

افزایش سطح سرمی آلباین اندوژن در مدل آلزایمر القایی توسط تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین

مریم زحمتکش (PhD)*، سهیلا حسین زاده (PhD)^۲، مرتضی کریمیان (PhD)^۲، غلامرضا حسن زاده (PhD)^۴

۱- گروه علوم اعصاب و مطالعات اعتیاد، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: ۹۴/۶/۹، اصلاح: ۹۴/۷/۶، پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: سطح سرمی فاکتورهای شبیه دیژیتال یا مهار کننده های پمپ سدیم، در بسیاری از شرایط پاتولوژیک افزایش می یابد. کاهش فعالیت پمپ سدیم به واسطه اولیگومرهای آمیلوئید بتا قبلاً گزارش شده اما مکانیسم دقیق آن مشخص نیست. لذا این مطالعه به منظور بررسی تغییرات سطح آلباین اندوژن سرم و سدیم CSF در مدل حیوانی آلزایمر القایی با تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین طراحی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر رت نر به طور تصادفی به گروه های سالین و استرپتوزوسین ۲، ۷ و ۱۴ روز تقسیم شدند. مدل آلزایمر با تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین به میزان ۳ mg/kg در روزهای اول و سوم القاء شد. نمونه CSF از فضای Cisterna magna و نمونه خون از ورید دمی گرفته شد و تغییرات سطح آلباین سرم و سدیم CSF در گروه های آزمایشی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی مورفولوژی نورونها و حضور پلاک های آمیلوئید به ترتیب از رنگ آمیزی کرزیل ویوله و قرمز کونگو استفاده شد.

یافته ها: سطح سرمی آلباین در گروههایی که استرپتوزوسین دریافت کردند در روز ۲ (0.2 ± 0.05) در برابر 0.4 ± 0.04 نانوگرم بر میلی لیتر، روز ۷ (0.3 ± 0.02) در برابر 0.6 ± 0.06 نانوگرم بر میلی لیتر و روز ۱۴ (0.2 ± 0.07) در برابر 0.6 ± 0.08 نانوگرم بر میلی لیتر پس از تزریق استرپتوزوسین، بطور معنی داری نسبت به گروه های سالین افزایش نشان داد ($p < 0.05$). همچنین افزایش سدیم CSF در گروه استرپتوزوسین ۲ روز نسبت به گروه های سالین معنی دار بود 142.6 ± 2.9 در برابر 150.6 ± 3.2 ($p < 0.05$). با این وجود در گروه های استرپتوزوسین ۷ و ۱۴ روز علیرغم یک روند افزایشی، تفاوت معنی داری دیده نشد.

نتیجه گیری: در این مطالعه افزایش سطح آلباین اندوژن سرم نشانه ای از تغییرات پاتولوژیک زودهنگام در فعالیت پمپ سدیم است و به عنوان هدف درمانی بالقوه پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: آلزایمر، آلباین، استرپتوزوسین.

مقدمه

می تواند شدت بیماری و خطر مرگ و میر بعد از جراحی را مشخص نماید (۵). تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین سبب تخریب پیشرونده یادگیری، حافظه و متابولیسم گلوکز مغزی می شود و از آن به عنوان یک مدل حیوانی مناسب در القای بیماری آلزایمر نوع اسپورادیک استفاده می شود (۶). از آنجاییکه تغییرات مولکولی در محیط خارج سلولی و میان بافتی مغز در Cerebrospinal fluid (CSF) منعکس می گردد، در صورت کاهش فعالیت پمپ، احتمال تغییر سدیم CSF وجود دارد. افزایش سدیم CSF مسیر نوروماژولیتوری را فعال می کند که با تولید موضعی آلدوسترون و تأثیر بر کانال های سدیمی اپی تلیال سبب آزاد شدن آلباین می گردد (۷). بنابراین علاوه بر اندازه گیری آلباین سرم، غلظت سدیم CSF نیز در این مطالعه بررسی شد. نظر به اینکه داروهای شبیه دیژیتال و آلباین اندوژن پمپ سدیم را مهار می کنند (۸و۹) و تاکنون تغییرات لیگاند اندوژن

