

بررسی تأثیر اواریکتومی بر حافظه‌ی شناختی و یادگیری در موش‌های صحرایی مدل آنزایمری القا شده با اسکوپولامین

رشاد رضاپور^۱، هیوا عثمانی^۱، افسانه جابری اصل^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر (AD (Alzheimer's disease)، یک بیماری پیشرونده و جزء شایع‌ترین اختلالات نورودژنراتیو می‌باشد. بیماری آلزایمر باعث اختلال در حافظه، یادگیری و سایر عملکردهای مهم ذهنی می‌شود. هدف این مطالعه، تأثیر اواریکتومی بر حافظه‌ی شناختی و یادگیری در مدل موش AD القا شده با اسکوپولامین می‌باشد.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر ۳۲ موش صحرایی ماده نژاد ویستار (وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم) در چهار گروه شاهد، اواریکتومی (OVX)، آلزایمری (AD) و اواریکتومی + آلزایمری (AD+OVX) تقسیم شد. مدل آلزایمری توسط تزریق اسکوپولامین، ۱ mg/kg بصورت داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز القا شد. حافظه‌ی کوتاه‌مدت و یادگیری غیر اجتنابی به ترتیب توسط آزمون رفتاری ماز Y شکل و شاتل باکس ارزیابی شد. برای ارزیابی میزان تخریب نورونی در ناحیه‌ی CA1 نمونه‌های بافت هیپوکامپ از روش رنگ‌آمیزی نیسل استفاده گردید. داده‌ها توسط آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون تقریبی Tukey در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ آنالیز گردید.

یافته‌ها: بر طبق آزمون ماز، شاخص درصد تناوب در گروه OVX، AD و AD+OVX کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. بر اساس آزمون شاتل باکس، میانگین مدت ورود به ناحیه‌ی تاریک در گروه OVX، AD و AD+OVX کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. نتایج رنگ‌آمیزی نیسل نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های زنده در گروه OVX، AD و AD+OVX نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: محرومیت از استروژن ناشی از OVX می‌تواند اثرات تشدید کننده‌ای در علائم ناشی از آلزایمر بر حافظه‌ی شناختی، یادگیری و همچنین آسیب نورونی داشته باشد.

واژگان کلیدی: اواریکتومی؛ حافظه؛ یادگیری؛ بیماری آلزایمر؛ اسکوپولامین

ارجاع: رضاپور رشاد، عثمانی هیوا، جابری اصل افسانه. بررسی تأثیر اواریکتومی بر حافظه‌ی شناختی و یادگیری در موش‌های صحرایی مدل آلزایمری القا شده با اسکوپولامین. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۷۹۲): ۱۰۲۷-۱۰۳۶.

مقدمه

بیماری آلزایمر (AD (Alzheimer's disease)، یک بیماری پیشرونده و جزء شایع‌ترین اختلالات نورودژنراتیو می‌باشد. این بیماری باعث اختلال در حافظه، یادگیری و سایر عملکردهای مهم ذهنی می‌شود. در مراحل اولیه، از دست دادن حافظه خفیف است، اما در مرحله آخر آلزایمر، افراد توانایی ادامه‌ی مکالمه و واکنش به محیط خود را از دست می‌دهند (۱). دو ویژگی هیستوپاتولوژیکی پلاک‌های آمیلوئید و پیچ‌خوردگی‌های نوروفیبریلاری (NFTs) در بیماری آلزایمر مشهود می‌باشد. به علت تجمع بیشتر این عوامل پاتولوژیکی در نواحی از مغز

همچون هیپوکامپ که در فرایند یادگیری و حافظه درگیر هستند، اختلال در عملکرد شناختی همراه با آسیب سلول‌های مغز در AD مشاهده می‌شود (۲).

تاکتون ریسک فاکتورهای مهم و متعددی از AD توسط مطالعات اپیدمیولوژیک شناسایی شده است. با این حال، سن، جنسیت و جهش ژنتیکی به عنوان سه عامل خطر اصلی مورد توجه قرار گرفته است. با افزایش سن، خطر ابتلا به AD نیز افزایش می‌یابد (۳)، همچنین شیوع این بیماری در زنان یائسه، به دلیل کاهش تولید هورمون‌های استروئیدی تخمدان‌ها از قبیل $\beta 17$ -استرادیول (E2) و پروژسترون

۱- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- دانشجو کارشناسی ارشد، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- دانشجو دکتری، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: افسانه جابری اصل: دانشجو دکتری، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

Email: afsane.ja110@gmail.com

روش‌ها

الف) موش‌ها و گروه‌های مورد مطالعه

در مطالعه‌ی حاضر، ۳۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار (وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم) از مرکز مطالعات تجربی و مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری شد. موش‌ها در قفس‌های جداگانه و در حیوان خانه دانشگاه با دمای $25/2 \pm 3$ درجه‌ی سانتی‌گراد و آب و غذای کافی (۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. این طرح دارای کد اخلاق به آدرس IR.IUMS.FMD.REC.1401.132 از کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران می‌باشد.

موش‌ها در چهار گروه (هر گروه شامل ۸ موش) بصورت زیر تقسیم‌بندی شدند: گروه اول: شاهد (Control)، گروه دوم: اورایکتومی شده (OVX)، گروه سوم: آلزایمری (AD)، گروه چهارم: اورایکتومی شده + آلزایمری (AD+OVX).

