Archive of SID

اثر کلسترول و لواستاتین بر یادگیری فضایی موش صحرایی نر

احمد علی معاضدی*، فخرالحاجیه حاجی محمد سمیعی**، رحیم چینی پرداز***

خلاصه :

در این تحقیق اثر کلسترول و داروی لواستاتین بریادگیری فضایی موش صحرایی نـژاد NMRI بـا استفاده از دستگاه ماز T - شکل مورد بررسی قرار گرفت . موش های نر مورد آزمایش بـه چـهارگـروه تقسیم شدند. گروه اول به مدت یک هفته از جیره غذایی حاوی ۵ درصد کلسترول (n= ۸) ، گروه دیگـر از همان جیره و سپس به مدت ۹ روز داروی لواستاتین (۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روز) (n= ۸) ، گروه سوم به مدت ۹ روز از داروی لواستاتین به تنهایی (n= ۷) و گروه شاهد (n= ۸) در تمـام دورهٔ قبـل از آموزش از جیره غذایی معمولی استفاده کردند . همه موشها ۹ روز با روش استاندارد آموزش داده شـدند. نتایج آزمایشات رفتاری نشان می دهد که مصرف جیره غذایی حاوی ۵ درصد کلسترول یادگیری فضـایی موش های صحرایی را کاهش می دهد . در صورتیکه مصرف لواستاتین ، یادگـیری را نسـبت بـه گـروه شاهد بهبود می بخشد . به نظر می رسد کلسترول از طریق کاهش سیالیت غشاءبر فعـالیت گـیرنده هـا و کانال های غشاء تأثیر داشته و از این طریق بر یادگیری تأثیر می گذارد .

واژه های کلیدی : کلسترول ، لواستاتین ، ماز T شکل ، یادگیری فضایی ، موش صحرایی

مقدمه :

عوامل ارثی دارای بیشترین نقـش در تعیـین غلظت کلسترول فرد می باشند امـا نقـش عوامـل تغذیه‌ای را نبایستی نادیده گرفت. کلسترول مـورد نیاز بدن از طریق اگزوژن (دسـتگاه گوارش) و انـدوژن (بیوسـنتز در سـلولهای بـدن از اسـتات) تأمین مـی شـود (۱). در اکـثر مدلـهای حیوانـی ، کلسـترول اگـزوژن (خوراکـی) بـاعث ایجـاد هایپرکلسترولمی می شود بعنوان مثال تغذیه موش

* بخش زیست‌شناسی – دانشکده علوم – دانشگاه شهیدچمران اهواز

** کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری – دانشکده علوم – دانشگاه شهید چمران اهواز

*** دانشیار بخش آمار – دانشکده علوم – دانشگاه شهید چمران اهواز

دریافت مقاله: ۸۰/٤/۲۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۱/۸/٦ اعلام قبولی: ۸۱/٦/۵

www.SID.ir

Archive of SID

صحرایی با رژیم غذایی حاوی ۵٪ کلسترول باعث ۶۹٪ افزایش در کلسترول تام می شود (۲).

کلسترول در فرآیندهای متعددی در بدن دخالت دارد. این ماده، ترکیب مهم غشاء سلولهای جانوری محسوب می شود و ۱۰ تا ۱۵ درصد لیپیدهای غشاء را تشکیل می دهد (۳). در شکل پذیری غشاء سلول نقش عمده ای دارد. کلسترول به طور یکنواخت در غشاء توزیع نشده و با مشکل کردن حرکات فسفولیپیدها و پروتئین‌ها، سیالیت غشاء را کاهش می‌دهد. این فرضیه که کلسترول یکی از عوامل کاهش دهنده سیالیت غشاء است اولین بار توسط هاوسلی و استنلی ارائه شد (٤). یهودا نیز نشان داد رابطه عکس بین میزان کلسترول و میکروویسکوزیته در بافتهای عصبی وجود دارد (٦،٥، ۷).