در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر شواهدی از کاهش فعالیت پمپ سدیم وجود دارد (۱). غلظت آمیلوئید بتا در حد نانومولار سبب کاهش فعالیت پمپ سدیم در اسلایس های هیپوکامپ می گردد که این اثر احتمالاً از طریق مسیر سیگنالینگ صورت می پذیرد و یکپارچگی غشاء برای ایجاد آن ضروری است. مهار فعالیت پمپ در حضور آمیلوئید بتا می تواند آغاز کننده وقایعی باشد که سلول را بسوی مرگ می برد (۲). اولین بار Fishman در سال ۱۹۷۹ ترکیباتی شبیه آلباین را در مغز شناسایی نمود (۳). از آن زمان تاکنون مطالعات متعددی به بررسی انواع داروهای شبیه دیژیتال و نقش آنها پرداخته اند. در سال ۲۰۱۵ مقالات مروری متعددی به ویژگی و اهمیت پایش این ترکیبات در شرایط پاتولوژیک مختلف اشاره نموده و آنها را به عنوان بیومارکر مطرح نموده اند (۴). در Simonini و همکاران نشان دادند که سطح پلاسمایی آلباین اندوژن قبل و بعد از عمل جراحی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۸۹-۰۱-۸۷-۱۰۳۷۷ دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر مریم زحمتکش

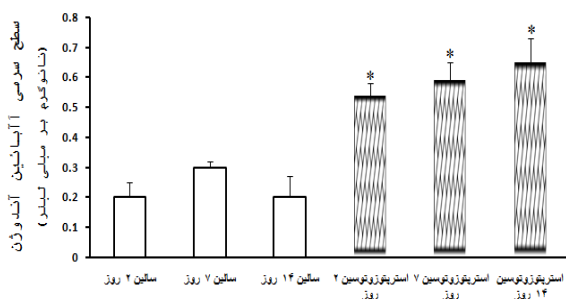
آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، گروه علوم اعصاب و مطالعات اعتیاد. تلفن: ۰۲۱-۴۳۰۵۲۱۵۵

E-mail: zahmatkm@tums.ac.ir

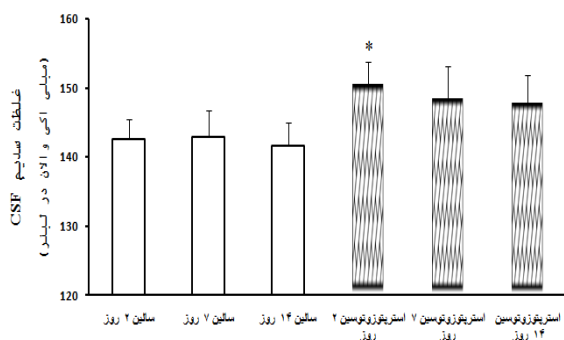
با استفاده از محلولهای استاندارد، غلظت آلباین بر حسب ng/ml سرم بدست آمد (۱۴). غلظت سدیم توسط اتونالایزر (B, analyzer asyLyte MedicaE) (USA, edford) مورد اندازه گیری قرار گرفت. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (OneWayANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفت و برای مقایسه اختلاف بین گروهها از تست توکی استفاده شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