ب) طراحی مطالعه

در روز اول، موش‌ها ابتدا توسط کتامین و زایلازین (mg/kg) ۱۲۵ و ۲۵ (بترتیب) بصورت داخل صفاقی بیهوش شدند (۱۵). در جراحی اورایکتومی ابتدا یک برش به طول ۱ سانتی‌متر در سطح شکمی موش، بالاتر از سوراخ ادراری ایجاد شد. سپس با یافتن رحم دو شاخه و در ادامه‌ی آن لوله‌ی رحمی تخمدان‌ها مشخص گردیدند، لوله‌ی رحمی در دو طرف توسط نخ سیلک گره زده شد و سپس تخمدان‌های دو طرف از بدن خارج گردید. در انتها عضلات و پوست توسط نخ سیلک (کات سه صفر) بخیه زده شد. همچنین از تتراسایکلین و کتورولاک (به عنوان آنتی‌بیوتیک و ضد درد؛ به ترتیب) در موضع جراحی استفاده شد. پس از گذشت سه هفته از جراحی اورایکتومی، برای القای مدل آلزایمری به موش‌ها از اسکوپولامین هیدروبروماید (سیگما، آمریکا) محلول در سالین فیزیولوژیک استفاده شد. اسکوپولامین با دوز تزریقی $1mg/kg$ بصورت داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز به موش‌ها تزریق شد (۱۶). پس از گذشت دو هفته، تست‌های رفتاری ماز Y شکل و شاتل باکس جهت بررسی حافظه‌ی کوتاه‌مدت و اجتنابی غیرفعال مورد بررسی قرار گرفت. موش‌ها پس از بیهوشی کامل قربانی شده و مغز آن‌ها جهت بررسی‌های بافتی خارج گردید. طراحی مطالعه در شکل ۱ نمایش داده شده است.

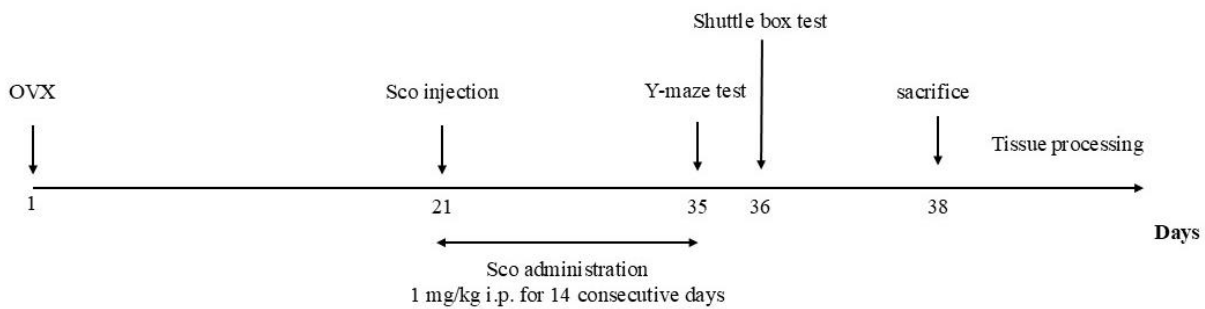
ث) آزمون رفتاری ماز Y شکل

تست ماز Y شکل برای بررسی حافظه‌ی کوتاه‌مدت موش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ماز Y شکل از سه بازوی پلاستیکی مشابه (۵۰ سانتی‌متر \times ۱۰ سانتی‌متر \times ۱۰ سانتی‌متر) که با زاویه‌ی ۱۲۰ درجه نسبت به یکدیگر قرار گرفته‌اند تشکیل شده است. بازوها با حروف انگلیسی نام‌گذاری شدند. همچنین علائم دیداری در اتاق و

(PG)، بالا است. همچنین کاهش سطح این هورمون‌ها بدنبال مداخلات درمانی مانند برداشتن تخمدان‌ها در سننن باروری نیز می‌تولند بر عملکردهای شناختی تأثیر بگذارد. در طی چهار دهه‌ی اخیر مطالعات زیادی در ارتباط با اثر هورمون‌های استروئیدی جنسی بر روی سیستم عصبی انجام شده است (۴-۶) که نشان‌دهنده‌ی دخالت فاکتور(های) خاص جنسیتی در پاتوژنز AD است و مطالعات نشان می‌دهند که ریسک ابتلا به بیماری آلزایمر و سایر بیماری‌های نورودژنراتیو در زنان اورایکتومی شده افزایش می‌یابد (۷). در زنان یائسه، رسوب بتا آمیلوئید و کاهش چگالی نورونی و نورونزنیس مشاهده می‌شود (۸، ۹).

هورمون‌های استروئیدی به علت اندازه و وزن کم به راحتی از سد خونی مغزی عبور نموده و بر اساس زمان تأثیرگذاری از طریق اثرات ژنومیک یا غیرژنومیک باعث تغییرات در ساختار و عملکرد بافت عصبی می‌گردند (۱۰، ۱۱). استروژن، که به دسته‌ی نورواستروئیدها تعلق دارد، در شناخت، حافظه و همچنین رفتار جنسی دخیل می‌باشد، دارای چهار فرم استروژنی است که E2 یا استرادیول قوی‌ترین و بیشترین تأثیر را دارد و به راحتی از سد خونی-مغز عبور می‌کند. از دست دادن اثر تقویت شناختی استروژن با افزایش سن احتمالاً با تغییرات در بیان و سیگنال‌دهی گیرنده‌های استروژن از جمله $ER\alpha$ و $ER\beta$ در نواحی مختلف مغز مرتبط است (۱۲). پروژسترون نیز هورمونی است که اثراتی مشابه استروژن دارد (۱۳). کاهش سطح استروژن به دنبال اورایکتومی طولانی‌مدت منجر به تغییرات و کاهش قابل توجه $ER\alpha$ در هیپوکامپ می‌شود (۱۴). به طوری که بهبود اختلال حافظه در موش‌های صحرایی اورایکتومی با تجویز یک آگونیست $ER\alpha$ مشاهده شد که این اهمیت گیرنده‌های $ER\alpha$ را در حفظ عملکرد حافظه نشان می‌دهد (۱۳).

در این پژوهش، تأثیر اورایکتومی بر حافظه و یادگیری در مدل موش‌های آلزایمری القا شده با اسکوپولامین مورد بررسی قرار گرفته است. این تحقیق با بهره‌گیری هم‌زمان از آزمون‌های شاتل باکس و ماز Y شکل برای ارزیابی حافظه شناختی، همراه با روش‌های هیستولوژیکی مانند رنگ‌آمیزی نیسل، رویکردی نوین به درک اثرات هم‌زمان کاهش هورمون‌های جنسی و نقص‌های شناختی ناشی از آلزایمر ارائه می‌دهد. ترکیب این دو عامل، تصویری جدید از تأثیرات هورمون‌های جنسی در زوال شناختی به دست می‌دهد. با توجه به اینکه محرومیت از استروژن می‌تواند اثراتی مشابه آلزایمر ایجاد کند و احتمال بروز هم‌زمان این دو عارضه وجود دارد، این مطالعه به بررسی تأثیر اورایکتومی بر حافظه و یادگیری در موش‌های آلزایمری پرداخته تا مشخص شود آیا این شرایط می‌تواند یادگیری، حافظه و مرگ سلولی را در بیماران آلزایمری تحت تأثیر قرار دهد یا خیر؟



شکل ۱. طراحی مطالعه.

