

تاثیر دوکوزاهگزانوئیک اسید بر یادگیری و حافظه فضایی در مدل بیماری آلزایمر موش‌های صحرایی نر بالغ

نسترن زمانی^۱، دکتر احمدعلی معاضدی^۲، دکتر محمد رضا آفرینش خاکی^۳، دکتر مهدی پور مهدی بروجنی^۴

نویسنده‌ی مسئول: نسترن زمانی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران Na_zamani2000@yahoo.com

دریافت: ۹۶/۳/۲۹ پذیرش: ۹۶/۶/۵

چکیده

زمینه و هدف: دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) فراوان‌ترین اسید چرب غیر اشباع در مغز است و یکی از اجزای ساختاری غشای سلول‌های عصبی است. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تاثیر DHA بر اختلال یادگیری و حافظه‌ی فضایی در مدل بیماری آلزایمر با تخریب الکتریکی هسته‌ی قاعده‌ای مگنوسلولایس (NBM) انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (Wistar) به هشت گروه تقسیم شدند: کنترل، تخریب (تخریب الکتریکی دو طرفه‌ی NBM)، شاهد تخریب (ورود الکترود به NBM بدون القای جریان الکتریکی)، تخریب DHA (۵، ۲/۵، ۱، ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و حلال (تخریب+روغن کنجد ۰/۲ میلی‌لیتر). یک هفته بعد، موش‌های صحرایی به مدت ۵ روز با دستگاه ماز Y شکل آموزش دیدند. بیست و پنج روز بعد از آموزش، آزمون فراخوانی حافظه برای ارزیابی حافظه‌ی بلند مدت انجام گرفت.

یافته‌ها: تخریب دو طرفه‌ی NBM منجر به کاهش یادگیری فضایی در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد تخریب گردید ($P < 0/001$). در گروه حلال در مقایسه با گروه تخریب هیچ تغییری در یادگیری فضایی مشاهده نگردید. همچنین درمان با DHA در گروه‌های تخریب DHA ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ($P < 0/05$)، تخریب DHA ($P < 0/01$) ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تخریب DHA ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P < 0/01$)، موجب افزایش معنی‌دار در یادگیری فضایی گردید. علاوه بر این بین نتایج روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه‌ی روز سی‌ام تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: دوکوزاهگزانوئیک اسید بصورت وابسته به مقدار موجب بهبود نقص یادگیری فضایی در مدل بیماری آلزایمر با تخریب الکتریکی NBM می‌گردد.

واژگان کلیدی: دوکوزاهگزانوئیک اسید، یادگیری فضایی، هسته قاعده‌ای مگنوسلولایس، بیماری آلزایمر

مقدمه

بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease: AD) منجر به فقدان پیشرونده‌ی حافظه و اختلالات شناختی و رفتاری می‌گردد. ژنتیک، بتا آمیلوئید (Beta-amyloid: A β) و کاهش استیل کولین عوامل اصلی در پاتوژنز این بیماری

۱- دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۲- دکتری تخصصی نوروفیزیولوژی، استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۳- دکتری تخصصی نوروفیزیولوژی، استادیار مرکز تحقیقات علوم شناختی و علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان

۴- دکتری تخصصی اپیدمیولوژی، دانشیار گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

(۵). تجمع $A\beta$ در بیماری آلزایمر با یک پاسخ التهابی ناشی از فعال شدن میکروگلیا و تجمع آستروسیت‌ها همراه می‌باشد و موجب القای بیان سیتوکین‌های پیش التهابی می‌شود. سیتوکین‌ها با تحریک سنتز $A\beta$ و تشکیل آمیلوئید موجب ایجاد یک حلقه معیوب در بازچرخشی سیستم التهابی می‌شوند و تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال و استرس اکسیداتیو آسیب مغز را افزایش می‌دهد (۶). بسیاری از واسطه‌های تشکیل شده از DHA شامل رزولوین‌ها (Resolvins) و نورپروتکتین D1 (NPD1: Neuroprotectin D1) خواص ضد التهابی دارند بنابراین می‌توانند با اثرات ضد التهابی خود در کاهش آسیب سلول‌های مغزی نقش داشته باشند (۷). همچنین NPD1 می‌تواند مانع انباشت آمیلوئید بتا شود. در بسیاری از مطالعات حیوانی و آزمایشگاهی نشان داده شده است که DHA در برابر علائم عصبی و پاتولوژی بیماری آلزایمر شامل تشکیل آمیلوئید بتا و هیپرفسفوریلاسیون تاو اثر محافظتی دارد (۸). همچنین در مطالعات *in vitro* نشان داده شد که DHA به‌طور قابل ملاحظه‌ای موجب مهار فیبریلایسیون $A\beta$ می‌گردد. علاوه بر این DHA سمیت القا شده توسط آمیلوئید را در محیط کشت سلول کاهش می‌دهد (۹). فقدان سیناپسی و مرگ نورونی در نواحی قشری و لیمبیک مغز فرآیندهای کلیدی در ایجاد اختلال شناختی مرتبط با نورودژنراسیون در بیماران مبتلا به آلزایمر هستند. در سطوح سلولی این آپوپتوزهای نورونی ممکن است به وسیله استرس اکسیداتیو آغاز شوند (۱۰). اسیدهای چرب غیراشباع از جمله DHA اثرات ضد اکسیداتیو، ضد التهابی و ضد آپوپتوزی دارند که منجر به محافظت عصبی در بیماران مبتلا به آلزایمر، سالمندان و آسیب‌های مغزی می‌شوند. اعمال ضد التهابی و آنتی اکسیدانی DHA با کاهش سطوح سلولی گونه‌های واکنش‌زا، واسطه‌های پیش التهابی، سطوح نیتريت، حفظ سطوح بالاتر گلوتاتیون (GSH) و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی همراه است (۵).

