

# اثر تجویز توام لوواستاتین و اسیدفولیک بر اختلالات شناختی ناشی از تخریب دو طرفه هسته قاعده‌های ماینرت در موش صحرایی نر بالغ مدل بیماری آلزایمر

آزاده اسکندری<sup>۱\*</sup>، احمد علی معاضدی<sup>۲</sup>

## چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر یکی از شایع‌ترین بیماری‌های نورودژنراتیو مغز است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر لوواستاتین و اسیدفولیک بر تخریب دو طرفه هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس موش‌های صحرایی مدل بیماری آلزایمر انجام شد. روش بررسی: در این مطالعه تجربی، 56 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به 8 گروه هفت‌تائی تقسیم شدند: گروه شاهد (دست نخورده)، گروه تخریب Nucleus Basalis Magnocellularis (NBM) (تخریب دو طرفه هسته NBM با القای جریان الکتریکی ۵ میلی آمپر به مدت ۳ ثانیه)، گروه شاهد تخریب (ورود الکتروود به هسته NBM بدون القای جریان الکتریکی)، گروه تخریب تحت تیمار با لوواستاتین (۱ mg/kg)، گروه تخریب تحت تیمار با اسیدفولیک (۵ mg/kg)، گروه تداخل لوواستاتین-اسیدفولیک، گروه ۵٪ Dimethyl sulfoxide (DMSO) (تخریب 5% DMSO + NBM)، گروه سالین (تخریب NBM + سالین). در آزمون‌های اکتساب و یادآوری دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی، الگوهای ورود به بازوها برای محاسبه خطای حافظه کارکردی، خطای حافظه مرجع و زمان سپری شده در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شدند. نتایج: آنالیز آماری یافته‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه تخریب در پارامترهای خطای حافظه مرجع، کارکردی و زمان سپری شده وجود دارد ( $P < 0/001$ ). تجویز توام لوواستاتین و اسیدفولیک منجر به کاهش خطای حافظه مرجع، کارکردی و مدت زمان سپری شده در دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی در مقایسه با گروه تخریب گردید ( $P < 0/05$ ). نتیجه گیری: طبق نتایج بدست آمده تجویز توام اسیدفولیک - لوواستاتین اثر مثبتی بر حافظه فضایی موش‌های آلزایمری القاء نمود.

واژه‌های کلیدی: بیماری آلزایمر، هسته قاعده‌ای مگنوسلولاریس، لوواستاتین، اسیدفولیک، ماز شعاعی

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۶۳۶۰۸۱۵۵، پست الکترونیکی: azade.eskandary@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۲

دمانس به دلیل پیر شدن جمعیت در سراسر جهان و عدم وجود هرگونه درمان موثر، به عنوان یک مسئله مهم اجتماعی ظهور کرده است (۱). بیماری آلزایمر ( Alzheimer's disease; AD) تقریباً ۶۰ درصد موارد کلی دمانس را تشکیل می‌دهد (۲). AD یک اختلال نورودژنراتیو مغزی پیشرونده است که باعث آسیب رساندن به مناطق مغزی دخیل در تثبیت حافظه و دیگر نواحی شناختی می‌شود (۳). شاخصه‌های اصلی این بیماری شامل رشته‌های درهم تنیده داخل نورونی متشکل از رشته‌های حاوی فرم فسفریله پروتئین میکروتوبولی تائو و تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی خارج سلولی متشکل از رسوب پروتئین‌های آمیلوئیدی بتا خارج سلولی می‌باشد (۴) هسته قاعده‌ای مگنوسولولاریس ( Nucleus basalis magnocellularis; NBM) یکی از هسته‌های قاعده‌ای مغز جلویی در جوندگان است که معادل هسته قاعده‌ای مینرت در انسان می‌باشد، بیش از ۹۰ درصد نورون‌های NBM کولینرژیک هستند که فیبرهای خود را به تمام قشر و آمیگدال گسیل می‌دهند (۵) ۷۰ تا ۸۰ درصد اعصاب کولینرژیک قشر مغز از هسته مینرت منشأ گرفته‌اند. در بیماران مبتلا به آلزایمر ۵۰ تا ۸۸ درصد این نورون‌ها از بین می‌روند، بنابراین از موش‌هایی با تخریب NBM می‌توان به عنوان مدل حیوانی آلزایمر استفاده کرد و یکی از روش‌های ایجاد مدل حیوانی آلزایمر، تخریب نورون‌های NBM با استفاده از روش الکتریکی می‌باشد (۶).

یکی از عوامل موثر در پاتوژنز بیماری آلزایمر استرس اکسیداتیو است که به صورت عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی‌اکسیدانی تعریف می‌شود. رادیکال‌های اکسیژن به پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غشاهای چربی حمله می‌کنند و یکپارچگی و عملکرد سلول را مختل می‌نمایند (۷). بافت مغز شامل بسیاری از اسیدهای چرب اشباع نشده است که به ویژه برای حملات رادیکال آزاد آسیب پذیر هستند. بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند نقش مهمی در پیشگیری و درمان آلزایمر داشته باشند (۸) در دو دهه اخیر تحقیقات گسترده‌ای به منظور دست یابی به روش‌های درمانی مناسب از یک سو و

درمان علل و عوامل ایجاد کننده بیماری آلزایمر از سوی دیگر صورت گرفته و همچنان در حال انجام است. نتایج تحقیقات نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند در کاهش علائم آلزایمر نقش مهمی ایفاء نمایند. اسیدفولیک یا ویتامین B<sub>۹</sub> یکی از اعضای خانواده ویتامین B است که برای تولید و نگهداری سلول‌های جدید، سنتز DNA و RNA و متیلاسیون مجدد هموسیستئین ضروری می‌باشد (۹-۱۰). اسیدفولیک در تمام سنین برای فعالیت سیستم عصبی مهم است (۱۱). اسیدفولیک یک پیش‌ساز ضروری برای تولید آنتی‌اکسیدان مهم کوآنزیم Q10 می‌باشد؛ اثرات مطلوب این کوآنزیم در بیماری آلزایمر به اثبات رسیده است (۱۲).

