

بکارگیری روشی نوین در درمان آلزایمر القاء شده توسط استرپتوزوتوسین در رت های نر نژاد ویستار همراه با کاهش عوارض هماتوکریت

شهربانوعریان^۱، محمد نبیونی^۲، مسعود باقرپور زارچی^{۳*}، مرتضی نظری سرنجه^۴، علی باقرپور زارچی^۴، کیانا شاهزمانی^۵

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

۲- دانشیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۴- دانشجوی دکترای تخصصی ار تپدی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۵- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره هفدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۴ / مسلسل ۶۴

چکیده

دریافت مقاله: ۹۴/۱/۳۰ پذیرش مقاله: ۹۴/۳/۱۷

*** مقدمه:** بیماری آلزایمر یک بیماری شایع نورودژنراتیو پیش رونده ای است که منجر به زوال عقل و نابودی سلول های مغزی به ویژه در ناحیه هیپوکامپ می شود. به تازگی مشخص شده اریتروپویتین با عمل حفاظت عصبی خود باعث بهبود در عملکردهای شناختی در طول این بیماری می گردد. هدف این مطالعه یافتن روشی جایگزین نسبت به روش مرسوم تزریق صفاقی برای تحویل اریتروپویتین به مغز توسط دور زدن سد خونی مغزی است.

*** مواد و روش ها:** جهت ایجاد مدل آلزایمری در رت ها، استرپتوزوتوسین در بطن های طرفی مغزی تزریق گردید. ۲ هفته پس از القاء آلزایمر داروی اریتروپویتین با دوز های متفاوت به صورت سیستم نامگنایی جهت درمان آلزایمر همراه با کاهش عوارض جانبی این دارو تزریق گردید. بعد از دوره درمان همه رت ها تحت مطالعه رفتاری آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال توسط دستگاه شاتل باکس و سنجش هماتوکریت خون قرار گرفتند.

*** یافته ها:** هرچند اریتروپویتین تأثیر معنی داری بر بهبود فرآیند های یادگیری و حافظه در هر دو گروه کنترل و شم نداشت ولی باعث ایجاد تفاوت معنی داری در بهبود این بیماری نسبت به گروه STZ (استرپتوزوتوسین) شد که این درمان با کاهش هماتوکریت نسبت به گروه دوز ۵۰۰۰ U/Kg همراه شد.

*** بحث و نتیجه گیری:** این نتایج پیشنهاد داد که تزریق STZ در بطن های جانبی مغز موجب آسیب شدید در حافظه و یادگیری مشابه بیماری آلزایمر می شود ولی اریتروپویتین از این آسیب همراه با کاهش در هماتوکریت جلوگیری می کند.

*** واژه های کلیدی:** آلزایمر، اریتروپویتین، استرپتوزوتوسین، هماتوکریت.

*آدرس مکاتبه نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری

پست الکترونیک: masood_bagherpoor@yahoo.com

مقدمه

بیماری های مختلفی در انسان موجب آسیب پیشرونده در حافظه و یادگیری می شوند که یکی از این اختلالات، بیماری آلزایمر است (۱). این بیماری در میان دیگر بیماری های تحلیل برنده مغز بیشترین سهم را دارد (۲).

علت تخریب نورونی در بیماری آلزایمر، هنوز مشخص نیست. از مشخصات بارز این بیماری، تشکیل پلاک های آمیلوئیدی در خارج نورون های برخی مناطق مغز (۳،۴) و ایجاد کلافه های نوروفیبریلاری در داخل جسم سلولی نورون ها می باشد. کلافه های نوروفیبریلاری از پروتئین های Tau به شدت فسفریله و میکروتوبول های تکه تکه شده تشکیل می شوند (۵).

