

اثر ایمی‌پرامین بر اختلال حافظه در موش صحرایی مدل بیماری آلزایمر: دخالت مسیر سیگنالینگ انسولین و پروتئین Reelin

المیرا بیرامی^۱، دلارام اسلیمی اصفهانی^۱، علیرضا جمشیدی حسن آبادی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر، یک اختلال عصبی پیشرونده است که باعث مختل شدن عملکردهای شناختی می‌شود. ایمی‌پرامین، نوعی داروی ضدافسردگی با اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در مغز می‌باشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر ایمی‌پرامین بر اختلال حافظه با تمرکز بر مسیر سیگنالینگ انسولین و شکل‌پذیری سیناپسی در موش‌های صحرایی بیمار شده با استرپتوزوتوسین (STZ (Streptozotocin) بود.

روش‌ها: در مطالعه‌ی تجربی حاضر، ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در ۴ گروه شاهد، STZ، STZ+ایمی‌پرامین و ایمی‌پرامین قرار گرفتند. القاء مدل حیوانی بیماری آلزایمر با تزریق درون بطنی STZ (۳mg/kg؛ ۳μl در هر بطن) انجام گرفت. تست ماز بعلاوه‌ی شکل مرتفع و آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال جهت بررسی عملکردهای شناختی مورد استفاده قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق STZ، تیمار با ایمی‌پرامین (۲۰mg/kg) به صورت داخل صفاقی و به مدت ۱۴ روز انجام گرفت. بررسی میزان بیان ژن انسولین و فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین (Akt، PI3K، IRS2، IR، mTOR) توسط تکنیک Real-time PCR و ارزیابی سطح پروتئین Reelin (فاکتور دخیل در شکل‌پذیری سیناپسی) توسط تکنیک وسترن بلات انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که STZ منجر به بروز اختلالات حافظه در موش‌ها شد و بیان ژن انسولین، فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین و نیز سطح پروتئین Reelin را کاهش داد. در حالی که ایمی‌پرامین، سبب کاهش اختلالات حافظه و نیز افزایش بیان فاکتورهای مذکور در هیپوکامپ حیوانات بیمار شده با STZ گردید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد، ایمی‌پرامین از طریق تأثیر بر مسیر سیگنالینگ انسولین و پروتئین دخیل در شکل‌پذیری سیناپسی سبب کاهش اختلالات حافظه در حیوانات بیمار شده با STZ می‌گردد.

واژگان کلیدی: ایمی‌پرامین؛ بیماری آلزایمر؛ اختلال حافظه؛ انسولین؛ پروتئین Reelin

ارجاع: بیرامی المیرا، اسلیمی اصفهانی دلارام، جمشیدی حسن آبادی علیرضا. اثر ایمی‌پرامین بر اختلال حافظه در موش صحرایی مدل بیماری آلزایمر:

دخالت مسیر سیگنالینگ انسولین و پروتئین Reelin. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۳۲): ۷۱۸-۷۰۸

مقدمه

آلزایمر، نوعی بیماری مغزی مزمن و پیشرونده است که باعث مختل شدن حافظه، عدم توجه و تمرکز و نیز بروز اختلالات خلقی و رفتاری می‌شود. در این بیماری، تجمع پروتئین آمیلوئید بتا، استرس اکسیداتیو، التهاب، کاهش تعداد و عملکرد نورون‌های کولینرژیک، کاهش شکل‌پذیری سیناپسی و در نهایت مرگ نورونی سبب پیشرفت بیماری می‌شوند (۱). به منظور القاء این بیماری در مطالعات حیوانی، تزریق درون بطنی مغزی (Streptozotocin) STZ، در دوز پایین‌تر

از دوز ایجادکننده‌ی دیابت (۳ mg/kg)، به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، STZ سبب بروز استرس اکسیداتیو، التهاب مزمن عصبی، تجمع پروتئین تائو هیپرفسفریله، اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین و در نهایت بروز اختلالات شناختی می‌شود که مشابه با اختلالات مشاهده شده در مغز بیماران آلزایمری می‌باشند (۲).

انسولین و سیگنالینگ متأثر از آن برای رشد و محافظت از سلول‌های عصبی اهمیت بسزایی دارند. حضور انسولین و گیرنده‌های

۱- استادیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- کارشناسی ارشد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: المیرا بیرامی؛ استادیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

آن در نواحی مختلفی از مغز همچون هیپوکامپ دلالت بر اهمیت انسولین در عملکردهای شناختی دارد (۳). انسولین بعد از اتصال به رسپتور خود سبب فعال شدن دو مسیر سیگنالینگ مهم از جمله مسیر PI3K/Akt و Ras/MAPK می‌شود که می‌توانند منجر به سنتز پروتئین‌های مختلف، تنظیم متابولیسم گلوکز، محافظت در برابر آپوپتوز و استرس اکسیداتیو، بقاء سلول‌های عصبی، شکل‌پذیری سیناپس و نیز بهبود عملکردهای شناختی شوند (۴). مطالعات مختلف، اختلال در مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt را در مغز بیماران آلزایمری گزارش کرده‌اند. این اختلالات عمدتاً با کاهش در سطح فسفوریلاسیون فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین و یا کاهش در فاکتورهای دخیل در این مسیر در نواحی درگیر در حافظه و یادگیری همراه هستند (۵). همچنین گزارش شده است که اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین می‌تواند با افزایش تجمع پروتئین آمیلوئید بتا، افزایش هایپرفسفروریلاسیون پروتئین تائو، افزایش التهاب عصبی، بروز استرس اکسیداتیو و نیز اختلال در فرایند نوروزن سبب پیشرفت بیماری آلزایمر گردد (۶).

نقص در نوروزن و شکل‌پذیری سیناپسی نیز با بروز اختلال در فرایندهای شناختی همراه می‌باشند. Reelin یکی از گلیکوپروتئین‌های بزرگ در ماتریکس خارج سلولی بوده و نقش مهمی در رشد و تکامل مغز دارد. در مغز بالغین توسط اینترنورون‌های گابارژیک موجود در قشر مغز و هیپوکامپ ترشح شده و در مهاجرت نورونی، بلوغ نورون‌ها، افزایش خارهای دندریتی، افزایش نوروزن و شکل‌پذیری سیناپسی و نیز تسهیل یادگیری و حافظه نقش مهمی را ایفاء می‌کند (۷). مطالعات متعدد کاهش سطوح mRNA و پروتئین Reelin را در بیماری‌های نورودژنراتیو همچون بیماری آلزایمر گزارش کرده‌اند (۸).