استاتین‌ها، مهارکننده‌های رقابتی آنزیم ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوکوتاریل کوآنزیم ردوکتاز، به طور گسترده‌ای برای کاهش سطح کلسترول سرم تجویز می‌شوند (۱۳). شواهد آزمایشگاهی نشان داد که استاتین‌ها علاوه بر اثرات پائین آوردن کلسترول، دارای اثرات حفاظت کننده نورونی در برابر انواع مختلف بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی می‌باشند (۱۴). استاتین‌ها علاوه بر اثرات حفاظت کننده اندوتلیالی، تعدیل نیتریک اکساید سنتاز (NOS) و اثرات آنتی‌اکسیدانی، دارای اثر مهاری در برابر فرآیندهای التهابی مهم شناخته شده در آسیب مغزی می‌باشند (۱۵) اخیراً گزارش شده که استاتین‌ها بار کلافه‌های نوروفیبریلاری را در موش‌های مدل تائوپاتی کاهش می‌دهند و همچنین فسفوریلاسیون تائو را تنظیم می‌نمایند (۱۶) استاتین‌ها وقایع توکسیک که از طریق A $\beta$  پیش برده می‌شوند مثل آسیب سیناپسی و مرگ نورونی را ممانعت می‌نمایند (۱۷). الگوهای تخریب هسته NBM در مطالعه‌ی نقش سیستم کولینرژیک قشری در شناخت و ادراک کاربرد دارد و بر نقص‌های ادراکی ایجاد شده در بیماری آلزایمر دلالت دارد (۱۸) از این رو در مطالعه حاضر، بر اساس تخریب ایجاد شده در NBM، شواهدی برای نقش آن در حافظه مرجع و کارکردی ارائه و سپس تاثیر درمان با اسیدفولیک و لوواستاتین به صورت مجزا و در تداخل با هم بر عملکردهای شناختی در موش‌های آلزایمری مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## روش بررسی

در این مطالعه تجربی تعداد ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی  $20 \pm 200$  در شروع آزمایش از مرکز تکثیر دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه شد. حیوانات تحت شرایط کنترل شده دمایی  $23 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰-۵۰ درصد و در یک چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. آب و غذا آزادانه در اختیار موش‌ها قرار گرفت. تمام آزمایش‌ها مطابق دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شدند. در روند اجرای آزمایش، کلیه ضوابط منشور اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی (شماره: ۳/۲۵۰/۹/۱۳، مورخ: ۳/۱۲/۹۰) (کد: ۱۳۹۰ الف ۹ ج ۱۸۰/۵۵) در مورد حیوانات رعایت گردید.

الف: گروه بندی حیوانات

موش‌ها به طور تصادفی به ۸ گروه ( $n=7$ ) تقسیم شدند: گروه کنترل، که تحت هیچ گونه عمل جراحی یا تزریق دارو قرار نگرفتند.

گروه تخریب (lesion)، موش‌هایی که جهت مدل آلزایمر هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه تخریب شد.

گروه شاهد تخریب (sham)، موش‌هایی که الکتروود بصورت دو طرفه به هسته NBM آن‌ها وارد شد، اما تخریبی ایجاد نکرد.

گروه تخریب + لوواستاتین، موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه با روش الکتریکی تخریب شد و به مدت ۵ روز داروی لوواستاتین (L) با دوز  $5 \text{ mg/kg}$  ۱، ۴۸ ساعت بعد از جراحی به صورت داخل صفاقی، دریافت نمودند.

گروه تخریب + اسیدفولیک، موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه با روش الکتریکی تخریب شد و به مدت ۵ روز اسیدفولیک (FA) با دوز  $5 \text{ mg/kg}$  نیم‌ساعت قبل از آموزش به صورت داخل صفاقی، دریافت نمودند. گروه تخریب + لوواستاتین- اسیدفولیک، موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه با روش الکتریکی تخریب شد و داروی لوواستاتین  $1 \text{ mg/kg}$  و

اسیدفولیک  $5 \text{ mg/kg}$  (L-FA)، به صورت داخل صفاقی، دریافت نمودند.

گروه تخریب - سالین (حلال اسیدفولیک)، موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه با روش الکتریکی تخریب شد و به مدت ۵ روز سالین (حلال دارو) را با حجم  $1 \text{ ml/kg}$ ، به صورت داخل صفاقی، دریافت نمودند.

گروه تخریب - 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) (حلال لوواستاتین)، موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه با روش الکتریکی تخریب شدند و به مدت ۵ روز، DMSO ۵ درصد را با حجم  $1 \text{ ml/kg}$ ، به صورت داخل صفاقی، دریافت کردند. همه گروه‌ها بعد از اتمام دوره تیمار با استفاده از ماز شعاعی هشت بازویی تحت آزمون اکتساب و یادآوری قرار گرفتند.

ب: ایجاد مدل آلزایمر با تخریب دو طرفه NBM

جهت تخریب هسته NBM، حیوانات آزمایشگاهی تحت بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین هیدروکلراید  $10 \text{ mg/kg}$  و زایلازین  $2 \text{ mg/kg}$  قرار گرفتند. برای تخریب این هسته، از دستگاه استریوتاکسی (شرکت stoelting، آمریکا) استفاده شد. مختصات مورد استفاده طبق اطلس پاکسینوس و واتسون عبارت بود از:  $AP = -1/3$  از برگما،  $ML = \pm 2/8$  از خط وسط و  $DV = 7/6$  از سطح سخت شامه (۱۹). بعد از قرار گرفتن الکتروود تک قطبی تخریبی در نقطه مورد نظر (جنس پلاتین، روکش تفلون، شرکت stoelting آمریکا) هسته NBM با استفاده از دستگاه تخریب ساز با شدت جریان  $5/$  میلی آمپر به مدت ۳ ثانیه، تخریب و مدل بیماری آلزایمر ایجاد گردید (۲۰).

دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی

ماز شعاعی هشت بازویی، از جنس پلاکسی گلاس برای بررسی حافظه فضایی مورد بررسی قرار گرفت. این ماز، متشکل از یک سکوی مرکزی (با قطر ۲۶ سانتی متر) و ۸ بازو با فواصل یکسان (طول ۵۰ سانتی متر، عرض ۱۰ سانتی متر) بود. علائم نشانه در محیط اطراف ماز وجود داشت که در طول دوره

یادآوری برای هر موش باقی می‌ماند. اتمام هر دور، زمانی بود که موش وارد هر ۴ بازو شده باشد. در فاصله بین دوره‌ها، غذا جایگزین و ماز تمیز گردید.

مرحله سوم، آزمون یادآوری (Recall) بود که ۷ روز بعد از اکتساب انجام گرفت. برای آزمون‌های اکتساب و یادآوری الگوی داخل شدن به بازوها برای محاسبه‌ی خطای حافظه مرجع (Reference memory error)، خطای حافظه کارکردی (Working memory error) و مدت زمان سپری شده در ماز مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در ماز شعاعی هشت بازویی، موش‌ها باید یاد بگیرند که حرکت کنند و جهت‌های خاصی را دنبال نمایند که غذا در انتهای آن بازو یافت می‌شود و اگر آن‌ها به انتهای بازوی مورد نظر رسیدند و غذا را خوردند، دیگر غذایی جایگزین آن نمی‌شود (اکتساب). در مقابل، بعد از یادگیری، در طول آزمون یادآوری، موش‌ها باید بازوهایی را که با استفاده از نشانه‌های فضایی در آن غذا یافته بودند، به یاد آورند و دوره آزمون را مطابق الگوی تعیین شده برای هر موش کامل نمایند (۱۷).

