

## The maintenance effect of $\beta$ -amyloid injection in the CA1 region of hippocampus on learning and spatial memory in adult male rats

Amiri S<sup>1</sup>, Azadmanesh K<sup>2</sup>, Naghdi N<sup>3\*</sup>

1- PhD Student in Biotechnology, Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I. R. Iran.

Received 2016/12/13; Accepted 2018/01/15

### Abstract:

**Background:** Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative diseases that lead to the progressive loss of mental, behavioral and learning abilities. The aim of this study was to investigate the maintenance effect of  $\beta$ -amyloid1-42 ( $A\beta$ ) injection in the CA1 region of hippocampus on learning and spatial memory of adult male rats using the Morris water maze test.

**Materials and Methods:** In this study, 42 adult male Wistar rats were randomly divided into control (intact), sham ( $A\beta$  solvent) and  $A\beta$ -injected groups (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). The  $\beta$ -amyloid and its solvent were bilaterally injected into the CA1 region of rats' hippocampus. The first recipient group of  $A\beta$  and its solvent after 6, the second group after 11 and the third groups after 31 days were trained by the Morris water maze test.

**Results:** During 4 training days and also in probe and visible tests, there was no significant difference between control and sham groups. The results of the learning steps in  $A\beta$  groups showed that traveled distance and escape latency to find the hidden platform was significantly increased compared with the sham groups, but there was no significant difference in the probe and visible tests between these groups.

**Conclusion:** It seems that long exposure to  $A\beta$  can lead to more memory and learning loss in animals with Alzheimer.

**Keywords:** Alzheimer,  $\beta$ -Amyloid, Hippocampus, Spatial Learning memory, Rat

\* Corresponding Author.

Email: naghdinasser@yahoo.com

Tel: 0098 910 101 7424

Fax: 0098 21 641 12834

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2018; Vol. 22, No 1, Pages 1-14*

Please cite this article as: Amiri S, Azadmanesh K, Naghdi N. The maintenance effect of  $\beta$ -amyloid injection in the CA1 region of hippocampus on learning and spatial memory in adult male rats. *Feyz* 2018; 22(1): 1-14.

# بررسی اثر ماندگاری تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بالغ بر یادگیری و حافظه فضایی

سارا امیری<sup>۱</sup>، کیهان آزادمنش<sup>۲</sup>، ناصر نقدی<sup>۳\*</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** آلزایمر یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی است که منجر به از دست رفتن توان فکری، رفتاری و توانایی یادگیری می‌گردد. هدف از انجام این مطالعه بررسی ماندگاری اثر تزریق بتا آمیلوئید ۱-۴۲ در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بالغ بر یادگیری و حافظه فضایی توسط ماز آبی موریس می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ استفاده شد که به‌طور تصادفی در گروه‌های کنترل (دست‌نخورده)، شم (تزریق حلال) و دریافت‌کننده بتا آمیلوئید (۵ میکروگرم/میکرولیتر) تقسیم بندی شدند. تزریقات به صورت دوطرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌ها انجام شد. گروه اول دریافت‌کننده بتا آمیلوئید و حلال آن پس از ۶ روز، گروه دوم پس از ۱۱ روز و گروه سوم پس از ۳۱ روز تحت آموزش با ماز آبی موریس قرار گرفتند.

**نتایج:** در مقایسه دو گروه کنترل و شم در طول ۴ روز آموزش و همچنین در آزمایش به‌خاطرآوری و یافتن سکوی آشکار، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج مرحله یادگیری در گروه‌های دریافت‌کننده بتا آمیلوئید نشان می‌دهد که مسافت طی شده و زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های شم افزایش یافته، ولی تفاوت معنی‌داری در آزمایش به‌خاطرآوری و یافتن سکوی آشکار بین این گروه‌ها مشاهده نگردید.

**نتیجه‌گیری:** تحت تاثیر قرار گرفتن طولانی مدت هیپوکامپ با بتا آمیلوئید سبب تخریب بیشتر حافظه و یادگیری در حیوانات مبتلا به آلزایمر می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** آلزایمر، بتا آمیلوئید، هیپوکامپ، یادگیری و حافظه فضایی، موش صحرایی

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۹۷، صفحات ۱۴-۱

## مقدمه

انتظار می‌رود در سال ۲۰۵۰ از هر ۸۵ نفر یک نفر به این بیماری مبتلا گردد [۴]. اکثریت موارد بیماری آلزایمر به‌صورت انفرادی و کمتر از ۱۰ درصد بیماران دارای فرم فامیلی (FAD) می‌باشند. این بیماری با الگوی توارثی اتوزومال غالب می‌باشد که در فرم فامیلی بروز بیماری به‌صورت شروع زود هنگام بوده که در اکثر موارد موتاسیون در ژن‌های کد کننده پروتئین پیش‌ساز بتا آمیلوئید (APP) و همچنین پرسلین (PS1 و PS2) علت بروز این بیماری می‌باشد [۶،۵،۲]. فرضیه‌های مختلفی در مورد اساس فاکتورهای مختلف برای توضیح ناهنجاری‌های چندعاملی مانند آلزایمر وجود دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به فرضیه کولینرژیک، فرضیه آمیلوئید بتا، فرضیه پروتئین تائو و فرضیه التهاب اشاره کرد [۷]. فرضیه کولینرژیک مرتبط با تغییرات و کاهش یافتن نورون‌های کولینرژیک می‌باشد [۸] و فرضیه بتا آمیلوئید مکانیسم بیماری را براساس حضور و تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی توضیح می‌دهد [۹]. مطالعات اخیر که نشان‌دهنده نقش پررنگ الیگومرهای بتا آمیلوئید در اختلالات سیناپسی می‌باشند پیشنهاد می‌دهند که این الیگومرها از مهم‌ترین سیگنال‌ها هستند که منجر به از بین رفتن تمامیت عملکردهای مغزی می‌شوند [۱۰-۱۳] و به‌نظر می‌رسد تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی که در سنین بالاتر ایجاد شده و توسعه پیدا

بیماری آلزایمر یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی و مسبب بیش از ۸۰ درصد موارد زوال عقل در سراسر دنیا در افراد سالخورده می‌باشد [۱]. آلزایمر بیماری است که با یک شروع تدریجی و کاهش شناختی پیش‌رونده و غیر قابل بازگشت مشخص شده، سبب از بین رفتن حافظه و سایر زمینه‌های شناختی گردیده و در نهایت ۳ تا ۹ سال پس از تشخیص منجر به مرگ می‌گردد. اگرچه تخریب حافظه در مراحل اولیه بیماری ظاهر می‌گردد عملکردهای حرکتی و حسی بیماران معمولاً در مراحل آخر تحت تاثیر قرار می‌گیرند [۳،۲]. سن مهم‌ترین ریسک فاکتور برای این بیماری می‌باشد و شیوع آن پس از سن ۶۵ سالگی به ازای هر ۵ سال دو برابر می‌شود.

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استاد، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

## \* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی

تلفن: ۰۹۱۰۱۰۱۷۴۲۴ | دوره‌نویس: ۰۲۱ ۶۴۱۱۲۸۳۴

پست الکترونیک: naghdinasser@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۳ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

۷ الی ۱۹) و رطوبت هوا  $4 \pm 55/6$  درصد نگهداری شدند. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه دسترسی آزاد داشتند. حیوانات پس از یک هفته آشنایی با محیط به روش تصادفی به گروه‌های کنترل، سه گروه Sham۶، Sham۱۱، Sham۳۱ و سه گروه  $\beta 6$ ،  $\beta 11$  و  $\beta 31$  تقسیم شدند.

