

## بررسی تاثیر پروژسترون بر پراکسیداسیون لیپیدی و اختلال حافظه ناشی از مدل آلزایمر حاصل از تزریق موضعی استرپتوزوتوسین در رت

مریم مظفری<sup>۱</sup>، حمیرا حاتمی\*<sup>۲</sup>، سیدمهدی بانان خجسته<sup>۳</sup>، غلامرضا دهقان<sup>۴</sup>

### چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر یکی از بیماری‌های شایع آسیب نورونی است که در حافظه و ادراک فضایی ایجاد نقص می‌کند. پروژسترون در نورون زایی هیپوکمپ، شکل پذیری سیناپسی، یادگیری و حافظه فضایی نقش دارد، همچنین دارای اثرات آنتی اکسیدانی است. از آنجایی که در پاتوژنز بیماری آلزایمر استرس اکسیداتیو دخیل می‌باشد و همچنین در مورد تاثیر پروژسترون روی بیماری آلزایمر نتایج متفاوتی گزارش شده است، لذا در این مطالعه تاثیر تزریق داخل بطنی پروژسترون با سه دوز مختلف بر حافظه فضایی، پراکسیداسیون لیپیدی و پراکسیداسیون کل در هیپوکمپ مدل‌های تجربی آلزایمر مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: ۴۲ سر رت نر با محدوده وزنی  $250 \pm 50$  گرم به طور تصادفی به شش گروه به شرح زیر تقسیم شدند؛ گروه‌های کنترل، شاهد، آلزایمر (تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین) و گروه آلزایمر به همراه پروژسترون ( $0.5, 1.5, 2.5 \mu\text{g/kg}$ ). دو هفته پس از تزریق درون بطنی استرپتوزوتوسین آلزایمر ایجاد شد، سپس دوزهای مختلف پروژسترون تزریق شدند. در ادامه شاخص‌های یادگیری و حافظه فضایی اندازه‌گیری شد و، هیپوکمپ برای اندازه‌گیری سطوح پارامترهای استرس اکسیداتیو جدا گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد.

نتایج: تزریق داخل بطنی STZ حافظه فضایی را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ( $p < 0.001$ ). تزریق هر سه دوز پروژسترون حافظه فضایی را در مقایسه با گروه کنترل بهبود بخشید ( $P < 0.001$ ). سطوح آنزیم‌های مالون دی آلدئید (MDA) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در هر سه دوز پروژسترون کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه آلزایمر نشان داد ( $P < 0.001$ ). نتیجه‌گیری: پروژسترون قادر به جلوگیری از کاهش یادگیری و حافظه فضایی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ موش صحرایی نر آلزایمری هست.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، حافظه فضایی، پروژسترون، پراکسیداسیون

۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

۲،۳،۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۴۱۳۳۳۹۲۷۴۰، پست الکترونیکی: homeirahatami@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۰

## مقدمه

بیماری آلزایمر نوعی بیماری همراه با زوال حافظه و تخریب نورونی در افراد مسن است که با کاهش تدریجی حافظه، اختلال در گفتار و تصمیم‌گیری و نیز اختلال در عملکرد سیستم حسی و حرکتی همراه است (۱). از دیگر علائم بیماری آلزایمر می‌توان به کاهش تعداد نورون‌ها در مناطق مربوط به یادگیری و حافظه به‌ویژه در ناحیه هیپوکامپ اشاره نمود. بررسی‌های انجام شده نشان دهنده طیف وسیعی از تغییرات پاتولوژیک از جمله تحلیل رفتن نورون‌های گسترده به ویژه در هیپوکامپ و لوب فرونتال است. مکانیسم‌های بیوشیمیایی دخیل در بیماری آلزایمر شناخته نشده است ولی بررسی‌ها تأثیر استرس اکسیداتیو در پیشرفت بیماری آلزایمر را تایید می‌کنند (۲).

گیرنده‌های پروژسترون در غشای سلول و هسته هستند. این گیرنده‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ شناسایی شدند و تاکنون در بسیاری از مناطق CNS از جمله در هیپوکامپ و قشر فرونتال، هسته ST، آمیگدال، ساقه مغز، ناحیه پری اپتیک، شکمی میانی و خلفی میانی هیپوتالاموس، قشر مخ، مخچه، تالاموس، غده هیپوفیز و نخاع دیده شده‌اند. پروژسترون تولید اثرات متعدد در مغز را از طریق ۳ مکانیسم اصلی تنظیم بیان ژن، واسطه‌گری سیستم‌های انتقال دهنده عصبی و فعال سازی آبخارهای سیگنالینگ بر عهده دارد (۳). با افزایش سن سطح پروژسترون کاهش می‌یابد و نیز افزایش متابولیت آن دی هیدرو پروژسترون (DHP) در ناحیه لیمبیک آشکار می‌شود. پیشنهاد شده است که متابولیت‌های پروژسترون نقش حفاظت از نورون را بر عهده دارند (۴-۶). پروژسترون شکل دندریت‌ها را در ناحیه هیپوکامپ که ناحیه درگیر در حافظه است تغییر می‌دهد. پروژسترون با افزایش فاکتورهای رشد عصبی و کاهش استرس اکسیداتیو سبب بقاء نورون‌ها و حفظ انتقال آکسونی در نورون‌های آسیب دیده می‌شود. همچنین پروژسترون دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بوده و قادر است بیان دوباره پمپ سدیم-پتاسیم را در آکسون القاء کند. پروژسترون از عمل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند و می‌توان آن‌ها را در پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر بکار برد. همچنین هورمون‌های جنسی پتانسیل واسطه‌گری در تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها را دارا هستند (۷).

