmacology*** 78 (2006) 193-197.

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 12:35 +0330 on Saturday October 23rd 2021

Research paper

Effect of intracerebroventricular injection of streptozotocin on memory, reactive oxygen species of brain mitochondria, and β-amyloid plaques in rat hippocampus

Mozhdeh Anjomani[1], Afsaneh Eliassi[1,2,*], Rasoul Ghasemi[1], Javad Fahanik-Babaei[2,3]

1. *Department of physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
2. *Neurophysiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
3. *Electrophysiology Research Center, Neuroscience Research Institute (Neurological Rehabilitation), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 4 April 2021 Accepted: 27 June 2021

Abstract

Background and aims: Alzheimer's disease (AD), is the most common neurodegenerative disease that is associated with cognitive and behavioral disorders and the rapidly increasing prevalence. In addition to its detrimental effects on learning and memory, AD affects the mitochondria as a vital organ of the cell as well as the hippocampal tissue that is the site of learning and memory. In this study, we investigated the concomitant effects of streptozotocin (STZ) on spatial memory, mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS), and hippocampal β-amyloid plaques in rats.

Methods: Animals were randomly divided into control, sham and STZ groups receiving streptozotocin 2, 3, 4 and 5 mg/kg through intracerebroventriclular (icv) injection. Learning and memory of rats was examined 14 days later by Morris Water Maze (MWM) test. Moreover, mitochondrial ROS in the brain and β-amyloid plaques in the hippocampus were evaluated.

Results: STZ 3 mg/kg (single dose, icv) was found the effective dose for impairing learning memory in the shortest possible time (14 days). Using Congo red staining, a number of amyloid beta plaques were observed in the hippocampus. Mitochondrial ROS production also increased by this dose of STZ.

Conclusion: Behavioral, biochemical, and histological findings of the present study suggest STZ 3 mg/kg icv injection to rats as one of the acceptable animal models of AD.

Keywords: Alzheimer, Streptozotocin, Memory, Reactive oxygen species, Congo Red, Mitochondria

Please cite this article as follows:

Anjomani M, Eliassi A, Ghasemi R, Fahanik-Babaei J, Effect of intracerebroventricular injection of streptozotocin on memory, reactive oxygen species of brain mitochondria, and β-amyloid plaques in rat hippocampus. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 4 (2020) 118-130.

*Corresponding author: af.eliassi@sbmu.ac.ir, afseliassi@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-4899-3430)

www.SID.ir