

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۶، دی ۱۳۹۶، ۹۲۸-۹۲۵

## اثرات تقویتی اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> بر حافظه فضایی در موش صحرایی نر بالغ مدل بیماری آلزایمر

آزاده اسکندری<sup>۱</sup>، احمد علی معاضدی<sup>۲</sup>، نسترن زمانی<sup>۳</sup>

دریافت مقاله: ۹۶/۷/۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۸/۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۶/۹/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۶/۹/۲۹

## چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر یک اختلال تحلیل برنده عصبی است که به طور بالقوه با کاهش پیشرونده حافظه و دمانس متعاقب آن شناخته می‌شود. مطالعه حاضر، با هدف ارزیابی اثر تقویتی اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> بر حافظه فضایی در موش‌های صحرایی نر بالغ مدل بیماری آلزایمر انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۴۹ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۷ گروه هفت تائی تقسیم شدند: گروه شاهد (دست نخورده)، گروه تخریب NBM (تخریب دو طرفه هسته NBM با القای جریان الکتریکی ۰/۵ میلی‌آمپر به مدت ۳ ثانیه)، گروه شاهد تخریب (ورود الکتروود به هسته NBM بدون القای جریان الکتریکی)، گروه تخریب + اسیدفولیک ۵mg/kg، گروه تخریب + ویتامین B<sub>12</sub> ۵mg/kg، گروه تخریب + اسید فولیک- ویتامین B<sub>12</sub>، گروه تخریب + 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:** یافته‌ها نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه تخریب در پارامترهای خطای حافظه مرجع، کارکردی و زمان سپری شده وجود دارد (P < ۰/۰۵). تجویز اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> به تنهایی اثر معنی‌داری بر پارامترهای حافظه فضایی در مقایسه با گروه تخریب نداشت. تجویز توأم اسید فولیک- ویتامین B<sub>12</sub> منجر به کاهش خطای حافظه مرجع، کارکردی و مدت زمان سپری شده در مقایسه با گروه تخریب در دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی گردید (P < ۰/۰۵).

**نتیجه‌گیری:** طبق نتایج بدست آمده تخریب دو طرفه هسته NMB منجر به کاهش حافظه فضایی، و تجویز توأم اسید فولیک - ویتامین B<sub>12</sub> منجر به بهبود حافظه فضایی گردید.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری آلزایمر، هسته قاعده‌ای مگنوسولولاریس، اسید فولیک، ویتامین B<sub>12</sub>، ماز شعاعی

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران  
تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۱۰۴۵ دورنگار: ۰۶۱-۳۳۳۳۱۰۴۵ پست الکترونیکی: azade.eskandary@gmail.com

۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- مربی و دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

## مقدمه

بیماری آلزایمر یک اختلال نورولوژیک است که با کمبود حافظه و ادراک تشخیص داده می‌شود [۱]. نشانه‌های هیستوپاتولوژیک مهم در پارانشیم مغز بیماران آلزایمر شامل تشکیل پلاک‌های آمیلوئید خارج سلولی حاوی پروتئین بتا آمیلوئید و وجود کلافه‌های نوروفیبریلاری داخل نورونی حاوی پروتئین میکروتوبولی تائو می‌باشد [۲].

یکی از ویژگی‌های نوروپاتولوژیک بیماری آلزایمر، تخریب نورون‌های بزرگ کولینرژیک هسته قاعده‌ای ماینرت، که معادل هسته قاعده‌ای مگنوسولاریس جوندگان می‌باشد، است که مسئول بسیاری از نواقص شناختی و حافظه‌ای این بیماری می‌باشد [۳]. ۹۰ درصد از نورون‌های هسته NBM (Nucleus Basalis Mynert) کولینرژیک می‌باشند و فیبرهای خود را به تمام قشر و آمیگدال گسیل می‌نمایند [۴]. در بیماری آلزایمر ۵۰ تا ۸۸ درصد از این نورون‌های کولینرژیک از بین می‌روند. همچنین ارتباط قوی بین کاهش نورونی NBM، نقص کولینرژیک قشری و درجه نقایص شناختی وجود دارد [۵-۶]. بررسی‌ها نشان داد در موش‌های با تخریب NBM مارکرهای کولینرژیک مغز مثل آزاد شدن استیل کولین و فعالیت کولین استیل ترانسفراز (ChAT) کاهش می‌یابد و یادگیری و حافظه مختل می‌گردد [۷].

بیماری آلزایمر و کاهش شناختی از اختلالات چند فاکتوری هستند که علل تحلیل مغزی در این بیماری‌ها مبهم باقی مانده است اما مطالعات مختلف نشان دادند که افزایش هموسیستئین قطعاً یکی از این علل است [۸-۹].