سطح پلاسمایی گلوکز تفاوت معنی داری بین گروه ها نشان نداد. همچنین با وجود تغییرات وزن، کاهش آن در گروههای دریافت کننده استرپتوزوتوسین اختلاف معنی داری نشان نداد. سطح سرمی آلباین در گروههایی که استرپتوزوتوسین دریافت کردند در روز ۲ 0.2 ± 0.05 در برابر 0.24 ± 0.04 نانوگرم بر میلی لیتر، روز ۷ 0.3 ± 0.02 در برابر 0.59 ± 0.06 نانوگرم بر میلی لیتر و روز ۱۴ 0.2 ± 0.07 در برابر 0.65 ± 0.08 نانوگرم بر میلی لیتر) پس از تزریق استرپتوزوتوسین، بطور معنی داری نسبت به گروه های سالیین افزایش نشان داد (نمودار ۱، $p < 0.05$). اما روند این تغییرات طی دو هفته یکسان بود. میزان سدیم CSF، روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین، بطور معنی داری نسبت به گروه های سالیین $142/6 \pm 2/9$ در برابر $150/6 \pm 3/2$ میلی اکوی والان بر لیتر، $p < 0.05$ (نمودار ۲) افزایش نشان داده است. اما تغییر شاخص فوق ۷ روز $148/5 \pm 4/6$ میلی اکوی والان بر لیتر و ۱۴ روز $147/9 \pm 3/9$ میلی اکوی والان بر لیتر) پس از تزریق استرپتوزوتوسین با وجود یک روند افزایشی، نسبت به گروه های سالیین معنی دار نمی باشد (نمودار ۲).



نمودار ۱. تغییرات سطح سرمی آلباین اندوژن در گروههای مورد مطالعه
 $p < 0.05$ * در مقایسه با گروه های سالیین



نمودار ۲. تغییرات میزان سدیم CSF در گروههای مورد مطالعه
 $p < 0.05$ * در مقایسه با گروه های سالیین

پمپ سدیم در مدل آلزایمر بررسی نشده است، مطالعه حاضر به منظور بررسی سطح سرمی آلباین اندوژن در مدل بیماری آلزایمر القایی با تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین طراحی شد.

مواد و روش ها

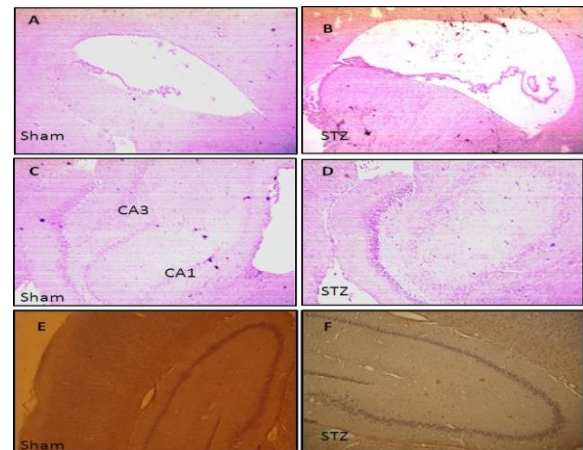
در این مطالعه بنیادی-کاربردی بازه زمانی سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۴۸ سر رت نر از نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند. اصول بیانیه هلسینکی سال ۲۰۰۸ و ضوابط اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. ابتدا رت ها با تزریق داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم (6 mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. پس از مشخص شدن پیوستگاه های برگما و لامبدا، کانول راهنما در مختصات فضایی بطن های طرفی که بر اساس اطلس Paxinos (۱۰) در یک رت ۲۹۰ گرمی؛ $-1/0$ میلیمتر نسبت به خط بین گوشها، $\pm 5/1$ میلیمتر نسبت