

# The Effect of Intracerebroventricular Administration of Streptozocin on Cell Proliferation in Subventricular Zone Stem Cells in a Rat Model of Alzheimer's Disease

Hoda Pasand Mozhdeh<sup>1,2</sup>, Bahman Zeynali<sup>1</sup>, Hadi Aligholi<sup>2,3</sup>, Iraj Kashani Radgerdi<sup>4</sup>, Sajad Sahab Negah<sup>2</sup>, Gholamreza Hassanzadeh<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Neuroscience, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>4</sup>Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

## Article Info:

Received: 20 Jun 2015

Accepted: 30 Jul 2015

## ABSTRACT

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder with the prevalence of one eighth or about 10% of people older than 65 years old. Aiming to induce progressive dementia and neurodegeneration, intracerebroventricularly (ICV) injection of streptozocin (STZ), a diabetogenic factor, was performed. Since this model leads to behavioral disorders, impaired energy, and glucose utilization, it is an appropriate model for AD. Reduction of the potency of stem cells in the subventricular zone (SVZ), one of the brain neurogenic regions, in AD has been reported. In this study, we examined the effect of ICV administration of STZ on stem cell proliferation in SVZ. **Materials and Methods:** Thirty male Wistar rats were classified into three groups, including control, sham, and STZ. Drug injection (3 mg/kg- ICV) was performed in lateral ventricles in days 1 and 3 after recovery of operation. Finally, after SVZ cell culture, cell proliferation was measured by evaluation of morphology, number, and diameter indexes of neurospheres. **Results:** Our study revealed that proliferation indexes, such as diameter and the number of neurosphere, were significantly decreased in the treatment group compared to control and sham groups. **Conclusion:** Our data has shown that application of STZ decreases proliferation of stem cells in SVZ of the brain.

## Key words:

1. Alzheimer Disease
2. Streptozocin
3. Neural Stem Cells

\* **Corresponding Author:** Gholamreza Hassanzadeh

**E-mail:** hassanzadeh@tums.ac.ir

# اثر تجویز درون بطنی استرپتوزوسین بر تکثیر سلول در سلول‌های بنیادی ناحیه تحت بطنی در یک مدل موش صحرایی مبتلا به بیماری آلزایمر

هدی پسندمژده<sup>۱،۲</sup>، بهمن زینلی<sup>۱</sup>، هادی علیقلی<sup>۲،۳</sup>، ایرج کاشانی رادگردی<sup>۴</sup>، سجاد سحاب نگاه<sup>۲</sup>، غلامرضا حسن زاده<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup>مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران

<sup>۳</sup>گروه علوم اعصاب، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

<sup>۴</sup>گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

## اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۸ مرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۳۰ خرداد ۱۳۹۴

## چکیده

**مقدمه:** بیماری آلزایمر شایع‌ترین اختلال تحلیل برنده عصبی با شیوع یک هشتم یا حدود ده درصد از افراد مسن‌تر از ۶۵ سال است. برای رسیدن به القاء زوال پیشرونده و تحلیل عصبی، تزریق درون بطنی استرپتوزوسین، یک فاکتور دیابتوزنیک، انجام شد. از آنجایی که این مدل منجر به اختلالات رفتاری، اختلال انرژی و مصرف گلوکز شد، یک مدل مناسب برای آلزایمر است. کاهش توان سلول‌های بنیادی در ناحیه تحت بطنی، یکی از نواحی نوروزنیک مغز، در بیماری آلزایمر گزارش شده است. در این مطالعه، ما تأثیر تجویز درون بطنی استرپتوزوسین در تکثیر سلول بنیادی در ناحیه تحت بطنی را آزمایش کردیم. **مواد و روش‌ها:** ۳۰ سر موش صحرایی ویستار نر به ۳ گروه تقسیم بندی شدند، شامل: کنترل، شم و STZ. تزریق دارو (۳ میلی گرم/کیلوگرم -تزریق درون بطنی) در بطن‌های جانبی در روزهای ۱ و ۳ بعد از بهبودی از عمل جراحی انجام شد. سرانجام بعد از کشت سلول ناحیه تحت بطنی، تکثیر سلول توسط سنجش شاخص‌های ریخت شناسی، تعداد و قطر نوروسفرها اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** مطالعه ما نشان داد که تکثیر شاخص‌ها از قبیل قطر و تعداد نوروسفرها، در گروه درمان در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم به طور معنی‌داری کاهش داشت. **نتیجه‌گیری:** اطلاعات ما نشان داد که استفاده از استرپتوزوسین تکثیر سلول‌های بنیادی در ناحیه تحت بطنی مغز را کاهش می‌دهد.