در این بیماری نورون های کولینرژیک و نورون های دیگر در قشر مغز از بین می روند. به ویژه نورون های کولینرژیک در آلزایمر آسیب می بینند، زیرا آن ها برای سنتز ناقل عصبی استیل کولین و فسفاتیدیل کولین غشاء به کولین نیاز دارند. نورون های کولینرژیک در بیماران مبتلا به آلزایمر، کمبود کولین آزاد برای سنتز استیل کولین را از طریق کاهش فسفاتیدیل کولین غشاء جبران می کنند. در طی روند ایجاد آلزایمر نورون های کولینرژیک با کاهش تولید استیل کولین همراه می شوند (۵).

بیماری آلزایمر بیماری پیش رونده ای است که با از بین بردن نورون ها باعث ایجاد اختلال شناختی می شود و تاکنون درمان مؤثری برای آن یافت نشده است. با این وجود تحقیقات نشان داده است که با استفاده از داروهایی از جمله اریتروپویتین می توان از مرگ سلولی نورون ها در سیستم عصبی مرکزی جلوگیری کرد و یا با احیای دوباره نورون ها میزان آسیب و در نهایت آلزایمر پیش رونده را متوقف و حتی بهبود داد (۶).

اریتروپویتین (EPO) ابتدا به عنوان یک داروی مؤثر در درمان آنمی شناخته شد ولی بعدها به عنوان یک محافظ عصبی قوی که می تواند بقای سلول ها را در انواع مختلفی از مدل های

آسیب در سیستم عصبی را بالا ببرد نیز شناخته شد. نشان داده شده است که کاربرد سیستمیک EPO می تواند پیامد های عملکردی مضر بعد از آسیب های مغزی را بهبود ببخشد و باعث کاهش از دست دادن سلول ها طی صدمه به نخاع، ادم مغزی تروماتیک، ترومای قشر مغز و فعالیت های صرع شود (۶).

یکی از مکانیسم های اساسی حفاظت عصبی EPO، مهار آپوپتوز و تسریع نوروزنز بوده و مکانیسم های دیگر القا حفاظت عصبی شامل اثرات ضد التهاب، ضد اکسیدان، رگ سازی و ضد صرع می باشد (۷).

نکته قابل توجه در استفاده از EPO وجود سد خونی مغزی (BBB) است که از عبور پروتئین های بزرگ از جمله EPO به سیستم عصبی مرکزی ممانعت می کند. شواهد نشان می دهد که این سد در برابر تحویل سیستمیک EPO (با وزن مولکولی ۳۴ کیلودالتون) به سیستم عصبی مرکزی یک اختلال قابل توجه بوده و می تواند در ارائه درمان با اریتروپویتین مورد استفاده قرار بگیرد. در ضمن این نکته نیز قابل ذکر می باشد که EPO نیمه عمر کوتاهی در حدود ۴ تا ۶ ساعت دارد (۸-۱۰).

با این شرایط تحویل این دارو به مغز به صورت تزریق وریدی چالش برانگیز بوده، چرا که تحویل سیستمیک آن نیاز به دوزهای بالا برای دستیابی به انتشار از طریق سد خونی مغزی داشته و اغلب منجر به سمیت سیستمیک می شود. قابل ذکر است خطر عوارض جانبی وابسته به دوز در استفاده از EPO به خصوص در گروه های در معرض خطر از جمله سندرم پلی هایپیر ویسکوزیته، فشار خون بالا، رتینوپاتی، ترومبوز عروق و سرطان می تواند به طور مؤثری اختلال آفرین باشد (۱۱-۱۳).

در نتیجه تزریق صفاقی و وریدی یک ضعف اساسی می باشد و باعث می گردد تا از دوزهای بسیار بالاتری نسبت به دوز درمانی آنمی جهت تحویل مؤثر این دارو به سیستم عصبی مرکزی استفاده گردد. این دوز بالا باعث مسمومیت سیستمیک و

EPO (500 U/Kg) تزریق شده در سیستم نامگنا (گروه ۷- گروه STZ-EPO (5000 U/Kg) تزریق شده در صفاق).

