مجلـــه‌ی علمـی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۵, شماره‌ی ۱۱۳, بهمن و اسفند ۱۳۹۶, صفـحات ۴۱ تا ۵۵

نقش گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین، پروتئین کیناز B و پروتئین کیناز Mζ بر اثر حفاظتی اسید رزمارینیک در مدل بیماری آلزایمر القا شده به وسیله‌ی بتا آمیلوئید (۳۵-۲۵) در موش صحرایی

دکتر توراندخت بلوچ نژاد مجرد[۱]، دکتر مهرداد روغنی[۲]، پرستو کاظملو[۳]

نویسنده‌ی مسؤل: گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران tmojarad@yahoo.com

دریافت: ۹۵/۷/۱۰ پذیرش: ۹۵/۱۲/۸

چکیده

زمینه و هدف: *بیماری آلزایمر یکی از شایع‌ترین انواع بیماری‌های نورودژنراتیو است که در نتیجه تجمع خارج سلولی پپتید بتا آمیلوئید و اختلال در عملکرد نورون‌ها بوجود می‌آید. در این مطالعه، نقش گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین، پروتئین کیناز B (PKB) و پروتئین کیناز Mζ (PKMζ) در اثرات حفاظتی اسید رزمارینیک در موش‌های صحرایی آلزایمری مورد ارزیابی قرار گرفت.*

روش بررسی: *حیوانات به ۶ گروه: ۱) شم- ۲) بتا آمیلوئیدی- ۳) بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)- ۴) بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک و مهار کننده PKMζ - ۵) PKB و ۶) گیرنده نیکوتینی استیل کولین تقسیم شدند. دو هفته پس از جراحی، مطالعات رفتاری (درصد تناوب در ماز Y و زمان تاخیر حین عبور در رفتار اجتنابی غیر فعال) و بافتی (اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) و دانسیته نورونی هیپوکامپ) انجام شد.*

یافته‌ها: *پیش درمان حیوانات بتا آمیلوئیدی با اسید رزمارینیک، موجب بهبود قابل ملاحظه‌ای در اختلالات رفتاری و بافتی مرتبط با هیپوکامپ شد. مهار گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین و PKB در این گروه، زمان تاخیر حین عبور (P<۰/۰۰۱) را کاهش و میزان MDA هیپوکامپ (P<۰/۰۰۱) را افزایش داد. به علاوه، مهار کننده PKB، دانسیته‌ی نورونی هیپوکامپ را در حیوانات بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک کاهش داد (P<۰/۰۵).*

نتیجه گیری: *بر اساس یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد که در مدل تجربی بیماری آلزایمر، اثرات حفاظتی اسید رزمارینیک منتج از خاصیت آنتی اکسیدانی آن و تا حدودی از طریق گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین، PKB و PKMζ اعمال می‌شود.*

واژگان کلیدی: ***اسید رزمارینیک؛ استرس اکسیداتیو؛ گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین، پروتئین کیناز B، پروتئین کیناز Mζ***

مقدمه

بیماری آلزایمر یکی از شایع ترین نوع دمانس در میان افراد سالخورده است که با بالا رفتن میانگین عمر در انسان، درصد ابتلا به آن افزایش یافته است (۱). دو مشخصه نوروپاتولوژیکی این بیماری شامل تجمع خارج سلولی

۱- دکترای تخصصی فیزیولوژی انسانی، استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

۲- دکترای تخصصی فیزیولوژی انسانی، استاد مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران

۳- کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

پلاک‌های پیری (Senile Plaques) حاوی پپتید بتا آمیلوئید (Aβ)، و کلافه‌های نوروفیبریلاری (Neurofibrillary Tangle) متشکل از پروتئین tau هیپرفسفریله شده است. الیگومرهای Aβ که از تجزیه پروتئولیتیکی پروتئین پیش ساز آمیلوئید (Amyloid Precursor Protein) حاصل می‌شود، اصلی‌ترین ماده تشکیل دهنده‌ی پلاک‌های آمیلوئیدی موجود در مغز بیماران آلزایمری است (۲). مطالعات نشان داده است که افزایش سن، زمینه ژنتیکی، ترومای سر، رسوب فلزاتی از قبیل آلومینیوم و آهن در مناطق مختلف مغز، تغییر ریتم ترشح مواد میانجی، به‌خصوص کاهش تعداد و عملکرد نورون‌های کولینرژیکی، مصرف دخانیات، ترشح بیش از حد آمینو اسیدهای تحریکی و بالاخره فعال شدن فرایندهای التهابی و استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد بیماری آلزایمر دارند. الیگومرهای Aβ از طریق هیپرفسفریلاسیون پروتئین tau، ایجاد التهاب و استرس اکسیداتیو، تعامل با رسپتورهای نیکوتینی استیل کولین، مهار پلاستیسیتی سیناپسی، و در نهایت مرگ سلولی، منجر به پیشرفت بیماری می‌شوند (۳). در طی روند التهابی، کاهش نورون‌ها و افزایش تعداد آستروسیت‌ها به‌ویژه در حوالی پلاک‌های آمیلوئیدی و ظهور میکروگلی‌های فعال شده دیده می‌شوند (٤). در این خصوص، هیپوکامپ یکی از اولین نواحی است که در بیماری آلزایمر کاهش نورونی در آن رخ می‌دهد. چنانکه تزریق پروتئین بتا آمیلوئید به داخل هیپوکامپ با القای نورودژنراسیون نورون‌ها، موجب اختلال در یادگیری و حافظه می‌شود. از طرف دیگر، مطالعات نشان داده است که ارتباط نزدیکی میان بیماری آلزایمر و اختلال در سیستم سیگنالینگ کولینرژیکی وجود دارد. چنان که در مناطقی از مغز که تحت تاثیر بیماری آلزایمر قرار دارند، کاهش اولیه و قابل ملاحظه‌ای در تعداد رسپتورهای نیکوتینی استیل کولین به وجود می‌آید. به‌عنوان مثال میزان زیر واحد آلفا ٤ گیرنده‌های نیکوتینی در بیماران آلزایمری ۸۰ درصد کمتر از افراد سالم است (۵). در حال حاضر، علیرغم تاثیر متوسط مهار کننده‌های آنزیم استیل کولین استراز در درمان بیماری آلزایمر، در حال حاضر این مهار کننده‌ها به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طرف دیگر، مطالعات in vivo نشان داده است که مسیر سیگنالینگ کولینرژیکی موجب افزایش انتقال سیناپسی با استفاده از پروتئین کیناز Mζ (PKMζ) که یکی از ایزوفرم‌های پروتئین کیناز C است می‌شود (٦). حفظ حافظه دراز مدت مستلزم نقش مداوم PKMζ است (۷) و مهار PKMζ موجب اختلال در حافظه حسی- حرکتی می‌گردد (۸). PKMζ با تقویت سیناپسی دراز مدت (Long Term Potentiation; LTP) موجب تثبیت حافظه می‌شود (۹). علاوه بر PKMζ، مسیر سیگنالینگ PI3K نقش مهمی در بسیاری از اعمال سلولی از قبیل بیان ژن، سیکل سلولی و تمایز دارد (۱۰). یکی از پروتئین کینازهایی که هدف اثر PI3K است، پروتئین کیناز B (PKB) یا Akt است که یک Serine/ Theronine protein kinase است (۱۱). یکی از اعمال مهم مسیر سیگنالینگ PI3K/ PKB در مغز القای LTP در ناحیه CA1 هیپوکامپ است که منجر به تغییرات سیناپسی موثر در فرایند حافظه و یادگیری می‌گردد. این مسیر سیگنالینگ همچنین در القای LTP در سیناپس‌های مسیر پرفورانت- سلول‌های گرانولی مورد نیاز می‌باشد (۱۲). با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در پاتولوژی بیماری آلزایمر، به نظر می‌رسد تقویت ذخایر آنتی اکسیدانی آندوژن به‌وسیله‌ی آنتی اکسیدان‌های مشتق از گیاهان بتواند از اثرات مخرب اولیگومرهای بتا آمیلوئید بکاهد. لذا، امروزه محققین توجه خاصی به استفاده از آنتی اکسیدان‌ها به‌عنوان یکی از عوامل نوروپروتکتیو در سیستم‌های درون تنی و برون تنی دارند. برای اولین بار اسید رزمارینیک به‌طور خالص از گونه گیاهی *Rosmarinus Officinalis* استخراج شد. ترکیب فنولیک اسید رزمارینیک و مشتقات آن از طریق