## کلید واژه‌ها:

۱. بیماری آلزایمر
۲. استرپتوزوسین
۳. سلول‌های بنیادی عصبی

\* نویسنده مسئول: غلامرضا حسن زاده

آدرس الکترونیکی: hassanzadeh@tums.ac.ir

## مقدمه

آمیلوئیدوزنیک را افزایش می‌دهد (۴). حافظه کوتاه مدت<sup>۱۴</sup> و حافظه بلند مدت<sup>۱۵</sup> نیز به طور پیشرونده و مرحله به مرحله<sup>۱۶</sup> بعد از تزریق درون بطنی استرپتوزوسین رو به زوال می‌گذارند و از آنجا که این مدل منجر به اختلال رفتاری، اختلال متابولیسم انرژی و گلوکز می‌شود، برای مدل تک‌گیر آلزایمر بسیار مناسب است (۵). آزمون‌های رفتاری حافظه اجتنابی غیر فعال<sup>۱۷</sup>، ماز آبی موریس<sup>۱۸</sup> مؤید مؤثر بودن استرپتوزوسین در ایجاد آلزایمر هستند (۶، ۷).

سال‌های بسیاری عقیده بر این بود که سیستم عصبی مرکزی در زمان بزرگسالی قابلیت نوروژایی ندارد. تا اینکه تقریباً از یک قرن پیش به موازات پیشرفت در فناوری، سلول‌هایی که قابلیت تکثیر و تمایز به نوروژ و گلیا دارند در مناطقی از مغز و نخاع شناسایی شدند. تا به حال، نوروژایی فعال در ناحیه تحت بطنی دیواره جانبی بطن‌های طرفی<sup>۱۹</sup>، ناحیه تحت گرانولی جیروس دندان‌های<sup>۲۰</sup> و ناحیه تحت اپاندیمی در هیپوتالاموس<sup>۲۱</sup> مشخص شده است (۸-۱۱).

در اوایل قرن حاضر Allen، سلول‌های میتوزی را در ناحیه تحت بطنی دیواره جانبی بطن جانبی موش‌های صحرایی بالغ شناسایی کرد (۱۲). ناحیه تحت بطنی در دوران تکامل جنینی در نزدیکی ناحیه بطنی تشکیل می‌شود و در ناحیه برآمدگی گانگلیونی، بسیار قابل توجه می‌باشد (۱۳). ناحیه تحت بطنی از یکسری سلول‌ها تشکیل شده است. احتمالاً سلول‌های نوع B1 که همان آستروسیت‌ها هستند، سلول‌های بنیادی در ناحیه تحت بطنی محسوب می‌شوند و این سلول‌ها تقسیم شده و سلول‌های نوع C که قابلیت تکثیر سریع دارند را می‌سازند و سلول‌های نوع C به نوبه خود افزایش یافته و به سلول‌های نوع A که نوروبلاست‌های مهاجرت کننده هستند، تبدیل می‌شوند. زنجیره سلول‌های نوع A به وسیله سلول‌های نوع B1 و سلول‌های نوع C احاطه شده‌اند (۱۴، ۱۵).

با توجه به هزینه‌های سنگین نگهداری از بیماران، آلزایمر یکی از اصلی‌ترین دغدغه‌های عمومی مربوط به سلامت جوامع تلقی می‌شود؛ از سوی دیگر با فراهم شدن امکان دسترسی به سلول‌های بنیادی در بالغین و تأثیر منفی بیماری آلزایمر بر این ذخیره بنیادی و با در نظر گرفتن این نکته که اغلب بیماران مبتلا به آلزایمر از اختلالات هورمون تیروئید نیز رنج می‌برند بر آن شدیم میزان تأثیر این هورمون را بر میزان بیان ژن seladin-1 درگیر در آلزایمر ببینیم و در صورت افزایش بیان آن، نقش محافظتی این هورمون در مقابل بیماری آلزایمر ثابت خواهد شد.