هموسیستئین یک آمینو اسید غیر ضروری حاوی سولفور است که از متابولیسم اسید آمینه ضروری متیونین تولید می‌شود. هموسیستئین به طور معمول از طریق ری متیلاسیون دو مسیر بیوشیمیایی که هموسیستئین را به متیونین تبدیل می‌کند و ترانسسولفوراسیون که هموسیستئین را به سیستئین و تائورین تبدیل می‌کند، به وجود می‌آید [۱۰]. چندین ویتامین B، از جمله B<sub>9</sub> (اسید فولیک) و B<sub>12</sub> (کوبالامین)، می‌توانند سطح هموسیستئین را کاهش دهند. اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> از جمله مواد مغذی مهم هستند که به واسطه رژیم غذایی برای انجام تعدادی از فرآیندهای سلولی مربوط به متیلاسیون و سنتز DNA (deoxyribonucleic acid) دریافت می‌شوند [۱۱]. اسید فولیک یک ویتامین محلول در آب است که نقش مؤثری در متیلاسیون اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها و همچنین در بیوسنتز پورین‌ها و پریمیدین ایفا می‌کند. ویتامین B<sub>12</sub> یک ترکیب ارگانیک فلزی است که نقش ضروری در عملکرد سیستم عصبی مرکزی دارد و در تبدیل هموسیستئین به متیونین توسط آنزیم متیونین سنتتاز دخیل است. متیونین برای سنتز نوکلئوتید و متیلاسیون ژنومی و غیرژنومی ضروری می‌باشد. کمبود ویتامین منجر به افزایش سطوح هموسیستئین می‌گردد [۱۲-۱۳].

مکانیسم‌هایی که کاهش اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> منجر به بیماری آلزایمر می‌شوند در حال بررسی است [۱۴-۱۵]. با این وجود، ارتباط معکوسی بین اسید فولیک و مکمل‌های ویتامین B و سطح هموسیستئین وجود دارد؛ زیرا اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> به عنوان کوفاکتور در تولید مجدد متیونین از هموسیستئین عمل می‌نمایند.

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 ۵۰-۴۰ درصد و در یک چرخه‌ی 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: ۹۰/۱۲/۳ (کد: ۱۳۹۰ الف ۹ ج ۱۸۰/۵۵/ Q)) در مورد حیوانات رعایت گردید. موش‌ها به طور تصادفی به ۷ گروه ( $n=7$ ) تقسیم شدند:

گروه کنترل، تحت هیچ گونه عمل جراحی یا تزریق دارو قرار نگرفتند. گروه تخریب، موش‌هایی که جهت مدل آلزایمر هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه تخریب شد. گروه شاهد تخریب، موش‌هایی که الکتروود به صورت دو طرفه به هسته NBM آن‌ها وارد شد اما تحریک الکتریکی وارد نشد. گروه تخریب+ اسید فولیک (FA)، موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه با روش الکتریکی تخریب شد و به مدت ۵ روز اسید فولیک ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم را نیم ساعت قبل از آموزش، به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند [۲۳]. گروه تخریب+ ویتامین B<sub>12</sub>، موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به صورت دو طرفه با روش الکتریکی تخریب شد و به مدت ۵ روز ویتامین B<sub>12</sub> با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم را نیم ساعت قبل از آموزش، به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند [۲۴]. گروه تخریب+ اسید فولیک - ویتامین B<sub>12</sub> (FA-B<sub>12</sub>)، موش‌هایی که جهت ایجاد مدل آلزایمر، هسته NBM آن‌ها به صورت

بنابراین، در بیماران با سطح پائین اسید فولیک و یا ویتامین B<sub>12</sub>، ممکن است غلظت هموسیستئین افزایش یابد. افزایش سطح هموسیستئین می‌تواند منجر به کاهش نورونی گردد [۱۶-۱۷]. یکی از مکانیزم‌های بالقوه ارتباط کاهش شناختی با هموسیستئین، اثرات زیانبار هموسیستئین بر عروق مغزی به وسیله هیپومتیلاسیون DNA است. علاوه بر این، هیپومتیلاسیون DNA باعث اختلال در یکپارچگی سد خونی مغزی و به دنبال آن آسیب سلولی و کاهش شناختی می‌شود [۱۸]. در نهایت، استرس اکسیداتیو حاصل از هیپومتیلاسیون DNA احتمالاً باعث کاهش فعالیت برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله گلوتاتیون می‌گردد [۱۹]. از دیگر مکانیسم‌های دخیل در کاهش شناختی می‌توان به آپوپتوز، آتروفی قشر و یا هیپوکامپ و مهار نورون‌ها اشاره کرد [۲۰]. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند هموسیستئین می‌تواند به طور مستقیم بر متابولیسم بتا‌آمیلوئید و تاؤ تأثیر بگذارد [۲۱]. از آنجایی که 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 می‌کند [۲۲]، در این کار پژوهشی بر اساس تخریب ایجاد شده در NBM، تأثیر تجویز اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> به صورت مجزا و تجویز توأم آن‌ها بر حافظه فضایی در موش‌های آلزایمری با تخریب دوطرفه هسته NBM مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی تعداد ۴۹ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد wistar در محدوده وزنی  $20 \pm 200$  در شروع

دو طرفه با روش الکتریکی تخریب شد و اسید فولیک ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ویتامین B<sub>12</sub> ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (FA-B<sub>12</sub>)، به مدت ۵ روز به صورت هم‌زمان نیم ساعت قبل از آموزش به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. گروه تخریب - سالین (حلال)، 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 نیم ساعت قبل از آموزش به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند.