استریفیکاسیون اسید کافئیک ساخته می‌شود. اسید رزمارینیک اعمال بیولوژیکی متنوعی از خود نشان می‌دهد که از آن جمله می توان به آثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد توموری، ضد ویروسی و ضد میکروبی اشاره کرد (۱۳). بر اساس مطالعه قبلی مشخص شد که پیش درمان با اسید رزمارینیک می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو مانع تحلیل حافظه و یادگیری در مدل تجربی بیماری آلزایمر شود. علیرغم روشن شدن نقش حفاظتی اسید رزمارینیک در مدل حیوانی بیماری آلزایمر، مکانیسم یا مکانیسم‌های درگیر در این اثرات نوروپروتکتیو به خوبی مشخص نشده است. لذا، در مطالعه حاضر، علاوه بر بررسی اثر اسید رزمارینیک بر اختلالات بافتی در موش‌های آلزایمری، نقش مسیرهای سیگنالینگ گیرنده‌های کولینرژیکی و پروتئین کیناز Mζ و پروتئین کیناز B در اثرات رفتاری و بافتی منتج از پیش درمان با اسید رزمارینیک در مدل تجربی بیماری آلزایمر القا شده بوسیله بتا آمیلوئید (۳۵-۲۵) مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه که از نوع تجربی بود بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم انجام شد. در حیوان خانه، آب آشامیدنی و غذای مخصوص موش بدون هیچگونه محدودیتی در دسترس حیوانات بوده و آنها تحت شرایط طبیعی از نظر درجه حرارت و نور در گروه‌های ۳ تا ٤ تایی در هر قفس نگه‌داری می‌شدند. لازم به ذکر است که این تحقیق بر اساس پروتکل NIH و اصول اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق IR.IUMS.1391.18.218 به‌انجام رسیده است. موش‌های صحرایی (n=٤٠) به‌طور تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند: ۱- شم (Sham)، ۲- بتا آمیلوئیدی (Aβ)، ۳- بتا آمیلوئیدی دریافت کننده اسید رزمارینیک ($A\beta+RA_{25}$)، ٤- بتا آمیلوئیدی دریافت کننده اسید رزمارینیک و مهار کننده پروتئین کیناز Mζ ($A\beta+RA_{25}+ZIP$)-۵ بتا آمیلوئیدی دریافت کننده اسید رزمارینیک و مهار کننده گیرنده نیکوتینی استیل کولین ($A\beta+RA_{25}+M$) ۶- بتا آمیلوئیدی دریافت کننده اسید رزمارینیک و مهار کننده پروتئین کیناز B ($A\beta+RA_{25}+T$)، برای جراحی استریوتاکسیک، موش‌ها با استفاده از ترکیب کتامین (۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکس قرار داده شدند. مدل بیماری آلزایمر، با تزریق استریوتاکسیک ماده Aβ (35–25) با دوز ۱۰ میکروگرم بر ۲ میکرولیتر به صورت دو طرفه به درون ناحیه هیپوکامپ پشتی با مختصات Anteroposterior: -3.5، Lateral: ±2 و Deep: 2.8 ایجاد گردید.

اسید رزمارینیک یک ساعت قبل از جراحی استریوتاکسیک، به‌میزان ۲۵ میلیگرم بر کیلوگرم وزن بدن، به گروه آلزایمری به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. مهار کننده‌ی پروتئین کیناز Mζ (ZIP)، به‌میزان ۱ میلی‌مول، مهار کننده مسیرهای نیکوتینی (Mecamylamine) به‌میزان ۳۰ میکروگرم و مهار کننده پروتئین کیناز B (Triciribine hydrate;T) به میزان ۱۰ میکروگرم یک ساعت پس از تزریق داخل صفاقی اسید رزمارینیک ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل بطنی تجویز شد.

بررسی حافظه فضایی با استفاده از آزمون Y- maze :

دو هفته پس از جراحی، حافظه فضایی کوتاه مدت حیوانات با استفاده از تست رفتاری Y-maze و محاسبه درصد تناوب، ۲ تا ۳ روز قبل از بررسی رفتار اجتنابی غیر فعال مورد سنجش قرار گرفت. Y-maze از پلکسی گلاس سیاه رنگ با سه بازوی عمود بر هم با ابعاد ٤٠، ۳۰ و ۱۵ سانتی‌متر ساخته شده بود. سه بازو به وسیله‌ی یک صفحه‌ی سه گوش با اضلاع ۱۵ سانتی‌متری به هم متصل شده بودند. سنجش روند حافظه از نوع باز شناختی (Recognitive) در

اتاق تاریک و بدون سر و صدا و رفت و آمد انجام شد. روش انجام تست به این صورت بود که در یک جلسه ۸ دقیقه‌ای، با قرار دادن هر موش در انتهای یک بازو به آن اجازه داده می‌شد که آزادانه در ماز حرکت کند. در این مدت تعداد دفعات ورود حیوان به داخل هر بازو، ثبت می‌شد. رفتار تناوب به معنی ورودهای سریالی به داخل تمام بازوها در مجموعه‌های سه تایی در نظر گرفته شد و درصد تناوب از نسبت تناوب مشاهده شده به حداکثر تناوب (تعداد کل بازوهای وارد شده منهای ۲ ×۱۰۰) محاسبه گردید (۱٤).