بیماری آلزایمر<sup>۱</sup> شایع‌ترین اختلال تحلیل‌برنده عصبی<sup>۲</sup> نقص اکتسابی پیشرونده عملکرد شناختی است که محتوای هوشیاری را بدون تغییر در سطح آن تحت تأثیر قرار می‌دهد و در سال ۱۹۰۶ توسط آلزایمر<sup>۳</sup> با تشریح مغز زن میان‌سالی که دچار نقص حافظه پیشرفته و فقدان پیشرونده توانایی‌های خود بود معرفی شد (۱). سه علامت بارز آلزایمر عبارتند از: ۱- آتروفی<sup>۴</sup> مغز که در آن مغز تحلیل رفته، وزن آن کاهش یافته، شکنج‌های مغز باریک، شیارهای آن عریض و بطن‌ها متسع می‌شوند ۲- پلاک‌های پتید آمیلوئید بتا<sup>۵</sup> که هم به صورت داخل سلولی و هم خارج سلولی رسوب می‌کنند ۳- کلاف‌های نوروفیبریلاری (NTF)<sup>۶</sup> که در نتیجه ناهنجاری در اسکلت سلولی ایجاد می‌شوند. در نهایت با از هم پاشیدن میکروتوبول‌ها، اختلال در انتقال آکسونی و مرگ نورونی رخ می‌دهد (۲). از نظر شیوع، تقریباً یک هشتم یا به عبارتی حدود ده درصد افراد مسن‌تر از ۶۵ سال به بیماری آلزایمر مبتلا می‌شوند. بیماری آلزایمر به دو نوع اصلی تقسیم می‌شود، نوع خانوادگی یا ارثی (FAD)<sup>۷</sup> که پیش از موعد بروز می‌کند و اغلب خانوادگی و ارثی است و نوع تک‌گیر (SAD)<sup>۸</sup> که به صورت انفرادی و بدون جهش ژنتیکی است و اغلب در دهه ۸۰ به بعد زندگی اتفاق می‌افتد.

در این پژوهش از تزریق درون بطنی (ICV)<sup>۹</sup> STZ<sup>۱۰</sup> که یک فاکتور دیابتوزنیک است برای تخریب متابولیسم مغزی گلوکز استفاده می‌شود. بعد از تزریق STZ، اختلال در نقش تنظیم کننده عصبی<sup>۱۱</sup> انسولین و گیرنده آن ایجاد می‌شود و در نتیجه آن اختلال در متابولیسم گلوکز، یادگیری، حافظه، ناهنجاری عمومی و موضعی در متابولیسم مغزی گلوکز به همراه کمبود انرژی، کمبود سیستم کولینرژیک و عصب‌دهی آن ظاهر می‌شود و تمامی این اختلالات را به اثر STZ بر متابولیسم گلوکز و کنترل آن توسط آبخار پیام‌رسانی<sup>۱۲</sup> انسولین و گیرنده آن نسبت می‌دهند (۳).

برای القاء تخریب و زوال پیشرونده مانند آنچه در نوع تک‌گیر آلزایمر دیده می‌شود از تزریق STZ استفاده می‌شود که منجر به کاهش شدید انرژی در بافت هیپوکامپ و قشر مغز شده، انرژی در دسترس کاهش یافته و پروسه‌های وابسته به آن از جمله تا خوردن، مرتب کردن پروتئین‌ها، بسته بندی آن‌ها در وزیکول، انتقال ناقلین عصبی<sup>۱۳</sup> و ارگانل‌های گلژی و رفتارهای یادگیری و حافظه همگی تحت تأثیر قرار می‌گیرند و به طور پیشرونده رفتار، حافظه و ترکیبات غنی از انرژی را کاهش و تولید مشتقات

<sup>1</sup> Alzheimer's disease

<sup>2</sup> Neurodegenerative

<sup>3</sup> Alois Alzheimer

<sup>4</sup> Atrophy

<sup>5</sup> Amyloid precursor protein (Aβ)

<sup>6</sup> Neurofibrillary tangle

<sup>7</sup> Familial Alzheimer's disease

<sup>8</sup> Sporadic Alzheimer disease

<sup>9</sup> Intracerebroventricular

<sup>10</sup> Streptozotocin

<sup>11</sup> Neuromodulatory

<sup>12</sup> Signaling

<sup>13</sup> Neurotransmitters

<sup>14</sup> Short-term memory

<sup>15</sup> Long-term memory

<sup>16</sup> Step wise manner

<sup>17</sup> Passive avoidance test

<sup>18</sup> Morris water maze

<sup>19</sup> Subventricular zone of lateral wall of lateral ventricle

<sup>20</sup> Sub-granular zone of dentate gyrus

<sup>21</sup> Hypothalamic sub-ependymal zone

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۳۰ سر موش صحرایی<sup>۲۲</sup> نر آلبینو<sup>۲۳</sup>، نژاد ویستار<sup>۲۴</sup> با وزن ۱۵۰-۱۰۰ گرم از مرکز علوم اعصاب شفا بیمارستان خاتم الانبیاء تهیه شد و در سه گروه شامل گروه کنترل بدون هیچ‌گونه مداخله، گروه شش دریافت‌کننده محلول نرمال سالین (به میزان ۵ میکرولیتر در هر بطن) بعد از جراحی استریوتاکسی و گروه STZ دریافت‌کننده محلول STZ با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حل شده در نرمال سالین (به میزان ۵ میکرولیتر در هر بطن) بعد از جراحی استریوتاکسی قرار گرفتند. موش‌های صحرایی در حیوانخانه مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا بیمارستان خاتم الانبیاء، مطابق کمیته اخلاق مرکز تحقیقات شفا نگهداری شدند. تمام آزمایشات با توجه به دستورالعمل‌های جهانی نگهداری (NIH)<sup>۲۵</sup> انجام شد.