جهت تخریب هسته NBM، حیوانات آزمایشگاهی تحت بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین هیدروکلراید ۱۰ درصد (۷۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین ۲ درصد (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) 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 [۲۵]. 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 تخریب‌ساز با شدت جریان ۰/۵ میلی‌آمپر به مدت ۳ ثانیه، تخریب و مدل بیماری آلزایمر ایجاد گردید [۲۶]. 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 سانتی‌متر) و ۸ بازو با فواصل یکسان (طول ۵۰ سانتی‌متر، عرض ۱۰ سانتی‌متر) 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 ۸ بازویی شعاعی، به رابطه‌ای که موش‌ها بین نشانه‌ها در محیط و جایگاه پاداش برقرار می‌کنند، متکی است. از این جهت، بیانگر یادگیری فضایی است [۲۷]. قبل از شروع آموزش، با محدود کردن غذا، وزن موش‌ها به ۸۵ درصد وزن اولیه رسید و این وزن 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 [۲۸]. 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 میلی‌گرم آماده شد [۲۷-۲۹]. 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 [۲۷].

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 نمایند 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. دومین مرحله، اکتساب به دنبال مرحله آشنایی است.

## آنالیز آماری

برای انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. با توجه به اینکه داده‌ها به صورت کمی بود، توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov فرض طبیعی بودن توزیع داده‌ها تأیید گردید ( $P > 0/05$ ). همچنین با توجه به  $P > 0/05$  در آزمون برابری واریانس‌ها بین گروه‌ها، تساوی واریانس گروه‌ها تأیید گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی Tukey تحلیل شدند. نتایج 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.

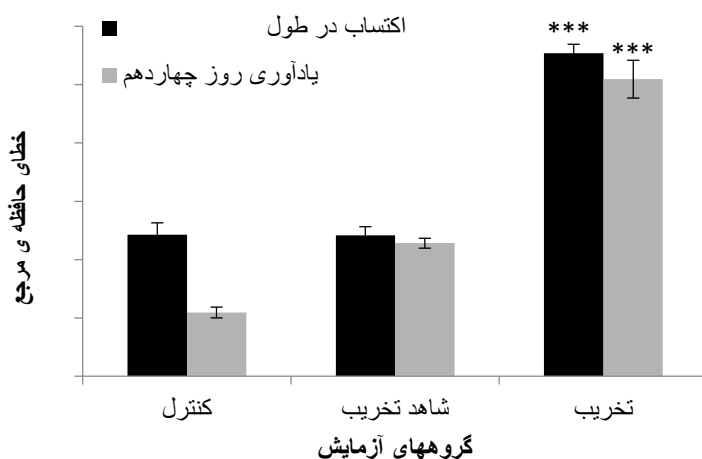
## نتایج

مقایسه گروه‌های کنترل و شاهد تخریب 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 صحرائی در مقایسه با گروه کنترل نداشت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بیانگر این است که تخریب دو طرفه هسته‌ی NBM با القای جریان الکتریکی، منجر به تخریب روند اکتساب و بخاطرآوری حافظه فضایی در روز چهاردهم می‌گردد. به طوری که تخریب دو طرفه هسته NBM منجر به افزایش خطای حافظه مرجع در گروه تخریب NBM در مقایسه با گروه کنترل شد ( $P > 0/001$ ). این اثر هم در روند آموزش و هم در مرحله یادآوری مشاهده شد (نمودار ۱).

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 و ماز تمیز گردید. مرحله سوم، آزمون یادآوری بود که ۷ روز بعد از اکتساب انجام شد. آزمون‌های اکتساب و یادآوری خطای حافظه مرجع، خطای حافظه کارکردی و مدت زمان سپری شده در ماز مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند [۲۷-۲۸].

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 بازوهای 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 [۲۷]. خطای حافظه کارکردی (Working memory error) به عنوان ورود مجدد به یک بازو که در آن طعمه را در طول مراحل قبلی آزمایش دریافت کرده است، تعریف می‌شود. خطای حافظه مرجع (Reference memory error) به عنوان ورود به بازوهای که هرگز در آن طعمه‌گذاری صورت نگرفته باشد، اطلاق می‌شود [۳۰].



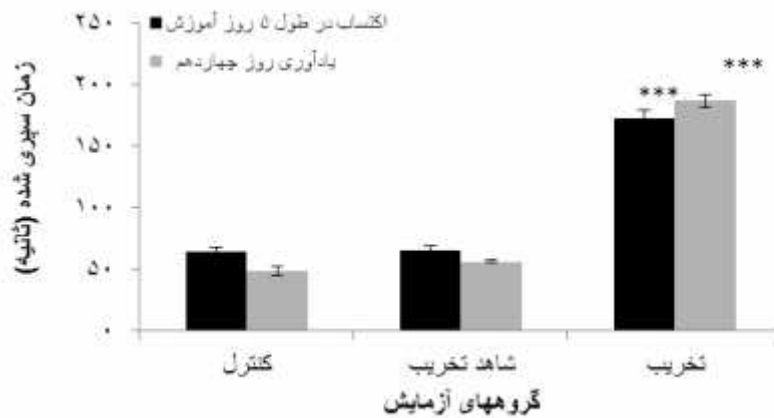
نمودار ۱- تأثیر تخریب هسته NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و آزمون یادآوری روز ۱۴ در ماز شعاعی برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب و تخریب (P < ۰/۰۰۱). آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey.

