

تحقیقی

اثر دونپزیل هیدروکلراید بر اختلالات حافظه مرجع و کارکردی ناشی از تخریب الکتریکی دوطرفه هسته قاعده‌ای مگنوسولولاریس در مدل بیماری آلزایمر موش صحرائی

آزاده اسکندری^۱، دکتر احمدعلی معاضدی*^۲، دکتر حسین نجف زاده ورزی^۳، دکتر محمدرضا آخوند^۴

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران. ۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران. ۳- استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران. ۴- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. ۵- استادیار، گروه آمار، دانشکده علوم ریاضی و کامپیوتر، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اختلال عملکرد و کاهش نورون‌های کولینرژیک قاعده قدامی مغز در زمره ابتدایی‌ترین وقایع پاتولوژیکی بیماری آلزایمر است. این مطالعه به منظور تعیین اثر دونپزیل هیدروکلراید بر اختلالات حافظه مرجع و کارکردی ناشی از تخریب الکتریکی دوطرفه هسته قاعده‌ای مگنوسولولاریس (NBM) در مدل بیماری آلزایمر موش صحرائی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۵۶ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار به‌طور تصادفی در ۸ گروه ۷ تایی شامل کنترل، 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)، گروه‌های تخریب تحت تیمار با دونپزیل (۰/۱، ۰/۵ و ۱۰)، گروه سالین (تخریب NBM + سالین) قرار گرفتند. در آزمون‌های اکتساب و یادآوری دستگاه ماز شمعی هشت بازویی، الگوهای ورود به بازوها در هر گروه برای محاسبه انتخاب بازوهای صحیح، خطای حافظه کارکردی، خطای حافظه مرجع و زمان سپری شده در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: تخریب الکتریکی دو طرفه هسته NBM در گروه تخریب، یادگیری فضایی را نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($P < 0/05$). همچنین وارد کردن الکتروود به هسته NBM بدون القای جریان الکتریکی نسبت به گروه تخریب، اثری بر یادگیری فضایی نداشت. تزریق دونپزیل بعد از القای جریان به صورت وابسته به دوز سبب بهبود متغیرهای خطای حافظه فضایی نسبت به گروه تخریب شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: تیمار موش‌های صحرائی با دونپزیل بعد از تخریب NBM به‌صورت وابسته به غلظت اختلال شناختی ناشی از تخریب را بهبود می‌دهد.

کلید واژه‌ها: آلزایمر، هسته قاعده‌ای مگنوسولولاریس، حافظه، دونپزیل هیدروکلراید، موش صحرائی

* نویسنده مسؤول: دکتر احمدعلی معاضدی، پست الکترونیکی moazedi.a@gmail.com

نشانی: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن ۰۶۱-۳۳۳۳۱۰۴۵، نمابر ۳۳۳۳۱۰۴۵

وصول مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۲۱، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۶/۶، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۶/۲۵

مقدمه

افزایش پروتئین‌های آمیلوئیدی بتا در سطح قشری با کاهش استیل کولین همراه است (۳). سیستم کولینرژیک، کارایی قابل ملاحظه‌ای در پردازش اطلاعات بخش‌های بزرگی از قشر و هیپوکامپ دارد و در تفکیک منابع توجه، حافظه کارکردی، جلوگیری از ورود اطلاعات نامربوط و بهبود عملکرد در کارهای مستمر نقش دارد (۵۴). هسته قاعده‌ای مگنوسولولاریس (Nucleus basalis magnocellularis: NBM) یکی از هسته‌های قاعده‌ای مغز جلویی در جوندگان است که معادل هسته قاعده‌ای مینز در انسان است. بیشتر از ۹۰ درصد از نورون‌ها در NBM کولینرژیک هستند که فیبرهای خود را به تمام قشر و آمیگدال گسیل می‌دهند (۶). ۷۰ تا ۸۰ درصد اعصاب کولینرژیک قشر مغز

بیماری آلزایمر یک اختلال عصبی پیشرونده و غیرقابل برگشت از دمانس است. این بیماری به‌وسیله نقایص پیشرونده حافظه و کاهش کارایی ادراکی مشخص می‌شود. بیماری آلزایمر حدود ۱۵ میلیون از افراد جهان را درگیر کرده و انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۴۰ به ۸۰ میلیون نفر افزایش یابد. حدود ۱۰ درصد از افراد بالای ۶۵ سال و ۵۰ درصد از افراد بالای ۸۵ سال از آلزایمر رنج می‌برند (۱). شاخصه‌های اصلی این بیماری شامل رشته‌های درهم تنیده داخل نورونی متشکل از رشته‌های حاوی فرم فسفریله پروتئین میکروتوبولی تاو و تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی خارج سلولی متشکل از رسوب پروتئین‌های آمیلوئیدی بتا خارج سلولی است (۲).

تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. در روند اجرای مطالعه، کلیه ضوابط منشور و موازین اخلاق پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رعایت گردید. مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق (کد ۱۳۹۰ الف ۹ ج ۱۸۰/۵۵/Q) دانشگاه شهید چمران اهواز قرار گرفت.

