مقاله پژوهشی

اثر بهبوددهنده روغن کنجد بر استرس اکسیداتیو هیپوکامپ موش صحرایی نر ناشی از استرپتوزوتوسین

حاتم احمدی[×1]، حمیرا حاتمی[2]، علیرضا علی همتی[3]، سیدمهدی بانان خجسته[4]، فاطمه فتحی[5]

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۱۱/۰۴ تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۴/۲۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو در پاتونژنز بیماری آلزایمر نقش دارد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی روغن کنجد بر روی پارامترهای استرس اکسیداتیو، ناشی از تجویز استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی نر بود.

مواد و روش کار: این مطالعه تجربی مداخله‌ای بر روی پنج گروه ۷ تایی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۷۰ گرم) اجرا شد که شامل: گروه کنترل که هیچ دارویی دریافت نکرد، گروه شاهد که ۵ میکرولیتر سالین در بطن‌های جانبی مغز را به مدت ۷روز دریافت کردند، گروه استرپتوزوتوسین که ۵ میکرولیتر استرپتوزوتوسین با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بطن‌های جانبی را به مدت ۷روز دری‌افت کردند و دو گروه استرپتوزوتوسین+ روغن کنجد که ابتدا با تزریق داخل صفاقی دوز ۵ میلی‌لیتر بر کی‌لوگرم روغن کنجد در دو دوره ۷ و ۲۸ روزه پیش‌تیمار شدند و سپس استرپتوزوتوسین را دریافت کردند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق دارویی در گروه‌های آزمایشی، جدا کردن هیپوکامپ مغز رت‌ها و هموژنیزاسیون آن صورت گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و مقدار تام گلوتاتیون بافت هیپوکامپ با استفاده از کیت‌های ویژه اندازه‌گیری شد. تجزی‌ه‌وتحلی‌ل داده‌ها به روش آنالیز واریانس ی‌ک‌طرفه انجام شد.

ی‌افته‌ها: فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و نیز مقدار تام گلوتاتیون بافت هیپوکامپ مغز رت‌های تحت تیمار با استرپتوزوتوسین، نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد ($P<0/05$). پیش تیمار ۲۸ روزه با روغن کنجد موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و همچنی‌ن مقدار تام گلوتاتیون هیپوکامپ در گروه اسپترپتوزوتوسین+ روغن کنجد نسبت به گروه استرپتوزوتوسین به مقادیر طبیعی شد ($P<0/05$).

بحث و نتی‌جه‌گی‌ری: تغذیه با روغن کنجد از طریق تعدیل پارامترهای استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ، ممکن است از کاهش بی‌ش‌ازحد آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی در افراد مبتلا و مستعد به آلزایمر پیشگیری کند.

کلیدواژه‌ها: استرپتوزوتوسین، روغن کنجد، استرس اکسیداتیو، هیپوکامپ

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره دوازدهم، ص ۹۵۲-۹۴۳، اسفند ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، تلفن: ۰۹۱۹۳۶۰۴۵۱۱

Email: hahmadi@cfu.ac.ir

مقدمه

بیماری آلزایمر با اختلال در حافظه شروع شده و درنهای‌ت منجر به اختلالات شدید شناختی و ازکارافتادگی و وابستگی کامل فرد مبتلا می‌شود (۱). استرپتوزوتوسین (Streptozotocin, STZ) آنتی‌بیوتیک تولیدشده توسط قارچ Streptomyces-achromogenes است که تجویز آن در حیوانات آزمایشگاهی، موجب نکروز و دژنراسیون سلول‌های بتای پانکراس و القاء دیابت می‌شود (۲). در تحقیقات بر روی هر دو مدل انسانی و حیوانی، گزارش شده که دیابت با تغییرات پاتولوژیک در سیستم عصبی

[1] استادیار گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

[2] دانشیار گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[3] دانشیار گروه تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[4] دانشیار گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[5] کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]

مرکزی، منجر به نقایص شناختی و عاطفی می‌شود (۳). تزریق استرپتوزتوسین با القاء پروآمیلوئیدوژنیک و یا استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ و قشر فرونتال، موجب مقاومت به انسولین و متابولیسم کم گلوکز در مغز می‌شود (۴). تجویز داخل مغزی استرپترتوزتوسین منجر به زوال تدریجی حافظه شده و به‌طور گسترده از این دارو برای ایجاد مدل‌های حیوانی آلزایمری استفاده می‌شود (۵). استرپتوزتوسین با افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species, ROS)، موجب بروز استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۶). رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن، ترکیباتی با واکنش‌پذیری بالا هستند که به اسیدهای نوکلئیک، انواع پروتئین‌ها و چربی‌های سلول حمله‌کرده و موجب آسیب به عملکردهای سلول و حتی تخریب سلولی می‌شوند (۷). رادیکال‌های آزاد تولی‌دشده در استرس اکسیداتیو، با متیلاسیون DNA، کربونیلاسیون پروتئین و ناهنجاری‌های دیگر در میتوکندری، منجر به زوال عقل می‌شود (۸). در تعدادی از بیماری-های نورودژنراتیو مانند ایسکمی، پارکینسون، آلزایمر و مالتیپل اسکلروزیس، تداوم استرس اکسیداتیو منجر به آسیب نورودژنراتیو و آپوپتوز نورونی می‌شود (۹). در ابتلا به بیماری آلزایمر و فرایندهای بیماری‌زایی مشابه، نورون‌های CA1 هیپوکامپ صدمه می‌بینند و اختلالات بارزی در حافظه ایجاد می‌شود (۱۰).

