DOI: 10.22122/jims.v35i454.8745 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٥٤/هفته‌ی دوم دی ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳

اثر اریتروپویتین بر آپوپتوز نورونی در شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ در رت‌های آلزایمری شده با استرپتوزوسین

مولود شبرنگ[۱]، بهمن رشیدی[۲]، حجت‌اله علایی[۳]، محمدرضا شریفی[۳]، پرهام رئیسی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آلزایمر، اختلالی است که با تخریب نورونی مناطق درگیر در یادگیری و حافظه همراه است. بر اساس نتایج برخی مطالعات، اریتروپویتین شاید اثرات حفاظتی بر مغز داشته باشد. بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی تأثیر اریتروپویتین بر آپوپتوز نورونی در لایه‌ی گرانولار شکنج دندانه‌دار تشکیلات هیپوکامپ در مدل حیوانی بیماری آلزایمر بود.

روش‌ها: برای ایجاد مدل آلزایمر، استرپتوزوتوسین به صورت دو طرفه در بطن‌های طرفی مغز رت‌ها تزریق گردید. پس از گذشت دو هفته و مشاهده‌ی آسیب شناختی، رت‌ها به مدت دو هفته‌ی دیگر اریتروپویتین را با دوز ۵۰۰ واحد بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی و یک‌روز در میان دریافت کردند. سپس رت‌ها تحت بیهوشی قرار گرفتند و مغز آن‌ها جهت مطالعه‌ی بافت‌شناسی تشریح گردید. جهت بررسی آپوپتوز نورونی، از روش Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) استفاده شد.

یافته‌ها: چهار هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های طرفی مغز، افزایش چشمگیر تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در لایه‌ی گرانولار شکنج دندانه‌دار مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). هرچند اریتروپویتین تأثیری بر رت‌های گروه شاهد نداشت، اما به صورت معنی‌داری میزان آپوپتوز را در رت‌های گروه آسیب کاهش داد ($P < ۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، شاید اریتروپویتین از طریق کاهش آپوپتوز نورونی بتواند در بهبود عوارض بیماری‌های نورودژنراتیو مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: آلزایمر، اریتروپویتین، استرپتوزوتوسین، آپوپتوز، هیپوکامپ

ارجاع: شبرنگ مولود، رشیدی بهمن، علایی حجت‌اله، شریفی محمدرضا، رئیسی پرهام. **اثر اریتروپویتین بر آپوپتوز نورونی در شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ در رت‌های آلزایمری شده با استرپتوزوسین.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۵۴): ۱۵۹۸-۱۵۹۳

مقدمه

آلزایمر، یک بیماری شایع و مهم‌ترین علت زوال عقل در پیری می‌باشد. این بیماری نوعی اختلال پیش‌رونده و برگشت‌ناپذیر همراه با اختلال یادگیری و حافظه است. در بیماری آلزایمر به دنبال تجمع غیر طبیعی فیلامان‌های tau در کلافه‌های فیبریلی عصبی و رسوب پلاک‌های بتاآمیلوئید، مرگ وسیع نورونی به ویژه در نواحی درگیر در فرایندهای شناختی به وجود می‌آید (۱). با وجود شیوع این بیماری، هنوز درمان قطعی برای آن شناخته نشده است.

اریتروپویتین، نوعی فاکتور مؤثر در فرایند خون‌سازی است که ضمن محافظت سلول‌های اریتروئید از آپوپتوز، موجب افزایش بقای آن‌ها می‌گردد (۲). تحقیقات نشان داده است که در سیستم عصبی مرکزی، هم اریتروپویتین و هم گیرنده‌های آن وجود دارند و برای تکامل عصبی ضروری هستند (۳). همچنین، اثرات محافظتی نورونی آن‌ها در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند پارکینسون مشخص شده است (۴). نتایج مطالعات حاکی از آن است که اریتروپویتین دارای اثرات محافظتی نورونی در مقابل استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از گلوتامات که هر دو از دلایل مهم بیماری‌های نورودژنراتیو هستند، می‌باشد (۶-۵). هرچند مکانیسم دقیق این اثر محافظتی مشخص نشده، اما نشان داده شده است که اریتروپویتین نقش مهمی در بقای سلولی و افزایش فاکتورهای آنتی‌آپوپتوتیک دارد (۷).