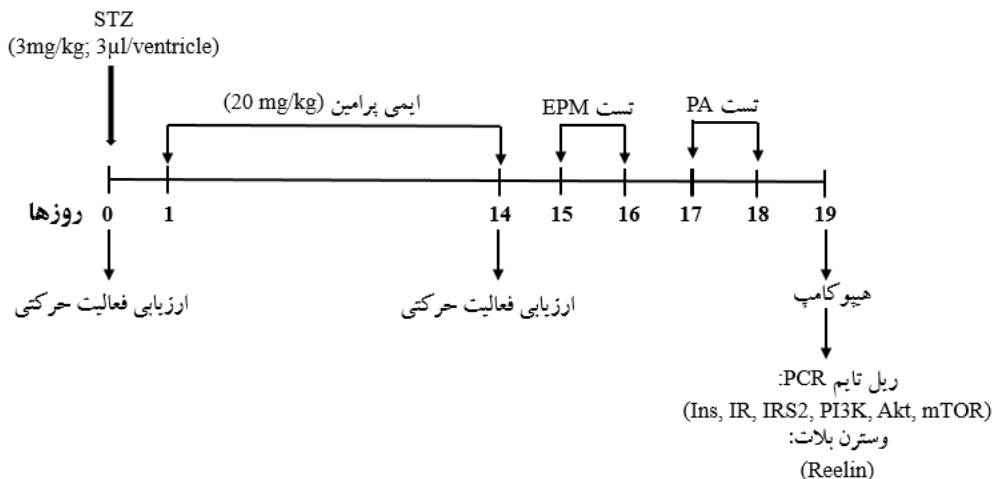
روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی، از ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۲۷۰-۲۳۰ گرم استفاده شد. موش‌ها در شرایط آزمایشگاهی استاندارد (دمای $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ، رطوبت $50 \pm 10\%$ و چرخه‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته) نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد را داشتند.

گروه‌بندی حیوانات: در این مطالعه موش‌ها در ۴ گروه ۸ تایی به ترتیب زیر قرار گرفتند: ۱- گروه شاهد: تزریق درون بطنی نرمال سالین ($3 \mu\text{l}$ در هر بطن) + تزریق داخل صفاقی نرمال سالین، ۲- گروه STZ: تزریق درون بطنی 3 mg/kg ؛ $3 \mu\text{l}$ در هر بطن) + تزریق داخل صفاقی نرمال سالین، ۳- گروه STZ و ایمی‌پرامین (STZ+Imi): تزریق درون بطنی 3 mg/kg ؛ $3 \mu\text{l}$ در هر بطن) + تزریق داخل صفاقی ایمی‌پرامین (20 mg/kg)، ۴- گروه ایمی‌پرامین (Imi): تزریق درون بطنی نرمال سالین ($3 \mu\text{l}$ در هر بطن) + تزریق داخل صفاقی ایمی‌پرامین (20 mg/kg) و ایمی‌پرامین بلافاصله قبل از تزریق در نرمال سالین $0/9$ درصد حل شدند. میزان حجم نرمال سالین در تزریق داخل صفاقی متناسب با وزن بدن حیوان بود. انتخاب دوز 3 mg/kg STZ و تزریق آن بصورت تک دوز در روز صفر، به منظور القاء مدل حیوانی بیماری آلزایمر، بر اساس مطالعات قبلی انجام گرفت (۱۴).

امروزه داروهای ضد افسردگی علاوه بر خواص ضد افسردگی و آرام‌بخشی‌شان، به دلیل اثرات ضد التهابی و محافظتی خود مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. این داروها به دلیل جلوگیری از بازجذب انتقال دهنده‌های عصبی مانند دوپامین، نوراپیفرین و استیل کولین به پایانه‌های عصبی، منجر به افزایش در دسترس‌پذیری آن‌ها در مغز شده و از این‌رو می‌توانند فرایندهای شناختی را تحت تأثیر قرار دهند (۹). ایمی‌پرامین جزئی از داروهای ضد افسردگی سه حلقه‌ای می‌باشد که معمولاً در انواع اختلالات روانی استفاده می‌شود. نشان داده شده است که ایمی‌پرامین با تأثیر بر فرایند نوروزن و بازسازی نورونی می‌تواند بر روی عملکردهای شناختی تأثیرگذار باشد (۱۰). همچنین گزارش شده است که تیمار با ایمی‌پرامین، سبب افزایش تکثیر سلولی و نیز کاهش آپوپتوز در هیپوکامپ موش‌های صحرایی دچار ایسکمی مغزی می‌شود (۱۱).

مطالعه‌ای دیگر نشان داده است که ایمی‌پرامین با مهار تولید



شکل ۱. پروتکل تزریق داروها و زمان‌بندی ارزیابی‌های رفتاری و مولکولی

۵۰×۱۰×۱۰ cm هستند. دو بازوی دیگر دارای دیواره‌هایی به رنگ تیره و با ابعاد ۵۰×۱۰×۴۰ cm در طرفین می‌باشند. ارتفاع این دستگاه از سطح زمین ۵۰ cm بود و به همین دلیل ماز مرتفع نامیده می‌شود. این تست در ۲ روز متوالی و در طی ۲ مرحله انجام گرفت. در روز ۱۵ اکتساب حافظه و ۲۴ ساعت بعد به یادآوری حافظه مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی اکتساب حافظه، حیوان در انتهای یکی از بازوهای باز قرار گرفت، بطوری که صورتش به سمت مخالف مرکز بود، سپس مدت زمانی که طول کشید تا حیوان از بازوی باز به یکی از بازوهای بسته وارد شود به عنوان (Initial transfer latency) ITL در نظر گرفته شد. در مرحله‌ی به یادآوری حافظه حیوان در انتهای همان بازوی بازی که در مرحله‌ی بررسی اکتساب حافظه قرار گرفته بود، قرار داده شد و مدت زمانی که طول کشید تا حیوان از بازوی باز به یکی از بازوهای بسته وارد شود به عنوان (Retention transfer latency) RTL در نظر گرفته شد. مدت زمان کل این آزمون ۹۰ ثانیه بود و در صورتی که حیوان در زمان تعیین شده بازوی بسته را پیدا نمی‌کرد، RTL برای حیوان ۹۰ ثانیه ثبت شده و به عنوان درصد تأخیر آزمون اولیه بیان گردید. کاهش در RTL به عنوان شاخص بهبود عملکرد شناختی در نظر گرفته شد (۱۷).

