**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی**
سال هشتم، شماره چهارم، پیاپی سی و دوم، بهار ۱۳۹۹ (۹۶-۸۵)

# نقش تستوسترون بر روی اختلالات حافظه ناشی از بیماری آلزایمر ایجادشده به‌وسیله داروی استرپتوزوتوسین، در موش‌های صحرایی نر بالغ

**سید رضا پوررابی[۱*]، علیرضا محجل نایبی[۲]**
۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران
۲. دکتری، گروه داروشناسی و سم‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز ٥١٦٦٤، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/٤/۱۷)

## چکیده
بیماری آلزایمر فرم مشترکی از دمانس پیشرونده مغزی است و معمولاً بین دهه‌های ششم تا نهم زندگی رخ می‌دهد با توجه به این‌که ما بین هورمون‌های استروئیدی و بیماری‌های نورودژنراتیو ارتباط مستقیمی وجود دارد بنابراین در این مطالعه اثر هورمون تستوسترون بر روی موش‌های صحرایی دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین (STZ) که عامل اختلالات حافظه و یادگیری است مورد بررسی قرار گرفت. تمام مطالعات بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار صورت گرفت. در این تحقیق موش‌های صحرایی نر با تزریق داخل بطنی داروی استرپتوزوتوسین (۳mg/kg/icv) در روزهای اول و سوم، و اختلالات حافظه بعد از ۲ هفته با استفاده آزمون یادگیری احترازی غیر فعال انجام شد. عمل جراحی گنادکتومی و حذف بیضه‌ها، در دیگر گروه‌ها به‌صورت مجزا صورت گرفت. ۲ هفته بعد تست الایزا برای اندازه‌گیری مقدار تستوسترون و اختلالات حافظه بعد از ٤ هفته با استفاده از آزمون یادگیری احترازی غیرفعال انجام شد. هورمون تستوسترون (mg/kg/sc ۱) به‌مدت ٦ روز تزریق شد. داروی فلوتامید به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های آندروژنی (mg/kg/ip ۱۰) و داروی تاموکسی فن به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی (mg/kg/ip ۱)، داروی لتروزول به‌عنوان مهارکننده آنزیم آروماتاز (mg/kg/ip ٤) به‌مدت ٦ روز بعد از اولین تزریق داروی استروپتوزوتوسین مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از داروی استرپتوزوسین و عمل جراحی گنادکتومی باعث کاهش مشخص حافظه کوتاه‌مدت (STL1) و حافظه بلندمدت (STL2) در آزمون یادگیری احترازی غیر فعال گردید. جایگزینی هورمون تستوسترون در موش‌های صحرایی گنادکتومی شده، و گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین، به‌طور معنی‌داری STL1 و STL2 را در حد گروه کنترل افزایش داد. استفاده از داروهای فلوتامید، لتروزول و تاموکسی فن حافظه و یادگیری را به‌صورت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل از بین برد همچنین جایگزینی تستوسترون در گروه‌های گنادکتومی و دریافت‌کننده داروی استروپتوزوتوسین به‌طور معنی‌داری اختلالات حافظه و یادگیری را بهبود بخشید. استفاده از هورمون تستوسترون، اختلالات حافظه و یادگیری را در موش‌های صحرایی آلزایمری و گنادکتومی شده را بهبود بخشید.

**واژه‌های کلیدی:** استرپتوزوتوسین، بیماری آلزایمر، تاموکسی فن، تستوسترون، فلوتامید، لتروزول.

# Role of the Testosterone in memory impairment of Alzheimer disease induced with streptozoocin in mature male Rats

**Seyed Reza Pourrabie[1*], Alireza Mohajjel Naebi[2]**
1. Assistant Professor, Department of Biology, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran
2. Ph. D., Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz 51664, Iran
(Received: Jan. 2, 2019 - Accepted: Jul. 8, 2019)

## Abstract
Alzheimer's disease is a common form of progressive dementia and usually occurs between the sixth and ninth decades of life, given that there is a direct relationship between steroid hormones and neurodegenerative diseases, so the present study was designed to explore effect of testosterone in memory impairment induced by intra-cerebroventricular (icv) injection of streptozptocin (STZ) as a model of sporadic Alzheimer disease (AD). Study was carried out on male Wistar rats. Adult male Wistar rats were intracerebroventricularly (icv) infused with STZ (3mg/kg/icv) on d 1 and d 3, and a passive avoidance task was assessed 2 weeks after the first injection of STZ. Castration surgery was performed in another group of rats, and the passive avoidance task was assessed 4 weeks after the operation. Testosterone (1 mg/kg.d, SC), the androgen receptor antagonist flutamide (10 mg/kg.d, ip), the estrogen receptor antagonist tamoxifen (1 mg/kg.d, ip) or the aromatase inhibitor letrozole (4 mg/kg.d, ip) were administered for 6 d after the first injection of STZ. STZ administration and castration markedly decreased both STL1 (the short memory) and STL2 (the long memory) in passive avoidance tests. Testosterone replacement almost restored the STL1 and STL2 in castrated rats, and significantly prolonged the STL1 and STL2 in STZ-treated rats. Administration of flutamide, letrozole or tamoxifen significantly impaired the memory in intact rats, and significantly attenuated the testosterone replacement in improving STZ- and castration-induced memory impairment. Testosterone administration ameliorates STZ- and castration-induced memory impairment in male Wistar rats.

**Keywords**: Alzheimer disease, flutamide, letrozole, Streptozotocin, tamoxifen, testosterone.

* نویسندهٔ مسئول: Email: Pourrabie@gmail.com
pourrabie@marandiau.ac.ir

## مقدمه

آلزایمر فرم مشترکی از بیماری‌های پیشرونده مغزی است و روند تخریبی آن شامل اختلال تدریجی حافظه، قضاوت و مهارت‌های زبانی (Price, 1993) تغییرات رفتاری (Greene, 1996) تضعیف شخصیت و حافظه فرد (Pillon, 1993) و کمبود بینائی فضایی (Kirk, 1991) می‌باشد. این بیماری بین دهه‌های ششم تا نهم زندگی رخ می‌دهد، وجود اندروژن‌ها در اغلب بافت‌های بدن به‌خصوص در مغز فعالیت‌های ویژه و تخصصی را انجام می‌دهد (Pike, 2008; Rosario, 2006). در مجموع تمام مشاهدات بیان می‌کنند که کاهش آندروژن وابسته به سن عامل بیماری‌های نورودژنراتیو نظیر بیماری آلزایمر می‌باشد (Rosario, 2004; Compton, 2002).

