

Evaluation of Spatial Memory Impairment after Intracerebroventricular Streptozocin Injection in Adult Rats

Elham Mohammadzadeh^{1,2}, Fatemeh Alipour^{1*}, Behzad Khallaghi¹

¹ Shefa Neuroscience Research Center, Khatam-al-Anbia Hospital, Tehran, Iran.

² Anatomical and Biological Science Department, Medical Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Article Info:

Received: 13 Dec, 2013

Accepted: 19 Jan, 2014

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's disease (AD), the most common cause of dementia among older people, gradually destroys memory and learning skills, and eventually the ability to carry out all tasks. In most people with AD, symptoms first appear after age 60. **Materials and Methods:** The experiments were carried out in adult (6-7 months old) male Wistar rats (230-270 g) in 3 groups of control, sham and Streptozocin (STZ). Animals in sham and STZ groups received normal saline and STZ intraventricular injections for two days, respectively. To assess spatial memory 8, 18, 30, 45, 70, 90 days after STZ injection, passive avoidance test was performed. **Results:** The mean retention latency decreased in STZ groups compared to control and sham groups. According to our findings, the most serious short-term and long-term memory loss was observed 90 days after STZ injection. The long-term memory destroyed earlier than short-term memory in STZ treatment rats. **Conclusion:** STZ injection in rats was resulted in significant time-dependent damages of cognitive abilities.

Key words:

1. Cognition
2. Memory
3. Rats
4. Streptozocin

* **Corresponding Author:** Fatemeh Alipour

E-mail: Fatemealipoor65@yahoo.com

بررسی اختلال حافظه ی فضایی بعد از تزریق درون بطنی استرپتوزوسین در موش های صحرایی بالغ

الهام محمدزاده^{۱،۲}، فاطمه علی پور^۳، بهزاد خلای^۱^۱ مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران.
^۲ گروه آناتومی و علوم زیستی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۲۹ دی ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۲۲ آذر ۱۳۹۲

چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر رایج ترین شکل دمانس در بین افراد مسن می باشد که به تدریج باعث نقص در حافظه و مهارت فکر کردن و در نهایت عدم توانایی در انجام ساده ترین کارها می شود. اولین نشانه های بیماری آلزایمر در اکثر افراد مبتلا بعد از سن ۶۰ سالگی دیده می شود. **مواد و روش ها:** آزمایشات روی موش های صحرایی نر ویستار (۶-۷ ماهه) با وزن ۲۷۰-۲۳۰ گرم در سه گروه کنترل، شم و استرپتوزوسین انجام گرفت. حیوانات در گروه های شم و استرپتوزوسین، به ترتیب نرمال سالین و استرپتوزوسین را به مدت دو روز به صورت تزریق داخل بطنی دریافت نمودند. برای سنجش حافظه ی فضایی رت ها ۸، ۱۸، ۳۰، ۴۵، ۷۰ و ۹۰ روز بعد از اولین تزریق، آزمون اجتنابی غیر فعال از گروه های مختلف گرفته شد. **یافته ها:** میانگین زمان تأخیر در گروه آلزایمر نسبت به گروه کنترل و شم کاهش یافته است. بر طبق یافته های ما موش های صحرایی ۹۰ روز بعد از تزریق استرپتوزوسین دچار بیشترین آسیب در حافظه ی کوتاه مدت و طولانی مدت شدند. حافظه ی طولانی مدت در موش های صحرایی تیمار شده با استرپتوزوسین سریعتر از حافظه ی کوتاه مدت دچار آسیب گردید. **نتیجه گیری:** تزریق استرپتوزوسین در موش های صحرایی به طور چشمگیری باعث آسیب توانایی شناختی آن ها به صورت وابسته به زمان می گردد.

کلید واژه:

۱. شناخت
۲. حافظه
۳. موش صحرایی
۴. استرپتوزوسین

* نویسنده مسئول: فاطمه علی پور

آدرس الکترونیکی: Fatmealipoor65@yahoo.com

مقدمه

تهیه شدند، انجام گردید. حیوانات در اتاقی با دمای $22 \pm 2^\circ \text{C}$ با سیکل ۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی و آب و غذای آزادانه نگهداری شدند. همه ی آزمایشات رفتاری بین ساعت ۸ صبح تا ۴ عصر انجام شد. همه ی آزمایشات بر طبق دستورالعمل های کمیته ی اخلاقی برای استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا انجام شد.