آزمون رفتار اجتنابی غیرفعال (Passive avoidance test) برای بررسی رفتار اجتنابی غیرفعال از دستگاه shuttle box با ابعاد ۲۰*۸۰*۲۰ سانتی متر با یک محفظه روشن و یک محفظه تاریک استفاده شد. در کف محفظه تاریک میله‌های فلزی برای شوک دادن به پای حیوان از طریق یک دستگاه استیمولاتور (بهبود پرداز تهران) تعبیه گردید. برای اعمال شوک، از تک تحریکی به‌شدت یک میلی آمپر به مدت یک ثانیه استفاده شد. رفتار اجتنابی غیرفعال در سه مرحله‌ی سازش (Adaptation)، اکتساب (Acquisition) و نگهداری و به یادآوری (Retention and Recall) انجام شد. در این آزمون دو متغیر تاخیر اولیه (Initial latency; IL) و تاخیر در حین عبور یا (Step-through latency; STL) مورد بررسی قرار گرفت (۱٤).

مطالعه هیستوشیمیایی: برای مطالعات بافتی، حیوانات با کتامین (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. جهت فیکس کردن مغز حیوانات، از روش پرفیوژن ترنس کاردیال (Transcardial Perfusion) با پارافرمالدئید ٤ درصد در (PBS۰/۱ مولار و pH= ۷/۴) استفاده شد. پس از اتمام پرفیوژن مغز، نیمکره چپ پارافینه شده، برش‌های کرونال ۲۰ میکرومتری از هیپوکامپ جهت رنگ آمیزی با کرزیل ویوله تهیه شد و تعداد نورون‌های هیپوکامپ در ناحیه CA1 شمارش شد.

تعیین غلظت مالون دی آلدئید در هیپوکامپ: پس از بیهوش کردن حیوانات با کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و جدا کردن هیپوکامپ مغز، آن را خشک نموده و وزن می‌کردیم. پس از توزین، هموژنیزه ۵ درصدی بافت در محلول سالین سرد ۰/۹ تهیه شده و سانتریفوژ می‌شد (۱۰۰۰ دور، ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه). سپس محلول رویی شفاف از بقیه محلول جدا شده و برای سنجش میزان مالون دی آلدئید استفاده شد. غلظت مالون دی آلدئید که شاخص پراکسیداسیون لیپیدی محسوب می‌شد از طریق اندازه‌گیری مواد راکتیو اسید تیوباربیتوریک در محلول رویی شفاف بدست می‌آمد. در پایان، جذب نوری نمونه‌ها با منحنی استاندارد بدست آمده از رقت‌های تترا اتوکسی پروپان تطبیق داده می‌شد (۱٤).

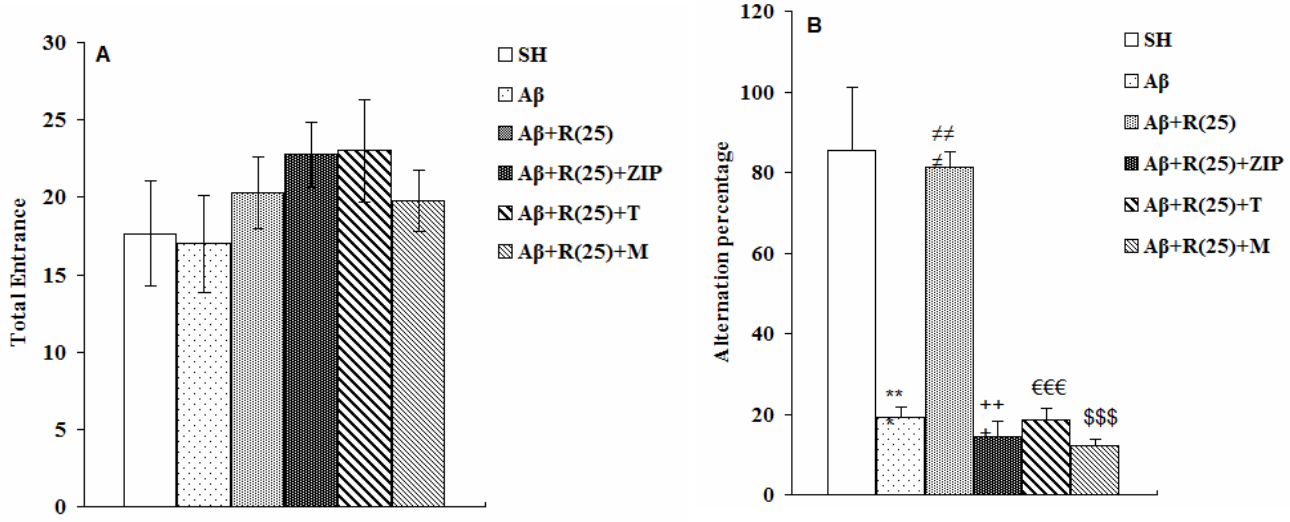
نتایج به‌دست آمده به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. برای مقایسه بررسی‌های استرس اکسیداتیو و بافتی از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و توکی و برای آنالیز داده‌های رفتاری مربوط به حافظه فضایی کوتاه مدت و رفتار اجتنابی غیر فعال از آزمون غیرپارامتریک کروسکال والیس استفاده گردید. در تمام آزمون‌ها مقادیر کمتر از P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