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: پرهام رئیسی
Email: p_reisi@med.mui.ac.ir

با توجه به نتایج پژوهش‌های پیشین که نشان داده‌اند اریتروپویتین موجب بهبود یادگیری و حافظه (۹-۸) و افزایش پرولیفراسیون نورونی در رت‌های مدل آلزایمر (۱) می‌گردد، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرات اریتروپویتین بر آپوپتوز نورونی القا شده با استفاده از تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های مغزی، در لایه‌ی گرانولی شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ رت‌ها انجام شد.

روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش، رت‌های نر نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم بودند که به صورت چهارتایی در هر قفس و سیکل روشنی/ تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. آزمایش‌های حیوانی مورد پذیرش کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بود و همه‌ی آزمایش‌ها بر اساس پروتکل‌های اخلاقی مراقبت و کاربرد حیوانات آزمایشگاهی (NIH Publications No. 80-23; revised 1996) صورت گرفت. گروه‌های آزمایش شامل چهار گروه شاهد، شاهد- اریتروپویتین، آسیب و آسیب- اریتروپویتین (۵ نفر در هر گروه) بود. اریتروپویتین نوترکیبی انسانی که در مطالعه‌ی حاضر به کار برده شد، شبیه هورمون درون‌زاد و دارای فعالیت بیولوژیکی کامل در تمام گونه‌های جانوری بود (۱۱-۱۰).

روش جراحی و مداخلات: حیوانات با تزریق داخل صفاقی ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کلرال هیدرات (۱۲) بیهوش شدند و تحت جراحی استریوتاکسیک قرار گرفتند. جهت ورود کانول تزریق به بطن‌های طرفی مغز، دو سوراخ (با مختصات قدامی- خلفی = ۰/۸- میلی‌متر، طرفی = ۰/۶ ± ۱/۰ میلی‌متر و شکمی = ۴/۲- میلی‌متر) (۱۳) بر روی جمجمه ایجاد شد و سپس کانول تزریق که به یک پمپ میکروواینجکشن وصل بود، به آرامی وارد بطن طرفی گردید و با استفاده از آن، ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم استروتوزوتوسین (Sigma, St. Louis, USA) (محلول در نرمال سالین با حجم ۴ میکرولیتر در هر بطن) (۱۴) به گروه‌های آسیب تزریق شد. گروه‌های شاهد نیز تحت جراحی قرار گرفتند، اما به جای استروتوزوتوسین، حجم مساوی از نرمال سالین به آن‌ها تزریق گردید. جهت ارزیابی صحت مدل آلزایمر ایجاد شده، در پایان هفته‌ی دوم پس از جراحی، رت‌ها تحت مطالعه‌ی رفتاری یادگیری اجتنابی غیر فعال قرار گرفتند و رت‌های دچار اختلال یادگیری و حافظه، جهت ادامه‌ی تحقیق انتخاب شدند [نتایج مربوط به مطالعه‌ی رفتاری پیش‌تر به چاپ رسیده است (۱)]. از شروع هفته‌ی سوم پس از جراحی، گروه‌های درمان به مدت دو هفته به صورت یک‌روز در میان، ۵۰۰۰ واحد بر کیلوگرم اریتروپویتین (Sigma, St. Louis, USA) (۱) را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. در گروه‌های شاهد نیز حجم مساوی از نرمال سالین تزریق گردید.

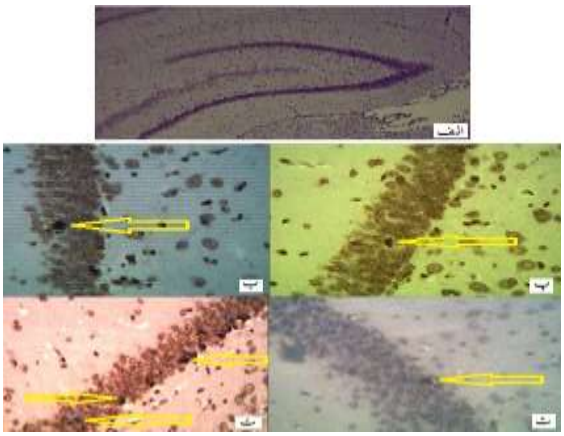
مطالعه‌ی بافت‌شناسی: در پایان هفته‌ی چهارم، رت‌ها بیهوش شدند و پس از جدا کردن سر، مغز آن‌ها تشریح و در فرمالین بافر شده‌ی ۱۰ درصد فیکس گردید. سپس مراحل پاساژ بافتی برای آبگیری، شفاف‌سازی و تلقیح پارافین و در نهایت، قالب‌گیری انجام شد. جهت بررسی هیستومورفولوژیک، برش‌های سریالی از ناحیه‌ی جلو به عقب (کرونال) تهیه گردید. لازم به ذکر است که از ناحیه‌ی جلو تا عقب به فاصله‌ی هر ۵۰۰ میکرون، یک برش با ضخامت ۴-۳ میکرومتر با استفاده از میکروتوم انجام شد و بر روی لام قرار گرفت.