نظریات متعددی در رابطه با عبور کلسترول از سد خونی - مغزی مطرح است. برخی معتقدند که کلسترول مورد نیاز برای سنتزمیلین به صورت مولکولهای پیش ساز با وزن مولکولی پایین در مغز ساخته می شود (۸). در حالی که، برخی اعتقاد دارند که کلسترول از طریق شبکه کروئید یا مایع مغزی- نخاعی وارد مغز می شود (۹). در هر حال، با توجه به اینکه کلسترول در سیالیت غشاء نقش داشته و از طرف دیگر پیش ساز استروئیدها می باشد و استروئیدها نیز از طریق سازمان دهی دندریت ها و سیناپس و افزایش خارهای دندریتی هیپوکامپ، یادگیری و حافظه راتحت تأثیر قرار می دهند (۹). انتظار می رود کلسترول در فرآیند یادگیری دخیل باشد. لذا در این تحقیق اثر کلسترول خوراکی (۲) روی یادگیری فضایی موش صحرایی با استفاده از ماز T - شکل مطالعه شد و به دنبال آن تأثیر داروی لواستاتین مهار کننده آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل COA ردوکتاز (HMG-COA) که باعث مهار سنتز کلسترول در مراحل اولیه می‌شود، در حضور و غیاب کلسترول مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است تا کنون چنین مطالعه‌ای در ایران صورت نگرفته و از نتایج این تحقیق برای مقایسه با اثرات روغن‌های گیاهی می توان بهره جست.

مواد و روش‌ها:

حیوانات مورد آزمایش، موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد NMRI با محدوده وزنی ۲۰ ± ۱۶۰ گرم بوده که از مؤسسه سرم سازی رازی حصارک کرج تهیه شدند و در شروع کار سه ماه بودند. تمام موشها به مدت چند روز قبل از شروع آزمایش ، از آب و غذای کافی استفاده کردند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ثابت ۱+۲٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آزمایشات در طی فاصله زمانی ۷ صبح الی ۷ شب انجام پذیرفت . هر حیوان روزانه فقط یک بار تحت آزمایش قرار گرفت.

حیوانات مورد نظر به چهار گروه تقسیم شدند : گروه اول به مدت یک هفته از رژیم

www.SID.ir

Archive of SID

غذایی حاوی ۵ درصد کلسترول(۲)، گروه دوم بعد از استفاده از غذای حاوی کلسترول به مدت ۹ روز داروی لواستاتین (۳۰ میلی‌گرم در روز) (۱۰) گروه سوم صرفاً از داروی لواستاتین به مدت ۹ روز استفاده کردند و گروه چهارم، (شاهد) با جیره غذایی معمولی تغذیه شدند.

جیره غذایی حاوی پودر کنسانتره به همراه ۵٪ وزنی کلسترول بوده که توسط مقدار کمی آب به شکل خمیر درآمده و با وارد کردن خمیر به داخل قیف شیرینی پزی و فشردن ، پلیت های معمولی مجدداً بازسازی شده و بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق و خشک شدن در اختیار حیوانات قرار داده شدند.

ضمناً داروی لواستاتین با مقدار مصرف ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر گیلوگرم در روز (۱۰) برای هر موش به طور جداگانه توزین شده و با مقدار کمی آب نیم گرم همگن شد . به سوسپانسیون حاصل ، ۱۸ گرم پودر کنسانتره افزوده و توسط سرنگ ۲cc به شکل پلیت درآمد . پس از خشک شدن به ۹ قسمت مساوی تقسیم شد تا به مدت ۹ روز برای هر موش استفاده شود.

جهت آموزش موشها ، از ماز T- شکل با ابعاد معین استفاده گردید (۱۱). قبل از شروع دوره آموزش، موشها از جیره غذایی ۱۱-۴ گرم استفاده کردند تا به ۸۵٪ وزن اولیه در شروع رژیم برسند. ضمناً به منظور رشد طبیعی ، اجازه داده شد که هر هفته، ۵ گرم به وزن آنها افزوده شود (۹).

آموزش در ۹ روز متوالی انجام گرفت . در روز اول به منظور آشنایی حیوان با ماز، کپسول‌های فشرده به مقدار ۴۵ میلی گرم در ساقه ، بازو و جعبه های هدف قرار داده شده و به موشها اجازه داده شد تا ماز را به مدت ۵ دقیقه جستجو کنند . در روزهای دوم و سوم ، موش ۱۰ ثانیه در جعبه شروع محبوس شده و با برداشت درب گیوتینی به آن اجازه داده شد که از کپسول های فشرده موجود در جعبه‌های هدف به مدت ۴۰ ثانیه استفاده کند. در این مرحله، حیوان یاد می‌گیرد که غذا فقط در جعبه های هدف وجود دارد . در روزهای چهارم و پنجم هر موش ۱۱ دفعه متوالی آموزش داده شد و هر بار ابتدا هر موش را ۱۰ ثانیه در جعبه شروع محبوس کرده و بعد با برداشتن درب گیوتینی اجازه داده شد که به سمت جعبه هدف چپ یا راست برود و در آنجا به مدت ۲۰ ثانیه محبوس گردید. در این مرحله جعبه هدف انتخابی چپ یا راست، ثبت شد.