#### القای آلزایمر:

از بتا آمیلوئید ۴۲-۱ برای القای آلزایمر در حیوانات استفاده شد. ویال‌های ۰/۱ میلی‌گرمی بتا آمیلوئید تهیه شده از شرکت Tocris در آب دیونیزه در غلظت ۵ میکروگرم در میکرو-لیتر حل شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز برای به-دست آمدن شکل تجمعی انکوبه شد. حیوانات به وسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بیهوش شدند و درون دستگاه استروتاکس قرار گرفتند. بعد از تراشیدن موهای روی سر و سوراخ کردن ججمه، مقدار ۱ میکرولیتر از مایع بتا آمیلوئید به وسیله میکرواینجکشن پمپ و با استفاده از سرنگ همیلتون درون ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز حیوانات مطابق با اطلس پاکسینوس و واتسون با مختصات AP ۸۴/۳،  $ML \pm 2/2$  و DV ۲/۷ (میلی‌متر) [۱۹] به صورت دوطرفه تزریق شد. سرعت تزریق ۰/۵ میکرولیتر در دقیقه بود و پس از کامل شدن تزریق سوزن به مدت ۳ دقیقه در محل باقی ماند.

#### رنگ‌آمیزی کنگورد:

برای مشاهده پلاک‌های آمیلوئیدی ۱۰ و ۳۵ روز پس از جراحی و تزریق بتا آمیلوئید، از مغز لام پاتولوژیک تهیه شده و رنگ‌آمیزی کنگورد که ویژه پلاک می‌باشد به‌طور خلاصه به شرح ذیل انجام شد: برش‌ها بعد از به آب رسیدن به مدت ۲۰ دقیقه درون محلول نمک اشباع شده قلیایی قرار داده شده و پس از آن ۳۰ دقیقه درون محلول کنگورد و در نهایت در گزلبول و آب قرار گرفتند. بعد از خشک و ثابت شدن، تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی در هیپوکامپ مغز مورد بررسی قرار گرفت [۲۰].

#### سنجش یادگیری و حافظه فضایی:

برای آزمون یادگیری و حافظه فضایی از ماز آبی مورس (Morris water maze) استفاده شد. دستگاه رفتاری شامل یک مخزن فلزی حلقوی با دیواره مشکی (به قطر ۱۵۰ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر) است که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری از آب  $2 \pm 21$  درجه سانتی‌گراد پر می‌شود. یک سکوی مدور (به قطر ۱۰ و ارتفاع ۲۸ سانتی‌متر) حدود ۲ سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز یکی از ربع

می‌کنند رخداد مراحل بعدتر این بیماری می‌باشد [۱۱]. بیماری آلزایمر در مراحل پیشرفته قابل تشخیص است و از نظر پاتولوژیکی با تجمع پروتئین بتا آمیلوئید و پیچ‌خوردگی‌های نوروفیبریلی در نواحی حساس و آسیب‌پذیر مغزی مانند هیپوکامپ و کورتکس مغز تشخیص داده می‌شود [۲]. پلاک‌های تشکیل شده نتیجه تجمع پپتیدهای کوچک بتا آمیلوئید هستند که این پپتیدها خود نتیجه برش‌های پروتئولیتیکی پروتئین پیش‌ساز بتا آمیلوئید می‌باشند [۱۳، ۱۴]. APP اساساً توسط آنزیم آلفا سکرتاز برش خورده و تولید فرم ترشعی پروتئین پیش‌ساز بتا آمیلوئید یعنی sAPP را می‌نماید که این فرم محلول و غیر سمی بوده، ولی زمانی که APP توسط بتا و گاما سکرتاز برش داده شود، منجر به تشکیل  $\beta 1-40$  و  $\beta 1-42$  می‌شود که برخلاف sAPP نامحلول بوده و منجر به تجمع پلاک‌های آمیلوئید می‌گردد [۱۵، ۱۶]. از علائم بیماران دارای بیماری آلزایمر کاهش حافظه کوتاه مدت و همچنین حافظه کاری همزمان با پیشرفت بیماری به علت نقص در اجزای اجرایی حافظه کاری می‌باشد [۱۷]. فعالیت‌های فیزیکی داشتن زندگی پویا و فعال می‌تواند سبب پیشگیری و یا ایجاد تاخیر در وقوع و پیشرفت ناهنجاری‌های مغزی گردد. مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت‌های فیزیکی باعث کاهش آسیب‌های نورونی در مدل‌های حیوانی آلزایمری می‌شود [۱۸]. ماز آبی مورس نوعی آزمون سنجش یادگیری و حافظه می‌باشد که در مطالعه ناهنجاری‌های مغزی در ارتباط با فراموشی در بیماری‌ها از جمله بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحقیقات بسیاری جهت یافتن راهی مناسب برای درمان پیشگیری و یا تشخیص زود هنگام این بیماری صورت گرفته، ولی همچنان مطالعات بیشتری مورد نیاز است. در این مطالعه در کنار بررسی اثر آموزش و یادگیری توسط ماز در بهبود روند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی به بررسی ماندگاری اثر تزریق بتا آمیلوئید ۴۲-۱ پس از گذشت ۳۱ روز در مدل ایجاد شده بیماری آلزایمر در موش‌های صحرائی نر بالغ پرداخته شده است.

#### مواد و روش‌ها

در این پژوهش تعداد ۴۲ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۳۰-۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران (تهران) تهیه گردید. موش‌های مورد آزمایش در گروه‌های ۶ تایی در قفس‌های فایبرگلاس (ابعاد: عرض ۳۱، طول ۴۷ و ارتفاع ۲۱ سانتی‌متر) در حیوانخانه بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی انستیتو پاستور تهران در شرایط کنترل شده، در دمای محیطی  $1 \pm 24$  درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت (روشنایی از

بررسی بافت شناسی:

برای بررسی و تایید محل صحیح تزریق موش با اثر بیهوش شده، سپس مغز حیوان از جمجمه خارج گردیده و پس از ثابت شدن مغز در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۳ روز و انتقال آن به فرمالین ۳ درصد، برش‌های ۱۰۰ میکرونی با استفاده از دستگاه ویبرواسلایس از آن تهیه شده و سپس محل تزریق در زیر میکروسکوپ بررسی شد. برای بررسی القای آلزایمر در موش‌های دارای تزریق بتا آمیلوئید، پس از گذشت ۱۰ و ۳۵ روز از تزریق، و پس از انجام پرفیوژن و تهیه بلوک پارافینه، تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز داده‌ها:

به منظور تحلیل داده‌های به دست آمده از شاخص یادگیری فضایی در مرحله اکتساب از آزمون t مستقل و همچنین آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey در سطح  $P \leq 0.05$  استفاده شد.

#### نتایج

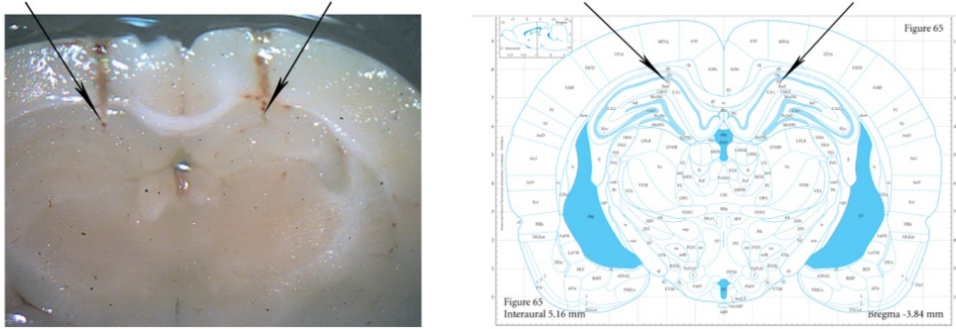
بررسی لام‌های تهیه شده مختصات صحیح محل تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه CA1 هیپوکامپ را تایید نمود (شکل شماره ۱). همچنین، مطالعات بافت شناسی نشان دادند که پروتکل استفاده شده برای القای آلزایمر در مغز موش‌های صحرایی کارآمد بوده و پس از گذشت ۱۰ و ۳۵ روز از القای آلزایمر پلاک‌های بتا آمیلوئید در مغز حیوانات مشاهده شدند (شکل شماره ۲). نتایج تحقیق در مرحله یادگیری به شرح ذیل بود:

۱- گروه شم: در مقایسه نتایج گروه کنترل با ۳ گروه Sham6 (F3, 20=0.942, n.s.) و Sham11 (F3, 20=1.326, n.s.) و مسافت طی شده (n.s.) جهت یافتن سکوی پنهان مشاهده نشد.