استرس اکسیداتیو و به دنبال آن آپوپتوز از دیگر عواملی هستند که در پاتوژنز بیماری آلزایمر (AD) مطرح شده‌اند. افزایش سطح استرس اکسیداتیو و تخریب میتوکندری نشانه‌های اولیه بیماری آلزایمر است. استرس اکسیداتیو ناشی از یک عدم تعادل بین تولید گونه‌های باز فعال اکسیژن (ROS) و توانایی سیستم زیستی برای سم‌زدایی این واسطه‌های فعال است. استرس اکسیداتیو سبب القای آسیب اکسیداتیو در هیپوکامپ که مرکز حیاتی برای فرآیندهای یادگیری و حافظه است می‌شود (۸).

یکی از روش‌ها برای القای بیماری آلزایمر تزریق استریتوزوتوسین به داخل بطن‌های مغزی است (۹،۱۰) و تزریق این ماده با دوز غیر دیابت زا به داخل هیپوکامپ منجر به آسیب حافظه و فرایندهای متابولیکی مغز، مشابه با آنچه در مغز افراد آلزایمری رخ می‌دهد می‌شود (۱۱). در رت‌های تیمار شده با STZ حافظه و یادگیری مختل می‌شود و نورون‌های کولینرژیک عملکرد خود را از دست می‌دهند و تحلیل تدریجی نورون‌ها اتفاق می‌افتد. از طرفی گزارش‌ها نشان دهنده تغییرات پپتیدهای بتا آمیلوئیدی و تائو پروتئین‌ها در مغز رت‌های دریافت‌کننده STZ است به همین دلیل جهت القای بیماری آلزایمر به رت از ZST استفاده می‌کنند (۱۲). تحقیقات انجام شده با STZ نشان دهنده کاهش در اندازه هیپوکامپ است.

با توجه به اثرات نوروپروتکتیو و خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروژسترون هدف پژوهش حاضر بررسی اثرات پروژسترون در بهبود نقایص شناختی و پارامترهای استرس اکسیداتیو در رت‌های آلزایمری است.

## روش بررسی

در مطالعه انجام شده ۴۲ سر رت نر نژاد ویستار با اوزان  $250 \pm 50$  گرم، از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری شد و به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه تبریز انتقال یافت. رت‌ها به مدت دو هفته برای رسیدن به حالت پایه و رفع استرس در شرایط آزمایشگاه و در شرایط سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند.

KCL ۱۵٪ با نسبت (۱/۱۰ w/v) اضافه گردید. بعد از سانتریفوژ کردن در دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  محلول شفاف رویی از رسوب زیرین جدا گردید تا برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدی:

مالون دی آلدئید حاصل تجزیه پلی اسیدهای چرب غیراشباع است تولید این ماده به عنوان بیومارکری برای سنجش میزان پروکسیداسیون لیپیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس روش اندازه‌گیری MDA بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید است ماده حاصله TBARS می‌باشد که در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارای جذب نوری است. به محلول شفاف به دست آمده از سانتریفوژ، اسید تری کلرواستیک و TBARS اضافه شد و در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفت. مخلوط حاصل پس از سرد شدن، به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شده و جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. غلظت‌های TBARS با استفاده از منحنی استاندارد MDA محاسبه شد که بر حسب nmol/mg پروتئین بیان شده است (۱۳،۱۴).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت کل سوپراکسید دیسموتاز به واسطه روش جنت و همکاران در سال ۲۰۰۲ با اندکی تغییر انجام شد. محلول واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالول، ۷۵۰ میکرولیتر بافر تریس EDTA ۵۰ میکرومولار با  $\text{PH} = ۸/۲$  است. تغییر جذب نوری در ۴۲۰ نانومتر و در هر ۱۵ ثانیه اندازه‌گیری شد. یک واحد آنزیم طبق تعریف مقداری از آنزیم است که باعث مهار نیمی از حداکثر فعالیت اتواکسیداسیون پیروگالول می‌شود (۱۵،۱۶).

آنالیز آماری: داده‌های مربوط به میانگین سرعت شنا، میانگین مدت زمان یافتن سکو، میانگین مسافت طی شده و میزان محصولات پرواکسیداسیون لیپیدی و سوپراکسید دیسموتاز به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (Mean  $\pm$  S.E.M) ارائه گردید و اختلاف معنی‌دار توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت‌ها در سطح  $(P < ۰/۰۵)$  معنی‌دار تلقی گردیده است.