ارزیابی حافظه‌ی اجتنابی غیر فعال: دستگاه مربوط به سنجش این تست از دو بخش مجزا تشکیل شده است که توسط یک درب گیوتینی از هم جدا شده‌اند و ابعاد هر بخش ۳۰×۲۰×۲۰ cm می‌باشد. این تست در ۳ مرحله و در ۲ روز متوالی انجام گرفت: (۱) مرحله‌ی عادت‌سازی: در این مرحله هر حیوان در داخل بخش روشن و پشت به درب قرار گرفت، ۱۰ ثانیه بعد درب برداشته شد تا حیوان وارد بخش تاریک شود، به محض ورود به این بخش درب بسته شد تا حیوان ۳۰ ثانیه آزادانه در آنجا حرکت نماید. (۲) مرحله‌ی

انتخاب دوز ایمی‌پرامین (۲۰ mg/kg) و تزریق داخل صفاقی آن به مدت ۱۴ روز متوالی، جهت تیمار موش مدل بیماری آلزایمر، نیز بر اساس مطالعات پیشین صورت گرفت (۱۳). پروتکل تزریق داروها و زمان‌بندی ارزیابی‌های رفتاری و مولکولی در شکل ۱ ارائه شده است.

نحوه‌ی القاء آلزایمر: برای این منظور موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین و زایلازین (به ترتیب ۸۰ و ۲۰ mg/kg) بیهوش شدند و سپس در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) قرار گرفتند. تزریق STZ (۳ mg/kg; Sigma-Aldrich, USA) به کمک میکروسرنج همیلتون و به صورت دو طرفه در بطن‌های جانبی (۳µl در هر بطن) با مختصات $AP = -0.8$ mm، $ML = \pm 1/5$ و $DV = -3.6$ mm در مدت ۳ دقیقه انجام شد (۱۵). ایمی‌پرامین هیدروکلراید (R.L.Fine Chem, India)، با خلوص ۹۹/۸ درصد، جهت تیمار حیوانات دریافت‌کننده‌ی STZ مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی فعالیت حرکتی: برای این منظور از دستگاه Open field استفاده شد. این دستگاه شامل یک جعبه از جنس پلاستیک فشرده شفاف با ابعاد ۴۰×۴۰×۴۰ cm است که به حس‌گرهای مادون قرمز در فاصله‌ی ۲/۵ cm از لبه‌ی پایینی جعبه مجهز می‌باشد. قبل از شروع و بعد از اتمام تزریق داروها (به ترتیب روزهای ۰ و ۱۴) حیوان به مدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار گرفت و سپس فعالیت‌های حرکتی افقی هر حیوان (تعداد عبورها از مقابل حس‌گرهای مادون قرمز) در این مدت توسط دستگاه ثبت شد و به عنوان شاخصی از فعالیت حرکتی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶).

ارزیابی اکتساب و به یادآوری حافظه: برای این منظور از تست ماز به علاوه‌ی شکل مرتفع EPM (Elevated plus maze) استفاده شد. این دستگاه از جنس پلکسی گلس بوده و دارای چهار بازو به شکل صلیب است. دو بازو فاقد هرگونه دیواره بوده و به ابعاد

اتانول ۷۵ درصد شستشو و سپس در $20 \mu\text{l}$ آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و روش طیف‌سنجی نوری سنجیده شد و نمونه‌هایی که نسبت جذب 280 به 260 بین $1/8$ تا 2 داشتند، به عنوان نمونه‌های خالص RNA در نظر گرفته شدند. برای ارزیابی کیفیت RNA، نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز شدند. برای نمونه‌هایی که RNA با کیفیت خوبی داشتند دو باند در ناحیه‌ی 18 s و 28 s بر روی ژل قابل مشاهده بود. سنتز cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA در حجم $20 \mu\text{l}$ و با استفاده از پرایمرهای OligodT و Easy cDNA Random hexamer، طبق دستورالعمل کیت Synthesis Kit ساخت شرکت پارس طوس ایران انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه (جدول ۱) به کمک نرم‌افزار Oligo analysis طراحی و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند. بیان ژن انسولین و فاکتورهای دخیل در مسیر سگنالینگ انسولین با استفاده از مستریمیکس حاوی Sybergreen و روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی $15 \mu\text{l}$ تشکیل شد که شامل $2 \mu\text{l}$ cDNA، $1 \mu\text{l}$ از پرایمرهای Forward و Reverse، $7/5 \mu\text{l}$ مستریمیکس حاوی Sybergreen شرکت Amplicon دانمارک و $3/5 \mu\text{l}$ آب مقطر دو بار تقطیر بود. برنامه‌ی زمانی و دمایی دستگاه Real-Time PCR (Applied Biosystems Step One, USA) شامل چرخه‌ی اول: 15 دقیقه در دمای 95°C ، چرخه‌ی دوم: 30 ثانیه در دمای 95°C ، چرخه‌ی سوم: 30 ثانیه در دمای 60°C و چرخه‌ی چهارم: 30 ثانیه در دمای 72°C بود (چرخه‌های دوم تا چهارم 40 مرتبه تکرار شدند) (۱۹). پس از پایان واکنش نتایج بیان ژن به صورت کمی به دست آمد و آنالیز آن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت. نتایج تمام ژن‌ها نسبت به ژن بتا-اکتین، به عنوان کنترل داخلی، نرمالایز شد و سپس مقایسه‌ی بین گروه‌ها انجام گرفت (۲۰).

آموزش: این مرحله 30 دقیقه بعد از مرحله‌ی ۱ انجام گرفت. ابتدا دست‌ها، پاها و دم حیوان خیس شد و سپس در بخش روشن و پشت به درب قرار گرفت، بعد از 10 ثانیه، درب برداشته و اجازه‌ی ورود به بخش تیره به حیوان داده شد. به محض ورود حیوان به بخش تیره، درب بسته و جریان الکتریکی با شدت 1 میلی‌آمپر و فرکانس 50 هرتز به مدت 2 ثانیه از پاهای حیوان عبور داده شد. 20 ثانیه پس از اعمال شوک درب برداشته شد تا حیوان وارد بخش روشن شود. اگر حیوان بعد از ورود به بخش روشن، 120 ثانیه در این بخش می‌ماند و وارد بخش تاریک نمی‌شد، نشان‌دهنده‌ی شکل‌گیری یادگیری در حیوان بود. (۳) مراحل به یادآوری حافظه: این مراحل به ترتیب 90 دقیقه و 24 ساعت بعد از مرحله‌ی آموزش جهت ارزیابی حافظه‌ی کوتاه‌مدت (STM (Short-term memory) و حافظه‌ی بلندمدت (LTM (Long-term memory) انجام شد، با این تفاوت که هیچ شوک الکتریکی به پای حیوان وارد نمی‌شد. میزان تأخیر در ورود اولیه به بخش تاریک (STL (Step-through latency) در طی 300 ثانیه ثبت شد (۱۸).