## جراحی استریوتاکسی و کشت سلولی

موش‌های صحرایی بیهوش شده و با استفاده از دستگاه استریوتاکسی و بر اساس اطلس پاکسینوس، مختصات فضایی بطن‌های طرفی تعیین شده و بعد از دریل شدن کانول‌های راهنما (گیج ۲۷)<sup>۲۶</sup> به صورت دوطرفه داخل بطن‌ها گذاشته شدند. در طول جراحی و پس از آن تا زمان به هوش آمدن، به منظور حفظ دمای بدن موش‌های صحرایی در  $37 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد، از پد گرم‌کننده استفاده شد (۱۶). پس از ۵ تا ۷ روز، استریوتوزوسین به میزان ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل بطنی در دو دوز تزریق گردید. بعد از گذشت ۲۱ روز ناحیه تحت بطنی کشت داده شد. نمونه بافتی پس از مرحله هضم مکانیکی به وسیله تیغ بیستوری، با ۲۵۰ میکرولیتر تریپسین ۰.۰۵٪ به مدت ۴ دقیقه هضم آنزیمی شد و بعد از افزودن مهارکننده تریپسین با دور ۸۱۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید، رسوب سلولی در محیط کشت نوروسفر Gibco DMEM-F12 (Gibco) که حاوی گلوتامین (Gibco) ۱٪، B27 supplement (Gibco) ۱٪ و فاکتور رشد اپیدرمی (۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر) (Sigma) بود در درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند.

طی مدت ۱۵ روز سلول‌های بنیادی / پیش‌ساز عصبی به صورت مجموعه‌ای از سلول‌های کروی به نام نوروسفر تکثیر شدند. با افزایش حجم نوروسفرها پاساژ سلولی با جمع‌آوری نوروسفرها داخل لوله فالکن و سانتریفیوژ با دور ۸۱۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد. شمارش سلولی با استفاده از تریپان‌بلو و لام نتوبار انجام گرفت و بعد از پاساژ دوم، قطر و تعداد نوروسفرها اندازه‌گیری شد (۱۷).

جهت ارزیابی تکثیر سلولی، ۲ شاخص تعداد نوروسفر و قطر نوروسفر در نظر گرفته شد. روز هفتم کشت، از هر ظرف ۵ عکس به صورت تصادفی به وسیله میکروسکوپ گرفته شد.

تعداد نوروسفرها در هر عکس به وسیله نرم‌افزار Infinity analyze software شمارش گردید. برای اندازه‌گیری قطر نوروسفرها از نرم‌افزار Infinity استفاده شد و نتایج به صورت میانگین دو قطر عمود بر هم به عنوان قطر نوروسفر توصیف شدند. از نظر ریخت‌شناسی<sup>۲۷</sup>، رنگ و شکل هندسی و میزان شناوری نوروسفرها و سلول‌ها مورد مقایسه قرار گرفت.

## آنالیز آماری

تمامی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده‌اند. آنالیز آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS سری ۲۱ انجام شد. برای بررسی یک متغیر بین چند گروه مجزا از آزمون One Way ANOVA و تست تعقیبی Tukey استفاده گردید.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

