

The effect of lovastatin on cognition impairment induced by bilateral electrical lesion of nucleus basalis magnocellularis in the Alzheimer's disease model in adult male rats

Eskandary A^{1*}, Moazedi AA¹, Najaph Zade Varzi H², Ghadery Pakdel F³, Akhond MR⁴

1- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I. R. Iran.

2- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I. R. Iran.

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

4- Department of Statistics, Faculty of Mathematical Science and Computer, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I. R. Iran.

Received December 4, 2016; Accepted September 25, 2017

Abstract:

Background: Statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, are widely used as medication to lower cholesterol levels in human patients. Much evidence indicates that statins can also exert neuroprotective actions. So, this study aimed at examining the effect of lovastatin on cognition deficit induced by bilateral electrical lesion of nucleus basalis magnocellularis (NBM) in the Alzheimer's disease model in adult male rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 56 adult male wistar rats were divided into 8 groups (n=7): control (intact), NBM lesion group (which received electrically-induced lesion 0.5 mA in 3s), sham group (the electrode was impaled into the NBM with no lesion), lovastatin groups (lesion+1, 5, 10, 20 mg/kg) and DMSO 5% 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 were recorded for calculating working memory errors, reference memory error and latency in each group.

Results: The bilateral NBM lesion resulted in significant reduction of spatial memory in acquisition and retention tests in the form of increased working and reference memory errors compared to the control group ($P<0.05$). Post-lesion treatment with lovastatin improved the parameters of spatial memory errors in the acquisition and retention tasks compared to the lesion group.

Conclusion: The electrical NBM lesion can reduce spatial memory function and the lovastatin therapy after brain injury improved cognitive disorders. It seems that lovastatin by reducing the activity of the acetylcholinesterase enzyme and increasing acetylcholine transferase enzyme activity can cause improvement in learning and memory capability.

Keywords: Alzheimer's disease, Nucleus basalis magnocellularis, Cognitive performance, Radial maze, Lovastatin

* Corresponding Author.

Email: azade.eskandary@gmail.com

Tel: 0098 916 360 8155

Fax: 0098 61 333 31045

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2017; Vol. 21, No 5, Pages 422-432

Please cite this article as: Eskandary A, Moazedi AA, Najaph Zade Varzi H, Ghadery Pakdel F, Akhond MR. The effect of lovastatin on cognition impairment induced by bilateral electrical lesion of nucleus basalis magnocellularis in the Alzheimer's disease model in adult male rats. *Feyz* 2017; 21(5): 422-32.

شرایط کنترل شده دمایی 23 ± 3 درجه سانتیگراد و رطوبت ۵۰-۴۰ 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.

حیوانات:

موش‌ها به‌طور تصادفی و به شرح ذیل به ۸ گروه ($n=7$) تقسیم شدند: گروه کنترل که تحت هیچ‌گونه عمل جراحی یا تزریق دارو قرار نگرفتند. گروه تخریب؛ موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به‌صورت دوطرفه با روش الکتریکی تخریب شد. گروه شاهد تخریب؛ موش‌هایی که الکترود به‌صورت دوطرفه به هسته NBM آن‌ها وارد شد، اما تخریبی ایجاد نکرد. گروه‌های تخریب-لوواستاتین: موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به‌صورت دوطرفه و با روش الکتریکی تخریب شده و ۴۸ ساعت بعد از جراحی به‌مدت ۵ روز داروی لوواستاتین را به‌ترتیب با مقادیر ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی دریافت نمودند [۲۰]. گروه تخریب-حلال (DMSO ۵ درصد)؛ موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر هسته NBM آن‌ها به‌صورت دوطرفه با روش الکتریکی تخریب شده و ۴۸ ساعت بعد از جراحی به‌مدت ۵ روز، DMSO ۵ درصد را (حلال دارو) دریافت کردند. همه گروه‌ها بعد از اتمام دوره تیمار با استفاده از ماز شعاعی هشت‌بازویی تحت آزمون اکتساب و یادآوری قرار گرفتند.

ایجاد مدل آلزایمر با تخریب دوطرفه NBM:

جهت تخریب هسته NBM، حیوانات آزمایشگاهی تحت بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین هیدروکلراید ۱۰ درصد (78 mg/kg) و زایلازین ۲ درصد (3 mg/kg) قرار گرفتند. برای تخریب این هسته از دستگاه استریوتاکس (شرکت Stoelting، آمریکا) استفاده شد. مختصات مورد استفاده (میلی‌متر) 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 [۲۱]. بعد از قرارگرفتن الکترود تک‌قطبی تخریبی در نقطه مورد نظر (از جنس پلاتین با روکش تفلون، شرکت Stoelting آمریکا) هسته NBM با استفاده از دستگاه تخریب ساز (Lesion maker) با شدت جریان ۰/۵ میلی‌آمپر به‌مدت ۳ ثانیه، تخریب شده و مدل بیماری آلزایمر ایجاد گردید [۲۲]. یک هفته بعد از جراحی، آزمون رفتاری با استفاده از