رت‌ها به‌طور تصادفی به شش گروه هفت‌تایی ذیل تقسیم شدند: ۱. گروه کنترل (سالم) ۲. گروه شاهد (روغن کنجد) ۳. گروه آلزایمر (دریافت‌کننده استرپتوزوتوسین (۳ mg/kg)) ۴. گروه آلزایمر به همراه پروژسترون (۲  $\mu\text{g/kg}$ ) ۵. گروه آلزایمر به همراه پروژسترون (۱/۵  $\mu\text{g/kg}$ ) ۶. گروه آلزایمر به همراه پروژسترون (۰/۵  $\mu\text{g/kg}$ ).

رت‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بی‌هوش شده و در دستگاه استرئوتاکسی در موقعیت جمجمه مسطح مستقر گردیدند. پوست ناحیه سر به حداقل میزان برش داده شده، پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و بر اساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس ناحیه مربوط به بطن به صورت دوطرفه مشخص گردید.

رت‌ها در گروه‌های شاهد، دریافت‌کننده استرپتوزوتوسین و گروه‌های آلزایمری دریافت‌کننده پروژسترون تحت جراحی قرار گرفتند و به مدت یک هفته دوره بهبودی را طی نمودند. تزریق داخل مغزی‌ها با استفاده از سرنگ همیلتون ۱۰  $\mu\text{l}$  انجام گرفت. برای القای آلزایمر در گروه‌های ۳-۶، از استرپتوزوتوسین (۳ mg/kg) در حجم ۴  $\mu\text{l}$  در هر بطن و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه استفاده شد.

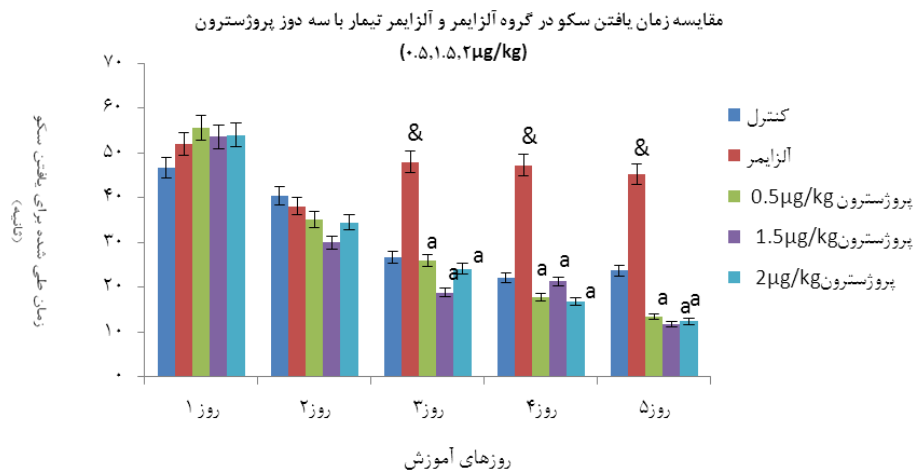
تزریق استرپتوزوتوسین در روزهای اول و سوم انجام شد. القای آلزایمر دو هفته طول کشید. در روز چهاردهم، تزریق دوزهای پروژسترون (۰.۵، ۱/۵، ۲) به میزان ۴  $\mu\text{l}$  در هر بطن انجام شد. نیم ساعت بعد از تزریق روش ماز آبی موریس به مدت پنج روز متوالی برای بررسی پارامترهای حافظه و یادگیری فضایی مورد استفاده قرار گرفت.

۲۴ ساعت بعد از آخرین روز سنجش ماز آبی موریس، تمامی موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بی‌هوش شده سپس سر حیوان بلافاصله توسط گیوتین جدا و بر روی تخته یخ بسته قسمت هیپوکامپ مغز به دقت جدا شد. هیپوکامپ جدا شده بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گردید و تا زمان تهیه هموزن در فریزر دمای  $-۸۰^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید. به منظور تهیه هموزن روی هر یک از نمونه‌ها محلول سرد

## نتایج

حیوانات گروه‌های مختلف طی روزهای آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت. نمودار ۱ مقایسه سرعت شنا بین گروه‌های کنترل، آزایمیری و آزایمیری تیمار با سه دوز پروژسترون ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  و  $1.5$  و  $2$ ) را نشان می‌دهد. نتایج هیچ‌گونه تغییر معنی‌دار را در بین گروه‌ها نشان نمی‌دهد.

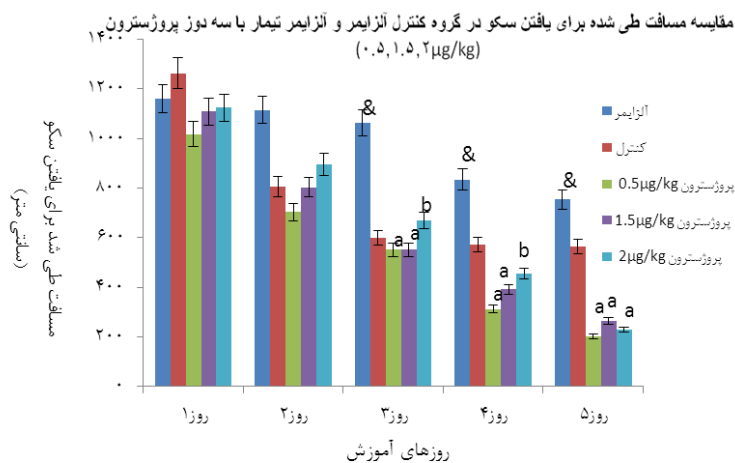
نتایج حافظه فضایی: برای بررسی فرآیند یادگیری و حافظه فضایی در طی روزهای آزمایش، نتایج حاصل از میانگین سرعت شنا، میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو و میانگین مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در