هستند. نقص کولینرژیک مهم‌ترین ویژگی نوروپاتولوژیک در بیماری آلزایمر است که با کاهش حافظه و شدت اختلال شناختی در این بیماری ارتباط نزدیکی دارد (۱). بیماران مبتلا به آلزایمر فقدان نورونی پیش‌رونده‌ای را نشان می‌دهند که با آتروفی نواحی خاصی از مغز همراه می‌باشد. انشعابات کولینرژیک هسته‌ای قاعده‌ای مینرت (Nucleus basalis of Meynert) به نواحی قشری مغز از جمله مسیرهایی است که بسیار سریع و به شدت در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر تحت تاثیر قرار می‌گیرد. در بیماران مبتلا به آلزایمر فقدان نورون‌های کولینرژیک قاعده‌ای مغز جلویی همراه با کاهش تعدادی از مارکرهای کولینرژیک شامل استیل کولین ترانسفراز، گیرنده‌های موسکارینی و نیکوتینی استیل کولین و سطوح استیل کولین می‌باشد (۲). گروه نورون‌های کولینرژیک قاعده‌ای مغز جلویی در مغز جوانان به عنوان هسته‌ای قاعده‌ای مگنوسلولاریس (Nucleus basalis NBM) Magnocellularis: شناخته می‌شوند که معادل هسته‌ای قاعده‌ای مینرت در انسان هستند. مدل‌های حیوانی با تخریب NBM، کاهش در مارکرهای کولینرژیک شامل سطح استیل کولین، آزادسازی و تغییر و تبدیل استیل کولین، بازجذب استیل کولین، فعالیت استیل کولین استراز و تعداد گیرنده‌های کولینرژیک موسکارینی در قشر جلو پیشانی را نشان داده‌اند (۳). از این رو مدل‌های تخریب هسته NBM برای مطالعه‌ی نقش سیستم کولینرژیک در هوشیاری و ادراک به کار می‌روند و بر نقص‌های ادراکی ایجاد شده در بیماری آلزایمر دلالت دارند. دوکوزاهگزانوئیک اسید (Docosahexaenoic acid: DHA) یک اسید چرب غیراشباع (PUFA) متعلق به گروه اسیدهای چرب ضروری غیر اشباع امگا ۳ می‌باشد که به طور عمده در محصولات دریایی یافت می‌شود (۴). DHA یکی از اجزای مهم غشای سلول‌های عصبی است و در ۳۰ تا ۴۰ درصد از فسفولیپیدهای موجود در ماده خاکستری قشر مغز و سلول‌های گیرنده‌ی نوری در شبکیه وجود دارد

با توجه به اینکه اثرات تزریق حاد داخل صفاقی DHA در دقیقه ۳۰ بعد از القای مدل آلزایمر تاکنون بررسی نشده است و نیز با در نظر گرفتن تاثیرات تزریق حاد داخل صفاقی DHA در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، بهبود اعمال شناختی و بهبود رفتار حرکتی در مدل آسیب ایسکمیک مغزی و مهار مسیرهای آپوپتوتیک در مدل آسیب نخاعی بر آن شدیم تا در این مطالعه پس از القای مدل آلزایمر از طریق تخریب الکتریکی دو طرفه‌ی NBM و قطع ورودی‌های اصلی کولینرژیک به هیپوکامپ و قشر مغز با توجه به اثرات ضد اکسیداتیو، ضد التهابی و ضد آپوپتوزی DHA تاثیر تزریق حاد داخل صفاقی این دارو را بر حافظه‌ی فضایی در دستگاه ماز Y شکل مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی که دارای کد اخلاق (ش ۱۳۹۰ ۹ الف/ج/۵۵/۱۸۰/Q) مصوب وزارت علوم، تحقیقات و فناوری بود، از موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی 20 ± 20 گرم استفاده گردید. موش‌ها در گروه‌های چهارتایی در هر قفس، در خانه‌ی حیوانات با درجه حرارت کنترل شده (20 تا 24 درجه‌ی سانتی‌گراد) و تحت چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و آب و غذا به مقدار کافی در دسترس داشتند و آزمایشات رفتاری در دوره روشنایی و با استفاده از دستگاه ماز Y شکل انجام گرفت. ماده مورد استفاده DHA بود که از شرکت سیگما تهیه گردید. موش‌ها به‌طور تصادفی به هشت گروه تقسیم شدند.

کنترل: گروهی که تحت هیچ گونه تزریق یا جراحی قرار نگرفتند.

ضایعه دیده (آلزایمری): گروهی که تحت عمل جراحی استرئوتاکسیک الکتروود تخریب به صورت دو طرفه وارد NBM شد و با عبور جریان الکتریکی عمل تخریب انجام گردید.

شاهد تخریب: گروهی که تحت جراحی و ورود الکتروود به NBM بدون تخریب این هسته قرار گرفتند. تخریب+حلال: گروهی که تحت عمل جراحی تخریب دو طرفه‌ی NBM قرار گرفتند و ۳۰ دقیقه بعد از جراحی حلال دارو (روغن کنجد) را به میزان 0.2 میلی‌لیتر به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه‌های تخریب+مقادیر مختلف DHA: این گروه‌ها تحت عمل جراحی تخریب دو طرفه‌ی NBM قرار گرفتند و ۳۰ دقیقه بعد از جراحی (۱۱) هر گروه یکی از مقادیر ۵، ۲/۵، ۱، ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کرد (۱۳ و ۱۲). گروه کنترل و سایر گروه‌ها یک هفته بعد از جراحی به مدت ۵ روز متوالی با دستگاه ماز Y شکل آموزش دیدند.