این اثر در طی مرحله به یادآوری نیز مشاهده شد (نمودار ۲). همچنین مدت زمان سپری شده برای یافتن طعمه‌ها در طول مرحله اکتساب و یادآوری در گروه تخریب NBM به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد (P < ۰/۰۰۱) (نمودار ۳).

آنالیز آماری داده‌ها بیانگر این است که تخریب دو طرفه NBM، حافظه کارکردی را برای پیدا کردن موقعیت‌های پاداشی دچار اختلال می‌کند. به طوری که منجر به افزایش معنی‌دار خطای حافظه کارکردی در طول روند آموزش در گروه تخریب در مقایسه با گروه کنترل گردید



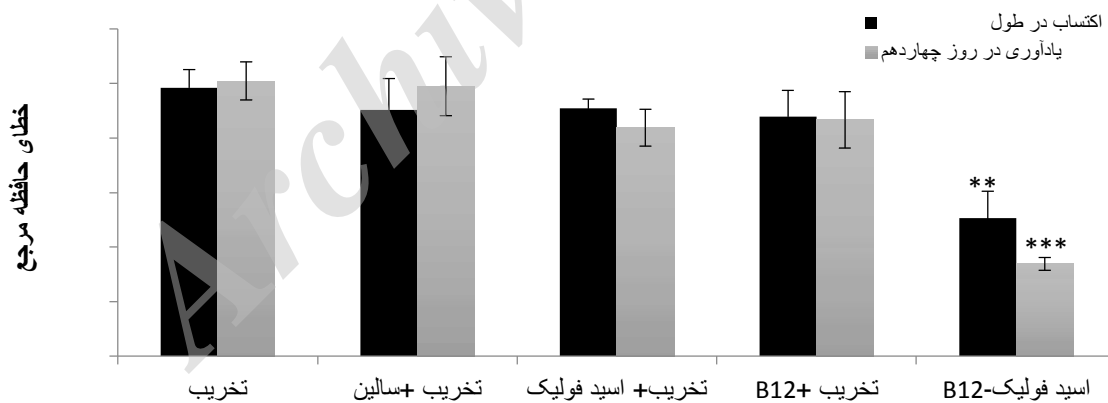
نمودار ۲- تأثیر تخریب هسته NBM بر خطای حافظه کارکردی. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و آزمون یادآوری روز ۱۴ در ماز شعاعی برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب و تخریب (P < ۰/۰۰۱). آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey.



نمودار ۳- تأثیر تخریب هسته NBM بر مدت زمان سپری شده در ماز. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و آزمون یادآوری روز ۱۴ در ماز شعاعی برای گروه‌های کنترل، شاهد تخریب و تخریب (\*\*\* $P < 0.001$ ). آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey.

تجویز توأم اسید فولیک و ویتامین B12 در مقایسه با گروه تخریب، منجر به کاهش معنی‌دار خطای حافظه مرجع در مرحله اکتساب ( $P=0.002$ ) و یادآوری ( $P < 0.001$ ) گردید (نمودار ۴).

آنالیز آماری یافته‌ها نشان داد در گروه تخریب+اسید فولیک و گروه تخریب+ ویتامین B12 در مقایسه با گروه تخریب، اثر معنی‌داری بر روی خطای حافظه مرجع در مرحله اکتساب و یادآوری مشاهده نشد ( $P < 0.05$ ) ولی



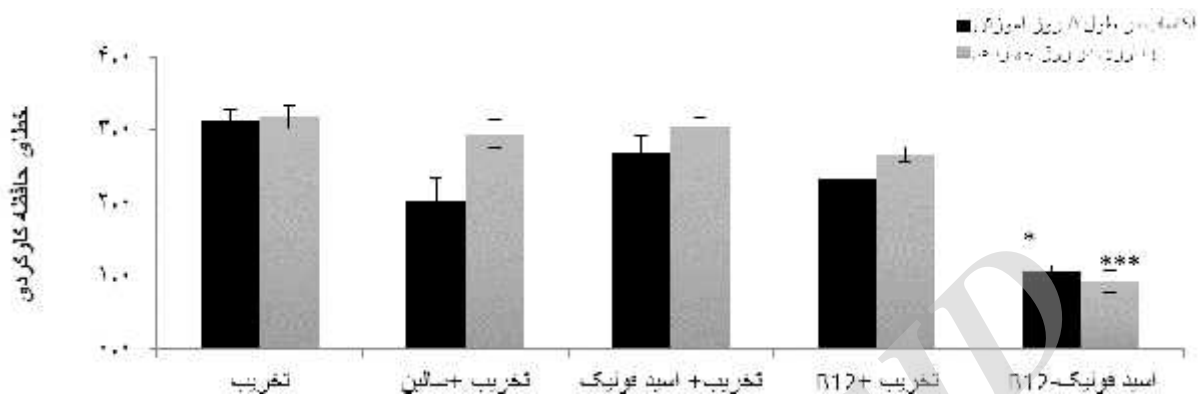
نمودار ۴- تأثیر تخریب هسته NBM بر خطای حافظه مرجع. مقایسه (Mean±S.E.M) بر اکتساب و آزمون یادآوری روز ۱۴ در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال سالین، اسید فولیک، ویتامین B12 و اسید فولیک - ویتامین B12 (\*\* $P < 0.01$ ، \*\*\* $P < 0.001$ ). آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey.