از بین می‌روند. همچنین، ارتباط قوی بین کاهش نورونی NBM، نقص کولینرژیک قشری و درجه نقایص شناختی وجود دارد [۸،۷]. مطالعات نشان داده‌اند که در موش‌های با تخریب NBM مارکرهای کولینرژیک مغز مثل آزاد شدن استیل کولین، فعالیت کولین استیل ترانسفراز (Choline acetyl transferase; ChAT) کاهش یافته، یادگیری و حافظه مختل می‌گردد [۹]. استاتین‌ها، مهارکننده‌های رقابتی ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز، معمولاً برای درمان هایپرکلسترولمی به‌کار می‌روند. شواهد روبه-رشدی نشان می‌دهد که این گروه از داروها اثرات مفیدی را بر اختلالات نورولوژیک از جمله بیماری آلزایمر، آسیب ترومای مغزی و سکتة اعمال می‌نمایند [۱۰]. استاتین‌ها جدای از خواص پائین‌آوردن‌گی کلسترول، دارای چندین اثر مستقل از کلسترول شامل اثرات آنتی‌ترومبوتیک، ضدالتهابی و تحریک سنتز نیتریک اکساید نیز می‌باشند [۱۱]. تیمار با استاتین‌ها منجر به افزایش تولید α Soluble amyloid precursor protein (s-APP α) و کاهش تولید $A\beta$ می‌گردد. اخیراً گزارش شده است که استاتین‌ها بار کلافه‌های نوروفیبریلاری را در موش‌های مدل تائوپاتی کاهش می‌دهند و همچنین فسفوریلاسیون تائو را تنظیم می‌نمایند [۱۲]. استاتین‌ها وقایع سمی که از طریق $A\beta$ پیش برده می‌شوند مثل آسیب سیناپسی و مرگ نورونی را ممانعت می‌نمایند [۱۳،۱۴]. بخشی از مطالعات کاهش در سطح پپتید بتا آمیلوئید را بعد از تیمار با استاتین‌ها نشان داده‌اند [۱۵]. سیموواستاتین منجر به افزایش نورونز، سرکوب آپوپتوز، بهبود آسیب ثانویه مغزی و تضعیف فعالیت میکروگلیاها و آستروسیت‌ها می‌شود [۱۶]. سیمو-واستاتین و آتورواستاتین منجر به نورونز و مهار مرگ نورونی شده و لوواستاتین منجر به کاهش التهاب می‌شود [۱۷]. علاوه بر این، لوواستاتین، سیموواستاتین و آتورواستاتین اختلالات شناختی ایجاد شده توسط آسیب ترومای مغزی را ترمیم می‌نمایند [۱۸]. الگوهای تخریب هسته NBM در مطالعه نقش سیستم کولینرژیک قشری در شناخت و ادراک کاربرد داشته و بر نقص‌های ادراکی ایجاد شده در بیماری آلزایمر دلالت دارد [۱۹]. ازاین‌رو، در این کار پژوهشی با تخریب دوطرفه هسته NBM، شواهدی برای نقش آن در حافظه فضایی ارائه شد. و سپس، تاثیر درمان با لوواستاتین بر عملکردهای شناختی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه تجربی، ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی 20 ± 200 گرم از مرکز تکثیر دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه شد. حیوانات تحت

دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی آغاز گردید.

دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی

این دستگاه از جنس پلکسی گلاس بوده و متشکل از یک سکوی مرکزی (با قطر ۲۶ سانتی متر) و ۸ بازو با فواصل یکسان (طول ۵۰ و عرض ۱۰ سانتی متر) بود. علائم نشانه در محیط اطراف ماز وجود داشت که در طول دوره آزمایش در مکان‌های ثابتی قرار گرفته بودند. عملکرد بررسی حافظه فضایی در ماز هشت بازویی شعاعی به رابطه‌ای که موش‌ها بین نشانه‌ها در محیط و جایگاه پاداش برقرار می‌کنند، متکی است. از این جهت، بیان‌گر یادگیری فضایی است [۲۳]. قبل از شروع آموزش، با محدود کردن غذا وزن موش‌ها به ۸۵ درصد وزن اولیه رسید و این میزان 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 [۲۴]. در طول مرحله کاهش وزن، ابتدا موش‌ها به خوردن تکه‌های کوچک طعمه (شکلات) عادت داده شدند و سپس در طول آزمون ماز، تکه‌های کوچک طعمه به صورت روزانه و با وزن ۴۵ میلی گرم آماده شد [۲۵، ۲۴]. آزمون ماز شعاعی هشت بازویی، در ۳ مرحله آشنایی، اکتساب و یادآوری که در مجموع شامل ۲۰ دور بود، انجام شد؛ بدین ترتیب که مرحله آشنایی و اکتساب ۲ 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 ۲ روز انجام گرفت، همه بازوها با غذا طعمه‌گذاری شدند. این مرحله ابتدا به شکل گروهی و سپس انفرادی انجام گرفت. در روز اول، آشنایی گروهی، اجازه داده شد ۳ موش هم‌زمان به مدت ۱۰ دقیقه ماز طعمه‌گذاری شده را جستجو کرده تا به دستگاه عادت کنند. در روز دوم، آشنایی انفرادی، به هر موش ۵ دقیقه زمان داده شد تا همه بازوهای طعمه‌گذاری شده را جستجو کند. دومین مرحله، اکتساب 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 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 شده و ماز تمیز گردید. مرحله سوم، آزمون یادآوری بود که ۷ روز بعد از اکتساب انجام گرفت. برای آزمون‌های اکتساب و یادآوری خطای حافظه مرجع، خطای حافظه کارکردی 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 کزده 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 و در طول آزمون یادآوری موش‌ها باید بازوهایی را که با استفاده از نشانه‌های فضایی در آن غذا یافته بودند، به یاد آورده و دوره آزمون را مطابق الگوی تعیین شده برای هر موش کامل می‌کردند [۲۳، ۱۳]. خطای حافظه کارکردی (Working memory error) به عنوان ورود مجدد به یک بازو که در آن حیوان پاداش را در طول مراحل قبلی آزمایش دریافت کرده است، تعریف می‌شود. خطای حافظه مرجع (Reference memory error) به عنوان ورود به بازوهایی که هرگز در آن طعمه‌گذاری صورت نگرفته باشد، اطلاق می‌شود [۲۶].

آنالیز آماری

برای انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید و به منظور مقایسه آماری کلیه پارامترها در همه گروه‌ها از آنالیز واریانس چندمتغیره و برای مقایسه هریک از پارامترها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی Tukey استفاده گردید. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف استاندارد از میانگین ($Mean \pm S.E.M$) ارائه گردید و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر تخریب هسته NBM بر حافظه فضایی