جراحی: موش‌ها جهت تخریب هسته‌ی NBM تحت بیهوشی عمومی با تزریق داخل صفاقی مخلوطی متشکل از ۷۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروهیدرات کتامین ۱۰ درصد و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلانین ۲ درصد قرار گرفتند (۱۴) و سپس در دستگاه استرئوتاکسی (Stoelting, USA) ثابت شدند. میله دندانی $3/3$ میلی‌متر زیر صفر افقی قرار گرفت تا مطابق اطلس وضعیت مناسب جمجمه حاصل گردد. سپس موهای پشت سر حیوان از ناحیه‌ی بین چشم‌ها تا گوش‌ها تراشیده و پوست این ناحیه ضد عفونی شد. با کمک اسکالپل یک برش طولی در پوست ناحیه‌ی پشت سر حیوان داده شد و بعد از کنار زدن بافت‌های پیوندی محل مورد نظر با نرمال سالین تمیز گردید تا درزهای جمجمه نمایان گردد. مختصات مورد استفاده برای NBM 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. با استفاده از دستگاه ایجاد کننده‌ی ضایعه (Lesion Making Device, UGO Basile) پس از قرار گرفتن الکتروود در نقطه مورد نظر با عبور جریان الکتریکی مستقیم با شدت 0.5 میلی‌آمپر به مدت ۳ ثانیه (۱۴)

NBM در هر دو نیمکره مغزی به صورت الکتریکی تخریب گردید و مدل آلزایمر ایجاد شد. پس از دوره بهبودی (یک هفته) آموزش در دستگاه ماز Y شکل به مدت ۵ روز آغاز گردید.

دستگاه ماز Y شکل: بررسی روند یادگیری و حافظه در مدل‌های آزمایشگاهی، بر اساس دو روش تنبیه (دریافت شوک یا احساس ناخوشایند) و تشویق (دریافت پاداش مثل آب و غذا) توسط مازهای متنوعی انجام می‌شود. با توجه به تداخل احتمالی برخی داروها در مکانیسم اشتها، به نظر می‌رسد برای بررسی تاثیر داروها بر روند یادگیری، روش تنبیه مناسب‌تر می‌باشد و با توجه به اینکه هیپوکامپ در حافظه فضایی نقش عمده‌ای دارد در این تحقیق از دستگاه ماز Y شکل برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی استفاده گردید (۱۵). این دستگاه به شکل Y است و دارای سه بازوی کاملاً مشابه به ابعاد $17/5 \times 60$ سانتی متر و ارتفاع ۳۰ سانتی متر و از جنس شیشه شفاف است. کف هر شاخه میله‌های آبکاری کروم - نیکل به فواصل یک سانتی متر از هم قرار گرفته‌اند که به دو طرف دیواره نصب گردیده است. احساس ناخوشایند (شوک الکتریکی) توسط دستگاه و از طریق این میله‌ها به حیوان منتقل می‌شود. در انتهای هر بازو یک منبع نوری (لامپ ۱۲ ولت) نصب گردیده است. سطح بالای دستگاه نیز توسط سرپوش‌های کشویی مسدود شده است تا از خروج حیوان در حین آموزش جلوگیری به عمل آید. در دستگاه کنترل، مشخصات تحریک نظیر طول تحریک، فرکانس تحریک، فاصله زمانی بین روشن شدن لامپ و اعمال تحریک، فاصله زمانی بعد از عمل تحریک و شمارش تعداد دفعات تحریک قابل تنظیم است. دستگاه باید در یک محیط تاریک، آرام و بی سر و صدا قرار گیرد. در روز اول آموزش ابتدا حیوان در ماز قرار داده شده و به مدت ۱۵ دقیقه اجازه داده می‌شود تا آزادانه درون ماز حرکت کند و با شکل ظاهری ماز آشنا شود. سپس از بازویی که حیوان در آن

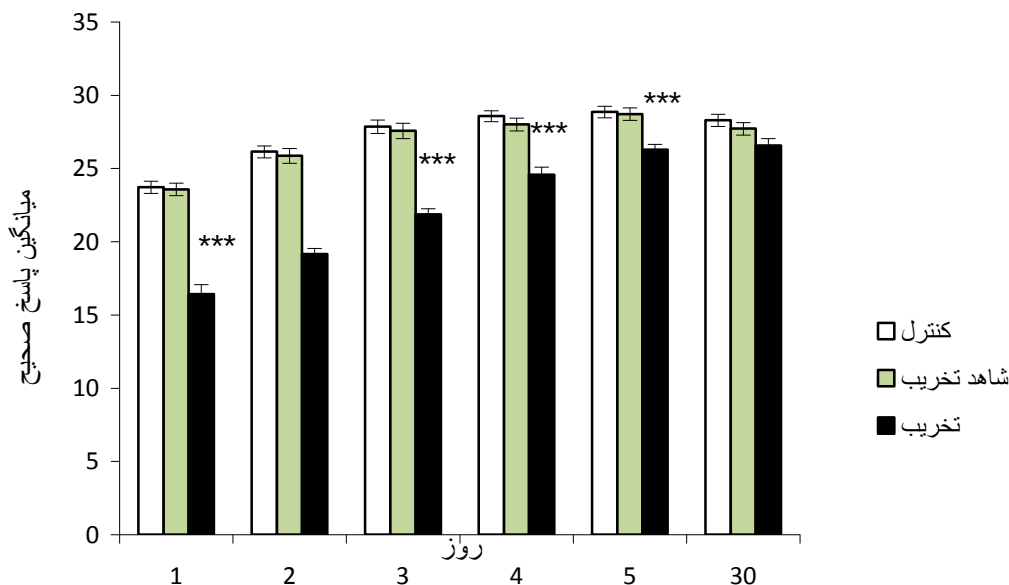
قرار دارد آموزش شروع می‌شود. انتخاب بازوها بر اساس جدول تصادفی صورت می‌گیرد. با فشار دادن یک دکمه روی دستگاه کنترل، چراغ یکی از بازوهای ماز روشن می‌شود که در یک فاصله زمانی کوتاه (۵ ثانیه) موش فرصت دارد تا از محل تاریک خارج شده و وارد بازوی روشن شود؛ در این صورت ورود موش به بازوی روشن به عنوان انتخاب صحیح محسوب می‌شود، در غیر این صورت بعد از ۵ ثانیه به پاهای موش شوکی داده می‌شود که در این صورت ورود به بازوی روشن به عنوان انتخاب صحیح و ورود به بازوی تاریک به عنوان انتخاب غلط محسوب می‌شود. بر اساس جدول تصادفی در هر روز به هر موش ۳۰ بار آموزش داده می‌شود و در پایان هر جلسه تعداد پاسخ صحیح محاسبه می‌گردد. جلسات آموزش به مدت ۵ روز متوالی ادامه می‌یابد تا موش‌ها به معیار پاسخ صحیح برسند؛ یعنی از ۳۰ بار آموزش در روز حداقل ۲۶ بار انتخابی صحیح داشته باشند. بیست و پنج روز بعد از آموزش آزمون فراخوانی حافظه برای ارزیابی حافظه بلند مدت انجام گرفت. در این آزمون حافظه‌ی هر کدام از حیوانات در روز سی‌ام به صورت یک جلسه در دستگاه ماز Y شکل مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن با نتایج روز پنجم آموزش مقایسه گردید (۱۵).