خطای حافظه کارکردی به عنوان ورود مجدد به یک بازو که در آن پاداش را در طول مراحل قبلی آزمایش دریافت کرده است، تعریف می‌شود. خطای حافظه مرجع، به عنوان ورود به بازوهایی که هرگز در آن طعمه‌گذاری صورت نگرفته است، اطلاق می‌شود (۲۳).

#### آنالیز آماری

برای انجام تست‌های آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید و به منظور مقایسه آماری برای عملکرد حافظه فضایی در دو آزمون اکتساب و یادآوری ماز شعاعی هشت بازویی، از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی Tukey استفاده گردید. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف استاندارد از میانگین گزارش گردید و سطح معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

خطای حافظه کارکردی و زمان سپری شده در ماز اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ). این نتایج بیانگر این است که ورود الکتروود به هسته NBM بدون القای جریان الکتریکی

آزمایش، در مکان‌های ثابتی قرار گرفته بودند. عملکرد بررسی حافظه فضایی در ماز شعاعی ۸ بازویی، به رابطه‌ای که موش‌ها بین نشانه‌ها در محیط و جایگاه پاداش برقرار می‌کنند، متکی است (۲۱). قبل از شروع آموزش، با محدود کردن غذا، وزن موش‌ها به ۸۵ درصد وزن اولیه رسید و این ۸۵-۸۰ درصد وزن طبیعی بدن در طول آزمون، با محدود کردن مقدار غذا حفظ شد. برای کمک به رشد موش‌ها، اجازه داده شد تا هر هفته ۵ گرم اضافه وزن داشته باشند. موش‌ها به خوردن تکه‌های کوچک طعمه (شکلات)، ابتدا در قفس انفرادی در طول مرحله کاهش وزن عادت داده شدند و سپس در طول آزمون ماز شعاعی هشت بازویی، تکه‌های کوچک طعمه به صورت روزانه و با وزن ۴۵ میلی گرم آماده شد (۲۲).

آزمون ماز شعاعی هشت بازویی، در ۳ مرحله آشنایی، اکتساب و یادآوری که در مجموع شامل ۲۰ دور بود، انجام شد؛ به این ترتیب که مرحله آشنایی و اکتساب دو بار در روز به فاصله ۲ ساعت و مرحله یادآوری ۳ بار در یک جلسه برای هر موش انجام شد.

در مرحله آشنایی که در دو روز انجام گرفت، همه بازوها با غذا طعمه‌گذاری شدند. این مرحله ابتدا به شکل گروهی و سپس انفرادی انجام گرفت. در آشنایی گروهی، روز اول اجازه داده شد ۳ موش هم‌زمان به مدت ۱۰ دقیقه ماز طعمه‌گذاری شده را جستجو کنند تا به دستگاه عادت کنند. در آشنایی انفرادی، روز دوم به هر موش ۵ دقیقه زمان داده شد تا همه بازوهای طعمه‌گذاری شده را جستجو کند. در این روش، موش در می‌یابد که بدست آوردن غذا با طی کردن کامل بازو میسر است.

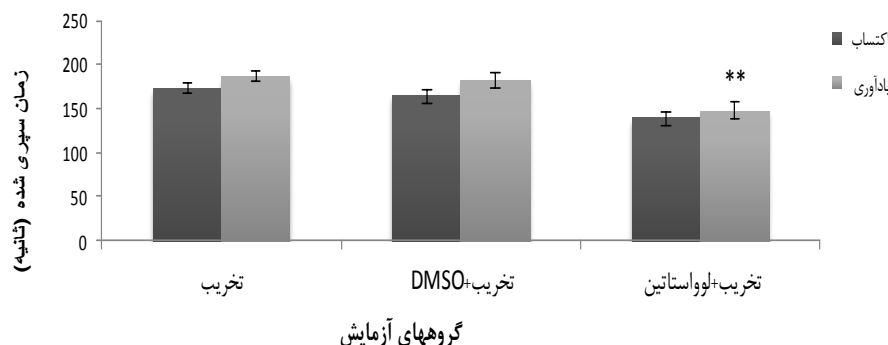
دومین مرحله، اکتساب (Acquisition) به دنبال مرحله آشنایی است. در طول ۵ روز دوره آموزش، ۴ بازو از ۸ بازو طعمه‌گذاری شد. الگوی طعمه‌گذاری به گونه‌ای انتخاب شد که سطح دشواری آن برای همه موش‌ها یکسان باشد. این الگو، در دوره‌های آموزش و

#### نتایج

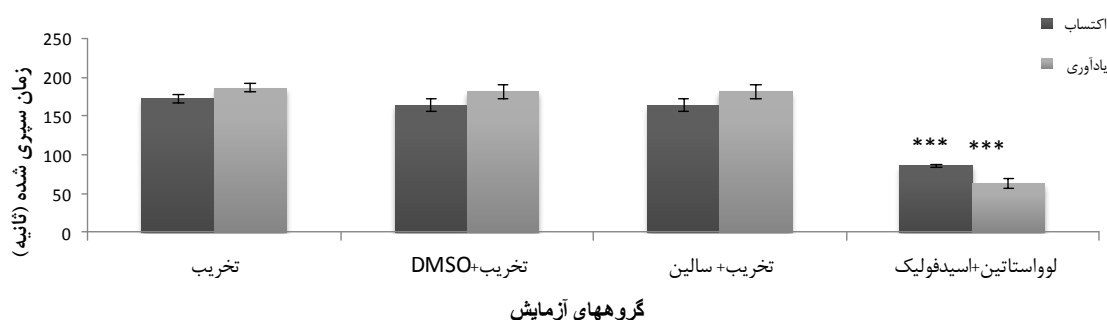
اثر تخریب هسته NBM بر حافظه فضایی مقایسه گروه‌های شاهد تخریب و کنترل در طول مرحله اکتساب و یادآوری برای پارامترهای خطای حافظه مرجع،

تخریب دو طرفه هسته NBM منجر به افزایش خطای حافظه مرجع ( $P < 0/001$ ) و کارکردی ( $P < 0/001$ ) در مرحله اکتساب و یادآوری درمقایسه با گروه کنترل گردید (نمودار ۱، نمودار ۲).