بیماری آلزایمر نتیجه تغییر پروتئین بتا آمیلوئید در نورون‌های کورتکس پیش‌پیشانی، هیپوکامپ و دیگر مناطق مغزی است که منجر به از بین‌رفتن نورون‌های این مناطق می‌شود. جالب این‌که ما بین هورمون‌های استروئیدی و بیماری‌های نورودژنراتیو ارتباط مستقیمی وجود دارد به‌طوری که جایگزینی هورمون استروژن در این سری از بیماران علت کاهش پیشرفت بیماری آلزایمر می‌باشد (Jaffe, 1994; Levin-Allerhand, 2002). اثرات حفاظتی هورمون استروژن در ارتباط با کاهش محصولات پروتئین بتا آمیلوئید است (Jaffe, 1994; Levin-Allerhand, 2002). اغلب مطالعات نشان می‌دهد که هورمون تستوسترون بر روی محصولات و همچنین بر تنظیم سطح پروتئین بتا آمیلوئید به‌صورت آزمایشگاهی (Gouras & Goodenough, 2000) و هم در درون بدن حیوانات آزمایشگاهی (Gillett, 2003) اثر می گذارد. همچنین نشان داده شده است که سطح پروتئین بتاآمیلوئید در موش‌های صحرایی گنادکتومی شده افزایش پیدا می‌کند (Papasozomenos, 1997).

در سال‌های اخیر، گزارش شده است که کاهش سطح تستوسترون عامل افزایش سطح پروتئین بتاآمیلوئید ۴۰ در پلاسمای افراد مسن که حافظه خودشان را از دست داده‌اند می‌باشد (Gillett, 2003).

از ویژگی‌های نوروپاتولوژی بیماری آلزایمر هیپرفسفوریلاسیون پروتئین تائو در درون نورون‌ها، تا به‌وجودآمدن تانگل‌های نورونی در کورتکس مناطق مختلف مغزی می‌باشد، تستوسترون قادر به جلوگیری از هیپرفسفوریلاسیون پروتئین‌های تائو می‌باشد (Papasozomenos, 1997, 2002). مطالعات در مورد افراد مسن مبتلا به بیماری آلزایمر نشان می‌دهد که کاهش نورواستروئیدها در اغلب نقاط بدن، به‌خصوص در نورون‌های مغزی علت اصلی بیماری می‌باشد (Weill-Engerer, 2002). در مجموع تحقیقات، اثر هم‌افزایی هورمون‌های استروئیدی نظیر تستوسترون و استروژن در تنظیم پروتئین بتاآمیلوئید در مغز موش‌های صحرایی را اثبات می‌نمایند (Simpson, 2001). دو نوع از اندروژن‌های درون بدنی نظیر تستوسترون و متابولیت آن، دی‌هیدروتستوسترون (Mooradian, 1987) وجود دارد که هرکدام دارای عملکردهای متفاوتی در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد (Leranth, 2004).

بررسی بیوشیمی بیماران آلزایمری نشان می‌دهد که در سطح نئو کورتکس کاهش استیل کولین و آنزیم کولین ترانسفراز مشاهده می‌شود (Hammond & Le, 2001)، به‌طوری که حافظه و یاد گیری توسط استیل کولین میانجی‌گری می‌شود (Haass, 2007).

نتیجه تجزیه و تحلیل‌ها نشان می‌دهد که زنان بیشتر از مردان به بیماری آلزایمر مبتلا می‌شوند به‌طوری که تقریبا میزان ابتلا زنان به این بیماری نسبت به مردان در حدود ۱/۵ برابر می‌باشد (Pappas, 2000).

نرخ ابتلا به بیماری آلزایمر در سنین بالاتر افزایش پیدا می‌کند. نتیجه تحقیقات نشان می‌دهد که سطح هورمون‌های جنسی (تستوسترون در مردان و استروژن و پروژسترون در زنان) در سنین بالا کاهش پیدا کرده به‌طوری‌که کاهش هورمون‌های جنسی در سنین بالا خطر ابتلا به بیماری آلزایمر را افزایش می‌دهد (Hammond & Le, 2001).

آنزیم آروماتاز باعث تبدیل آندروژن به استروژن شده و سطح استروژن مغزی را کنترل می‌کند. فعالیت آروماتاز برای اولین بار در سیستم لیمبیک مغز جنین و هیپوکامپ موش‌های صحرایی کشف شد. یافته های جدید نقش‌های جدید غیر منتظره آنزیم آروماتاز نظیر تنظیم فعالیت سیناپس‌ها، تحریک‌پذیری سیناپسی، نورون زائی، پاسخ نورون‌ها به بافت‌های آسیب دیده و شناخت را در مغز تنظیم می‌نماید ( Leranth, 2004) آنزیم آروماتاز مغزی در سیستم لیمبیک جنین انسان و هیپوکامپ موش‌های صحرایی نشان داده شده است (Naftolin, 1972). تعدادی دیگر از مطالعات فعالیت، پراکنش و توزیع آنزیم آروماتاز را در سیستم عصبی مرکزی اغلب مهره داران را نشان می‌دهد. بنابر این فعالیت اندروژن‌ها در سیستم عصبی مرکزی به‌وسیله هر دو مکانیسم، مکانیسم غیرمستقیم نظیر آرماترزاسیون تستوسترون و تبدیل آن به استروژن، و مکانیسم مستقیم نظیر فعالیت گیرنده‌های تستوسترون میانجی‌گری می‌شود (Jakab, 1993). آنتی‌اندروژن‌ها به‌صورت رقابتی با گیرنده‌های آندروژنی اتصال پیدا کرده و فعالیت آن‌ها را کاهش می‌دهند. (Kemppainen, 1996) دو نوع از آنتی‌اندروژن‌ها نظیر استروئیدی و غیراستروئیدی وجود دارند (Singh, 2000). از آنتی‌اندروژن‌های غیر استروئیدی نظیر فلوتامید به‌عنوان یک آنتی‌اندروژن عمومی مورد استفاده قرار می‌گیرد که رفتارهای کانالی غیر مشابه با آگونیست‌های آندروژنی را نشان می‌دهد (Berrevoets, 2000).

در این مطالعه بیشتر به اثرات حفاظت نورونی توجه داده شده است، که برای این منظور از آنتاگونیست گیرنده‌های آندروژنی نظیر داروی فلوتامید، آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی نظیر تاموکسی فن و در نهایت از مهارکننده آروماتاز نظیر لتروزول استفاده شد در بیماران نورودژنراتیو نظیر بیماری آلزایمر هر کدام از آن‌ها دارای اثرات هم‌افزایی بر روی گیرنده‌های اندروژن و استروژنی را دارند.

در این مطالعه تأثیر هورمون تستوسترون بر حافظه و یادگیری مدل حیوانی آلزایمر القاشده با داروی استروپتوزوسین مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این تحقیق می‌تواند روش‌های درمانی جدید و مناسبی را در بهبود اختلالات حافظه و یادگیری بیماران آلزایمری بیان کند.