تکنیک (Real-Time polymerase chain reaction) Real-Time PCR

استخراج RNA از بافت هیپوکامپ، توسط کیت RNX-Plus ساخت شرکت سیناژن ایران انجام شد. بدین منظور، 1 ml محلول RNX-Plus به میکروتیوب حاوی بافت هیپوکامپ اضافه و به مدت 3 دقیقه درون دستگاه هموژنایزر هموژن گردید. سپس $200 \mu\text{l}$ کلروفورم به نمونه‌ی هموژن شده اضافه شد و به مدت 5 دقیقه در دمای 4°C قرار گرفت. سپس به منظور حذف اجزای پروتئینی، بافت هموژن شده به مدت 15 دقیقه با دور 12000 rpm و در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. در پایان این مرحله، سوپرناتانت بالایی حاوی RNA جداسازی و به اندازه‌ی حجم آن محلول ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت 15 دقیقه با دور 12000 rpm و در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. پلت (pellet) حاوی RNA در 1 ml

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Reverse primers (5'-3')	Forward primers (5'-3')	Genes
GTAGAGGGAGCAGATACTGGT	ATCTTCAGACCTTGGCACTGG	Ins
GAGCGGAGGAGTCTTCATT	GGTGTAGTGGCTGTACATT	IR
GACTTCTTGTCCCATCACTTGAAA	GCTAAGCATCTCCTCAGAATGGA	IRS2
ATGTGTATGGACCCGGAAGG	ATGTGTATGGACCCGGAAGG	PI3K
TGCCATCATTCTTGAGGAGGAA	ACGTAGCCATTGTGAAGGAGG	Akt
AGGATGGTCAAGTTGCCGAG	AGAACCTGGCTCAAGTACGC	mTOR
AACGCAGCTCAGTAACACTCC	TCTATCCTGGCCTCACTGTC	β -actin

تکنیک وسترن بلات: این تکنیک برای بررسی سطح پروتئین Reelin (به عنوان فاکتور مهم در شکل‌پذیری سیناپسی) مورد استفاده قرار گرفت. بافت‌های هیپوکامپ در بسافر مخصوص لیز (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 8$ ، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl، تریتون X-100 ۰/۱ درصد، سدیم دزوکسی کولات ۰/۲۵ درصد، سدیم دودسیل سولفات ۰/۱ درصد، ۱ میلی‌مولار اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید، ۱ میلی‌مولار سدیم اورتوانادات، ۱۵ میلی‌مولار سدیم پیروفسفات، ۵۰ میلی‌مولار سدیم فلوراید و ۱ میلی‌مولار فینیل متیل سولفونیل فلوراید) هموژن شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C با سرعت 12000 rpm سانتریفیوژ شدند و در پایان مایع شفاف بالایی حاوی پروتئین از لایه پایینی جداسازی گردید. سپس نمونه‌ها بر اساس پروتکل کیت (BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL) از لحاظ محتوای پروتئینی تعیین غلظت شده و در مرحله‌ی بعد ۶۰ میکروگرم از پروتئین‌ها بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. سپس پروتئین‌های جدا شده در ژل، توسط روش نیمه خشک بر روی کاغذ PVDF (Millipore, Billerica, MA) منتقل شدند.

به منظور کاهش باندهای غیراختصاصی، کاغذ PVDF پس از دریافت پروتئین‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق با شیر خشک بدون چربی ۲ درصد بلوکه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای 4°C با آنتی‌بادی اولیه Reelin (Abcam #ab78540) با رقت ۱:۱۰۰۰ انکوبه شد. پس از اتمام زمان ۱۲ ساعته، کاغذ PVDF ۳ بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه با محلول TBST شسته شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق با آنتی‌بادی ثانویه (Anti-Rabbit IgG (labeled with horseradish peroxidase, Abcam, #ab97051) با رقت ۱:۱۲۰۰۰ انکوبه گردید. پس از اتمام این مرحله نیز کاغذ PVDF ۳ بار به مدت ۵ دقیقه با محلول TBST شسته شد. در نهایت، از معرف ECL (Bio-Rad, Hercules, CA) برای مرئی نمودن باندها استفاده شد. ابتدا به نسبت مساوی دو محلول A و B باهم مخلوط شدند و کاغذهای PVDF به مدت ۵ تا ۲۰ ثانیه در معرض این محلول قرار گرفتند و اثر آن بر روی فیلم X-ray به این صورت ظاهر شد که کاغذها پس از قرار گرفتن در معرض معرف ECL، به داخل X-ray film Cassette انتقال داده و جهت آشکارسازی فیلم به تاریکخانه منتقل شدند. در نهایت فیلم‌های ظاهر شده، اسکن شدند و توسط نرم‌افزار Image J شدت باندها اندازه‌گیری شد. از آنتی‌بادی بتا اکترین (Cell Signaling, #4970) با رقت ۱:۷۵۰ به عنوان کنترل داخلی و برای نرمالایز کردن داده‌ها استفاده شد (۲۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها از

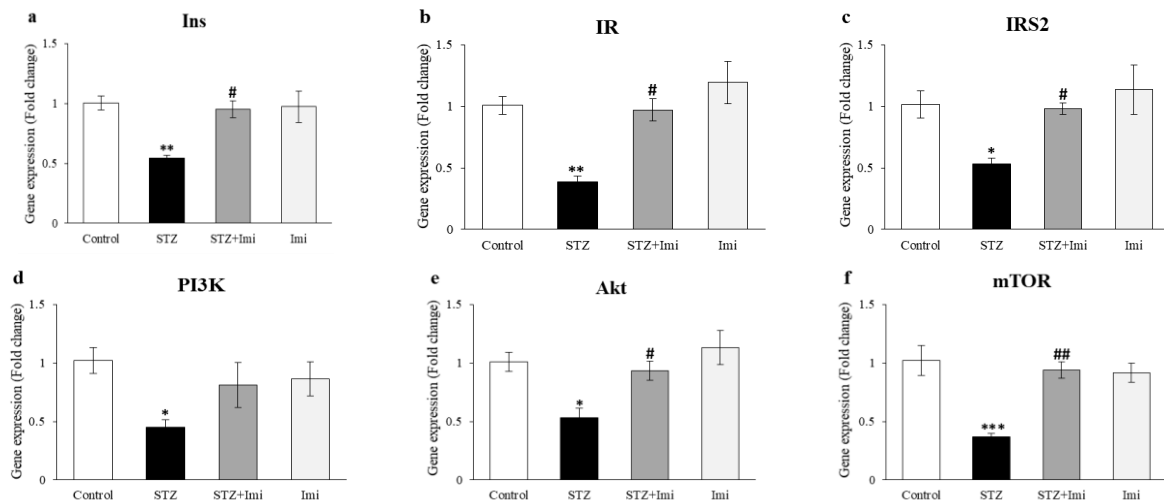
آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. آزمون واریانس یک‌طرفه برای بررسی داده‌های بدست آمده از تست PA، EPM، Real-Time PCR و وسترن بلات مورد استفاده قرار گرفت و آزمون آماری Repeated-measures ANOVA جهت آنالیز داده‌های حاصل از تست Open filed استفاده شد. برای مشخص نمودن گروه‌های دارای اختلاف معنی‌دار از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) جهت بررسی‌های آماری و نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه‌ی ۸ (Graph Pad Software, USA) برای ترسیم نمودارها استفاده شدند. سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند.