آنالیز آماری: نتایج حاصل از این پژوهش به صورت توصیفی و تحلیلی با نرم افزار SPSS بررسی گردیدند. به منظور مقایسه میانگین تعداد پاسخ صحیح در گروه‌های مختلف و تعیین این که آیا گروه‌ها با یکدیگر اختلاف دارند یا نه، از آنالیز واریانس با اندازه‌گیری تکراری و آزمون تکمیلی TUKEY استفاده گردید. مقایسه گروه‌های مختلف در ۵ روز متوالی آموزش با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون تکمیلی TUKEY و آزمون t مستقل انجام شد. در این بررسی $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

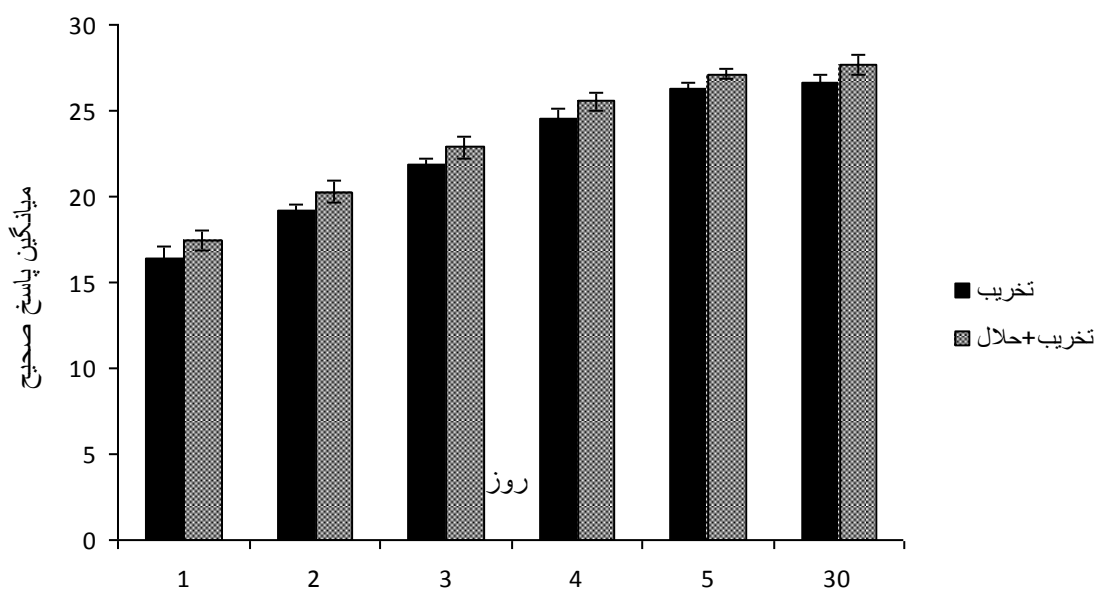
یافته ها

در این مطالعه نتایج حاصل از آنالیز واریانس با اندازه گیری تکراری نشان داد که گروه، زمان و اثر متقابل گروه و زمان تاثیر معنی داری بر یادگیری فضایی دارد ($P < 0.001$). در مقایسه گروه های مختلف در ۵ روز متوالی آموزش با روش آنالیز واریانس یک طرفه نشان داده شد که میزان یادگیری فضایی بین گروه کنترل و شاهد تخریب در هیچ کدام از روزها دارای تفاوت معنی دار نمی باشد. از طرف دیگر میزان یادگیری فضایی بین گروه های کنترل و تخریب در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم ($P < 0.001$) دارای تفاوت معنی دار بود که بیانگر این مسئله است که تخریب دوطرفه ی