تاریک یادداشت شد که به عنوان زمان سپری شده در اتاق تاریک (Time spent in dark chamber) TDC در ۲۴ ساعت بعد از آموزش و اعمال شوک در نظر گرفته شد (۱۸).

ج) آماده‌سازی بافت مغز و تهیه لام
موش‌ها توسط کتامین (۱۲۵mg/kg) و زایلازین (۲۵mg/kg) بیهوش گردیدند. سپس از انتهای استخوان جناغ قفسه سینه موش برداشته شد و قلب حیوان نمایان گشت و سوزن متصل به دستگاه پرفیوژن وارد بطن چپ موش شد و سپس با ایجاد برشی در دهلیز راست خون از قلب خارج گشت و سرم فیزیولوژیک در رگ‌ها به گردش درآمد. در ادامه پس از اتمام سرم، فیکساتیو (پارافرمالدهید ۴ درصد) وارد گردش عمومی خون شد و بافت‌های بدن موش فیکس شدند (۱۹). سپس مغز موش خارج گردید و به مدت دو روز در فیکساتیو و سپس سه روز در سوکروز ۳۰ درصد قرار داده شد. برش‌های کرونال از ناحیه‌ی هیپوکامپ مغز توسط دستگاه کرایوسکشن و با ضخامت ۲۰ میکرومتر بصورت سریالی تهیه گشت و به لام‌های ژلاتینه شده منتقل گردیدند (۲۰، ۲۱).

چ) رنگ‌آمیزی نیسل و شمارش سلولی
تمامی لام‌های تهیه شده از ناحیه‌ی هیپوکامپ با رنگ کرزیول ویوله ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شدند. سپس عکس‌هایی از ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ توسط میکروسکوپ نوری با دو بزرگنمایی ۱۰× و ۲۰× تهیه گشت و با استفاده از نرم‌افزار ImageJ سلول‌های زنده این ناحیه مورد شمارش قرار گرفت. تمامی شمارش‌های نورونی این ناحیه با چارچوبی یکسان در تمامی برش‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۷ GraphPad و (version 27, IBM Corporation, Armonk, NY) prism نسخه‌ی ۱۰ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون تقریبی Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری در این مطالعه کمتر از ۰/۰۵ بود ($P \leq 0/05$).

بر روی دیوارها نصب گردید. برای ارزیابی حافظه‌ی کوتاه‌مدت، موش‌ها در ماز قرار داده شدند تا به مدت ۱۰ دقیقه این دو بازو را مورد بررسی قرار دهند، سپس بعد از ۹۰ دقیقه اینترنتال دوباره درون ماز قرار داده شدند تا هر سه بازو را مورد بررسی قرار دهند (۱۷). در این تست، درصد تناوب ورود به هر بازو و همچنین تعداد دفعات ورود به هر بازو مورد بررسی قرار گرفته است.

ت) آزمون رفتاری شاتل باکس

جهت بررسی یادگیری غیراجتنابی تست شاتل باکس مورد استفاده قرار گرفت. این دستگاه از دو قسمت محفظه‌ی اصلی و جعبه‌ی کنترل تشکیل شده است. محفظه‌ی اصلی به ابعاد ۲۰×۴۰×۲۰ سانتی‌متر می‌باشد کف محفظه به میله‌های فلزی رسانای جریان الکتریکی مجهز گردید. محفظه‌ها توسط دیواره‌ای به دو اتاقک روشن و اتاقک تاریک تقسیم شدند. ابتدا موش‌ها جهت سازش وارد دستگاه شدند، به این ترتیب که درب بین دو محفظه برداشته شده و به هر موش اجازه داده شد بین محفظه‌ها رفت و آمد کنند. در طی مرحله‌ی یادگیری موش‌ها ابتدا در اتاقک روشن به مدت ۵ ثانیه قرار گرفتند، سپس درب گیوتینی باز شد و موش‌ها آزادانه به داخل اتاقک تاریک حرکت کردند. بلافاصله بعد از ورود به اتاقک تاریک، درب بین دو محفظه بسته شد و شوک الکتریکی با فرکانس ۵۰ هرتز، یک میلی‌آمپر به مدت ۵ ثانیه به پای حیوان اعمال گردید. پس از ۲۰ ثانیه، موش‌ها به قفس خانه خود بازگردانده شدند. دو دقیقه بعد، موش‌ها مجدداً در اتاقک روشن قرار گرفتند و تأخیر در ورود به محفظه‌ی تاریک ثبت شد.

۲۴ ساعت بعد از مرحله‌ی آموزش هر موش در اتاقک روشن (درحالی که درب گیوتینی بسته بود) قرار داده شد و ۱۰ ثانیه بعد درب گیوتینی باز گشت و زمان تأخیر در ورود به اتاقک تاریک به عنوان (Step through latency) STL یادداشت گردید. حداکثر زمان برای تأخیر در ورود به جعبه تاریک تا ۶۰۰ ثانیه ثبت گردید، بعد از آنکه موش به قسمت تاریک رفت مدت زمان سپری شده در جعبه‌ی

یافته‌ها

الف) ارزیابی حافظه‌ی کوتاه‌مدت

آزمون ماز Y شکل جهت ارزیابی حافظه کوتاه مدت از نوع بازشناختی انجام شد. میانگین و انحراف معیار درصد تناوب در گروه شاهد (۷۴/۱۳ ± ۸/۶۵)، OVX (۴۸/۸۸ ± ۸/۳۵)، AD (۲۷/۹۵ ± ۳۸/۱۳) و AD+OVX (۲۰/۵۰ ± ۶/۵۲) بدست آمد. با توجه به شکل ۲ (A) بین میانگین درصد تناوب در گروه OVX، AD، AD+OVX و AD+OVX کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (P < ۰/۰۰۰۱). علاوه بر این، تفاوت در گروه AD+OVX نیز نسبت به گروه OVX (P < ۰/۰۰۰۱) و AD (P < ۰/۰۰۱) معنی‌دار بوده است.