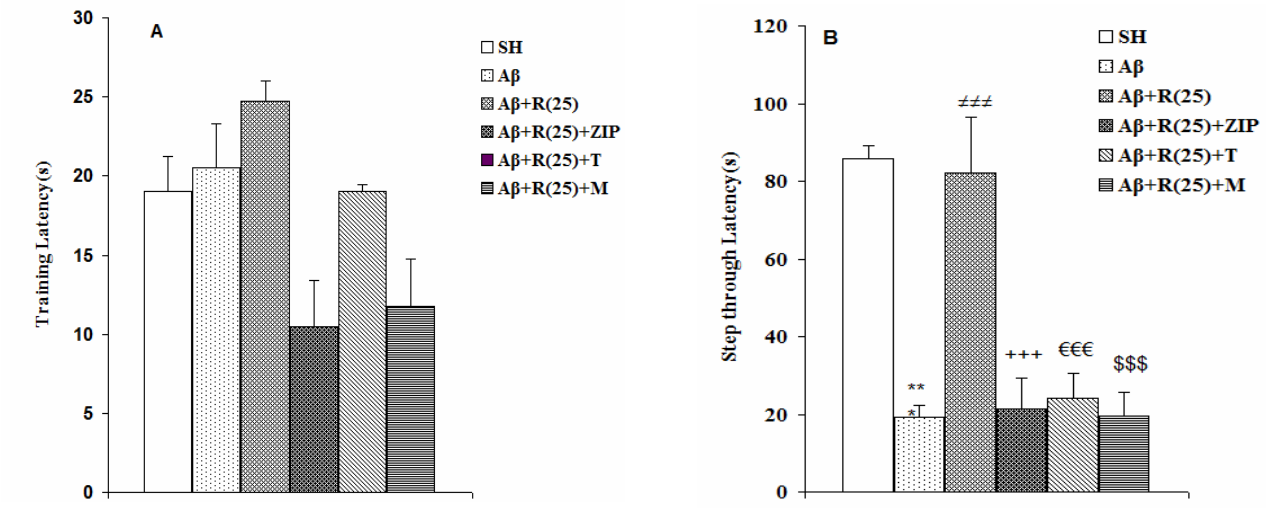
بررسی رفتاری: همان گونه که شکل ۱ نشان می‌دهد در آزمون ماز Y، تفاوت معنی‌داری در تعداد کل بازوهای وارد شده (Total Entrance) توسط هر موش بین گروه‌ها وجود ندارد (شکل A۱). ولی درصد تناوب (Alternation percent) در گروه حیوانات آلزایمری به‌طور قابل توجهی در مقایسه با گروه شم کاهش یافته است (شکل B۱) (P<۰/۰۰۱). پیش درمان موش‌های آلزایمری با اسید رزمارینیک موجب افزایش معنی‌دار درصد تناوب در آنها گردید (P<۰/۰۰۱). تجویز داخل بطنی مهار کننده‌های

گیرنده‌های نیکوتینی، PKB و PKMζ موجب کاهش معنی‌دار درصد تناوب در موش‌های آلزایمری پیش درمان شده با اسید رزمارینیک شد (P<۰/۰۰۱).

نتایج به دست آمده از بررسی رفتار اجتنابی غیر فعال با استفاده از Shuttle Box نشان داد که در تاخیر اولیه میان گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (شکل A۲). از طرف دیگر، تاخیر در حین عبور در گروه حیوانات آلزایمری به‌طور قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه شم کاهش یافت (P<۰/۰۰۱). پیش درمان موش‌های آلزایمری با اسید رزمارینیک موجب افزایش معنی‌دار تاخیر در حین عبور (P<۰/۰۰۱) شد. مهار کننده‌های گیرنده‌های نیکوتینی، PKB و PKMζ در موش‌های آلزایمری پیش درمان شده با اسید رزمارینیک موجب کاهش معنی‌دار تاخیر در حین عبور شد (P<۰/۰۰۱) (شکل B۲).

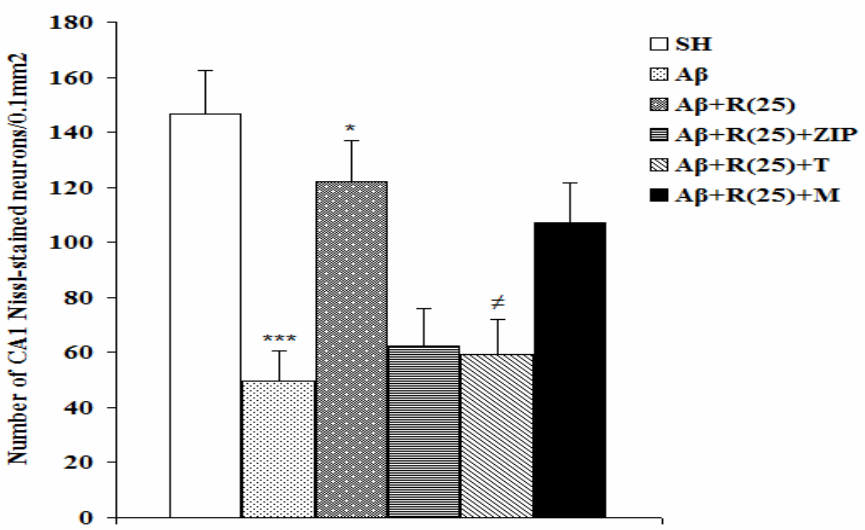


شکل ۱: بررسی و مقایسه تعداد کل ورودها (A) و درصد رفتار تناوبی (B) در ماز Y میان گروه های شم و بتا آمیلوئیدی قبل و بعد از پیش درمان با اسید رزمارینیک به تنهایی و یا به همراه مهار کننده گیرنده نیکوتینی استیل کولین (Mecamylamine;M) ، مهار کننده‌ی پروتئین کیناز B (Triciribine hydrate;T) و مهار کننده پروتئین کیناز (M ζ ZIP). مقادیر به صورت Means ± SEM آورده شده است. $P<۰/۰۰۱^{***}$ (نسبت به گروه شم)، $P < ۰/۰۰۱^{\#\#\#}$ (نسبت به گروه بتا آمیلوئید) $P < ۰/۰۰۱^{+++}$ (نسبت به گروه بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک)، $P < ۰/۰۰۱^{€€€}$ (نسبت به گروه بتا آمیلوئید)، $P < ۰/۰۰۱^{\$\$\$}$ (نسبت به گروه بتا آمیلوئید)

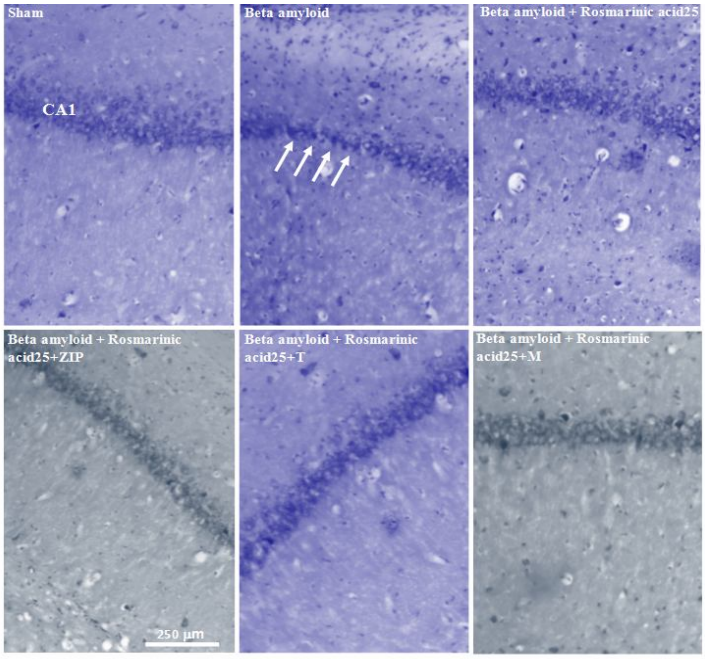


شکل ۲: بررسی و مقایسه تاخیر اولیه (Initial Latency) (A) و تاخیر حین عبور (Step Through Latency)(B) در آزمون رفتار اجتنابی غیر فعال میان گروه‌های شم و بتا آمیلوئیدی قبل و بعد از پیش درمان با اسید رزمارینیک به تنهایی و یا به همراه مهار کننده گیرنده نیکوتینی استیل کولین (Mecamylamine;M) ، مهار کننده پروتئین کیناز B (Triciribine hydrate;T) و مهار کننده پروتئین کیناز (Mζ ZIP). مقادیر به صورت Means ± SEM آورده شده است. $P < ۰/۰۱$ *** (نسبت به گروه شم)، $P < ۰/۰۱$ ### (نسبت به گروه بتا آمیلوئید) $P < ۰/۰۱$ +++ (نسبت به گروه بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک)، $P < ۰/۰۱$ €€€ (نسبت به گروه بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک)، $P < ۰/۰۱$ $$$ (نسبت به گروه بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک).

