

اثر ژل رویال بر یادگیری و حافظه در رت پس از تزریق استرپتوزوتوسین به داخل بطن‌های جانبی مغز (icv-STZ)

زهره زمانی^۱، دکتر پرهام رئیسی^۲، دکتر حجت‌اله علایی^۳، دکتر علی اصغر پیله وریان^۴، زهرا زمانی^۵

خلاصه

مقدمه: بیماری آلزایمر یک اختلال عصبی پیش‌رونده و برگشت ناپذیر می‌باشد. این بیماری علت مهم دمانس پیری است که با تخریب نورونی و زوال شناختی، به ویژه در سنین پیری مشخص می‌شود. با تزریق استرپتوزوتوسین به داخل بطن‌های جانبی مغز رت، مدل مناسبی از آلزایمر نوع اسپورادیک ایجاد می‌شود. ژل رویال ماده لزجی است که توسط زنبورهای عسل کارگر جوان از جنس *Apis mellifera* تولید می‌گردد. در مطالعات پیشین نشان داده شده است که ژل رویال دارای خواص نورون‌زن بوده، موجب القای تمایز نورونی نیز می‌شود. مطالعه‌ی حاضر قصد داشت تا اثر این ماده را بر یادگیری و حافظه در رت پس از تزریق استرپتوزوتوسین به داخل بطن‌های جانبی مغزی (icv) بررسی نماید.

روش‌ها: ۴۸ عدد موش صحرایی نر با وزن ۳۵۰-۳۰۰ گرم، به چهار گروه شم، شم-ژل رویال، استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین-ژل رویال تقسیم شدند. گروه استرپتوزوتوسین و استرپتوزوتوسین-ژل رویال تحت عمل جراحی، تزریق دوطرفه‌ای از استرپتوزوتوسین (۱/۵ mg/kg) دریافت نمودند و دو گروه دیگر به همین ترتیب و با همین دوز نرمال سالین دریافت کردند. گروه شم-ژل رویال و استرپتوزوتوسین-ژل رویال به مدت ۱۰ روز غذای حاوی ژل رویال (۳ درصد وزنی) دریافت نمودند ولی گروه شم و استرپتوزوتوسین با غذای معمولی فاقد ژل رویال تغذیه شدند. حافظه و یادگیری در این حیوانات، از طریق آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال نشان داد که شاخص‌های حافظه و یادگیری در گروه استرپتوزوتوسین در مقایسه با گروه شم به طور قابل ملاحظه‌ای تخریب شده است؛ اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های شم و استرپتوزوتوسین-ژل رویال وجود نداشت. با این که ژل رویال شاخص‌های یادگیری و حافظه را در گروه شم-ژل رویال بهبود بخشید ولی این تغییرات در مقایسه با گروه شم معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که تزریق استرپتوزوتوسین به داخل بطن‌های جانبی مغز موجب اثرات مخربی بر یادگیری و حافظه در رت می‌شود. با این وجود مصرف غذای حاوی ژل رویال از اثرات تخریبی استرپتوزوتوسین جلوگیری کرد. نتایج مشاهده شده در این تحقیق پیشنهاد می‌کند که ممکن است ژل رویال دارای اثرات مطلوبی بر جلوگیری و تخفیف بیماری آلزایمر باشد.

واژگان کلیدی: ژل رویال، استرپتوزوتوسین، یادگیری و حافظه، آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال، بیماری آلزایمر.

مقدمه

قدرت شناخت خود را از دست می‌دهند. در نوع اسپورادیک این بیماری همراه با اختلالات شناختی، آسیب شدیدی نیز به صورت پیش‌رونده در متابولیسم گلوکز و انرژی مغز به وجود می‌آید (۱-۲). گلوکز،

بیماری‌های نورودژنراتیو مختلفی در انسان موجب آسیب پیش‌رونده‌ی حافظه و عملکردهای شناختی می‌گردند. یکی از این اختلالات، بیماری آلزایمر می‌باشد که افراد مسن مبتلا به این بیماری، حافظه و

^۱ دانشجوی زیست‌شناسی علوم جانوری، گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ استادیار فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ استادیار فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۴ استادیار فیزیولوژی جانوری، گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران.

^۵ دانشجوی پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

سوخت اصلی تأمین انرژی بیولوژیک در سیستم اعصاب مرکزی است (۱) و از عوامل مؤثر بر یادگیری و حافظه می‌باشد (۳). هر آسیبی در متابولیسم گلوکز موجب تشدید فرایند زوال عقل می‌گردد (۴). همچنین تحقیقات کلینیکی رابطه‌ای را میان بیماری آلزایمر و مقاومت به انسولین در مغز نشان داده است (۵).

مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که تزریق استرپتوزوتوسین به داخل بطن‌های مغزی icv-STZ در رت بر یادگیری و حافظه و همچنین بر فرایندهای متابولیسمی در مغز این حیوانات اثراتی مشابه با بیماری آلزایمر نوع اسپورادیک ایجاد می‌کند (۱-۲). بنابراین icv-STZ مدل مناسبی برای مطالعه‌ی این بیماری می‌باشد (استرپتوزوتوسین یک ماده‌ی دیابتوزنیک است که جهت القای دیابت تیپ یک در حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌شود) (۱).

ژل رویال (Royal Jelly یا RJ) ماده‌ی لزجی است که توسط زنبورهای عسل کارگر جوان ترشح شده (۶)، توسط آن لاروهای کندو تغذیه می‌شوند. تغذیه‌ی لاروهای کارگر با ژل رویال از روز سوم رشد متوقف شده ولی لاروهای انتخابی جهت ملکه شدن همچنان از این ژل تغذیه می‌شوند (۷). زنبورهای ملکه، ملکه به دنیا نمی‌آیند بلکه بر اساس تغذیه‌ی بعد از تولد به ملکه تبدیل می‌شوند. این ژل نقش مهمی در تغذیه‌ی ملکه دارد. تغذیه با ژل رویال عامل بزرگ‌تر بودن جثه، قدرت باروری زیاد و بیشتر بودن طول عمر ملکه می‌باشد (۷).

ژل رویال حاوی ۱۵-۱۲ درصد پروتئین، ۱۲-۱۰ درصد کربوهیدرات، ۷-۳ درصد لیپید (شامل

استرول‌ها و اسیدهای چرب)، عناصر معدنی و ویتامین‌ها است (۸). به تازگی مشخص شده است ژل رویال دارای انواع فعالیت‌های بیولوژیکی در سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن (۹) و به خصوص سیستم اعصاب می‌باشد. ژل رویال حاوی ترکیبات فسفردار به ویژه استیل کولین است که یکی از ناقلین پیام‌های عصبی از یک سلول به سلول بعدی می‌باشد (۷). ژل رویال اکسیژن رسانی به بافت مغز را افزایش می‌دهد، این افزایش اکسیژن رسانی در افراد مسنی که مبتلا به برخی از اختلالات مغزی ناشی از پیری عروق و کاهش اکسیژن رسانی به مغز بوده‌اند، مفید می‌باشد (۱۰). همچنین نورون‌ها را تسهیل کرده (۸)، موجب شاخه‌زایی و القای تمایز نورونی می‌گردد (۱۱، ۸). علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند ژل رویال از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی موجب بهبود هیپرانسولینمی و مقاومت به انسولین در مدل‌های حیوانی مقاوم به انسولین می‌شود (۱۲). ترکیبات حاصل از هیدرولیز آنزیمی ژل رویال دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار زیادی در مقابل انواع اکسیژن فعال از قبیل رادیکال‌های آنیون سوپر اکسید و هیدروکسیل می‌باشد (۱۳).

بنا بر آن چه در مورد اثرات سودمند ژل رویال بر حفظ و بقای نورونی که به آن‌ها اشاره شد و با توجه به این که محققین هنوز هم در پی یافتن داروی مطمئن و مناسبی برای درمان بیماری آلزایمر هستند، این مطالعه به بررسی اثرات ژل رویال بر یادگیری و حافظه در رت‌ها به دنبال تزریق استرپتوزوتوسین به داخل بطن‌های جانبی مغز، از طریق مطالعه‌ی رفتاری پرداخت.

روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش رت‌های نر از نژاد ویستار با وزن ۳۵۰-۳۰۰ گرم بودند که در شرایط سیکل تاریکی و روشنی به صورت ۱۲ ساعته در قفس‌های چهارتایی نگهداری شدند. رت‌ها به ۴ گروه دوازده تایی گروه شم، گروه شم-ژل رویال، گروه استرپتوزوتوسین و گروه استرپتوزوتوسین-ژل رویال تقسیم شدند. در کلیه گروه‌ها در تمام طول آزمایش، رت‌ها به طور آزادانه به غذا دسترسی داشتند. از روز هفتم پس از جراحی، رت‌های گروه‌های دریافت کننده ژل رویال به جای غذای معمولی به مدت ۱۰ روز به آن‌ها غذای حاوی ژل رویال (۳ درصد وزنی) داده شد (۱۵-۱۴، ۶). ژل رویال تازه توسط دستگاه Freeze drier به فرم لیوفیلیز در آمد، سپس با پودر با نسبت وزنی ۳ درصد با غذای استاندارد پودر شده‌ی رت مخلوط شد و با اضافه کردن کمی آب به صورت خمیر درآمد. خمیر تهیه شده را به فرم غذای رت آماده کرده، توسط وکیوم (در دمای پایین) خشک شد (۱۴، ۹، ۶).

حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات با دوز ۴۰۰ mg/kg بیهوش شدند و برای ثابت نگه داشتن دمای بدن آن‌ها (۰/۵ ± ۳۶/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) از تشک گرم کننده استفاده شد. بعد از Shave کردن، سر حیوان در دستگاه استریوتاکسیک جراحی مغز ثابت شد و با ایجاد شکافی طولی در بخش خلفی سر، جمجمه نمایان گشت. بعد از مشخص کردن مختصات استریوتاکس برای بطن‌های جانبی مغزی با استفاده از راهنمای اطلس مغز رت (۱۶) و همچنین با استفاده از مختصات به دست آمده از مطالعه‌ی پایلوت (جلویی-عقبی ۰/۸- میلی‌متر،

جانبی ۱/۶ ± میلی‌متر و پشتی-شکمی ۴/۲- میلی‌متر)، با کمک دریل دو سوراخ در جمجمه، به طوری که به بافت مغز آسیب نرساند ایجاد شده، کانول مخصوص تزریق به آرامی وارد بطن‌ها شد و داروی استرپتوزوتوسین با دوز ۱/۵ mg/kg (وزن بدن در سالین) (۲) به وسیله‌ی سرنگ هامیلتون طی مدت ۳ دقیقه داخل هر بطن تزریق گردید. پس از اتمام تزریق، به مدت ۵ دقیقه سوزن مورد استفاده در داخل بطن باقی ماند و سپس سوزن خارج شد؛ همه‌ی این مراحل در بطن طرف مقابل انجام گرفت. گروه‌های شم نیز به همین روش تحت جراحی قرار گرفتند ولی به جای STZ، حجم مساوی از سالین دریافت نمودند. بعد از جراحی، رت‌ها در قفس‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند و بدون هیچ محدودیتی به آب و غذا دسترسی داشتند.

آزمون رفتاری بعد از تمام شدن دوره‌ی ۱۰ روزه‌ی تغذیه‌ی حیوان با ژل رویال، بین ساعات ۹ تا ۱۲ صبح، در آزمایشگاه تحت شرایط استاندارد انجام شد. برای بررسی پاسخ احترازی غیر فعال (Passive avoidance response) از اتاقک یادگیری اجتنابی شاتل باکس استفاده شد. دستگاه شاتل باکس شامل دو اتاقک روشن (۲۵ × ۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر) و تاریک (۲۵ × ۲۵ × ۵۰ سانتی‌متر) و یک درب گیوتینی بین آن‌ها می‌باشد (مسیر حرکت یک طرفه برای موش). کف اتاقک تاریک دارای میله‌های فلزی به قطر ۲/۵ میلی‌متر و به فاصله‌ی ۱ سانتی‌متر می‌باشد. برای اعمال تحریک به محفظه‌ی تاریک از دستگاه مولد شوک الکتریکی استفاده گردید. به این منظور، شوک الکتریکی به شدت ۱/۵ میلی‌آمپر به مدت ۳ ثانیه اعمال شد (۲). همچنین برای سنجش یادگیری

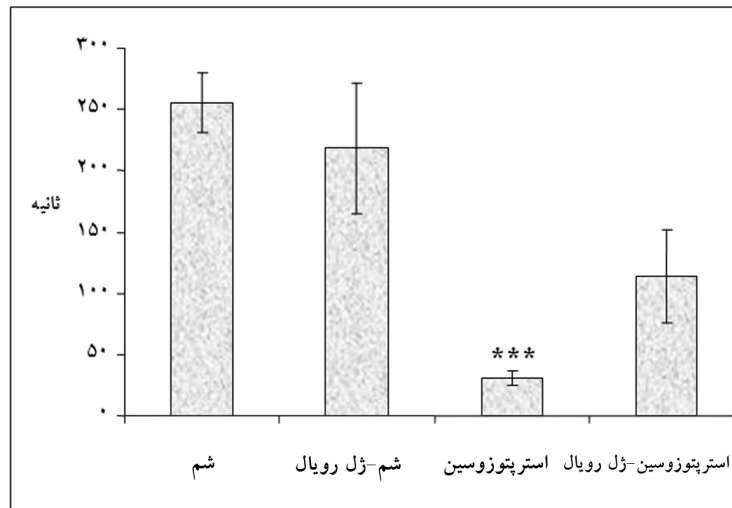
تفاوت که زمانی که حیوان به محفظه‌ی تاریک وارد می‌شد هیچ گونه شوکی دریافت نمی‌کرد. در این مرحله، تأخیر زمانی در اولین ورود به اتاق تاریک اندازه‌گیری گردید. طولانی‌تر بودن تأخیر زمانی برای ورود به اتاق تاریک در مرحله‌ی ارزیابی حافظه، نشانه‌ی یادگیری و حافظه‌ی بهتر بود.