داروی دونیزیل هیدروکلراید (CAS number: 120011-70-3، شرکت سیگما) حل شده در نرمال سالین ۰/۹ درصد به عنوان حلال استفاده شد. دارو هر روز تهیه و در حجم یک میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

برای ایجاد مدل آلزایمر و تخریب دوطرفه هسته NBM، حیوانات آزمایشگاهی تحت بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از ۷۸ mg/kg کتامین هیدروکلراید ۱۰ درصد و ۳ mg/kg زایلازین ۲ درصد قرار گرفتند. برای تخریب این هسته، از دستگاه استریوتاکسی (شرکت stoelting، آمریکا) استفاده شد. مختصات مورد استفاده طبق اطلس پاکسینوس و واتسون شامل $AP = -1/3$ از برگما، $ML = \pm 2/8$ از خط وسط و $DV = 7/6$ از سطح سخت شامه (۱۷) بود. بعد از قرارگیری الکتروود تک قطبی تخریبی در نقطه مورد نظر (جنس پلاتین، روکش تفلون، شرکت stoelting آمریکا) هسته NBM با استفاده از دستگاه تخریب ساز (lesion maker device) با شدت جریان ۰/۵ میلی آمپر به مدت ۳ ثانیه تخریب و مدل بیماری آلزایمر ایجاد گردید.

حیوانات به طور تصادفی در ۸ گروه ۷ تایی به شرح زیر گروه بندی شدند (۱۸).

گروه اول (کنترل): تحت هیچگونه عمل جراحی یا تزریق دارو قرار نگرفت.

گروه دوم (تخریب): مدل بیماری آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM با روش الکتریکی.

گروه سوم (شاهد تخریب): الکتروود به صورت دوطرفه به هسته NBM موش ها وارد شد؛ اما تخریبی ایجاد نگردید.

گروه های چهارم، پنجم، ششم و هفتم: مدل آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM با روش الکتریکی ایجاد شد. حیوانات بعد از گذشت ۷ روز، ۳۰ دقیقه قبل از آموزش، داروی دونیزیل را به ترتیب با مقادیر ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم (گروه تیمار اول)، یک میلی گرم بر کیلوگرم (گروه تیمار دوم)، ۵ میلی گرم بر کیلوگرم (گروه تیمار سوم) و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم (گروه تیمار چهارم) به صورت داخل صفاقی به حجم یک میلی لیتر بر کیلوگرم دریافت کردند.

گروه هشتم (گروه سالین، حلال دارو): مدل آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM با روش الکتریکی ایجاد شد. بعد از گذشت ۷ روز، ۳۰ دقیقه قبل از آموزش، سالین (حلال دارو) را به صورت داخل صفاقی به حجم یک میلی لیتر بر کیلوگرم دریافت کردند.

از هسته مینرت منشأ گرفته اند. در بیماران مبتلا به آلزایمر ۵۰ تا ۸۸ درصد این نورون ها از بین می روند. بنابراین از موش های با تخریب NBM می توان به عنوان مدل حیوانی آلزایمر استفاده کرد و یکی از روش های ایجاد مدل حیوانی آلزایمر، تخریب نورون های NBM با استفاده از روش الکتریکی است (۷). یافته های بالینی و آزمایشگاهی از این فرضیه حمایت می نماید که کاهش نورون های کولینرژیک قاعده مغز جلویی و متعاقب آن کاهش کولین استیل ترانسفراز به طور معنی داری سبب بروز اختلالات شناختی در بیماری آلزایمر می گردد (۸-۱۰). دونیزیل یک مهار کننده غیر رقابتی برگشت پذیر آنزیم کولین استیل استراز با میل ترکیبی بالا برای سیستم کولینرژیک مرکزی در مقایسه با سیستم کولینرژیک محیطی است. تحلیل نورون های کولینرژیک مرتبط با کاهش انتقال کولینرژیک در نئوکورتکس و دیگر نواحی مغزی، به طور معنی داری موجب کاهش اعمال شناختی مشاهده شده در بیماران آلزایمری شده است (۱۱). اختلال در انتقال دهنده های گلو تامات در اختلالات مزمن عصبی نظیر بیماری آلزایمر دخالت دارد (۱۲). دونیزیل از هیدرولیز استیل کولین باقی مانده در مغز ممانعت می نماید و ابزار فارماکولوژیکی مفیدی برای تضعیف اختلالات شناختی در بیماران آلزایمری است (۱۳). شواهد روز افزون نشان می دهند که آنتی کولین استرازها دارای اثرات حفاظت کننده نورونی هستند (۱۴). در حال حاضر مهار کننده های استیل کولین استراز به عنوان یک درمان علامتی برای بهبود یا حداقل حفظ عملکرد کولینرژیک مرکزی استفاده می شوند (۳). دونیزیل نورون ها را در برابر تحلیل نورونی القاء شده توسط بتا آمیلوئید محافظت می نماید (۱۵). همچنین دارای اثر محافظتی در برابر سمیت گلو تامات، آسیب نورونی و سمیت نورونی بتا آمیلوئید بوده و موجب تنظیم افزایش گیرنده های استیل کولینی موسکارینی می گردد (۱۴ و ۱۶). الگوهای تخریب هسته کولینرژیک NBM برای مطالعه نقش سیستم کولینرژیک قشری در هوشیاری و درک به کار می رود و بر نقص های ادراکی ایجاد شده در بیماری آلزایمر دلالت دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثر دونیزیل هیدروکلراید بر اختلالات حافظه مرجع و کارکردی ناشی از تخریب الکتریکی دوطرفه هسته قاعده ای مگنوسولاریس در مدل بیماری آلزایمر موش صحرائی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۵۶ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی 20 ± 20 گرم خریداری شده از مرکز تکثیر دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در دانشگاه شهید چمران اهواز طی سال های ۹۶-۱۳۹۵ انجام شد.