جراحی توسط استریوتاکس

حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (80 mg/Kg) و زایلازین (15 mg/Kg) بیهوش شدند. سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت شد و با ایجاد شکاف طولی در بخش خلفی سر، مجسمه نمایان گردید سپس کانول های مخصوص تزریق در داخل بطن های طرفی در موقعیت 0.8 عقب برگما، $1.5 \pm$ در طرفین شکاف ساجیتال و 2.5 میلی متر پایین تر از سطح مجسمه قرار داده شدند (18). بعد از جراحی استریوتاکس و کانول گذاری، حیوانات در قفس هایشان به مدت ۶ روز به منظور بهبودی نگهداری شدند.

روش کار آزمایشگاهی

حیوانات به سه گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، شم و STZ. حیوانات گروه های کنترل هیچگونه مداخله ای صورت نگرفت. حیوانات در گروه های شم و STZ، به ترتیب نرمال سالین و STZ را به مدت دو روز به صورت تزریق داخل بطنی دریافت نمودند و سپس ۸، ۱۸، ۳۰، ۴۵، ۷۰ و ۹۰ روز بعد از اولین تزریق تست شاتل باکس از آن ها گرفته شد.

آزمون رفتاری یادگیری اجتنابی غیر فعال (Passive)

(Avoidance Learning Test)

۶ و ۷ روز قبل از رسیدن به زمان مورد نظر، رت ها تحت مطالعه ی یادگیری اجتنابی غیر فعال قرار گرفتند. Shuttle Box شامل دو اتاقک تاریک و روشن است که توسط درب کشویی از هم جدا می شوند. در روز اول که شامل مرحله ی سازگاری^۱ و یادگیری^۲ می باشد هر رت در اتاقک روشن در حالی که پشتش به سمت درب کشویی است به مدت ۳ دقیقه قرار داده شد تا به دستگاه عادت کند. به منظور مرحله ی یادگیری، ۱۰ ثانیه بعد از قرار دادن رت در اتاق روشن درب کشویی بالا کشیده شد. بعد از ورود رت به اتاق تاریک، درب بسته شد و شوک الکتریکی (۱ میلی آمپر، ۵۰ هرتز) به مدت ۱ ثانیه به کف پای حیوان اعمال گردید. ۲۰ ثانیه بعد، رت از اتاقک خارج گردید. این تمرین ادامه داده شد تا جایی که رت در بخش روشن به مدت ۳۰۰ ثانیه باقی ماند. به منظور ارزیابی حافظه، ۲۴ ساعت و ۱۶۸ ساعت بعد از دریافت شوک الکتریکی، حیوان دوباره در داخل اتاق روشن قرار داده شد و دریچه ی کشویی باز گردید ولی شوک الکتریکی اعمال نگردید و زمان تأخیر اولیه برای ورود به اتاق تاریک (Step through latency) تا ۳۰۰ ثانیه ثبت گردید.

بیماری آلزایمر^۱ (AD)، یک بیماری تخریب کننده ی نورونی شایع، رایج ترین شکل دمانس است که توسط فقدان حافظه ی پیشرونده مشخص می گردد (۱، ۲). چندین فاکتور محیطی و ژنتیکی در AD نقش دارند؛ بیش از ۹۵٪ بیماران مبتلا به AD سن بیشتر از ۶۵ سال دارند و از طریق فاکتورهای محیطی مبتلا شده اند (۳). AD توسط فاکتورهای مختلفی از جمله فلزات سنگین (۴-۶)، سن، جنس، مصرف الکل و سیگار، افسردگی، تغذیه (۷)، تروما (۸) و کلسترول (۹، ۱۰) ایجاد می گردد.