نمودار ۱: مقایسه میانگین مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکو بین گروه‌های کنترل، آزایمیری و آزایمیری تیمار با سه دوز پروژسترون ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  و  $1.5$  و  $2$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده است. تفاوت معنی‌داری در بین سرعت شنا در هیچ یک از گروه‌ها مشاهده نشده است.

سپری شده برای یافتن سکو در گروه آزایمیر نسبت به گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ) و نیز بین گروه‌های آزایمیری تیمار با هر سه دوز پروژسترون در مقایسه با گروه آزایمیر کاهش معنی‌دار آماری مشاهده شد ( $P < 0.001$ ).

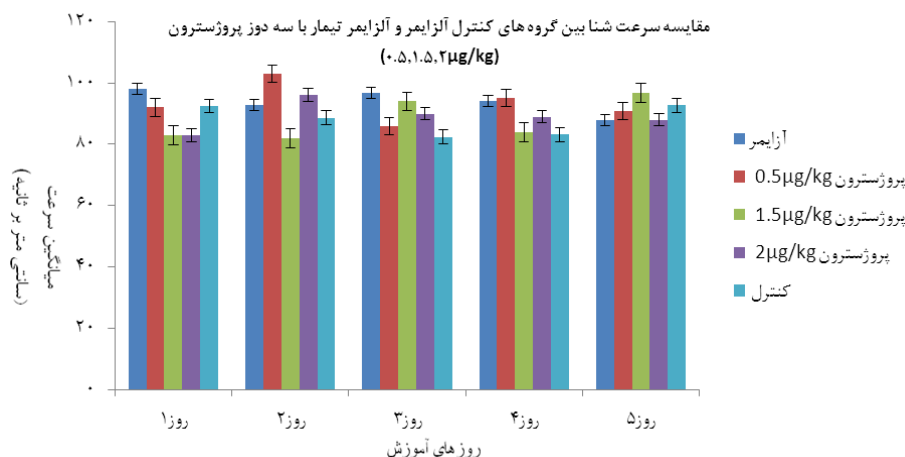
نمودار ۲ مقایسه میانگین مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکو بین گروه‌های کنترل، آزایمیری و آزایمیری تیمار با سه دوز پروژسترون ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  و  $1.5$  و  $2$ ) را نشان می‌دهد. نتایج نشان دهنده افزایش معنی‌دار در مدت زمان



نمودار ۲: مقایسه میانگین مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکو بین گروه‌های کنترل، آزایمیری و آزایمیری تیمار با سه دوز پروژسترون ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  و  $1.5$  و  $2$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با  $P < 0.001$  با حرف  $a$  نسبت به گروه آزایمیری نشان داده می‌شود و حرف  $\&$  بیانگر اختلاف معنی‌دار گروه آزایمیر نسبت به گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ). نتایج نشان دهنده افزایش معنی‌دار در مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو در گروه آزایمیر نسبت به گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ) و نیز بین گروه‌های آزایمیری تیمار با هر سه دوز پروژسترون و گروه آزایمیر کاهش معنی‌دار آماری مشاهده می‌شود ( $P < 0.001$ ).

تیمار با پروژسترون  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  و  $2$  کاهش معنی‌دار نسبت به گروه آلیزیمی دیده شد ( $P < 0.001$ ) همچنین گروه آلیزیمی تیمار با پروژسترون  $1/5 \mu\text{g}/\text{kg}$  کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه آلیزیمی نشان داد ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۳).

مقایسه میانگین مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در گروه‌های کنترل، گروه آلیزیمی و گروه تیمار با سه دوز پروژسترون ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ،  $1/5$  و  $2$ ) نشان داد در گروه آلیزیمی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار در مسافت طی شده برای رسیدن به سکو مشاهده شد ( $P < 0.001$ ) در گروه آلیزیمی



نمودار ۳: مقایسه میانگین مسافت طی شده برای رسیدن به سکو در گروه‌های کنترل، گروه آلیزیمی و گروه تیمار با سه دوز پروژسترون ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ،  $1/5$  و  $2$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با  $P < 0.001$  با حرف a و با  $P < 0.01$  با حرف b نسبت به گروه آلیزیمی بیان شده است و حرف & بیانگر اختلاف معنی‌دار گروه آلیزیم نسبت به گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ). در گروه آلیزیمی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار در مسافت طی شده برای رسیدن به سکو مشاهده شد ( $P < 0.001$ ). در گروه آلیزیمی تیمار با پروژسترون  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  و  $2$  کاهش معنی‌دار نسبت به گروه آلیزیمی دیده شد ( $P < 0.001$ ) همچنین گروه آلیزیمی تیمار با پروژسترون  $1/5 \mu\text{g}/\text{kg}$  کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه آلیزیمی نشان داد ( $P < 0.001$ ).