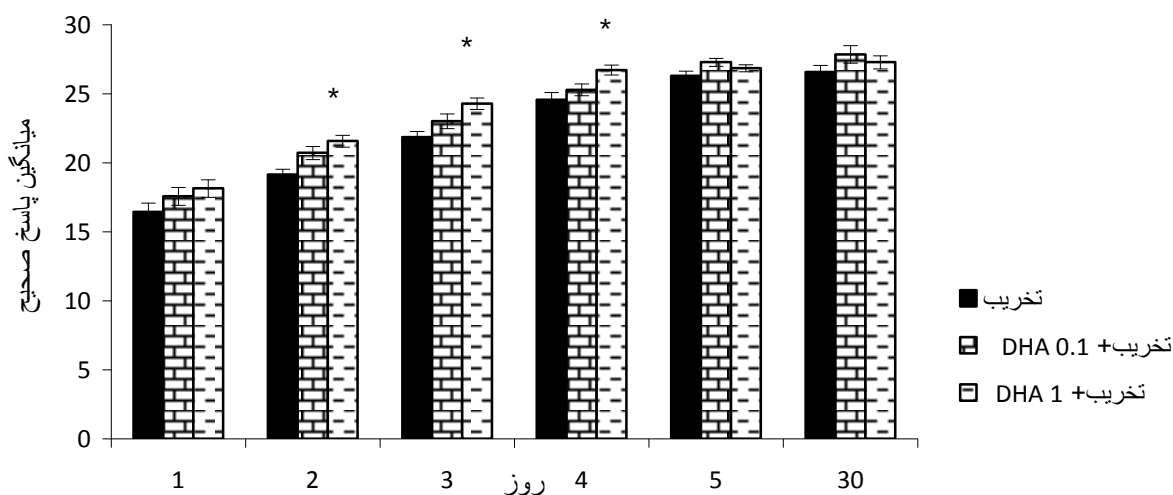
NBM منجر به کاهش یادگیری فضایی نسبت به گروه کنترل می شود. علاوه بر این، بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه ی روز سی ام اختلاف معنی داری وجود نداشت (نمودار ۱). همچنین مقایسه ی میزان یادگیری فضایی بین گروه های تخریب و تخریب+حلال در هیچ کدام از روزها تفاوت معنی داری را نشان نداد. علاوه بر این در این گروه ها بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه ی روز سی ام اختلاف معنی داری وجود نداشت (نمودار ۲).



نمودار ۱: مقایسه میانگین پاسخ صحیح ($\bar{x} \pm S.E.M$) بین گروه کنترل با گروه های شاهد تخریب و تخریب در روزهای اول تا پنجم و روز سی ام با روز پنجم آموزش در موش های صحرایی نر بالغ ($n=7$; $P < 0.001$; xxx).



نمودار ۲: مقایسه میانگین پاسخ صحیح ($\bar{x} \pm S.E.M$) بین گروه تخریب با گروه تخریب+حلال در روزهای اول تا پنجم و روز سی ام با روز پنجم آموزش در موش های صحرایی نر بالغ ($n=7$)



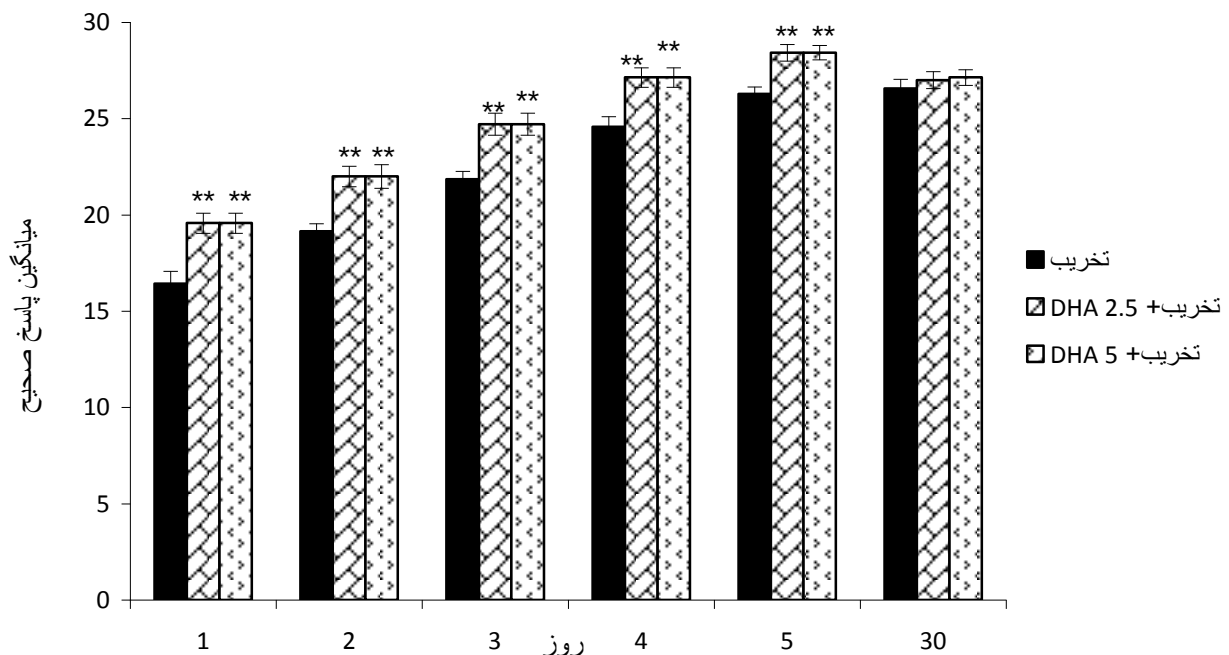
نمودار ۳: مقایسه میانگین پاسخ صحیح ($\bar{x} \pm S.E.M$) بین گروه تخریب با گروه های تخریب+DHA در مقادیر ۱ و ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روزهای اول تا پنجم و روز سی ام با روز پنجم آموزش در موش های صحرایی نر بالغ ($n=7$, $P < 0.05$ *).

پنجم اختلاف معنی داری را نشان نداد اما بین گروه های تخریب و تخریب DHA ۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روزهای

مقایسه ی میزان یادگیری فضایی بین گروه های تخریب و تخریب DHA ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم در روزهای اول تا

۵ میلی گرم بر کیلوگرم در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم ($P < 0.01$) اختلاف معنی داری را نشان داد. علاوه بر این، بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه‌ی روز سی‌ام اختلاف معنی داری وجود نداشت (نمودار ۴).

دوم، سوم و چهارم ($P < 0.05$) اختلاف معنی داری وجود داشت علاوه بر این، بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه‌ی روز سی‌ام اختلاف معنی داری وجود نداشت (نمودار ۳). مقایسه‌ی میزان یادگیری فضایی بین گروه تخریب با گروه‌های تخریب DHA+ ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم و تخریب DHA+



نمودار ۴: مقایسه میانگین پاسخ صحیح ($\bar{x} \pm S.E.M$) بین گروه تخریب با گروه‌های تخریب+DHA در مقادیر ۵ و ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم در روزهای اول تا پنجم و روز سی‌ام با روز پنجم آموزش در موش‌های صحرایی نر بالغ ($n=7$, $P < 0.01$).