در مغز، اثری بر میزان خطای حافظه کارکردی و مرجع موش‌های صحرایی گروه شاهد تخریب در مقایسه با گروه کنترل نداشت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بیانگر این است که در گروه تخریب،



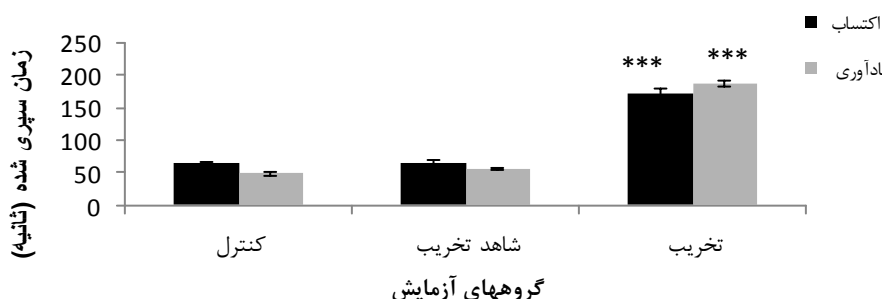
نمودار ۱: تاثیر تخریب هسته NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه ( $Mean \pm S.E.M$ ) بر اکتساب و یادآوری برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب و تخریب در مقایسه با گروه کنترل ( $*** P < 0/001$ )



نمودار ۲: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه کارکردی. مقایسه ( $Mean \pm S.E.M$ ) بر اکتساب و یادآوری برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب و تخریب در مقایسه با گروه کنترل ( $*** P < 0/001$ )

به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ( $P < 0/001$ ) (نمودار ۳).

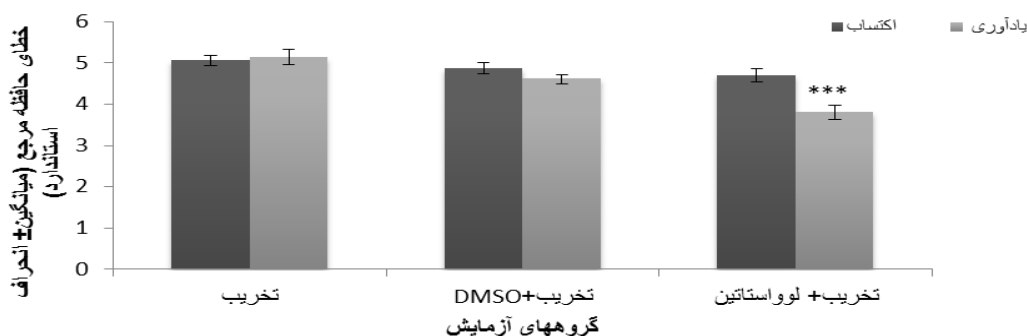
همچنین مدت زمان سپری شده برای یافتن طعمه‌ها در طول مرحله اکتساب و یادآوری در گروه تخریب NBM



نمودار ۳: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر زمان سپری شده. مقایسه ( $Mean \pm S.E.M$ ) بر اکتساب و یادآوری برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب و تخریب در مقایسه با گروه کنترل ( $*** P < 0/001$ )

معنی‌داری بر روی خطای حافظه مرجع در طی مرحله اکتساب اعمال نکرد ولی منجر به کاهش معنی‌داری خطای حافظه مرجع در مرحله یادآوری گردید ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۴).

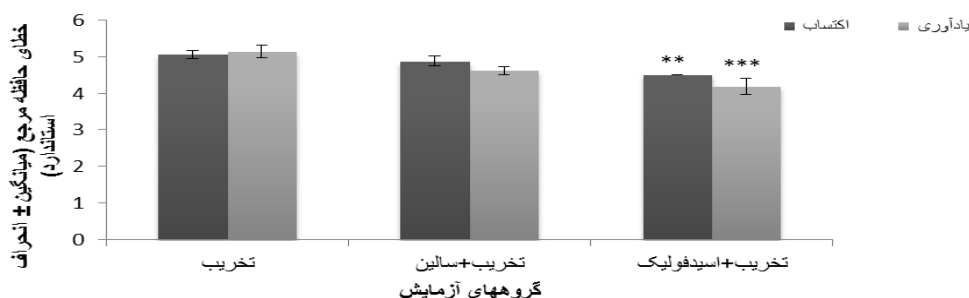
تاثیر تیمار لوواستاتین و اسیدفولیک بر پارامترهای حافظه فضایی بعد از تخریب هسته NBM  
آنالیز آماری یافته‌ها نشان داد که در گروه تخریب + لوواستاتین نسبت به گروه تخریب، تیمار با لوواستاتین اثر



نمودار ۴: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال دی متیل سولفوکساید DMSO و لوواستاتین در مقایسه با گروه تخریب در مقایسه با گروه تخریب ( $P < 0.001$ ) (\*\*\*)

مرجع در مرحله اکتساب نداشت ولی منجر به کاهش معنی‌دار خطاها در مرحله یادآوری گردید ( $P < 0.01$ ) (نمودار ۵).

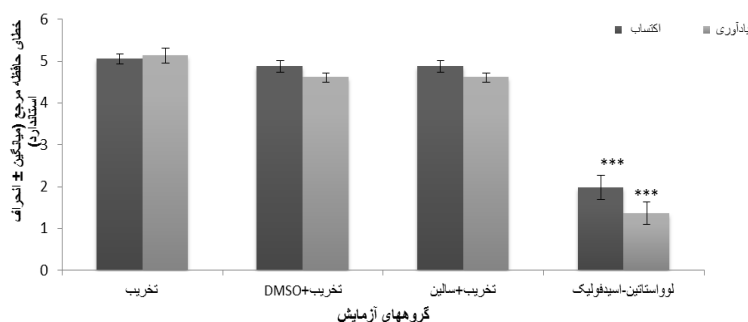
همچنین تجویز اسیدفولیک ۵mg/kg در رت‌های آلزایمری نسبت به گروه تخریب اثر معنی‌داری بر روی خطای حافظه



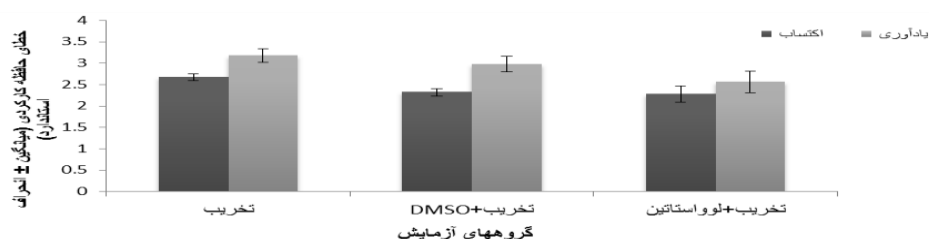
نمودار ۵: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال سالین و اسید فولیک در مقایسه با گروه تخریب ( $P < 0.001$ ) (\*\*)