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی

تمام مواد شیمیایی متعلق به کارخانه شیمیایی سیگما (آمریکا) می‌باشدند. تمام محلولها به‌صورت تازه و در روز استفاده، تهیه شدند. داروهای تاموکسی فن و استرپتوزوتوسین در دی متیل سولفوکسید ۵ درصد استریل (DMSO) و استرپتوزوتوسین در مایع مغزی و نخاعی مصنوعی (ACSF) حل شدند. تستوسترون، فلوتامید لتروزول در روغن کرچک حل شدند.

### حیوانات

تمام مطالعات بر روی موش‌های صحرایی ویستار رت در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم انجام شد. حیوانات در درون قفسه های استاندارد پلی پروفیلن، به‌طوری که در هر قفس ۴ عدد موش صحرایی، تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵±۲ °C با رژیم غذائی مناسب قرار داده شد. تمامی آزمایشات در آزمایشگاه علوم پزشکی دانشگاه تبریز انجام شد.

### گنادکتومی

برای گنادکتومی ابتدا موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی کتامین ۶۰ mg/kg و زایلازین ۶mg/kg بی‌هوش و موهای منطقه شکمی بیضه با ریش تراش برداشته و با بتادین (کارخانه بهوازان- رشت- ایران) استریل گردید. سپس پوست ناحیه اسکروتوم به طول ۱/۵ سانتی‌متر برش و از بالای بیضه‌ها لوله‌های اپیدیم با نخ بخیه ۰/۴ بخیه و در نهایت بیضه‌ها حذف‌شده و محل بخیه زده شد (Long, 1983; Harooni, 2008).

یک ماه بعد، گروه مذکور، مورد تست حافظه و یادگیری قرار گرفتند.

**تزریق درون‌بطنی داروی استرپتوزوتوسین**

برای تزریق درون‌بطنی داروی استرپتوزوتوسین ابتدا موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی کتامین ۶۰ mg/kg و زایلازین ۶ mg/kg بی‌هوش، سپس برای دسترسی بهتر به مکان تزریق، در دستگاه استریوتاکسی ثابت شدند (Singh, 2000). موهای قسمت بالای سر با ریش تراش تراشیده و با بتادین استریل و در نهایت با تیغ جراحی شیار ۱/۵ سانتی‌متر باز، به‌طوری‌که جمجمه نمایان شد. منطقه جلویی و عقبی برگما (AP=۰/۸mm)، منطقه میانی جانبی از خط میانی جمجمه (ML=±۱/۶ mm) و منطقه پشتی و شکمی جمجمه (DV=۳/۴ mm) در نظر گرفته شد. برای ایجاد مدل تجربی آلزایمر داروی استرپتوزوسین ( 750 µg/10 µL ACSF/Rat, at d 1 and 3) در روزهای ۱ و ۳ به درون دو نیمکره مغزی به‌وسیله سرنگ همیلتون با سرعت ۰/۲ µL/min با پمپ میکروانجکشین تزریق شد (Singh, 2000). تست حافظه و یادگیری ۱۴روز بعد از آخرین تزریق داروی استرپتوزوسین انجام شد ( Alireza Mohajjel, 2014).

برای گروه‌هایی که با هورمون تستوسترون تیمار می‌شوند، هورمون تستوسترون (۱ mg/kg/sc) به‌مدت ۶ روز، ۲ هفته بعد از عمل جراحی گنادکتومی تزریق شد. هورمون تستوسترون برای گروه‌های کنترل و شم جراحی به‌مدت ۶ روز، مورد استفاده قرار گرفت و برای گروه استریوتاکسی بعد از اولین تزریق داروی استروپتوزوتوسین مورداستفاده قرار گرفت (Seyedreza, 2012).

داروهای فلوتامید به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های آندروژنی (۱۰ mg/kg/ip)، داروی تاموکسی فن به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی (۱ mg/kg/ip) و داروی لتروزول به‌عنوان مهارکننده آنزیم آروماتاز (4mg/kg/ip) به‌مدت ۶ روز برای گروه‌های کنترل و شم جراحی و یا گروه گنادکتومی تیمارشده با هورمون تستوسترون و برای گروه استریوتاکسی بعد از اولین تزریق داروی استروپتوزوتوسین مورد استفاده قرار گرفت (Seyedreza, 2012; Naftolin, 1972).

**آزمون احترازی غیر فعال**

دستگاه شاتل باکس مربوط به شرکت آزما (تبریز– ایران) شامل محفظه روشن که به محفظه تاریک به وسیله در گیوتینی اتوماتیک وصل می‌باشد. شوک الکتریکی توسط میله‌های استیل کف دستگاه به‌وسیله دستگاه استیمولاتور هدایت می‌شود. تمامی آزمایش‌ها در محدوده زمانی ۹ صبح الی ۱۵ ومحیط بدون صدا و رفت‌وآمد انجام گرفت. در روزهای اول و دوم آزمون هر یک از موش‌های صحرایی را در درون دستگاه به‌مدت ۵ دقیقه برای عادت‌کردن قرار داده شد. روز سوم برای اکتساب یادگیری در نظر گرفته می‌شود، به‌طوری‌که هر یک از موش‌ها را در محفظه روشن دستگاه پشت به درب قرار داده شده و بعد از بازشدن درب به حیوان فرصت داده می‌شود تا وارد محفظه تاریک شده و درب به‌طور اتوماتیک بسته و شوک الکتریکی با شدت ۱ میلی‌آمپر و به‌مدت ۳ ثانیه (1 mA, 50 Hz, 3 s once) به کف محفظه تاریک اعمال می‌گردد. در این مرحله تأخیر اولیه (Initial Latency= IL) در جهت ورود موش‌های صحرایی به محفظه تاریک در نظر گرفته‌شده و نمونه‌هایی که تأخیر اولیه بالای ۶۰ ثانیه داشته باشند از تست بیرون گذاشته شدند. ۲۴ ساعت بعد از آموزش، هر یک از موش‌های صحرایی در محفظه روشن برای مرحله به خاطرآوری آزمون قرار داده شدند و زمان ورود به محفظه تاریک (Step-through latency=STL1) (حافظه کوتاه‌مدت) اندازه‌گیری شد. آزمون مذکور بعد از سه هفته بعد از آخرین جراحی برای هر یک از نمونه‌ها جهت بررسی حافظه بلندمدت (STL2) انجام شد. زمان پایانی برای STL1 و STL2 ۹۰۰ ثانیه درنظر گرفته شد ( Seyedreza, 2012; Alireza Mohajjel, 2014).