به خط وسط جمجمه و 4 میلیمتر نسبت به سطح جمجمه تعیین گردید، قرار داده شد. بعد از جراحی استریوتاکسی و طی شدن روند بیهوشی، استرپتوزوتوسین به مقدار 3 mg/kg b.wt حل شده در سالیین به حجم 2 میکرولیتر در روزهای اول و سوم و در هر دو طرف داخل بطنهای مغزی تزریق شد. گروه های سالیین تحت جراحی استریوتاکسی قرار گرفته و سالیین به روش داخل بطنی تزریق شد. برای بررسی تأثیر تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین با دوز betogenicdia-Sub بر سطح پلاسمایی گلوکز، مقدار آن با روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و با استفاده از اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. ۲، ۷ و ۱۴ روز بعد از تزریق داخل بطنی سالیین / استرپتوزوتوسین در گروه های سالیین و استرپتوزوتوسین، نمونه CSF از فضای Cisterna magna (۱۱) و نمونه خون از ورید دمی گرفته شد. مغز رت ها بعد از پرفیوژن داخل قلبی سالیین و پارافرمالدئید ۴٪ (حاوی بافر فسفات ۱/۰ مولار، $\text{pH} = 7.4$) به سرعت خارج و در محلول پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. مقاطع کروئال با ضخامت 10 میکرومتر تهیه و ویژگی های مورفولوژیک نورونهای هیپوکامپ پس از رنگ آمیزی با کرزیل و یوله مورد بررسی قرار گرفت (۱۲). همچنین رنگ قرمز کونگو برای شناسایی آمیلوئید در هیپوکامپ به کار گرفته شد (۱۳). 5 میکرومول از محلول قرمز کونگو در بافر فسفات پتاسیم با $\text{pH} = 4.7$ تهیه گردید. پس از حذف پارافین، مقاطع 8 میکرومتری در محلول رنگ کونگو و اتانل $5/0$ ٪ به مدت 20 دقیقه در تاریکی قرار داده شده و پس از مواجهه با الکل مطلق و شستشو با آب به مدت یک دقیقه در محلول همتوکسیلین قرار گرفتند. برای اندازه گیری آلباین، سرم و محلول استاندارد آلباین در چاهک های میکروپلیت حاوی آنتی سرم آنتی آلباین خرگوش به مدت دو ساعت در دمای 37°C قرار داده شدند. پس از شستشو، آنتی بادی های آنتی آلباین متصل به آلباین-آللبومین و goat anti-peroxidase-rabbit IgG اضافه و به مدت یک ساعت دیگر انکوبه شد. حضور آنزیم پروکسیداز باقیمانده در هر چاهک با اضافه نمودن 200 میکرولیتر محلول سوبسترایتر میتیل بنزیدین به هر چاهک تعیین گردید و ضمن محافظت در مقابل نور، به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. واکنش با افزودن یک محلول اسیدی، پایان داده شد و میزان جذب در طول موج 450 نانومتر قرائت شد.