میانگین و انحراف معیار تعداد کل بازوهای که هر حیوان وارد آنها شده است در گروه شاهد (۲۹/۵۰ ± ۴/۰۰)، OVX (۲۷/۵۳ ± ۲/۱۳)، AD (۲۰/۶۳ ± ۴/۱۰) و AD+OVX (۱۴/۵۰ ± ۳/۸۹) بدست آمد. با توجه به شکل ۲ (B) بین میانگین تعداد کل وارد شدن به هر بازو که در این آزمون شاخصی از میزان توانایی حرکتی حیوان می‌باشد، در گروه OVX، AD، AD+OVX و AD+OVX نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت (P < ۰/۰۰۰۱). علاوه بر این، تفاوت در گروه AD+OVX نیز نسبت به گروه OVX (P < ۰/۰۱) و AD (P < ۰/۰۵) معنی‌دار بوده است.

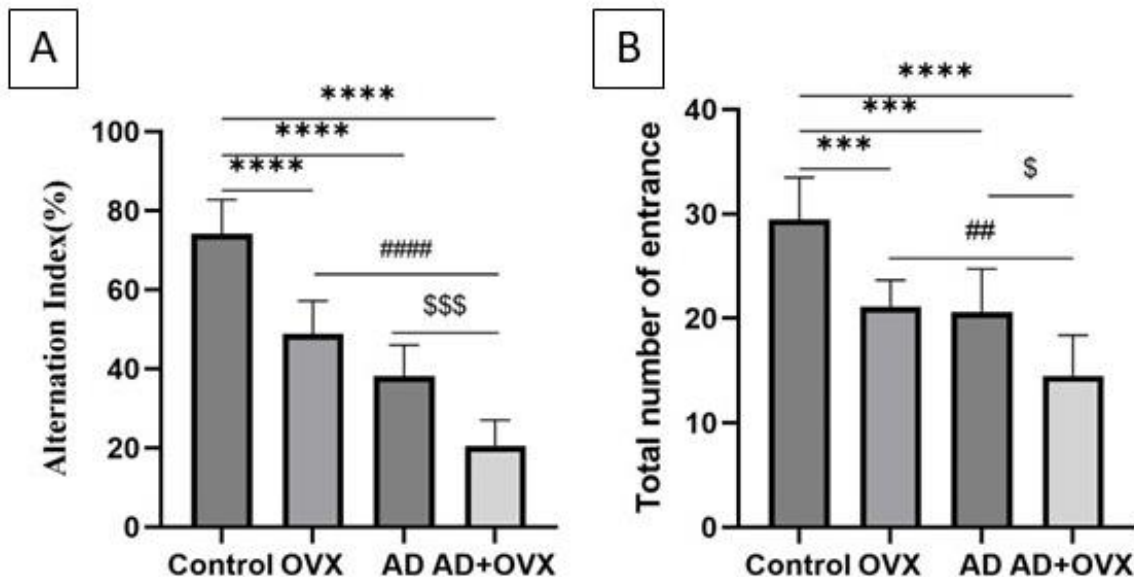
ب) ارزیابی یادگیری و حافظه‌ی اجتنابی غیرفعال (Passive Avoidance Test)

آزمون شاتل باکس جهت ارزیابی یادگیری و حافظه‌ی اجتنابی غیرفعال انجام شد. میانگین و انحراف معیار STL در گروه شاهد (۵۲۱/۵ ± ۳۲/۵۷) و OVX (۳۵۸/۰ ± ۳۵/۵۰)، AD (۵۲/۰۴ ± ۵۲/۰۴) و AD+OVX (۲۹۲/۴ ± ۱۱/۴۴) بدست آمد. با توجه به شکل ۳ (A) میانگین مدت ورود به ناحیه‌ی تاریک در گروه OVX، AD، AD+OVX و AD+OVX کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (P < ۰/۰۰۰۱). همچنین، تفاوت در گروه AD+OVX نیز نسبت به گروه OVX (P < ۰/۰۰۰۱) و AD (P < ۰/۰۰۰۱) معنی‌دار بوده است.

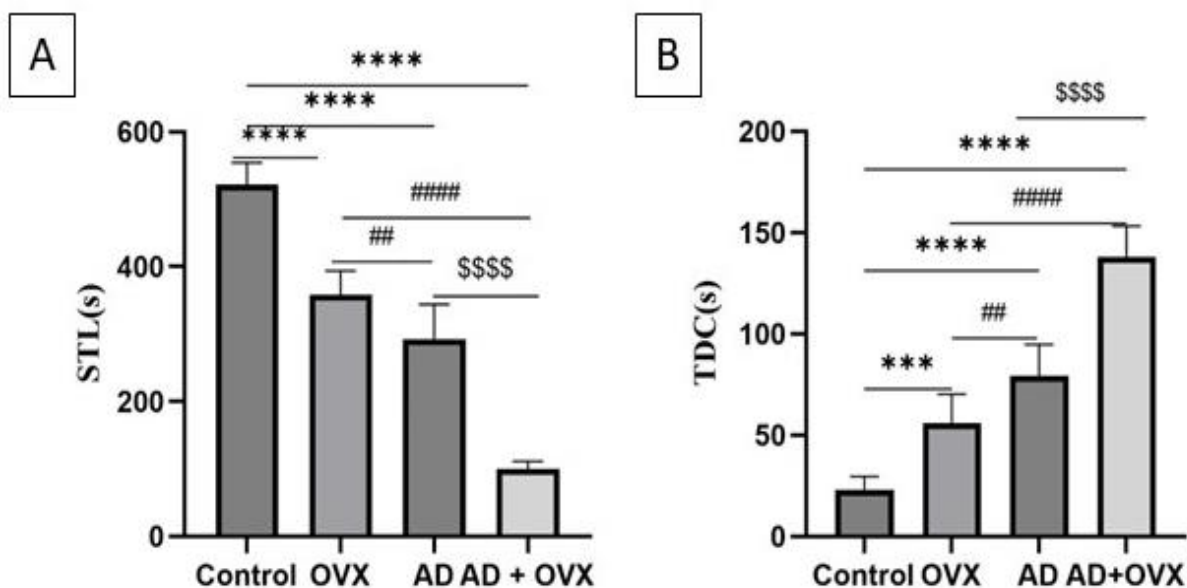
میانگین و انحراف معیار TDC را در گروه شاهد (۲۲/۸۸ ± ۶/۷۰)، OVX (۵۶/۰۰ ± ۱۴/۳۳)، AD (۷۹/۲۵ ± ۱۵/۴۴) و AD+OVX (۱۳۸/۱ ± ۱۵/۰۸) بدست آمد. با توجه به شکل ۴ (B) میانگین مدت زمان سپری شده در ناحیه‌ی تاریک در گروه OVX، AD و AD+OVX افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (P < ۰/۰۰۰۱). همچنین، تفاوت در گروه AD+OVX نیز نسبت به گروه OVX (P < ۰/۰۰۰۱) و AD (P < ۰/۰۰۰۱) معنی‌دار بوده است.