بررسی بافتی: نتایج بررسی هیستوشیمیایی ناحیه CA1 هیپوکامپ گروه شم با استفاده از رنگ آمیزی با کرزیل ویوله نشان دهنده‌ی نورون‌های هرمی با هسته‌های گرد، هسته‌های برجسته و سیتوپلاسم واضح بود. در گروه حیوانات آلزایمری، اندازه‌ی نورون‌ها کوچکتر، هسته‌ها چروکیده، هسته‌ها غیرواضح و محدوده‌ی سیتوپلاسمی سلول نیز در بیشتر موارد به‌خوبی مشخص نبود و در مجموع تراکم نورون‌های نیسل مثبت به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P<۰/۰۰۱$). پیش درمان موش‌های آلزایمری با اسید رزمارینیک به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش معنی‌دار در تراکم نورون‌های نیسل مثبت شد ($P<۰/۰۵$). مهار کننده PKB در موش‌های آلزایمری پیش درمان شده با اسید رزمارینیک، تراکم نورون‌های نیسل مثبت را کاهش داد ولی مهار کننده PKMζ و مهار کننده گیرنده نیکوتینی استیل کولین تاثیر معنی‌داری بر تراکم نورون‌های نیسل مثبت نداشت (شکل ۴و ۳).

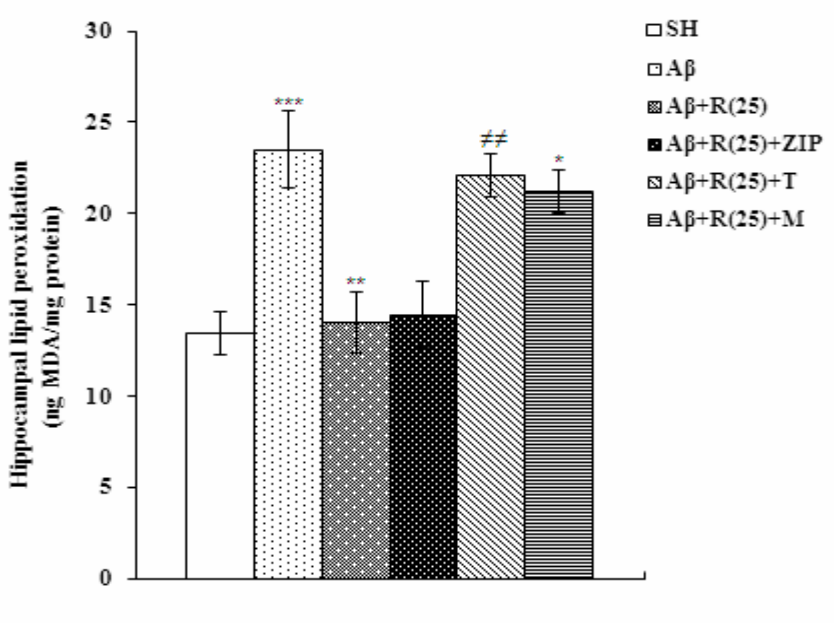


*شکل ۳: بررسی و مقایسه تعداد نورون‌های نیسل در واحد سطح در ناحیه CA1 هیپوکامپ میان گروه‌های شم و بتا آمیلوئیدی قبل و بعد از پیش درمان با اسید رزمارینیک به تنهایی و یا بهمراه مهار کننده گیرنده نیکوتینی استیل کولین (Mecamylamine;M)، مهار کننده پروتئین کیناز (Triciribine hydrate;T) B و مهار کننده پروتئین کیناز (Mζ ZIP). مقادیر به‌صورت Means ± SEM آورده شده است. $P < ۰/۰۰۱$ *** (نسبت به گروه شم)، $P < ۰/۰۵$ * (نسبت به گروه بتا آمیلوئید) $P < ۰/۰۵$ ≠ (نسبت به گروه بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک).*



شکل ٤: فتومیکروگراف برش‌های کرونال از هیپوکامپ که نورون‌های نیسل را در گروه‌های شم و بتا آمیلوئیدی قبل و بعد از پیش درمان با اسید رزمارینیک به تنهایی و یا بهمراه مهار کننده گیرنده نیکوتینی استیل کولین (Mecamylamine;M)، مهار کننده پروتئین کیناز B (Triciribine hydrate;T) و مهار کننده‌ی پروتئین کیناز (Mζ ZIP) نشان می‌دهد. در گروه بتا آمیلوئید کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد نورون‌های ناحیه CA1 مشاهده می‌شود که پیش درمان این گروه با اسید رزمارینیک تا حد چشمگیری مانع کاهش نورون‌ها شده است. (مقیاس برابر با ۲۵۰ میکرومتر است).

بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید در هیپوکامپ نشان داد که تزریق بتا آمیلوئید در حیوانات آلزایمری موجب افزایش قابل توجهی در میزان مالون دی آلدئید می‌شود (P<۰/۰۰۱). پیش درمان موش‌های آلزایمری با اسید رزمارینیک، موجب کاهش معنی‌دار میزان مالون دی آلدئید شد (P<۰/۰۱). مهار کننده‌های گیرنده‌های نیکوتینی و PKB در موش‌های آلزایمری پیش درمان شده با اسید رزمارینیک، میزان مالون دی آلدئید را افزایش داد (P<۰/۰۱ - P<۰/۰۵). ولی مهار کننده PKMζ تغییر معنی‌داری بر میزان مالون دی آلدئید به وجود نیاورد (شکل ۵).