آنزی‌م‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز (Super Oxide Dismutase, SOD)، کاتالاز ((Catalaze, CAT و گلوتاتیون پراکسیداز(Glutathione Peroxidase, GPx)، اولین خط دفاعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن تشکیل می‌دهند. گلوتاتیون بافتی (glutathione,GSH) نیز یک خط ثانویه دفاعی در برابر رادی‌کال‌های آزاد داخل سلولی و پراکسیدهای تولید شده در استرس اکسیداتیو را شکل می‌دهد (۱۱). این آنزیم‌ها به‌منظور حفاظت از نورون‌ها در برابر گونه‌های واکنشی اکسیژن و نیتروژن بیان می‌شوند (۷).

روغن کنجد (Sesame oil, SO) از دانه گونه گیاهی علفی یک‌ساله کنجد (Sesamum indicum)، متعلق به خانواده Pedaliaceae استخراج می‌شود (۱۲). روغن کنجد حاوی اسیدهای چرب غی‌راشباع اولئیک، لینولئیک، پالمیتیک، استئاریک و لسیتین است که این اسیدهای چرب با افزایش سیالیت غشای سلول‌های مغزی، به‌ویژه در ناحیه CA1 هیپوکامپ و با افزایش عملکرد سیستم کولینرژیک، موجب افزایش یادگیری می‌شود (۱۳). همچنین این روغن طبیعی حاوی آنتی‌اکسی‌دان‌های سزامین، سزامولین، سزامینول و توکوفرول است (۱۲). توکوفرول، فعال‌ترین و فراوان‌ترین فرم ویتامین E بوده که در پیشگیری از تجمع رادیکال-های آزاد در غشاها و لی‌پوپروتئی‌ن‌ها نقش دارد (۱۴). سزامین، سزامولین و به‌ویژه ویتامین E موجود در روغن کنجد، دارای اثرات ضد فشارخون، کاهش سطح کلسترول و نیز اثرات آنتی‌اکسی‌دان و محافظت‌کننده عصبی است (۱۵). علاوه بر این، روغن کنجد تجوی‌زشده به‌عنوان مکمل غذایی در مدل‌های حیوانی آزمایشی، می‌تواند دارای اثرات آنالژزیک و ضدالتهابی باشد (۱۶).

به دلیل اینکه استراتژی درمانی و داروهای فعلی قادر به معکوس کردن فرآیند بیماری آلزایمر نیستند (۱۷)، رویکرد پیشگیری از اثرات ناشی از تجویز استرپتوزتوسین به‌عنوان عامل بیماری آلزایمر در مدل‌های آزمایشگاهی و کاهش پارامترهای مرتبط با نقایص شناختی در هیپوکامپ، در مطالعات قبلی نیز مورد تأکی‌د قرارگرفته است (۱۸). لذا در تحقیق حاضر، اثرات پیشگیرانه آنتی‌اکسیدانی روغن کنجد در کاهش پارامترهای استرس اکسیداتیو، ناشی از تزریق درون بطن‌های مغز استرپتوزتوسین در موش صحرایی نر موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی مداخله‌ای از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار، تهی‌شده از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، در محدوده وزنی ۵۰±۲۰۰ گرم استفاده شد. به‌منظور کاهش استرس و عادت به شرایط آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، جانوران در گروه‌های ۵ تایی به مدت دو هفته در شرایط دمای ثابت محیطی ($^{\circ}$c ۳±۲۲) و تنظیم نور با دوره‌ی تاریکی-روشنایی۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷صبح) نگهداری - شدند. هنگام کار با رت‌ها، موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. علت انتخاب موش‌های صحرایی نر، ساده‌تر بودن سیستم هورمونی و نیز تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها بود.

وسایل موردنی‌از عبارت بودند از: دستگاه اسپکتروفتومتری (شرکت یونیکو، UNICO آمریکا)، ترازوی دقیق، سرنگ انسولین، سالین نرمال، الکل، پنبه، استرپتوزتوسین (شرکت Sigma)، روغن کنجد (شرکت گل‌داروی اصفهان)، کتامین و زایلازین (شرکت (Alfasan Chemical Co, Woerden, and Holland)).

تزریق دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم روغن کنجد در گروه‌های آزمایشی به‌صورت درون صفاقی، به مدت ۷ و ۲۸ روز و قبل از جراحی مغز صورت گرفت. در رابطه با ایمنی کاربردهای درمانی استفاده از روغن کنجد، هی‌چ‌کدام از رت‌ها پس از تزریق با روغن، اختلالات حرکتی نسبت به گروه کنترل پیدا نکرده و نمردند (۱۹). مبنای نحوه تجویز و دوز استفاده‌شده روغن کنجد به‌صورت درون صفاقی در این مطالعه بر اساس مطالعات قبلی بود (۲۰). تزریق استرپتوزتوسین بعد از بیهوشی و جراحی رت‌ها در استریوتاکسی، به

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]

مدت ۷ و به‌صورت دوطرفه در بطن‌های جانبی مغز صورت گرفت. با توجه به اینکه تزریق داخل بطن مغزی استرپتوزوتوسین، یک روش خوب برای القای التهاب عصبی منجر به زوال عقل در حیوانات آزمایشگاهی است، انتخاب دوز مصرفی و محل تزریق این دارو نیز بر پایه مطالعات قبلی صورت گرفت (۲۱).