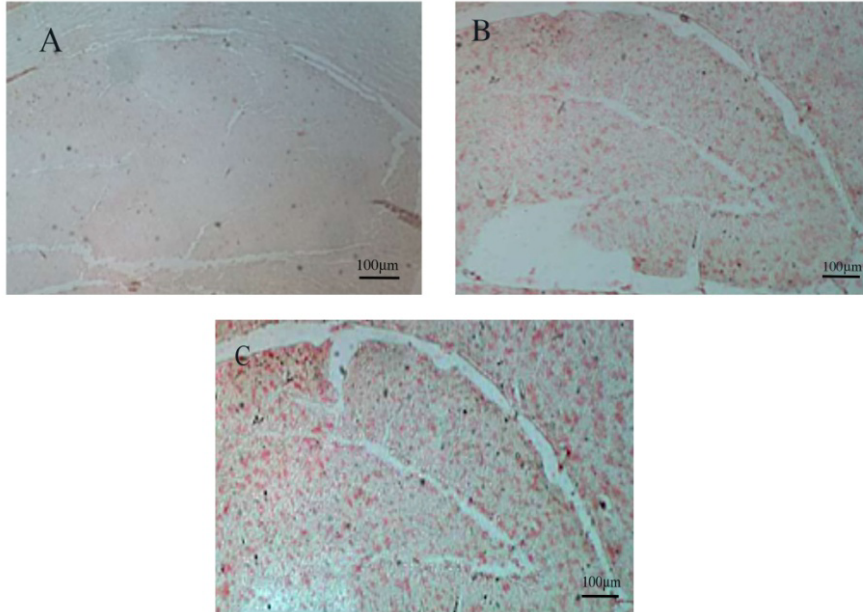
الف) گروه ۶ روزه (Sham6 و Aβ6): نتایج حاصل از مسافت طی شده و زمان سپری شده در گروه اول آزمایش (۶ روز پس از تزریق بتا آمیلوئید) در شکل‌های شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده ( $P < 0.001$ ) و زمان سپری شده ( $P < 0.001$ ) می‌باشد.

دایره‌های ازپیش تعیین شده قرار داده می‌شود. حرکت و رفتار حیوان به وسیله نرم‌افزار Ethovision 7 و دوربین بالای مخزن ردیابی و ثبت می‌شود. مسیر شنای موش در هر بار آموزش ثبت شده و متغیرهای زیر اندازه‌گیری شدند: مدت زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان توسط حیوان؛ طول مسافت پیموده شده در هر بار آموزش؛ مدت زمان سپری شده در ربع هدف؛ و روش آموزش ماز آبی موریس. در مرحله یادگیری موش‌ها به مدت ۴ روز متوالی و هر روز در ۴ کارآزمایی جداگانه جهت یافتن سکوی پنهان که در مرکز ربع جنوب غربی قرار داشت، تحت آموزش قرار گرفتند. هر موش به‌طور تصادفی از یکی از چهار جهت اصلی به نحوی داخل آب رها می‌شد که سر حیوان به سمت دیواره حوضچه قرار داشته باشد. سپس برای یافتن سکوی پنهان در آب شنا می‌کرد. در هر کارآزمایی به محض یافتن سکوی توسط موش و یا پس از ۹۰ ثانیه به پایان می‌رسید و پس از یافتن سکوی به موش ۲۰ ثانیه زمان داده می‌شد تا در روی سکوی باقی بماند. پس از آخرین آموزش هر روز حیوان از حوضچه خارج شده، با حوله خشک شده و سپس به قفس خود بازگردانده می‌شد. در روز پنجم تست پروب و آزمون سکوی آشکار اندازه‌گیری شد. آزمون پروب و سکوی آشکار (visible)، هر دو ۲۴ ساعت پس از آخرین روز آموزش انجام شدند. در آزمون پروب حافظه فضایی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مرحله موش‌ها در یک آزمون ۶۰ ثانیه‌ای که طی آن سکوی از داخل آب برداشته می‌شد، مورد ارزیابی قرار گرفته و مدت زمان صرف شده در ربع دایره هدف که قبلاً سکوی در آن قرار داشت، اندازه‌گیری شد. در آزمون سکوی آشکار که جهت سنجش سیستم‌های انگیزشی، حرکتی و بینایی انجام می‌گیرد، پس از پوشانده شدن سکوی با فویل آلومینیومی به گونه‌ای که به‌صورت واضح دیده شود، سکوی هم سطح آب قرار داده شد. این بار سکوی در وسط ربع جنوب شرقی قرار داشت و هر موش در ۴ کارآزمایی به‌طور تصادفی از ۴ جهت اصلی به داخل آب رها شد. پس از پیدا کردن سکوی پوشانده شده و هم سطح آب توسط موش، مدت زمان پیدا کردن سکوی در هر بار اندازه‌گیری شد. برای بررسی ماندگاری اثر بتا آمیلوئید تزریق شده، سه گروه آزمایشی طراحی شد، به گونه‌ای که گروه اول پس از گذشت ۶ روز، گروه دوم پس از گذشت ۱۱ روز و گروه سوم پس از گذشت ۳۱ روز از تزریق هر کدام به مدت ۴ روز و در هر روز با ۴ کارآزمایی آموزش داده شدند و به ترتیب در روز دهم برای گروه اول، در روز پانزدهم برای گروه دوم و در روز سی و پنجم برای گروه سوم تست پروب و آزمون سکوی آشکار انجام شد.

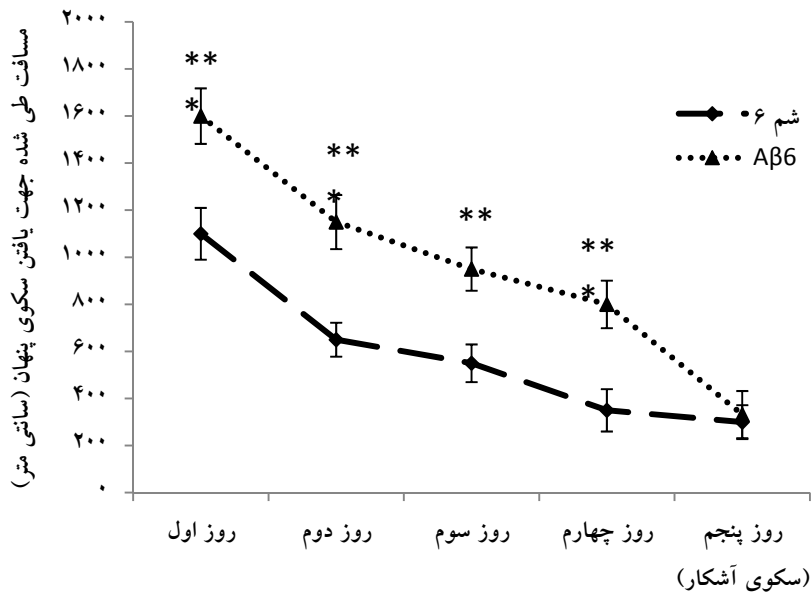
بتا آمیلوئید، CA1 هیپوکامپ، یادگیری و حافظه فضایی، ...