حیوانات تحت شرایط کنترل شده دمایی 23 ± 3 درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۰-۴۰ درصد و در یک چرخه روشنایی-

غذا یافته بودند را به یادآورده و دوره آزمون را مطابق الگوی تعیین شده برای هر موش کامل کنند (۱۹).

خطای حافظه کارکردی (working memory error) به عنوان ورود مجدد موش به یک بازو که در آن پاداش غذایی را در طول مراحل قبلی آزمایشات دریافت کرده بود؛ تعریف شد. خطای حافظه مرجع (reference memory error) به عنوان ورود موش به یک بازو که هرگز در طی آزمایش طعمه گذاری نشده بود؛ تعریف شد (۲۱).

داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-20 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه آماری عملکرد حافظه کارکردی و مرجع در دو آزمون اکتساب و یادآوری ماز شعاعی هشت بازویی، از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی Tukey استفاده گردید. داده ها به صورت میانگین و انحراف استاندارد از میانگین (Mean±S.E.M) گزارش شد و سطح معنی داری آزمون ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شدند.

یافته ها

میزان خطای حافظه فضایی گروه کنترل در مقایسه با گروه شاهد تخریب در طول دوره اکتساب و یادآوری اختلاف آماری معنی داری نشان نداد.

تخریب دوطرفه هسته NBM با القای جریان الکتریکی، منجر به تخریب روند اکتساب و به خاطر آوری حافظه فضایی گردید. به طوری که طی آزمون اکتساب (۳/۷۲±۰/۰۵۶) و یادآوری (۳/۵۱±۰/۰۶۶) گروه تخریب هسته NBM در مقایسه با گروه کنترل از نظر میزان پاسخ های صحیح کاهش آماری معنی داری نشان دادند ($P < 0/001$) (جدول یک). افزایش خطای حافظه مرجع ($P < 0/001$) و خطای حافظه کارکردی ($P < 0/001$) در روند آموزش و مرحله یادآوری مشاهده شد (جدول یک). مدت زمان سپری شده برای انتخاب بازوهای صحیح در طول مرحله اکتساب (۲۲۰/۲۸±۱۲/۸۰) و یادآوری (۲۳۱/۶۲±۸/۱۸) در گروه تخریب به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ($P < 0/001$) (جدول یک).

تجویز دونپزیل طی مرحله اکتساب در موش های صحرائی آلزایمری منجر به بهبود در پاسخ های صحیح در مقایسه با گروه تخریب گردید. به طوری که این تفاوت در گروه های تیمار دوم (۳/۹۱±۰/۰۴۵) ($P = 0/003$)، تیمار سوم (۴±۰) ($P < 0/001$) و تیمار چهارم (۴±۰) ($P < 0/001$) از نظر آماری معنی دار بود؛ اما گروه تیمار اول (۳/۷۸±۰/۱۰۱) از نظر پاسخ های صحیح تفاوت آماری معنی داری با گروه تخریب نشان نداد. در طول آزمون یادآوری، سطح معنی داری در این متغیر برای گروه های تیمار اول (۳/۹۰±۰/۰۶۲)، تیمار دوم (۳/۹۰±۰/۰۶۲)، تیمار سوم (۳/۹۰±۰/۰۹۵) و تیمار چهارم (۳/۹۵±۰/۰۴۸) به ترتیب $P = 0/034$ ،

برای همه گروه ها بعد از دوره بهبودی (۷ روز)، آزمون رفتاری اکتساب و یادآوری، با دستگاه ماز شعاعی ۸ بازویی اجرا شد.

دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی از جنس پلاکسی گلاس برای بررسی حافظه مرجع و کارکردی 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 و عرض ۱۰ سانتی متر) بود. علائم نشانه در محیط اطراف ماز وجود داشت که در طول دوره آموزش، در مکان های ثابتی قرار گرفته بودند. ماز شعاعی ۸ بازویی، به رابطه ای که موش ها بین نشانه ها در محیط و جایگاه تقویت کننده برقرار می کنند، تکیه دارد و از این نظر بیانگر یادگیری فضایی است (۱۹ و ۲۰). قبل از شروع آموزش، با محدود کردن غذا، وزن موش ها به ۸۵ درصد وزن اولیه رسید و این وزن در طول آموزش با محدود کردن مقدار غذا حفظ شد. برای کمک به رشد موش ها، اجازه داده شد تا هر هفته ۵ گرم اضافه وزن داشته باشند. موش ها به خوردن تکه های کوچک طعمه (شکلات)، ابتدا در قفس انفرادی در طول مرحله کاهش وزن عادت داده شدند. سپس در طول آزمون ماز شعاعی هشت بازویی، تکه های کوچک طعمه به صورت روزانه و با وزن ۴۵ میلی گرم آماده شد (۲۱). آزمون ماز شعاعی هشت بازویی، در ۳ مرحله آشنایی، اکتساب و یادآوری و در مجموع شامل ۲۰ دور انجام شد. مرحله آشنایی و اکتساب دوبار 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 طعمه گذاری شدند. این مرحله ابتدا به شکل گروهی و سپس انفرادی انجام گردید. در آشنایی گروهی، روز اول اجازه داده شد ۳ موش هم زمان به مدت ۱۰ دقیقه ماز طعمه گذاری 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 طعمه گذاری شده را جستجو کند. در این روش، موش در می یابد که به دست آوردن غذا با طی کردن کامل بازو میسر است.