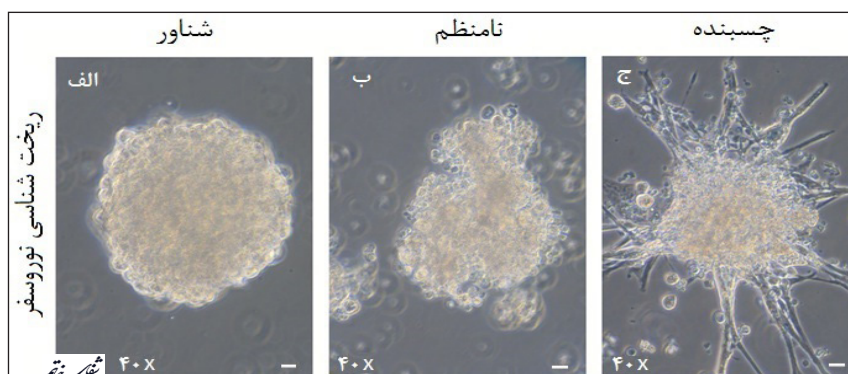
## مشاهدات ریخت‌شناسی

در مطالعه ریخت‌شناسی، نوروسفرها اغلب طلایی رنگ و در ابعاد مختلف مشاهده شدند. بعضی کاملاً گرد و مدور بوده و برخی شکل هندسی خاصی نداشتند. اکثر موارد، نوروسفرها شناور بودند و گاهی به صورت سست به کف ظرف چسبیده و استتاله‌هایی نیز در اطراف آن‌ها دیده می‌شد (تصویر ۱). در مقایسه کیفی بین ریخت‌شناسی نوروسفرها در سه گروه مورد بررسی با توجه به تصویر می‌توان گفت در گروه کنترل و شش نوروسفرها، تیپیک با سیتوپلاسم شفاف و رنگ مایل به طلایی روشن و از نظر ظاهری کاملاً کروی با حاشیه منظم بودند، درحالی‌که در گروه آلزایمر تعداد کمتری نوروسفر با ویژگی بالا دیده شد، علاوه بر این در این گروه تعدادی نوروسفر با اشکال نامنظم و کوچک با حاشیه نامنظم و در بعضی موارد با رنگ طلایی تیره مایل به قهوه‌ای و غیر شفاف دیده شد.

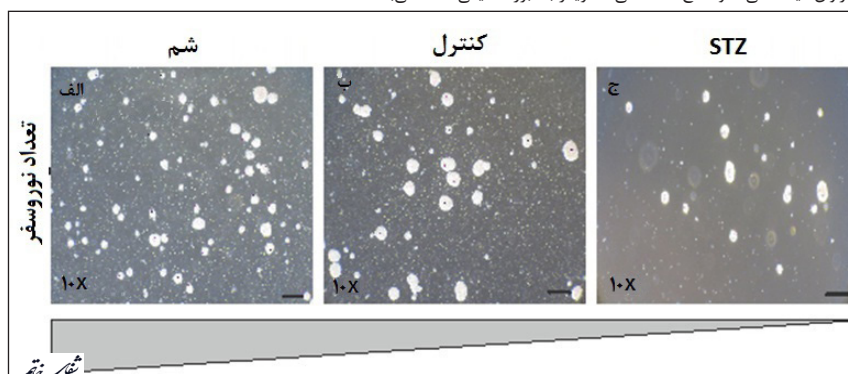
## بررسی تعداد نوروسفر

در مطالعه حاضر از دو شاخص تعداد نوروسفر و قطر نوروسفر جهت بررسی چگونگی تأثیر STZ بر تکثیر و پتانسیل خود تجدیدی سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز عصبی کشت داده شده، استفاده شد. میانگین کل تعداد نوروسفر در گروه شش برابر  $89.28 \pm 42.0$  و در گروه کنترل برابر  $56.81 \pm 27.2$  و در گروه STZ برابر  $25.84 \pm 11.8$  نوروسفر است. پتانسیل تکثیری سلول‌های بنیادی و در نتیجه تعداد نوروسفر در گروه STZ به شدت کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری بین این گروه با دو گروه شش و کنترل مشاهده شد (تصویر ۲ و نمودار ۱) ( $F(4,2)=30.02$ ,  $P<0.001$ ). از سوی دیگر اختلاف معنی‌دار بین تعداد نوروسفر در دو گروه شش و کنترل با سطح معنی‌داری ( $P<0.01$ ) و افزایش پتانسیل تکثیری سلول‌های بنیادی در گروه شش مشاهده شد.

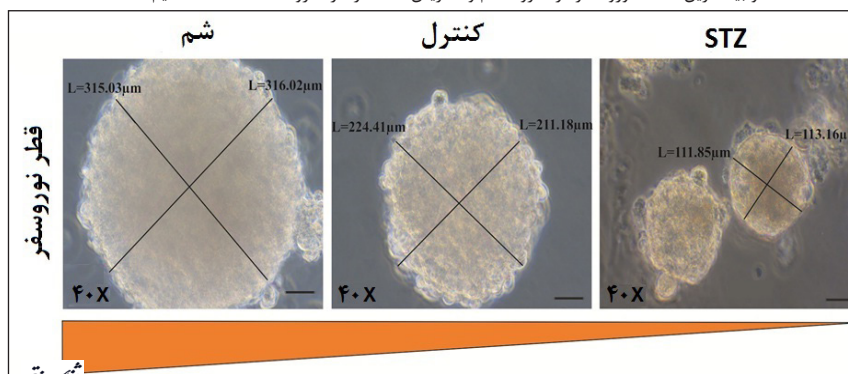
<sup>22</sup> Rat<sup>23</sup> Albino<sup>24</sup> Wistar<sup>25</sup> National institutes of health<sup>26</sup> 27-Gauge<sup>27</sup> Morphology