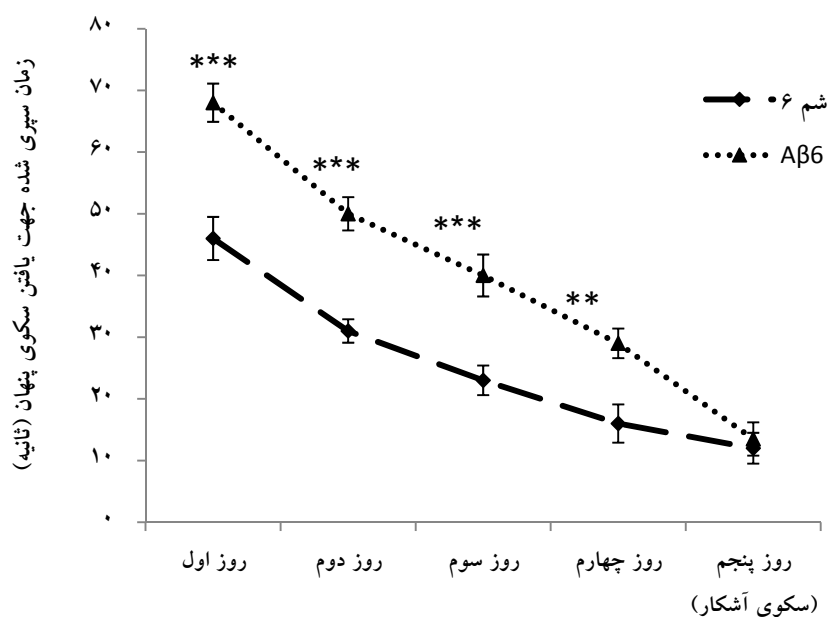
شکل شماره ۱- برش تهیه شده از مغز موش ها پس از تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه CA1 هیپوکامپ



شکل شماره ۲- پلاک های بتا آمیلوئید در برش های رنگ آمیزی شده با کنگورد به رنگ قرمز دیده می شوند. A. گروه شم و B و C به ترتیب گروه های دارای تزریق بتا آمیلوئید در ۱۰ و ۳۵ روز پس از تزریق را نشان می دهد.



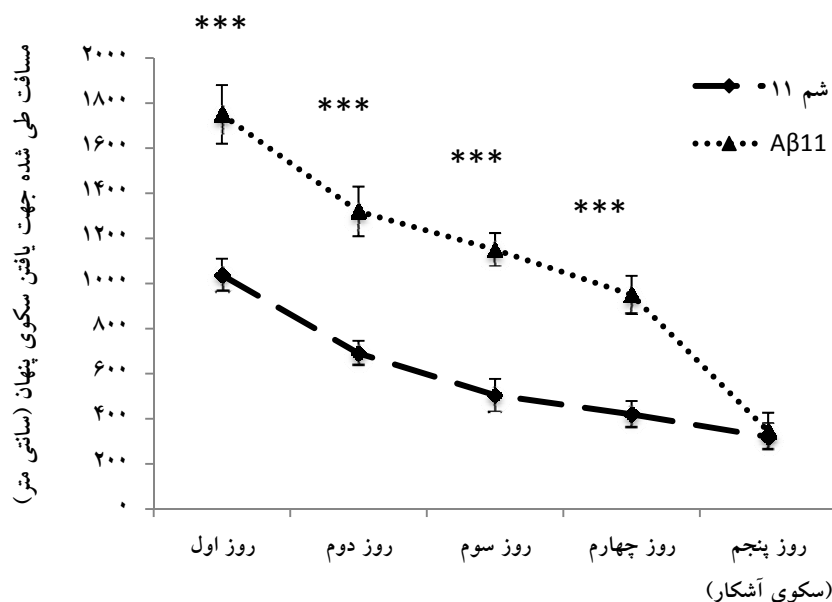
شکل شماره ۳- مقایسه مسافت طی شده در گروه های Sham و Aβ6 در ماز آبی مورس در روزهای مختلف آموزش جهت یافتن سکوی پنهان. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.



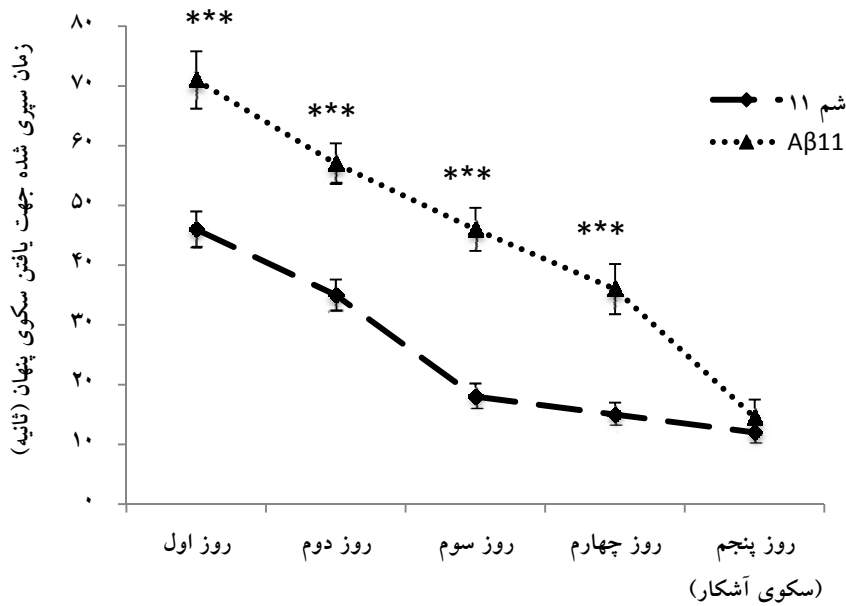
شکل شماره ۴- مقایسه زمان سپری شده در گروه‌های Sham۶ و Aβ۶ در ماز آبی موریس در روزهای مختلف آموزش جهت یافتن سکوی پنهان. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.

است. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده ( $P < 0/001$ ) و زمان سپری شده ( $P < 0/001$ ) می‌باشد.

(ب) گروه ۱۱ روزه (Sham۱۱ و Aβ۱۱): نتایج حاصل از مسافت طی شده و زمان سپری شده در گروه دوم آزمایش (۱۱ روز پس از تزریق بتا آمیلوئید) در شکل‌های شماره ۵ و ۶ نشان داده شده



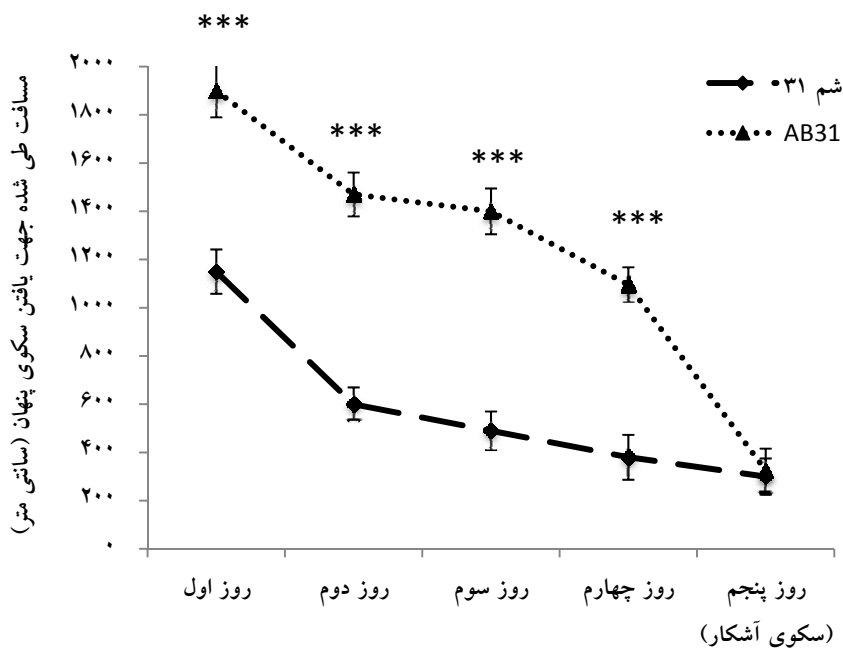
شکل شماره ۵- مقایسه مسافت طی شده در گروه‌های Sham۱۱ و Aβ۱۱ در ماز آبی موریس در روزهای مختلف آموزش جهت یافتن سکوی پنهان. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.