حافظه کارکردی در مرحله اکتساب و یادآوری نسبت به گروه تخریب اختلاف معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۷ و نمودار ۸). اما تجویز توام اسید فولیک- لوواستاتین در مقایسه با گروه تخریب منجر به کاهش معنی‌دار خطای حافظه کارکردی در مرحله اکتساب و یادآوری گردید ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۹)

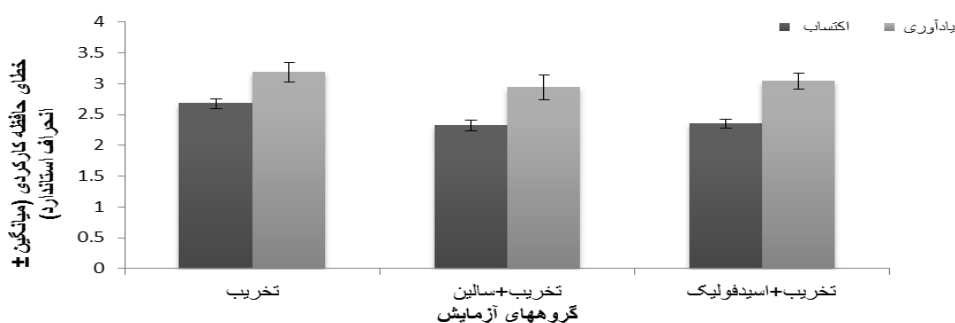
از طرف دیگر تجویز توام اسید فولیک-لوواستاتین در رت‌های آلزایمری در مقایسه با گروه تخریب منجر به کاهش معنی‌دار خطای حافظه مرجع در مرحله اکتساب و یادآوری گردید ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۶). از نظر خطای حافظه‌ی کارکردی، آنالیز آماری یافته‌ها نشان داد که در گروه‌های تخریب + لوواستاتین و تخریب + اسید فولیک میزان خطای



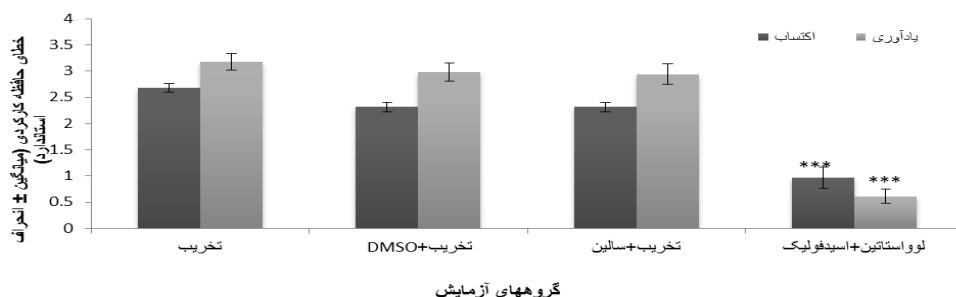
نمودار ۶: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال سالین، حلال دی متیل سولفوکساید DMSO و لوواستاتین-اسیدفولیک در مقایسه با گروه تخریب ( $P < 0.001$ ) (\*\*\*)



نمودار ۷: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه کارکردی. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال دی متیل سولفوکساید DMSO و لوواستاتین در مقایسه با گروه تخریب



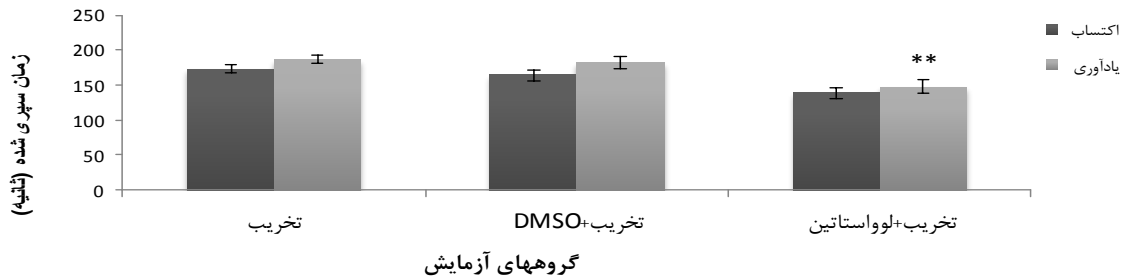
نمودار ۸: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال سالین و اسید فولیک در مقایسه با گروه تخریب



نمودار ۹: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال سالین، حلال DMSO و لوواستاتین-اسیدفولیک در مقایسه با گروه تخریب ( $P < 0.001$ ) (\*\*\*)

بر روی مدت زمان سپری شده در ماز در مرحله اکتساب مشاهده نشد اما منجر به کاهش معنی دار مدت زمان سپری شده در مرحله یادآوری گردید ( $P < 0/01$ ) (نمودار ۱۰).

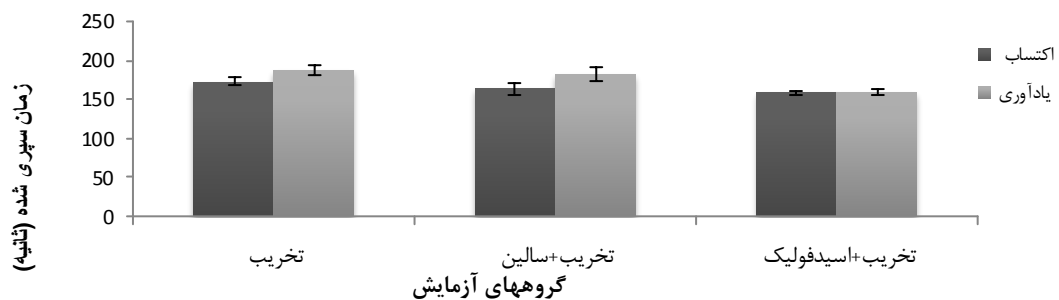
همچنین تفاوت معنی داری بین گروه‌ها از نظر زمان سپری شده برای یافتن طعمه‌ها مشاهده شد؛ به طوری که در گروه تخریب + لوواستاتین در مقایسه با گروه تخریب اثر معنی داری