دوزهای مختلف پروژسترون ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ،  $1/5$  و  $2$ ) تفاوت معنی‌دار آماری را نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ).

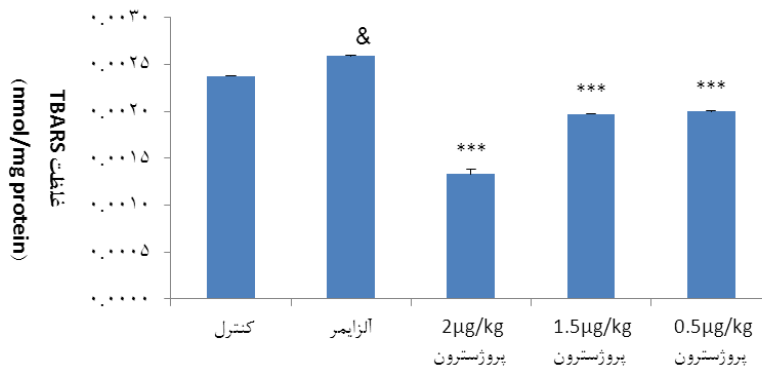
با توجه به آنالیز داده‌های پروکسیداسیون لیپیدی، مقادیر TBARS بین گروه‌های کنترل، شاهد و دوزهای ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ )، ( $1/5$ ) پروژسترون با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار آماری نشان داده شد ( $P < 0.001$ ) ولی بین دوز  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  پروژسترون و گروه کنترل تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد (نمودار ۴).

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های سرعت، طی روزهای آموزش میانگین سرعت شنا بین گروه‌های کنترل، شاهد و گروه آلیزیمی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

نتایج سنجش پروکسیداسیون لیپیدی:

با توجه به آنالیز داده‌های پروکسیداسیون لیپیدی، مقادیر TBARS بین گروه کنترل، شاهد و آلیزیمی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.001$ ). بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های پروکسیداسیون لیپیدی، مقادیر TBARS بین گروه آلیزیم و

نمودار بررسی پراکسیداسیون لیپیدی در گروه کنترل، آلیزایمر و آلیزایمر تیمار با پروژسترون (۰.۵، ۱.۵، ۲ μg/kg)

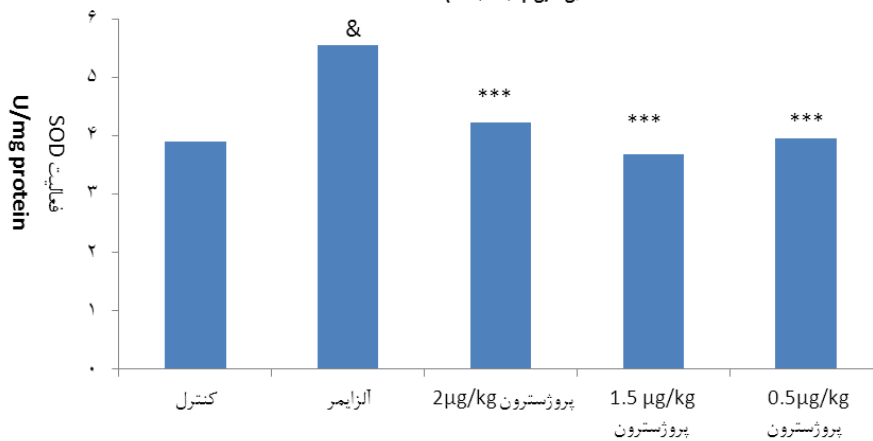


گروه ها

نمودار ۴: نتایج سنجش میزان TBARS برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی در هیپوکمپ موش‌های نر آلیزایمری شده در گروه‌های کنترل، گروه آلیزایمر و آلیزایمر تیمار با پروژسترون (۰.۵ و ۱/۵ و ۲) نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با  $P < 0.001$  با \*\*\* نسبت به گروه آلیزایمری بیان شده است و حرف & بیانگر اختلاف معنی‌دار گروه آلیزایمر نسبت به گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ). بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های پراکسیداسیون لیپیدی، مقادیر TBARS بین گروه آلیزایمری و گروه کنترل تفاوت معنی‌دار آماری دیده می‌شود ( $P < 0.001$ ). گروه‌های آلیزایمر تحت تیمار با دوزهای مختلف پروژسترون (۰.۵ و ۱/۵ و ۲) تفاوت معنی‌دار آماری را نسبت به گروه آلیزایمر نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ).

نتایج سنجش سوپراکسید دیسموتاز: مقایسه داده‌های مربوط به گروه‌های تیمار با هر سه دوز پروژسترون (۰.۵ و ۱/۵ و ۲) نسبت به گروه آلیزایمری کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۵).  
 با توجه به آنالیز داده‌های فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان فعالیت آنزیم SOD در بین گروه آلیزایمری نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار آماری را نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ).