بحث

از NBM به قشر در بیماران مبتلا به آلزایمر غالباً به سرعت و با شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۲). سیستم کولینرژیک مسئول ذخیره و فراخوانی اطلاعات در حافظه است. تخریب سیستم کولینرژیک در مغز به عنوان دلیل اصلی از دست دادن حافظه و شناخت در بیماران مبتلا به آلزایمر شناخته شده است (۱۷). با توجه به اینکه اکثریت نورون‌های NBM کولینرژیک هستند به نظر می‌رسد که کاهش نورون‌های

این مطالعه به بررسی تاثیر تزریق حاد داخل صفاقی DHA در دقیقه‌ی ۳۰ پس از تخریب الکتریکی دوطرفه‌ی NBM و القای مدل آلزایمر بر فرآیند یادگیری و حافظه‌ی فضایی پرداخته است. NBM منشأ اصلی انشعابات کولینرژیک به هیپوکامپ و کورتکس است و نقش مهمی را در فرآیندهای شناختی دارد (۱۶). مسیر انشعابات کولینرژیک

می‌گردد (نمودار ۳ و ۴). در این بررسی اثرات رفتاری مشاهده شده برای DHA وابسته به مقدار بود. مقادیر DHA پایه براساس مطالعات انجام شده‌ی پیشین (۱۳ و ۱۲) و با تعدیل و تغییراتی انتخاب شدند. در نتایج حاصل از پژوهش‌های پن و همکاران نشان داده شد که تزریق حاد داخل صفاقی DHA با مقدار نانومول بر کیلوگرم ۵۰۰ در گروه‌های یک ساعت و سه روز قبل از آسیب ایسکمیک مغزی و نیز درمان مزمن به مدت ۶ هفته قبل از آسیب ایسکمیک مغزی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی با کاهش معنی‌دار در سطوح مالون دی آلدئید (MDA) در بافت قشر مغز می‌گردد. همچنین در این بررسی درمان مزمن DHA با مقدار ۵۰۰ نانومول بر کیلوگرم و به مدت ۶ هفته قبل از آسیب ایسکمیک موجب افزایش سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون در بافت قشر مغز گردید (۱۲). در مطالعات برمن و همکاران نیز نشان داده شد که پیش درمان حاد با DHA در مقادیر ۵، ۲/۵، ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش حجم آسیب ناشی از هیپوکسی در مدل ایسکمی مغزی و بهبود عملکرد رفتاری می‌گردد. در این بررسی نشان داده شد که DHA با مقدار ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشترین اثر محافظت‌کننده‌ی عصبی را دارد (۱۳). در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که پیش درمان حاد با DHA موجب افزایش مقاومت بافت عصبی نخاع در برابر تغییرات ثانویه‌ی ناشی از آسیب نخاعی پس از ضربه می‌گردد که به نظر می‌رسد دلیل آن مهار مسیرهای آپوپتوتیک می‌باشد (۲۰). همچنین در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که تزریق حاد وریدی DHA سه ساعت بعد از القای مدل ایسکمی مغزی موجب محافظت عصبی، بهبود رفتار حرکتی و بهبود اعمال شناختی در ماز Y شکل می‌گردد (۲۱). نتایج یک بررسی نشان داد که تزریق آمیلوئید بتا در هیپوکامپ موش‌های صحرایی موجب ایجاد نقص در تقویت دراز مدت (Long-term potentiation: LTP) و حافظه کارکردی و

کولینرژیک نقش مهمی را در اختلالات حافظه‌ی مشاهده شده در موش‌های صحرایی با تخریب NBM داشته باشند. در این پژوهش مقایسه‌ی نتایج بین گروه کنترل و تخریب دوطرفه‌ی NBM نشان داد که تخریب دوطرفه‌ی این هسته باعث کاهش معنی‌دار در فرآیند یادگیری فضایی می‌گردد (نمودار ۱). در مطالعات ربیعی و همکاران نیز نشان داده شد که تخریب دوطرفه‌ی NBM با استفاده از روش الکتریکی باعث کاهش یادگیری فضایی در ماز آبی موریس و همچنین کاهش یادگیری اجتنابی غیرفعال در دستگاه شاتل باکس می‌شود (۳). همچنین در مطالعات دبیر و همکاران تخریب الکتریکی دو طرفه‌ی NBM موجب کاهش پاسخ‌های درست در آزمون اکتساب در ماز شعاعی هشت بازویی گردید (۱۸). در مطالعات گشادرو و همکاران نیز نشان داده شد که تخریب NBM با استفاده از اسید ایوتونیک منجر به کاهش یادگیری احترازی غیرفعال می‌شود (۱۹) که این نتایج همسو با نتایج به دست آمده در این کار پژوهشی می‌باشند، لذا تخریب الکتریکی دو طرفه‌ی NBM می‌تواند به عنوان مدل مناسبی جهت ایجاد بیماری آلزایمر در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

از طرف دیگر، مقایسه‌ی نتایج بین گروه کنترل و شاهد تخریب نشان داد که ورود الکتروده به NBM بدون تخریب این هسته اثری بر یادگیری فضایی ندارد و این نشان می‌دهد که مراحل مختلف بیهوشی، جراحی و ورود الکتروده به NBM بدون ایجاد تخریب اثری بر یادگیری فضایی در موش‌های صحرایی ندارد. همچنین مقایسه‌ی بین دو گروه تخریب و تخریب+حلال نشان داد که حلال (روغن کنجد) تاثیری بر یادگیری فضایی ندارد (نمودار ۲).