پ) نتایج رنگ‌آمیزی نیسل

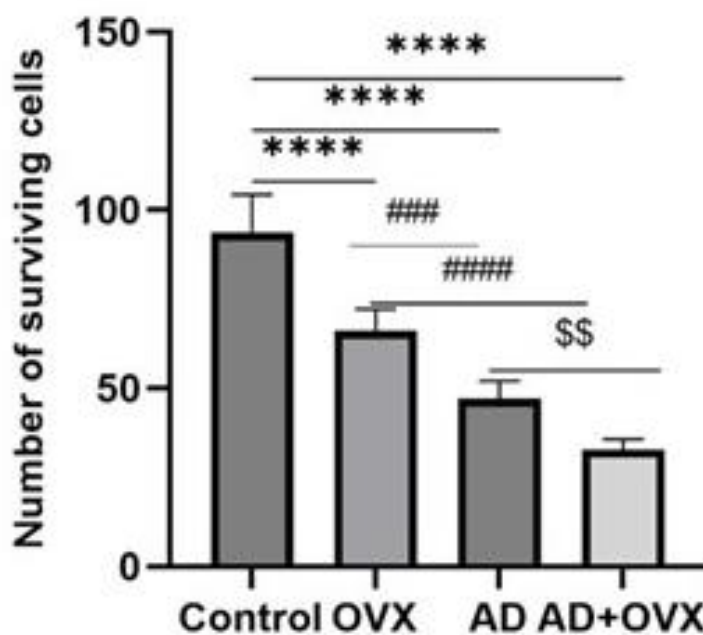
نتایج شمارش سلولی در نتیجه‌ی رنگ‌آمیزی نیسل به منظور بررسی سلول‌های از بین رفته در مقایسه با سلول‌های سالم در گروه شاهد، OVX، AD، AD+OVX و AD+OVX مختلف؛ در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در شکل ۵ تصویر ۱ نشان داده شده است.



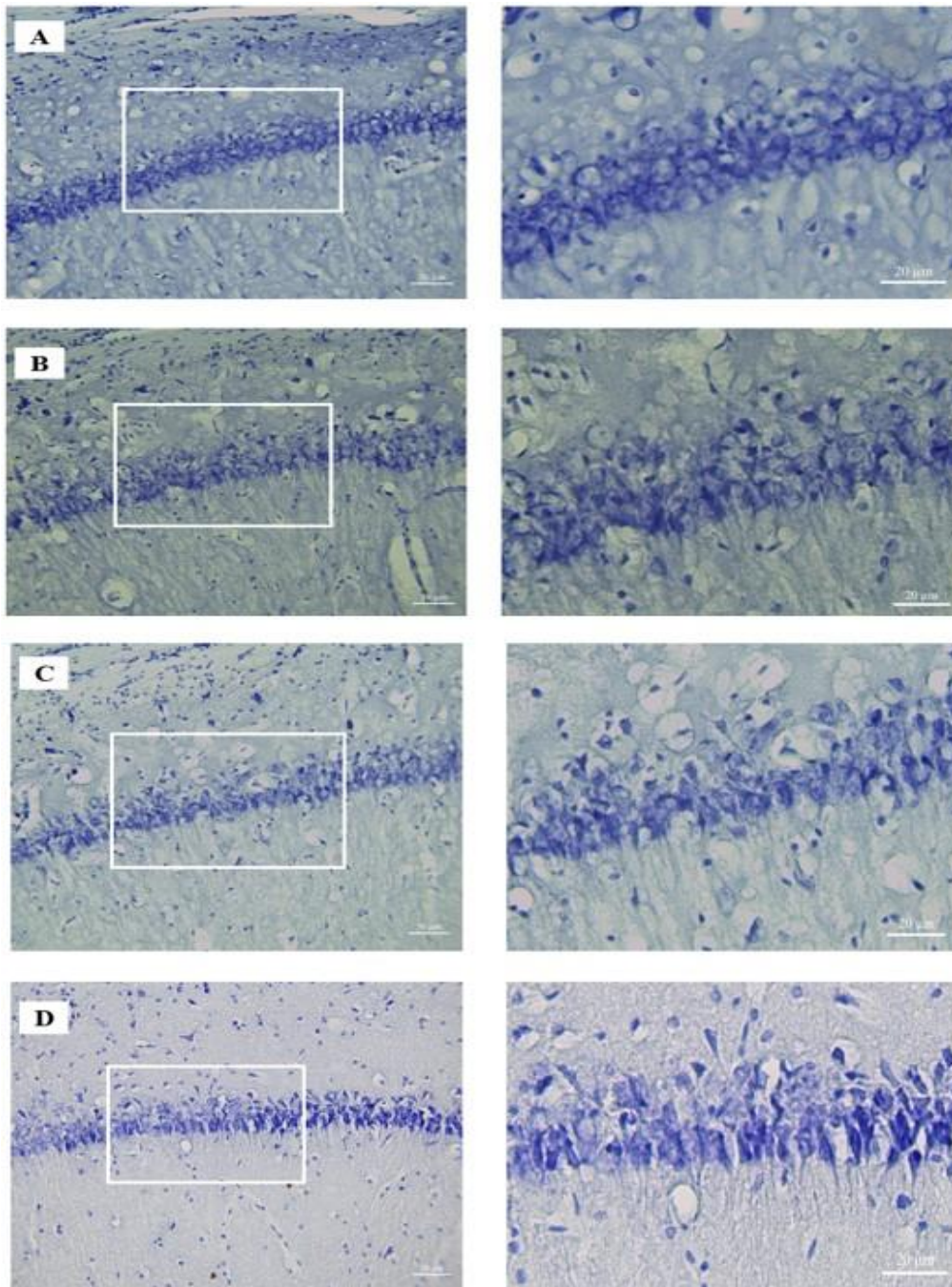
شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین درصد تناوب (A) و تعداد بازوهای وارد شده (B) در بین گروه‌های مورد مطالعه. (n = ۸ میانگین ± انحراف معیار، علائم * تفاوت در سطح معنی‌داری را به صورت * P ≤ ۰/۰۵، ** P ≤ ۰/۰۱، *** P ≤ ۰/۰۰۱، **** P ≤ ۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد، # در مقایسه با گروه OVX و \$ در مقایسه با گروه AD نشان می‌دهد.)