دومین مرحله، اکتساب (Acquisition) به دنبال دوره آشنایی است. در طول ۵ روز دوره آموزش، ۴ بازو از ۸ بازو طعمه گذاری شدند. الگوی طعمه گذاری به گونه ای انتخاب شد که سطح دشواری آن برای همه موش ها یکسان باشد. این الگو، در دوره های آموزش و یادآوری برای هر موش یکسان باقی ماند. اتمام هر دور، زمانی بود که موش وارد هر ۴ بازو شده باشد. در فاصله بین دوره ها، غذا جایگزین و ماز تمیز گردید.

مرحله سوم، آزمون یادآوری (Recall) بود که ۷ روز بعد از اکتساب انجام گردید. برای آزمون اکتساب و یادآوری الگوی داخل شدن برای پاسخ صحیح و انواع خطاها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. بعد از یادگیری، در طول آزمون یادآوری، موش ها باید بازوایی را که با استفاده از نشانه های فضایی در آن

جدول یک: میانگین و انحراف استاندارد از میانگین تعداد پاسخ صحیح، تعداد خطای حافظه مرجع، تعداد خطای حافظه کارکردی و میزان زمان سپری شده گروه‌های کنترل، شاهد تخریب، تخریب، سالین و تیمار شده با دونیزیل در آزمون رفتاری اکتساب و یادآوری با دستگاه ماز شعاعی ۸ بازویی

گروه‌ها	تعداد پاسخ صحیح		تعداد خطای حافظه مرجع		تعداد خطای حافظه کارکردی		زمان سپری شده (ثانیه)
	مرحله یادآوری	مرحله اکتساب	مرحله یادآوری	مرحله اکتساب	مرحله یادآوری	مرحله اکتساب	
کنترل	۴±۰	۴±۰	۲/۵۲±۰/۱۹۴	۰/۳۷±۰/۱۳۴	۰/۴±۰/۰۳۷	۰/۱۳±۰/۰۳۷	۵۹/۱±۶/۴۹
شاهد تخریب	۴±۰	۴±۰	۲/۵۵±۰/۱۶۷	۰/۷۱±۰/۱۶۹	۰/۷±۰/۰۸۱	۰/۷±۰/۰۸۱	۶۳/۶±۵/۲۲
تخریب	۳/۷۱±۰/۰۵۶	۳/۷۱±۰/۰۵۶	۰/۵۵±۰/۰۹۷††	۲/۷±۰/۱۷۳††	۲/۶±۰/۰۸۱††	۲/۷±۰/۱۷۳††	۲۲/۲±۱۲/۸۰††
سالین	۳/۸۲±۰/۰۵۲	۳/۸۲±۰/۰۵۲	۰/۱۱±۰/۱۸۹	۳/۱±۰/۱۶۰	۲/۶±۰/۱۲۱	۳/۱±۰/۱۶۰	۱۸۰/۹±۳/۴۴
تیمار اول	۳/۷۸±۰/۱۰۱	۳/۷۸±۰/۱۰۱	۰/۰۹±۰/۰۹۲	۲/۵±۰/۰۶۶	۲/۳±۰/۰۸۴	۲/۵±۰/۰۸۴	۱۳۹/۱±۱۱/۹۱†
تیمار دوم	۳/۹۱±۰/۰۴۵	۳/۹۱±۰/۰۴۵	۴/۸±۰/۰۹۳*	۲/۳±۰/۲۵۶#	۲/۱±۰/۰۴۸#	۲/۳±۰/۲۵۶#	۱۲۲/۳±۳/۸۷†
تیمار سوم	۴±۰*	۴±۰*	۴/۸۷±۰/۰۸۹#	۳/۱۳±۰/۱۷۶#	۱/۸±۰/۱۴۳*	۳/۱۳±۰/۱۷۶#	۹۷/۲±۱۳/۷۶†
تیمار چهارم	۴±۰*	۴±۰*	۳/۹۵±۰/۰۴۸*	۳/۰±۰/۲۰†	۱/۰±۰/۰۹۸†	۳/۰±۰/۲۰†	۹۷/۱±۵/۳۰†

مرحله اکتساب: در طول ۵ روز آموزش و مرحله یادآوری در روز چهاردهم بود.