برای آنالیز نتایج مربوط به آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال از آزمون غیر پارامتریک Kruskal-Wallis و Dunnett's جهت Post-test استفاده شد.

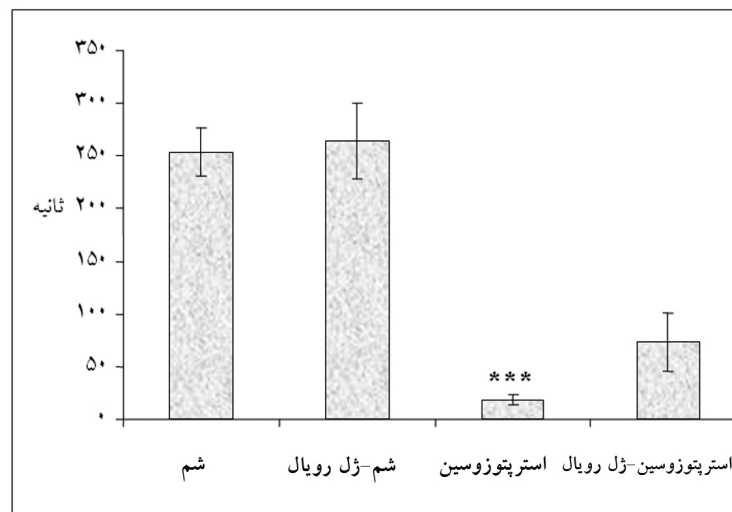
یافته‌ها

در این تحقیق، پاسخ احترازی غیر فعال از طریق ثبت و اندازه‌گیری شاخص‌های تأخیر در حین عبور بعد از ۲۴ ساعت و یک هفته به عنوان عملکرد حافظه و یادگیری در نظر گرفته شد و نتایج به دست آمده بین گروه‌های مختلف مقایسه گردید. نتایج نشان داد که ۲۴ ساعت (یک روز) و یک هفته پس از اعمال شوک جهت یادگیری در دستگاه شاتل باکس، تأخیر زمانی برای ورود به اتاق تاریک در موش‌های گروه استرپتوزوتوسین در مقایسه با گروه شم کاهش معنی‌داری داشت (به ترتیب ۲۴ ساعت بعد $5/656 \pm 30/69417$ ثانیه در گروه استرپتوزوتوسین و $23/837 \pm 255/498$ ثانیه در گروه شم، $P < 0/001$). نمودار شماره‌ی ۱؛ و یک هفته بعد $18/53 \pm 4/552$ ثانیه در گروه استرپتوزوتوسین و $23/063 \pm 253/70$ ثانیه در گروه شم، $P < 0/001$ ، نمودار شماره‌ی ۲). با این وجود، تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های دیگر غیر از گروه استرپتوزوتوسین در مقایسه با گروه شم مشاهده نشد.

احترازی غیر فعال موش از دستگاه شاتل باکس استفاده شد. این آزمون در ۳ مرحله انجام گرفت: ۱- مرحله‌ی سازش (Adaptation): پس از گذشت ۳ هفته از تزریق STZ به داخل بطن‌های جانبی مغز، حیوان قبل از شروع آزمایش به مدت ۵ دقیقه در داخل دستگاه قرار گرفت، به صورتی که درب گیوتینی بین دو اتاق تاریک و روشن باز بود و رت‌ها بین دو اتاق حرکت می‌کرد. ۲- مرحله‌ی اکتساب (Acquisition): در این مرحله برای شروع آزمایش، حیوان در حالی که پشتش به سمت درب گیوتینی بود، در محفظه‌ی روشن قرار گرفت و بعد از ۱۰ ثانیه درب گیوتینی بالا کشیده شد تا حیوان از محفظه‌ی روشن به محفظه‌ی تاریک برود (ملاک برای ورود حیوان به محفظه‌ی تاریک، عبور اندام‌های حرکتی پشتی حیوان از درب ارتباط دهنده‌ی دو اتاق بود). سپس درب پایین آورده شد و شوک الکتریکی با شدت $1/5$ میلی‌آمپر به مدت ۳ ثانیه به پای حیوان اعمال گردید که با واکنش جست و خیز جانور، دریافت شوک محرز گردید. در پایان حیوان به قفس منتقل شد. در ارتباط با این مرحله، موش‌های با تأخیر اولیه بیش از ۳۰۰ ثانیه از آزمایشات حذف گردیدند. ۳- مرحله‌ی آزمایش نگهداری اطلاعات (Retention): به منظور ارزیابی حافظه، ۲۴ ساعت و یک هفته بعد از دریافت شوک الکتریکی، حیوان دوباره در داخل اتاق روشن قرار داده شد و درب گیوتینی باز گردید. مدت زمان سپری شده برای ورود موش به اتاق تاریک بعد از باز شدن درب، ثبت شد. در هر دو مرحله‌ی یادگیری و ارزیابی حافظه، سقف زمانی ۳۰۰ ثانیه بود، با این