در روزهای ششم، هفتم و هشتم آموزش به منظور بررسی یادگیری ساده[1] هر روز و در هر دفعه آموزش بر اساس تمایل حیوان، غذا تنها در یک جعبه هدف چپ یا راست قرار گرفته و دفعات آموزش به قدری تکرار می شد که حیوان ۵ بار متوالی به جعبه هدف محتوی غذا برود . در این مرحله یادگیری ساده انجام شده و سپس به منظور انجام یادگیری معکوس[2] محل غذا را

1- Simple learning
2- Reversal learning

www.SID.ir

Archive of SID

عوض کرده و در جعبه هدف مقابل قرار داده، در این مرحله نیز معیار[3] صحیح یادگیری انتخاب جعبه هدف مورد نظر برای ۵ بار متوالی است. در این مرحله تعداد دفعات[4] آموزش و زمان ترک جعبه شروع تا ورود به بازوی انتخابی در هر دفعه یادداشت گردید.

در روز نهم آموزش یا مرحله خاموشی[5]، کپسول های فشرده از جعبه هدف برداشته شده و پس از محبوس کردن موش به مدت ۱۰ ثانیه در جعبه شروع، به آن اجازه داده شد که به جعبه هدف چپ یا راست برود . برای هر موش ۱۰ بار این کار تکرار شد و زمان تأخیر[6] از ترک جعبه شروع تا ورود به جعبه انتخابی یادداشت گردید (۱۱).

نتایج :

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده و مقایسه دو به دو گروهها از آزمون آماری دو نمونه t.test و جهت مقایسه همه گروهها با هم از آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و متعاقب آن آزمون توکی استفاده شده است.

نتایج آزمون آماری بین گروهی که به مدت یک هفته از رژیم حاوی ۵ درصد کلسترول استفاده کردند و گروه شاهد . نشان می دهد که میانگین دفعات آموزش تا رسیدن به معیار صحیح یادگیری ساده بین این دو گروه اختلاف معنی داری ($P < ۰/۰۱$) وجود دارد ، در حالی که میانگین دفعات تا رسیدن به معیار صحیح یادگیری معکوس بین دو گروه مذکور ، تفاوت معنی داری نشان نمی دهد (نمودار ۱) . همچنین مقایسهٔ میانگین تأخیرها طی روزهای یادگیری و تست خاموشی بین دو گروه مذکور تفاوت معنی داری (به ترتیب $P < ۰/۰۱$ ، $P < ۰/۰۵$) نشان می دهد (نمودار ۲).

از طرفی همچنین مقایسه پارامترهای اندازه گیری شده در گروه شاهد و گروهی که کلسترول و سپس ۹ روز لواستاتین دریافت کرده اند در هیچ یک از موارد اختلاف معنی داری مشاهده نشد (نمودارهای۱و۲) . در صورتی که مقایسه گروهی که لواستاتین به تنهایی دریافت کرده اند و گروه شاهد تنها در میانگین تأخیرها طی تست خاموشی تفاوت معنی داری ($P < ۰/۰۵$) مشاهده شد (نمودار ۲) و در دیگر پارامترهای اندازه گیری شده اختلاف معنی داری وجود نداشت، (نمودار۱) . از آزمون آماری که بین گروهی که کلسترول و لواستاتین دریافت کرده بودند (گروه دوم) و گروهی که لواستاتین دریافت نموده ا ند (گروه سوم) چنین برمی آید که بین میانگین دفعات آموزش تا رسیدن به معیار صحیح یادگیری ساده و همچنین معکوس در دو گروه مذکور تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) مشاهد می‌شود (نمودار۱). همچنین در مقایسه میانگین تأخیرها طی روزهای یادگیری و نست خاموشی بین گروه لواستاتین و گروهی که کلسترول و لواستاتین