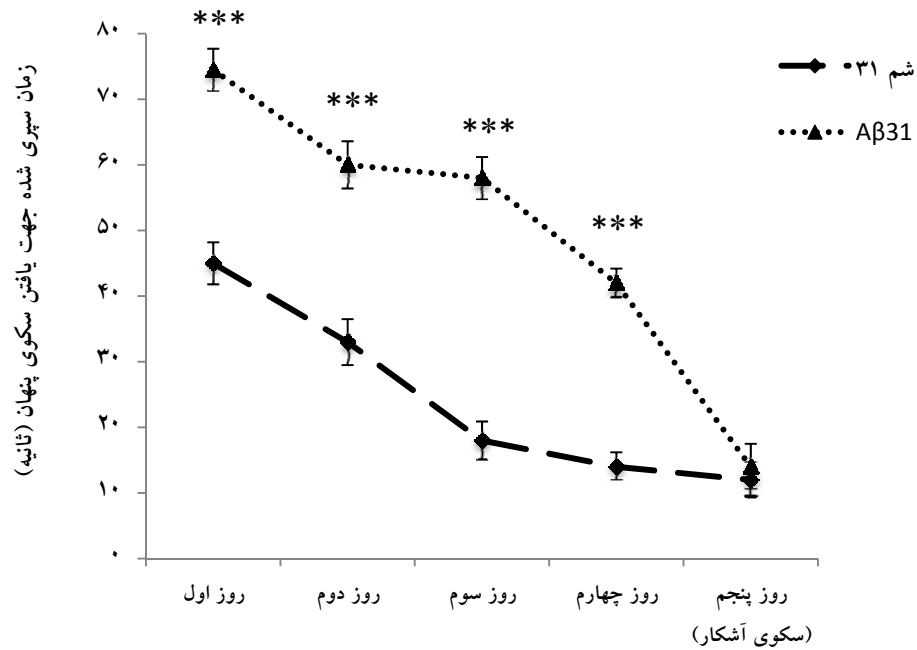
شکل شماره ۶- مقایسه زمان سپری شده در گروه‌های Sham 11 و Aβ11 در ماز آبی موریس در روزهای مختلف آموزش جهت یافتن سکوی پنهان. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.

است. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در مسافت طی شده ( $P < 0.001$ ) و زمان سپری شده ( $P < 0.001$ ) می‌باشد.

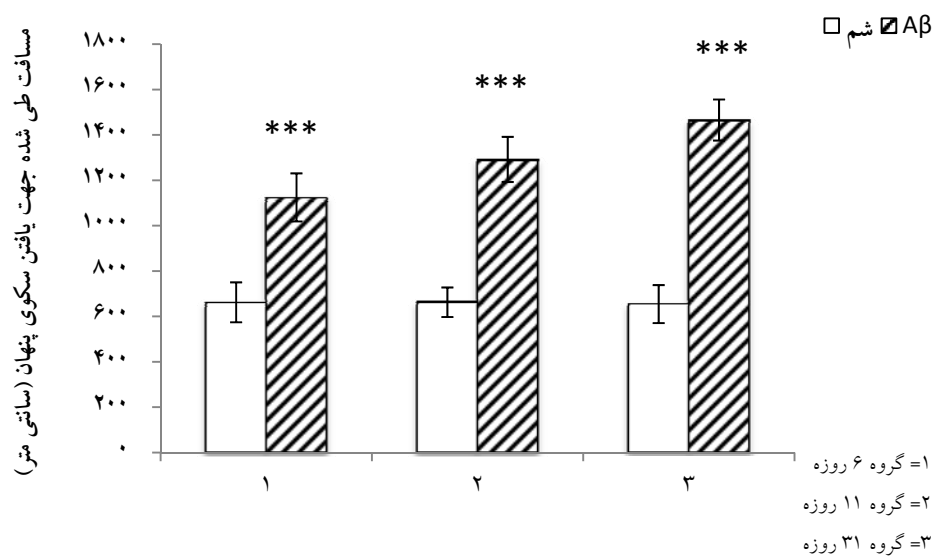
ج) گروه 31 روزه (Sham 31 و Aβ31): نتایج حاصل از مسافت طی شده و زمان سپری شده در گروه سوم آزمایش (31 روز پس از تزریق بتا آمیلوئید) در شکل‌های شماره 7 و 8 نشان داده شده



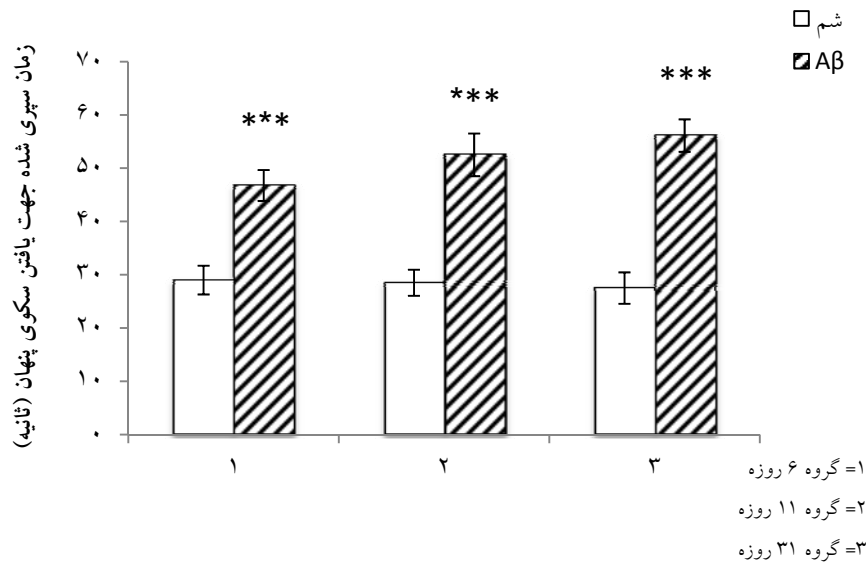
شکل شماره ۷- مقایسه مسافت طی شده در گروه‌های Sham 31 و Aβ31 در ماز آبی موریس در روزهای مختلف آموزش جهت یافتن سکوی پنهان. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.



شکل شماره ۸- مقایسه زمان سپری شده در گروه‌های Sham31 و Aβ31 در ماز آبی موریس در روزهای مختلف آموزش جهت یافتن سکوی پنهان. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.



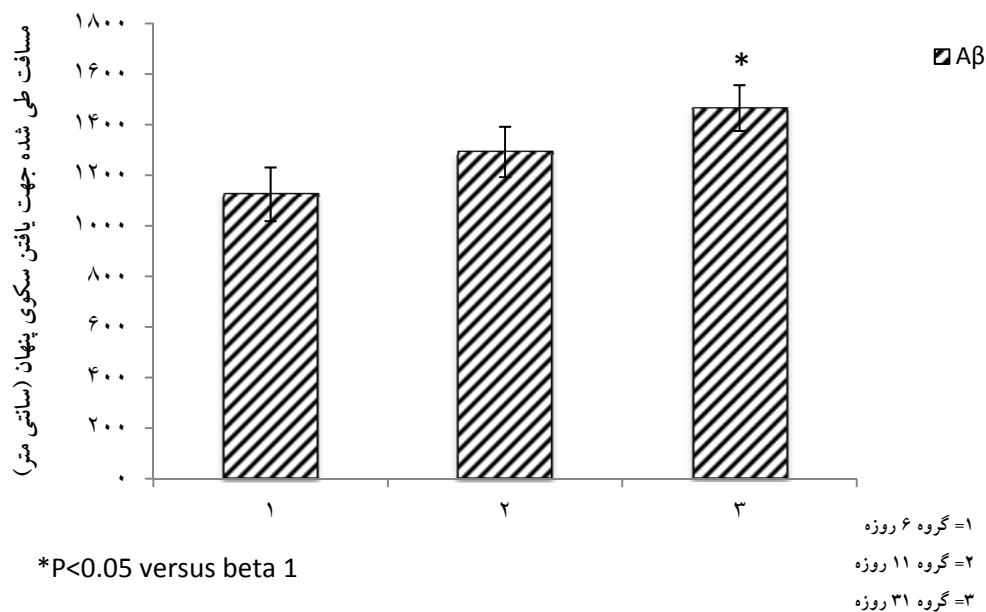
شکل شماره ۹- مقایسه میانگین مسافت طی شده در گروه‌های مختلف آزمایش برای یافتن سکوی پنهان  $P < 0.001$  با علامت \*\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شم می‌باشد. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.