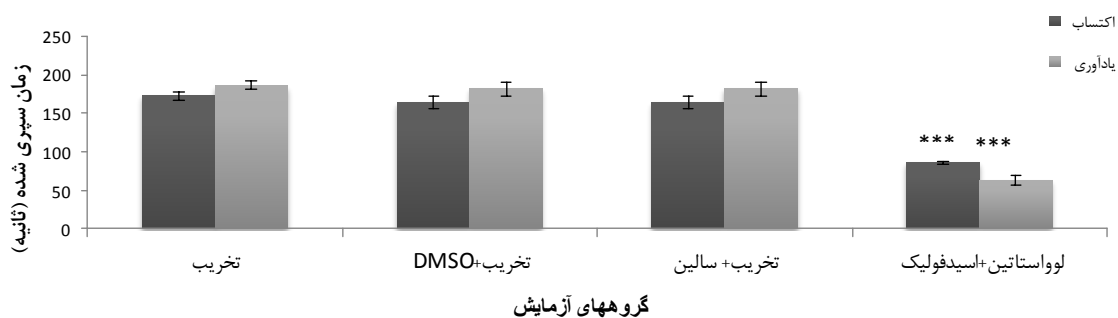
نمودار ۱۰: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه ( $Mean \pm S.E.M$ ) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال دی متیل سولفوکساید DMSO و لوواستاتین در مقایسه با تخریب ( $P < 0/01$ ) (\*\*)

توام لوواستاتین-اسیدفولیک در رت‌های آلزایمری در مقایسه با گروه تخریب منجر به کاهش معنی دار زمان سپری شده گردید ( $P < 0/001$ ) (نمودار ۱۲)

تجویز اسید فولیک در رت‌های آلزایمری در مقایسه با گروه تخریب اثر معنی داری بر روی مدت زمان سپری شده در مرحله اکتساب و یادآوری ایجاد نکرد (نمودار ۱۱). ولی تجویز



نمودار ۱۱: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه ( $Mean \pm S.E.M$ ) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال سالین و اسید فولیک در مقایسه با گروه تخریب



نمودار ۱۲: تاثیر تخریب هسته قاعده‌ای ماینرت NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه ( $Mean \pm S.E.M$ ) بر اکتساب و یادآوری در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال دی متیل سولفوکساید DMSO، حلال سالین و لوواستاتین-اسیدفولیک در مقایسه با گروه تخریب ( $P < 0/001$ ) (\*\*\*)



## بحث

بررسی‌ها در پرمات‌ها و جوندگان نشان داده است که عملکرد کولینرژیک قشری برای کسب حافظه جدید ضروری می‌باشد (۲۴). NBM منبع اولیه انشعاب کولینرژیک هیپوکامپ و کورتکس می‌باشد و فعالیت کولینرژیک قشری NBM در طی مراحل اولیه کسب حافظه‌ی کارکردی و ذخیره حافظه مرجع ضروری است (۲۵). نتایج حاصل از تحقیق کنونی نشان می‌دهد که تخریب الکتریکی دو طرفه NBM، منجر به کاهش حافظه فضایی در ماز شعاعی هشت بازویی می‌شود (نمودار ۱، ۲، ۳). زاهدی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که تخریب دو طرفه هسته NBM با استفاده از روش الکتریکی باعث کاهش حافظه فضایی در ماز آبی موریس و همچنین کاهش یادگیری اجتنابی فعال می‌گردد (۲۶). همچنین ربیعی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که تخریب دو طرفه هسته NBM با روش الکتریکی باعث کاهش یادگیری اجتنابی غیر فعال در دستگاه شاتل باکس می‌شود (۲۷). بنابراین گزارشات ارائه شده نشان دهنده کاهش یادگیری و حافظه متعاقب تخریب دو طرفه هسته NBM می‌باشند که این مطالب در تأیید نتایج حاصل از این پژوهش می‌باشد.

در ادامه این کار پژوهشی تزریق لوواستاتین ۱ mg/kg به حیوانات آلزایمری نتوانست منجر به بهبودی حافظه مرجع و کارکردی در طول مراحل آموزش گردد. پارک و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که تیمار موش‌های سوری (۲۵۷۹Tg) مدل بیماری آلزایمر که با غذای استاندارد آزمایشگاهی حاوی لوواستاتین ۰/۲-درصد به مدت ۳ هفته تیمار شدند منجر به کاهش کلسترول پلاسما، افزایش تولید بتا آمیلوئید و رسوب پلاک‌های پیری در مغز این حیوانات می‌گردد. نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که کاهش کلسترول ممکن است یک فاکتور خطر برای آلزایمر در این حیوانات باشد (۲۸). بایتون و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که تیمار موش‌های صحرایی سالم به مدت ۴۵ روز به صورت خوراکی با سیموواستاتین موجب نقص در حافظه فضایی با استفاده از ماز بارنز می‌شود (۲۹). هرچند که دولگا و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند پیش

تیمار موش‌های سوری با لوواستاتین قبل از تخریب NBM با NMDA باعث بهبود حافظه فضایی در دستگاه ماز Y شکل می‌شود (۳۰). همچنین زاو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که تیمار با لوواستاتین به طور برجسته‌ای نقایص حافظه و یادگیری را در رت‌های لیژن NBM با ایپوتونیک اسید در تست ماز آبی موریس تخفیف می‌دهد و منجر به افزایش فعالیت آنزیم کولین استیل ترانسفراز (ChAT) در قشر فرونتال و هیپوکامپ گردید (۳۱). همچنین در کار پژوهشی ما موش‌های آلزایمری تحت تیمار با اسید فولیک ۵mg/kg قرار گرفتند، اما تیمار با اسیدفولیک به تنهایی اثر معنی‌داری در جهت بهبود حافظه مرجع و کارکردی اعمال نکرد اما تجویز توام لوواستاتین ۱ mg/kg و اسیدفولیک ۵mg/kg منجر به کاهش معنی دار خطاهای مرجع و کارکردی و بهبود حافظه فضایی گردید.

بررسی‌ها نشان داده است که کمبود فولات یک عامل خطر برای کاهش شناختی و AD است (۳۲). همچنین در بیماران مبتلا به AD، کاهش سطح فولات در سرم و مایع مغزی نخاعی مشاهده شد (۳۳). کمبود فولات باعث افزایش سطح هموسیستئین از طریق مسیرهای گوناگون می‌شود. مطالعات نشان داده است که بالا بودن سطح هموسیستئین خون موجب آسیب یادگیری و حافظه می‌گردد؛ که احتمال دارد این امر از طریق مهار فعالیت پمپ Na/K/ATPase، افزایش استرس اکسیداتیو مغز و افزایش مرگ برنامه ریزی شده باشد (۳۴). بررسی‌ها نشان داد که مصرف اسیدفولیک باعث پائین آمدن سطح هموسیستئین می‌گردد. مشخص شده است که کمبود اسید فولیک، که میزان آن در خون مبتلایان به آلزایمر نیز کاهش چشمگیری می‌نماید، به طور قابل توجهی نورون‌ها را در هیپوکامپ موش بالغ مهار می‌کند و بر متابولیسم نوروترنسمیترهایی مانند استیل کولین موثر است (۳۵). اسیدفولیک نقش مهمی در متیلاسیون مجدد هموسیستئین به متیونین و سنتز S-آدنوزیل-متیونین، اهداکننده متیل‌بیولوژیک در واکنش‌های متیلاسیون، دارد. کاهش متیلاسیون DNA در

لوواستاتین - اسیدفولیک بر روی حافظه کارکردی و مرجع در موش های صحرایی آلزایمری می باشد، در بررسی های بعدی می توان در کنار مطالعه حافظه مرجع و کارکردی، میزان مهار آنزیم و یا سطح استیل کولین را مورد بررسی قرار داد.