اسلایدها به مدت حدود ۱۲۰-۳۰ دقیقه در آون با دمای ۵۸-۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا پارافین مقطع بافتی ذوب شود. سپس برای تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک، از روش Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) با کمک کیت‌های تشخیصی (Roche, Swiss) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده استفاده گردید. بعد از فاصله‌ی کوتاهی از پارافین‌زدایی، اسلایدها با پروتئیناز k تیمار و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس اسلایدها با محلول Phosphate buffered saline (PBS) (دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) شستشو داده شد و در محلول حاوی ۰/۱ میلی‌مول Tris-hydrochloride (Tris HCl)، به مدت ۳۰ دقیقه در pH = ۷ و دمای اتاق قرار گرفت و سپس دوباره با محلول PBS شستشو داده شد. در مرحله‌ی بعد، ترکیب واکنشی TUNEL اضافه گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در محفظه‌ی مرطوب انکوبه شد. سپس اسلایدها شسته و دی‌آمینوبنزیدین (Diaminobenzidine یا DAB) به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد و پس از آن با آب جاری شستشو داده شد و رنگ زمینه‌ای با هماتوکسیلین صورت گرفت. نمونه‌ها در گزیلول شفاف‌سازی گردید و با ریختن یک یا دو قطره چسب انتیلان روی برش، با دقت لامل روی برش قرار گرفت و چسب با فشار مختصری پخش شد تا به صورت یکنواخت و بدون حباب هوا زیر لامل قرار گیرد. لام‌ها تمیز گردید و پس از خشک شدن چسب، نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شد. نمونه‌ها با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ و نرم‌افزار Motic Image عکس‌برداری گردید و تصاویر تحت شمارش سلولی قرار گرفت.

داده‌ها با استفاده از آزمون‌های Mann-Whitney، Kruskal-Wallis (ANOVA غیر پارامتریک) و Dunn's Multiple Comparisons مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌های توصیفی نیز به صورت میانگین و انحراف معیار بیان گردید. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

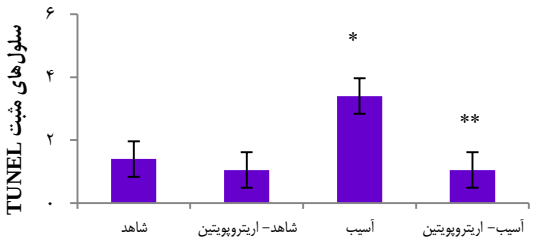
یافته‌ها

یافته‌های مطالعه‌ی هیستولوژیک (شکل ۱) نشان داد که چهار هفته پس از تزریق استروتوزوتوسین در بطن‌های طرفی مغز رت، تعداد سلول‌های آپوپتوتیک به صورت معنی‌داری در لایه‌ی گرانولار شکنج دندانه‌دار گروه آسیب نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۲)



شکل ۱. نمای میکروسکوپ نوری از شکنج دندانه‌دار تشکیلات هیپوکامپ رت (الف) (بزرگنمایی ۴×)، سلول‌های آپوپتوتیک [سلول‌های مثبت Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP (TUNEL) Nick-End Labeling] در لایه‌ی گرانولار گروه‌های شاهد (ب)، گروه شاهد- اریتروپویتین (پ)، گروه آسیب (ت) و گروه آسیب- اریتروپویتین (ث) (بزرگنمایی ۴۰×).

هرچند اریتروپویتین به تنهایی نتوانست تأثیری بر آپوپتوز نورونی شکنج دندانه‌دار تشکیلات هیپوکامپ رت‌های گروه شاهد داشته باشد، اما به صورت چشمگیری در گروه آسیب- اریتروپویتین توانست تعداد نورون‌های دچار آپوپتوز را در مقایسه با گروه آسیب کاهش دهد ($P < ۰/۰۱$) (شکل ۲).