نمودار ۱. تأثیر **icv-STZ** و غذای حاوی ژل رویال بر تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک، یک روز پس از اعمال شوک جهت یادگیری در دستگاه شاتل باکس. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. زمان بیشتر نشان دهنده‌ی حافظه‌ی بهتر است. گروه شم (n = 9)، گروه شم-ژل رویال (n = 8)، گروه استرپتوزوسین (n = 11) و گروه استرپتوزوسین-ژل رویال (n = 8)، $***P < 0.001$ نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم).



نمودار ۲. تأثیر **icv-STZ** و غذای حاوی ژل رویال بر تأخیر زمانی برای ورود به اتاق تاریک یک هفته پس از اعمال شوک جهت یادگیری در دستگاه شاتل باکس. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. زمان بیشتر نشان دهنده‌ی حافظه‌ی بهتر است. گروه شم (n = 9)، گروه شم-ژل رویال (n = 8)، گروه استرپتوزوسین (n = 11) و گروه استرپتوزوسین-ژل رویال (n = 8)، $***P < 0.001$ نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم).

برای ورود به اتاق تاریک، تأخیر زمانی معنی‌داری را نشان دادند که بیانگر تخریب روند یادگیری به دلیل تزریق استرپتوزوسین به داخل بطن‌های جانبی مغز می‌باشد. این نتایج تأیید کننده‌ی مطالعات پیشین است

بحث

نتایج حاصل از آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال نشان داد ۲۴ ساعت و یک هفته پس از اعمال شوک، موش‌های گروه استرپتوزوسین در مقایسه با گروه شم

ذهنی یادگیری، حافظه و شناخت می‌شود که در طول زمان در سطح پایینی باقی می‌ماند (۲). icv-STZ در موش‌ها موجب غیر حساس شدن گیرنده‌های انسولین و تغییرات بیوشیمیایی، شبیه بیماری آلزایمر می‌شود (۱۷). همچنین icv-STZ با مهار گیرنده‌های انسولین مغز از طریق کاهش مصرف گلوکز و کاهش فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیک در مغز با کاهش تشکیل انرژی، کاهش فعالیت استیل کولین ترانسفراز و آسیب نورون‌های آوران کولینرژیک و همچنین کاهش فعالیت کاتکول آمینرژیک موجب پیدایش اختلالاتی در یادگیری و ظرفیت حافظه می‌گردد (۲-۳).

بهبود اکتساب یا نگهداری اطلاعات، نشان دهنده‌ی افزایش توانایی یادگیری و حافظه در موش‌ها است. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر بهبود یادگیری و حافظه در موش‌های گروه استرپتوزوتوسین-ژل رویال بود که ممکن است به دلیل مهار استرس اکسیداتیو و بهبود سطح ATP توسط ژل رویال باشد؛ چرا که مطالعات پیشین نشان داده‌اند ژل رویال از طریق اثرات آنتی اکسیدانی موجب بهبود هیپرانسولینمی و مقاومت به انسولین در مدل‌های حیوانی مقاوم به انسولین می‌گردد (مقاومت به انسولین با تغییر سطح استرس اکسیداتیو همراه می‌شود) (۱۲). همچنین ترکیبات حاصل از هیدرولیز آنزیمی ژل رویال، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار زیادی در مقابل انواع اکسیژن فعال از قبیل رادیکال آنیون سوپر اکسید و رادیکال هیدروکسیل می‌باشد (۱۳). لازم به ذکر است که فعالیت آنتی اکسیدانی RJ به دلیل اتصال آن با رادیکال‌های آزاد می‌باشد که باعث استرس اکسیداتیو می‌شوند، نه این که به طور مستقیم فعالیت آنزیمی آنتی اکسیدان‌ها را تغییر دهند (۱۳).