جراحی و کانول گذاری:

ابتدا رت‌ها با استفاده از ترکیب۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم زایلازین به شیوه درون صفاقی بی‌هوش شدند(۲۲). سپس سر رت‌های بی‌هوش در دستگاه استریوتاکسی ثابت شده و با ایجاد شکاف طولی در بخش خلفی سر، جمجمه نمایان گردید. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات مغز رت، مشخصات بطن‌های جانبی مغز با موقعیت (جلویی- عقبی ۰/۸− میلی‌متر، جانبی ۱/۱۶± میلی‌متر، پشتی- شکمی ۴/۲- میلی‌متر) به‌دست آمد و کانول‌گذاری صورت گرفت (۲۳). در پنجمین روز دوره بهبودی بعد از جراحی، موش‌ها آماده تزریق درون بطن‌های جانبی مغز بودند. در روز اجرای آزمون، برای تزریق دارو از سرنگ همیلتون۱۰میکرولیتری استفاده شد. به‌منظور القای آلزایمر در گروه آلزایمری، با استفاده از سرنگ همیلتون، ۵ میکرولیتر از داروی استرپتوزوتوسین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در هر دو بطن جانبی تزریق شد. گروه شاهد نیز حجم ۵ میکرولیتر از سالین را دریافت کردند (۲۱).

موش‌های صحرایی نر بر اساس محدوده وزنی۵۰±۲۰۰ گرم به‌صورت تصادفی به پنج گروه ۷ تایی تقسیم شدند که شامل: گروه کنترل، که هیچ تیماری روی آن‌ها صورت نگرفت. گروه شاهد که به مدت ۷ روز، ۵ میکرولیتر سالین۰/۹ درصد را به‌صورت دوطرفه در بطن‌های جانبی مغز دریافت کردند. گروه آزمایشی آلزایمری که ۵ میکرولیتر استرپتوزوتوسین با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم را به مدت ۷ روز در بطن‌های جانبی مغز دریافت کردند. دو گروه ترکیبی روغن کنجد + استرپتوزوتوسین که ابتدا روغن کنجد با غلظت ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم را به مدت ۷ و ۲۸ روز به‌صورت درون‌صفاقی دریافت کردند و بعد از جراحی در دستگاه استریوتاکسی، استرپتوزوتوسین با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم را به مدت ۷ روز دریافت کردند.

نمونه‌برداری:

۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق دارویی، رت‌ها با پنبه‌ی آغشته به اتر بی‌هوش و سر آن‌ها توسط گیوتین جدا شد. مغز رت بر روی تخته یخ‌بسته قرار داده شد و هیپوکامپ از مغز جدا و بلافاصله در نیتروژن مایع ۸۰-درجه سانتی‌گراد به‌صورت فریزر نگه‌داری شد. با استفاده از هموژنایزر مکانیکی، هموژن بافت‌های هیپوکامپ تهیه گردید. بعد از سانتریفوژ کردن بافت هموژنیزه در دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محلول رویی استخراج شد تا برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورداستفاده قرار بگیرد. میزان پروتئین توتال در سوپرناتانت‌ها توسط روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۲۴).

مطالعات بیوشیمیایی:

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش Paglia وValentin اندازه‌گیری شد. اساس این روش بر پایه اکسیداسیون NADPH در حضور H2O2 است. فعالیت این آنزیم بر روی محلول رویی تهیه‌شده از بافت هموژن، در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. مقادیر به‌دست‌آمده به‌صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (۲۵). روش مورداستفاده برای تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز، ظرفیت این آنزیم برای مهار اتو-اکسیداسیون پیروگالول است. فعالیت این آنزیم در طول‌موج ۵۰۵ نانومتر از طریق طی‌فسنجی محلول رویی اندازه‌گیری شد. اساس این روش احیاء تترازولیوم در یک سیستم تولید سوپراکسید وابسته به گزانتین اکسیداز است. فعالیت اختصاصی آنزیم به‌صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (۲۵). سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه H_2O_2 در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر و در ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. فعالیت آنزیم از طریق محاسبه میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر و به‌صورت نانومول H2O2 بر نانوگرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد (۲۶). نمونه‌های موردنظر برای اندازه‌گیری محتوای گلوتاتیون بافتی در ۵ حجم اسید کلرواستیک ۱ درصد هموژن شدند و سپس در دور۱۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. میزان جذب نور در طول‌موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری و محتوای گلوتاتیون به‌صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بیان شد (۲۵).

روش‌های آماری:

داده‌های به‌دست‌آمده به‌وسیله نرم‌افزار SPSS تجزیه‌وتحلیل آماری شد. به علت اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمالی بودند، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه برای مقایسه تفاوت کمی میانگین داده‌ها در گروه‌های آزمایشی و برای مقایسه تفاوت کیفی میانگین داده‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. P<۰/۰۵ به‌عنوان تفاوت مقدار معنی‌دار گروه‌ها مورد ملاک قرار گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارExcel 2007 صورت گرفت.

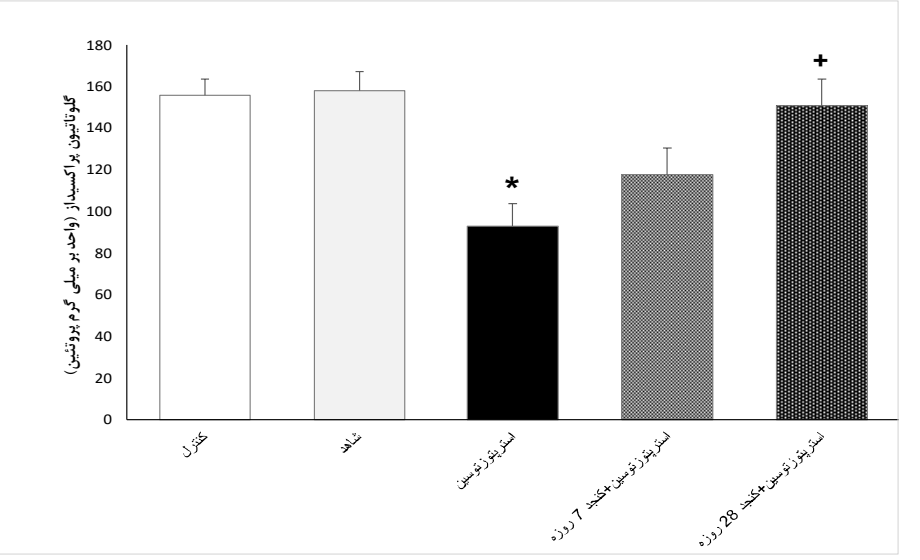
یافته‌ها

بررسی اثر تزریق استرپتوزوتوسین در بطن‌های جانبی مغز بر پارامترهای استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی نر:

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]

تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که در گروه مدل آلزایمری رت‌ها، تزریق دوطرفه ۵ میکرولیتر استرپتوزتوسین با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم در بطن‌های جانبی مغز به مدت ۷ روز، موجب کاهش معنی‌دار فعالیت هر سه آنزیم آنتی‌اکسی‌دانی گلوتاتیون پراکسیداز (طرف چپ نمودار ۱، P<۰/۰۵)، سوپراکسیددسموتاز (طرف چپ نمودار ۲، P<۰/۰۵) و کاتالاز (طرف چپ نمودار ۳، P<۰/۰۵) و نیز محتوای گلوتاتیون بافتی (طرف چپ نمودار ۴، P<۰/۰۵) در هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که تزریق استرپتوزتوسین در بطن‌های جانبی مغز موش‌های صحرایی، با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و القاء استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ، می‌تواند از طریق دژنراسیون نورونی، موجب اختلال حافظه در مدل حیوانات آلزایمری شود.



نمودار (۱): تأثیر استرپتوزتوسین، روغن کنجد و برهم کنش اثر آن‌ها بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز هیپوکامپ موش‌های صحرایی داده‌ها به‌صورت میانگین SEM ± بیان شده‌اند (علامت × بیانگر P< ۰/۰۵نسبت به گروه کنترل و علامت + بیانگر P< ۰/۰۵نسبت به گروه استرپتوزتوسین).

بررسی تداخل اثر تزریق پیش‌تیمار درون‌صفاقی روغن کنجد به مدت ۷ روز با تزریق استرپتوزتوسین درون بطن‌های جانبی مغز بر پارامترهای استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی نر:

تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه گروه استرپتوزتوسین+ روغن کنجد ۷ روزه با گروه استرپتوزتوسین نشان داد که پیش‌تیمار رت‌ها با تزریق درون‌صفاقی روغن کنجد (غلظت ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) به مدت ۷ روز، قبل از تزریق دوطرفه دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم استرپتوزتوسین به مدت ۷ روز در بطن‌های جانبی مغز، قادر به جلوگیری از اثرات نامطلوب استرپتوزتوسین بر فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (وسط نمودار ۱، P>۰/۰۵)، کاتالاز (وسط نمودار ۳، P>۰/۰۵) و مقدار تام گلوتاتیون (وسط نمودار ۴، P>۰/۰۵) هیپوکامپ نسبت به گروه دریافت کننده استرپتوزتوسین نشد و صرفاً فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز در گروه ترکیبی استرپتوزتوسین+ روغن کنجد ۷ روزه نسبت به گروه استرپتوزتوسین به حالت نرمال بازگشت (وسط نمودار ۲، P<۰/۰۵). با وجود بهبود یکی از پارامترهای مربوط به استرس اکسیداتیو در پیش تیمار با روغن کنجد ۷ روزه، اما برداشت کلی نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که پیش تیمار رت‌ها با روغن کنجد در مدت کوتاه ۷ روزه قادر به بهبود استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق استرپتوزتوسین در بطن‌های جانبی مغز در مدل رت‌های آلزایمری نیست.

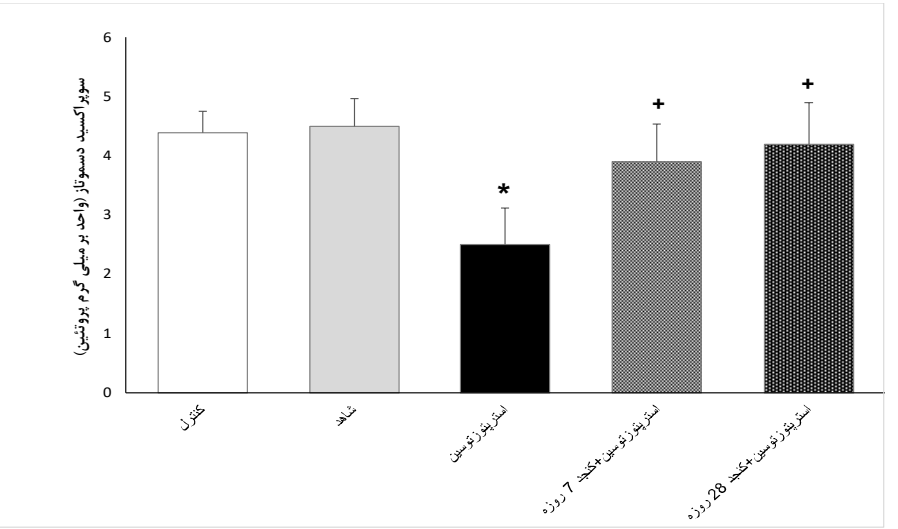
بررسی تداخل اثر پیش تیمار تزریق درون‌صفاقی روغن کنجد به مدت ۲۸ روز با تزریق استرپتوزتوسین درون بطن‌های جانبی مغز بر پارامترهای استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی نر:

پیش‌تیمار تزریق درون‌صفاقی روغن کنجد با غلظت ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به مدت ۲۸ روز قبل از دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم

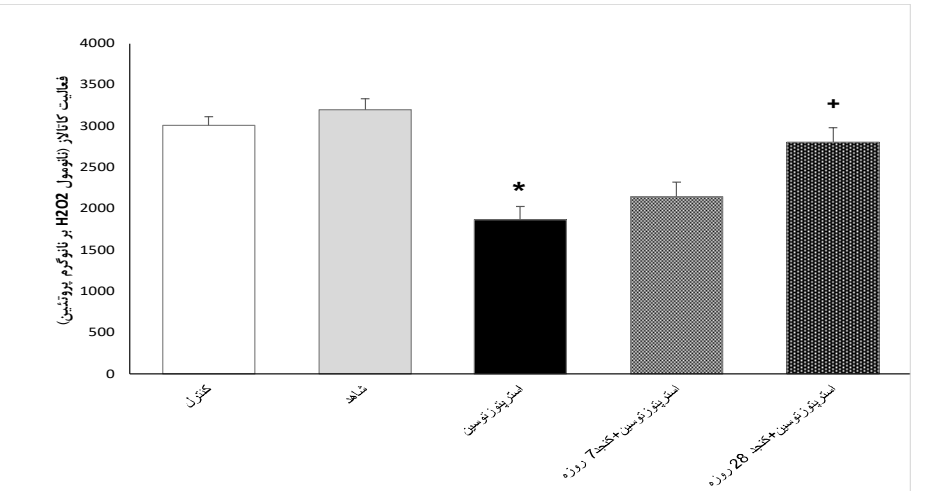
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]

تزریقی استرپتوزتوسین به مدت ۷ روز در بطن‌های جانبی مغز رت-ها، مانع از اثر نامطلوب استرپتوزتوسین بر فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (سمت راست نمودار۱، P<۰/۰۵)، سوپراکسیددسموتاز (سمت راست نمودار۲، P<۰/۰۵)، کاتالاز (سمت راست نمودار۳، P<۰/۰۵) و مقدار تام گلوتاتیون (سمت راست نمودار۴، P<۰/۰۵) در هیپوکامپ رت‌ها نسبت به گروه دریافت کننده استرپتوزتوسین شد. بررسی نتایج این بخش از تحقیق در مورد تداخل اثر دارویی نشان داد که پیش‌تیمار رت‌ها با تزریق درون‌صفاقی روغن کنجد با غلظت ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به مدت ۲۸ روز، مانع از اثرات نامطلوب تزریق استرپتوزنوسین با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم به مدت ۷ روز در بطن‌های جانبی مغز بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسی‌دانی شد و قادر به بهبودی استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق استرپتوزتوسین در بطن‌های جانبی مغز در مدل رت‌های آلزایمری شد.



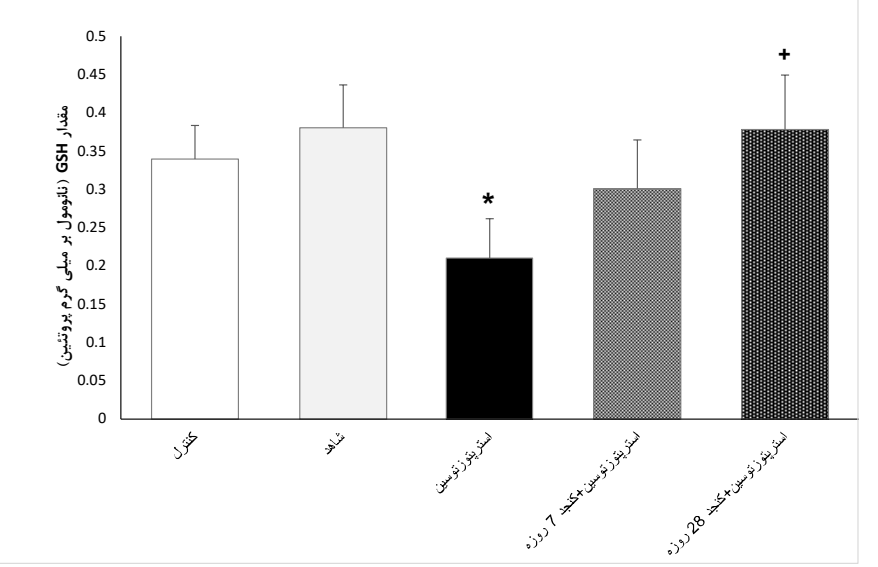
نمودار (۲): تأثیر استرپتوزتوسین، روغن کنجد و برهم کنش اثر آن‌ها بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز هیپوکامپ موش‌های صحرایی داده‌ها به‌صورت میانگین SEM ± بیان شده‌اند (علامت × بیانگر P< ۰/۰۵نسبت به گروه کنترل و علامت + بیانگر P< ۰/۰۵نسبت به گروه استرپتوزتوسین).



نمودار (۳): تأثیر استرپتوزتوسین، روغن کنجد و برهم کنش اثر آن‌ها بر فعالیت آنزیم کاتالاز هیپوکامپ موش‌های صحرایی داده ها به‌صورت میانگین SEM ± بیان شده‌اند (علامت × بیانگر P< ۰/۰۵نسبت به گروه کنترل و علامت + بیانگر P< ۰/۰۵نسبت به گروه استرپتوزتوسین).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]