شکل شماره ۱۰- مقایسه میانگین زمان سپری شده در گروه‌های مختلف آزمایش برای یافتن سکوی پنهان با علامت \*\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شم می‌باشد. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.

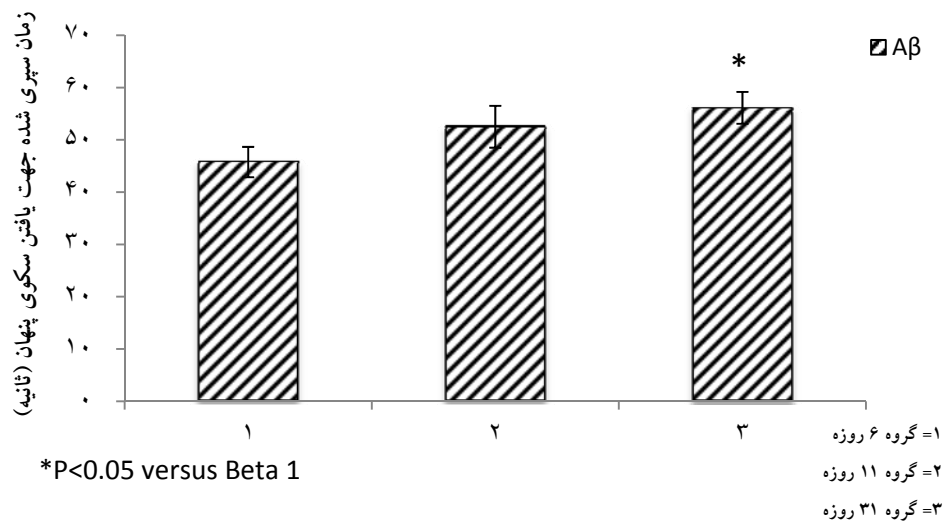
شده (F2, 15=8.864, P<0.001) و زمان سپری شده (F2, 15=9.112, P<0.001) نشان Tukey تست تعقیبی وجود دارد. داد که تخریب در اثر گذشت زمان و بر اثر بتا آمیلوید به صورت معنی‌داری مسافت طی شده (P<0/05) و همچنین زمان سپری شده (P<0/05) را افزایش داده است (شکل‌های شماره ۱۱ و ۱۲).

مقایسه میانگین مسافت طی شده و زمان سپری شده سه گروه شم و آرایمری در یافتن سکوی پنهان به ترتیب در شکل‌های شماره ۹ و ۱۰ نشان داده شده است. مقایسه بین گروه‌های آرایمری Aβ6, Aβ11 و Aβ31: نتایج حاصل از مقایسه سه گروه آرایمری ۶ و ۱۱ و ۳۱ با یکدیگر نشان داد که بین گروه اول و سوم اختلاف معنی‌دار در مسافت طی



\*P<0.05 versus beta 1

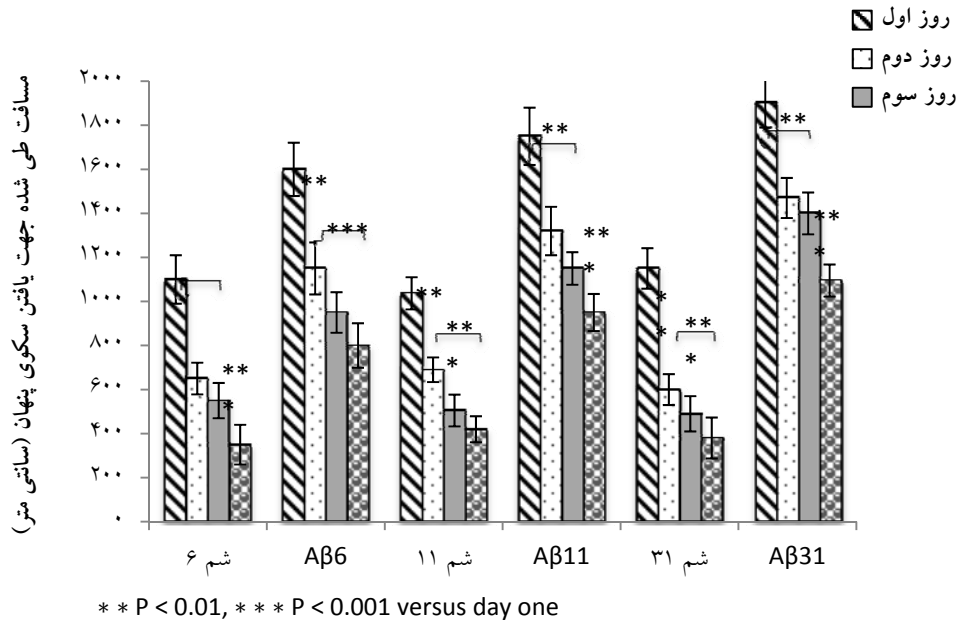
شکل شماره ۱۱- مقایسه میانگین مسافت طی شده در گروه‌های آزمایش با علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Aβ6 می‌باشد. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.



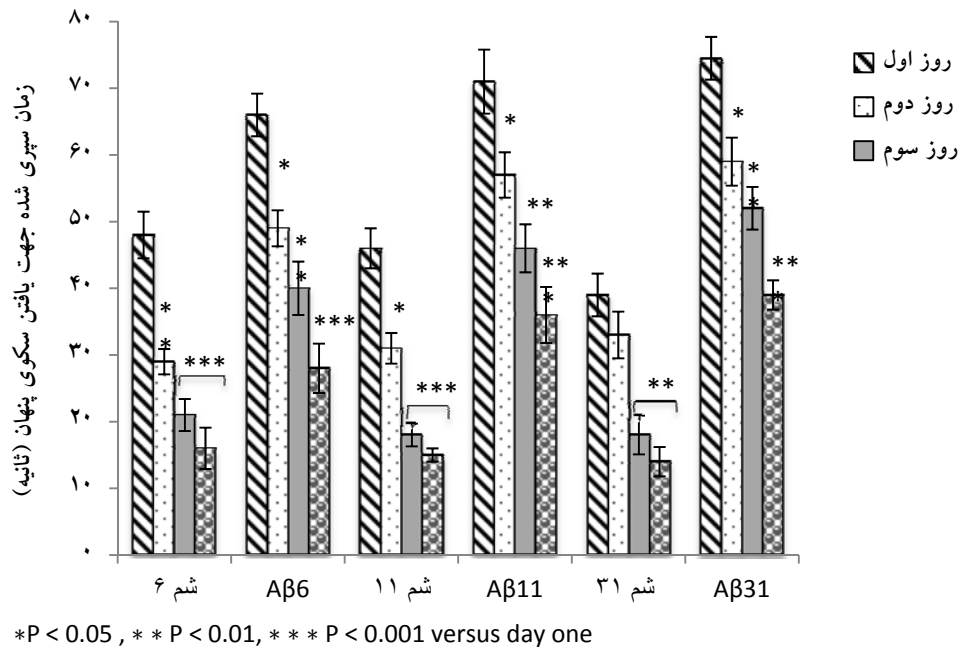
شکل شماره ۱۲- مقایسه میانگین مسافت طی شده در گروه‌های آزمایش Aβ۶ با علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Aβ۶ می‌باشد. نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده است.  $P < 0.05$

روز اول با روزهای دیگر آموزش در تمامی گروه‌ها در مسافت طی شده و زمان سپری شده جهت یافتن سکوی پنهان می‌باشد (شکل‌های شماره ۱۳ و ۱۴).