تفاوت معنی‌داری با گروه تخریب وجود نداشت. به علاوه، تیمار رت‌های آلزایمری با ویتامین B12 ۵ mg/kg در

از نظر خطای حافظه کارکردی، در گروه تخریب + اسید فولیک در مرحله اکتساب ( $P=0.993$ ) و یادآوری ( $P=1$ )

حافظه کارکردی در مرحله اکتساب ( $P=0/032$ ) و یادآوری ( $P=0/007$ ) گردید (نمودار ۵).

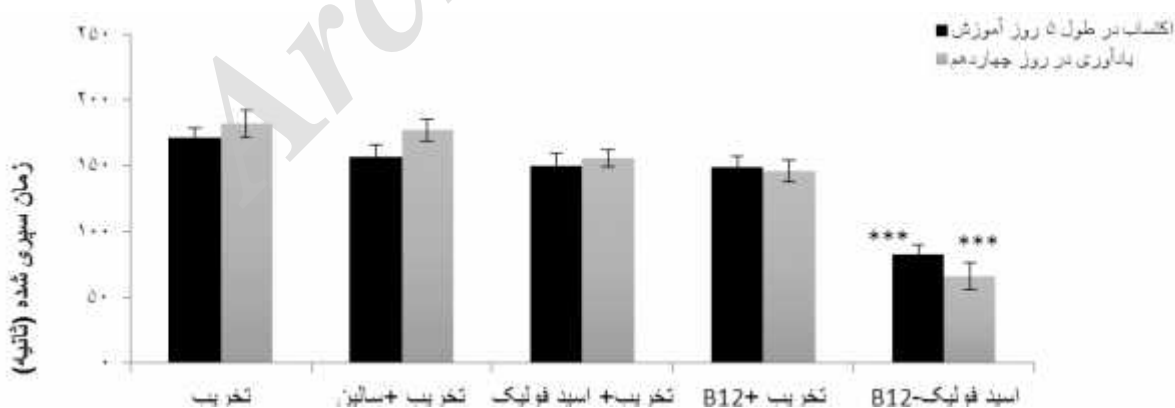
مرحله اکتساب ( $P=0/881$ ) و یادآوری ( $P=0/973$ ) تفاوت معنی‌داری با گروه تخریب نشان نداد ولی تجویز توأم اسید فولیک- ویتامین B<sub>12</sub> منجر به کاهش معنی‌دار خطای



نمودار ۵- تأثیر تخریب هسته NBM بر خطای حافظه کارکردی. مقایسه ( $Mean \pm S.E.M$ ) بر اکتساب و آزمون یادآوری روز ۱۴ در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال، اسید فولیک، ویتامین B<sub>12</sub> و اسید فولیک- ویتامین B<sub>12</sub> ( $P=0/05$ , \*\*  $P=0/01$ ). آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey.

اکتساب ( $P=0/426$ ) و یادآوری ( $P=0/062$ ) مشاهده نشد ولی تجویز توأم اسید فولیک- ویتامین B<sub>12</sub> در مرحله اکتساب و یادآوری منجر به کاهش معنی‌دار زمان سپری شده در مقایسه با گروه تخریب گردید ( $P=0/001$ ) (نمودار ۶).

از نظر زمان سپری شده برای یافتن طعمه‌ها، در گروه تخریب + اسید فولیک در مقایسه با گروه تخریب تفاوت معنی‌داری در مرحله اکتساب ( $P=0/460$ ) و یادآوری ( $P=0/327$ ) مشاهده نشد. همچنین در گروه تخریب+ ویتامین B<sub>12</sub> تفاوت معنی‌داری با گروه تخریب در مرحله



نمودار ۶- تأثیر تخریب هسته NBM بر مدت زمان سپری شده در ماز. مقایسه ( $Mean \pm S.E.M$ ) بر اکتساب و آزمون یادآوری روز ۱۴ در ماز شعاعی برای گروه‌های تخریب، حلال، اسید فولیک، ویتامین B<sub>12</sub> و اسید فولیک- ویتامین B<sub>12</sub> ( $P=0/001$ , \*\*\*  $P=0/001$ ). آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey.