بررسی مادیر سوپراکسید دیسموتاز در گروه کنترل، آلیزایمر و آلیزایمر تیمار با پروژسترون (۰.۵، ۱.۵، ۲ μg/kg)



گروه ها

نمودار ۵: میانگین مقادیر پراکسید دیسموتاز در گروه کنترل، گروه آلیزایمر و گروه‌های آلیزایمری تیمار با ۳ دوز مختلف پروژسترون (۰.۵ و ۱/۵ و ۲). نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با  $P < 0.001$  با \*\*\* نسبت به گروه آلیزایمری بیان شده است و حرف & بیانگر اختلاف معنی‌دار گروه آلیزایمر نسبت به گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ). با توجه به آنالیز داده‌های فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان فعالیت آنزیم SOD در بین گروه آلیزایمری نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار آماری را نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ). مقایسه داده‌های مربوط به گروه‌های تیمار با هر سه دوز پروژسترون ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه آلیزایمری کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.001$ ).

## بحث

در بررسی حاضر تأثیر تزریق داخل بطنی پروژسترون با سه دوز مختلف، به صورت مجزا بر روی حافظه فضایی و وضعیت اکسیداتیو نمونه‌های تجربی آلزایمر مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق داخل مغزی استرپتوزوتوسین موجب تخریب یادگیری و حافظه فضایی و نیز افزایش استرس اکسیداتیو در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. تزریق پروژسترون اختلالات یادگیری، حافظه فضایی و استرس اکسیداتیو ناشی از القای استرپتوزوتوسین را در رت‌های آلزایمری بهبود بخشید.

پیشنهاد شده که ریزتزریق استرپتوزوتوسین به مغز سبب مهار ترانسپورتر گلوتامات (GLUT2) شده و اختلال متابولیسم انسولین در مغز را سبب می‌شود و این مقاومت در برابر انسولین به طور عمده با کاهش در عملکرد شناختی، افزایش متابولیسم مغزی و هیپرفوسفوریلاسیون پروتئین تائو همراه است (۱۷).

تزریق داخل مغزی استرپتوزوتوسین اثرات عمیق و طولانی‌مدتی در بیوشیمی مغز، متابولیسم و عملکرد مغز از جمله کاهش جذب قند و مصرف انرژی، افزایش لاکتات خروجی، کاهش ذخیره فسفولیپیدی، استرس اکسیداتیو بافت و به خطر افتادن عملکرد شناختی و حرکتی را به همراه دارد (۱۷). Markesbery و همکاران افزایش اکسیداسیون لیپید و پروتئین و نوکلئیک اسید را در بیماری آلزایمر اثبات کرده‌اند (۱۸) که این افزایش اکسیداسیون لیپیدی‌ها خون با مطالعه حاضر است.

بررسی‌های انجام شده توسط علی پور این نکته را تأکید می‌کند که تزریق استرپتوزوتوسین با دوز ۳ mg/kg سبب افزایش آپوپتوز در هیپوکمپ می‌شود که این خود در کاهش حافظه فضایی نقش دارد (۱۹). در تحقیقات انجام شده توسط دهقانی نیز نشان داده شده که تزریق STZ به هیپوکمپ سبب اختلال در حافظه فضایی و کاهش یادگیری نسبت به گروه کنترل می‌شود (۲۰). این موضوع با مطالعه حاضر سازگار است و در گروه دریافت کننده STZ فاکتورهای حافظه

فضایی و نیز استرس اکسیداتیو نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است.

شواهد نشان می‌دهد که پروژسترون در مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی در مغز نقش ایفا می‌کند. خواص آنتی‌اکسیدانی پروژسترون در پاسخ به استرس اکسیداتیو ناشی از آهن در سلول‌های عصبی گزارش شده است. مطالعاتی که توسط ایران منش و همکاران انجام شد نشان می‌دهد که هورمون درمانی با پروژسترون در بیماران مبتلا به آلزایمر مفید واقع شده است (۲۱).

مطالعه انجام شده توسط شهرپور و همکاران این موضوع را اثبات کرده که دوزهای کم پروژسترون به طور معنی‌داری حافظه و یادگیری احترازی غیرفعال را افزایش می‌دهد اما مقادیر زیاد پروژسترون تأثیر معنی‌داری در حافظه و یادگیری ندارد (۲۲). با توجه به این که در این مطالعه از دوزهای کم پروژسترون استفاده گردید در تمامی گروه‌های تیمار با پروژسترون شاهد افزایش حافظه فضایی همراه با بهبود پارامترهای سنجش حافظه فضایی شامل زمان رسیدن به سکو و نیز کاهش مسافت طی شده نسبت به گروه آلزایمری بودیم.

در تحقیقات انجام گرفته توسط پالیزوان و همکاران، تزریق پروژسترون (با دوز ۱۰۰ mg به ازای هر کیلوگرم) به صورت صفاقی، بر روی حافظه فضایی رت‌های تازه متولد شده تأثیر منفی داشت و سبب کاهش حافظه فضایی گردید (۲۳) که بامطالعه حاضر مغایرت دارد.