گروه کنترل: تحت هیچ مداخله‌ای قرار نگرفت؛ گروه شاهد تخریب: الکتروود به صورت دوطرفه به هسته NBM موش‌ها وارد شد؛ اما تخریبی ایجاد نگردید؛ گروه تخریب: ایجاد مدل بیماری آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM؛ گروه‌های تیمار: ایجاد مدل بیماری آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM سپس دریافت داروی دونیزیل با مقادیر ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در گروه‌های تیمار اول، تیمار دوم، تیمار سوم و تیمار چهارم؛ گروه سالین: ایجاد مدل بیماری آلزایمر با تخریب دوطرفه هسته NBM سپس دریافت سالین؛ †† P<۰/۰۰۱، * P<۰/۰۱، # P<۰/۰۰۵ در مقایسه با گروه کنترل؛ † P<۰/۰۰۱، * P<۰/۰۱، # P<۰/۰۰۵ در مقایسه با گروه تخریب

را نشان دادند (P<۰/۰۰۱). این تغییرات بین گروه تخریب با گروه حلال (سالین) از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول یک).

بحث

در مطالعه حاضر حیوانات دچار تخریب الکتریکی دو طرفه NBM در طول آزمون اکتساب و یادآوری، اختلالات بیشتری همچون زمان طولانی برای انجام آزمون، حواس پرتی و خواب‌آلودگی را نسبت به گروه کنترل از خود نشان دادند. نتایج نشان داد که تخریب الکتریکی دوطرفه NBM قبل از آموزش، بر اکتساب و همچنین یادآوری روز چهاردهم ماز شعاعی هشت بازویی اثر گذاشته است.

در مطالعه زاهدی و همکاران تخریب دوطرفه هسته NBM با استفاده از روش الکتریکی (شدت جریان ۲ میلی آمپر، ۱۵ ثانیه) باعث کاهش حافظه فضایی در ماز آبی موریس و همچنین کاهش یادگیری اجتنابی فعال گردید (۲۲). همچنین در مطالعه ربیعی و همکاران تخریب دوطرفه هسته NBM با روش الکتریکی (شدت جریان ۲ میلی آمپر) باعث کاهش یادگیری اجتنابی غیرفعال در دستگاه شاتل باکس شد (۲۳). بنابراین گزارش‌های آرایه شده نشان‌دهنده کاهش یادگیری و حافظه متعاقب تخریب دوطرفه هسته NBM است که این مطالب در تایید نتایج حاصل از مطالعه حاضر است.

استفاده از نوروتوکسین‌های مختلف برای تخریب NBM نشان داد که کاربرد نوروتوکسین‌های مختلف، اثرات متفاوتی در ایجاد اختلال یادگیری دارند. مثلاً تخریب NBM با ایبوتونیک اسید در مقایسه با کوئزکوالیک اسید، نقص شدیدتری را در یادگیری فضایی ایجاد نموده است. البته ممکن است که نقص ادراکی به دنبال تخریب شیمیایی NBM، به علت تخریب انشعابات کولینرژیک از NBM به سیتوم و قشر نباشد؛ بلکه به علت وسعت تخریب سلول‌های غیر کولینرژیک درون NBM بوده و سایر

P=۰/۰۳۳، P=۰/۰۳۳، P=۰/۰۱۲ تعیین شد (جدول یک).

تفاوت آماری معنی‌داری از نظر تعداد پاسخ‌های صحیح بین گروه‌های تخریب و حلال (سالین) مشاهده نشد. خطای حافظه مرجع طی روند اکتساب در گروه‌های تخریب تحت تیمار با دونیزیل نسبت به گروه تخریب کاهش آماری معنی‌دار نشان داد. به طوری که سطح معنی‌داری برای گروه تیمار دوم (۴/۸۸±۰/۰۹۳)، گروه تیمار سوم (۴/۸۷±۰/۰۸۹) و گروه تیمار چهارم (۳/۰۷±۰/۲۰) به ترتیب P=۰/۰۰۲، P=۰/۰۱۱، P<۰/۰۰۱ و تعیین شد؛ اما در گروه تیمار اول (۵/۰۴±۰/۰۹۲) تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. همچنین طی روند یادآوری گروه تیمار اول (۴/۱۳±۰/۱۷۶) تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد؛ اما سطح معنی‌داری برای گروه‌های تیمار دوم (۳/۸±۰/۱۹۰) (P=۰/۰۰۲) و سوم (۳/۱۳±۰/۱۷۶) (P=۰/۰۴۵) و چهارم (۳/۰۴±۰/۳۸) (P=۰/۰۰۱) از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول یک).

از نظر خطای حافظه کارکردی، تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌ها در مرحله اکتساب و یادآوری مشاهده شد. در مرحله اکتساب گروه تیمار اول (۲/۵۱±۰/۰۶۶) تفاوت آماری معنی‌داری را با گروه تخریب نشان نداد؛ اما سطح معنی‌داری در گروه‌های تیمار دوم (۲/۳۷±۰/۲۵۶) (P=۰/۰۲۶) و سوم (۱/۸۰±۰/۱۴۳) (P<۰/۰۰۱) و چهارم (۰/۸۰۷±۰/۲۲۷) (P<۰/۰۰۱) از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین طی روند یادآوری گروه تیمار اول (۲/۳۴±۰/۰۸۴) تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد؛ اما سطح معنی‌داری برای گروه‌های تیمار دوم (۲/۲±۰/۰۴۸) (P=۰/۰۲۴) و سوم (۱/۷۲±۰/۰۹۶) (P<۰/۰۰۱) و چهارم (۱/۰۸±۰/۰۹۸) (P<۰/۰۰۱) از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول یک).

تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌ها از نظر زمان سپری شده برای یافتن طعمه‌ها وجود داشت. به طوری که در روند اکتساب و یادآوری همه چهار گروه تحت تیمار با دونیزیل سطح معنی‌داری

نمود؛ ولی دوز ۱mg/kg منجر به کاهش معنی دار خطای حافظه کارکردی گردید. همچنین برخلاف نتایج مطالعه حاضر در مطالعه Sharma و همکاران نقص حافظه القایی با استرپتوزوتوسین، تیمار موش‌های سوری با دوزپزیدیل دوز ۰/۱mg/kg به صورت داخل صفاقی برای ۱۵ روز منجر به بهبود نقیص شناختی در تست ماز آبی موریس گردید (۲۸). در مطالعه حاضر دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی مورد استفاده قرار گرفت. احتمالاً تفاوت‌ها به دلیل تفاوت در نوع ماز مورد استفاده برای بررسی حافظه بوده است و در موارد تشابه نوع ماز، تفاوت در مدل القایی برای بررسی حافظه فضایی می‌تواند مطرح باشد. به طوری که در مطالعه ما از تخریب الکتریکی NBM برای القای مدل استفاده شد و در برخی مطالعات با نتیجه متفاوت، از روش‌های دیگر از جمله تزریق اسکوپولامین و استرپتوزوتوسین برای القای نقص در حافظه استفاده شده است.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم بررسی میزان مهار آنزیم کولین استیل ترانسفراز و یا سنجش سطح استیل کولین مغز توسط غلظت‌های مختلف دوزپزیدیل اشاره نمود. هرچند نتایج این مطالعه بیانگر اثرات مفید دوزپزیدیل بر روی حافظه کارکردی و مرجع در موش‌های صحرایی آلزایمری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تخریب الکتریکی دوطرفه NBM می‌تواند به عنوان مدل مناسبی برای بیماری آلزایمر در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. تیمار موش‌های صحرایی آلزایمری با دوزپزیدیل به صورت وابسته به دوز باعث بهبود عوارض ناشی از تخریب NBM گردید. با توجه به این نکته که قشر مغز در موش‌های صحرایی عصب‌دهی کولینرژیک از هسته NBM دریافت می‌نماید؛ لذا تخریب الکتریکی NBM می‌تواند منجر به کاهش محتوی استیل کولین در قشر مغز شود. به نظر می‌رسد که دوزپزیدیل به صورت وابسته به دوز محتوی استیل کولین را در قشر مغز موش‌های صحرایی افزایش داده و نواقص یادگیری را در مدل‌های حیوانی هیپوکولینرژیک بهبود می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان نامه خانم آزاده اسکندری برای اخذ درجه دکتری در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز بود. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر همکاری و مساعدت در انجام این مطالعه نهایت سپاس خود را اعلام می‌داریم.

References

1. Khanahmadi M, Farhud D, Malmir M. Genetic of alzheimer's disease: a narrative review article. Iran J Public Health. 2015; 44(7): 892-901.
2. Kroker KS, Rast G, Giovannini R, Marti A, Dorner-Ciossek C, Rosenbrock H. Inhibition of acetylcholinesterase and phosphodiesterase-9A has differential effects on hippocampal early and late LTP. Neuropharmacology. 2012 Apr;62(5-

مسیرهای کولینرژیک قاعده مغز جلویی هم تحت تاثیر قرار گرفته باشند (۲۴). با توجه به مطالب مذکور و نظر به این که در تخریب الکتریکی، شدت جریان الکتریکی و مدت زمان آن تحت کنترل است و احتمال آسیب به ساختارهای مجاور هسته کمتر است؛ در مطالعه حاضر به منظور ایجاد مدل آلزایمر از روش تخریب الکتریکی دوطرفه هسته NBM استفاده شد.

در مطالعه حاضر تزریق مقادیر ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم از دوزپزیدیل به حیوانات آلزایمری به صورت وابسته به دوز موجب بهبودی در روند یادگیری و حافظه مرجع و کارکردی در ماز شعاعی هشت بازویی گردید. یک استراتژی برای بهبود علائم آلزایمر جبران غلظت استیل کولین طبیعی در شکاف سیناپسی به منظور بهبود انتقال نورونی در پایانه‌های کولینرژیک مغز است. از آنجایی که استیل کولین نقش مهمی در تنظیم رشد آکسونی و شکل‌پذیری سیناپس‌ها دارد؛ نقص کولینرژیک در اختلال آلزایمر می‌تواند شکل‌پذیری قشری را مختل نماید. به این ترتیب بر پایه فرضیه کولینرژیک، مهارکننده‌های استیل کولین استراز برای بهبود کاهش شناختی وابسته به آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۵).