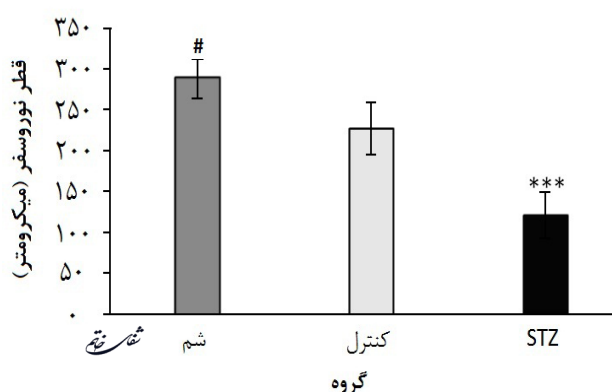
**تصویر ۱-** بررسی ریخت شناسی نوروسفرها: همان‌طور که در تصویر دیده می‌شود نوروسفرها از نظر ریخت شناسی در اشکال متفاوت مدور با حاشیه منظم و طلایی روشن، مانند آنچه در گروه شم و کنترل دیده می‌شود (الف) گاهی بی شکل با حاشیه نامنظم و رنگ طلایی تیره مایل به قهوه‌ای که بیشتر در گروه STZ مشاهده می‌شود (ب) در همه گروه‌ها به ویژه گروه شم تعدادی از نوروسفرها چسبیده به کف ظرف با حاشیه منظم و استتال‌های فراوان دیده می‌شوند (ج) - (تمامی تصاویر با بزرگنمایی ۴۰X می‌باشند).



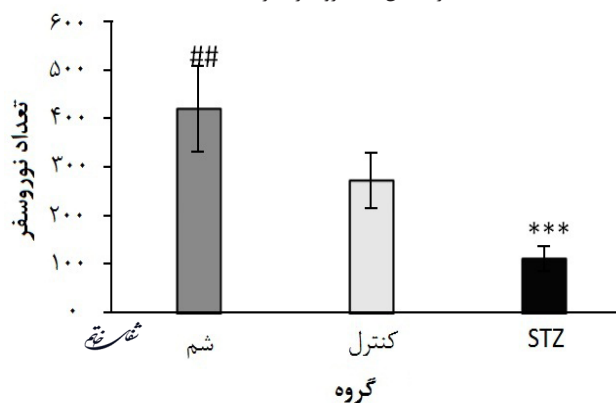
**تصویر ۲-** مقایسه تعداد نوروسفر بین گروه‌های STZ، کنترل و شم. کاهش تعداد نوروسفر از چپ به راست قابل مشاهده است و بیشترین تعداد نوروسفر در گروه شم و کمترین تعداد را در گروه STZ شاهد هستیم.



**تصویر ۳-** مقایسه قطر نوروسفرها بین گروه‌ها: بیشترین میانگین قطر نوروسفر متعلق به گروه شم و کمترین قطر متعلق به گروه STZ است.



نمودار ۲- میانگین قطر نوروسفرها میان گروه‌های STZ، کنترل، شم (علامت \* بیانگر مقایسه میان هر سه گروه و علامت # بیانگر مقایسه میان گروه شم با کنترل می‌باشند).  $P < 0.05$  \* یا  $P < 0.01$  \*\* یا  $P < 0.001$  \*\*\* و  $P < 0.001$  \*\*\*\* یا  $P < 0.0001$  #####



نمودار ۱- مقایسه تعداد نوروسفر بین گروه‌های STZ، کنترل، شم (علامت \* بیانگر مقایسه میان هر سه گروه و علامت # بیانگر مقایسه میان گروه شم با کنترل می‌باشند).  $P < 0.05$  \* یا  $P < 0.01$  \*\* یا  $P < 0.001$  \*\*\* و  $P < 0.001$  \*\*\*\* یا  $P < 0.0001$  #####

## بررسی قطر نوروسفر

میانگین قطر نوروسفرها در گروه‌های آلزایمر، کنترل و شم به ترتیب  $50/72$ ،  $227/120$  و  $290/32$  میکرومتر است. یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد قطر نوروسفرها در گروه آلزایمر نسبت به دو گروه دیگر به صورت معنی‌داری کاهش یافته است که این امر حاکی از کاهش پتانسیل تکثیری سلول‌های بنیادی ناحیه تحت بطنی تحت تأثیر داروی STZ است. همان‌طور که در (تصویر ۳) و (نمودار ۲) به تصویر کشیده شده است، تفاوت معنی‌داری میان میانگین قطر نوروسفرها در هر سه گروه به‌خصوص میان گروه STZ با دو گروه دیگر مشاهده شد (سطح معنی‌داری  $(P < 0/001)$  و میزان  $F$  برابر  $F(4, 2) = 43/83$  می‌باشد). همچنین اختلاف معنی‌داری با  $(P < 0/05)$  بین گروه شم و کنترل دیده شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