شکل ۵: بررسی و مقایسه میزان مالون دی آلدئید در گروه‌های شم و بتا آمیلوئیدی قبل و بعد از پیش درمان با اسید رزمارینیک به تنهایی و یا به‌همراه مهار کننده گیرنده نیکوتینی استیل کولین (Mecamylamine;M)، مهار کننده‌ی پروتئین کیناز B (Triciribine hydrate;T) و مهار کننده‌ی پروتئین کیناز Mζ (ZIP) *** P < ۰/۰۱ (نسبت به گروه شم)، ** P < ۰/۰۱ (نسبت به گروه بتا آمیلوئید) ## P < ۰/۰۱ (نسبت به گروه بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک)، * P < ۰/۰۵ (نسبت به گروه بتا آمیلوئیدی پیش درمان شده با اسید رزمارینیک).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق هیپوکامپی Aβ(25-35)، موجب بروز اختلالات شناختی مرتبط با یادگیری و حافظه، کاهش تعداد نورون های ناحیه CA1 و افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید در هیپوکامپ می‌شود. سایر مطالعات in vivo و in vitro نیز نشان داده است که نوروتوکسیسیتی Aβ(25-35) که یک قطعه کوتاه سنتتیک از طول کامل پروتئین بتا آمیلوئید Aβ(1-42) است مشابه با مولکول کامل بتا آمیلوئید است چنان که تزریق Aβ(25-35) به مغز موش صحرایی منجر به اختلال درحافظه‌ی فضایی شده است (۱۵). برخی از مطالعات نشان داده اند که Aβ موجود در آکسون می‌تواند عملکرد آن را مختل کرده و به نحو بالقوه به نورودژنراسیون کمک نماید. بر اساس مطالعات انجام شده، Aβ می‌تواند با اثر مستقیم بر انتقالات سیناپسی

موجب افت فرایندهای شناختی در بیماری آلزایمر شود (۱۶). پپتید بتا آمیلوئید با فعال کردن NADPH اکسیداز در میکروگلیاها، منجر به تولید رادیکال‌های سوپر اکسید (O^{2-}) و پراکسیداسیون هیدروژن و افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۷). چنان که پراکسیداسیون لیپیدها و نیتراسیون اسیدآمینه در پروتئین‌ها می‌تواند عملکرد سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (۱۸). واکنش سریع بین سوپر اکسید و NO منجر به تولید $ONOO^-$ می‌شود که عامل اصلی آسیب اکسیداتیو ناشی از بتا آمیلوئید در مغز بیماران آلزایمری است (۱۹). از آنجایی که افزایش سن همراه با افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش سیستم آنتی اکسیدانی در بدن است و بیماری آلزایمر یک بیماری نورودژنراتیو مرتبط با افزایش سن است، لذا به نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو نه تنها یک پدیده‌ی زود هنگام در این بیماری است بلکه از طریق مسیرهای متعدد سیگنالینگ موجب شروع بیماری می‌شود و پاسخگوی اختلالات شناختی و پیشرفت آن باشد (۱۸). در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که پیش درمان حیوانات آلزایمری با اسید رزمارینیک موجب کاهش اختلالات رفتاری و بافتی مرتبط با این بیماری می‌شود. چنان که اسید رزمارینیک موجب افزایش درصد تناوب و مدت زمان تاخیر در حین عبور و کاهش مرگ نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ و پراکسیداسیون لیپیدی در آن می‌شود. در سایر مطالعات نیز نقش اسید رزمارینیک به‌عنوان یک عامل نوروپروتکتیو در کنترل موارد آلزایمر خفیف دیده شده است که اثرات نوروپروتکتیو آن در ارتباط با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و مهار ROS است (۲۱و۲۰). در مطالعه‌ی ما نیز اسید رزمارینیک توانست میزان پراکسیداسیون لیپیدی را در مدل بیماری آلزایمر کاهش دهد. به نظر می‌رسد در این مطالعه نیز یکی از ویژگی‌های اسید رزمارینیک در پیشگیری از تخریب حافظه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن باشد. از طرف دیگر، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده نقش مسیرهای سیگنالینگ کولینرژیکی، پروتئین کیناز B و پروتئین کیناز Mζ در اثرات رفتاری و بافتی منتج از اسید رزمازینیک بود چنان که تجویز مهار کننده‌های نیکوتینی مسیر کولینرژیک و پروتئین کینازهای B و Mζ اثرات حفاظتی اسید رزمارینیک را در بررسی‌های رفتاری و بافتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای تخفیف دادند. همان‌گونه که از نتایج به‌دست آمده مشخص شده است علیرغم بروز تغییرات رفتاری منتج از مهار کننده‌های مسیرهای سیگنالینگ کولینرژیکی، پروتئین کیناز B و پروتئین کیناز Mζ، تغییرات بافتی خود را به خوبی نشان ندادند. از آنجایی که دوره زمانی بررسی‌های رفتاری و بافتی دو هفته پس از جراحی و تزریق بتا آمیلوئید بوده است، به نظر می‌رسد این مدت برای بروز تغییرات رفتاری کافی نبوده و برای مشاهده تغییرات بافتی می‌باید فاصله زمانی میان تزریق بتا آمیلوئید و مطالعه‌ی بافتی بیش از دو هفته باشد. با این وجود، نتایج این مطالعه با نقش مسیر نیکوتینی کولینرژیک در بیماری آلزایمر و نقش پروتئین کینازهای B و Mζ در روند حافظه و یادگیری هماهنگ است. چنان که رسپتورهای نیکوتینی استیل کولین در مغز از اهمیت ویژه‌ای در پردازش فرایندهای شناختی و حافظه، بقای سلول‌های عصبی و پلاستیسیته سیناپسی برخوردارند. این رسپتورها که در طی فرایندهای ارتباطی به عنوان تعدیل کننده نوروترانسمیتری عمل می‌کنند در مغز از فراوانی بالایی برخوردارند. اختلال در رسپتورهای نیکوتینی استیل کولین در سلول‌های عصبی نقش مهمی در بروز بیماری‌هایی از قبیل آلزایمر، پارکینسون، اسکیزوفرنی و اوتیسم و غیره دارند (۲۲). مطالعات نشان داده‌اند که در طی بیماری آلزایمر، کاهش پیشرونده‌ای در فراوانی این رسپتورها در مغز انسان به‌وجود می‌آید. در سیستم اعصاب مرکزی، فراوان‌ترین گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین، گیرنده‌های۲ β/ ٤ α و ۷ α است (۲۳). گیرنده ۷ α در نورون‌های مناطقی از مغز از جمله هیپوکامپ و کورتکس پری فرونتال که سهم عمده‌ای در

حافظه‌ی کاری دارند و در بیماری آلزایمر بیش از سایر مناطق تحت تاثیر قرار می‌گیرند به فراوانی یافت می‌شود (۲۴). فعال شدن این گیرنده به‌وسیله‌ی نیکوتین و سایر آگونیست‌ها، موجب کاهش فعالیت غیر طبیعی میکروگلیاها می‌شود که می‌تواند از این طریق نقش حفاظت نورونی نیکوتین را در بیماری آلزایمر توجیه کند (۲۵). با استفاده از تصویر برداری مولکولی مشخص شده است که استیل کولین استراز در کورتکس افراد مبتلا به بیماری آلزایمر کاهش چشم گیری می‌یابد (۲۶)