انتقال یونی و در مواردی سبب فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی متعددی می‌گردد. اثرات آنها در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک مانند هیپرتانسیون، هموستاز سدیم، تنظیم تون عروق و سرطان بررسی شده است (۱۷ و ۱۸). از سوی دیگر گزارشاتی از کاهش فعالیت پمپ سدیم در سلول‌های کورتیکال در محیط کشت و اسلایسهای هیپوکامپ در حضور آمیلوئید بتا وجود دارد (۲). مطالعه Bores و همکاران نشان داد که غلظت نانومولار آمیلوئید بتا سبب کاهش فعالیت پمپ سدیم در اسلایس های هیپوکامپ می‌گردد (۲). این اثر بصورت مستقیم صورت نمی‌گیرد بلکه یکپارچگی غشاء برای ایجاد اثرات آمیلوئید بتا بر پمپ ضروری می‌باشد، به همین دلیل احتمال می‌رود این اثر از طریق مسیر سیگنالینگ صورت پذیرد. همچنین مشاهده شده است که کاهش فعالیت پمپ به علت تخلیه ATP نمی‌باشد، چراکه کاهش فعالیت پمپ در حضور ATP همچنان وجود دارد. بنظر می‌رسد که مهار فعالیت پمپ در حضور آمیلوئید بتا آغاز کننده وقایع و اثراتی باشد که سلول را بسوی مرگ می‌برد (۲). دلیل عدم مشاهده تغییرات مربوط به آمیلوئید بتا در این مطالعه می‌تواند مدت کوتاه بررسی باشد. آمیلوئید بتا به واسطه تولید ROS می‌تواند به کاهش فعالیت پمپ بیانجامد (۱۹)، اما این احتمال وجود دارد که اثرات آمیلوئید بتا از طریق مهار کننده های اندوژن پمپ ایجاد شده باشد. با توجه به اینکه در این مدل، مقاومت به انسولین مغزی ایجاد می‌شود و از سوی دیگر انسولین یکی از عوامل مهم در تنظیم فعالیت پمپ سدیم می‌باشد. بنابراین می‌توان این احتمال را مطرح نمود که القای مدل با اختلال مسیر سیگنالینگ انسولین و تأثیر بر فعالیت پمپ سبب تحریک ارگانهای داخلی به تولید مهار کننده های اندوژن پمپ می‌شود (۲۰). از آنجایی که تغییرات مولکولی در محیط خارج سلولی و میان بافتی مغز در CSF منعکس می‌گردد، در صورت کاهش فعالیت پمپ، احتمال تغییر سدیم CSF بدلیل عدم تعادل یونی وجود دارد. اخیراً گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد افزایش سدیم CSF مسیر نوروماجولیتوری را فعال می‌کند که با تولید موضعی آلدوسترون و عملکرد کانالهای سدیمی اپی تلیال سبب آزاد شدن آلبائین می‌گردد (۷). بنابراین در این مطالعه افزایش میزان سدیم CSF می‌تواند باعث تغییر گرایان یونی متعاقب اختلال عملکرد پمپ باشد. از سوی دیگر خود می‌تواند بصورت عاملی برای آزاد شدن بیشتر مهار کننده های اندوژن پمپ عمل کند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در مدل القای آلزایمر اسپورادیک که با تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین صورت می‌پذیرد، میزان آلبائین سرم افزایش می‌یابد. بنابراین در شرایط پاتولوژیک مانند آلزایمر که با اختلال متابولیسم سلولی همراه می‌باشد، امکان افزایش مهار کننده های اندوژن پمپ سدیم حتی قبل از تشکیل پلاک های آمیلوئید بتا وجود دارد و مقابله با افزایش آنها می‌تواند بعنوان راهکار درمانی جدید پیشنهاد گردد. یکی از محدودیت های مطالعه کنونی حجم کم CSF جمع آوری شده بود که امکان بررسی فاکتورهای شبیه دیژیتال رامشکل می‌نمود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی تکنیک های دیگر مثل HPLC آزمون شود تا بتوان مقادیر این ماده را در حجم کم نیز اندازه گیری نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران بدلیل حمایت مالی تقدیر و تشکر می‌گردد.