۴- مقایسه در ۴ روز آموزش: فرایند یادگیری در طول چهار روز آموزش نشان‌دهنده دست‌یابی تمامی گروه‌های شم و گروه‌های دارای تزریق بتا آمیلوئید به معیار یادگیری و اختلاف معنی‌دار بین



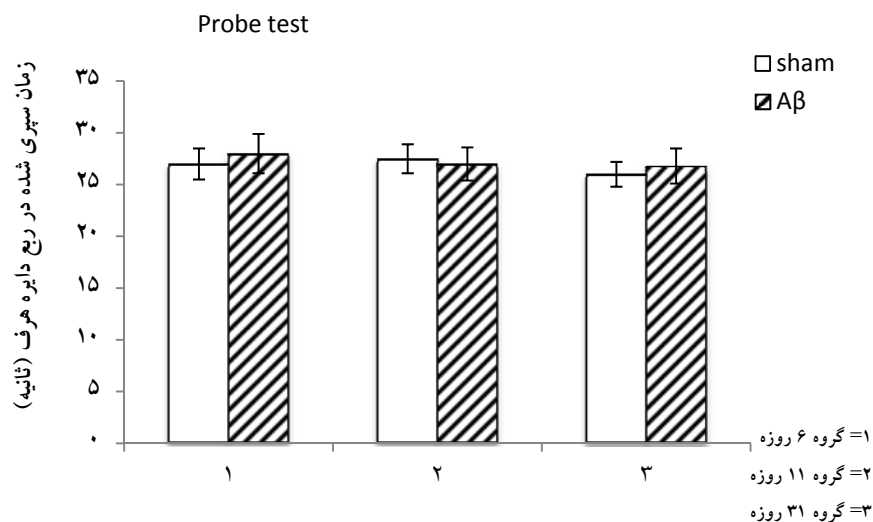
شکل شماره ۱۳- مسافت طی شده در چهار روز آموزش در سه گروه شم و سه گروه دارای تزریق بتا آمیلوئید نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده و  $P < 0.01$  با علامت \*\* و  $P < 0.001$  با علامت \*\*\* معنی‌داری نسبت به روز اول را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۱۴- زمان سپری شده در چهار روز آموزش در سه گروه شم و سه گروه دارای تزریق بتا آمیلوئید نتایج به صورت  $\bar{X} \pm SEM$  گزارش شده و  $P < 0.05$  با علامت \*،  $P < 0.01$  با علامت \*\*،  $P < 0.001$  با علامت \*\*\* معنی داری نسبت به روز اول را نشان می‌دهد.

حافظه در تمامی گروه‌های آزمایش انجام شد. زمان سپری شده در ربع دایره هدف در هیچ‌یک از گروه‌های دارای تزریق بتا آمیلوئید در مقایسه با گروه‌های شم اختلاف معنی دار نشان نداد ( $P > 0.05$ ). همچنین، در مقایسه سه گروه دارای تزریق بتا آمیلوئید با یکدیگر نیز تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ( $F_{2, 15} = 1.242, n.s.$ ) (شکل شماره ۱۵).

۵- آزمون سکوی آشکار (visible): همان‌طور که در شکل‌های شماره ۳ تا ۸ نشان داده شده است، در تست سکوی آشکار در روز پنجم تفاوت معنی داری در مقایسه ۳ گروه دارای تزریق بتا آمیلوئید با گروه‌های شم در مسافت طی شده و زمان سپری شده برای یافتن سکوی آشکار وجود نداشته است.  
۶- سنجش حافظه فضایی (پروب): بعد از مراحل یادگیری در ماز آبی موریس یک مرحله آزمایش پروب جهت سنجش به‌خاطر آوری



شکل شماره ۱۵- مدت زمان سپری شده در سه گروه دارای تزریق بتا آمیلوئید در مقایسه با سه گروه شم در ربع محل قرارگیری سکو در آزمایش پروب.

## بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمامی گروه‌های مورد بررسی طی روزهای آموزش با ماز آبی موریس به معیار یادگیری دست یافته و با کاهش زمان صرف شده و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو یادگیری خود را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند. همچنین، گروه  $A\beta_{31}$  تخریب معنی‌داری نسبت به گروه  $A\beta_6$  نشان داده؛ بدین معنی که زمان سبب تخریب بیشتر یادگیری خواهد شد. همچنین، روند یادگیری طی ۴ روز آموزش بین گروه‌های دارای تزریق بتا آمیلوئید در مقایسه با گروه‌های شم تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل‌های شماره ۱۳ و ۱۴). نتایج حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به گروه  $Sham_6$  و  $A\beta_6$  (شکل‌های شماره ۳ و ۴) بیان‌گر این می‌باشد که موش‌های گروه دارای تزریق بتا در مقایسه با گروه شم به‌صورت معنی‌داری در مدت زمان بیشتر و با پیمودن مسافت بیشتری سکو را یافته‌اند. نتایج گروه‌های  $Sham_{11}$  و  $A\beta_{11}$  و همچنین  $Sham_{31}$  و  $A\beta_{31}$  (شکل‌های شماره ۵ تا ۸) نیز نشان دادند که زمان لازم و مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در دو گروه دیگر دارای تزریق بتا آمیلوئید نیز همچنان دارای روند کاهشی نسبت به گروه شم و دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به این گروه بوده است. لذا، اثر و ماندگاری بتا آمیلوئید ۱-۴۲ پس از گذشت ۳۱ روز از تزریق همچنان پایدار بوده و روند یادگیری در این دو گروه به‌صورت کاهشی ادامه داشته است. همچنین، در تست سکوی آشکار تفاوتی بین گروه‌ها مشاهده نشد؛ بدین معنی که حیوانات از نظر سیستم‌های انگیزشی، حرکتی و بینایی دچار مشکل نبوده‌اند. مطالعات متعدد به بررسی نقش و اثر بتا آمیلوئید در ایجاد پلاک‌های آمیلوئیدی و همچنین اختلال در حافظه و یادگیری در بیماری آلزایمر پرداخته‌اند. یادگیری فضایی و به‌خاطرآوری هردو از مواردی هستند که خیلی زود در بیماری آلزایمر دچار اختلال می‌شوند و پیشرفت بیماری موجب شدیدتر شدن آنها می‌گردد [۲۱]. Hsiao و همکاران در مطالعه روی موش‌های ترانسژنیک آلزایمری نشان دادند که اختلال در یادگیری و حافظه به‌طور قابل ملاحظه‌ای با افزایش میزان بتا آمیلوئید و تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی مرتبط و همراه می‌باشد [۲۲]. Choi Hoon Se و همکارانش در مطالعه خود به بررسی اثر تزریق بتا آمیلوئید در مغز موش‌های صحرایی و نقش آن در یادگیری پرداخته و دریافتند که این حیوانات در مدت زمان بیشتری نسبت به حیوانات کنترل موفق به یافتن سکوی پنهان در ماز آبی می‌گردند و تزریق بتا آمیلوئید در مغز موجب آسیب دیدن حافظه می‌گردد [۲۳]. همچنین، در مطالعه دیگری Kam-eg A و همکاران به نتایج مشابهی دست یافتند