به طور کلی نتایج به دست آمده در این مطالعه در زمینه مورد اثرات پروژسترون در افزایش حافظه فضایی با نتایج به دست آمده توسط Patrick T و همکاران که پروژسترون را به هیپوکمپ تزریق کردند و نیز نتایج به دست آمده توسط Frye CA و نیز Walf و همکاران مطابقت دارد (۲۴-۲۶). فردوسی و همکاران در مطالعه اثرات هورمون پروژسترون بر استرس اکسیداتیو به این نتیجه رسیدند که هورمون پروژسترون در دوزهای پایین اثر افزایشی بر سطوح آنزیم SOD و MDA دارد ولی در دوزهای التهاب زا اثر کاهشی بر فعالیت‌های آنزیم‌ها دارد

مطالعه در این بررسی، رت‌های نر دریافت‌کننده پروژسترون در حضور و عدم حضور ویتامین ث در یک دوره پنج روزه است که از محدودیت این مطالعه است. پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های بعدی این اثر بر روی رت‌های ماده فاقد تخمدان بررسی گردد.

#### سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد بوده و بدین وسیله از معاونت پژوهشی محترم دانشگاه تبریز در تأمین اعتبار لازم قدردانی می‌گردد.

که این با نتایج ما سازگار نیست (۲۷). تحقیقات انجام شده توسط Unfer T C نشان‌گر تأثیر آنزیم پروژسترون بر روی آنزیم SOD است (۲۸) که این موضوع نیز با نتایج ما سازگاری داشت.

به طور کلی می‌توان چنین نتیجه گرفت که ارائه پروژسترون در دوزهای کم، قادر است اختلالات شناختی بیماران آلزایمری را که در بیشتر مواقع به دلیل افزایش استرس اکسیداتیو است، بهبود بخشیده یا به سطح کنترل نزدیک نماید. با این حال مطالعات تکمیلی با جزئیات بیشتر تاکید می‌گردد. جامعه مورد

#### References:

- 1- Somasundaram R, Dhanaraju MD, Sanjay AS. *ALZHEIMER'S DISEASE AND POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS*. Pharmacie Globale (IJCP) 2013; 4(5): 1.
- 2- Elsayad C, Madeo J. *The Role of Oxidative Stress in Alzheimer's disease, Madeo and Elsayad*. J Alzheimer's Dis Parkinsonism 2013; 3: 2.
- 3- Melcangi RC, Giatti S, Calabrese D, Pesaresi M, Cermenati G, Mitro N, et al. *Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions*. Progress in Neurobiology 2014; 113: 56-59.
- 4- Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. *Allan Butterfield. Different Mechanisms of Oxidative Stress and Neurotoxicity for Alzheimer's A $\beta$ (1-42) and A $\beta$ (25-35)*. J Am Chem Soc 2001; 123(24): 5625-31.
- 5- Stein DG, Hoffman SW. *Estrogen and progesterone as neuroprotective agents in the treatment of acute brain injuries*. Pediatr Rehabil 2003; 6(1): 13-22.
- 6- Rosario ER, Ramsden M, Pike CJ. *Progestins inhibit the neuroprotective effects of estrogen in rat Hippocampus*. Brain research 2006; 1099(1): 206-210.
- 7- Massafra C, Gioia D, De Felice C, Muscettola M, Longini M, Buonocore G. *Gender-related differences in erythrocyte glutathione peroxidase activity in healthy subjects*. Clin Endocrinol 2002; 57(5): 663-667.
- 8- Elsayad C, Madeo J. *The Role of Oxidative Stress in Alzheimer's disease. Madeo and Elsayad*. J Alzheimer's Dis Parkinsonism 2013; 3: 2.
- 9- Martins RN, Harper CG, Stokes GB, Masters CL. *Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress*. J Neurochem 1986; 46(4): 1042-1045.



- 10- Smith MA, Hirai K, Hsiao K, Pappolla MA, Harris PL, Siedlak SL, et al. *Amyloid-<sub>β</sub> deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress*. J Neurochem 1998; 70(5): 2212-2215.
- 11- Šalković-Petrišić M, Knezović 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?* Journal of Neural Transmission 2013; 120(1): 233-52.
- 12- Markesbery WR, Carney JM. *Oxidative alterations in Alzheimer's disease*. Brain Pathol 1999; 9(1): 133-146.
- 13- Mahadik SP, Mukherjee S, Correnti I, Sheffer R. *Elevated levels of lipid peroxidation products in plasma from drug-naive patients at onset of psychosis*. Schizophr Res 1995; 15: 6670.
- 14- Kuloghi M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezean AE, Cinkiline N. *Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder*. Cell Biochem Funct 2002; 20(2): 171-175.
- 15- Reddy R, Sahebarao MP, Mukherjee S, Murthy JN. *Enzymes of the antioxidant system in chronic schizophrenic patients*. Biol Psychiatry 1991; 30(4): 409-12.
- 16- Sugino N, Karube-Harada A, Kashida S, Takiguchi S, Kato H. *Differential regulation of copper- zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells*. Molecular Human Reproduction 2002; 8(1): 68-74.
- 17- Šalković-Petrišić M, Knezović 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*. Journal of Neural Transmission 2013; 120(1): 233-52.
- 18- Markesbery WR, Carney JM. *Oxidative alterations in Alzheimer's disease*. Brain Pathol 1999; 9(1): 133-146.
- 19- Mohammadzadeh E, Alipour F, Khallaghi B. *Evaluation of Spatial Memory Impairment after Intracerebroventricular Streptozotocin Injection in Adult Rats*. Shefaye Khatam 2014; 2(1): 40-5.
- 20- Dolatabadi HRD, Reisi P, Malekabadi HRA, Alaei H, Pilehvarian AA. *Effects of Folic Acid on Passive Avoidance Learning and Memory in Rat Alzheimer Model by Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin*. J Isfahan Med School 2010; 28(112).
- 21- Iranmanesh F, Sayyadi A, Fayegh A, Shafiee Z. *Surveying of estrogen and progesterone effect on electroencephalogram and mini-mental status examination (MMSE) in female patients with Alzheimer's*. Dis Birjand Univ J 2004; 13(2): 9-15.
- 22- Shahrivar T, Moazedi AA, Rasekh AR, Almasi-Turk S, Roozbehi A. *The effects of intrahippocampus injection of progesterone on passive avoidance learning and memory in adult male rats*. ISMJ 2014; 17(4): 524-532.