نتایج حاصل از بررسی های بافت شناسی، افزایش فضای بطن در گروه های دریافت کننده استرپتوزوتوسین نسبت به گروه های سالیین را نشان می‌دهد (شکل ۱B). در گروه سالیین (C)، سلولهای هیپوکامپ به صورت منظم مشاهده شدند. نورون های دژنره و جمع شده به صورت پراکنده و با فضاهای خارج سلولی افزایش یافته نسبت به نورون های سالم مشخص می‌شوند (D). در رنگ آمیزی کونگو ناحیه هیپوکامپ تفاوت بارزی بین گروههای سالیین (E) و استرپتوزوتوسین (F) مشاهده نشد.



شکل ۱. اثر تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین بر اندازه بطن.

(A-B) و ویژگی های مورفولوژیک نورونهای هیپوکامپ (C-D) پس از رنگ آمیزی کزریل و یوله و قرمز کونگو (E-F) در گروههای سالیین و استرپتوزوتوسین. نورون های دژنره و جمع شده به صورت پراکنده و با فضاهای خارج سلولی افزایش یافته (D) نسبت به نورون های سالم (C) مشخص می‌شوند. بزرگنمایی ۴۰x.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که در مدل القای آلزایمر اسپورادیک در رت که با تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین صورت می‌پذیرد، میزان مهار کننده اندوژن پمپ سدیم، آلبائین در سرم افزایش می‌یابد. تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین سبب کاهش متابولیسم انرژی، استرس اکسیداتیو، مقاومت به انسولین در مغز و تخریب پیشرونده یادگیری و حافظه می‌شود و بعنوان یک مدل حیوانی مناسب برای القای بیماری آلزایمر نوع اسپورادیک در نظر گرفته می‌شود (۶). استرپتوزوتوسین یک نیتروزآمید متیل نیتروز اوربا است که به D گلوکز متصل شده و پس از جذب سلولی متابولیزه شده و N-nitrosoureide آزاد می‌شود که سبب آسیب DNA و مرگ سلول از طریق تولید ROS می‌گردد (۱۵). با توجه به اینکه تغییرات اندازه بطن ها و مورفولوژیک نورونها در گروههای استرپتوزوتوسین مشاهده شدند، خود تأییدی بر وجود تغییرات دژنراتیو در مدل مذکور می‌باشد. در این مطالعه تزریق داخل بطنی دوز sub-diabetogenic استرپتوزوتوسین بر سطح پلاسمایی گلوکز گروههای آزمایشی تأثیر قابل ملاحظه‌ای نداشت. افزایش فاکتور شبیه دیژیتال، آلبائین در این مطالعه با گزارشات قبلی که افزایش آن را در شرایط پاتولوژیک مختلف نشان داده اند، همخوانی دارد (۱۶). فاکتورهای شبیه دیژیتال از خانواده استروئید هایی هستند که در غده آدرنال و مغز سنتز و رها می‌شوند. اتصال آنها به پمپ سدیم سبب مهار

Enhanced Serum Endogenous Ouabain in a Model of Sporadic Type of Alzheimer's Disease Induced by Intracerebroventricular Streptozotocin Injection

M. Zahmatkesh (PhD)^{*1}, S. Hosseinzadeh (PhD)², M. Karimian (PhD)³, G.R. Hassanzadeh (PhD)⁴

1.Department of Neuroscience and Addiction Studies, Faculty of Advanced Technologies Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

2.Neuroscience Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

3.Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

4.Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(3); Mar 2016; PP: 33-7

Received: Aug 8th 2015, Revised: Sep 9th 2015, Accepted: Jan 1th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Serum level of digitalis-like factors or sodium pump inhibitors increase under numerous pathogenic circumstances. Diminution of sodium pump activity was reported to be secondary to beta-amyloid oligomers, though the mechanism involved remains inconclusive. Therefore, this study was conducted to evaluate the alteration in serum levels of endogenous ouabain and cerebrospinal fluid (CSF) sodium in an animal model of Alzheimer's disease, induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (ICV-STZ).

METHODS: In this empirical study, 48 male rats were randomly divided into six groups of saline and STZ. Alzheimer's model was induced by ICV injection of STZ (3 mg/kg) on the first and third days. CSF samples were drawn from cisterna magna, and blood samples were collected from caudal vein. Thereafter, serum levels of ouabain and CSF sodium were evaluated 2, 7, and 14 days after STZ/saline injection in the test groups. Cresyl violet and Congo red stains were applied to study neuronal morphology and presence of amyloid plaques.

FINDINGS: The mean serum levels of ouabain in the STZ groups were 0.2 ± 0.05 ng/mL vs. 0.54 ± 0.04 ng/mL on the second day, 0.3 ± 0.02 ng/mL vs. 0.59 ± 0.06 ng/mL on the seventh day, and 0.2 ± 0.07 ng/mL vs. 0.65 ± 0.08 ng/mL on the fourteenth day. These results indicated a significant increase of endogenous ouabain in the experimental groups compared to the saline groups ($p < 0.05$). On the second day, CSF sodium concentration in the STZ groups was significantly higher than the saline groups (142.6 ± 2.9 vs. 150.6 ± 3.2 ; $p < 0.05$). However, despite the increasing trend, in the STZ groups there were no significant differences between the 7- and 14-day STZ groups.

CONCLUSION: In this study, elevated serum level of endogenous ouabain is a sign of early pathological changes in sodium pump activity and can be recommended as a potential therapeutic target.