**آنالیز آماری**

برای تحلیل آماری داده‌ها، از نرم‌افزار آماری Sigms stat استفاده و داده‌ها به شکل mean±SD نشان داده شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها در بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) استفاده شد. در صورت وجود تفاوت معنی‌دار در گروه‌ها دو به دو توسط پس آزمون Turkeys با یکدیگر مقایسه شدند. از نظر آماری P<۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

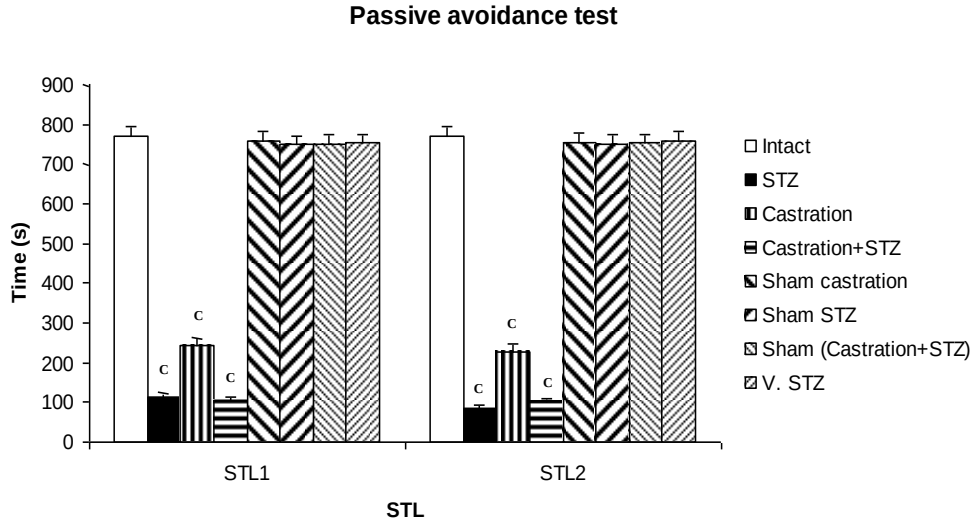
## نتایج

**اثر داروی استرپتوزوتوسین و عمل جراحی گنادکتومی بر روی اختلالات یادگیری**

زمان تأخیر در ورود (STL) در گروه‌های کنترل، دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین ( 750 µg/10 µL ACSF/Rat, at d 1 and 3)، گنادکتومی شده، گنادکتومی شده دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین، شم جراحی و گروه دریافت‌کننده محلول داروی استرپتوزوتوسین اندازه‌گیری شد، به‌طوری‌که در شکل ۱ نشان می‌دهد STL1 و STL2 گروه‌های مذکور در مقایسه با گروه‌های کنترل، شم جراحی و گروه دریافت‌کننده محلول داروی استرپتوزوتوسین کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۱) را نشان می‌دهد.

**تأثیر جایگزینی هورمون تستوسترون بر روی اختلالات حافظه**

نه گروه از موش‌های صحرایی در این مطالعه قرار گرفتند: ۱- گروه کنترل؛ ۲- گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین ( 750 µg/10 µL ACSF/Rat, at d 1 and 3)؛ ۳- گروه گنادکتومی‌شده؛ ۴- گروه کنترل دریافت‌کننده هورمون تستوسترون (۱ mg/kg/sc) به‌مدت ۶ روز بعد از اولین روز تزریق داروی استرپتوزوتوسین؛ ۵- گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین تیمارشده با هورمون تستوسترون؛ ۶- گروه گنادکتومی تیمارشده با هورمون تستوسترون؛ ۷- گروه استرپتوزوتوسین+ گروه گنادکتومی+ حلال تستوسترون؛ ۸- گروه استرپتوزوتوسین+ گروه گنادکتومی+ هورمون تستوسترون؛ ۹- شم جراحی گنادکتومی+ شم جراحی استریوتاکسی+ تستوسترون.

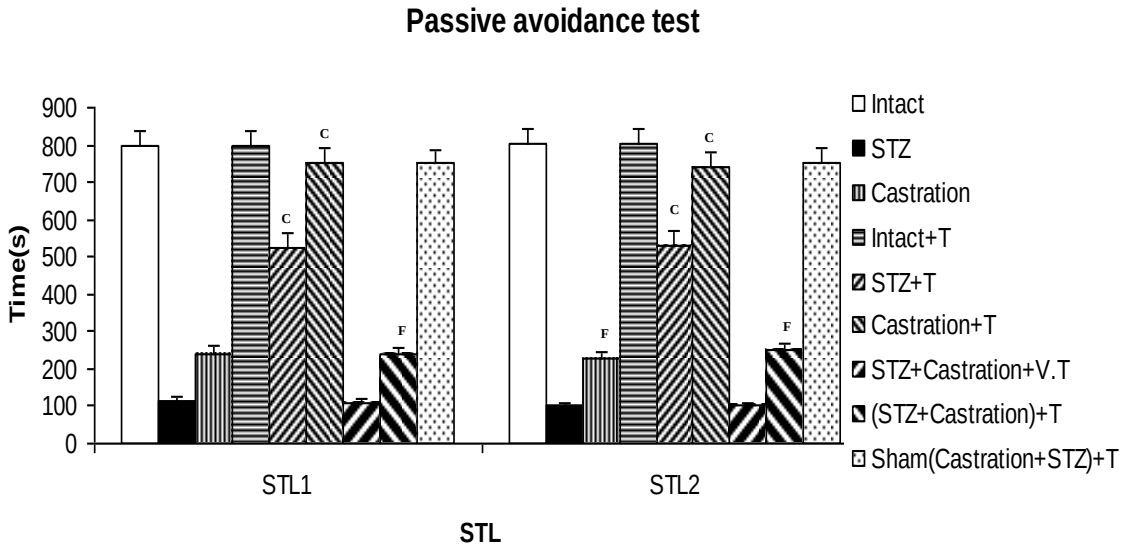



**شکل ۱.** نتایج آزمون احترازی غیر فعال $STL_1$ (حافظه کوتاه‌مدت) و $STL_2$ (حافظه بلندمدت) گروه‌های کنترل، دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین (750 µg/10 µL ACSF/Rat, at d 1 and 3)، گنادکتومی شده، گنادکتومی شده دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین، شم جراحی گنادکتومی، شم جراحی استریوتاکسی و گروه دریافت‌کننده محلول داروی استرپتوزوتوسین. هر یک از هیستوگرام‌ها نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار (Mean±SD) از زمان STLs می‌باشد. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۸ عدد و تغییرات $P<۰/۰۱^{C}$ معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