## بحث

NBM منبع اولیه انشعاب کولینرژیک هیپوکامپ و کورتکس می‌باشد و فعالیت کولینرژیک قشری NBM در طی مراحل اولیه کسب حافظه کارکردی و ذخیره حافظه مرجع ضروری است [۳۱]. نتایج حاصل از تحقیق کنونی نشان می‌دهد تخریب الکتریکی دو طرفه NBM پیش از آموزش، باعث کاهش معنی‌داری در روند اکتساب و فراخوانی در ماز شعاعی هشت بازویی می‌شود. Rabiei و همکاران گزارش کردند که تخریب دو طرفه هسته NBM با روش الکتریکی باعث کاهش یادگیری اجتنابی غیر فعال در دستگاه شاتل باکس می‌شود [۳۲]. همچنین Zahedi و همکاران 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 [۳۳]. در ادامه این کار پژوهشی تجویز اسید فولیک ۵ mg/kg و یا ویتامین B12 ۵mg/kg به حیوانات آلزایمری نتوانست منجر به بهبودی حافظه مرجع و کارکردی در طول مراحل آموزش گردد در حالی که تجویز توأم اسیدفولیک-ویتامین B12 منجر به کاهش معنی‌دار خطای حافظه کارکردی و مرجع و بهبود حافظه فضایی گردید. بررسی‌های مختلف نشان داد که کمبود ویتامین‌های گروه B در پاتوژنز بیماری آلزایمر دخیل است. اسید فولیک و ویتامین B12 برای عملکرد سیستم عصبی در تمام سنین مهم می‌باشند. با افزایش سن، غلظت فولات و متابولیت آن، S-آدنوزیل متیونین به طور قابل توجهی در مایع مغزی نخاعی کاهش می‌یابد. این کاهش در غلظت فولات باعث هیپرهوموسیستئینمی

می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است که هموسیستئین افزایش‌یافته منجر به فعال شدن گیرنده‌های NMDA می‌شوند و بنابراین، افزایش هموسیستئین در بیماران آلزایمری ممکن است منجر به سمیت نورونی و مرگ سلول گردد [۳۴]. Singh و همکاران گزارش کردند که تیمار موش‌های صحرایی پیر به مدت ۸ هفته با اسید فولیک ۵ mg/kg منجر به بهبود معنی‌دار حافظه در تست حافظه اجتنابی فعال، افزایش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی در مقایسه با گروه کنترل گردید. در این مقاله پیشنهاد شده است که اسید فولیک با کاهش استرس اکسیداتیو و حفظ یکپارچگی نورونی منجر به بهبود حافظه می‌گردد [۳۵]. همچنین Li و همکاران گزارش کردند تیمار سلول‌های نوروبلاستوما انسانی (SH-SY5Y) با اسید فولیک منجر به مهار فسفوریلاسیون پروتئین تائو به واسطه مهار واکنش‌های دمتیلاسیون پروتئین فسفاتاز 2A (PP2A) می‌گردد. از آنجایی که کلافه‌های نوروفیبریلاری متشکل از پروتئین‌های هایپرفسفریله تائو یکی از مارکرهای پاتولوژیک در بیماری آلزایمر می‌باشند، اسید فولیک به واسطه مهار فسفوریلاسیون تائو دارای اثرات امیدبخشی در جریان بیماری می‌باشد [۳۶]. چندین مطالعه تجربی نیز نشان دادند که ویتامین B12 می‌تواند نوروون‌های مرکزی را از غلظت‌های بالای گلوتامات محافظت کند [۳۷]. این موضوع پیشنهاد می‌کند که ویتامین B12 فقط برای عملکرد طبیعی مغز مورد نیاز نمی‌باشد بلکه یک نقش حفاظتی در برابر سموم تولید شده تحریک‌کننده مغز را نیز ایفا می‌کند؛ اگرچه مکانیسم زمینه‌ساز اثرات حفاظت‌کننده نورونی ویتامین B12 مبهم

نوع تزریق و فاکتور زمان بوده است. با توجه به اینکه در این پژوهش اثر اسیدفولیک و ویتامین B<sub>12</sub> به طور مجزا و همچنین اثر تجویز توأم اسید فولیک- ویتامین B<sub>12</sub> بر سطح هموسیستئین در موش صحرائی آلزایمری بررسی نشده است، پیشنهاد می‌شود برای بررسی دقیق‌تر اثر این ویتامین‌ها بر حافظه‌ی فضایی در موش صحرائی آلزایمری، تغییرات سطح هموسیستئین در این مدل ارزیابی شود.

### نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر تخریب دو طرفه NBM به عنوان مدلی جهت القای بیماری آلزایمر در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. تجویز توأم اسیدفولیک- ویتامین B<sub>12</sub> تا حدودی منجر به کاهش عوارض ناشی از تخریب NBM گردید. بنابراین، تیمار با اسیدفولیک و ویتامین B<sub>12</sub> را می‌توان به عنوان یک روش جهت بهبود علائم آلزایمر پیشنهاد نمود.

### تشکر و قدرانی

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 می‌آید.