در مطالعه Yamaguchi و همکاران نقص حافظه القاء شده با اسکوپولامین در تیمار موش‌های صحرایی با دوزپزیدیل (۱۰ mg/kg) قبل از تست باعث بهبود حافظه کارکردی و مرجع در تست ماز شعاعی گردید (۹). همچنین Xu و همکاران گزارش کردند دوزپزیدیل (۱mg/kg) باعث بهبود یادآوری در تست ماز آبی موریس در موش‌های صحرایی دچار ایسکمی مغزی می‌شود. همچنین دوز پایین ۰/۱ mg/kg بر حافظه مرجع و کارکردی معنی‌دار نبود (۲۶) که هم‌راستا با مطالعه حاضر است. علاوه بر این در مطالعه van der Staay و Spowart-Manning در نقص حافظه القایی توسط اسکوپولامین در موش‌های سوری نر C57، استفاده خوراکی دوزپزیدیل ۳۰ دقیقه قبل از تست در دوز ۱ mg/kg اثری بر روی نقیص القایی حافظه در ماز T شکل نشان نداد (۲۷). در حالی که در مطالعه ما دوز ۱mg/kg منجر به کاهش معنی‌دار خطای حافظه کارکردی و مرجع در مرحله اکتساب و یادآوری گردید. همچنین Lindner و همکاران گزارش کردند که تزریق اسکوپولامین به موش‌های صحرایی نر منجر به افزایش خطای حافظه کارکردی گردید و تزریق دوزپزیدیل در دوزهای ۱ mg/kg و ۰/۱ نتوانست اثرات اسکوپولامین را آنتاگونیزه نماید (۲۱). هرچند که در مطالعه ما دوز ۰/۱mg/kg اثر معنی‌داری بر خطای حافظه کارکردی ایجاد

6):1964-74. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.12.021

3. D'Amelio M, Rossini PM. Brain excitability and connectivity of neuronal assemblies in Alzheimer's disease: from animal models to human findings. Prog Neurobiol. 2012 Oct;99(1):42-60. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.07.001

4. Dumas JA, Newhouse PA. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional

- compensation. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011 Aug; 99(2):254-61. doi: 10.1016/j.pbb.2011.02.022
5. Easton A, Sankaranarayanan S, Tanghe A, Terwel D, Lin AX, Hoque N, et al. Effects of sub-chronic donepezil on brain Abeta and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl).* 2013 Nov;230(2):279-89. doi: 10.1007/s00213-013-3152-3
6. Raghanti MA, Simic G, Watson S, Stimpson CD, Hof PR, Sherwood CC. Comparative analysis of the nucleus basalis of Meynert among primates. *Neuroscience.* 2011 Jun; 184:1-15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.008
7. Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PG. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid β -42 with memantine. *Behav Brain Res.* 2011 Aug; 221(2):594-603. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.033
8. Paleja M, Girard TA, Herdman KA, Christensen BK. Two distinct neural networks functionally connected to the human hippocampus during pattern separation tasks. *Brain Cogn.* 2014 Nov; 92C:101-111. doi: 10.1016/j.bandc.2014.10.009
9. Yamaguchi Y, Higashi M, Matsuno T, Kawashima S. Ameliorative effects of azaindolizone derivative ZSET845 on scopolamine-induced deficits in passive avoidance and radial-arm maze learning in the rat. *Jpn J Pharmacol.* 2001 Nov; 87(3):240-4.
10. Gratwicke J, Kahan J, Zrinzo L, Hariz M, Limousin P, Foltynie T, et al. The nucleus basalis of Meynert: a new target for deep brain stimulation in dementia? *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Dec; 37(10 Pt 2): 2676-88. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.09.003
11. Saxena G, Patro IK, Nath C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. *Behav Brain Res.* 2011 Oct; 224(1):50-7. doi: 10.1016/j.bbr.2011.04.039
12. Shahraki A, Ghahghaei A, Zakeri Z. [Glutamate transporters and excitotoxicity in nervous system]. *J Gorgan Univ Med Sci.* 2011; 13(3): 1-15. [Article in Persian]
13. Akaike A, Takada-Takatori Y, Kume T, Izumi Y. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection. *J Mol Neurosci.* 2010 Jan; 40(1-2): 211-6. doi: 10.1007/s12031-009-9236-1
14. Creed MC, Milgram NW. Amyloid-modifying therapies for alzheimer's disease: Therapeutic progress and its implication. *Age (Dordr).* 2010 Sep; 32(3): 365-84. doi: 10.1007/s11357-010-9142-z
15. Kapai NA, Bukanova JV, Solntseva EI, Skrebtsky VG. Donepezil in a narrow concentration range arguments control and impaired by beta-amyloid peptide hippocampal LTP in NMDA-independent manner. *Cell Mol Neurobiol.* 2012; 32: 219-26.
16. Cutuli D, De Bartolo P, Caporali P, Tartaglione AM, Oddi D, D'Amato FR, et al. Neuroprotective effects of donepezil against cholinergic depletion. *Alzheimers Res Ther.* 2013 Oct; 5(5):50. doi: 10.1186/alzrt215
17. Freret T, Bouet V, Quiedeville A, Nee G, Dallemagne P, Rochais C, Boulouard M. Synergistic effect of acetylcholinesterase inhibition (donepezil) and 5-HT(4) receptor activation (RS67333) on object recognition in mice. *Behav Brain Res.* 2012 Apr; 230(1): 304-8. doi: 10.1016/j.bbr.2012.02.012
18. Shen H, Kihara T, Hongo H, Wu X, Kem WR, Shimohama S, et al. Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors and internalization of NMDA receptor. *British J Pharmacol.* 2010; 161(1): 127-39. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00894.x
19. Liu P, Bilkey DK. The effects of NMDA lesions centered on the postrhinal cortex on spatial memory tasks in the rat. *Behav Neurosci.* 2002 Oct; 116(5):860-73.
20. Davis CP, Franklin LM, Johnson GS, Schrott LM. Prenatal oxycodone exposure impairs spatial learning and/or memory in rats. *Behav Brain Res.* 2010 Sep; 212(1):27-34. doi: 10.1016/j.bbr.2010.03.022
21. Lindner MD, Hogan JB, Hodges DB Jr, Orié AF, Chen P, Corsa JA, et al. Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small effects on working memory and spatial mapping. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Nov;188(4):629-40. doi: 10.1007/s00213-006-0556-3
22. 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's Disease. *Iran J Pharm Res.* 2015 Fall; 14(4):1197-206.
23. 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 Feb; 39(2):353-60. doi: 10.1007/s11064-013-1232-8
24. Mesulam MM. Some cholinergic themes related to Alzheimer's disease: synaptology of the nucleus basalis, location of m2 receptors, interactions with amyloid metabolism, and perturbations of cortical plasticity. *J Physiol Paris.* 1998 Jun-Aug;92(3-4):293-8.
25. Takada-Takatori Y, Kume T, Izumi Y, Ohgi Y, Niidome T, Fujii T, et al. Roles of nicotinic receptors in acetylcholinesterase inhibitor-induced neuroprotection and nicotinic receptor up-regulation. *Biol Pharm Bull.* 2009 Mar;32(3):318-24.
26. Xu AJ, Chen Z, Yanai K, Huang YW, Wei EQ. Effect of 3-[1-(phenylmethyl)-4-piperidiny]-1- (2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin-8-yl)- 1- propanone fumarate, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on spatial cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Neurosci Lett.* 2002 Oct; 331(1):33-6.
27. Spowart-Manning L, van der Staay FJ. The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. *Behav Brain Res.* 2004 May; 151(1-2):37-46.
28. Sharma B, Singh N, Singh M. Modulation of celecoxib- and streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. *J Psychopharmacol.* 2008 Mar; 22(2):162-71. doi: 10.1177/0269881107081553