(۲). موش‌های گروه استرپتوزوتوسین-ژل رویال در مقایسه با گروه استرپتوزوتوسین با تأخیر زمانی بیشتری وارد اتاق تاریک شدند؛ به طوری که هیچ تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های استرپتوزوتوسین-ژل رویال و شم مشاهده نشد که بیانگر اثر مفید ژل رویال بر جلوگیری از تخریبات ناشی از استرپتوزوتوسین می‌باشد. تحقیقات نشان داده‌اند تزریق استرپتوزوتوسین به داخل بطن‌های جانبی مغز با دوزی که ایجاد دیابت قندی نمی‌کند، منجر به تخریب متابولیسم گلوکز مغز می‌گردد. این تخریب باعث کاهش نسبت ATP به ADP می‌شود که ممکن است به دلیل عدم تعادل بین تولید و مصرف انرژی باشد. عدم تعادل در متابولیسم انرژی، بیانگر حالتی از استرس متابولیک عصبی (Metabolic neuronal stress) می‌باشد (۲۰). به دلیل این که icv-STZ منجر به اختلال در رفتار، متابولیسم انرژی و گلوکز و همچنین چندین اختلال در متابولیسم اکسیداتیو می‌شود، می‌تواند به عنوان مدل حیوانی مناسبی برای بیماری آلزایمر تک گیر در نظر گرفته شود. همچنین آسیب متابولیسم گلوکز در مغز توسط icv ماده‌ی دیابتورژیک STZ به تخریب رفتار اجتنابی غیر فعال منجر می‌شود (۱). تحقیقات پیشین نشان دادند که icv-STZ موجب کاهش متابولیسم انرژی / استرس اکسیداتیو می‌گردد که این امر باعث تخریب شناختی توسط مهار سنتز ATP و استیل کوآنزیم A می‌شود. نقص کولینرژیک از طریق کاهش فعالیت کولینرژیک ترانسفراز (ChAT) در هیپوکامپ و افزایش فعالیت کولین استراز (ChE) در مغز موش‌های icv-STZ ایجاد می‌شود.

icv-STZ موجب تخریب گیرنده‌های انسولین مغز شده، این تخریب منجر به زوال پیشرونده‌ی قابلیت‌های

به نام N_1 -Oxide AMP نیز بوده است که به طور طبیعی فقط در این ژل یافت می‌گردد (۱۳-۱۲). این ماده مانع تکثیر سلول‌های PC_{12} می‌شود (Pheochromocytoma) و بیان نوروفیلان M (پروتئین خاص نورون‌های بالغ) را تحریک می‌کند که منجر به القای تمایز نورونی می‌گردد (۱۳). با توجه به این که یکی از عوارض بیماری آلزایمر، مرگ نورونی می‌باشد، این ژل به دلیل القای نوروزن و تمایز نورونی، ممکن است در پیش‌گیری و یا درمان این بیماری و سایر اختلالات نورودژنراتیو نقش داشته باشد.

در سیستم اعصاب مرکزی، فاکتور رشد عصبی (Nerve growth factor یا NGF) ارتباط نزدیکی با سیستم کولینرژیک دارد. NGF بقای نورون‌های کولینرژیک آسیب دیده در شرایط آزمایشگاهی را افزایش می‌دهد، همچنین باعث حفظ و تنظیم فنوتیپ نورون‌های کولینرژیک می‌شود. NGF یک عمل شبه ناقل عصبی در جهت تنظیم انتقال عصبی کولینرژیک و تحریک پذیری نورونی دارد. داروها و ترکیباتی که تولید NGF را در سیستم اعصاب مرکزی تشدید می‌کنند، می‌توانند در درمان بیماری آلزایمر مفید باشند (۱۹)؛ چرا که نورون‌های کولینرژیک به ویژه در بیماری آلزایمر آسیب می‌بینند. مطالعات پیشین اثرات سینرژیکی (Synergistic) را بین N_1 -AMP اکسید و NGF بر روی ایجاد انشعابات نورونی نشان داده است (۱۲). به این ترتیب شاید اثر مفید ژل رویال بر بهبود حافظه و یادگیری در موش‌های گروه استرپتوزوتوسین-ژل رویال نسبت به گروه استرپتوزوتوسین ناشی از وجود N_1 -AMP اکسید و اثر سینرژیکی آن با NGF باشد. همچنین این ژل بیان ژن Glial cell line-derived neurotrophic factor

هیپوکامپ و نواحی مختلف کورتکس مغز در یادگیری و حافظه نقش دارند و افزایش استرس اکسیداتیو برای این نواحی مغز، بسیار بحرانی می‌باشد. همچنین استرس اکسیداتیو و فرایندهای التهابی (Inflammatory processes) نقش مهمی در پاتوژنز بیماری آلزایمر دارند. در اختلالات نورودژنراتیو چربی‌ها، پروتئین‌ها، ترکیبات عمده‌ی ساختاری و عملی غشای سلول توسط رادیکال‌های آزاد مورد حمله قرار می‌گیرند که به پراکسیداسیون چربی‌ها و اکسیداسیون پروتئین‌ها و در نهایت آسیب یکپارچگی غشا منجر می‌گردد. این امر در تسریع مکانیسم پیری و اختلالات نورودژنراتیو وابسته به آن فاکتور مهمی است (۲). ژل رویال به دلیل داشتن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ممکن است در پیش‌گیری از تخریب ناشی از استرس اکسیداتیو و بروز اختلالات ناشی از آن نقش حفاظتی داشته باشد.