- 23- Rajabian H, Mirzazadeh E, Jand Y, Rad G. *Effect of progesterone administration in newborns rats on Morris Water Maze learning susceptibility after adolescence*. J Arak Univ Med Sci 2009; 11(4): 23-31.
- 24- Orr PT, Lewis MC, Frick KM. *Dorsal hippocampal progesterone infusions enhance object recognition in young female mice*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 2009; 93(2): 177-182.
- 25- Frye CA, Lacey EH. *Progestins influence performance on cognitive tasks independent of changes in affective behavior*. Psychobiology 2000; 28(4): 500-63.
- 26- Walf AA, Rhodes ME, Frye CA. *Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats*. Neurobiol Learn Mem 2006; 86(1): 35-64.
- 27- Ferdowsi K, Hatami H, Dehghan G. *Evaluation the Simultaneous Effects of Progesterone and Vitamin C on Anxiety in Male Wistar Rats*. Armaghane-danesh, Yasuj Univ Med Sci J(YUMSJ) 2015; 20(6): 516-525.
- 28- Unfer TC, Maurer LH, Kemerich DM, Figueiredo CG, Duarte MMF, Gelain DP, et al. *Non-genomic, direct modulatory effect of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone and their synthetic derivatives on the activity of human erythrocyte CuZn superoxide dismutase*. Free Radic Res 2013; 47(3): 219-32.

## ***The Effect of Progesterone on Lipid Peroxidation and in Rat Alzheimer Model by Local Injection of Streptozotocin***

Maryam Mozafari (Msc student)<sup>1</sup>, Homeira Hatami (PhD)<sup>\*2</sup>  
Seyed Mahdi Banan (PhD)<sup>3</sup>, Golamreza Dehgan (PhD)<sup>4</sup>

<sup>1-4</sup> Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received: 10 Jan 2016

Accepted: 2 Jun 2016

### ***Abstract***

**Introduction:** Alzheimer's disease is one of the most prevalent brain neurodegenerative diseases and the most common cognitive deficits are memory dysfunction and spatial perception impairment. Progesterone has a neurosteroid action in hippocampal neurogenesis, synaptic stability and spatial learning and memory and has antioxidant effect. Since oxidative stress is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, and conflicting results were reported about the effects of progesterone on therefore in Alzheimer's, the present study investigated the effect of microinjection of three doses of progesterone on the process of spatial memory and lipid peroxidation and total peroxidation in the hippocampus in the experimental model of AD.

**Methods:** 42 adult male Wistar rats weighting  $250 \pm 50$  g were randomly divided into six main groups (n=7): control group, sham group, Alzheimer's model (intracerebroventricular injection of streptozotocin), Alzheimer model + progesterone (0.5, 1.5, 2  $\mu$ g/kg). 2 weeks after injection of streptozotocin (3 mg/kg), Alzheimer's was induced then progesterone injected in different doses. After termination of behavioral testing days, the hippocampus was removed to measure the levels of oxidative stress parameter to measure levels of oxidative stress parameters. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA).

**Results:** Results showed that intraventricular injection of STZ decreased spatial memory in comparison to control group (P<0.001). Administration progesterone significantly improved spatial memory in experimental models of Alzheimer's rats (P<0.001). MDA and SOD in all doses of progesterone showed a significant reduction compared to the AD animals (P<0.001).

**Conclusion:** Progesterone can prevent a decrease in spatial learning and memory by reducing oxidative stress in the hippocampus of rats with Alzheimer's.

**Keyword:** Alzheimer; Spatial Memory; Progesterone; Peroxidation

### ***This paper should be cited as:***

Maryam Mozafari, Homeira Hatami, Seyed Mahdi Banan, Golamreza Dehgan. *The effect of progesterone on lipid peroxidation and in rat alzheimer model by local injection of streptozotocin.* J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(7): 587-97.

**\*Corresponding author: Tel: 04133392740, email: homeirahatami@yahoo.com**