نمودار (۴): تأثیر استرپتوزتوسین، روغن کنجد و برهم کنش اثر آن‌ها بر مقدار تام گلوتاتیون بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی داده‌ها به‌صورت میانگین SEM ± بیان شده‌اند (علامت × بیانگر ۰/۰۵ >Pنسبت به گروه کنترل و علامت + بیانگر ۰/۰۵ >Pنسبت به گروه استرپتوزتوسین).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم استرپتوزتوسین به مدت ۷ روز در بطن‌های جانبی مغز موش صحرایی، با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و نیز کاهش مقدار تام گلوتاتیون، موجب بروز استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی نر شده که می‌تواند زمینه ساز کاهش حافظه و ایجاد مدل رت آلزایمری باشد. نتیجه ازمایشات بر روی برهم‌کنش داروها در این تحقیق نیز نشان داد که تزریق پیش تیمار درون صفاقی دوز ۵ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم روغن کنجد در دوره ۲۸ روزه قبل از تجویز استرپتوزتوسین، با جلوگیری از کاهش میزان آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی مذکور توسط استرپتوزتوسین در هیپوکامپ و بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو، می‌تواند دارای نقش محافظتی علیه آسیب سلولی و بافتی ناشی از تزریق استرپتوزتوسین در هیپوکامپ مغز موش صحرایی باشد، درصورتیکه اعمال پیش تیمار دوز مصرفی روغن کنجد در دوره کوتاه مدت ۷ روزه، قادر به برگرداندن اثرات نامناسب ناشی از تجویز استرپتوزتوسین بر پارامترهای استرس اکسیداتیو نشد.

نتایج مطالعه حاضر در زمینه بروز استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق استرپتوزتوسین در هیپوکامپ، با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارد. گزارش شده که تجویز استرپتوزتوسین برای ایجاد حیوانات دیابتی، با کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و کاهش سطح گلوتاتیون و نیز افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی در هیپوکامپ، موجب افزایش استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ می‌شود (۲۷). تیمار موش‌ها با استرپتوزتوسین، با کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde, MDA)، می‌تواند منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در هیپوکامپ شود (۲۸). این کاهش در سیستم آنتی‌اکسیدانی یا افزایش استرس اکسیداتیو، باعث عدم انعطاف‌پذیری سیناپسی و کاهش عملکرد شناختی مغز می‌شود (۲۸). مشابه تحقیق حاضر، گوش[1] و همکاران نیز برای بررسی اثر استرپتوزتوسین برحافظه و التهاب عصبی، دوزهای ۱/۵، ۳ و ۶ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم این دارو را در بطن‌های جانبی مغز موش صحرایی نر تزریق کردند (۲۱). این محققین گزارش کردند که دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارو در این ناحیه مغزی، پارامترهای مرتبط با التهاب عصبی را در هیپوکامپ مغز بیشتر از دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن القاء می‌کند (۲۱).

[1] Ghosh R

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]

در همین راستا، بوید-کیمبال[2] و همکاران نیز گزارش کرده‌اند که بیان سوپراکسید دسموتاز در نواحی مختلف مغز بیماران آلزایمری کمتر از افراد غیرآلزایمری است و پیشنهاد کردند که ممکن است مکانیسم جبرانی طبیعی برای حفاظت این ناحیه از آسیب آکسیداتیو، به واسطه رادیکال‌های آزاد کافی نباشد (۲۹).

همچنین در این مطالعه، برهم‌کنش اثر پیش تیمار تزریق درون صفاقی روغن کنجد با تزریق استرپتوزتوسین در درون بطن‌های جانبی مغز رت‌های نر مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه تاکنون تداخل اثر این دو دارو با یکدیگر در مطالعه‌ای بررسی نشده است، اما در تحقیقات متعدد قبلی، اثر منفرد و یا ترکیبی هر کدام از این داروها با داروهای دیگر مورد بررسی قرار گرفته است. برخی از محققین نقش پیشگیرانه ترکیبات و داروهای مختلف، علیه اثرات نامناسب تجویز استرپتوزتوسین در موجودات آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار داده‌اند. کوساراجو[3] و همکاران گزارش کردند که داروی ساکساگلیپتین می‌تواند پارامترهای مرتبط با نقایص شناختی در هیپوکامپ رت‌های آلزایمری القاء شده از تجویز استرپتوزتوسین را بهبود بخشد (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر، پیش تیمار با دوزهای داخل صفاقی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کی‌لوگرم والریل‌سالیسیلات نیز به‌صورت روزانه و برای یک دوره ۲۱ روزه، موجب بهبود اختلالات شناختی ناشی از تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین در رت‌ها شد (۳۰). همچنین در مطالعات مختلف، پیش تیمار با ورزش ملایم در رت‌های دیابتی القایی از تزریق استرپتوزتوسین، می‌تواند موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و نیز موجب بهبود توده سلول‌های بتای پانکراسی (۶) و بهبود استرس اکسیداتیو در بافت های قلبی شد (۳۱). سمرقندیان و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که تزریق داخل‌صفاقی زعفران به‌طور قابل توجهی اثرات نامطلوب متابولیکی در موش‌های تحت درمان با استرپتوزتوسین را بهبود می‌بخشد (۳۲). زعفران باعث بهبود مقدار گلوکز خون، نقایص شناختی، پرواکسیداسیون لیپیدی و کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌های دیابتی شد (۳۲). همچنین بعلت اینکه آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E و C در سرم بیماران دیابتی کاهش می‌یابد (۳۳)، ویتامین E موجود در روغن کنجد از طریق مکانیسم‌های مختلف، سبب کاهش شدت واکنش‌های استرس اکسیداتیو و تأثیر مولکولی آن‌ها بر ماکرومولکول‌های لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود و اثر سلولی و درنهایت مشکلات بالینی ناشی از ماکرومولکول‌های تخریب شده را کاهش می‌دهد (۳۴). روغن کنجد می‌تواند نارسایی‌های متعدد اندام‌های رت‌های تحت درمان با لیپوپلی‌ساکاریدها را کاهش داده و موجب افزایش بقای این اندام‌ها از طریق اثر مهاری بر فعالیت گزانتین اکسیداز شود (۳۴). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده که ویتامین E موجود در روغن کنجد، از طریق مهار تولید آنیون سوپراکسید، از سلول‌های کبد در برابر پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کند (۳۵). همچنین اثر درمان طولانی مدت با ترکیب آنتی‌اکسیدانی ویتامینE، بر روی استرس‌اکسیداتیو در کورتکس پری‌فرونتال و هیپوکامپ گزارش شده است (۲۷).