پس از بیهوش شدن رت‌ها توسط تزریق داخل صفاقی کلرات هیدرات با دوز 400 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، سر حیوان در دستگاه استریوتاکسیک جراحی مغز ثابت شده و با ایجاد شکاف طولی در بخش خلفی سر، جمجمه نمایان گردید. بعد از مشخص کردن مختصات استریوتاکسی برای بطن‌های جانبی مغز بر اساس مطالعه پایلوت (موقعیت جلویی- عقبی mm 8/0-، جانبی mm 6/1 ± و پشتی-شکمی mm 2/4) با کمک دریل دو سوراخ در جمجمه ایجاد کرده و STZ (Streptozotocin, zigma) با دوز 3 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را به وسیله سرنگ هاملتون در هر بطن تزریق گردید (14). جهت آماده کردن محلول STZ، 3 میلی گرم از این ماده را با ترازو وزن کرده و با 80 میلی لیتر نرمال سالین تزریقی مخلوط می کنیم (همه مراحل روی یخ خشک انجام گردید). گروه شم نیز به همین روش تحت جراحی قرار گرفته ولی به جای STZ حجم مساوی از سالین دریافت کرد.

رت های آلزایمری شده به صورت روزانه و به مدت 3 روز دوزهای متفاوتی از EPO (Pooyesh Darou IRAN) را دریافت کردند. همچنین گروه کنترل موش های سالمی بودند که عمل جراحی بر روی آن ها انجام نشد. پس از آن همه رت ها تحت مطالعه رفتاری آزمون یادگیری اجتنابی غیر فعال و سنجش همتوکریت قرار گرفتند.

مطالعه رفتاری: دستگاه یادگیری اجتنابی غیرفعال (شاتل باکس) شامل دو بخش تاریکی و روشن است که توسط یک درب از هم جدا می شوند. یادگیری به این صورت انجام می گیرد که رت در حالی که پشت به سمت درب بود در اتاق روشن قرار گرفت و 60 ثانیه بعد درب بالا کشیده شد. پس از ورود رت به

افزایش تولید گلوبول های قرمز و پلاکت‌ها و در نتیجه افزایش همتوکریت و فشار خون می گردد. افزایش فشار خون یکی از عوارض جانبی استفاده از دوزهای بالا این دارو است که احتمال بروز ایجاد سکنه های مغزی و قلبی و دیگر عوارض مربوط به فشار خون را بالا می برد. در بیماران مبتلا به آلزایمر با توجه به سن بالایی که دارند این افزایش فشار خون می تواند یک عامل کشنده بالقوه باشد. در نتیجه EPO مانند یک شمشیر دو لبه ای می باشد که در استفاده از این دارو باید یک سری عوامل را در نظر گرفت (11-13).

در این تحقیق از یک روش جایگزین برای تزریق دارو استفاده گردید تا با حذف سد خونی مغزی امکان استفاده از دوز های پایین تر فراهم گردد. راه جایگزین برای تزریق صفاقی، تزریق در ناحیه سیستم نامگنا مورد توجه قرار گرفت و با توجه به اینکه مایع مغزی نخاعی در سیستم نامگنا نیز به چرخش در می آید، گزینه مناسبی برای تزریق خواهد بود.

در نتیجه با ارائه یک راه جایگزین تزریق، بر آن آمدم تا اثرات مطلوب درمانی، همراه با اثرات نامطلوب جانبی استفاده از این دارو را به صورت مقایسه ای با تزریق صفاقی که تزریق رایج در درمان آسیب های مغزی است مورد مقایسه و بحث قرار دهیم

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش رت های نر از نژاد ویستار با وزن تقریبی 220 گرم بوده و در شرایط سیکل تاریکی و روشنی به صورت 12 ساعته و بدون هیچ محدودیت غذایی نگهداری شدند. سپس رت ها به طور تصادفی به 7 گروه 5 تایی تقسیم گردیدند. 1- گروه کنترل 2- گروه شم (رت های جراحی شده بدون القاء آلزایمر) 3- گروه STZ (رت های جراحی شده همراه با تزریق STZ بدون تیمار با دارو) 4- گروه STZ-EPO (50 U/Kg) تزریق شده در سیستم نامگنا) 5- گروه STZ-EPO (100 U/Kg) تزریق شده در سیستم نامگنا) 6- گروه STZ-