بررسی‌های اخیر حاکی از وجود ارتباط میان اثرات مخرب بتا آمیلوئید و پلاستیسیتی سیناپسی منتج از رسپتورهای نیکوتینی کولینرژیکی است چنان که $A\beta_{(25-35)}$ محلول میل ترکیبی به زیر واحدهای مختلف رسپتورهای نیکوتینی کولینرژیکی دارد. به‌عنوان مثال در کورتکس و هیپوکامپ بیماران آلزایمری، بتا آمیلوئید با میل ترکیبی بالا به زیر واحد α ۷ رسپتورهای نیکوتینی متصل می‌شود. کمپلکس بتا آمیلوئید با زیر واحد α ۷ رسپتورهای نیکوتینی فسفریلاسیون پروتئین tau را تسریع می‌کند. همچنین غلظت‌های نانومولار بتا آمیلوئید موجب ایجاد اثر آنتاگونیستی در رسپتورهای α ۷ می‌شود (۲۷). از طرف دیگر، بر اساس فرضیه کولینرژیکی بیماری آلزایمر، نورون‌های کولینرژیک در ناحیه Basal Forebrain در طی دوره‌ی بیماری آلزایمر به شدت دچار آسیب دیدگی می‌شوند که این آسیب با کاهش در تعداد نورون‌ها و سنتز استیل کولین همراه است. این آسیب کولینرژیکی موجب کاهش حافظه و اختلال شناختی می‌شود که مشخصه‌ی بارز بیماری آلزایمر است (۲۸). به همین دلیل بهبود عملکرد سیستم نوروترانسمیتری کولینرژیکی همواره به‌عنوان یک استراتژی درمانی در مطالعات بیماری آلزایمر مورد توجه بوده است. به‌علاوه، اولین مکانیسم مولکولی کشف شده برای ذخیره‌ی طولانی مدت اطلاعات، فعالیت دائمی پروتئین کیناز Mζ است که ایزومری غیرمعمولی و دائما فعال از خانواده‌ی پروتیئن کیناز C است. در هنگام ایجاد LTP در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ، ایزوفرم‌های آنزیم PKC در فازهای زمانی متفاوت از حالت غیر فعال در سیتوزول به حالت فعال در غشا تغییر می‌کنند. افزایش فعال شدن این ایزوفرم ها جهت حفظ و نگه‌داری LTP ادامه یافته و حدود دو ساعت باقی می‌ماند و میزان آن با درجه‌ی تقویت EPSP ارتباط مستقیم دارد. مهار این پروتئین کیناز، حافظه‌ی بلند مدت مورد نیاز برای رفتار احترازی فعال، حافظه‌ی فضایی مورد نیاز برای ماز شعاعی هشت بازو و ماز آبی را مختل می‌کند (۲۹). با این حال استفاده از مهار کننده‌ی پروتئین کیناز Mζ نمی‌تواند در حفظ حافظه بلند مدتی که بیش از دو روز از ایجاد آن می‌گذرد تاثیر گذار باشد. این مساله با نیمه عمر پروتئین کیناز Mζ سازگار است. مهار پروتئین کیناز Mζ هرگونه تقویت در عملکرد سیناپسی را تا ۵ ساعت پس از القای LTP از بین می‌برد (۲۹). علاوه بر پروتئین کیناز Mζ، مسیر سیگنالینگ پروتئین کیناز B به‌عنوان یک مسیر حیاتی در سلول های یوکاریوتیک عمل می‌کند. پروتئین کیناز B هدف اثر فسفاتیدیل تری کینازها (PI3K) است (۳۰). یکی از اعمال مهم مسیر سیگنالینگ PI3K / PKB در مغز، القای LTP در ناحیه CA1 هیپوکامپ است که منجر به تغییرات سیناپسی موثر در فرایند حافظه و یادگیری می‌شود (۳۱). بر اساس مطالعات اخیر مشخص شده است که مهار پروتئین کیناز Mζ پس از یادگیری، حافظه‌ی فضایی اخیر را مختل می‌سازد در حالی‌که به حافظه فضایی گذشته دور آسیبی وارد نمی‌آورد (۳۲).

فسفوریلاسیون پروتئین‌ها اولین تغییر سیناپسی در شروع مسیر سیگنالینگ LTP است. مطالعات نشان می‌دهند که در اسلایس‌های هیپو کمپ موش پس از القای LTP توسط تحریک تتانیک، فسفوریلاسیون PKB، در سیناپس‌های

کولترال شافر با سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ افزایش می‌یابد (۳۳). مطالعات In vitro نشان داده‌اند که مسیر PI3K / PKB ، از نورون‌ها در برابر توکسیسیتی بتا آمیلوئید محافظت می‌کند. به علاوه، این مسیر، یکی از حیاتی‌ترین مسیرها در تنظیم بقای سلول است و میزان مقاومت سلول‌ها را در برابر تحریکات آپوپتوتیک افزایش می‌دهد. Akt اثرات آنتی آپوپتیک خود را از طریق فسفریله کردن چندین ماده پرو آپوپتیک از جمله خانواده BCL2 و گلیکوژن سنتازکیناز ۳β (GSK -3β) به انجام می‌رساند (۳٤). بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که در مغز بیماران آلزایمری، مسیر PI3K/ PKB مختل می‌شود و فعالیت اندک و یا بیش از اندازه این مسیر منجر به اتوفاژی آسیب دیده مرتبط با پاتولوژی در این بیماران می شود. همچنین A25-35 موجب کاهش میزان PKB فسفریله شده می‌شود که بیانگر نقش مسیر PI3K/ PKB در اتوفاژی است (۳۵). نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نیز با یافته‌های فوق هماهنگ می‌باشد چنانکه مهار پروتئین کیناز Mζ و پروتئین کیناز B موجب اختلال در فرایند بازشناختی در آزمون ماز Y و یادگیری در آزمون رفتار اجتنابی غیر فعال گردیدند و اثرات حفاظتی اسید رزمارینیک را تخفیف دادند.

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که پیش درمان مدل آلزایمری موش صحرایی با اسید رزمارینیک می‌تواند از اختلالات رفتاری و هیستوشیمیایی منتج از بتاآمیلوئید جلوگیری کند. در این مطالعه، اثرات حفاظتی اسید رزمارینیک را می‌توان به ویژگی آنتی اکسیدانی و مسیرهای سیگنالینگ کولینرژیکی، پروتئین کیناز B و پروتئین کیناز Mζ نسبت داد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی است. بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران اعلام می‌داریم.

References

1- Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: Prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol*. 2008; 7: 812-26.