نتیجه‌گیری

از جمع بندی نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج مطالعات قبلی، می‌توان چنین نتیجه گرفت که پیش تیمار ۲۸ روزه موش‌های صحرایی با روغن کنجد که حاوی آنتی‌اکسی‌دان‌های سزامین، سزامولین و سزامینول و به‌ویژه توکوفرول بعنوان فرم فعال ویتامین E است، می‌تواند اثرات نامناسب استرس اکسیداتیو استرپتوزتوسین در هیپوکامپ و به تبع آن اختلالات شناختی و حافظه‌ای ناشی از بروز استرس اکسیداتیو در موجود را کاهش داده و به‌عنوان یک ماده غذایی مناسب جهت پیشگیری از ابتلا به بیماری آلزایمر توصیه شود. از مزایای مطالعه حاضر، بررسی پارامترهای مرتبط با استرس اکسیداتیو به‌عنوان نمادی از تغییرات بافتی و سلولی در نتیجه داروی استرپتوزتوسین و برهم‌کنش روغن کنجد با استرپتوزتوسین است. از محدودیت‌های مطالعه حاضر، محدودیت زمانی برای انجام تحقیق و نیز کمبود امکانات و دستگاه‌های آزمایشگاهی برای سنجش دیگر پارامترهای رفتاری و تغییرات بافتی در تکمیل و تأیید نتایج این مطالعه بود. با توجه به گزارش‌های متفاوت قبلی و نیز نتایج حاصل از این پژوهش، مطالعات بیشتر با شیوه‌های مختلف تجویز داروها به‌صورت حاد و مزمن و نیز بررسی پارامترهای رفتاری، جهت تأیید نقش روغن کنجد در بهبود مشکلات حافظه و یادگیری در افراد مستعد و مبتلا به آلزایمر پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز بابت تأمین اعتبار لازم کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایند.

[2] Boyd-Kimball D

[3] Kosaraju J

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]

References:

1.Guariglia CC. Spatial working memory in Alzheimer's disease. Dement. Neuropsychol 2007; 1(4):392-5.

2. Li X, Jiang YH, Jiang P. et al. Analysis of Heart Rate Variability and Cardiac Autonomic Nerve Remodeling in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2015;123: 272–81

3. Biessels GJ, Gispen WH. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? Exp Clin Endocrinol Diabetes 2015; 123(05): 272-81.

4. Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. J Neuroimmunol 2012;254(1-2):1-9.

5. Sharma B, Singh N, Singh M. Modulation of celecoxib- and streptozotocin induced experimental dementia of Alzheimer's disease by Pitavastatin and Donepezil. J Psychopharmacol 2008; 22, 162e171.

6. Kanter F, Aksu M, Takir O, Kostek B. Kanter A. Oymagil A. Effects of Low Intensity Exercise Against Apoptosis and Oxidative Stress in Streptozotocin-induced Diabetic Rat Heart.. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2017;125(09): 583-91.

7. Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Francisco J. M. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. Biochim Biophys Acta 2019;1865(8):1949-67.

8. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Tota SK, Kumar A, Ahmad AS. Streptozotocin intracerebroventricular-induced neurotoxicity and brain insulin resistance: a therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-like pathology. Mol Neurobiol 2016; 53(7):4548–62.

9. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev 1998;78(2):547–81.

10. Blacker D, Wilcox M.A, Laird N.M, Rodes L, Horvath S.M, Go R.C, Perry R, Watson Jr B, Bassett S.S, McInnis M.G, Albert M.S, Hyman B.T, Tanzi R.E. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. Nat Genet 1998; 19, 357–60.

11. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circul Res 2010;107(9):1058–70.

12. Chavali SR, Utsunomiya T, Forse RA: Increased survival after cecal ligation and puncture in mice consuming diets enriched with sesame seed oil. Crit Care Med 2001; 29:140–3.

13. Lindstrom HA, Fritsch T, Petot G, Smyth KA, Chen CH, Debanne SM, et al. The relationships between television viewing in midlife and the development of Alzheimer's disease in a case-control study. Brain Cogn 2005;58 (2):157 –65.

14. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Rad Biol Med 2007; 43:4–15.

15. Visavadiya N.P, Narasimhacharya A.V.R.L. Sesame as a hypocholesteraemic and antioxidant dietary component. Food Chem. Toxicol 2008; 46: 1889–95.

16. Corso M.P, Klen M.F, Silva E.A, Filho L.C, Santos J.N, Freitas L.S, Dariva C. Extraction of sesame seed (Sesamun indicum L) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. J Supercrit Fluids 2010; 52, 56–61.

17. Berk C. Paul G, Sabbagh M. Investigational drugs in Alzheimer's disease: current progress. Expet Opin Invest Drug. 2014;2(6): 837-46.

18. Kosaraju J, Gali CC, Khatwal RB, Dubala A, Chinni S. Saxagliptin: A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. Neuropharmacol 2013;27: 291-300.

19. Henriques Monteiro E.M, Apolinário Chibli L, Yamamoto C.H, Santana Pereira M.C, Pinto Vilela F.M, Mírian Pereira Rodarte, etal. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Sesame Oil and Sesamin. Nutrients 2014; 6: 1931-44.

20. Li Y.H, Chien S. P, Chu P.Y , Liu M.Y. Prophylactic and Therapeutic Effects of a Subcutaneous Injection of Sesame Oil Against Iron-Induced Acute Renal Injury in Mice. J Parent Ent Nut 2012; 36 (3): 344-8.