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد می‌باشد که با کد اخلاق در پژوهش IR.KHU.REC.1401.027 و با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی به انجام رسیده است.

یافته‌ها

نتایج ارائه شده در شکل ۲a نشان داد که بین فعالیت حرکتی حیوانات گروه STZ و گروه شاهد در روز صفر ($3/1 \pm 270/2$ در مقابل $4/2 \pm 261/2$) و روز ۱۴ ($4/38 \pm 285/4$ در مقابل $4/5 \pm 250/1$) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین نتایج تفاوت معنی‌داری را در فعالیت حرکتی حیوانات گروه STZ و گروه تیمار شده با ایمی‌پرامین در روز صفر و ۱۴ نشان نداد (به ترتیب $3/4 \pm 284/8$ و $3/51 \pm 299/1$). بین حیوانات گروه شاهد و گروهی که ایمی‌پرامین را به تنهایی دریافت نموده بودند نیز در روز صفر ($3/23 \pm 295/1$) و روز ۱۴ ($5/1 \pm 277/9$) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

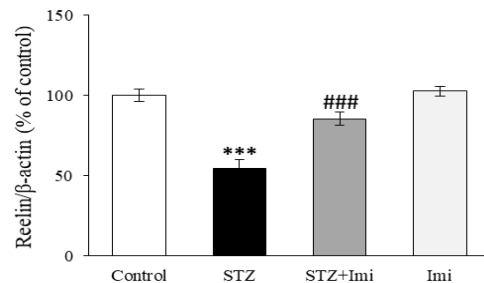
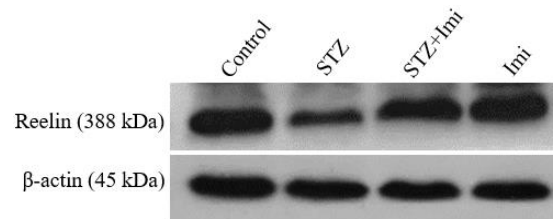
نتایج حاصل از تست EPM نشان داد که تزریق STZ به طور قابل توجهی سبب افزایش حضور حیوان در بازوهای باز در مرحله‌ی اکسساب ($8/15 \pm 75/75$) و به یادآوری حافظه ($7/84 \pm 70$) نسبت به گروه شاهد ($5/97 \pm 35/63$) و ($3/58 \pm 22/88$) شد ($P < 0.001$)، که دلالت بر بروز اختلال در اکسساب و به یادآوری حافظه به دلیل تزریق STZ دارد. در حالی که تزریق ایمی‌پرامین به موش‌های تیمار شده با STZ سبب کاهش مدت زمان سپری شده در بازوهای باز در مرحله‌ی اکسساب ($2/15 \pm 43/63$) و به یادآوری حافظه ($5/01 \pm 39/63$) نسبت به گروه STZ گردید ($P < 0.01$). این نتایج دلالت بر افزایش توانایی حیوان در پیدا کردن سریع بازوهای بسته در گروه STZ تیمار شده با ایمی‌پرامین دارد. شایان ذکر است که تزریق ایمی‌پرامین به تنهایی بر توانایی اکسساب ($7/93 \pm 39/5$) و به یادآوری حافظه ($4/98 \pm 31/38$) در مقایسه با گروه شاهد نداشت ($P > 0.05$) (شکل ۲b و ۲c).



شکل ۳. اثر ایمی‌پرامین بر سطح بیان ژن انسولین و فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین در هیپوکامپ موش‌های بیمار شده با STZ (a) انسولین (Ins)، (b) رسپتور انسولین (IR)، (c) IRS2، (d) PI3K، (e) Akt و (f) mTOR. تعداد حیوانات در هر گروه آزمایشی ۴ موش بود. $P < 0/05$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/001$ ، $P < 0/0001$ در مقایسه با گروه STZ. $P < 0/05$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/001$ در مقایسه با گروه STZ. $P < 0/05$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/001$ در مقایسه با گروه STZ.

در این مطالعه، موش‌های بیمار شده با STZ بعد از گذشت دو هفته، اختلال در اکتساب و به یادآوری حافظه را در تست EPM و نیز اختلال در حافظه اجتنابی کوتاه و بلندمدت را در تست PA نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی فعالیت‌های حرکتی حیوانات نیز تأیید نمود که داده‌های حاصل از تست‌های رفتاری به دلیل وجود اختلالات حرکتی در حیوانات نبوده است. در توافق با یافته‌های ما، مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که تزریق درون بطنی STZ بدون تحت تأثیر قرار دادن فعالیت‌های حرکتی حیوان و نیز سطح گلوکز خون، سبب بروز اختلال در فرایندهای شناختی همچون حافظه و یادگیری در موش‌های صحرایی می‌شود (۱۴، ۲۲-۲۴). مطالعات همچنین نشان داده‌اند که موش‌های صحرایی بیمار شده با STZ طیف وسیعی از تغییرات پاتولوژیک همچون استرس اکسیداتیو، مقاومت به انسولین، التهاب عصبی، نقص در سیستم کولینرژیک و کاهش ارتباطات سیناپسی در هیپوکامپ را نشان می‌دهند که تمامی این عوامل می‌توانند در بروز اختلالات شناختی دخیل باشند (۲۵).