برای انجام مقایسه بین دوز های مختلف درمانی و تعیین بهترین دوز با کمترین عوارض در افزایش هماتوکریت، اثر دوز های مختلف EPO تزریق شده در ناحیه سیسترنامگنا بر روی هماتوکریت خون را نسبت به دوز 5000 U/Kg که به صورت صفاقی تزریق شده در روز ۴ پس از اولین تزریق دارو اندازه گیری و مورد مقایسه قرار گرفتند.

برای آنالیز نتایج مربوطه از آزمون‌های غیرپارامتریک Mann Whitney و Kruskal-Wallis استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داده شده در نمودار ۱ نشان می دهد، هر چند زمان ورود به اتاق تاریکی در رت‌های گروه STZ هنوز نسبت به گروه شم به شدت کم تر بوده ولی زمان ورود به اتاق تاریکی در گروه STZ دریافت کننده دوزهای 50 U/Kg و 100 U/Kg به طور چشمگیری افزایش یافت که تفاوت قابل توجهی با گروه شم نداشت و میان گروه‌های STZ و گروه‌های STZ-EPO با دوز 50 U/Kg و 100 U/Kg تفاوت معنی دار وجود داشت. دوز 500 U/Kg به دلیل مسمومیت دوزی تفاوت معنی داری با گروه STZ نداشت و حتی نشان دهنده آثار نامطلوب مسمومیت دوزی دارو همراه با کاهش بیشتر حافظه نسبت به گروه STZ است. با این وجود تفاوت معنی داری میان گروه های شم و EPO مشاهده نگردید. همچنین گروه های STZ-EPO با دوز 50 U/Kg و 100 U/Kg تفاوت معنی داری با دوز درمانی 5000 U/Kg که به صورت صفاقی تزریق شده بود نداشتند. این نتایج نشان دهنده این است که دوزهای 50 U/Kg و 100 U/Kg دارای اثرات مطلوب درمانی می باشند و حتی اثرات درمانی مطلوب تری نسبت به دوز 5000 U/Kg صفاقی داشته اند.

اتاق تاریک در بسته شد و شوک الکتریکی (75 ولت ، $2/0$ میلی آمپر و 50 هرتز) به مدت 5 ثانیه به کف پای موش اعمال گردید. جهت ارزیابی حافظه و یادگیری، 24 ساعت پس از دریافت شوک الکتریکی رت ها دوباره در داخل اتاق روشن قرار داده شدند و تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک در مدت 300 ثانیه و بدون ایجاد شوک ثبت گردید.

اندازه‌گیری هماتوکریت: با توجه به اینکه EPO

هماتوکریت خون را بالا می برد و این افزایش به عنوان یک عارضه جانبی در مصرف این دارو شناخته شده است، در این تحقیق بر آن آمدمیم تا این عارضه را کاهش و یا حتی حذف کنیم. با توجه به این هدف هماتوکریت را به عنوان یک تست مقایسه ای بین گروه ها قرار دادیم تا بتوانیم در کنار روند بهبود روند عوارض جانبی را نیز مورد مقایسه قرار بدهیم.

هماتوکریت یا HCT روشی برای تخمین مقدار گلبول

های قرمز خونی است. برای انجام این کار ابتدا بایستی لانست را در ناحیه وریدی دم موش فرو کرده که خون جریان پیدا کند. قطره اول خون را حذف کرده و سپس لوله مویین هپارینه را در جریان خون گذاشته به طوری که دو سوم لوله از خون پر شود. سپس طرف دیگر لوله را با انگشت مسدود کرده تا خون خارج نشود. در ادامه نوک لوله مویینه را با چند بار فرو بردن در داخل خمیر مخصوص مسدود می کنیم. سپس لوله را در داخل دستگاه سانتیفریوژ قرار داده و دستگاه را روشن کرده که 5 دقیقه کار کند به گونه ایی که سرعت دستگاه 12000 دور در دقیقه باشد. حال خون داخل لوله 3 قسمت دارد: 1 - لایه گویچه قرمز متراکم 2 - لایه سفید شامل گویچه سفید و پلاکت 3 - لایه پلاسمای خون. سپس لوله را روی خط کش قرار داده به گونه ایی که فصل مشترک بین خمیر و خون روی عدد صفر و آخرین سطح پلاسمای روی عدد 100 قرار گیرد، حال عددی که طول ستون گویچه های قرمز را نشان می دهد هماتوکریت می باشد.