#### نتیجه گیری

در این پژوهش تخریب دو طرفه NBM منجر به کاهش حافظه فضایی گردید. گرچه، تجویز لوواستاتین و اسیدفولیک به تنهایی اثر مثبتی بر حافظه مرجع، کارکردی و مدت زمان سپری شده در ماز ایجاد نکرد اما تجویز توام اسیدفولیک - لوواستاتین منجر به بهبود پارامترهای حافظه فضایی در ماز شعاعی هشت بازویی گردید.

#### سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر همکاری و مساعدت در انجام این پروژه علمی - پژوهشی کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

طول فقدان فولات باعث تغییر بیان ژن می شود و بنابراین ممکن است یکپارچگی ژنوم را مختل کند (۳۶). علاوه بر این شواهد قوی دال بر اثرات آنتی اکسیدانی اسیدفولیک وجود دارد. اسیدفولیک یک کوفاکتور ضروری برای سنتز اندوژن کوآنزیم Q<sub>10</sub>، یک آنتی اکسیدان قوی، است و هر گونه نقص اسیدفولیک منجر به کاهش کوآنزیم Q<sub>10</sub> می شود (۳۷). همچنین بررسی ها نشان داده است که پیش تیمار با کوآنزیم Q<sub>10</sub>، فعالیت استیل کولین استراز را در موش های با نقص حافظه القایی توسط تزریق داخل بطنی استرپتوزوتوسین کاهش می دهد؛ این نتایج پیشنهاد کننده اثر حفاظت کننده نورونی کوآنزیم Q<sub>10</sub> بر روی نورون های کولینرژیک می باشد (۳۸). از محدودیت های مطالعه حاضر، عدم بررسی میزان مهار آنزیم کولین استیل ترانسفراز و یا سنجش سطح استیل کولین مغز به واسطه تجویز لوواستاتین و اسیدفولیک در رت های آلزایمری می باشد. هر چند نتایج این مطالعه بیانگر اثرات مفید

#### References:

- 1- Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. *Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data*. Lancet Neurol 2014; 13(8):788-94.
- 2- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. Lancet 2005; 366: 2112-17.
- 3- Davis CP, Franklin LM, Johnson GS, Schrott LM. *Prenatal oxycodone exposure impairs spatial learning and/or memory in rats*. Behav Brain Res 2010; 212: 27-34.
- 4- Cutuli D, Bartolo P, Caporali P, Tartaglione AM, Oddi D, Nobili A. *Neuroprotective effects of donepezil against cholinergic depletion*. Alzheimer's Res and Therapy 2013; 5(50): 50.
- 5- Dumas JA, Newhouse PA. *The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation*. Pharmacol Biochem Behav 2011; 99(2): 254-61.
- 6- Easton A, Sankarana Rayanan S, Tanghe A, Terwel D, Lin AX, Hoane N. *Effects of sub-chronic donepezil on brain Aβ and cognition in a mouse model of alzheimer's disease*. Psychopharmacology 2013; 230(2): 279-89.

- 7- Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. *Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection streptozotocin in rats*. Behav Brain Res 2006; 171(1): 9-16.
- 8- Ishrat T, Parveen K, Khan MM, Khuwaja G, Khan MB, Yousuf S, et al. *Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type*. Brain Res 2009; 1281:117-27.
- 9- Weinstein SJ, Hartman TJ, Stolzenberg-Solomon R, Pietinen P, Barrett MJ, Taylor PR. *Null association between prostate cancer and serum folate, vitamin B(6), vitamin B(12), and homocysteine*. Cancer Epi Biomarkers Prev 2003; 12(11):1271-72.
- 10- Singh R, Kanwar SS, Sood PK, Nehru B. *Beneficial effects of folic acid on enhancement of memory and antioxidant status in aged rat brain*. Cell Mol Neurobiol 2011; 31(1):83-91.
- 11- Reisi P, Babri S, Alaei H, Sharifi MR, Mohaddes G, Lashgari R. *Effects of treadmill running on short-term pre-synaptic plasticity at dentate gyrus of streptozotocin-induced diabetic rats*. Brain Res 2008; 1211: 30-6. [Persian]
- 12- Peng W, Yang J, Yang B, Wang L, Xiong X, Liang Q. *Import of statins on cognitive deficits in adult male rodents after traumatic brain injury: a systematic review*. Biomed Res Inter 2014; 13.
- 13- Asahi M, Huang Z, Thomas S, Yoshimura S, Sumii T, Mori T, et al. *Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Met 2005; 25(6): 722-9.
- 14- Schmeer C, Kretz A, Isenmann S. *Statin-mediated protective effects in the central nervous system: general mechanisms and putative role of stress proteins*. Restor Neurology and Neurosci 2006; 24 (2): 79-95.
- 15- Li R, Xu D, Ma T. *Lovastatin suppresses the aberrant tau phosphorylation from FTDP-17 mutation and okadaic acid-induction in rat primary neurons*. Neurosci 2015; 294: 14-20.
- 16- Dabir N, Moazedi AA, Haghparast A, Khajepour L, Akhoond M. *Effects of estrogen therapy on cognitive performance deficit induced by nucleus basalis magnocellularis lesion: animal model of alzheimer's disease*. JIMS 2016; 370(34): 64-73. [Persian]
- 17- Szigeti C, Bencsik N, Simonka AJ, Igradi A, Kasa P. *Long term effects of selective immunolesions of cholinergic neurons of the nucleus basalis magnocellularis on the ascending cholinergic pathways in the rats: a model for alzheimer's disease*. Brain Res Bull 2013; 94: 9-16.
- 18- Mans RA, Chowdhury N, Cao D, McMahon LL, Li L. *Simvastatin enhances hippocampal long-potentialiation in C57BL/6 mice*. Neurosci 2010; 166(2): 435-44.
- 19- Mendoza-Oliva A, Ferrera P, Fragoso-Medina J, Arias C. *Lovastatin differentially affects neuronal cholesterol and amyloid- $\beta$  production in vivo and in vitro*. CNS Neurosci Therap 2015; 21(8): 631-41.