2- Gralle M, Ferreira ST. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol*. 2007; 82: 11-32.

3- De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A beta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 1971-76.

4- Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8: 101-13.

5- Perry E, Martin-Ruiz C, Lee M, et al. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur J Pharmacol*. 2000; 393: 215-22.

6- Serrano P, Friedman EL, Kenney J, et al. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biol*. 2008; 6: 2698-706.

7- Liu XF, Tari PK, Haas K. PKM zeta restricts dendritic arbor growth by filopodial and branch stabilization within the intact and awake developing brain. *J Neurosci*. 2009; 29: 12229-35.

8- Migues PV, Hardt O, Wu DC, et al. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci*. 2010; 13: 630-4.

9- Hayes J, Li S, Anwyl R, Rowan MJ. A role for protein kinase A and protein kinase M zeta in muscarinic acetylcholine receptor-initiated persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neurosci*. 2008; 151: 604-12.

10- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 615-75.

11- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296: 1655-7.

12- Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci*. 2006; 23: 3375-84.

13- Petersen M, Simmonds MS, Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003; 62: 121-5.

14- Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Chronic epigallocatechin-3-gallate ameliorates learning and memory deficits in diabetic rats via modulation of nitric oxide and oxidative stress. *Behav Brain Res*. 2011; 224: 305-10.

15- Baluchnejadmojarad T, Roghani M, karimi N, kamran M. Varenicline Ameliorates Learning and Memory Deficits in Amyloid β(25–35) Rat Model of Alzheimer's Disease. *BCN*. 2011; 3: 3-9.

16-Wirths O, Weis J, Kayed R, Saido TC, Bayer TA. Age-ependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model. *Neurobiol Aging*. 2007; 28: 1689-99.

17- McLellan ME, Kajdasz ST, Hyman BT, Bacskai BJ. In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J Neurosci*. 2003; 23: 2212-7.

18- Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, et al. Evidence of increased oxidative damage in 8. 19- Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med*. 2004; 20: 329-59.

20- Bigford GE, Del Rossi G. Supplemental substances derived from foods as adjunctive therapeutic agents for treatment of neurodegenerative diseases and disorders. *Adv Nutr*. 2014; 5: 394-403.

21- Yamada M, Ono K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M. Natural Phenolic Compounds as therapeutic and preventive agents for cerebral amyloidosis. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 863: 79-94.

22- Pimlott SL, Piggott M, Owens J, et al. Nicotinic acetylcholine receptor distribution in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease, and vascular dementia: in vitro binding study using 5-[(125)i]-a-85380. *Neuro Psychopharmacol*. 2004; 29: 108-16.

23- Dineley KT, Pandya AA, Yakel JL. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2015; 36: 96-108.

24- Echeverria V, Yarkov A, Aliev G. Positive modulators of the α7 nicotinic receptor against neuroinflammation and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2016; 144: 142-57.

25- Barreto GE, Iarkov A, Moran VE. Beneficial effects of nicotine, cotinine and its metabolites as potential agents for Parkinson’s disease. *Front Aging Neurosci*. 2015; 6: 340.

26- Roy R, Niccolini F, Pagano G, Politis M. Cholinergic imaging in dementia spectrum disorders. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016; 43: 1376-86.

27- Pettit DL, Shao Z, Yakel JL. Beta-Amyloid (1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci*. 2001; 21: RC120.

28- Pinto T, Lanctôt KL, Herrmann N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. *Ageing Res Rev*. 2011; 10: 404-12.

29- Serrano P, Yao Y, Sacktor TC. Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phaselong-term potentiation. *J Neurosci*. 2005; 25: 1979-84.

30- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296: 1655-7.

31- Opazo P, Watabe AM, Grant SG, O'Dell TJ. Phosphatidylinositol 3- kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J Neurosci*. 2003; 23: 3679-88.

32- Hales JB, Ocampo AC, Broadbent NJ, Clark RE. Consolidation of spatial memory in the rat: Findings using zeta-inhibitory peptide. *Neurobiol Learn Mem*. 2016; 136: 220-27.

33- Racaniello M, Cardinale A, Mollinari C, et al. Phosphorylation changes of CaMKII, ERK1/2, PKB/Akt kinases and CREB activation during early long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 mouse hippocampal synapses. *Neurochem Res*. 2010; 35: 239-46.

34- Kim D, Chung J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol*. 2002; 35: 106-1.

35- Fan S, Zhang B, Luan P, et al. PI3K/AKT/mTOR/p70S6K pathway is involved in Aβ25-35-induced autophagy. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 161020.

The Role of Acetylcholine Nicotinic Receptors, Protein Kinase B and Protein Kinase M on the Protective Effect of Rosmarinic Acid in Beta Amyloid (25-35) Induced Rat Model of Alzheimer's Disease

Baluchnejadmojarad T[1], Roghani M[2], Kazemloo P[3]

[1]Dept. of Physiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[2]Dept of Physiology, School of Medicine, Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

[3]Dept of Physiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Baluchnejadmojarad T, Dept.of Physiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: tmojarad@yahoo.com

Received: 1 Oct 2016 **Accepted:** 26 Feb 2017

Background and Objective: Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases and results from the extracellular accumulation of β-amyloid peptides and the resulting neuronal dysfunction. In this study, the role of nicotinic acetylcholine receptors, protein kinase B (PKB) and protein kinase M (PKM) were evaluated in order to examine the mechanism of the protective effects of rosmarinic acid in a rat model of Alzheimer's disease.

Materials and Methods: Animals were divided into 6 groups consisting of 1) Sham, 2) Beta amyloid, 3) Rosmarinic acid pretreated beta amyloid (25 mg/kg), 4-6) Rosmarinic acid and PKM inhibitor, PKB inhibitor and acetylcholine receptor inhibitor pretreated beta amyloid. Two weeks post-surgery, behavioral (alternation percent in Y maze and step through latency in passive avoidance task) and histochemical (hippocampal malondialdehyde and neuronal density measurement) studies were performed.

Results: Pretreatment of beta amyloid animals with rosmarinic acid considerably alleviated the behavioral and histochemical disturbances related to the hippocampus. In this group, nicotinic acetylcholine receptors and PKB inhibitors decreased step through latency ($p<0.001$) and increased hippocampal malondialdehyde levels ($p<0.001$). In addition, PKB inhibitors decreased hippocampal neuronal density in rosmarinic acid pretreated beta amyloid rats ($p<0.05$).

Conclusion: Based on the findings of this study, it seems that in this experimental model of Alzheimer's disease the protective effects of rosmarinic acid were derived from its antioxidant properties and partially via nicotinic acetylcholine receptors, PKB and PKM.

Keywords: Rosmarinic acid; Oxidative stress; Nicotinic acetylcholine receptors, Protein kinase B; Protein kinase