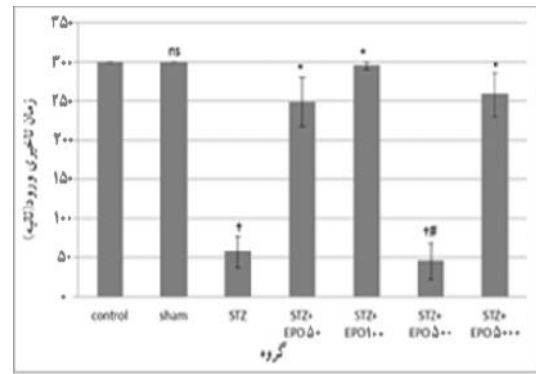
بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کاربرد EPO می تواند به صورت معنی داری آسیب های ایجاد شده در حافظه و یادگیری را که به وسیله تزریق داخل بطنی مغزی STZ القاء می شود را بهبود ببخشد. همچنین با تغییر در نحوه تزریق EPO، می توان عوارض جانبی و مسمومیت سیستمیک این دارو را کاهش داد ولی همان آثار مطلوب درمانی را به دست آورد.

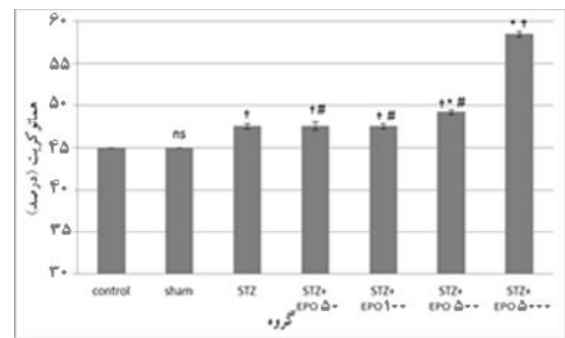
به علاوه در این تحقیق مشاهده گردید که هر چند کاربرد اریتروپویتین بر روند حافظه و یادگیری در رت های گروه های کنترل و شم تأثیری نداشت ولی بر روی رت های گروه های القاء شده آلزایمر توسط STZ که در روندهای بازیابی اطلاعات دچار اختلال شده بودند موجب بهبود چشمگیری گردید.

مطالعات نشان داده اند که EPO با اثر مستقیم بر افزایش گیرنده هایش و کاهش رهایی وزیکول های گلوتامات و اثر غیر مستقیم بر افزایش تولید گلوتامیون پراکسیداز از آستروسیت ها سبب بهبود آسیب نورونی ایجاد شده از گلوتامات می گردد (۱۵). یکی از مواردی که سبب آسیب در یادگیری در اثر تزریق داخل بطنی STZ می شود مرگ نورنی است که نتایج ما نیز نشان داد که با تزریق STZ به صورت داخل بطنی موش ها دچار اختلالات حافظه ای می شوند.