نتایج مطالعه‌ی حاضر همچنین آشکار نمود که STZ سبب کاهش بیان ژن انسولین و نیز فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین (IR، IRS2، PI3K، Akt و mTOR) در هیپوکامپ موش‌ها گردید. مسیر سیگنالینگ انسولین به عنوان یک هدف مهم جهت درمان اختلالات شناختی، اخیراً مورد توجه زیادی قرار گرفته است، زیرا مطالعات بسیاری کاهش در میزان انسولین و یا اختلال در فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین از جمله اختلال در میزان بیان و عملکرد رسپتور انسولین را در هیپوکامپ بیماران مبتلا به آلزایمر گزارش کرده‌اند و نیز نشان داده‌اند که این اختلالات می‌توانند



شکل ۴. اثر ایمی‌پرامین بر سطح پروتئین Reelin در هیپوکامپ موش‌های بیمار شده با STZ. تعداد حیوانات در هر گروه آزمایشی ۴ موش بود. $P < 0/001$ ، $P < 0/0001$ در مقایسه با گروه STZ. $P < 0/001$ در مقایسه با گروه STZ.

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر، تأثیر مثبت ایمی‌پرامین را در بهبود حافظه‌ی موش‌های صحرایی بیمار شده با STZ نشان داد، که این رویدادها با افزایش بیان ژن انسولین، فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین و نیز افزایش سطح پروتئین Reelin در هیپوکامپ این حیوانات همراه بودند.

منجر به بروز استرس اکسیداتیو، آپوپتوز، التهاب عصبی، هایپرفسفریلاسیون پروتئین تائو و در نهایت اختلال در عملکردهای شناختی شوند (۴، ۲۶). مطالعه‌ای نشان داده است که اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین با ایجاد مقاومت به انسولین در مغز می‌تواند خطر ابتلا به فراموشی را افزایش دهد (۲۷). بعلاوه در توافق با یافته‌های ما، گزارش شده است که تزریق درون بطنی STZ از طریق هایپرفسفریلاسیون پروتئین تائو و نیز اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین می‌تواند سبب بروز اختلالات شناختی در موش‌های صحرایی شود (۲۸). مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند تزریق درون بطنی STZ از طریق افزایش التهاب عصبی، تجمع پروتئین آمیلوئید بتا و نیز اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین (کاهش بیان IR، Akt، PI3K، IRS1 و افزایش بیان GSK-3 β) در هیپوکامپ و کورتکس موش‌های صحرایی، سبب بروز اختلال در حافظه‌ی فضایی این حیوانات می‌شود (۱۴، ۲۹). در مطالعه‌ی حاضر، تزریق STZ همچنین سبب کاهش سطح پروتئین Reelin (فاکتور مهم دخیل در شکل‌پذیری سیناپسی) در هیپوکامپ موش‌ها گردید. در توافق با نتایج ما، مطالعات نشان داده‌اند که تزریق درون بطنی STZ منجر به بروز استرس اکسیداتیو، نقص در عملکرد میتوکندری، کاهش شکل‌پذیری سیناپسی در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و نیز بروز اختلال در حافظه‌ی شناختی و حافظه‌ی فضایی موش‌های صحرایی می‌شود (۳۰، ۳۱). با توجه به نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر و نیز یافته‌های مطالعات پیشین، این احتمال وجود دارد که STZ حداقل بخشی از اثرات خود در بروز اختلالات شناختی را با تأثیر بر مسیر سیگنالینگ انسولین و شکل‌پذیری سیناپسی در هیپوکامپ اعمال می‌نماید، بنابراین با تمرکز بر روی این مسیرها می‌توان راهکارهایی را برای کنترل پیشرفت بیماری آلزایمر مطرح نمود.

در این مطالعه همانطور که پیش‌تر نیز ذکر شد، جهت بهبود و یا کاهش اختلالات حافظه ناشی از STZ از ایمی‌پرامین استفاده شد تا مشخص شود آیا ایمی‌پرامین با تحت تأثیر قرار دادن فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین و شکل‌پذیری سیناپسی، که اهمیت زیادی در بیماری‌های نورودژنراتیو همچون بیماری آلزایمر دارند، می‌تواند موجب بهبود و یا کاهش نقایص حافظه در موش‌های تیمار شده با STZ شود یا خیر. نتایج حاصل نشان داد که تزریق ایمی‌پرامین به مدت ۱۴ روز متوالی موجب افزایش توانایی اکتساب و یادآوری حافظه و نیز بهبود حافظه‌ی اجتنابی کوتاه و بلندمدت در موش‌های تیمار شده با STZ گردید و همچنین بیان ژن انسولین، فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین و نیز پروتئین Reelin را در هیپوکامپ این حیوانات افزایش داد. شواهدی مبنی بر اثرات محافظتی ایمی‌پرامین بر روی سلول‌های عصبی در مطالعات in-vivo

و in-vitro وجود دارد (۳۲).

در مطالعه‌ای گزارش شده است که ایمی‌پرامین با مهار TNF- α و جلوگیری از تجمع پروتئین آمیلوئید بتا در مغز، سبب کاهش اختلالات شناختی در موش‌های مدل بیماری آلزایمر می‌شود (۳۳). مطالعه‌ای دیگر نشان داد که ایمی‌پرامین با کاهش سطح پروتئین آمیلوئید بتا و نیز کاهش تشکیل دستجات نوروفیبریلاری می‌تواند منجر به بهبود فرایندهای شناختی در بیماران آلزایمری شود (۳۴). نتایج یک تحقیق دیگر نشان داده است که تجویز مزمن ایمی‌پرامین به موش‌های دچار استرس خفیف مزمن منجر به بهبود عملکردهای شناختی در این حیوانات می‌شود (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر تیمار با ایمی‌پرامین منجر به افزایش تکثیر سلولی و نیز کاهش تخریب عصبی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی دچار ایسکمی مغزی شده است (۱۱). بعلاوه گزارش شده است که ایمی‌پرامین با افزایش نورون‌ژن در هیپوکامپ موش‌های دچار ترومای مغزی عملکردهای شناختی را در این موش‌ها بهبود می‌بخشد (۳۶).