[۲۴]. Shankar و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که بتا آمیلوئید محلول که مستقیماً از مغز بیماران آلزایمری جدا شد است، موجب کاهش تراکم دندریت‌های نخاعی، مهار LTP و تسهیل LTD در هیپوکامپ می‌شود و در حافظه یک رفتار یاد-گرفته‌شده تداخل ایجاد می‌کند [۲۵]. Lesne و همکاران در مطالعه روی  $A\beta$  ویژه‌ای به نام  $A\beta_{56}$  در موش‌های ترانسژنیک  $Tg_{2576}$  نشان دادند که نقص در حافظه در موش‌های ۱۴-۶ ماهه از طریق تجمع خارج سلولی  $A\beta$  محلول ۵۶ کیلودالتونی ایجاد می‌گردد و اظهار داشتند که  $A\beta_{56}$  می‌تواند مستقل از پلاک‌ها و یا از دست رفتن نورون‌ها منجر به تخریب حافظه گردد [۲۶]. در سال ۲۰۰۹ Garcia Osta و همکاران نیز به بررسی نقش آمیلوئید بتا در تشکیل حافظه پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که در مقابل نقش پاتولوژیک  $A\beta$  در هنگام تجمع در تشکیل پلاک‌ها،  $A\beta$  داخل سلولی (اندوژنوس) در هیپوکامپ سالم واسط تشکیل حافظه و یادگیری می‌باشد. علاوه بر آن تزریق داخل هیپوکامپی  $A\beta_{1-42}$  خارج سلولی با غلظت پیکومولار منجر به افزایش تثبیت حافظه می‌گردد [۲۷]. گزارشات Wang و همکاران نیز نشان داد که  $A\beta_{1-42}$  منجر به مهار فعال شدن کلسیم وابسته به  $\alpha 7CahR$  و آزادسازی استیل کولین می‌گردد که هردو فرآیندهای حیاتی دخیل در حافظه و عملکردهای شناختی هستند [۲۸]. همچنین، تحقیقات دیگر نشان‌گر آن بوده است که علی‌رغم حضور میزان بالای APP و تجمع بتا آمیلوئید، حذف زیرواحد  $\alpha 7CahR$  در موش‌های DPAPP منجر به جلوگیری و حفاظت از تخریب عملکرد در یکپارچگی سیناپسی و یادگیری و حافظه می‌گردد [۲۹]. بازه زمانی و نتایج مطالعات ذکر شده مشابه دو گروه ۶ و ۱۱ روزه این تحقیق می‌باشند. همچنین، نتایج گروه سوم ( $Sham_{31}$  و  $A\beta_{31}$ ) نشان داد که با گذشت زمان بیش از ۳۱ روز از تزریق بتا آمیلوئید، حیوانات دارای تزریق به‌صورت معنی‌داری زمان و مسافت طی شده بیشتری جهت یافتن سکوی پنهان داشته، اثر بتا آمیلوئید ۱-۴۲ همچنان پس از ۳۱ روز ماندگار بوده و تخریبی که در اثر این تزریق و تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز ایجاد شده است، احتمالاً بازگشت‌پذیر نمی‌باشد؛ این نتیجه با نتایج مطالعه سهیلی و همکاران [۳۰] در سال ۲۰۱۰ مغایر می‌باشد. نتایج آنها که به بررسی اثر بهبود دهنده آموزش در ماز در موش‌های صحرایی آلزایمری پرداخته بودند، نشان داد که به‌دنبال تکرار مراحل آموزش در ماز پس از ۲۰ روز، یادگیری بر رفتار حیوانات اثر مثبت داشته، به‌طوری‌که زمان و مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان در گروه آلزایمری و شاهد پس از ۲۰ روز تفاوت معنی‌داری را نشان نداده است. همچنین، آزمایش پروب (شکل

بتا آمیلوئید، CA1 هیپوکامپ، یادگیری و حافظه فضایی، ...

یادگیری رسیده بودند، ولی گروهی که مدت زمان بیشتری تحت تاثیر بتا آمیلوئید بوده دیرتر به یادگیری دست یافته و این نشان می‌دهد که مدت زمان در معرض بتا آمیلوئید بودن ارتباط مستقیمی با تخریب بیشتر دارد.

### تشکر و قدردانی

از انستیتو پاستور ایران بابت تامین هزینه‌های این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

### References:

- [1] Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* 2015; 67(2): 195-203.
- [2] Huang X, Cua Jungco MP, Atwood CS, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI. Alzheimer's disease, beta-amyloid protein and zinc. *J Nutrition* 2000; 130(5S Suppl): 1488s-92s.
- [3] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *New England J Med* 2010; 362(4): 329-44.
- [4] Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007; 3(3): 186-91.
- [5] Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, NY)*. 1995; 269(5226): 973-7.
- [6] Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375(6534): 754-60.
- [7] Kurz A PR. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35(2): 372-9.
- [8] Winkler J, Thal LJ, Gage FH, Fisher LJ. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J Mol Med* 1998; 76(8): 555-67.
- [9] Kulkarni PV, Chiguru S, Arora V, Slavine N, Hao G, Sun X, et al. Early Detection of Amyloid Plaques in Mouse Models of Alzheimer's Disease by PET with 18F-Hydroxy Quinoline. *Austin J Clin Neurol* 2015; 2(8).
- [10] Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* 2014; 76: 27-50.
- [11] Dal Pra I CA, Gui L, Chakravarthy B, Pacchiana R, Gardenal E, et al. Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the "infectious" A $\beta$  and tau drivers of Alzheimer's disease? *Neuroscientist* 2015; 21(1): 9-29.

شماره ۱۵) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در مقایسه موش‌های هریک از گروه‌های شم با گروه‌های دارای تزریق بتا آمیلوئید آموزش دیده وجود ندارد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این نشان می‌دهند که تحت تاثیر قرار گرفتن طولانی مدت هیپوکامپ با بتا آمیلوئید سبب تخریب بیشتر یادگیری فضایی در حیوانات مبتلا به آلزایمر می‌گردد، در حالی که تغییر معنی‌داری در به‌خاطرآوری ایجاد نمی‌کند. همچنین تمامی گروه‌ها به معیار

- [12] Galimberti D GL, Scarpini E. Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2013; 333(1): 50-4.
- [13] Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular Med* 2016; 8(6): 595-608.
- [14] Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 2011; 4(3).
- [15] Kim T, Hinton DJ, Choi DS. Protein kinase C-regulated A $\beta$  production and clearance. *Int J Alzheimers Dis* 2011; 857368.
- [16] Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* 2004; 62(11): 1984-9.
- [17] Guariglia CC. Spatial working memory in Alzheimer's disease. *Dementia Neuropsychologia* 2007; 1(4): 392-5.
- [18] M. Kathryn Jedrzejewski VM-YLaJQT. Physical Activity and Cognitive Health Alzheimers Dement. 2007; 3(2): 98-108.
- [19] Paxinos G WC. The rat brain in stereotaxic coordinates. Orlando, FL: Academic Press; 1986.
- [20] Wilcock DM, Marcia NG, Dave M. Quantification of cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques with Congo red histochemical stain. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1591-5.
- [21] Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning Motivation* 1981; 12(2): 239-60.
- [22] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science (New York, NY)* 1996; 274(5284): 99-102.
- [23] Se Hoon Choi CHP, JaWook Koo, Ji-HeuiSeo, Hye-Sun Kim, Sung-Jin Joeng, Jun-Ho Lee, et al. Memory impairment and cholinergic dysfunction by centrally administered Ab and carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP in mice. *FASEB* 2001; 15(10): 1816-8.

- [24] Kam-eg A TB, Tantisira MH. Preliminary study on effects of standardized extract of *Centella asiatica*, Eca 233, on deficit of learning and memory induced by an intracerebroventricular injection of  $\beta$ -amyloid peptide in mice. *Thai J Pharmacol* 2009; 31: 79-82.
- [25] Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008; 14(8): 837-42.
- [26] Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006; 440(7082): 352-7.
- [27] Garcia-Osta A, Alberini CM. Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem* 2009; 16(4): 267-72.
- [28] Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB.  $\beta$ -Amyloid(1-42) binds to  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 2000; 275(8): 5626-32.
- [29] Gustavo Dziewczapolski CMG, Eliezer Masliah, and Stephen F. Heinemann. Deletion of the  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Improves Cognitive Deficits and Synaptic Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neuroscience* 2009; 29(27): 8805-15.
- [30] Soheili Kashani M, Salami M, Rezaei-Tavirani M, Talaei Zavareh SA. Maze training improves learning in an Alzheimer model of rat. *Feyz* 2010; 14(3): 209-16. [in Persian]