شکل ۲. تأثیر اریتروپویتین بر آپوپتوز نورونی در شکنج دندانه‌دار تشکیلات هیپوکامپ پس از تزریق استرپتوزوسین در بطن‌های طرفی رت

$^{*}P < ۰/۰۵$ وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد، $^{**}P < ۰/۰۱$ وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه آسیب

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP Nick-End Labeling

تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آسیب- اریتروپویتین و شاهد وجود نداشت.

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های طرفی مغز، موجب افزایش چشمگیر تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در لایه‌ی گرانولار شکنج دندانه‌دار می‌گردد. هرچند اریتروپویتین تأثیری بر میزان آپوپتوز نورونی در رت‌های سالم نداشت، اما در رت‌های گروه آسیب توانست آپوپتوز را به طور چشمگیری کاهش دهد و به سطح گروه شاهد برساند.

آلزایمر یک بیماری شایع و از مهم‌ترین علت زوال عقل در پیری به شمار می‌رود. این بیماری یک اختلال پیش‌رونده و برگشت‌ناپذیر، همراه با اختلال در یادگیری و حافظه می‌باشد. در بیماری آلزایمر، به دنبال تجمع غیر طبیعی فیلامان‌های tau در کلافه‌های فیبریلی عصبی و رسوب پلاک‌های بتاآمیلوئید، مرگ وسیع نورونی به ویژه در نواحی درگیر در فرایندهای شناختی به وجود می‌آید (۱). با وجود شیوع این بیماری، هنوز درمان قطعی برای آن شناخته نشده است.

در پژوهش حاضر، مدل آلزایمری با استفاده از تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین در رت‌ها القا شد. مطالعات نشان داده‌اند که تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های طرفی مغز، موجب اختلال متابولیسم گلوکز در مغز می‌گردد و شاید با برهم زدن تعادل بین تولید و مصرف انرژی، باعث کاهش Adenosine triphosphate (ATP) در مغز شود (۱۵). اختلال متابولیسم انرژی، منجر به استرس اکسیداتیو و افزایش سایتوکاین‌های التهابی می‌شود و این عوامل، آسیب عملکرد میتوکندریایی و افزایش احتمال آپوپتوز در مغز به ویژه در هیپوکامپ را به همراه دارد (۱۷-۱۶). نتایج تحقیقات حاکی از آن است که تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های طرفی مغز، از طریق کاهش فعالیت آنزیم سنتز کننده‌ی استیل کولین و افزایش فعالیت آنزیم تخریب کننده‌ی این انتقال دهنده‌ی عصبی و همچنین، با ایجاد اختلال در متابولیسم انرژی، می‌تواند از طریق کاهش تولید استیل کوآنزیم A، موجب نقص در عملکرد نورون‌های کولینرژیک گردد (۱۹-۱۸).

هرچند نوروژنز پس از تولد در سیستم مرکزی اعصاب متوقف می‌شود، اما ظرفیت تولید نورون‌های جدید در برخی مناطق مغز از جمله شکنج دندانه‌ای از تشکیلات هیپوکامپ، تا پایان عمر حفظ می‌گردد (۲۰). یافته‌های پژوهشی نشان داد که تعداد زیادی از این نورون‌های تازه ساخته شده در نوروژنز افراد بالغ دچار آپوپتوز می‌گردد و نمی‌تواند وارد سیستم عملکردی این ناحیه شود (۲۱). بنابراین، عوامل و شرایطی که بتواند از آپوپتوز نورونی که در سیستم مرکزی اعصاب در پستانداران بالغ وجود دارد (۲۲) و در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر تشدید می‌گردد

(۱)، جلوگیری نماید؛ می‌تواند در بهبود فرایندهای عصبی و شناختی این نوع بیماری‌ها مؤثر باشد (۲۴-۲۳).