شکل ۳. مقایسه‌ی میانگین تأخیر در ورود به محفظه‌ی تاریک (A) و میانگین زمان سپری شده در ناحیه‌ی تاریک (B) در بین گروه‌های مورد مطالعه. (n = ۸) میانگین ± انحراف معیار، علائم *: تفاوت در سطح معنی‌داری را به صورت $P \leq 0/05$ ، **: $P \leq 0/01$ ، ***: $P \leq 0/001$ ، ****: $P \leq 0/0001$ در مقایسه با گروه شاهد، # در مقایسه با گروه OVX و \$ در مقایسه با گروه AD نشان می‌دهد.



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین تعداد سلول‌های زنده در هیپوکامپ در بین گروه‌های مورد مطالعه. (n = ۸) میانگین ± انحراف معیار، علائم *: تفاوت در سطح معنی‌داری را به صورت $P \leq 0/05$ ، **: $P \leq 0/01$ ، ***: $P \leq 0/001$ ، ****: $P \leq 0/0001$ در مقایسه با گروه شاهد، # در مقایسه با گروه OVX و \$ در مقایسه با گروه AD نشان می‌دهد.



شکل ۵. رنگ آمیزی نیسل در ناحیهی CA1 هیپوکامپ در گروه‌های شاهد (A)، OVX (B)، AD (C) و AD+OVX (D) می‌باشد.

به شکل ۵، میانگین تعداد سلول‌ها در گروه OVX و AD و AD+OVX نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/0001$). همچنین، تفاوت در گروه AD+OVX نیز نسبت به گروه OVX ($P < 0/0001$) و AD ($P < 0/01$) معنی‌دار بوده است.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر تأثیر اواریکتومی بر حافظه و یادگیری در

از مشخصات سلول‌های سالم می‌توان به سلول‌هایی با هستک و سیتوپلاسم روشن و بالعکس سلول‌های ناسالم سلول‌هایی با هستک و سیتوپلاسم تیره می‌باشند، اشاره کرد که خود نشان‌دهنده‌ی تغییرات سلولی و مورفولوژیک می‌باشند. میانگین و انحراف معیار تعداد سلول‌های نورونی زنده در منطقه‌ی CA1 در ناحیه‌ی هیپوکامپ در گروه شاهد ($93/67 \pm 10/61$)، OVX ($66/17 \pm 5/98$)، AD ($47/17 \pm 4/91$) و AD+OVX ($32/67 \pm 3/07$) بدست آمد. با توجه

گروه آلزایمری نسبت به گروه شاهد نشان داد (۲۸). بطور کلی این نتایج نشان داد که تعامل پیچیده محرومیت از استروژن ناشی از اواریکتومی و همچنین آلزایمر، اثر تشدیدکننده بر تغییرات شناختی و اختلال در حافظه دارد.

تعداد سلول‌های سالم ناحیه هیپوکامپ در همه گروه‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود در نتیجه مدل AD و OVX نیز می‌تواند باعث تغییرات مورفولوژیک در ناحیه هیپوکامپ شود. همچنین این کاهش در گروه AD+OVX نسبت به سایر گروه‌ها شدیدتر بود. همانطور که Hu و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که اواریکتومی باعث اختلال در حافظه و کاهش سلول‌های سالم ناحیه هیپوکامپ نسبت به گروه شاهد می‌شود (۲۹).

در راستای مطالعه‌ی حاضر، Luo و همکاران در سال ۲۰۲۲، کاهش نورونی شدید را در ناحیه هیپوکامپ موش‌های گروه AD+OVX گزارش کردند، همچنین کاهش سیناپس‌های بین نورونی در هیپوکامپ موش‌های گروه‌های AD و AD+OVX مشاهده شد (۳۰). این کاهش نورونی و سیناپسی می‌تواند به‌عنوان شاخصی از اختلالات شناختی و حافظه در مدل‌های آلزایمر و اواریکتومی مورد توجه قرار گیرد.

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان‌دهنده‌ی یک تعامل پیچیده میان محرومیت استروژن ناشی از اواریکتومی و آسیب‌های شناختی مرتبط با آلزایمر است. این ترکیب باعث تشدید اختلالات حافظه، یادگیری و همچنین آسیب‌های نورونی در ناحیه هیپوکامپ نیز می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که محرومیت از استروژن ناشی از اواریکتومی و همچنین مدل آلزایمر می‌تواند باعث تغییر در یادگیری و عملکرد حافظه‌ی کوتاه‌مدت و اجتنابی و همچنین کاهش نورونی سلول‌های ناحیه هیپوکامپ شود. بنابراین با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت محرومیت از استروژن ناشی از OVX می‌تواند اثرات تشدیدکننده‌ای در علائم ناشی از آلزایمر بر حافظه‌ی شناختی، یادگیری و همچنین آسیب نورونی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی علوم تشریح به شماره‌ی ۲۳۶۴۲ می‌باشد که در دانشگاه علوم پزشکی ایران تصویب و با حمایت مالی معاونت پژوهشی به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات معاونت محترم پژوهشی تقدیر و تشکر می‌شود.