در مطالعه‌ی دیگر نشان داده شد که ایمی‌پرامین با کاهش سطح کاسپاز ۳، JNK، P38 و نیز افزایش فرم فعال ERK در هیپوکامپ موش‌های صحرایی تیمار شده با STZ، سبب بهبود حافظه‌ی فضایی در این موش‌ها می‌شود (۱۳). بعلاوه گزارش شده است که ایمی‌پرامین با افزایش بیان Reelin در هیپوکامپ سبب کاهش رفتارهای شبه افسردگی در موش‌های صحرایی می‌شود (۳۷، ۳۸). با توجه به اینکه مطالعات نشان داده‌اند فعال شدن مسیر PI3K/AKT منجر به افزایش فعالیت سیستم کولینرژیک، افزایش بقاء سلول‌های عصبی و نیز بهبود عملکردهای شناختی می‌شود (۳، ۴) و نیز با توجه به اینکه اهمیت مسیر سیگنالینگ انسولین و شکل‌پذیری سیناپسی در فرایندهای شناختی ثابت شده است (۸)، بنابراین این احتمال وجود دارد که در مطالعه‌ی حاضر ایمی‌پرامین با افزایش بیان فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین و نیز فاکتور دخیل در شکل‌پذیری سیناپسی سبب کاهش اختلالات حافظه‌ی ناشی از STZ شده است.

از آنجایی که اختلال در فرایند نورون‌ژن و نیز بروز التهاب عصبی در پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو همچون بیماری آلزایمر نقش بسزایی دارند، از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به انجام مطالعات ایمونوهیستوشیمی و ارزیابی بیان فاکتورهای دخیل در نورون‌ژن و التهاب عصبی در بافت هیپوکامپ گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه اشاره نمود، که انجام آن برای مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق درون

هدف درمانی امیدوارکننده برای کاهش و یا بهبود اختلالات حافظه در بیماران آلزایمری پیشنهاد گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه‌ی دانشجوی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۲۹۲۰۶۵۶ می‌باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی به انجام رسیده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی تقدیر و تشکر می‌شود.

بطنی STZ سبب بروز اختلال در اکتساب و به یادآوری حافظه و نیز اختلال در حافظه‌ی اجتنابی کوتاه و بلندمدت در موش‌های صحرایی شد و این اختلالات با کاهش بیان ژن انسولین، فاکتورهای دخیل در مسیر سیگنالینگ انسولین و نیز کاهش سطح پروتئین Reelin در هیپوکامپ حیوانات همراه بودند. در حالیکه تزریق داخل صفاقی ایمی‌پرامین، با تحت تأثیر قرار دادن مسیر سیگنالینگ انسولین و شکل‌پذیری سیناپسی، سبب بهبود حافظه در موش‌های تیمار شده با STZ گردید. بنابراین استفاده از ایمی‌پرامین می‌تواند به عنوان یک

References

- Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 2020; 18(11): 1106-25.
- Gáspár A, Hutka B, Ernyey AJ, Tajti BT, Varga BT, Zádori ZS, et al. Performance of the intracerebroventricularly injected streptozotocin Alzheimer's disease model in a translationally relevant, aged and experienced rat population. *Sci Rep* 2022; 12(1): 20247.
- Agrawal R, Reno CM, Sharma S, Christensen C, Huang Y, Fisher, et al. Insulin action in the brain regulates both central and peripheral functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2021; 321(1): E156-63.
- Pomytkin I, Costa-Nunes JP, Kasatkin V, Veniaminova E, Demchenko A, Lyundup A, et al. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neurosci Ther* 2018; 24(9): 763-74.
- Gabbouj S, Ryhänen S, Marttinen M, Wittrahm R, Takalo M, Kemppainen S, et al. Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain-special emphasis on PI3K-Akt pathway. *Front Neurosci* 2019; 13: 629.
- Akhtar A, Sah SP. Insulin signaling pathway and related molecules: role in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2020; 135: 104707.
- Jossin Y. Reelin functions, mechanisms of action and signaling pathways during brain development and maturation. *Biomolecules* 2020; 10(6): 964.
- Kim JW, Herz J, Kavalali ET, Monteggia LM. A key requirement for synaptic Reelin signaling in ketamine-mediated behavioral and synaptic action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118(20): e2103079118.
- Kandil EA, Abdelkader NF, El-Sayeh BM, Saleh S. Imipramine and amitriptyline ameliorate the rotenone model of Parkinson's disease in rats. *Neuroscience* 2016; 332: 26-37.
- Strekalova T, Anthony DC, Dolgov O, Anokhin K, Kubatiev A, Steinbusch HM, et al. The differential effects of chronic imipramine or citalopram administration on physiological and behavioral outcomes in naïve mice. *Behav Brain Res* 2013; 245: 101-6.
- Schiavon AP, Milani H, Romanini CV, Foresti ML, Castro OW, Garcia-Cairasco N, et al. Imipramine enhances cell proliferation and decreases neurodegeneration in the hippocampus after transient global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2010; 470(1): 43-48.
- Nobile B, Durand M, Olié E, Guillaume S, Molès JP, Haffen E, et al. The anti-inflammatory effect of the tricyclic antidepressant clomipramine and its high penetration in the brain might be useful to prevent the psychiatric consequences of SARS-CoV-2 infection. *Front Pharmacol* 2021; 12: 615695.
- Javadvpour P, Askari S, Rashidi FS, Dargahi L, Ahmadiani A, Ghasemi R. Imipramine alleviates memory impairment and hippocampal apoptosis in STZ-induced sporadic Alzheimer's rat model: possible contribution of MAPKs and insulin signaling. *Behav Brain Res* 2021; 408: 113260.
- Akhtar A, Dhaliwal J, Saroj P, Uniyal A, Bishnoi M, Sah SP. Chromium picolinate attenuates cognitive deficit in ICV-STZ rat paradigm of sporadic Alzheimer's-like dementia via targeting neuroinflammatory and IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3 β pathway. *Inflammopharmacology* 2020; 28(2): 385-400.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 2006.
- Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. *Methods Mol Biol* 2019; 1916: 99-103.
- Sachdeva AK, Misra S, Kaur IP, Chopra K. Neuroprotective potential of sesamol and its loaded solid lipid nanoparticles in ICV-STZ-induced cognitive deficits: behavioral and biochemical evidence. *Eur J Pharmacol* 2015; 747: 132-40.
- Beirami E, Oryan S, Seyedhosseini Tamijani SM, Ahmadiani A, Dargahi L. Intranasal insulin treatment restores cognitive deficits and insulin signaling impairment induced by repeated methamphetamine exposure. *J Cell Biochem* 2018; 119(2): 2345-55.
- Chavoshinezhad S, Zibaii MI, Seyed Nazari MH, Ronaghi A, Asgari Taei A, Ghorbani A, et al. Optogenetic stimulation of entorhinal cortex reveals the implication of insulin signaling in adult rat's hippocampal neurogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2021; 111: 110344.

20. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinforma Biomath* 2013; 3(3): 71-85.
21. Azarafrouz F, Farhangian M, Chavoshinezhad S, Dargahi S, Nassiri-Asl M, Dargahi L. Interferon beta attenuates recognition memory impairment and improves brain glucose uptake in a rat model of Alzheimer's disease: Involvement of mitochondrial biogenesis and PI3K pathway. *Neuropeptides* 2022; 95: 102262.
22. Kazkayasi I, Telli G, Nemutlu E, Uma S. Intranasal metformin treatment ameliorates cognitive functions via insulin signaling pathway in ICV-STZ-induced mice model of Alzheimer's disease. *Life Sci* 2022; 299: 120538.
23. Bassani TB, Bonato JM, Machado MM, Cópola-Segovia V, Moura EL, Zanata SM, et al. Decrease in adult neurogenesis and neuroinflammation are involved in spatial memory impairment in the streptozotocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease in rats. *Mol Neurobiol* 2018; 55(5): 4280-96.
24. Verma V, Singh D, Kh R. Sinaptic acid alleviates oxidative stress and neuro-inflammatory changes in sporadic model of Alzheimer's disease in rats. *Brain Sci* 2020; 10(12): 923.
25. Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; 117: 104-17.
26. Yang JJ. Brain insulin resistance and the therapeutic value of insulin and insulin-sensitizing drugs in Alzheimer's disease neuropathology. *Acta Neurol Belg* 2022; 122(5): 1135-42.
27. Benedict C, Grillo CA. Insulin resistance as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease: a state-of-the-art review. *Front Neurosci* 2018; 12: 215.
28. Liu P, Cui L, Liu B, Liu W, Hayashi T, Mizuno K, et al. Silibinin ameliorates STZ-induced impairment of memory and learning by up-regulating insulin signaling pathway and attenuating apoptosis. *Physiol Behav* 2020; 213: 112689.
29. Rajasekar N, Nath C, Hanif K, Shukla R. Intranasal insulin administration ameliorates streptozotocin (ICV)-induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation, amyloidogenesis, and memory impairment in rats. *Mol Neurobiol* 2017; 54(8): 6507-22.
30. Esteves IM, Lopes-Aguiar C, Rossignoli MT, Ruggiero RN, Broggin ASC, Bueno-Junior LS, et al. Chronic nicotine attenuates behavioral and synaptic plasticity impairments in a streptozotocin model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2017; 353: 87-97.
31. Nabavi Zadeh F, Nazari M, Amini A, Adeli S, Barzegar Behrooz A, Fahanik Babaei J. Pre-and post-treatment of α -Tocopherol on cognitive, synaptic plasticity, and mitochondrial disorders of the hippocampus in icv-streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's-like disease in male Wistar rat. *Front Neurosci* 2023; 17: 1073369.
32. Lieberknecht V, Engel D, Rodrigues ALS, Gabilan NH. Neuroprotective effects of mirtazapine and imipramine and their effect in pro-and anti-apoptotic gene expression in human neuroblastoma cells. *Pharmacol Rep* 2020; 72(3): 563-70.
33. Chavant F, Deguil J, Pain S, Ingrand I, Milin S, Fauconneau B, et al. Imipramine, in part through tumor necrosis factor α inhibition, prevents cognitive decline and β -amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332(2): 505-14.
34. Johnson NR, Wang ACJ, Coughlan C, Sillau S, Lucero E, Viltz L, et al. Imipramine and olanzapine block apoE4-catalyzed polymerization of A β and show evidence of improving Alzheimer's disease cognition. *Alzheimers Res Ther* 2022; 14(1): 88.
35. Erburu M, Cajaleon L, Guruceaga E, Venzala E, Muñoz-Cobo I, Beltrán E, et al. Chronic mild stress and imipramine treatment elicit opposite changes in behavior and in gene expression in the mouse prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 2015; 135: 227-36.
36. Han X, Tong J, Zhang J, Farahvar A, Wang E, Yang J, et al. Imipramine treatment improves cognitive outcome associated with enhanced hippocampal neurogenesis after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 2011; 28(6): 995-1007.
37. Fenton EY, Fournier NM, Lussier AL, Romay-Tallon R, Caruncho HJ, Kalynchuk LE, et al. Imipramine protects against the deleterious effects of chronic corticosterone on depression-like behavior, hippocampal reelin expression, and neuronal maturation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015; 60: 52-59.
38. Tsuneura Y, Nakai T, Mizoguchi H, Yamada K. New strategies for the treatment of neuropsychiatric disorders based on reelin dysfunction. *Int J Mol Sci* 2022; 23(3): 1829.

The Effect of Imipramine on Memory Disorder in a Rat Model of Alzheimer's Disease: Involvement of Insulin Signaling Pathway and Reelin Protein

Elmira Beirami¹, Delaram Eslimi Esfahani¹, Alireza Jamshidi Hasanabadi²

Original Article

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurological disorder that impairs cognitive functions. Imipramine is an antidepressant drug with antioxidant and anti-inflammatory effects on the brain. The present study aimed to investigate the effect of imipramine on memory impairment, focusing on insulin signaling pathway and synaptic plasticity in rats treated with streptozotocin (STZ).

Methods: In this experimental study, 32 male Wistar rats were divided into 4 groups: control, STZ, STZ+imipramine, and imipramine. An animal model of AD was induced by intraventricular injection of STZ (3mg/kg; 3µl/ventricle). Elevated plus maze and passive avoidance tests were used to examine cognitive functions. 24 h after STZ injection, treatment with imipramine (20mg/kg) was done intraperitoneally for 14 days. The expression level of insulin and the factors involved in the insulin signaling pathway (IR, IRS2, PI3K, Akt, and mTOR) were investigated by Real-time PCR and the protein level of Reelin (a factor involved in synaptic plasticity) was evaluated by western blot technique. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used to analyze the data.

Findings: The results showed that STZ caused memory disorders in rats and decreased the expression level of insulin and factors involved in the insulin signaling pathway, and also the protein level of Reelin. In contrast, imipramine reduced memory disorders and increased the expression of the mentioned factors in the hippocampus of animals treated with STZ.

Conclusion: Imipramine appears to reduce memory disorders in STZ-treated animals through its effects on the insulin signaling pathway and protein involved in synaptic plasticity.

Keywords: Imipramine; Alzheimer's disease; Memory disorders; Insulin; Reelin protein

Citation: Beirami E, Eslimi Esfahani D, Jamshidi Hasanabadi A. **The Effect of Imipramine on Memory Disorder in a Rat Model of Alzheimer's Disease: Involvement of Insulin Signaling Pathway and Reelin Protein.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(732): 708-18.

1- Assistant Professor, Department of Animal Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2- MSc, Department of Animal Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Elmira Beirami, Assistant Professor, Department of Animal Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran; Email: elmira.beirami@khu.ac.ir