icv-STZ نه تنها باعث تخریب یادگیری و حافظه در موش‌ها شده بلکه موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز و کاهش فعالیت استیل کولین ترانسفراز در هیپوکامپ می‌شود (۱۸). استیل کولین برای شکل‌گیری و رشد حافظه و بازیابی آن لازم و ضروری می‌باشد. سنتز استیل کولین به تجزیه‌ی گلوکز و وجود انسولین جهت کنترل فعالیت آنزیم استیل کولین ترانسفراز (آنزیم سازنده‌ی استیل کولین) نیاز دارد. نقص و اختلالات فرایندهای شناختی با فعالیت استیل کولین ترانسفراز مرتبط می‌باشند (۲). بنابراین ژل رویال به دلیل داشتن ترکیبات فسفردار به ویژه استیل کولین، شاید بتواند در درمان این اختلالات مفید واقع شود (۷).

عصاره‌ی ژل رویال حاوی ترکیب منحصر به فردی

علایم بیماری را تعدیل کنند (مانند استفاده از مهار کننده‌های آنزیم استیل کولین استراز که تجزیه استیل کولین را کاهش می‌دهد و بهبودی مختصر و موقتی را در این بیماران ایجاد می‌نماید)، محققین هنوز در پی یافتن داروی مطمئن و مناسبی برای درمان بیماری آلزایمر هستند. هدف پژوهشگران فقط بهبود حافظه‌ی بیماران نیست بلکه به دنبال متوقف کردن تغییرات نورودژنراتیو مغز هستند (۱۸). نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق استرپتوزوتوسین به داخل بطن‌های جانبی مغز، موجب اثرات مخربی بر یادگیری و حافظه در رت می‌شود. با این وجود، مصرف غذای حاوی ژل رویال از اثرات تخریبی استرپتوزوتوسین تا حدودی جلوگیری کرد. قابل ذکر است عواملی همچون درصد وزنی ژل رویال در غذای حاوی ژل رویال و تعداد روزهای تیمار شاید بتواند بر اثرات ژل رویال تا حدودی تأثیر گذار باشند. با توجه به نتایج مشاهده شده در این تحقیق، ممکن است استفاده از ژل رویال دارای اثرات مطلوبی بر جلوگیری و تخفیف بیماری آلزایمر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از شرکت عسل طبیعی اصفهان برای تهیه‌ی ژل رویال تازه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. 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.
2. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res* 2006; 171(1): 9-16.

(GDNF)، فاکتور نوروتروفی که در مغز عمل می‌کند، نیز نوروفیلان H، پروتئینی که به طور اختصاصی در آکسون‌ها بیان می‌شود، را در هیپوکامپ مغز موش‌های جوان تسهیل می‌کند. GDNF به عنوان فاکتور بقای نورون‌های دوپامینرژیک کشت شده‌ی مغز میانی به کار می‌رود (۹). در مطالعات اخیر نشان داده شده است که GDNF به عنوان فاکتوری برای حفظ و بقای نورون‌های کشت شده عمل می‌کند و موجب شاخه سازی در نورون‌ها و تمایز نورونی نیز می‌شود (۲۰، ۱۳-۱۲، ۹). از دیگر ترکیبات ژل رویال، ۱۰-هیدروکسی ترانس ۲-دکانوئیک اسید (HDEA)، یک اسید چرب غیر اشباع می‌باشد که نوروزنرژن توسط سلول‌های NSC (Neural stem/progenitor cells) را تسهیل می‌کند (۲۰). همچنین مشاهده شده است که ژل رویال اکسیژن رسانی به بافت مغز را افزایش می‌دهد؛ این افزایش اکسیژن رسانی در افراد مسنی که مبتلا به برخی از اختلالات مغزی ناشی از پیری عروق و کاهش اکسیژن رسانی به مغز هستند، مفید می‌باشد (۹).