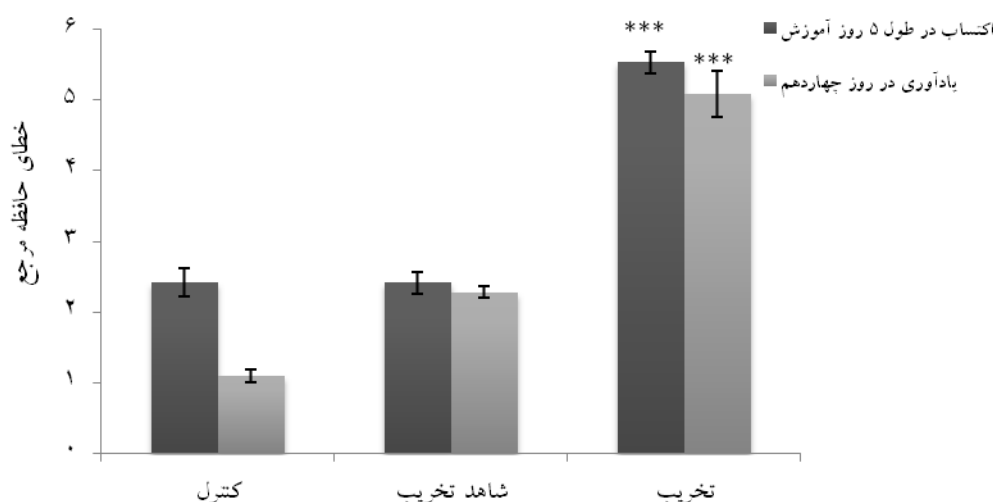
نتیجه آزمون Wilks Lambda در آنالیز واریانس چند-متغیره نشان داد که گروه‌ها از نظر متغیرهای مورد بررسی تفاوت معنی‌دار باهم دارند ($P < 0.001$). مقایسه گروه‌های شاهد تخریب و کنترل در طول دوره اکتساب و یادآوری برای پارامترهای مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$). این نتایج بیان‌گر این است که ورود الکتروود به هسته NBM بدون القای جریان الکتریکی در مغز، اثری بر میزان خطای حافظه کارکردی و مرجع موش‌های صحرایی گروه شاهد تخریب در مقایسه با گروه کنترل نداشته است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بیان‌گر این است که تخریب دوطرفه هسته NBM با القای جریان الکتریکی منجر به تخریب روند اکتساب و به‌خاطرآوری حافظه فضایی می‌گردد؛ به‌طوری‌که در طی آزمون اکتساب و یادآوری افزایش خطای حافظه مرجع ($P < 0.001$) و خطای حافظه کارکردی ($P < 0.001$) در روند آموزش و مرحله یادآوری در

گروه تخریب در مقایسه با کنترل مشاهده شد (نمودار ۱-A، نمودار ۱-B). همچنین، مدت زمان سپری شده برای یافتن طعمه-ها در طول مرحله اکتساب در گروه تخریب NBM به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ($P < 0.001$) و در آزمون به یادآوری نیز انتخاب بازوها همراه با تاخیر بود (نمودار ۱-C و جدول شماره ۱).

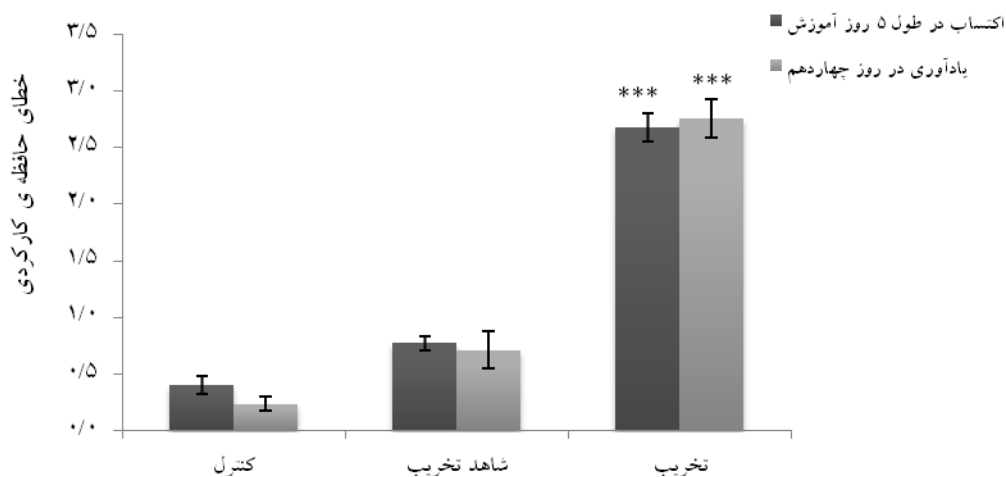
تأثیر لوواستاتین بر حیوانات بعد از تخریب هسته NBM

تجویز لوواستاتین طی مرحله اکتساب در موش‌های صحرایی آلزایمری منجر به بهبود حافظه مرجع در مقایسه با گروه تخریب شد؛ به طوری که از نظر خطای حافظه مرجع در روند اکتساب در گروه‌های تخریب تحت تیمار با لوواستاتین سطح معنی داری برای دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم $P < 0.01$ و برای دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم $P < 0.001$ بود، اما دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی داری را با گروه تخریب نشان نداد ($P > 0.05$). همچنین، طی روند به یادآوری سطح معنی داری برای دوزهای ۱ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب $P < 0.01$ و $P < 0.05$ و برای دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر

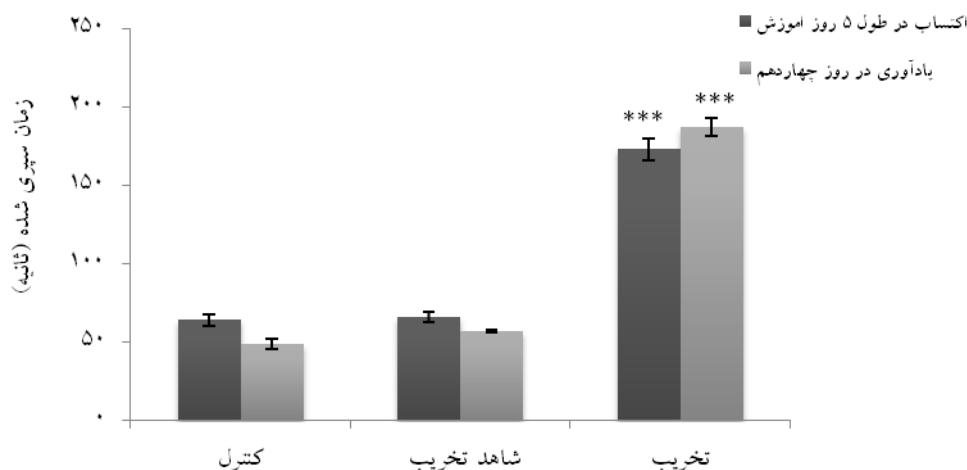
کیلوگرم $P < 0.001$ بود (نمودار ۲-A). از نظر خطای حافظه کارکردی، در مرحله اکتساب گروه‌های تحت تیمار با لوواستاتین با دوز ۱، ۵، ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی داری با گروه تخریب نشان ندادند، اما سطح معنی داری برای دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم $P < 0.001$ بود. همچنین، طی روند به یادآوری دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی داری نشان نداد، اما سطح معنی داری برای دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.05$ بود (نمودار ۲-B). همچنین، تفاوت معنی دار بین گروه‌ها از نظر زمان سپری شده برای یافتن طعمه‌ها مشاهده شد؛ به طوری که در روند اکتساب گروه تحت تیمار با لوواستاتین ۱ میلی گرم بر کیلوگرم سطح معنی داری $P < 0.01$ نشان داد و دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم سطح معنی داری $P < 0.001$ نشان دادند. همچنین، در آزمون به یادآوری سطح معنی داری برای کلیه گروه‌ها $P < 0.001$ بود (نمودار ۲-C). در ضمن، در این پارامتر نیز تغییرات بین گروه تخریب با گروه حلال معنی دار نبود ($P > 0.05$) (جدول شماره ۱).



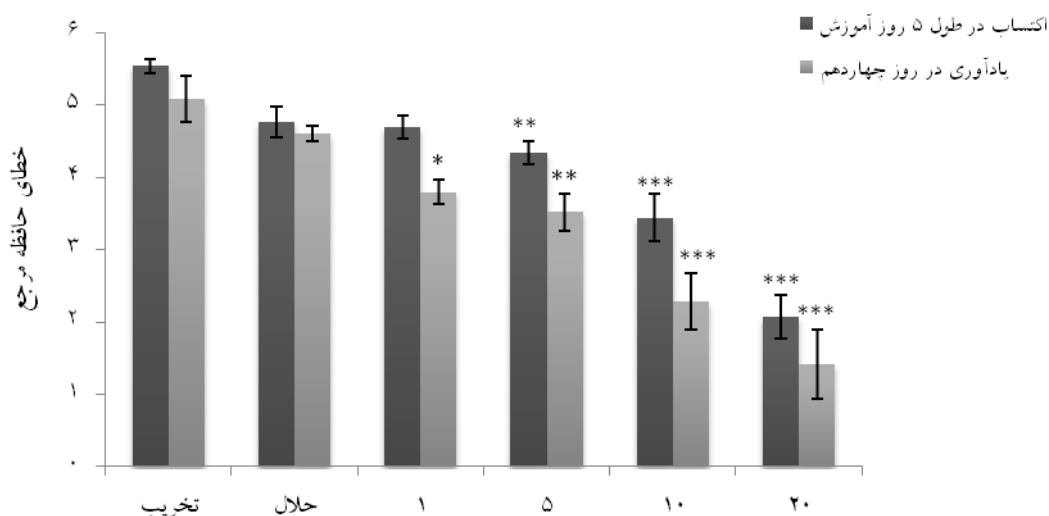
نمودار شماره ۱-A- تأثیر تخریب هسته NBM بر میزان خطای حافظه مرجع در دوره ۵ روزه آموزش برای آزمون اکتساب و آزمون یادآوری روز چهاردهم در ماز شعاعی برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب، و تخریب NBM ($P < 0.001$ ***).



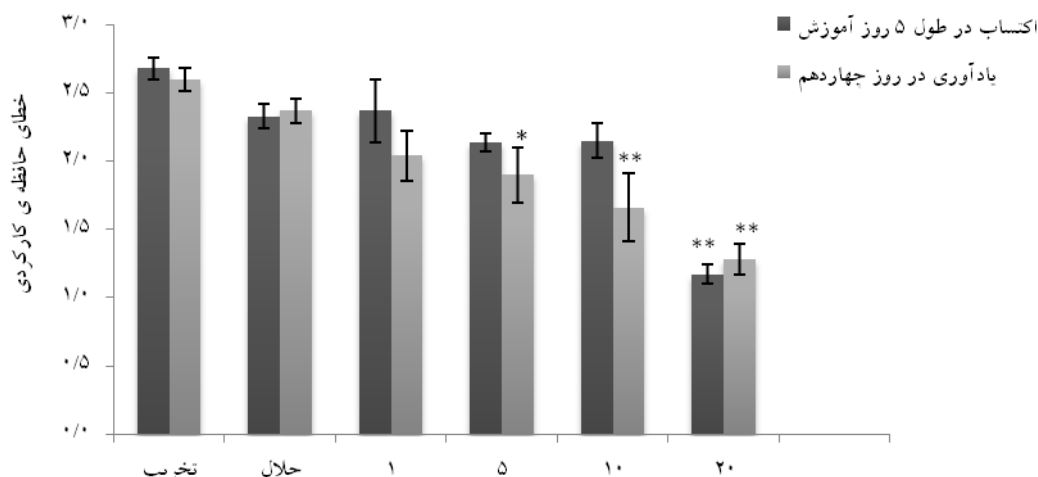
نمودار B-۱- تاثیر تخریب هسته NBM بر میزان خطای حافظه کارکردی در دوره ۵ روزه آموزش برای آزمون اکتساب و آزمون یادآوری روز چهاردهم در ماز شعاعی برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب، و تخریب NBM ($P < 0.001$).