3- Criterion
4- Trial
5- Extinction
6- Latency

www.SID.ir

Archive of SID

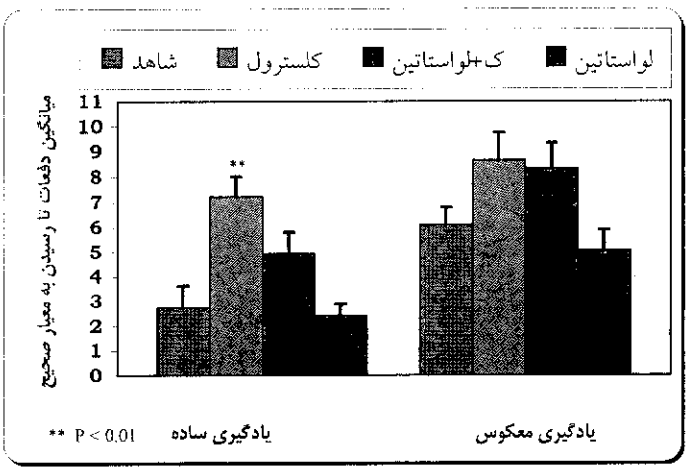
دریافت کرده اند تفاوت معنـی داری (P < ۰/۰۱) مشاهده می‌شود (نمودار۲).

بحث:

همـانطور کـه قبـلاً اشـاره شـد ، کلسـترول جـزء ضـروری غشـاء سـلول‌های جـانوری خصوصـاً سلولهای عصبی می‌باشـد . غـلاف میلیـن احاطـه کننده نورون‌ها در دستگاه عصبی دارای ۲۰ تـا ۲۵ درصد کلسترول می‌باشد از این رو، مغـز بیـش از هر اندام دیگری کلسترول داشته و رشد طبیعی آن منوط به سنتز یا ورود کلسترول از پلاسما اسـت (۸،۵) .

بنابراین انتظار می رود ، تغیـیرات کلسـترول خون یا مغز ، فرآیند یادگیری را تحت تـأثیر قـرار دهد (۳) . در این آزمایش تغذیه بـا رژیـم غذایـی حاوی ۵ درصد کلسترول، حالت هایپرکلسترولمی در موش صحرایی ایجاد گردید . (٦٩٪ افزایش در کلسترول تام بوجود می آید) (۲) .

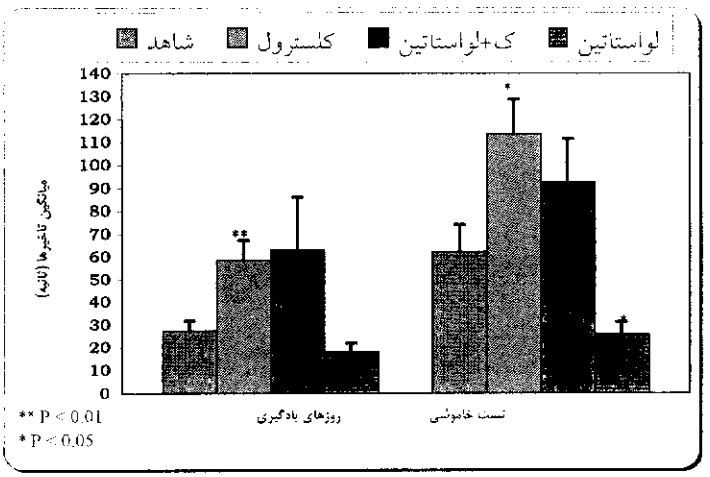
نتایج حاصل از مطالعه گروه شاهد و گروهی که ۵ درصد کلسترول به مدت یک هفتـه دریـافت کرده اند حاکی از کاهش یادگیری متعاقب تجویـز کلسترول می باشد (نمودار ۱و۲).



نمودار (۱): دفعات آموزش تا رسیدن به معیار صحیح یادگیری ساده ومعکوس طی روزهای یادگیری درگروه شاهد(n = ۸) و گروهی که یک هفته غذای حاوی کلسترول استفاده کردند (n = ۸) و گروهی که یک هفته غذای حاوی کلسترول و سپس ۹روز لواستا تین استفاده کرد ند(n = ۸) و گروهی که ۹ روز لواستا تین استفاده کردند(n = ۷) .

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار (۲): تاخیرها تا رسیدن به معیار صحیح یادگیری ساده ومعکوس طی روزهای یادگیری و تست خاموشی درگروه شاهد (n = ۸) و گروهی که یک هفته غذای حاوی کلسترول استفاده کردند (۸ = n) و گروهی که یک هفته غذای حاوی کلسترول و سپس ۹ روز لواستاتین استفاده کردند (n = ۸) و گروهی که ۹ روز لواستاتین استفاده کردند (۷ = n) .