سازوکار دقیق بیماری آلزایمر بر محققین روشن نیست. عوامل زیادی که اصطلاحاً عوامل ثانویه نامیده می‌شوند مانند سوخت و ساز غیرطبیعی گلوکز و استرس اکسیداتیو<sup>۲۸</sup> در شروع و پیشرفت این بیماری دارای اهمیت است. اولین و مهم‌ترین فرایند غیرطبیعی در بیماری آلزایمر سوخت و ساز غیرطبیعی گلوکز مغز است که منجر به آسیب جدی به گیرنده‌های انسولین و مسیر انتقال سیگنال می‌شود و خود می‌تواند واسطه آسیب سلولی و آپوپتوز و مرگ سلولی نورون‌ها شوند. Duan و همکارانش نشان دادند در صورت استفاده از STZ، با کاهش سطح ATP در نورون‌ها شانس تولید Tau هایپر فسفریله بالاتر می‌رود. حافظه کوتاه‌مدت و حافظه بلندمدت نیز به طور پیش‌رونده و مرحله به مرحله بعد از تزریق درون بطنی STZ رو به زوال می‌گذارند و از آنجا که این مدل منجر به اختلال رفتاری، اختلال متابولیسم انرژی و گلوکز می‌شود، برای مدل تک‌گیر آلزایمر بسیار مناسب است (۵).

Lannert و همکاران نشان دادند که تزریق داخل بطنی STZ باعث ایجاد اختلالات متابولیسمی در مغز موش‌های صحرایی از طریق مهار گیرنده‌های انسولین می‌شود. از طرفی انسولین در سطح سلول دارای اثرات متعددی بر روی نورون‌ها می‌باشد (۱۸). تزریق داخل بطنی STZ می‌تواند فعالیت استیل‌کولین ترانسفراز را در قشر مغز و هیپوکامپ کاهش دهد و موجب زوال پیش‌رونده حافظه و یادگیری شود (۳). Gold نشان داد حیوانات، مدل STZ زوال پیش‌رونده در فعالیت‌های شناختی، مشابه آنچه در آلزایمر اتفاق می‌افتد را نشان می‌دهند. به‌عنوان مثال اختلال در کنترل و متابولیسم گلوکز در مغز به‌عنوان یکی از اولین و اصلی‌ترین ناهنجاری‌های ایجاد شده در مدل تک‌گیر آلزایمر است و موجب اختلال در عملکرد انسولین می‌شود (۱۹).

در بررسی حاضر نیز با توجه به بررسی‌های گذشته که مدل STZ را به‌عنوان یکی از روش‌های تأیید شده برای القاء مدل آلزایمر معرفی کردند از تزریق STZ به صورت درون بطنی استفاده شد. آسیب‌های نورونی که به دنبال آلزایمر در سلول ایجاد می‌شود، سبب راه اندازی سیری از واکنش‌های سلولی می‌شود که در نهایت، استرس‌های سلولی طولانی‌مدت، اختلالات میتوکندری، تضعیف متابولیسم سلولی و همین‌طور فعال شدن مسیرهای مختلف را به همراه دارد که نهایتاً مرگ سلولی را موجب می‌شوند. تحقیقاتی که به تازگی بر روی بافت مغزی اجساد صورت گرفته است، ارتباط نزدیکی بین مشخصات سلول‌های پاتولوژیک در بیماران آلزایمری با افرادی که دارای سطوح پایین هورمون‌های انسولین و گیرنده‌های آن هستند را نشان داده است (۲۰).

در این مطالعه برای اولین بار تأثیر STZ بر سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز عصبی ناحیه تحت بطنی مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد تعداد و قطر نوروسفرها در گروه STZ بسیار کمتر از دو گروه کنترل و شم بود که این نتیجه همراه با مطالعات پیشین در زمینه اثر STZ بر تخریب متابولیسم سلولی و کاهش تعداد سلول‌ها به دلیل مرگ نورونی است. در این مطالعه تعداد و قطر نوروسفر در گروه شم به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بیشتر بود که علت این امر استرس ناشی از جراحی استریوتاکسی و آسیب بافتی ایجاد شده متعاقب آن در گروه شم سبب تحریک سلول‌های بنیادی ناحیه تحت بطنی برای ترمیم نواحی آسیب دیده شده و این سلول‌ها با ترشح فاکتورهای رشد و انواع انتقال دهنده‌های عصبی سبب ورود سلول‌های بنیادی ناحیه تحت بطنی به فاز تکثیری می‌شوند.