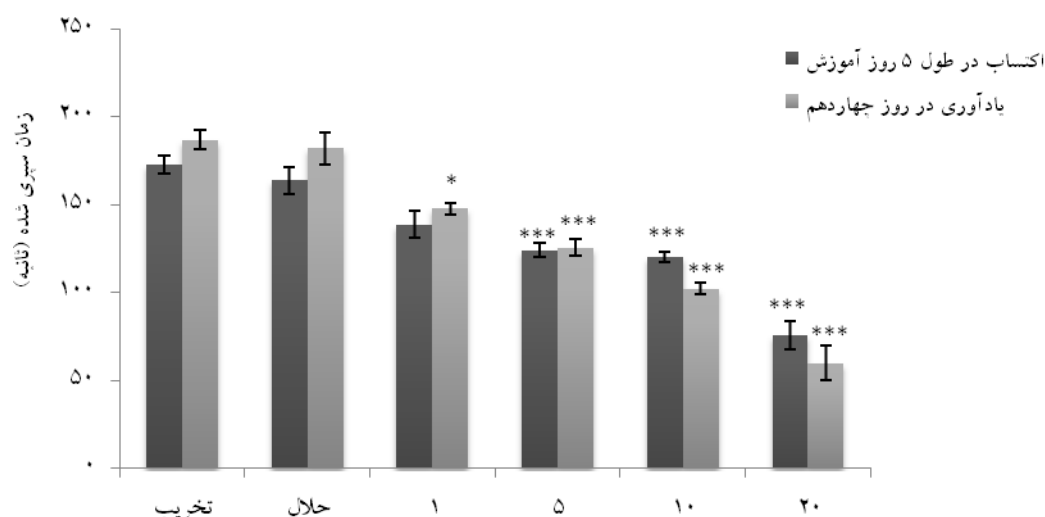
نمودار C-۱- تاثیر تخریب هسته NBM بر میزان زمان سپری شده در بازوها در دوره ۵ روزه آموزش برای آزمون اکتساب و آزمون یادآوری روز چهاردهم در ماز شعاعی برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب و تخریب NBM ($P < 0.001$).



نمودار A-۲- تاثیر مقادیر مختلف لوواستاتین بر خطای حافظه مرجع موش‌های مدل بیماری آلزایمر در دوره ۵ روزه آموزش برای آزمون اکتساب و آزمون یادآوری روز چهاردهم در ماز شعاعی ($P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$ در مقایسه گروه تخریب NBM).



نمودار ۲-B- تاثیر لوواستاتین بر خطای حافظه کارکردی موش‌های مدل بیماری آلزایمر در دوره ۵ روزه آموزش برای آزمون اکتساب و آزمون یادآوری روز چهاردهم در ماز شعاعی ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ در مقایسه گروه تخریب (NBM)).



نمودار ۲-C- تاثیر لوواستاتین بر زمان سپری شده در بازوها توسط موش‌های مدل بیماری آلزایمر در دوره ۵ روزه آموزش برای آزمون اکتساب و آزمون یادآوری روز چهاردهم در ماز شعاعی ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ در مقایسه گروه تخریب (NBM)).

جدول شماره ۱- نتایج به دست آمده از بررسی مقایسه‌ای تاثیر مقادیر مختلف لوواستاتین بر پارامترهای حافظه فضایی در ماز شعاعی هشت‌بازویی

	خطای حافظه مرجع		خطای حافظه کارکردی		زمان	
	اکتساب	یادآوری	اکتساب	یادآوری	اکتساب	یادآوری
کنترل	۲/۴۲±۰/۱۹ ^a	۱/۰۹±۰/۰۹ ^a	۰/۴۸±۰/۱۰ ^a	۰/۲۷±۰/۱۷ ^a	۶۴/۰۱±۴/۴۶ ^a	۴۸/۶۶±۳/۳۶ ^a
شاهد تخریب	۲/۴۱±۰/۱۷ ^a	۲/۲۸±۰/۰۸۶ ^{ab}	۰/۷۷±۰/۰۵۶ ^a	۰/۷۱±۰/۱۶۹ ^a	۶۵/۶۰±۲/۸۱ ^a	۵۶/۴۷±۰/۹۴ ^a
تخریب	۵/۵۴±۰/۰۹۷ ^d	۵/۰۹±۰/۳۲۲ ^d	۲/۶±۰/۰۸۱ ^c	۲/۷۶±۰/۱۷۳ ^c	۱۷۳/۱۲±۵/۲۶ ^d	۱۸۷±۵/۵۲ ^d
DMSO (حلال)	۴/۷۲±۰/۲۱۵ ^{cd}	۴/۶۱±۰/۱۱۳ ^{cd}	۲/۳۳±۰/۰۹۱ ^c	۲/۳۷±۰/۰۸۶ ^{cd}	۱۶۳/۸۲±۷/۹۷ ^{cd}	۱۸۲/۱۶±۹/۱۱ ^d
لوواستاتین ۱ mg	۴/۷۰±۰/۱۵۵ ^{cd}	۳/۸۰±۰/۱۷۵ ^c	۲/۳۷±۰/۲۳۲ ^c	۲/۰۴±۰/۱۸۴ ^{cd}	۱۳۸/۷۰±۷/۹۷ ^{bc}	۱۴۷/۹۱±۳/۴۱ ^c
لوواستاتین ۵ mg	۴/۳۴±۰/۱۶۳ ^{bc}	۳/۵۲±۰/۲۵۹ ^{bc}	۲/۱۴±۰/۰۶۴ ^b	۱/۹±۰/۲۰۱ ^{cd}	۱۲۴/۳۴±۴/۰۷ ^b	۱۲۵/۵۷±۴/۸۲ ^{bc}
لوواستاتین ۱۰ mg	۳/۴۴±۰/۳۲۶ ^b	۲/۲۸±۰/۳۹۴ ^{ab}	۲/۱۵±۰/۱۲۵ ^c	۱/۶۶±۰/۲۵۱ ^{cd}	۱۲۰/۳۳±۲/۶۳ ^b	۱۰۲/۴۲±۳/۵ ^b
لوواستاتین ۲۰ mg	۲/۰۷±۰/۳۰۳ ^a	۱/۴۲±۰/۴۸۰ ^a	۱/۱۷±۰/۰۷۱ ^b	۷۵/۹۷±۵/۱۸ ^{bc}	۷۵/۹۷±۵/۱۸ ^a	۵۹/۸۰±۹/۸۱ ^a

نتایج به صورت Mean±S.E.M گزارش شده‌اند. داشتن حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بحث