در مطالعات پیشین مشاهده شد که اریتروپویتین می‌تواند عملکردهای شناختی را به صورت بارزی در رت‌های آلزایمری شده با روش تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های طرفی مغز بهبود بخشد (۹-۸). همچنین، این نتیجه حاصل شد که اریتروپویتین می‌تواند پرولیفراسیون نورونی را در شکنج دندانه‌ای رت‌های آلزایمری شده به صورت بارزی افزایش دهد (۱). با توجه به نتایج پژوهش حاضر که نشان داد اریتروپویتین، آپوپتوز نورونی را در رت‌های گروه آسیب به طور چشمگیری کاهش می‌دهد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش نوروژنز در شکنج دندانه‌دار می‌تواند معلول دو حالت باشد؛ یکی افزایش ساخت نورون‌های جدید و دوم، به دلیل این که بخشی عمده‌ای از نورون‌های تازه متولد شده دچار آپوپتوز می‌شوند، افزایش تعداد نورون‌های تازه متولد شده به دنبال تجویز اریتروپویتین، ممکن است ناشی از اثرات ضد آپوپتوزی آن بر این سلول‌های تازه باشد.

نتایج تحقیقات حاکی از آن است که در سکته‌ی مغزی و ضربه به سر، اریتروپویتین از طریق افزایش انتقال گلوکز و آنزیم‌های گلیکولیتیک و فاکتورهای رشد، اثرات محافظتی بر مغز دارد (۲۳-۲۲). همچنین، می‌تواند فاکتورهای نوروتروفیک مانند فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (Brain-derived neurotrophic factor یا BDNF)، فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (Insulin-like growth factor-1 یا IGF-۱) و برخی دیگر از پروتئین‌ها را در هیپوکامپ افزایش دهد (۱). اثرات قوی آنتی‌اکسیدانی اریتروپویتین، نورون‌ها را در مقابل عوامل مختلف استرس‌زا محافظت می‌کند و به عنوان فاکتور مهمی در مقابل استرس اکسیداتیو القا شده به دلیل تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های طرفی مغز، از آپوپتوز نورونی جلوگیری می‌نماید (۲۴). همچنین، بسیاری از مدل‌های مختلف تجربی نشان داده‌اند که اریتروپویتین التهاب عصبی را کاهش می‌دهد و این امر، با کاهش چشمگیر سایتوکاین‌های پیش‌التهابی در مغز همراه است (۲۵).

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، اریتروپویتین موجب کاهش آپوپتوز در شکنج دندانه‌دار رت‌های مدل آلزایمر می‌گردد و می‌تواند به عنوان یک انتخاب جهت بهبود بیماری آلزایمر در نظر گرفته شود، هرچند نیاز به انجام پژوهش‌های گسترده‌تر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی با شماره‌ی ۳۸۹۰۱۷ می‌باشد که با حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

References

1. Arabpoor Z, Hamidi G, Rashidi B, Shabrang M, Alaei H, Sharifi MR, et al. Erythropoietin improves neuronal proliferation in dentate gyrus of hippocampal formation in an animal model of Alzheimer's disease. Adv Biomed Res 2012; 1: 50.
2. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. Nature 2000; 405(6787): 635.
3. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. JAMA 2005; 293(1): 90-5.
4. Wu Y, Shang Y, Sun SG, Liu RG, Yang WQ. Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurodegenaration in PC12 cells. Neurosci Bull 2007; 23(3): 156-64.
5. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. J Biol Chem 2001; 276(42): 39469-75.
6. Nakata S, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Satoh Y, Ishikawa J, et al. NF-kappaB family proteins participate in multiple steps of hematopoiesis through elimination of reactive oxygen species. J Biol Chem 2004; 279(53): 55578-86.
7. Ma R, Xiong N, Huang C, Tang Q, Hu B, Xiang J, et al. Erythropoietin protects PC12 cells from beta-amyloid(25-35)-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. Neuropharmacology 2009; 56 (6-7): 1027-34.
8. Hamidi G, Arabpour Z, Shabrang M, Rashidi B, Alaei H, Sharifi MR, et al. Erythropoietin improves spatial learning and memory in streptozotocin model of dementia. Pathophysiology 2013; 20(2): 153-8.
9. Reisi P, Arabpoor Z, Shabrang M, Rashidi B, Alaei H, Sharifi MR, et al. The effects of erythropoietin on learning and memory in rats with Alzheimer's diseases. J Isfahan Med Sch 2011; 29(159): 1648-56. [In Persian].
10. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. Behav Brain Res 2004; 153(1): 77-86.
11. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, et al. Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. Br J Pharmacol 1999; 127(2): 482-8.
12. Rashidi B, Payghani C, Khani F, Rafieezadeh A, Alaei H, Reisi P. The effect of levothyroxine on lysolecithin-induced local demyelination in optic chiasm of male rats. J Isfahan Med Sch 2017; 35(437): 789-95. [In Persian].
13. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego, CA: Academic Press; 2005.