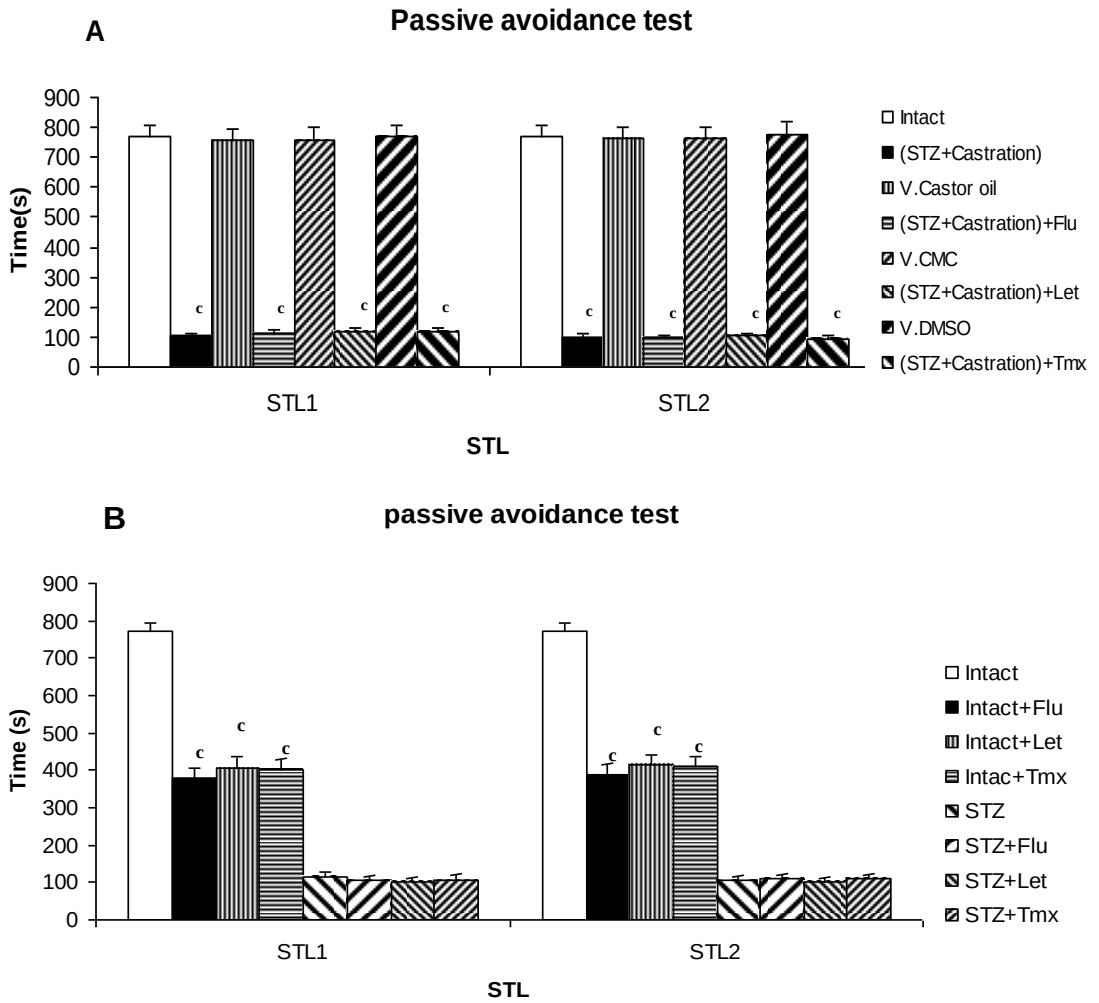
زمان STL1 و STL2 گروه‌های کنترل و شم جراحی استریوتاکسی و گنادکتومی که دریافت کردند، هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری (P<۰/۰۱) با گروه‌های کنترل و شم جراحی استریوتاکسی و گنادکتومی نداشت. زمان STL1 و STL2 گروه‌های دریافت‌کننده داروی استروپتوزوتوسین و گنادکتومی تیمار شده با هورمون تستوسترون افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۱) نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده داروی استروپتوزوتوسین و گنادکتومی نشان داد. همچنین زمان STL1 و STL2 گروه‌های دریافت‌کننده داروی استروپتوزوتوسین گنادکتومی‌شده افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۱) نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده داروی استروپتوزوتوسین گنادکتومی‌شده را نشان داد (شکل ۲).

**تأثیر داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن بر روی اختلالات حافظه**

تأثیر داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن بر روی STL1 (حافظه کوتاه‌مدت) و STL2 (حافظه بلندمدت) در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. زمان STL1 و STL2 در گروه‌های حلال مواد نظیر روغن کرچک، کربوکسی متیل سلولز، دی‌متیل سولفوکسید ۵ درصد مانند گروه کنترل می‌باشد. در مجموع گروه گنادکتومی تیمارشده با داروی استرپتوزوتوسین به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه‌های کنترل یا حلال مواد کاهش را نشان می‌دهد. در کل، مقدار STLها در گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده استروپتوزوتوسین تیمارشده با داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن در شکل ۳-B نشان داده شده است. زمان STL1 و STL2 گروه‌های کنترل تیمارشده با داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. درنهایت این‌که زمان STL1 و STL2 گروه‌های تیمارشده با داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن همانند گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین می‌باشد.




**شکل ۲.** نتایج ازمون احترازی غیر فعال $STL_1$ (حافظه کوتاه‌مدت) و $STL_2$(حافظه بلندمدت) گروه‌های کنترل، گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین،گنادکتومی، گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین گنادکتومی‌شده، گروه‌های شم جراحی مربوط به موش‌های صحرایی تیمارشده با هورمون تستوسترون. هر یک از هیستوگرام‌ها نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار (Sem±Mean) از زمان STLs می‌باشد. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۸ عدد می‌باشد. تغییرات $P<۰/۰۱^{C}$ معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل، تغییرات معنی‌دار $P<۰/۰۱^{F}$ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین و گنادکتومی.