موش‌های مدل آلزایمری مورد بررسی قرار گرفت و از اواریکتومی به عنوان یک روش تسریع شده‌ای از منوپاز که در انسان‌ها دیده می‌شود استفاده شد. در ابتدا جهت بررسی حافظه‌ی کوتاه‌مدت حیوان ۵ هفته پس از جراحی اواریکتومی، تست ماز Y شکل مورد استفاده قرار گرفت، درصد شاخص تناوب و همچنین تعداد ورود به بازوها در همه‌ی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد، کاهش یافت که به معنای اختلال در حافظه‌ی کوتاه‌مدت حیوان و همچنین کاهش توانایی حرکتی حیوان است.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۲ انجام شد، نشان داد درصد شاخص تناوب و تعداد ورود به بازوها در گروه‌های AD و OVX نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت و این کاهش در گروه AD+OVX شدیدتر هم بوده است که همراستا با مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (۱۵). این نتایج تأیید می‌کند که تعامل میان محرومیت استروژن و آلزایمر می‌تواند به تشدید اختلالات شناختی منجر شود. در مطالعه‌ای دیگر که تأثیر نارینژنین را بر روی یادگیری و حافظه‌ی موش‌های آلزایمری مورد بررسی قرار داد، کاهش درصد شاخص تناوب در گروه‌های آلزایمری را در مقایسه با گروه شام شاهد گزارش کرد (۲۳) که نشان‌دهنده‌ی اختلالات شناختی در مدل آلزایمری القا شده است.

حافظه‌ی اجتنابی غیر فعال حیوان توسط تست شاتل باکس، ۵ هفته پس از جراحی اواریکتومی، در گروه‌های مورد مطالعه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج، کاهش معنی‌دار STL را در گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد نشان داد. همان‌طور که Khaleghi و همکاران، کاهش معنی‌دار STL را در گروه OVX نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۲۴).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Fedotova و همکاران انجام پذیرفت، میزان STL در گروه OVX نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافته بود (۲۵). همچنین میزان STL قبل و بعد از شوک در گروه AD نسبت به گروه شاهد بشدت کاهش یافته بود (۲۶). کاهش میزان STL به معنای ورود سریع حیوان به ناحیه تاریک است و نشانه‌ای از آسیب در یادگیری و حافظه‌ی کوتاه‌مدت حیوان است.

همچنین مطالعه‌ای دیگر نشان داد که میزان TDC یا مدت زمان سپری شده در ناحیه تاریک در گروه AD و گروه محروم از استرادیول بصورت معنی‌داری افزایش یافته است که همراستا با مطالعه‌ی حاضر بوده و تأییدکننده‌ی آسیب در یادگیری و حافظه‌ی کوتاه‌مدت حیوان است (۲۷).

یک مطالعه‌ی دیگر در سال ۲۰۲۲، افزایش میزان TDC را در

References

1. Yeung ST, Martinez-Coria H, Ager RR, Rodriguez-Ortiz CJ, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. Repeated cognitive stimulation alleviates memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model. *Brain Res Bull* 2015;117: 10-5.
2. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2019; 14(1): 32.
3. Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology* 2020; 40(1): 22-9.
4. Garcia-Segura LM, Balthazart J. Steroids and neuroprotection: New advances. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30(2): v-ix.
5. Coughlan GT, Bethausen TJ, Boyle R, Kosciak RL, Klinger HM, Chibnik LB, et al. Association of age at menopause and hormone therapy use with tau and β -amyloid positron emission tomography. *JAMA Neurol* 2023; 80(5): 462-73.
6. Jameie SB, Pirasteh A, Naseri A, Jameie MS, Farhadi M, Babaee JF, et al. β -Amyloid Formation, Memory, and Learning Decline Following Long-term Ovariectomy and Its Inhibition by Systemic Administration of Apigenin and β -Estradiol. *Basic Clin Neurosci* 2021; 12(3): 383-94.
7. Reuben R, McFall GP, Dixon RA, Einstein G. Predictors of Alzheimer's disease risk in women with bilateral oophorectomy from the UK Biobank. *Alzheimer's & Dementia* 2022; 18(S11): e063188.
8. Ding F, Yao J, Zhao L, Mao Z, Chen S, Brinton RD. Ovariectomy induces a shift in fuel availability and metabolism in the hippocampus of the female transgenic model of familial Alzheimer's. *PLoS One* 2013; 8(3): e59825.
9. Bhavnani BR. Estrogens and menopause: pharmacology of conjugated equine estrogens and their potential role in the prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 85(2-5): 473-82.
10. Thiebaut C, Vlaeminck-Guillem V, Trédan O, Poulard C, Le Romancer M. Non-genomic signaling of steroid receptors in cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2021; 538: 111453.
11. Kuruca SE, Karadenizli S, Akgun-Dar K, Kapucu A, Kaptan Z, Uzum G. The effects of 17β -estradiol on blood brain barrier integrity in the absence of the estrogen receptor alpha; an in-vitro model. *Acta Histochem* 2017; 119(6): 638-47.
12. Jett S, Malviya N, Schelbaum E, Jang G, Jahan E, Clancy K, et al. Endogenous and exogenous estrogen exposures: how women's reproductive health can drive brain aging and inform Alzheimer's prevention. *Front Aging Neurosci* 2022; 14: 831807.
13. Frye CA, Duffy CK, Walf AA. Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 88(2): 208-16.
14. Grissom EM, Daniel JM. Evidence for Ligand-Independent Activation of Hippocampal Estrogen Receptor- α by IGF-1 in Hippocampus of Ovariectomized Rats. *Endocrinology* 2016; 157(8): 3149-56.
15. Farkas S, Szabó A, Török B, Sólyomvári C, Fazekas CL, Bánrévi K, et al. Ovariectomy-induced hormone deprivation aggravates $A\beta(1-42)$ deposition in the basolateral amygdala and cholinergic fiber loss in the cortex but not cognitive behavioral symptoms in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; 13: 985424.
16. Aykac A, Ozbeyli D, Uncu M, Ertaş B, Kılınç O, Şen A, et al. Evaluation of the protective effect of *Myrtus communis* in scopolamine-induced Alzheimer model through cholinergic receptors. *Gene* 2019; 689: 194-201.
17. Burgess A, Dubey S, Yeung S, Hough O, Eterman N, Aubert I, et al. Alzheimer disease in a mouse model: mr imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior. *Radiology* 2014; 273(3): 736-45.
18. Shamsipour S, Sharifi G, Taghian F. Impact of interval training with probiotic (*L. plantarum* / *Bifidobacterium bifidum*) on passive avoidance test, ChAT and BDNF in the hippocampus of rats with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2021; 756: 135949.
19. Goodarzi S, Pazirandeh A, Jameie SB, Baghban Khojasteh N. Differentiation in boron distribution in adult male and female rats' normal brain: A BNCT approach. *Appl Radiat Isot* 2012; 70(6): 952-6.
20. Zhu Y, Liu F, Zou X, Torbey M. Comparison of unbiased estimation of neuronal number in the rat hippocampus with different staining methods. *J Neurosci Methods* 2015; 254: 73-9.
21. Mandour DA, Bendary MA, Alsemeh AE. Histological and immunohistochemical alterations of hippocampus and prefrontal cortex in a rat model of Alzheimer like-disease with a preferential role of the flavonoid "hesperidin". *J Mol Histol* 2021; 52(5): 1043-65.
22. Liu G, Wang J, Deng XH, Ma PS, Li FM, Peng XD, et al. The Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Oxysophocarpine on Pilocarpine-Induced Convulsions in Adult Male Mice. *Cell Mol Neurobiol* 2017; 37(2): 339-49.
23. Ghofrani S, Joghataei M-T, Mohseni S, Baluchnejadmojarad T, Bagheri M, Khamse S, et al. Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: Insights into the underlying mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2015; 764: 195-201.
24. Khaleghi M, Rajizadeh MA, Bashiri H, Kohlmeier KA, Mohammadi F, Khaksari M, et al. Estrogen attenuates physical and psychological stress-induced cognitive impairments in ovariectomized rats. *Brain Behav* 2021; 11(5): e02139.
25. Fedotova JO, Hartmann G, Lénárd L, Sapronov N. Involvement of 5-HT₁? receptors in passive avoidance learning in intact and ovariectomized female rats. *Acta Physiologica Hungarica* 2004; 91(3-4): 185-96.