با توجه به این که، سنتز کلسترول مغز از طریق یک پیام هومورال یا عصبی در پاسخ به کلسترول خوراکی افزایش می یابد (۳) . بنابراین احتمالاً ، سطح کلسترول مغز افزایش یافته و نقص در یادگیری نیز ناشی از افزایش کلسترول خون می باشد . در همین راستا، آنسر و سنتورک نشان دادند که منگنز خوراکی باعث افزایش کلسترول خون ، کبد ، مخچه و قشر مخ شده و در یادگیری توسط ماز T – شکل ، اختلاف ایجاد می کند، که مؤید نتایج بدست آمده است (۱۳). علاوه بر این، گزارش قبلی آزمایشگاه ما نشان داد که استفاده ازرژیم غذایی حاوی ۱۰ درصد روغن ذرت به مدت سه و چهار هفته، موجب بهبود یادگیری در ماز T– شکل می شود و این افزایش یادگیری، احتمالاً ناشی از اسیدهای چرب ضروری در روغن ذرت بوده که باعث کاهش کلسترول می شوند (۱۱) . یهودا نیز نشان داد که مصرف اسیدلینولنیک و اسید لینولئیک به نسبت ٤:۱ باعث تعدیل روند یادگیری شوند (٦، ۷) .

با توجه به نقش ، سیالیت غشاء در فعالیت گیرنده های میانجی های عصبی و پاسخ ایمنی (١٤) ، از این رو ، کاهش سیالیت غشاء در اثر هایپر کلسترولمی فعالیت گیرنده ها و کانالها را تحت تأثیر قرار می دهد (١٥،٧،٦) و ممکن است از این طریق تقویت طویل المدت و فرآیند یادگیری را تحت تأثیر قرار دهد .

www.SID.ir

Archive of SID

کیفیت یادگیری به تغییرات سیالیت غشاء بستگی دارد . در جوندگان ، با افزایش سن ، نسبت کلسترول به فسفولیپید افزایش یافته و متعاقباً سیالیت غشاء کاهش می یابد . از آنجایی که غشاءهای مغزی جایگاه پردازش اطلاعات می باشند ، فعالیت های ذهنی نظیر یادگیری با افزایش سن ، کاهش می یابد همچنین گزارش شده است که یادگیری نیز باعث کاهش کلسترول هیپوکامپ و قشر مخ می شود (۱۴) . با توجه به اثرات کلسترول در روند یادگیری و به منظور بررسی دقیق تر این مسئله تأثیر لواستاتین (داروی کاهنده کلسترول) همراه با کلسترول و در غیاب کلسترول مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفت .

آزمون آماری بین گروهی که کلسترول و لواستاتین استفاده کرده اند و گروه شاهد در هیچ یک از موارد اندازه گیری شده تفاوت معنی داری نشان نداد (نمودارهای ۱و۲) و لواستاتین تا حدی توانسته اثرات منفی کلسترول را محو کند . به منظور بررسی اثر کلسترول اندوژن و اگزوژن در گروه سومی که رژیم غذایی معمولی استفاده کرده اند ، داروی لواستاتین تجویز شد و مقایسه گروه شاهد و گروهی که لواستاتین دریافت کرده اند تنها در میانگین تأخیرها طی تست خاموشی تفاوت معنی داری ($P < ۰/۰۵$) مشاهده شد (نمودار ۲). بر این اساس ، میانگین تأخیرها در گروهی که لواستاتین دریافت کرده بودند از گروه شاهد کمتر بود . احتمالاً لواستاتین از طریق کاهش کلسترول اندوژن باعث عملکرد بهتر موشها درماز T- شکل شده است .

این نتایج با یافته محققان دیگر که کاهش کلسترول اندوژن باعث افزایش یادگیری می شود، مطابقت دارد . در همین راستا آنر و همکارانش نشان دادند که مصرف مویولین یا لواستاتین که مهار کننده بیوسنتز کلسترول است در موشهایی که در اثر مصرف منگنز خوراکی دچار هایپرکلسترولمی شده بودند با کاهش کلسترول خون ، کبد ، مخچه ، قشر مخ و هیپوکامپ موجب بهبود یادگیری در ماز T- شکل می شود (۱۳).

پارسا و همکارانش نیز گزارش داده‌اند که در صورت مصرف لواستاتین در موشهایی که دو هفته غذای حاوی کسره پاستوریزه استفاده کرده اند وضعیت یادگیری بهبود می یابد (۱۲) .