در این روش، ترکیب STZ به صورت داخل بطن مغزی تزریق می‌شود و بر اساس مطالعات پیشین، موش‌هایی که استریوتوزوسین را به صورت داخل مغزی دریافت کرده بودند، پس از مدتی سبب مغز آن‌ها کاهش پیدا کرد و علائم سلولی وابسته به اختلالات تحلیل رونده عصبی از جمله مرگ سلولی، گلیوز، افزایش میزان پروتئین tau و آمیلوئید بتا را نشان می‌دادند (۲۱). Hosseinzadeh و همکاران زوال شناختی قابل توجهی را با میانگین تأخیر فرار طولانی‌مدت<sup>۲۹</sup> در تست رفتاری ماز آبی موریس بین گروه ۲۱ روزه تزریق STZ در مقایسه با گروه تزریق نرمال سالین مشاهده کردند (۲۲). راهبردهای<sup>۳۰</sup> درمانی که روی حیوانات تیمار شده با تزریق درون بطنی STZ انجام شده است در مطالعه Salkovic-Petrisic و همکاران آورده شده است (۲۳). در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شد داروی STZ منجر به اختلال در متابولیسم سلولی و کاهش تعداد و قطر نوروسفرهای ناحیه تحت بطنی می‌شود که این امر حاکی از کاهش پتانسیل تکثیری و خود تجدیدی سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز عصبی این ناحیه است.

<sup>28</sup> Oxidative stress<sup>29</sup> Prolonged mean scape latency<sup>30</sup> Strategies

1. Katzman R. The prevalence and malignancy of Alzheimer disease: a major killer. *Arch Neurol.* 1976; 33(4): 217-8.
2. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw-Hill. 2000.
3. Peri A, Serio M. Neuroprotective effects of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *J Mol Endocrinol.* 2008; 41(5): 251-61.
4. Guigon CJ, Zhao Li, Changxue Lu, Willingham MC, Cheng SY. Regulation of  $\beta$ -catenin by a novel nongenomic action of thyroid hormone  $\beta$  receptor. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(14): 4598-608.
5. Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2008; 18(1): 108-15.
6. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature.* 2001; 414(6859): 112-7.
7. Alipour F, Karimzadeh F, Hasanzadeh G. P59: Triazine improved hippocampal injuries in animal model of Alzheimer's disease. *The Neurosci J Shefaye Khatam.* 2015; 2(4): 109.
8. Alvarez-Buylla A, Temple S. Stem cells in the developing and adult nervous system. *J Neurobiol.* 1998; 36(2): 105-10.
9. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998; 4(11): 1313-7.
10. Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL. Neural stem cells an overview. *Circ Res.* 2003; 92(6): 598-608.
11. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992; 255(5052): 1707-10.
12. Allen E. The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. Waverley Press. 1912; p. 22.
13. Altman J, Bayer SA. Atlas of prenatal rat brain development. CRC Press. 1994.
14. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999; 97(6): 703-16.
15. Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell.* 2012; 10(6): 698-708.
16. Mohammadzadeh E, Alipour F, Khallaghi B. Evaluation of spatial memory impairment after intracerebroventricular streptozocin injection in adult rats. *The Neurosci J Shefaye Khatam.* 2014; 2(1): 40-5.
17. Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres-re-evaluating the relationship. *Nat Methods.* 2005; 2(5): 333-6.
18. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of Streptozocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998; 112(5): 1199-208.
19. Gold PE. Role of glucose in regulating the brain and cognition. *The American J Clinical Nutrition.* 1995; 61(4): 987S-95S.
20. Cuevas E, Auso E, Telefont M, Morreale de Escobar G, Sotelo C, Berbel P, et al. Transient maternal hypothyroxinemia at onset of corticogenesis alters tangential migration of medial ganglionic eminence-derived neurons. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(3): 541-51.
21. Hassanzadeh G, Hosseini A, Pasbakhsh P, Akbari M, Ghaffarpour M, Takzare N, et al. Trimetazidine prevents oxidative changes induced in a rat model of sporadic type of Alzheimer's disease. *Acta Med Iran.* 2015; 53(1): 17-24.
22. Hosseinzadeh S, Zahmatkesh M, Heidari M, Hassanzadeh GR, Karimian M, Sarrafnejad A, et al. Hippocampal DHCR24 down regulation in a rat model of Streptozocin-induced cognitive decline. *Neurosci Lett.* 2015; 587: 107-12.
23. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the Streptozocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm (Vienna).* 2013; 120(1): 233-52.