کاهش نورون ها در مناطق مربوط به یادگیری و حافظه، به خصوص در ناحیه ی هیپوکمپ یکی از علائم مشاهده شده در AD است (۱۱). هیپوکمپ در کف بطن طرفی در لوب تمپورال مغز قرار دارد و قشرهای مربوط به آن نقش مهمی در انتقال اطلاعات از حافظه ی کوتاه مدت به حافظه ی دائمی دارند. همچنین هیپوکمپ در حفظ حافظه بعد از یک دوره تثبیت نقش به سزایی دارد (۱۲). مشخص گردیده است که نوع تک گیر (Sporadic) بیماری آلزایمر همراه با اختلالات یادگیری و حافظه، آسیب پیشرونده ی شدیدی را در متابولیسم گلوکز و انرژی مغز ایجاد می نماید. با توجه به اینکه گلوکز تأمین کننده ی اصلی انرژی بیولوژیک جهت فعالیت های متابولیک در سیستم اعصاب مرکزی است، هرگونه اختلالی در متابولیسم انرژی و گلوکز همراه با آسیب فرآیندهای شناختی و حافظه ای می باشد (۱۳). از سوی دیگر، انسولین دارای اثرات بسیاری روی عملکردهای مغز، از جمله یادگیری و حافظه می باشد (۱۴).

در واقع رابطه ی نزدیکی بین بیماری آلزایمر و مقاومت به انسولین وجود دارد و عدم حساسیت گیرنده های انسولین در این بیماری، یک مکانیسم احتمالی برای مختل شدن عملکرد نوروترانسمیترها و آسیب ساختاری مناطق مرتبط با یادگیری و حافظه است (۱۴). تزریق داروی استرپتوزوسین^۲ (STZ) به عنوان یک آنتاگونیست رسپتور انسولین، به داخل بطن های جانبی مغز رت ها یک تعدادی از جنبه های مختلف تخریب نورونی AD را ایجاد می کند (۱۵). حیوانات در معرض قرار گرفته با STZ، مقاومت به انسولین در مغز و ویژگی های اختصاصی AD تک گیر را نشان می دهند (۱۶). همچنین شباهت هایی بین AD در انسان و مدل STZ، در آسیب نورونی، کاهش حجم هیپوکمپ، التهاب نورونی و نقص پیشرونده ی حافظه و یادگیری وجود دارد (۱۷). اگرچه تحقیقات مختلفی روی مطالعات رفتاری AD انجام شده است ولی هیچ ارزیابی به صورت time-course بر روی این مدل صورت نگرفته است. از آنجایی که تغییرات رفتاری در مراحل مختلف AD یک نقش اساسی را در تشخیص صحیح آن و انتخاب زمان مناسب برای درمان بازی می کند، این تحقیق به منظور مطالعه ی time-course تغییرات رفتاری در مدل STZ انجام شد.

مواد و روش ها

آزمایشات روی رت های نر و بیستار بالغ (۶-۷ ماهه) با وزن ۲۷۰-۲۳۰ گرم که از خانه ی حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا

.....
1 Alzheimer Disease

2 Streptozocin

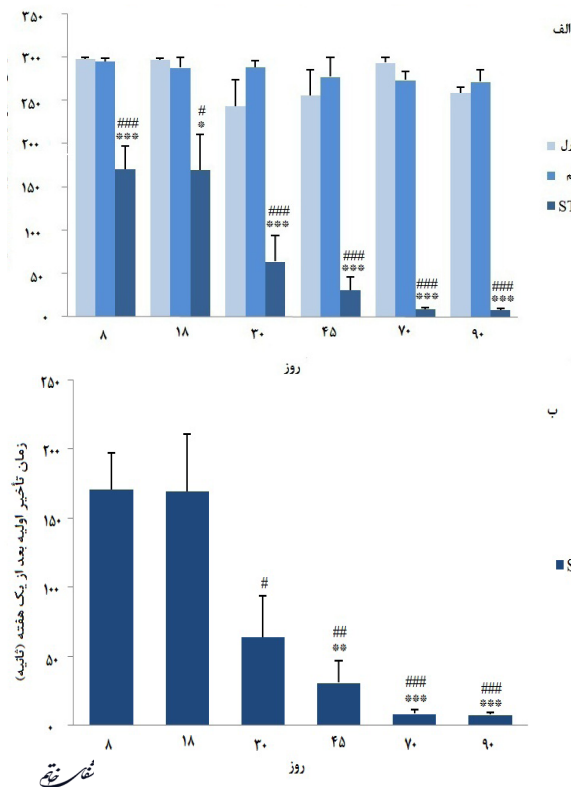
3 Adaptation

4 Learning

یافته ها

داده ها نشان می دهد یک روز بعد از اعمال شوک در دستگاه Shuttle box، میانگین زمان تأخیر اولیه در رت های گروه های آلزایمری در مقایسه ی با گروه کنترل و شم هم سن خود، به طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است ($P < 0.001$ ، $P < 0.05$). در واقع تخریب حافظه از مراحل اولیه (۸ روز بعد از تزریق STZ) آغاز شده و تا مراحل نهایی (۹۰ روز بعد از تزریق STZ) ادامه یافته و رفته رفته شدیدتر شده است (نمودار ۱-الف).

میانگین زمان تأخیر در بین گروه های کنترل و همچنین بین گروه های شم در زمان های مختلف، تفاوت چشمگیری نشان نداده است. میانگین زمان تأخیر در گروه های آلزایمری که ۷۰ و ۹۰ روز بعد از تزریق STZ از آن ها تست گرفته شد نسبت به گروه ۱۸ روزه کاهش چشمگیری نشان داده است ($P < 0.001$ ، نمودار ۱-ب).

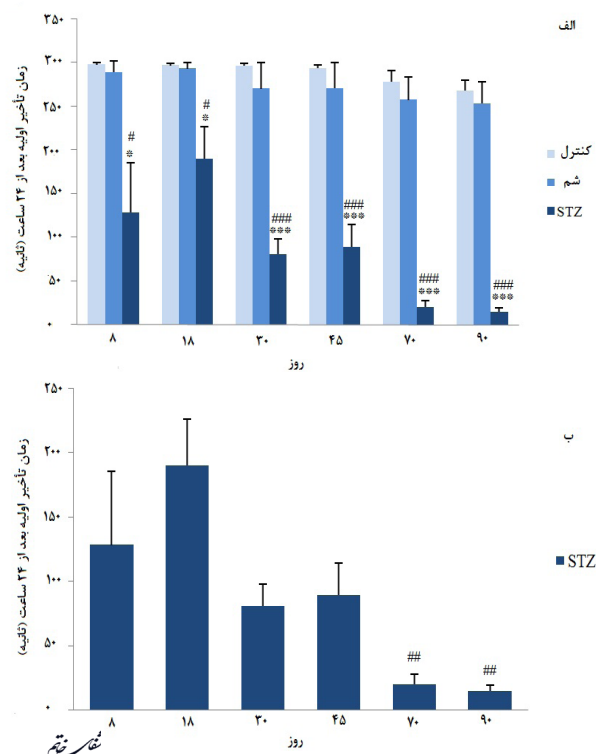


نمودار ۲- زمان تأخیر اولیه بعد از یک هفته. الف) میانگین زمان تأخیر اولیه در گروه های آلزایمری در مقایسه با گروه کنترل و شم هم سن خود، به طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است ($P < 0.001$ ، $P < 0.05$). ب) معرف مقایسه با گروه کنترل و # معرف مقایسه با گروه شم می باشد. ب) میانگین زمان تأخیر در گروه های آلزایمری ۷۰ و ۹۰ روزه نسبت به گروه ۸ روزه کاهش چشمگیری نشان داده است ($P < 0.001$ ، $P < 0.001$ ، $P < 0.001$). معرف مقایسه با گروه ۸ روزه نسبت به گروه ۱۸ روزه کاهش چشمگیری نشان داده است. معرف مقایسه با گروه ۸ روزه و # معرف مقایسه با گروه ۱۸ روزه می باشد. * و ** و *** به ترتیب نشان دهنده $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ می باشد.