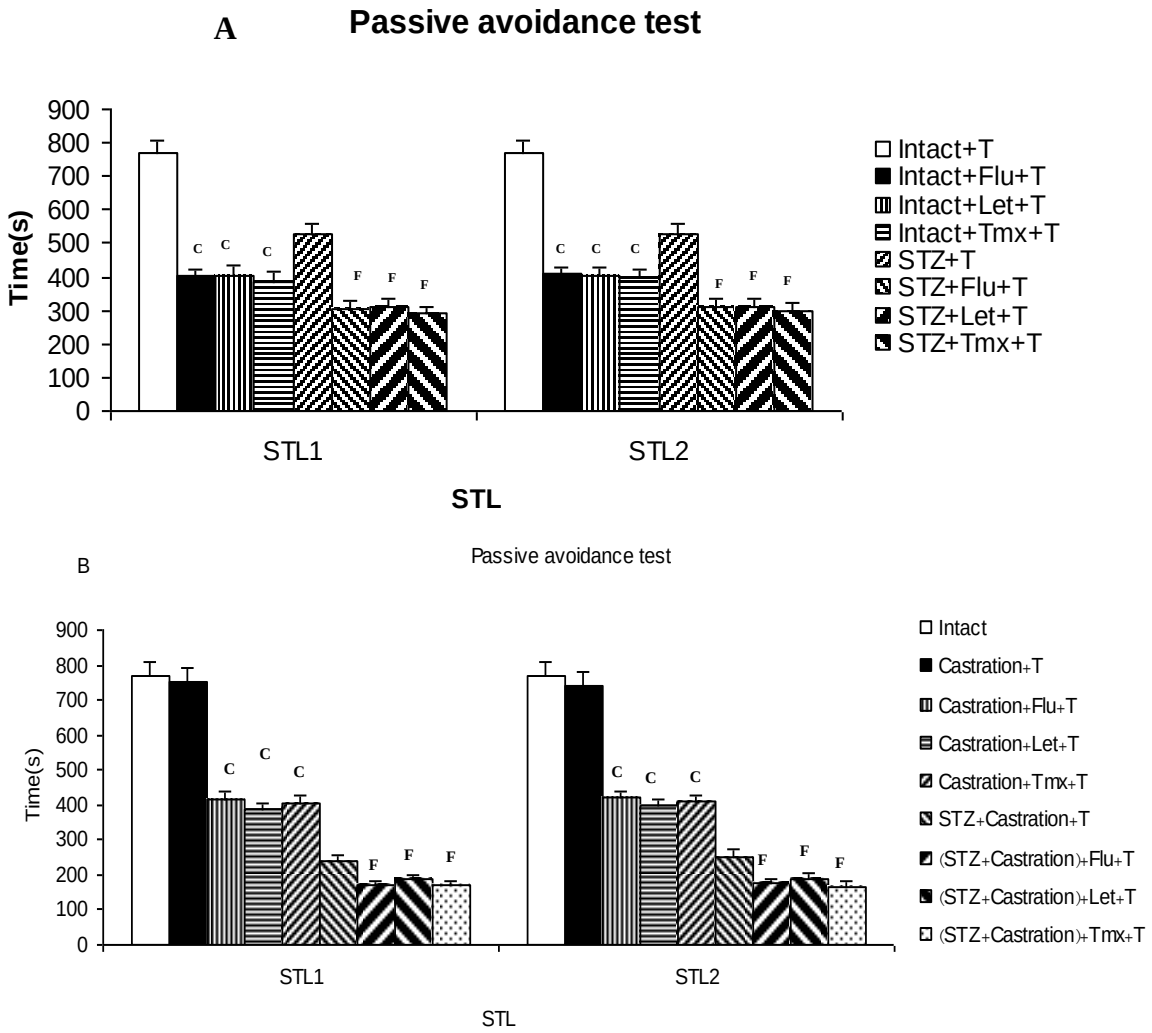



**شکل ۳.** نتایج آزمون احترازی غیر فعال $STL_1$ (حافظه کوتاه‌مدت) و $STL_2$ (حافظه بلندمدت) گروه‌های دریافت‌کننده داروی فلوتامید به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های آندروژنی (۱۰ mg/kg/ip) و داروی تاموکسی فن به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی (۱ mg/kg/ip)، داروی لتروزول به‌عنوان مهارکننده آنزیم آروماتاز (۴ mg/kg/ip) در مقایسه با گروه‌های حلال مواد نظیر روغن کرچک، کربوکسی متیل سلولز، دی‌متیل سولفوکسید ۵ درصد (A، گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین (B). هر یک از هیستوگرام‌ها نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار (Sem±Mean) از زمان STLs می‌باشد. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۸ عدد می‌باشد. تغییرات $P<۰/۰۱^{C}$ معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل، روغن کرچک، کربوکسی متیل سلولز، دی متیل سولفوکسید ۵ درصد.

**تأثیر داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن در گروه‌های تیمار شده با هورمون تستوسترون**

تأثیر داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن بر روی STL1 (حافظه کوتاه‌مدت) و STL2 (حافظه بلندمدت) در مقایسه با گروه کنترل تیمارشده با تستوسترون در شکل ۴-A مشخص شده است. نتایج بیان می‌کنند زمان STL1 و STL2 گروه کنترل تیمار شده با داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه کنترل و گروه کنترل تیمارشده با تستوسترون کاهش یافته است. در مجموع گروه دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین تیمارشده با هورمون تستوسترون که به آن‌ها داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی‌فن تزریق شده باشد به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه‌های مذکور که داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن را دریافت ننموده‌اند، کاهش یافته است. در کل مقدار STLها در ارتباط با گروه‌های گنادکتومی، گنادکتومی دریافت‌کننده داروی

استرپتوزوتوسین تحت درمان با هورمون تستوسترون، تیمار شده با داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن در شکل B-۴ نشان داده شده است. زمان STL1 و STL2 گروه گنادکتومی تیمارشده با هورمون تستوسترون تیمار شده با داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه‌های مذکور که داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن را دریافت ننموده اند کاهش یافته است. در مجموع شکل B-۴ نشان می‌دهد که زمان STL1 و STL2 گروه گنادکتومی دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین تحت درمان با هورمون تستوسترون تیمار شده با داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه‌های مذکور که داروهای لتروزول، فلوتامید و تاموکسی فن را دریافت ننموده اند کاهش یافته است.




**شکل ٤.** نتایج آزمون احترازی غیر فعال $STL_1$ (حافظه کوتاه‌مدت) و $STL_2$ (حافظه بلندمدت) گروه‌های STZ و گنادکتومی دریافت‌کننده تستوسترون تیمار شده با داروهای فلوتامید به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های آندروژنی (۱۰ mg/kg/ip)، تاموکسی فن به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی (۱ mg/kg/ip) و لتروزول به‌عنوان مهارکننده آنزیم آروماتاز (۴ mg/kg/ip) (A)؛ گروه‌های گنادکتومی و گنادکتومی+ دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین (B). هر یک از هیستوگرام‌ها نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار (Sem±Mean) از زمان STLs می‌باشد. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۸ عدد می‌باشد. تغییرات $P<۰/۰۱^{C}$ معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل یا گروه گنادکتومی تیمارشده با هورمون تستوسترون. همچنین تغییرات معنی‌دار $P<۰/۰۱^{F}$ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده داروی استروپتوزوتوسین و یا گروه گنادکتومی دریافت‌کننده داروی استروپتوزوتوسین تیمارشده با هورمون تستوسترون.