نتیجه گیری

با توجه به این که تا کتون درمان قطعی برای بیماری آلزایمر شناخته نشده است و درمان‌های موجود فقط می‌تواند سرعت پیشرفت بیماری را کم و یا بعضی از

5. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(6): 288-93.
6. Narita Y, Ohta S, Suzuki KM, Nemoto T, Abe K, Mishima S. Effects of long-term administration of royal jelly on pituitary weight and gene expression in middle-aged female rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73(2): 431-3.
7. Barker SA, Foster AB, Lamb DC, Hodgson N. Identification of 10-hydroxy-delta 2-decenoic acid in royal jelly. *Nature* 1959; 183(4666): 996-7.
8. Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. Royal jelly-induced neurite outgrowth from rat pheochromocytoma PC12 cells requires integrin signal independent of activation of extracellular signal-regulated kinases. *Biomed Res* 2007; 28(3): 139-46.
9. Hashimoto M, Kanda M, Ikeno K, Hayashi Y, Nakamura T, Ogawa Y, et al. Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69(4): 800-5.
10. Donadieu Y. *Royal Jelly in Natural Therapeutics*. 6th ed. Paris: Rue de l'Ecole de Medecine; 1983.
11. Hattori N, Nomoto H, Mishima S, Inagaki S, Goto M, Sako M, et al. Identification of AMP N1-oxide in royal jelly as a component neurotrophic toward cultured rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70(4): 897-906.
12. Zamami Y, Takatori S, Goda M, Koyama T, Iwatani Y, Jin X, et al. Royal jelly ameliorates insulin resistance in fructose-drinking rats. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(11): 2103-7.
13. Nagai T, Inoue R, Suzuki N, Nagashima T. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. *J Med Food* 2006; 9(3): 363-7.
14. Narita Y, Nomura J, Ohta S, Inoh Y, Suzuki KM, Araki Y, et al. Royal jelly stimulates bone formation: physiologic and nutrigenomic studies with mice and cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70(10): 2508-14.
15. Hattori N, Ohta S, Sakamoto T, Mishima S, Furukawa S. Royal Jelly Facilitates Restoration of the Cognitive Ability in Trimethyltin-Intoxicated Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009. [online].
16. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. Maryland: Academic Press; 1998.
17. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem* 2007; 101(3): 757-70.
18. Kaur B, Singh N, Jaggi AS. Exploring mechanism of pioglitazone-induced memory restorative effect in experimental dementia. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; 23(5): 557-66.
19. Rattray M. Is there nicotinic modulation of nerve growth factor? Implications for cholinergic therapies in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2001; 49(3): 185-93.
20. Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. *Biomed Res* 2007; 28(5): 261-6.

Effect of Royal Jelly (RJ) on Learning and Memory in Rats after Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin (icv-STZ)

Zohre Zamani¹, Parham Reisi PhD², Hojjatallah Alaei PhD³,
Ali Asghar Pilehvarian PhD⁴, Zahra Zamani⁵

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neuropsychiatric disorder of the brain. It is the leading cause of senile dementia, characterized by neuronal degeneration and cognitive deteriorations, especially in the elderly. Intracerebroventricular streptozotocin (ICV-STZ) injection in rats' brain provides a relevant model to sporadic dementia of Alzheimer type. Royal Jelly is a viscous substance produced by the young worker honey bees of the species, *Apis mellifera*. Earlier studies showed that RJ induces neurogenesis and neuronal differentiation. There are no reports so far showing if RJ has good effects on Alzheimer disease; thus in this study, we examined effect of RJ on learning and memory in rats after intracerebroventricular injection of streptozotocin.

Methods: Forty eight male Wistar rats, each weighing 300-350 g, were used in the present study. The animals were divided in to four equal groups: sham, sham-royal jelly, streptozotocin, and streptozotocin-royal jelly. STZ and STZ-RJ groups received a bilateral ICV injection of STZ (1.5 mg/kg). Two other groups underwent the same surgical procedures, but same volume of saline was injected instead of STZ. Groups of sham-RJ and STZ-RJ was feed RJ-food (3% w/w) (lyophilized royal jelly mixed with powdered regular food) for a period of 10 days and groups of sham and streptozotocin was feed regular rats food in the same time. Learning and memory was analyzed by Morris water maze test and passive avoidance learning test.

Finding: The results comes from passive avoidance learning test showed that learning and memory indices were significantly impaired in streptozotocin group respect to sham group, but there was not any significant difference between sham and streptozotocin-royal jelly groups. Although royal jelly improved learning and memory indices in sham-RJ group, but these changes were not significant.

Conclusion: Intracerebroventricular injection of streptozotocin (icv-STZ) was determined to cause adverse effects on learning and memory in rat. The administration of royal jelly to these animals alleviated the adverse effects of streptozotocin. The results of this research suggest that Royal Jelly may have good effect on prevent and attenuation of Alzheimer's disease.

Keywords: Royal jelly, Streptozotocin (STZ), Learning and memory, Alzheimer's disease.

¹ Student of Animal Biology, Department of Basic Sciences, Payam-e Noor University, Isfahan, Iran.

² Assistant Professor, Department of Physiology, School of Medicine and Applied Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

³ Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁴ Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Payam-e Noor University, Isfahan, Iran.

⁵ Student of Nursing, School of Nursing and Midwifery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Parham Reisi PhD, Email: p_reisi@med.mui.ac.ir