میانگین زمان تأخیر در بین گروه های کنترل و همچنین بین گروه های شم در زمان های مختلف، تفاوت چشمگیری نشان نداده است. میانگین زمان تأخیر در گروه های آلزایمری که ۷۰، ۴۵، ۳۰ و ۹۰ روز بعد از تزریق STZ از آن ها تست گرفته شد نسبت به گروه ۸ روزه کاهش چشمگیری نشان داده است ($P < 0.001$ ، $P < 0.001$ ، $P < 0.001$ ، نمودار ۲-ب).

بحث و نتیجه گیری

تحقیقات نشان داده اند که کمبود انرژی زیر بنای زوال رفتاری می باشد و از آنجایی که گلوکز منبع اصلی برای تولید انرژی در مغز است، متابولیسم صحیح آن برای حفظ عملکرد طبیعی مغز مهم است و کمبود آن با اختلال در اعمال ادراکی مرتبط است. بنابراین مشخص گردیده است که عملکرد طبیعی مغز مانند یادگیری، حافظه و ادراک مرتبط با متابولیسم انرژی سلولی می باشد (۱۹). از سوی دیگر مطالعات نشان داده اند که فعالیت آنزیم استیل کولین ترانسفراز در هیپوکمپ موش های آلزایمری شده با تزریق استرپتوزوسین کاهش می یابد. این آنزیم در واقع یکی از نوروترانسمیترهای ضروری در حافظه و یادگیری می باشد (۲۰). همچنین استرپتوزوسین سبب تشدید استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش تشکیل رادیکال های فعال اکسیژن در بعضی از نواحی مغز از جمله هیپوکمپ که مرکز یادگیری و



نمودار ۱- زمان تأخیر اولیه بعد از ۲۴ ساعت. الف) میانگین زمان تأخیر اولیه در گروه های مختلف آلزایمری در مقایسه با گروه کنترل و شم هم سن خود، به طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است ($P < 0.001$ ، $P < 0.05$). ب) معرف مقایسه با گروه کنترل و # معرف مقایسه با گروه شم می باشد. ب) میانگین زمان تأخیر در گروه های آلزایمری ۷۰ و ۹۰ روزه نسبت به گروه ۱۸ روزه کاهش چشمگیری نشان داده است ($P < 0.001$). معرف مقایسه با گروه ۱۸ روزه نسبت به گروه ۳۰ روزه کاهش چشمگیری نشان داده است. معرف مقایسه با گروه ۳۰ روزه و # معرف مقایسه با گروه ۴۵ روزه می باشد. * و ** و *** به ترتیب نشان دهنده $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ می باشد.

داده های حاصل از تست رفتاری نشان می دهد یک هفته بعد از اعمال شوک در دستگاه Shuttle box، میانگین زمان تأخیر اولیه در رت های گروه های آلزایمری در مقایسه با گروه کنترل و شم هم سن خود، به طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است ($P < 0.001$ ، $P < 0.05$ ، نمودار ۲-الف).

تقویت حافظه ی بلند مدت با واسطه ی هیپوکمپ بیش از یک یا چندین هفته در جوندگان و ماه ها (۲۶، ۲۷) و حتی سال ها در انسان ها طول می کشد (۲۸-۳۰).

یافته های ما پیشنهاد کننده ی این مطلب است که تخریب حافظه ی طولانی مدت در بازه ی زمانی نسبت به حافظه ی کوتاه مدت سریع تر رخ می دهد و با گذر زمان افزایش می یابد. بر طبق یافته های ما رت ها ۹۰ روز بعد از تزریق STZ دچار بیشترین آسیب در حافظه ی کوتاه مدت و طولانی مدت شدند. با توجه به اینکه تعداد زیادی از بیماران آلزایمری در اواسط و یا مراحل انتهایی بیماریشان اقدام به درمان می کنند، می توان با مطالعات بیشتر در این زمینه مدلی از مرحله شدید آلزایمر را ایجاد کرد تا موارد درمانی در مراحل انتهایی آلزایمر مورد آزمایش و بررسی قرار گیرد.

حافظه است، می شود (۲۱).