الگوهای تخریب هسته کولینرژیک NBM برای مطالعه نقش سیستم کولینرژیک در عملکردهای شناختی و ادراک کاربرد داشته و بر نقص‌های ادراکی ایجاد شده در بیماری آلزایمر دلالت دارد [۲۷]. هسته NBM منبع اولیه از انشعابات کولینرژیک به هیپوکامپ و قشر مغز می‌باشد و نقش مهمی در فرآیندهای شناختی دارد [۲۸]. سیستم کولینرژیک مسئول ذخیره و بازیابی اطلاعات در حافظه است. تخریب سیستم کولینرژیک مغز مسئول کاهش حافظه و شناخت در بیماری آلزایمری است. از آنجایی که بیشتر نورون‌ها در هسته NBM کولینرژیک‌اند، به نظر می‌رسد که کاهش نورون‌های کولینرژیک ناشی از تخریب NBM می‌تواند باعث کاهش حافظه شود [۲۹]. تخریب سیستم کولینرژیک NBM در جوندگان و پرمات‌ها عملکرد کولینرژیک قشر را کاهش می‌دهد و موجب نقص در یادگیری و حافظه می‌شود [۳۰]. هسته مینرت در حفظ و نگهداری اطلاعات مربوط به حافظه کارکردی و نیز ذخیره اطلاعات حافظه مرجع نقش دارد. فعالیت کولینرژیک قشری NBM در طول مراحل اولیه‌ی اکتساب حافظه کارکردی و ذخیره میان مدت حافظه مرجع و تا کامل شدن مراحل آزمون دارای اهمیت است [۳۱]. بررسی‌ها نشان داده است که اختلال عملکرد تحلیل‌رونده از سیستم کولینرژیک نشأت گرفته از قاعده مغز جلویی که چندین ناحیه قشری و هیپوکامپ را عصب دهی می‌نماید، در ارتباط با نقص حافظه و تحلیل عصبی دیده شده در چندین نوع از زوال عقل و پیر شدن مغز، از جمله آلزایمر، است و کاهش فعالیت کولین استیل ترانسفراز در ارتباط با کاهش شناختی است [۳۲]. نتایج حاصل از تحقیق کنونی نشان می‌دهد که تخریب الکتریکی دوطرفه NBM پیش از آموزش باعث کاهش معنی‌دار در روند اکتساب و فراخوانی در ماز شعاعی هشت‌بازویی می‌شود. زاهدی و همکاران گزارش داده‌اند که تخریب دوطرفه هسته NBM با استفاده از روش الکتریکی باعث کاهش حافظه فضایی در ماز آبی مورس و همچنین کاهش یادگیری اجتنابی فعال می‌گردد [۲۹]. همچنین ربیعی و همکاران گزارش کرده‌اند که تخریب دوطرفه هسته NBM با روش الکتریکی باعث کاهش یادگیری اجتنابی غیرفعال در دستگاه شاتل باکس می‌شود [۶]. بنابراین، گزارشات ارائه شده نشان‌دهنده کاهش یادگیری و حافظه متعاقب تخریب دوطرفه هسته NBM می‌باشند که این مطالب در تأیید نتایج حاصل از این پژوهش می‌باشد. استفاده از نوروتوکسین‌های مختلف برای تخریب NBM اثرات متفاوتی در ایجاد اختلال یادگیری دارند. مثلاً تخریب NBM با ایبوتونیک اسید در مقایسه با کوئیکوالیک اسید، نقص شدیدتری را در یادگیری فضایی ایجاد

نموده است. البته ممکن است که نقص ادراکی ایجاد شده به دنبال تخریب شیمیایی NBM به علت تخریب انشعابات کولینرژیک از NBM به سیتوم و قشر نباشد، بلکه به علت وسعت تخریب سلول‌های غیرکولینرژیک درون NBM باشد و نیز ممکن است سایر مسیرهای کولینرژیک قاعده مغز جلویی هم تحت تأثیر قرار گرفته باشند [۳۳]. باتوجه به مطالب بالا و نظر به اینکه در تخریب الکتریکی، شدت جریان الکتریکی و مدت زمان آن تحت کنترل می‌باشد، در این پژوهش برای ایجاد مدل آلزایمر از روش تخریب الکتریکی هسته NBM استفاده شد. در ادامه این کار پژوهشی تزریق لوواستاتین به حیوانات آلزایمری به صورت وابسته به دوز تأثیر مثبت در روند یادگیری و حافظه در ماز شعاعی هشت‌بازویی داشت. استفاده خوراکی از استاتین‌های لیپوفیلیک مثل لوواستاتین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را در قشر جلو پیشانی در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد که این امر منجر به افزایش سطح استیل کولین در شکاف سیناپسی شده و موجب کاهش اختلالات عملکردی کولینرژیک در آلزایمر می‌شود. علاوه بر این استاتین‌ها مهار $\alpha 7$ -nAChRs (گیرنده‌های پس‌سیناپسی نیکوتینی استیل کولین) القاء شده بتا آمیلوئید را ممانعت می‌نمایند. همچنین، تنظیم افزایشی از $\alpha 7$ -nAChRs توسط لوواستاتین گزارش شده که طی یک مکانیسم مستقل از کلسترول منجر به افزایش تولید α -sAPP در طی پردازش APP و در نهایت کاهش تولید $A\beta$ می‌گردد. گذشته از اثر روی فعالیت ChAT لوواستاتین به طور واضحی فعالیت گیرنده‌های موسکارینی و NMDA را هم در ناحیه قشری و هم در هیپوکامپ بهبود می‌دهد [۱۱]. ثابت شده است که تغییر در فعالیت گیرنده‌های M_1 و M_4 به اختلالات شناختی کمک می‌نماید و تحریک گیرنده‌های موسکارینی (به-خصوص M_1) دارای اثرات مفیدی در بهبود شناخت در بیماران مبتلا به اختلالات نورولوژیک است. گیرنده‌های NMDA به طور گسترده‌ای در مغز توزیع شده‌اند و برای القای LTP (Long-term-potential) و LTD (Long-term-depression) ضروری می‌باشند. افزایش عملکرد این گیرنده‌ها در مغز جلویی منجر به بهبود یادگیری و حافظه می‌گردد. فعالیت اتصالی این دو گیرنده به طور معنی‌داری بعد از آسیب NBM کاهش می‌یابد و تیمار با لوواستاتین به طور برجسته‌ای فعالیت آنها را بهبود می‌دهد [۳۵، ۳۴]. اثرات مفید لوواستاتین بر یادگیری و حافظه توسط مطالعات مختلفی تأیید شده‌اند؛ به‌طوری‌که Zhao و همکاران گزارش کرده‌اند که تیمار با لوواستاتین به طور برجسته‌ای نقایص حافظه و یادگیری را در موش‌های صحرایی که NBM آنها با ایبوتونیک اسید تخریب شده است، در آزمون ماز آبی مورس