- 20-Luine VN, Frankfurt M. *Estrogen facilitate memory processing through membrane mediated mechanisms and alterations in spike density*. Front Neuroend 2012; 33 (4): 388-402.
- 21-Davis CP, Franklin LM, Johnson GS, Schrott LM. *Prenatal oxycodone exposure impairs spatial learning and/or memory in rats*. Behav Brain Res 2010; 212 (1): 27-34.
- 22-Cosquer B, Vasconcelos AP, Frohlich J, Cassel JC. *Blood-brain barrier and electromagnetic fields: effects of scopolamine methylbromide on working memory after whole body exposure to 2.45 GHZ microwaves in rats*. Behav Brain Res 2005; 161(2): 229-37.
- 23-Liu P, Bilkey D.K. *The effect of NMDA lesions centered on the postrhinal cortex on spatial memory tasks in the rat*. Behav Neurosci 2002; 116 (5): 860-73.
- 24-Wicke JG, Kahan J, Zrinzo L, Hariz M, Limousin P. *The nucleus basalis of mynert: a new target for deep brain stimulation in dementia?* Neurosci Behav Rev 2013; 37 (10 pt 2): 2676-88.
- 25-Nyakas C, Granic L, Halmy L, Banerjee P, Luiten G. *The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid  $\beta$ A-42 with memantine*. Behav Brain Res 2011; 221(2): 594-603.
- 26-Zahedi M, Hojjati MR, Fathpour H, Rabiei Z, Alibabaei Z. *Effect of rheum ribes hydro-alcoholic extract on memory impairments in rat model of Alzheimer disease*. I J Pharm Res 2015; 14(4): 1197-1206.
- 27-Rabiei Z, Rafieian-kopaei M, Heidarian E, Saghaei E, Mokhtari S. *Effects of Zizyphus jujube extract on memory and learning impairment Induced by bilateral electric lesions of the nucleus basalis of meynert in rat*. Neurochem Res 2014; 39(2): 353-60.
- 28-Park H, Hwang M, Honga H, Booa J, Oha S, Lee J, et al. *Lovastatin enhances A production and senile plaque deposition in female Tg2576 mice*. Neurobiol Aging 2003; 24(5): 637-43.
- 29-Baytan SH, Alkanat M, Okuyan M, Ekinici M, Gedikli E, Ozeren M. *Simvastatin impairs spatial memory in rats at a specific dose level*. Tohoku J Exp Med 2008; 214(4): 341-9.
- 30-Dolga AM, Nijholt I, Ostroveanu A, Bosch Q. *Lovastatin induced neuroprotection through tumor necrosis factor receptor 2 signaling pathway*. J alzheimers dis 2008; 13 (2): 111-22.
- 31-Zhao Z, Zhao S, Xu N, Yu C, Guan S, Liu X, Huang L. *Lovastatin improves neurological outcome after neucleus basalis magnocellularis lesion in rats*. Neurosci 2010; 167 (3): 954-963.
- 32-Hinterberger M, Fischer P. *Folate and Alzheimer: when time matters*. J Neural Transm 2013; 120(1):211-224
- 33-Agarwal R, Chhillar N, Kushwaha S, Singh NK, Tripathi CB. *Role of vitamin B(12), folate, and thyroid stimulating hormone in dementia: a hospital-based study in north Indian population*. Ann Indian Acad Neurol 2010; 13: 257-62

- 34-Arlt S, Schwedhelm E, Kölsch H, Jahn H, Linnebank M, Smulders Y. *Dimethylarginines, homocysteine metabolism, and cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis. 2012; 31(4): 751-8.
- 35-Ernster L, Dallner G. *Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function*. Biochim Biophys Acta 1995; 1271: 195-204.
- 36- Kronenberg G, Harms CH, Sobol RW, Cardozo-Pelaez F, Linhart H, Winter B. *Folate Deficiency Induces Neurodegeneration and Brain Dysfunction in Mice Lacking Uracil DNA Glycosylase*. J Neurosci 2008; 28(28): 7219-30
- 37-Folkers K. *Relevance of the biosynthesis of coenzyme Q10 and the four bases of DNA as a rationale for the molecular causes of cancer and a therapy*. Biochem Biophys Res Commun 1996; 224(2): 358-61.
- 38- Cummings JL. *The role of cholinergic agents in the management of behavioural disturbances in Alzheimer's disease*. Int J Neuropsychopharmacol 2000; 3(7): 21-9.

## Effect of co-administration of lovastatin and folic acid on cognitive impairment due to bilateral electrical lesion of nucleus basalis magnocellularis in the Alzheimer's disease model in adult male rats

Azade Eskandary\*<sup>1</sup>, Ahmad Ali Moazedi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PhD student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 2 Des 2017

Accepted: 14 Oct 2017

### Abstract

**Introduction:** Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative diseases in the brain. The aim of this study was to evaluate the effect of lovastatin and folic acid on cognitive deficit by induced lesion in nucleus basalis magnocellularis

**Methods:** In this experimental study, 56 male Wistar rats were randomly divided into 8 groups: (7 rat in each group): control(intact), Nucleus basalis magnocellularis (NBM) lesion group, which received electrically- induced lesion (0.5 m A, 3s) in NBM, Sham group ( the electrode was impaled in to the NBM with no lesion), lovastatin group (NBM lesion + lovastatin 1mg/kg), folic acid group (NBM lesion+ folic acid 5mg/kg), interaction group( NBM lesion+ lovastatin-folic acid), saline group( NBM lesion + saline) and Dimethyl sulfoxide (DMSO) group (NBM lesion + DMSO 5%). Acquisition and retention testing was done by using an eight-radial arm maze, in which, the patterns of arm entries in each group for calculating working memory errors, reference memory error and latency were recorded. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test

**Results:** Results showed that there was a significant difference between the control and lesion groups in the parameters of the reference memory error, working memory error and elapsed time ( $P < 0.05$ ). Co-administration of lovastatin - folic acid resulted in a reduction in the reference and working memory error and the time spent in the eight-arm radial laser maze compared with lesion group

**Conclusion:** According to the results, co-administration of folic acid and lovastatin had a positive effect on spatial memory of Alzheimer's rats.

**Keywords:** Alzheimer disease, Nucleus Basalis Magnocellularis, lovastatin, folic acid, radial maze

This paper should be cited as:

Eskandary A, Moazedi AA. Effect of co-administration of lovastatin and folic acid on cognitive impairment due to bilateral electrical lesion of nucleus basalis magnocellularis in the Alzheimer's disease model in adult male rats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2018; 25(11): 907-20.

\*Corresponding author: Tel: 09163608155, email: azade.eskandary@gmail.com