KEY WORDS: Alzheimer's, Ouabain, Streptozotocin.

Please cite this article as follows:

Zahmatkesh M, Hosseinzadeh S, Karimian M, Hassanzadeh GR. Enhanced Serum Endogenous Ouabain in a Model of Sporadic Type of Alzheimer's Disease Induced by Intracerebroventricular Streptozotocin Injection. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(3):33-7.

***Corresponding author: M. Zahmatkesh (PhD)**

Address: Department of Neuroscience and Addiction Studies, Faculty of Advanced Technologies Medicine, Tehran Univ Med Sci, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 43052155

E-mail: zahmatkm@tums.ac.ir

References

- 1.Hattori N, Kitagawa K, Higashida T, Yagyu K, Shimohama S, Wataya T, et al. CI-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett*. 1998; 254(3):141-4.
- 2.Bores, GM, Smith CP, Wirtz-Brugger F,Giovanni A. Amyloid β -peptides inhibit Na/K-ATPase: tissue slices versus primary cultures. *Brain Res Bull*.1998;46(5):423-7.
- 3.Fishman MC. Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain. *Proc Nati Acad Sci*. 1979;76(9):4661-3.
- 4.Hamlyn JM, Manunta P. Endogenous cardiotonic steroids in kidney failure: a review and an hypothesis. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2015;22(3):232-44.
5. Simonini M, Pozzoli S, Bignami E, Casamassima N, Messaggio E, Lanzani C, et al. Endogenous ouabain: an old cardiotonic steroid as a new biomarker of heart failure and a predictor of mortality after cardiac surgery .*Biomed Res Int*. 2015;714793.
6. Sharma M, Gupta Y. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci*. 2001;68(9):1021-9.
7. Quadri L, Bianchi G, Cerri A, Fedrizzi G, Ferrari P, Gobbini M, et al. 17 β -(3-Furyl)-5 β -androstane-3 β , 14 β , 17 α -triol (PST 2238). A very potent antihypertensive agent with a novel mechanism of action. *J Med Chem*. 1997; 40(11): 1561-4.
- 8.Kerek F,Voicu VA. Spherical oligo-silicic acid SOSA disclosed as possible endogenous digitalis-like factor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;5:233.
- 9.Hamlyn JM. Natriuretic hormones, endogenous ouabain, and related sodium transport inhibitors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:199.
10. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates.6th ed: Academic; 1986.p.456.
- 11.Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Benade V, Muddana N, R Saralaya, et al, A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J Neurosci Meth*. 2009;178(1):116-9.
- 12.Burnett RA, Brown IL, Findlay J. Cresyl fast violet staining method for Campylobacter like organisms. *J Clin Pathol*. 1987; 40(3):353.
- 13.Nilsson M. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*. 2004; 34(1): 151-60.
- 14.Qazzaz HM, Valdes Jr. Simultaneous isolation of endogenous digoxin-like immunoreactive factor, ouabain-like factor, and deglycosylated congeners from mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(1): 193-200.
- 15.Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an icv injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res*. 1999;102(1):73-88.
- 16.Chen S, Yuan C, Clough D, Schooley J, Haddy F ,Pamnani M .Role of digitalis-like substance in the hypertension of streptozotocin-induced diabetes in reduced renal mass rats. *Am J Hyperten*. 1993; 6(5-1): 397-406.
- 17.Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 293(2): 1-87.
- 18.Nesher, Shpolansky U, Rosen H, Lichtstein DM. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci*. 2007;80(23): 2093-07.
- 19.Mark RJ, Keller JN, Kruman I, Mattson MP. Basic FGF attenuates amyloid β -peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res*. 1997; 756(1-2): 205-14.
- 20.Wasada T, Kuroki H, Naruse M, Arii H, Maruyama A, Katsumori K, et al. Insulin resistance is associated with high plasma ouabain-like immunoreactivity concentration in NIDDM. *Diabetologia*. 1995; 38(7): 792-7.