اگرچه به نظر می رسد اریتروپویتین تأثیرات درمانی بر اختلالات شناختی آلزایمر دارد ولی مکانیسم های اصلی به خوبی شناخته نشده اند. یک توضیح احتمالی آن است که EPO از آپوپتوز نورونی که در بیماری های انسانی آلزایمر ایجاد می شود جلوگیری می کند و از طریق افزایش پیشبرد آبشارهای پیام دهی مؤثر در بقای سلولی، بیان ژنهای پروتئین های آنتی آپوپتوتیک و نورونز در هیپوکامپ باعث بهبود



نمودار ۱. نمودار مدت زمان تأخیر در گروه های مختلف. همانطور که از نمودار پیدا است رت های آلزایمری تیمار شده با دوز ۱۰۰ U/Kg در مقایسه با دوز ۵۰۰۰ U/Kg رایج در درمان به صورت صفاقی، آثار بهبود یکسانی داشتند. ns عدم تفاوت معنادار با گروه کنترل، † تفاوت معنادار با گروه شم ($p < 0.01/0$)، * تفاوت معنادار با گروه STZ+EPO ۵۰۰۰ U/Kg ($P < 0.01/0$).
نمودار ۲ تفاوت معنی دار و مطلوبی را در درصد هماتوکریت بین گروه های ۵۰ و ۱۰۰ U/Kg در مقایسه با گروه ۵۰۰۰ U/Kg صفاقی را نشان می دهد. این نتایج همراه با نتایج بدست آمده از نمودار ۱ بیان می کند دوز های ۵۰ و ۱۰۰ U/Kg مانند دوز ۵۰۰۰ U/Kg اثرات درمانی مطلوبی دارند ولی این اثرات درمانی با حذف هماتوکریت بالا نسبت به گروه ۵۰۰۰ U/Kg صفاقی همراه گردیده است.



نمودار ۲. نمودار مربوط به درصد هماتوکریت گروه های مختلف پس از گذشت ۴ روز از تیمار با دارو است. مطابق نمودار دوز درمانی ۱۰۰ U/Kg نسبت به دوز ۵۰۰۰ U/Kg صفاقی با درصد هماتوکریت پایین تری همراه بوده است و اثر جانبی نامطلوب هماتوکریت با تغییر روش تزریق حذف گردید. ns عدم تفاوت معنادار با گروه کنترل، † تفاوت معنادار با گروه شم ($p < 0.01/0$)، * تفاوت معنادار با گروه STZ+EPO ۵۰۰۰ U/Kg ($P < 0.01/0$).
تفاوت معنادار با گروه STZ+EPO ۵۰۰۰ U/Kg ($P < 0.01/0$).

سیسترنامگنا انجام گرفت توانستیم با استفاده از دوز های پایین تر EPO آثار مطلوب درمانی را به دست آوریم.

همچنین تحقیقات ویلی و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که اریتروپویتین مانند یک شمشیر دو لبه می باشد که علاوه بر آثار بهبودی در درمان بیماری های آسیب مغزی دارای اثرات سوء قابل توجهی هم هست (۱۱) که ما نیز در این تحقیق شاهد اثرات سوء استفاده از این دارو بودیم و توانستیم با تغییر در نحوه تزریق یکی از عوارض جانبی این دارو یعنی هماتوکریت بالا را حذف کنیم.

به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد EPO می تواند تا حدودی در بهبود آسیب های STZ مؤثر باشد. بنابراین ممکن است این دارو از نظر کلینیکی در درمان بیماری آلزایمر و یا پیشگیری از ابتلا به این بیماری سودمند باشد. البته در درمان کلینیکی باید عوارض جانبی وابسته به دوز این دارو نیز در نظر گرفته شود که می توان مانند تحقیق پیش رو با تغییر در نحوه تزریق جهت کاهش دوز مصرفی، این اثرات سوء را حذف کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از خانم دکتر شهربانو عریان، مدیریت محترم دانشکده علوم زیستی و آقای دکتر محمد نبیونی، مدیریت محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه خوارزمی تقدیر و تشکر می گردد.

آسیب های مغزی از جمله آلزایمر شده است (۱۵). اصلاح ژن های خانواده Bcl-2 یکی از مهمترین مکانیسم های بررسی شده در خواص ضد آپوپتوز EPO است. EPO به طور مداوم بیان ژن ضد آپوپتوز Bcl-x را افزایش می دهد و بیان ژن پیش مرگ Bax را کاهش می دهد. Bax یک مولکول پیش آپوپتوز است که اغلب یک نقش تنظیم کننده در مرگ سلولی در CNS به دنبال هیپوکسی-ایسکمیک در نوزادان بازی می کند. EPO به طور قابل توجهی از القاء هیپوکسی-ایسکمیک Bax و تنظیم مثبت mRNA DP5 در بافت مغز جلوگیری می کند (۱۵).