باقی مانده است [۳۸]. همچنین گزارش شده است که افزایش سطح هموسیستئین در اثر کمبود اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> منجر به کاهش نورونی می‌گردد که این امر ممکن است از طریق همومیتیلایسیون DNA اتفاق بیفتد. اثرات مستقیم بر روی نقایص مغزی می‌تواند توسط اسید فولیک یا مکمل‌های ویتامین B آنتاگونیست شود که منجر به کاهش سطح هموسیستئین و کاهش نورونی می‌شود [۳۹-۴۰]. Smith و همکاران گزارش کردند تیمار بیماران نقایص شناختی دارای سطح بالای هموسیستئین با ویتامین‌های B، به واسطه کاهش سطح هموسیستئین منجر به کند شدن سرعت آتروفی مغزی می‌گردد [۴۱]. در پژوهش حاضر، تیمار موش‌های صحرائی آلزایمری با اسید فولیک و یا ویتامین B<sub>12</sub> به تنهایی نتوانست نتایج قابل توجهی بر روی حافظه نشان دهد، در حالی که تجویز توأم این ترکیبات اثرات معنی‌داری را در جهت بهبودی حافظه فضایی اعمال کرد. به نظر می‌رسد که تفاوت نتیجه گزارش‌های ارائه شده با نتیجه پژوهش حاضر، با توجه به اینکه در این پژوهش از تزریق داخل صفاقی استفاده شده و مدت زمان تیمار ۵ روز بوده، احتمالاً به دلیل تفاوت در

## References

- [1] Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of Neural Science. 4<sup>th</sup>- Edition. McGraw-Hill, New York, 2000; 961- 2.
- [2] Khan Mohamadi M, Farhud D, Malmir M. Genetic of alzheimer s disease: a narrative review article. *I J Public Health* 2015; 44 (7): 892-901.
- [3] Whitehouse PJ, Price DI, Struble RG, Clark AW. Alzheimer s disease and senile dementia: loss of

- neurons in the basal forebrain. *Sci* 1982; 215(4537): 1237-9.
- [4] Rabiei Z, Rafeian-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.
- [5] Nyakas C, Granic L, Halmy L, Baner Jee P, Luiten G. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid A-42 with memantine. *Behav Brain Res* 2011; 221 (2): 594-603.
- [6] Popovic M, Popovic N, Jovanova N, Bokonjic D, Dobric S. Effect of physostigmine and verapamil on active avoidance in an experimental model of Alzheimer s disease. *Inter J Neurosci* 1997; 92(1-2): 87-93.
- [7] Salamone ID, 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.
- [8] Oulhaj A, Refsum H, Beaumont H, Williams J, King E, Jacoby R, Smith AD. Homocysteine as predictor of cognitive decline in Alzheimer disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2010; 25 (1): 82–90.
- [9] Serot JM, Barbe` F, Arming E, Bottiglieri T, Frank P, Montoghe P, Nicolas P. Homocysteine and methylmalonic acid concentration in cerebro-spinal fluid: relation with age and Alzheimer's disease. *J Neurosurg Psychiatry* 2005; 76 (11): 1585–7.
- [10] Miller AL. The methionin-homocystein cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern Med Re* 2003; 8 (1): 7-19.
- [11] Kobe T, Witte V, Schnelle A, Grittner U, Tesky V, Pantel J. Vitamin B-12 concentration, memory performance, and hippocampal structure in patients with mild cognitive impairment. *Am J Clin Nutr* 2016; 103 (4): 1045-54.
- [12] Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cattaruzza T, Cazzato G, Bava A. Vitamin B12 and folate depletion in cognition: a review. *Neurology India*. 2004; 52(3): 310-8.
- [13] Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet Neurology* 2006; 5(11): 949-60.
- [14] Almeida CC, Brentani HP, Forlenza OV, Diniz BS. Serum folic acid is reduced in patients with Alzheimer's disease. *Rev Psiquiatr Clin* 2012; 39(3): 90-3.
- [15] Wang HX, Wahlin A, Basun H, Fastbom J, Winblad B, Fratiglioni I. Vitamin B12 and folate in relation to the development of Alzheimer's disease. *Neurology* 2001; 56 (9): 1188-94.
- [16] Zhang CE, Wei W, Liu YH, Peng JH, Tian Q, Liu GP. Hyperhomocysteinemia increases b-amyloid by enhancing expression of c-secretase on phosphorylation of amyloid precursor protein in rat brain. *Am J Pathol* 2009; 174 (4): 1481-91.
- [17] Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujoka H, Wang Y. Amyloid-b over-production causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/ fusion

- proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(49): 19318-323.
- [18] Arshavasky YI. Why Alzheimer's disease starts with a memory impairment: neurophysiological insight. *J Alzheimer Dis* 2010; 20 (1): 5-16.
- [19] Tchanchou F, Graves M, Falcone D, Shea TB. S-adenosyl methionine mediates glutathione efficacy by increasing glutathione S-transferase activity: implications for S-adenosylmethionine as a neuroprotective dietary activity supplement. *J Alzheimer Dis* 2008; 14(3): 323-8.
- [20] Kim SR. Plasma total homocysteine levels are not associated with medial temporal lobe atrophy, but with white matter changes in Alzheimer's disease. *J Clin Neurol* 2009; 5(2): 85-90.
- [21] Cacciapuoti F. Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Thromb Thrombolysis* 2013; 36(3): 258-62.
- [22] 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.
- [23] Lalonde R, Barraud H, Ravey J, Guent JL, Bronowicki JP, Sterazille C. Effects of a B-vitamin deficient diet on exploratory activity, motor coordination, and spatial learning in young adult Balb/c mice. *Brain Res* 2008; 1188 (1): 122-31.
- [24] Mastronardi FG, Min W, Wang H, Winer S, Dosch M, Boggs JM. Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN-beta plus vitamin B<sub>12</sub>: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance. *J Immunol* 2004; 172(10) : 618-26.
- [25] Montero A, Vale-Martinez A, Guillazo G. Effect of electrical stimulation of the nucleus basalis on two-way active avoidance acquisition, retention and retrieval. *Behav Brain Res* 2004; 154(1): 41-54.
- [26] Moazedi A.A, Mosavi M, Chinipardaz R. The effect of estrogen on passive avoidance memory in an experimental model of Alzheimer disease in male rats. *Physiol Pharma* 2011; 14(4): 416-25.
- [27] Luine V.N and Frankfurt M. Estrogen facilitate memory processing through membrane mediated mechanisms and alterations in spike density. *Front Neuroend* 2012; 33 (4): 388-402.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.

- [31] 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 A-42 with memantine. *Behav Brain Res* 2011; 221 (2): 594-603.
- [32] 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.
- [33] 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): 1197-206.
- [34] Troen A. Folate and Vitamin B12: Function and Importance in Cognitive Development. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2012; 70 161-71.
- [35] Singh R, Kanwar SH, Sood P, 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.
- [36] Li W, Jiang M, Xiao Y, Zhang X, Cui S, Huang G. Folic acid inhibits tau phosphorylation through regulation of PP2A methylation in SH-SY5Y cells. *J Nutr Health Aging* 2015; 19(2): 123-9.
- [37] Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, Akaike A. Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B12 analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1997; 38(5): 848-54.
- [38] Akaike A, Tamura Y, Sato Y, Yokota T. Protective effects of a vitamin B12 analog, methylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *European Journal of Pharmacology* 1993; 241(1): 1-6.
- [39] Nicolai V, Fuso A, Cavallaro RA, Di Luzio A, Scarpa S. B vitamin deficiency promotes tau phosphorylation through regulation of GSK 3-beta and PP2A. *J Alzheimer Dis* 2010; 19(3): 895–907.
- [40] Yu NK, Back SH, Kaang BK. DNA methylation-mediated control of learning and memory. *Mol Brain* 2011; 4: 5.
- [41] Smith AD, Smith SM, De Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G. Homocysteine-lowering by vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2010; 5(9): 212-44.

## The Synergist Effects of Folic Acid and Vitamin B<sub>12</sub> on Spatial Memory in Adult Male Rat Model of Alzheimer's Disease

A. Eskandary<sup>1</sup>, A.A. Moazedi<sup>2</sup>, N. Zamani<sup>3</sup>

Received: 26/09/2017 Sent for Revision: 28/10/2017 Received Revised Manuscript: 16/12/2017 Accepted: 20/12/2017

**Background and Objectives:** Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized clinically by progressive memory loss and subsequent dementia. The aim of this study was to evaluate the synergist effect of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on spatial memory in adult male rat Alzheimer's disease.

**Material and methods:** In this experimental study, 49 male Wistar rats were randomly divided into 7 groups: (7 rats in each group): control (intact), 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), NBM lesion + folic acid 5mg/kg, NBM lesion+ vitamin B<sub>12</sub> 5mg/kg, NBM lesion+ folic acid- vitamin B<sub>12</sub>, NBM lesion + saline. Acquisition and retention testing was done by using an eight-radial arm maze, in which the patterns of arm entries were recorded in each group for calculating working memory errors, reference memory error ,and latency. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

**Results:** The 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). The administration of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> alone did not have any significant effect on spatial memory parameters compared with the lesion group. Co-administration folic acid- vitamin B<sub>12</sub> resulted in a reduction in the reference and working memory errors and the time spent in the eight-arm radial laser maze.

**Conclusion:** According to the results, the NBM lesion resulted in a reduction in spatial memory and co-administration of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> resulted in improved spatial memory.

**Key words:** Alzheimer disease, Nucleus Basalis Magnocellularis, Folic acid, Vitamin B<sub>12</sub>, Radial maze

**Funding:** This research was funded by Shahid Chamran University.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethical Committee of Shahid Chamran University approved the study.

**How to cite this article:** Eskandary A, Moazedi A.A, Mamani N. The Synergist Effects of Folic Acid and Vitamin B<sub>12</sub> on Spatial Memory in Adult Male Rat Model of Alzheimer's Disease. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 16(10): 925-38. [Farsi]

1- PhD Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Corresponding Author) Tel: (061)33331045, Fax: (061)33331045, E-mail: azade.eskandary@gmail.com

2- Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- PhD Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Payam-e-noor University, Tehran, Iran