14. Dehghani Dolatabadi HR, Reisi P, Alaei H, Azizi MH, Pilehvarian AA. Folic acid and coenzyme q10 ameliorate cognitive dysfunction in the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. Iran J Basic Med Sci 2012; 15(2): 719-24.
15. Yosefi1 M, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian AA. Effect of exercise on learning and memory in rats after intracerebroventricular injection of streptozotocin. J Isfahan Med Sch 2011; 29(151): 1142-9. [In Persian].
16. Shin EJ, Jeong JH, Bing G, Park ES, Chae JS, Yen TP, et al. Kainate-induced mitochondrial oxidative stress contributes to hippocampal degeneration in senescence-accelerated mice. Cell Signal 2008; 20(4): 645-58.
17. Vendramini AA, de Labio RW, Rasmussen LT, Dos Reis NM, Minett T, Bertolucci PH, et al. Interleukin-8-251T > A, Interleukin-1alpha-889C > T and Apolipoprotein E polymorphisms in Alzheimer's disease. Genet Mol Biol 2011; 34(1): 1-5.
18. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. Behav Neurosci 1998; 112(5): 1199-208.
19. Kumar R, Jaggi AS, Singh N. Effects of erythropoietin on memory deficits and brain oxidative stress in the mouse models of dementia. Korean J Physiol Pharmacol 2010; 14(5): 345-52.
20. Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. Neurosci Lett 2000; 291(1): 17-20.
21. Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(19): 10910-7.
22. White LD, Barone S Jr. Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. Cell Death Differ 2001; 8(4): 345-56.
23. Ferri P, Cecchini T, Ciaroni S, Ambrogini P, Cuppini R, Santi S, et al. Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. J Neurocytol 2003; 32(9): 1155-64.
24. Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. Nat Med 1999; 5(4): 448-53.
25. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. Cell Death Differ 2004; 11(Suppl 1): S37-S44.

DOI: 10.22122/jims.v35i454.8745 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Received: 02.09.2017

Vol. 35, No. 454, 2nd Week, January 2018 Accepted: 04.11.2017

The Effect of Erythropoietin on Neuronal Apoptosis in Hippocampal Dentate Gyrus in Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease in Rats

Moloud Shabrang[1], Bahman Rashidi[2], Hojjatallah Alaei[3], Mohammad Reza Sharifi[3], Parham Reisi[4]

Original Article

Abstract

Background: Alzheimer's disease is a disorder associated with neuronal degeneration in the areas involve in learning and memory. It has been proposed that erythropoietin probably has neuroprotective effects. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of erythropoietin on neuronal apoptosis in the granular layer of dentate gyrus of the hippocampus in an animal model of Alzheimer's disease.

Methods: Animal model of Alzheimer's was established via bilateral intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ). After 2 weeks and observation of cognitive disorder, rats received intraperitoneal (IP) injection of erythropoietin every other day with a dose of 5000 IU/kg for 2 weeks. Finally, the rats were anesthetized and their brains were dissected for immunohistochemical study. Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) method was used to study neuronal apoptosis.

Findings: Intracerebroventricular injection of streptozotocin increased the number of apoptotic cells in the granular layer of dentate gyrus significantly ($P < 0.05$). Although erythropoietin had no effect on the control rats, it significantly reduced the number of apoptotic cells in the lesion group ($P < 0.01$)

Conclusion: The results of this study indicate that erythropoietin may be effective in reducing the complications of neurodegenerative diseases by reducing neuronal apoptosis.

Keywords: Alzheimer's disease, Erythropoietin, Streptozotocin, Apoptosis, Hippocampus

Citation: Shabrang M, Rashidi B, Alaei H, Sharifi MR, Reisi P. **The Effect of Erythropoietin on Neuronal Apoptosis in Hippocampal Dentate Gyrus in Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease in Rats.** J Isfahan Med Sch 2018; 35(454): 1593-8.

1- Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Parham Reisi, Email: p_reisi@med.mui.ac.ir