EPO همچنین با بیان ژن BDNF (فاکتور نوروتروفین مغزی) و فاکتور رشد شبه انسولین ۱، برخی نوروفیلان ها و پروتئین هایی که به طور اختصاصی در نوروها بیان می شوند را در هیپوکامپ مغز موش ها تسهیل می کند (۱۶).

با توجه به تحقیقات انجام شده توسط رئیسی و همکاران در سال ۱۳۹۰ و تحقیق پیش رو در درمان آلزایمر، نشان داده شده است که EPO می تواند قدرت یادگیری فضایی و عملکرد حافظه در آلزایمر را بالا ببرد و حفظ کند (۱۷). ولی در تحقیقات رئیسی و همکاران اثرات سوء مصرف این دارو را از جمله افزایش هماتوکریت و فشار خون در نظر گرفته نشده است و با توجه به اینکه تزریق به صورت صفاقی صورت گرفته است مجبور به استفاده از دوز های بالا مانند دوز U/Kg ۵۰۰۰ بوده اند. همانطور که ذکر شد دوز U/Kg ۵۰۰۰ بالایی نسبت به دوز درمانی بیماری های آنمیک است (دوز ۵۰) و این دوز بالا باعث افزایش هماتوکریت می گردد. ولی در این تحقیق با تغییر در نحوه تزریق که به صورت تزریق در

References

- Ott A, Slooter AJ, Hofman A, van Harskamp F, Witteman JC, Van Broeckhoven C, et al. Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*.1998;351:1840-1843.
- Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am J Epidemiol*.1997; 145(1):33-41.
- Grace EA, Rabiner CA, Busciglio J. Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid beta: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2002;114(1):265-273.
- Bothwell M, Giniger E. Alzheimer's disease: neurodevelopment converges with neurodegeneration. *Cell*. 2000;102(3):271-273.
- Herring A, Ambree O, Tomm M, Habermann H, Sachser N, Paulus W, et al. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Experimental Neurology*. 2009;216(1):184-192.
- Sermin G, Tolga F, Kursad G. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Research*.2004;1000(1-2):19-31.
- Abdullah K, Funda T, Meryem GO, Nuray D, Hasan O. Erythropoietin in neonatal brain protection: The past, the present and the future. *Brain & Development*.2011;33(8):632-643.
- William A, Nelson L, Catherine L, Michael L, Anne C. Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. *European Journal of Pharmacology*.2004;505(1-3):93-101.
- Pilar M, Ivona B, Harry W, Christoph S. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Progress in Neurobiology*.2009;87(4):212-251.
- Gu'lay U, Sarper D, Nearin B, Ziya Z. Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures. *Life Sciences*.2006;78(22):2571-2576.
- Velly L, Pellegrini L, Guillet B, Bruder N, Pisano P. Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: A double-edged sword. *Pharmacology & Therapeutics*.2010;128(3):445-459.
- Kenneth M, Zhao Z C, Chen Shang Y. Raves and risks for erythropoietin. *Cytokine & Growth Factor Reviews*.2008;19(2):145-155.
- Dezhi Mu, Tao X, Yi Qu. Erythropoietin for neonatal brain injury: opportunity and challenge. *Int. J. Devl Neuroscience*.2011;29(6):583-591.
- 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. *Behavioural Brain Research*.2006;171(1):9-16.
- Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Villa P, Ghezzi P, Garau A, et al. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem*.2005;93(2):412-421.

16. Michael A, Floris G, Annemieke K, Cobi J, Frank van B. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Research Reviews*.2008;59(1):22-33.
17. 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 Disease. *Journal of Isfahan Medical School*.2011;159:1648-1656.(In Persian)