در مقایسه‌ی بین گروه تخریب با گروه‌های تخریب+مقادیر مختلف DHA نشان داده شد که DHA در مقادیر ۵، ۲/۵، ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب افزایش معنی‌داری در یادگیری فضایی در مدل بیماری آلزایمر با تخریب دو طرفه‌ی NBM

همچنین کاهش سطح استیل کولین در مغز می‌شود در صورتی که استفاده از مکمل رژیم DHA موجب بازگشت ترشح نوروترانسمیترها و نقص LTP به حالت طبیعی گردید (۹). تحقیقات در مدل‌های حیوانی بیماری آلزایمر، ضربه مغزی و آسیب نخاعی اثرات محافظت عصبی و ترمیم‌کننده را برای DHA نشان داده‌اند. مکانیسم‌های بیولوژیک که احتمالاً به وسیله‌ی آن DHA اثرات محافظت عصبی خود را اعمال می‌کند شامل مهار سیکلواکسیژناز-۲ و در نتیجه مهار سنتز پروستاگلندین‌ها، لوکوترین‌ها و ترومبوکسان‌ها و همچنین مهار ترشح سائتوکین‌های پیش التهابی می‌باشد. در یک بررسی نشان داده شد که NPD1 که یک متابولیت DHA است نفوذ لوکوسیت‌ها و بیان ژن‌های پیش التهابی را در مغز در شرایط ایسکمی مهار می‌کند (۲۲). همچنین در مطالعات تاثیر پپتیدهای $\alpha\beta$ بر مغز و ایسکمی مغزی نشان داده شد که NPD1 نقش محافظت کننده‌ی عصبی دارد و در حضور نوروتروفین‌ها NPD1 بلافاصله در پاسخ به استرس اکسیداتیو و آسیب‌های ایسکمیک ساخته می‌شود و موجب تنظیم بالا دست وقایع آپوپتوز در سلول‌های مغزی، سیگنالینگ التهاب عصبی و حفظ هومئوستاز سلولی می‌گردد (۲۳). در موش‌های مسن DHA موجب بهبود اعمال‌شناختی و افزایش سطح پروتئین فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) در بافت هیپوکامپ گردید (۲۴). همچنین در نورون‌های هیپوکامپ DHA موجب افزایش فعالیت سیناپسی گلوتامات همراه با افزایش بیان زیر واحدهای گیرنده‌ی گلوتامات گردید (۲۵). در مطالعه‌ای نشان داده شد که پیش درمان با DHA در موش‌های صحرایی مدل آلزایمر موجب افزایش فعالیت گلوتاماتون ردوکتاز و سطوح گلوتاماتون احیا شده و همچنین کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و گونه‌های اکسیژن فعال افزایش یافته در قشر مغز و هیپوکامپ می‌گردد. همچنین در این بررسی اثرات مفید پیش درمان با DHA بر قدرت یادگیری اجتنابی فعال در دستگاه شاتل باکس در موش‌های مدل

آلزایمر مشاهده شد (۲۶). در آزمایشات *in vitro* نشان داده شد که DHA موجب افزایش رشد نوریت در نورون‌های حسی در موش‌های صحرایی مسن (۲۷) و نورون‌های هیپوکامپ در موش‌های صحرایی بالغ می‌گردد (۲۸). کاهش فعالیت استیل کولین ترانسفراز (ChAT) در نئوکورتکس از اولین وقایع پاتولوژیک در پاتوژنز بیماری آلزایمر می‌باشد. در یک بررسی نشان داده شد که DHA موجب حفظ فعالیت ChAT و جلوگیری از دژنراسیون سیستم‌های کولینرژیک در موش‌های صحرایی تحت تاثیر آمیلوئید بتا می‌گردد (۲۹). نتایج حاصل از یک بررسی نشان داد که رژیم‌های غذایی غنی از DHA موجب افزایش سطوح خارج سلولی استیل کولین در هیپوکامپ موش‌های صحرایی مسن (۳۰) و کاهش آسیب ناشی از سمیت تحریکی بر اثر تزریق N-methyl-D-aspartate (NMDA) در نورون‌های کولینرژیک قاعده‌ی مغز جلویی در موش‌های صحرایی نوزاد می‌گردد (۳۱). همچنین DHA موجب تقویت القای پاسخ ناشی از NMDA در نورون‌های پیرامیدال قشر مغز موش‌های صحرایی می‌گردد (۳۲) و پاسخ‌های نورون‌های گابارژیک را در جسم سیاه کاهش می‌دهد (۳۳) که نتایج فوق همسو با نتایج ما در مطالعه‌ی حاضر هستند. بنابراین در این کار پژوهشی نیز به نظر می‌رسد که بعد از القای مدل آلزایمر به روش تخریب الکتریکی NBM که در آن بخش عمده‌ای از نورون‌های کولینرژیک قاعده‌ی مغز جلویی حذف می‌گردند احتمالاً DHA از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش فعالیت گلوتاماتون ردوکتاز، افزایش رشد نوریت، اثرات محافظت کننده‌ی عصبی، افزایش فعالیت سیناپسی گلوتامات، افزایش سطوح خارج سلولی استیل کولین، حفظ فعالیت ChAT و جلوگیری از دژنراسیون سیستم‌های کولینرژیک موجب افزایش یادگیری فضایی می‌گردد. در این مطالعه سطوح استیل کولین و همچنین میزان بیان گیرنده‌های کولینرژیک موسکارینی و نیکوتینی در هیپوکامپ و قشر مغز بررسی نشده

صحرائی نر بالغ موجب بهبود یادگیری فضایی در دستگاه ماز Y شکل می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دکتری خانم نسترن زمانی می‌باشد، بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت همکاری و مساعدت در انجام این پروژه علمی-پژوهشی اعلام می‌دارند.