21. Ghosh R, Sil S, Gupta P, Ghosh T. Optimization of intracerebroventricular streptozotocin dose for the induction of neuroinflammation and memory

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]

impairments in rats. Metab Brain Dis 2020; 35, 1279 – 86.

22. Khalili M, Hamzeh, F. Effects of Active Constituents of Crocus sativus L., Crocin on Streptozocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Male Rats. Iran Biomed J 2010; 14(1): 59-65.
23. Paxinos G, Watson C, The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. New York, NY, USA: Academic press, an imprint of Elsevier, 2006. Academ press, An imprint of Elsevier. 2006.
24. Roghani M, Baluchnejadmojard T. Chronic epigallocatechin-gal late improves aortic reactivity of diabetic rats: Underlying mechanisms. Vascul Pharmacol 2009; 51:84-9.
25. Ghadrdoost B, Vafaei A A, Rashidy-Pour A., Hajisoltani R, Bandegi A R, Motamedi F, et al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. Eur J Pharmacol. 2011; 667(1): 222-9.
26. Alam M.N, Bristi NJ, Rafiquzzaman M Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J 2013; 21(2):143-52.
27. Helen de Morais H, Camila P. de Souza, Luisa M. da Silva, Daniele M. Ferreira, Maria Fernanda Werner, Roberto Andreatini, Joice M. da Cunha, Janaina M. Zanoveli. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. Behav Brain Res 2014;258(1):52-64.
28. Pandey S.P, Singh H.K, Prasad S. Alterations in Hippocampal Oxidative Stress, Expression of AMPA Receptor GluR2 Subunit and Associated Spatial Memory Loss by Bacopa monnieri Extract (CDRI-08) in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus Type 2 Mice. PLoS One 2015;10(7): e0131862.
29. Boyd-Kimball D, Mohmmad-Abdul H, Reed T, Sultana R, Butterfield D.A. Role of phenylalanine 20 in Alzheimer's amyloid betapeptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. Chem Res Toxicol 2004;17:1743–9.
30. Dhull DK, Jindal A, Dhull RK, Aggarwal S. Neuroprotective Effect of Cyclooxygenase Inhibitors in ICV-STZ Induced Sporadic Alzheimer's Disease in Rats. J Mol Neurosci 2012; 46:223–235.
31. Samadi A, Gaeini A, Hedayati M et al. The effect of resistance exercise on oxidative stress in cardiac and skeletal muscle tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. J Bas Clin Pathophysiol 2013;2:28–33.
32. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F. Ameliorative Effect of Saffron Aqueous Extract on Hyperglycemia, Hyperlipidemia, and Oxidative Stress on Diabetic Encephalopathy in Streptozotocin Induced Experimental Diabetes Mellitus. Biomed Res Int 2014; 2014: 920857.
33. Maes M, De Vos N, Pioli R, Demedts P, Wauters A, Neels H, et al. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. J Affect Disord 2000;58(3):241–6.
34. Hsu DZ, Liu MY: Sesame oil attenuates multiple organ failure and increases survival rate during endotoxemia in rats. Crit Care Med 2002;30:1859–62.
35. Wang WL. Vitamin E and edible oils. Food Indust 1986;18:28–35.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]

Original Article

AMELIORATIVE EFFECT OF SESAME OIL ON STREPTOZOTOCON- INDUCED OXIDATIVE STRESS IN MALE RAT HIPPOCAMPUS

*Hatam Ahmad*i[1], Homiera Hatami Nemati[2], Alireza Ali hemati3[3], Seyyed Mehdi Banan Khojasteh[4], Fateme Fathi[5]*

Received: 24 January, 2021; Accepted: 12 July, 2022

Abstract

Background & Aims: Oxidative stress plays a role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. The aim of this study was to investigate the antioxidant effects of sesame oil on oxidative stress parameters caused by administration of streptozotocin in male rats.

Matherials & Methods: This interventional experimental study was performed on five groups (7 on each) of male Wistar rats (250-270 g), including: the control group that did not receive any drug, the sham group that received 5 µl of saline in the lateral ventricles of the brain for 7 days, the streptotocin group which received 5 µl of streptotocin at a dose of 1.5 mg/kg in the lateral ventricles for 7 days, and two groups of streptotocin+sesame oil, which were first pre-treated by intraperitoneal injection of 5 ml/kg of sesame oil in two periods of 7 and 28 days and then received streptotocin. 48 hours after the last drug injection in the experimental groups, the hippocampuses of the rats' brains were separated and homogenized. The activity of antioxidant enzymes glutathione peroxidase, superoxide desmutase, catalase, and the total amount of glutathione in the hippocampus tissue were measured using special kits. Data analysis was done by one-way ANOVA.

Results: The activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase, and total glutathione in the hippocampal tissue of streptozotocin-treated rats decreased compared to the control group (P¬<0.05). 28-day pretreatment with sesame oil improved the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and the total amount of hippocampal glutathione in the streptozotocin+sesame oil group to normal values, compared to the streptozotocin group (P<0.05).

Conclusion: By modulating the parameters of oxidative stress in the hippocampus, nutrition of sesame oil may prevent excessive reduction of antioxidant enzymes in the people with or prone to Alzheimer's disease.

Keywords: Streptozotocin, Sesame Oil, Oxidative Stress, Hippocampus

Address: Basic Sciences Department, University of Farhangian, Tehran, Iran
Tel: +989193604511
Email: hahmadi@cfu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2022: 32(12): 952 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[1] *Assistant Professor, Basic Sciences Department, University of Farhangian, Tehran, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran*
[3] *Associate Professor, Department of anatomical science, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[4] *Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran*
[5] *M.Sc., Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOI: 10.52547/umj.32.12.943]