## بحث و نتیجه‌گیری

بیماری آلزایمر یکی از بیماری‌های مهم نورودژنراتیو مغزی است که درآن نورون‌های کورتکس قسمت‌های مختلف مغزی، به‌خصوص نورون‌های کولینرژیک کورتکس فرونتال و هیپوکامپوس از بین می‌روند. در بیماران آلزایمری فعالیت‌های غیر طبیعی در متابولیسم گلوکز مغزی مشاهده می‌شود که ناشی از اختلال اولیه در گیرنده‌های انسولین در نورون‌های مناطق مختلف کورتکس مغزی می‌باشد. اختلال مذکور به‌خصوص در ارتباط با انتقال پیام فیزیولوژیکی هورمون انسولین می‌باشد که عامل اساسی دمانس‌های مغزی به‌شمار می‌رود. استرپتوزوتوسین عملکرد گیرنده‌های انسولین و فعالیت استرس اسیداتیو را مهار می‌کند. در این زمینه تزریق درون‌بطنی از دوز ۷۵۰ میکروگرم در ۱۰ میکرولیتر حلال مناسب (مایع مغزی نخاعی مصنوعی) برای هر موش صحرایی (750µg/rat/10µL ACSF) در روزهای اول و سوم بیماری آلزایمر را ایجاد می‌نماید. تزریق داروی استرپتوزوتوسین درون‌بطنی برای ایجاد مدل بیماری آلزایمر از ۲۰ سال پیش مرسوم بوده است. یافته‌های مهم پاتوفیزیولوژی در زمینه ایجاد بیماری آلزایمر در موش‌های صحرایی ناشی از تزریق درون‌بطنی داروی استرپتوزوتوسین می‌باشد. به‌طوری که ایجاد مقاومت به انسولین در نورون‌های مغزی، ناشی از تزریق درون‌بطنی داروی استرپتوزوتوسین، مربوط به پاتولوژی پروتئین‌های بتاآمیلوئید و تائو می‌باشد (Paxinos, 1986).

مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار STL1 و STL2 (P<۰/۰۱) در گروه دریافت‌کننده داروی استروپتوزوتوسین نسبت به گروه کنترل را نشان داد، بنابراین داروی استرپتوزوتوسین اختلالات یادگیری و حافظه را درموش‌های صحرایی ایجاد می‌نماید. مقدار داروی استرپتوزوتوسین مصرف‌شده در این مطالعه کاملا مطمئن بوده و عامل هیچ‌گونه تغییرات سطح گلوکز خون نمی‌شود (Shingo, 2012). در مطالعات قبلی، اثر تستوسترون و گیرنده‌های آندروژنی و استروژنی بر روی موش صحرایی تیمارشده با داروی استرپتوزوتوسین به‌طور کامل مشخص نشده است (Seyedreza, 2012). بنابراین در این مطالعه از آنتاگونیست گیرنده‌های آندروژنی نظیر فلوتامید با دروز ۱۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن، آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی نظیر تاموکسی‌فن سیترات با دوز ۱ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن و مهارکننده آروماتاز نظیر لتروزول با دوز ۴ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن به‌کار گرفته شد. نتایج حاصله از تست یادگیری احترازی غیر فعال در این تحقیق نشان می‌دهد که اختلالات یادگیری بعد از دو هفته در موش‌های صحرایی گنادکتومی‌شده به‌وجود می‌آید، که با نتایج حاصله از تحقیقات پیشین در زمینه اثرات تستوسترون بر روی حافظه فضایی موش‌های صحرایی مطابقت می‌کند (Spritzer, 2011). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که STL1 حافظه کوتاه‌مدت و STL2 حافظه درازمدت گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده داروی استرپتوزوتوسین که تحت تأثیر داروهای فلوتامید، تاموکسی فن سیترات و لتروزول قرار گرفته اند به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است که بیان‌کننده اختلالات یادگیری و حافظه و پیشرفت بیماری آلزایمردر این سری از گروه‌های مورد آزمایش می‌باشد. هورمون تستوسترون با آروماتیزاسیون اندروژن‌ها به ۱۷ بتا استرادیول از طریق تسهیل و افزایش میزان ترجمه ژنهای مربوط به گیرنده‌های استروژنی عملکرد مغز را میانجی‌گری می‌نماید. در برخی از موارد تستوسترون بر روی حافظه کلامی با تأثیر بر روی آروماتیزاسیون ۱۷ بتا استرادیول اثر می‌گذارد. به‌طوری‌که تأثیر بر روی حافظه فضایی کاملاً وابسته به آروماتیزاسیون می‌باشد (Cherrier & Gibbs, 2005). در خرگوش‌ها تداخلات اندروژن‌ها که عامل عملکرد صحیح حافظه فضایی می‌باشد باعث یادگیری اطلاعات جدید حافظه فضایی در هر یک از تمرین‌ها می‌شود (Gibbs, 2005).

به‌طور مشابه، تزریق درون هیپوکامپی استرادیول‌ها

در موش‌های صحرایی باعث بهبود حرکات در آزمون موریس آبی می‌شود (Packard, 2007). لازم به توضیح است که نباید نقش متابولیکی اندروژن‌ها در بهبود حافظه و یادگیری را دست کم گرفت.

مطالعه حاضر نشان داد که تستوسترون هیچ اثر معنی‌داری در زمان STL1 و STL2 گروه کنترل نداشت. مترادفا در این تحقیق نتیجه گیری شد که حد فیزیولوژیکی تستوسترون در بدن هیچ نوع اثر معنی‌داری در بهبود حافظه و یادگیری در گروه‌های نرمال و غیرگنادکتومی شده، ایجاد نکرد. هورمون تستوسترون روند حافظه و یادگیری را در گروه‌هایی از موش‌های صحرایی که با داروی استروپتوزوتوسین تیمار شده بودند را بهبود بخشید در صورتی که هیچ اثر مشابهی را در گروه کنترل ایجاد نکرد. یافته‌های دیگری که در این مطالعه مشاهده گردید این بود که روغن کرچک، کربوکسی متیل سلولوس (CMC) و دی متیل سولفوکسید (DMSO) هیچ نوع تغییرات معنی‌داری در STL1 و STL2 هر دو گروه کنترل و گنادکتومی‌شده ایجاد نکرد. بنابراین تغییرات ایجاد شده در موش‌های صحرایی مربوط به تأثیر داروهای لتروزول، تاموکسیفن سیترات و فلوتامید می‌باشد. آنتاگونیست گیرنده‌های آندروژنی نظیر داروی فلوتامید بر روی گیرنده‌های آندروژنی اثر کرده و باعث مسدود کردن آن‌ها می‌شود. تیمار گروه کنترل با داروهایی نظیر تاموکسی‌فن سیترات و لتروزول دلیل اصلی تغییرات معنی‌دار STLها (P<۰/۰۱) می‌باشد که باعث کاهش حافظه و ایجاد اختلالات یادگیری می‌شود. این سری از داروها از طریق مسیرهایی در سیستم عصبی مرکزی موش صحرایی اثر می‌کند که تستوسترون اثر می کرد، بنابر این باعث اختلال در حافظه و یادگیری موش صحرایی می‌شود. در مجموع تستوسترون از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم باعث کاهش اختلالات حافظه و یادگیری در موش‌های صحرایی گردید. در مجموع این سری از نتایج نشان می‌دهند که گنادکتومی حافظه را در موش‌های صحرایی تیمارشده با استرپتوزوتوسین از بین می برد. به‌طوری‌که جایگزین نمودن هورمون تستوسترون اختلالات حافظه را کاهش می‌دهد. تستوسترون باید به‌صورت زیاد در ارتباط با اختلالات حافظه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین پایه مطالعات ما گیرنده‌های استروژنی و آندروژنی می‌باشد که میتوانند اثرات هم‌افزایی داشته باشند. نتیجه این‌که استفاده از تستوسترون به‌همراه داروهای ضد آلزایمر روتین می‌تواند در پیشگیری نشانه‌های بیماری آلزایمر مؤثر باشد.