لوب‌های بویایی خیلی شدید یا گسترده بوده است؛ به‌طوری‌که تیمار حیوانات با سیمواستاتین نتوانسته اثری در جهت بهبودی حافظه ایجاد نماید [۳۹]. علت تفاوت نتیجه گزارش‌های ارایه شده با نتیجه این پژوهش، احتمالاً به دلیل تفاوت نوع تزریق و فاکتور زمان بوده است و در موارد تشابه مدت زمان تیمار، تفاوت در دستگاه استفاده شده جهت بررسی حافظه فضایی می‌باشد؛ به‌طوری‌که در این پژوهش از دستگاه ماز شعاعی هشت‌بازویی استفاده شد و در برخی از مطالعات با نتیجه متفاوت از دستگاه‌های دیگری از جمله ماز بارنز و ماز آبی استفاده شده است.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر تخریب دوطرفه NBM به‌عنوان مدلی جهت القای بیماری آلزایمر در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت و تجویز لوواستاتین تا حدودی منجر به کاهش عوارض ناشی از تخریب NBM گردید. به نظر می‌رسد که لوواستاتین از طریق کاهش فعالیت کولین استیل استراز، افزایش فعالیت استیل کولین ترانسفراز و افزایش فعالیت گیرنده‌های موسکارینی و NMDA باعث بهبود فرآیندهای یادگیری و حافظه می‌گردد. بنابراین، تیمار با لوواستاتین به‌صورت وابسته به دوز را می‌توان به‌عنوان یک روش جهت بهبود علائم آلزایمر پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر همکاری و مساعدت در انجام این پروژه علمی-پژوهشی کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References:

- [1] Dumont M, Beal MF. Neuroprotective strategies involving ROS in alzheimers disease. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(5): 1014-26.
- [2] Ferreira ME, de Vasconcelos AS, da Costa Vilhena T, da Silva TL, da Silva Barbosa A, Gomes AR, et al. Oxidative stress in alzheimers disease: should we keep trying antioxidant therapies? *Cell Mol Neurobiol* 2015; 35(5): 595-614.
- [3] Khanahmadi M, Farhud DD, Malmir M. Genetic of Alzheimer's Disease: A Narrative Review Article. *Iran J Public Health* 2015; 44(7): 892.
- [4] Ovsepian SV, Herms J. Drain of the brain: low affinity p75 neurotrophin receptor affords a molecular sink for clearance of cortical amyloid beta by the cholinergic modulator system. *Neurobiol Aging* 2013; 34(11): 2517-24.

تخفیف می‌دهد. لوواستاتین به‌طور معنی‌داری آپوپتوز سلولی را مهار می‌نماید، نورون‌ها را در برابر آسیب محافظت می‌کند و تراکم نورونی را در NBM و هیپوکامپ بعد از تخریب با ایبوتونیک اسید حفظ می‌نماید. همچنین، فعالیت آنزیم کولین استیل ترانسفراز در قشر فرونتال و در هیپوکامپ، بعد از تخریب هسته NBM کاهش می‌یابد و تیمار با لوواستاتین فعالیت ChAT را احیاء می‌نماید [۳۶]. Dolga و همکاران گزارش کرده‌اند که پیش‌تیمار موش‌های سوری با لوواستاتین قبل از تخریب NBM با NMDA باعث بهبود حافظه فضایی در دستگاه ماز Y شکل می‌شود [۱۱]. از طرف دیگر مطالعات زیادی اثرات منفی استاتین‌ها را بر حافظه بیان می‌کنند. برای مثال، Park و همکاران گزارش کرده‌اند که تیمار ۳ هفته‌ای موش‌های سوری Tg2579 مدل بیماری آلزایمر با غذای استاندارد آزمایشگاهی حاوی لوواستاتین ۰/۲ درصد منجر به کاهش کلسترول پلاسما، افزایش تولید بتا‌آمیلوئید 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 [۳۷]. Bayton و همکاران گزارش کرده‌اند که تیمار موش‌های صحرایی سالم به مدت ۴۵ روز با سیمواستاتین خوراکی موجب نقص در حافظه فضایی می‌شود [۳۸]. همچنین، نشان داده شده است که سیمواستاتین نقایص شناختی موش‌های صحرایی با تخریب لوب بویایی را در آزمون‌های میدان باز و حافظه اجتنابی فعال بهبود نمی‌دهد؛ هرچند که سیمواستاتین منجر به بهبود شناخت در حیوانات سالم می‌شود. بهبود در شناخت می‌تواند نتیجه تعدیل مسیرهای سیگنالی درگیر در شکل‌پذیری سیناپسی و تشکیل حافظه باشد. از طرف دیگر می‌توان پیشنهاد کرد که آسیب مغزی ایجاد شده در نتیجه تخریب

- [5] Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 1982; 215(4537): 1237-9.
- [6] 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.
- [7] Nyakas C, Granic L, Halmy LG, Banerjee P, Luiten G. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid β A-42 with memantine. *Behav Brain Res* 2011; 221(2): 594-603.
- [8] Popović M, Popović N, Jovanova-Nesić K, Bokonić D, Dobrić S, Kostić VS, et al. Effect of

physostigmine and verapamil on active avoidance in an experimental model of Alzheimers disease. *Int J Neurosci* 1997; 92(1-2): 87-93.

[9] Salamone JD, Beart PM, Alpert JE, Iversen SD. Impairment in t-maze reinforced alternation performance following nucleus basalis magnocellularis lesions in rats. *Behav Brain Res* 1989; 13(1): 63-70.