Original Paper

Effect of donepezil hydrochloride on reference and working memory impairment after bilateral electrical lesion of nucleus basalis magnocellularis in rats model of Alzheimer disease

Azade Eskandary (M.Sc)¹, Ahmad Ali Moazedi (Ph.D)^{*2}
Hossein Najaphzadevarzi (Ph.D)^{3,4}, Mohamad Reza Akhond (Ph.D)⁵

¹Ph.D Candidate in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. ²Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. ³Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. ⁴Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. ⁵Assistant Professor, Department of Statistics, Faculty of Mathematical Sciences and Computer, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background and Objective: Dysfunction and loss of basal forebrain cholinergic neurons and their cortical projections are the earliest pathological events in the pathogenesis of Alzheimer disease (AD). This study was done to evaluate the effect of donepezil hydrochloride on reference and working memory caused by mutual electrical lesion of the nucleus basalis magnocellularis (NBM) in animal model of AD.

Methods: In this experimental study, 56 adult male Wistar rats were allocated into 8 groups (n=7) including: control (intact), NBM lesion group, which received electrically-induced lesion (0.5 mA, 3s) in NBM, Sham group (the electrode was impaled into the NBM with no lesion), donepezil groups (lesion + 0.1, 1, 5, 10 mg/kg/bw of donepezil hydrochloride) and vehicle group (NBM lesion + saline). Acquisition and retention testing were done by using an eight-radial arm maze, in which, the patterns of arm entries in each group were recorded for calculating correct choice, working memory errors, reference memory error and latency.

Results: The spatial learning of animals in the lesion of NBM group significantly reduced compared to controls (P<0.05). Moreover, no effect on spatial learning was seen in the sham group compared with the lesion group. The post-lesion treatment with donepezil hydrochloride in a dose-dependent manner improved the parameters of spatial memory errors in the acquisition and retention tasks in comparison with the lesion group (P<0.05).

Conclusion: Treatment with donepezil hydrochloride, dose-dependently improves cognitive impairment induced by the destruction of the nucleus basalis magnocellularis.

Keywords: Alzheimer disease, Nucleus Basalis Magnocellularis, Memory, Donepezil hydrochloride, Rat

* Corresponding Author: Moazedi AA (Ph.D), E-mail: moazedi.a@gmail.com

Received 11 Mar 2017

Revised 28 Aug 2017

Accepted 16 Sep 2017