## REFERENCES


Agonist and antagonist activities of hydroxyl flutamideand Casodex relate to androgen receptor stabilization. Urology; 48: 157-63.

Cherrier, M.M.; *et al*. (2005). The role of aromatization in testosterone supplementation: effects on cognition in older men. Neurology; 64: 290-6.

Compton, J.; *et al*. (2002). Cognition and Alzheimer’s disease. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol; 16: 357-70.

Gibbs, R.B. (2005). Testosterone and estradiol produce different effects on cognitive performance in male rats. Horm Behav; 48: 268-77.

Gillett, M.J.; Martins, R.N. (2003). Relationship between testosterone, sex hormone binding globulin and plasma amyloid beta peptide 40 in older men with subjective memory loss or dementia. J Alzheimers Dis; 5: 267-9.

Goodenough, S.; Engert, S. (2000). Testosterone stimulates rapid secretory amyloid precursor protein release from rat hypothalamic cells via the activation of the mitogen activated protein kinase pathway. Neurosci Lett; 296: 49-52.

Gouras, G.K.; *et al*. (2000). Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer’s beta-amyloid peptides. Proc Natl Acad Sci U S A; 97: 1202-5.

Greene, J.D.; Baddeley, A. (1996).

Analysis of the episodic memory deficit in early Alzheimer's disease: evidence from the doors and people test. Neuropsychologia; 34:537-51.

Haass, C.; Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat Rev Mol Cell Biol; 8: 101-12.

Hammond, J.; *et al*. (2000). Intra hippocampal injection of testosterone impaired acquisition, consolidation and retrieval of inhibitory avoidance learning and memory in adult male rats. Behav Brain Res; 188(1): 71-7.

Jaffe, A.B.; Gandy, S.E. (1994). Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein. J Biol Chem; 269: 13065-8.

Jakab, R.L.; Horvath, TL. (1993). Aromataseimmunoreactivity in the rat braingonadectomy-sensitive hypothalamicneurons and an unresponsive 'limbic ring' of the lateral septumbednucleus- amygdala complex. J Steroid Biochem Mol Biol; 44: 481-98.

Kemppainen, J.A.; Wilson, E.M. (1996).

Kirk, A.; Kertesz, A. (1991). On drawing impairment in Alzheimer's disease. Archives of Neurology; 48:73-7.

Leranth, C.; Hajszan, T. (2004). Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. J Neurosci; 24: 495-9.

Levin-Allerhand, J.A.; Lominska, C.E. (2002). 17alpha-Estradiol and 17 beta-estradiol treatments are effective in lowering cerebral amyloid-beta levels in Abeta PPSWE transgenic mice. J Alzheimers Dis 2002; 4: 449-57.

Long, J.B. (1983). Effect of castration and adernalectomy on in vitro rates of tryptophan hydroxylation and levels of serotonin in microdissected brain nuclei of adult male rats. Brain Ress; 277: 289-297.

Mohajjel Nayebi, A.; Pourrabie, S.R.; Hosseni, S.E. (2014). Testosterone ameliorates streptozotocin-induced memory impairment in male rats. Acta pharmacological cinica; 35: 752-757.

Mooradian, A.D.; Morley, J.E. (1987). Biological actions of androgens. Endocr Rev 1987; 8: 1-28.

Naftolin, F.; Ryan, K.J. (1972). Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. Endocrinology; 90: 295-8.

Packard, M.G.; Kohlimaire, J.R. (1996). Post training intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic system. Behav Neurosci; 110: 626-32.

Palmer, A. M., Stratmann, G. C.; Procter, A. W.; Bowen, D. M. (1988). Possible neurotransmitter basis of behavioral changes in Alzheimer's disease. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 23(6), 616-620.

Papasozomenos, S.C. (1997). The heat shock-induce hyperphosphorylation of tau is estrogen-independent and prevented by androgens: implications for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A; 94: 6612-7.

Papasozomenos, S.Ch.; Shanavas, A.; (2002). estosterone prevents the heat shock-induced overactivation of glycogen synthase kinase-3 beta but not of cyclin-dependent kinase 5 and c-Jun NH2-terminal kinase and concomitantly abolishes hyperphosphorylation of tau: implications for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A; 99: 1140-5.

Pappas, B.A.; Bayley, P.J. (2000). Choline acetyltransferase activity nd cognitive domain scores of Alzheimer's patients. Neurobiol Aging; 21: 1-7.

Paxinos, G.; Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego: Academic Press.

Pike, C.J.; Nguyen, T.V. (2008). Androgen cell signaling pathways involved in

neuroprotective actions. Horm Behav; 53: 693-705.

Pike, C.J.; Rosario, E.R. (2006). Androgens, aging, and Alzheimer's disease. Endocrine; 29: 233-41.

Pillon, B.; Deweer, B. (1993). Explicit memory in Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases. Arch Neurol; 50: 374-9.

Price, B.H.; Gurvit, H. (1993). Neuropsychological patterns and language deficits in 20 consecutive cases of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. Arch Neurol; 50: 931-7

Rosario, E.R.; Chang, L. (2004). Age-related testosterone depletion and the development of Alzheimer disease. JAMA; 292: 1431-2.

Shingo, A.S.; Kanabayashi, T. (2012). Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin signalling through the dentate gyrus. Behav Brain Res; 229: 378-83.

Simpson, E.R.; Davis, S.R. (2001). Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis-some new perspectives. Endocrinology; 142: 4589-94.

Singh, S.M.; Gauthier, S. (2000). Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. Curr Med Chem; 7: 211-47.

Spritzer, M.D.; Daviau, E.D. (2011). Effects of testosterone on spatial learning and memory in adult male rats. Horm Behav; 59: 484-96.

Weill-Engerer, S.; David, J.P. (2002). Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and no demented patients. J Clin Endocrinol Metab; 87: 5138-43.