[10] Peng W, Yang J, Yang B, Wang L, Xiong XG, Liang Q. Import of statins on cognitive deficits in adult male rodents after traumatic brain injury: a systematic review. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 13.

[11] Dolga AM, Nijholt IM, Ostroveanu A, Ten Bosch Q, Luiten PG, Eisel UL. Lovastatin induces neuroprotection through tumor necrosis factor receptor 2 signaling pathways. *J Alzheimers Dis* 2008; 13(2): 111-22.

[12] Li R, Xu D, Ma T. Lovastatin suppresses the aberrant tau phosphorylation from FTDP-17 mutation and okadaic acid-induction in rat primary neurons. *Neuroscience* 2015; 294: 14-20.

[13] 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 alzheimers disease. *J Isfahan Med Sch* 2016; 34(370): 64-73.

[14] Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW. Do statins prevent Alzheimer's disease? A narrative review. *Eur J Intern Med* 2015; 26(9): 666-9.

[15] Mans RA, Chowdhury N, Cao D, McMahon LL, Li L. Simvastatin enhances hippocampal long-potential in C57BL/6 mice. *Neuroscience* 2010; 166(2): 435-44.

[16] Chen G, Zhang S, Shi J, Ai J, Hang C. Simvastatin reduces secondary brain injury caused by cortical contusion in rats: possible involvement of TLR4/ NF- κ B pathway. *Experimental Neurol* 2009; 216(2): 398-406.

[17] Chen SF, Hung TH, Chen CC, Lin KH, Huang YN, Tsai HC, et al. lovastatin improves histological and functional outcomes and reduces inflammation after experimental traumatic brain injury. *Life Sci* 2007; 81(4): 288-98.

[18] Chauhan NB, Gatto R. Restoration of cognitive deficits after statin feeding in TBJ. *Res Neurol Neurosci* 2011; 29(1): 23-34.

[19] Szigeti C, Bencsik N, Simonka AJ, Igradi A, Kasa P, Gulya K. 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 alzheimers disease. *Brain Res Bull* 2013; 94: 9-16.

[20] Mendoza-Oliva A, Ferrera P, Frago-Medina J, Arias C. Lovastatin differentially affects neuronal cholesterol and amyloid- β production in vivo and in vitro. *CNS Neurosci Ther* 2015; 21(8): 631-41.

[21] Montero-Pastor A, Vale-Martínez A, Guillazo-Blanch G, Martí-Nicolovius M. Effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on two-way active

avoidance acquisition, retention, and retrieval. *Behav Brain Res* 2004; 154(1): 41-54.

[22] Moazedi AA, Mosavi M, Chinipardaz R. The effect of estrogen on passive avoidance memory in an experimental model of Alzheimer disease in male rats. *Physiol Pharmacol* 2011; 14(4): 416-25.

[23] Luine VN, Frankfurt M. Estrogen facilitate memory processing through membrane mediated mechanisms and alterations in spike density. *Front Neuroend* 2012; 33(4): 388-402.

[24] 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.

[25] Cosquer B, Vasconcelos AP, Fröhlich 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.

[26] Liu P, Bilkey DK. The effect of NMDA lesions centered on the postrhinal cortex on spatial memory tasks in the rat. *Behav Neurosci* 2002; 116(5): 860-73.

[27] Mallet PE, Beninger RJ, Flesher SN, Jhamandas K, Boegman RJ. Nucleus basalis lesions: implication of basoamygdaloid cholinergic pathways in memory. *Brain Res Bull* 1995; 36(1): 51-6.

[28] Liu AK, Chang RC, Pearce RK, Gentleman SM. Nucleus basalis of mynert revisited: anatomy, history and differential involvement in alzheimers and parkinsons disease. *Acta Neuropathol* 2015; 129(4): 527-40.

[29] Zahedi M, Hojjati MR, Fathpour H, Rabiei Z, Alibabaei Z, Basim A. Effect of rheum ribes hydro-alcoholic extract on memory impairments in rat model of Alzheimer disease. *Iran J Pharm Res* 2015; 14(4): 1197-206.

[30] Gratwicke J, Kahan J, Zrinzo L, Hariz M, Limousin P, Foltynie T, et al. The nucleus basalis of mynert: a new target for deep brain stimulation in dementia? *Neurosci Behav Rev* 2013; 37(10 Pt 2): 2676-88.

[31] Givens B, Olton DS. Local modulation of basal forebrain: effects on working and reference memory. *J Neurosci* 1994; 14(6): 3578-87.

[32] Contestabile A, Ciani E, Contestabile A. The place of choline acetyltransferase activity measurement in the cholinergic hypothesis of neurodegenerative disease. *Neurochem Res* 2008; 33(2): 318-27.

[33] Mesulam MM. Some cholinergic themes related to alzheimers disease: synaptology of the nucleus basalis, Location of m₂ receptors, interaction with amyloid metabolism and perturbation of cortical plasticity. *J Physiol Paris* 1998; 92(3): 293-8.

[34] Coccamo A, Fisher A, Laferla FM. M₁ agonists as a potential disease-modifying therapy for

Alzheimers disease. *Curr Alzheimer Res* 2009; 6(2): 112-17.

[35] Yamin G. NMDA receptor dependent signaling pathways that underlie amyloid beta protein disruption of LTP in the hippocampus. *J Neurosci Res* 2008; 87(8): 1729-36.

[36] Zhao Z, Zhao S, Xu N, Yu C, Guan S, Liu X, et al. Lovastatin improves neurological outcome after nucleus basalis magnocellularis lesion in rats. *Neuroscience* 2010; 167(3): 954-63.

[37] Park IH, Hwang EM, Hong HS, Boo JH, Oh SS, Lee J, et al. Lovastatin enhances A production

and senile plaque deposition in female Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 2003; 24(5): 637-43.

[38] Baytan SH, Alkanat M, Okuyan M, Ekinci M, Gedikli E, Ozeren M, et al. Simvastatin impairs spatial memory in rats at a specific dose level. *Tohoku J Exp Med* 2008; 214(4): 341-9.

[39] Douma TN, Borre Y, Hendriksen H, Olivier B, Oosting RS. Simvastatin improves learning and memory in control but not in olfactory bulbectomized rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2011; 216(4): 537-44.