بر طبق مطالعه ی ما، نقص در یادگیری و حافظه ی فضایی کوتاه مدت ۷۰ روز بعد از تزریق ICV-STZ^۵ رخ می دهد و نقص در یادگیری و حافظه ی فضایی بلند مدت از ۳۰ روز بعد از تزریق ICV-STZ آغاز می گردد و تا ۹۰ روز بعد از تزریق STZ ادامه می یابد. تبدیل حافظه ی ابتدایی به حافظه ی بلند مدت نیاز به سنتز پروتئین دارد (۲۲) که STZ ممکن است این عملکرد را مهار کند. بنابراین حافظه ی بلند مدت در رت های در معرض STZ، زودتر از حافظه ی کوتاه مدت تخریب می گردد (۲۳-۲۵) که این نتایج هم راستا با نتایج مطالعه ی ما می باشد. آپشار سیگنالینگ مولکولی توسط یادگیری در هیپوکمپ معمولاً در مدت چندین ساعت یا یک روز کامل می شود در حالی که

منابع

1. Šalković-Petrišić M. Amyloid cascade hypothesis: is it true for sporadic Alzheimer's disease. *Period Biol.* 2008; 110(1): 17-25.
2. Weerateerangkull P, Praputpittaya C, Banjerdpongchai R. Effects of Ascorbic acid on streptozotocin-induced oxidative stress and memory impairment in rats. *J Physiol Sci.* 2007; 20: 2.
3. Piaceri I, Nacmias B, Sorbi S. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci.* 2012; 5: 167-77.
4. Peto MV. Aluminium and iron in humans: bioaccumulation, pathology, and removal. *Rejuvenation Res.* 2010; 13(5): 589-98.
5. Loeff M, Walach H. Copper and iron in Alzheimer's disease: a systematic review and its dietary implications. *Br J Nutr.* 2012; 107(01): 7-19.
6. Squitti R. Metals in Alzheimer's disease: a systemic perspective. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012; 17: 451.
7. Ikeda T, Yamada M. Risk factors for Alzheimer's disease. *Brain Nerve.* 2010; 62(7): 679-90.
8. Sivanandam TM, Thakur MK. Traumatic brain injury: A risk factor for Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012; 36(5): 1376-81.
9. Stefani M, Liguri G. Cholesterol in Alzheimer's Disease: Unresolved Questions. *Curr Alzheimer Res.* 2009; 6(1): 15-29.
10. Pregelj P. Involvement of cholesterol in the pathogenesis of Alzheimer's disease: role of statins. *Psychiatria Danubina.*

2008; 20(2): 162.

11. Herring A, Ambree O, Tamm M, Habermann H, Sachser N, Paulus W, et al. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp Neurol.* 2009; 216(1): 184-92.
12. Meilandt WJ, Barea-Rodriguez E, Harvey SA, Martinez JL Jr. Role of hippocampal CA3 muopioid receptors in spatial learning and memory. *J Neurosci.* 2004; 24: 2953-62.
13. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998; 112(5): 1199-208.
14. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res.* 2006; 171(1): 9-16.
15. de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005; 7(1): 45-61.
16. 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.* 2013; 120(1): 233-52.
17. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance

⁵ Intracerebroventricular

- as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007; 72: 217-33.
18. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Academic press. 2007.
19. Hoyer S, Lee SK, Loffler T, Schliebs R. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 920: 256-8.
20. Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 44(2): 491-4.
21. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult rats. *Brain Res.* 1990; 532: 95-100.
22. McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science.* 2000; 287(5451): 248-51.
23. Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 44(2): 491-4.
24. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998; 112(5): 1199-208.
25. Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res.* 1999; 102(1-2): 73-88.
26. Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci.* 1999; 19(3): 1106-14.
27. Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science.* 1992; 256(5057): 675-7.
28. Kritchevsky M, Squire LR. Transient global amnesia: evidence for extensive, temporally graded retrograde amnesia. *Neurology.* 1989; 39(2 Pt 1): 213-8.
29. Squire LR, Haist F, Shimamura AP. The neurology of memory: quantitative assessment of retrograde amnesia in two groups of amnesic patients. *J Neurosci.* 1989; 9(3): 828-39.
30. Haist F, Bowden Gore J, Mao H. Consolidation of human memory over decades revealed by functional magnetic resonance imaging. *Nat Neurosci.* 2001; 4(11): 1139-45.