26. Hosseini N, Alaei H, Reisi P, Radahmadi M. The effect of treadmill running on passive avoidance learning in animal model of Alzheimer disease. *Int J Prev Med* 2013; 4(2): 187-92.
27. Moazedi Aa, Moosavi M, Chinipardaz R. The effect of estrogen on passive avoidance memory in an experimental model of Alzheimer's disease in male rats [in Persian]. *Physiol Pharmacol* 2011; 14(4): 416-25.
28. Rashno M, Gholipour P, Salehi I, Komaki A, Rashidi K, Esmail Khoshnam S, et al. p-Coumaric acid mitigates passive avoidance memory and hippocampal synaptic plasticity impairments in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rat model. *Journal of Functional Foods* 2022; 94: 105117.
29. Hu Z, Yang Y, Gao K, Rudd JA, Fang M. Ovarian hormones ameliorate memory impairment, cholinergic deficit, neuronal apoptosis and astrogliosis in a rat model of Alzheimer's disease. *Exp Ther Med* 2016; 11(1): 89-97.
30. Luo M, Zeng Q, Jiang K, Zhao Y, Long Z, Du Y, et al. Estrogen deficiency exacerbates learning and memory deficits associated with glucose metabolism disorder in APP/PS1 double transgenic female mice. *Genes Dis* 2022; 9(5): 1315-31.

Investigating the Effect of Ovariectomy on Cognitive Memory and Learning in Scopolamine-Induced Alzheimer's Model Rats

Reshad Rezapour¹, Hiva Osmani², Afsaneh Jaberi-Asl³

Original Article

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is a progressive disease and one of the most common neurodegenerative disorders. AD causes impairment in memory, learning and other important mental functions. The aim of this study is the effect of ovariectomy on cognitive memory and learning in AD mouse model induced with scopolamine.

Methods: In the present study, 32 female Wistar rats (weight 180 to 200 grams) were divided into four groups: control, ovariectomy (OVX), Alzheimer's disease (AD), and ovariectomy + Alzheimer's disease (AD+OVX). Alzheimer's model was induced by intraperitoneal injection of scopolamine, 1 mg/kg for 14 days. Short-term memory and non-avoidance learning were evaluated by Y-shaped maze and shuttle box behavioral tests, respectively. Nissl's staining method was used to evaluate the degree of neuronal destruction in the CA1 area of hippocampal tissue samples. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's approximate test at a significance level of 0.05.

Findings: According to the Maze test, a significant decrease in frequency index was observed in the OVX, AD and AD+OVX groups compared to the control group. According to the shuttle box test, the average duration of entering the dark area in the OVX, AD and AD+OVX groups was significantly reduced compared to the control group. The Nissl staining results showed that the average number of live cells in the OVX, AD and AD+OVX groups was significantly reduced compared to the control group.

Conclusion: Deprivation of estrogen caused by OVX can have aggravating effects on Alzheimer's symptoms on cognitive memory, learning and also neuronal damage.

Keywords: Ovariectomy; Memory; Learning; Alzheimer's disease; Scopolamine

Citation: Rezapour R, Osmani H, Jaberi-Asl A. **Investigating the Effect of Ovariectomy on Cognitive Memory and Learning in Scopolamine-Induced Alzheimer's Model Rats.** J Isfahan Med Sch 2024; 42(792): 1027-36.

1- MSc, Neuroscience Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- MSc Student, Student Research Committee, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- PhD Candidate, Department of Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Afsaneh Jaberi-Asl, PhD Candidate, Department of Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; Email: afsane.ja110@gmail.com