همچنین نتایج حاصل از مقایسه گروهی که کلسترول و لواستاتین مصرف کرده اند و گروهی که لواستاتین استفاده کرده اند . نشان می دهد که میانگین دفعات آموزش تا رسیدن به معیار صحیح یادگیری ساده و معکوس ($P< ۰/۰۵$) و میانگین تأخیرها طی تست خاموشی اختلاف معنی‌داری($P< ۰/۰۱$) نشان می دهد (نمودار ۱ و ۲) .

مشاهده شده است با کاهش کلسترول توسط مصرف مواد غذایی و اسیدهای چرب ضروری و غیر اشباع یادگیری افزایش می یابد (۵) و

www.SID.ir

Archive of SID

یادگیری در گروهی که لواستاتین استفاده کرده اند نسبت به گروهی که یک هفته کلسترول و سپس ۹ روز لواستاتین استفاده کرده اند ، افزایش یافته است .

نتیجه گیری کلی حاکی از این است که احتمالاً کلسترول از طریق تاثیر بر سیالیت غشاء یادگیری فضایی را کاهش داده و لواستاتین به عنوان داروی کاهنده کلسترول ، اثر معکوس دارد و با کاهش کلسترول ، باعث بهبود یادگیری می‌شود .

منابع:

۱- مارتین-دیوید، پیتر نیر، رادول ویکتور، بیوشیمی‌ها و میر، مترجمین: کریم زاده- ح، رفتسا ری- ع، ابطحسی- م، چاپ بیست و سوم، انتشارات شهر آب،۱۳۷۳، صفحه ۲۰۵ .

2- Kim, C.K., Joen, K.I., Lim, D.M.,Johng, T.N., Trazaskos, J. M. Paik, Y.k. Cholesterol biosynthesis From Lanosterol : regulation and purification of rat hepatic sterol 14-reductase . Biochemica. Et. Biophysica. Acta. 1995, 1259: 39 – 48 .

3-Boleman SL, Graf TL, Mersmann H y, Pig Fed Cholesterol Neonatally have increased cerebrum Cholesterol as young adult. J. Nutrition,1998. 128: 2498- 2504 .

٤- مجد- احمد، شریعت زاده، محمدعلی، زیست شناسی سلولی و ملکولی، جلد اول ، چاپ اول ، انتشارات دانشگاه ، اراک، ۱۳۷۵، صفحه ۲۹۷.

5- Schoknecht PA, Ebner S, Pond WG, Zhang S. Dietary cholesterol supplementation improve growh and behavioral response of pigs selected for genetically high and low serum cholesterol.J. Nut. 1994, 124:305-314.

6-Yehuda S, Brandys Y, Blumenfeld, A. Essential fatty acid preparation reduces cholesterol and fatty acids in rat cortex. Intern. J. Neurosci . 1996 86:249-256.

7- Yehuda, S., Rabinovitz, S.,Carasso, R., Mostofsky, D.I. Fatty acid and brian peptids. Peptids. 1998, 19: 407-419.

8- Moller ,P., Jurevis, H. origin of cholesterol in myelin. Neuro chemical. Res. 1996, 21 : 463 – 470.

9- Daniel J M, Fader AJ, Spencer AL.Esterogen enhanced performance of female rats during acquisition of a Radial arm maze. Hormon & Behavior. 1997, 32: 217 – 225.

10- Amin D, Rutledge. RZ, Needle SJ. RPR 101821 . Anew-potent cholesterol lowering agent: inhibition of squalen syntheses and 7dehydro cholesterol reductase. Naunyn. Shmiedeberg's . Arch. Pharmacol . 1996, 353: 233-240.

۱۱- معاضدی، احمدعلی. صلح جو، کرامت اله وهمکاران. اثر رژیم غذایی حاوی روغن ذرت بر یادگیری فضایی موش صحرایی (Rat).مجله علمی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.شماره ۲۹. ۱۳۷۹.صفحات ۲۶-۳٤.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۲- پارسا مژگان. اثرات کره پاستوریزه و داروی لواستاتین بر یادگیری فضایی و بافت هیپوکامپ موش صحرایی (Rat) ، پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، ۱۳۷۹.

13-Oner G, Senturk Uk Reversibility of manganese induced learning defect in rats. Food . Chem. Toxicol. 1995, 33: 559- 563.

14- Kessler AR, Yehuda S Learning – induced changes in brian membrane cholesterol and fluidity :implications for brian aging. Intern. J.Neuroscience. 1985, 28: 73 – 82.

15-Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. Modulation of learning and nearonal membrane composition in rat by essential fatty acid perparation:time-course analysis. Neurocheamical. Res. 1998, 23:627-634.

www.SID.ir