References

- 1- Rabieia Z, Hojjati MR, Rafieian-Kopaeiaa M, Alibabaeia Z. Effect of Cyperus rotundus tubers ethanolic extract on learning and memory in animal model of Alzheimer. *Biomedicine & Aging Pathology*. 2013; 3: 185-91.
- 2- Maczurek A, Hager K, Kenkies M, et al. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60: 1463-70.
- 3- Rabiei Z, Asgharzadeh S, Bigdeli MR. Medicinal Herbs Effective in the Treatment of the Alzheimer's Disease. *JBUMS*. 2015; 16: 51-9.
- 4- Belkouch M, Hachem M, Elgot A, et al. The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*. 2016; 38: 1-11.
- 5- Tanaka K, Farooqui AA, Siddiqi NJ, Alhomida AS, Ong WY. Effects of Docosahexaenoic Acid

است که پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود.

نتیجه‌گیری

DHA یک مکمل غذایی با عملکردهای متنوع است که از طریق فرایندهای ضد التهابی، ضد استرسی و تعدیل در بیان ژن‌های آپوپتوزی موجب محافظت عصبی در بسیاری از مدل‌ها می‌گردد. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهند که تزریق حاد داخل صفاقی DHA در دقیقه‌ی ۳۰ پس از القای مدل آلزایمر به صورت وابسته به مقدار در موش‌های

- on Neurotransmission. *Biomol Ther*. 2012; 20: 152-7.
- 6- Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, et al. Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. *Clinica Chimica Acta*. 2006; 364: 91-112.
- 7- Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, Bégin M, Féart C, Barberger-Gateau P. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res*. 2009; 48: 239-56.
- 8- Calon F, Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007; 77: 287-93.
- 9- Hashimoto M, Hossain S. Neuroprotective and Ameliorative Actions of Polyunsaturated Fatty Acids Against Neuronal Diseases: Beneficial Effect of Docosahexaenoic Acid on Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Sci*. 2011; 116: 150-62.

- 10- Moreira P, Zhu X, Liu Q, et al. Compensatory responses induced by oxidative stress in Alzheimer disease. *Biol Res.* 2006; 39: 7-13.
- 11- Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* 2000; 19: 1784-93.
- 12- Pan HC, Kao TK, Ou YC, et al. Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. *J Nutr Biochem.* 2009; 20: 715-25.
- 13- Berman DR, Liu YQ, Barks J, Mozurkewich E. Docosahexaenoic acid confers neuroprotection in a rat model of perinatal hypoxia-ischemia potentiated by Escherichia coli lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 202: 469. e1-6.
- 14- Ashkavandi S, Moazedi AA, Semnanian S, Eshagh-Harooni H, Mohammadi T, Pourmehdi-Boroujeni M. The effect of methylprednisolone on spatial learning and memory in adult male rats using an experimental model of Alzheimer's disease. *Feyz.* 2015; 19: 102-10.
- 15- Hoveida R, Moazedi AA, Rasekh AR. The effect of intra-Hippocampal CA1 area injection of Estradiol Benzoate on the spatial learning and memory in adult male rats. *Modares J Med Sci.* 2005; 7: 115-24.
- 16- Abraham IM, Koszegi Z, Tolod-Kemp E, Szego EM. Action of estrogen on survival of basal forebrain cholinergic neurons: Promoting amelioration. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 1: S104-12.
- 17- 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 Alzheimers Disease. *Iran J Pharm Res.* 2015; 14: 1197-206.
- 18- Dabir N, Moazedi AA, Haghparast A, Khajepour L, Akhoond M. Effects of Estrogen Therapy on Cognitive Performance Deficit Induced by Nucleus Basalis Magnocellularis Lesion: Animal Model of Alzheimer's Disease. *J Isfahan Med Sch.* 2016; 34: 1-10.
- 19- Goshadrou F. Modified sensory processing in the barrel cortex of the Rat model of Alzheimer's disease. *J Gorgan Uni Med Sci.* 2011; 13: 16-25.
- 20- Figueroa JD, Cordero K, Baldeosingh K, et al. Docosahexaenoic acid pretreatment confers protection and functional improvements after acute spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma.* 2012; 29: 551-66.
- 21- Hong SH, Belayev L, Khoutorova L, Obenaus A, Bazan NG. Docosahexaenoic acid confers enduring neuroprotection in experimental stroke. *J Neurol Sci.* 2014; 338: 135-41.
- 22- Berman DR, Mozurkewich E, Liu Y, Barks J. Docosahexaenoic acid pretreatment confers neuroprotection in a rat model of perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 200: 305. e1-6.
- 23- Palacios-Pelaez R, Lukiw WJ, Bazan NG. Omega-3 essential fatty acids modulate initiation

- and progression of neurodegenerative disease. *Mol Neurobiol*. 2010; 41: 367-74.
- 24- Jiang LH, Shi Y, Wang LS, Yang ZR. The influence of orally administered docosahexaenoic acid on cognitive ability in aged mice. *J Nutr Biochem*. 2009; 20: 735-41.
- 25- Kim HY, Spector AA, Xiong ZM. A synaptogenic amide N-docosahexaenylethanolamide promotes hippocampal development. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011; 96: 114-20.
- 26- Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, et al. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem*. 2002; 81: 1084-91.
- 27- Robson LG, Dyllal S, Sidloff D, Michael-Titus AT. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurones throughout development and in aged animals. *Neurobiol Aging*. 2010; 31: 678-87.
- 28- Calderon F, Kim HY. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2004; 90: 979-88.
- 29- de Wilde MC, Penke B, van der Beek EM, Kuipers AA, Kamphuis PJ, Broersen LM. Neuroprotective effects of a specific multi-nutrient intervention against A β 42-induced toxicity in rats. *J Alzheimers Dis*. 2011; 27: 327-39.
- 30- Favreliere S, Perault MC, Huguet F, et al. DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 2003; 24: 233-43.
- 31- Högyes E, Nyakas C, Kiliaan A, Farkas T, Penke B, Luiten PG. Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. *Neuroscience*. 2003; 119: 999-1012.
- 32- Nishikawa M, Kimura S, Akaike N. Facilitatory effect of docosahexaenoic acid on N-methyl-D-aspartate responses in pyramidal neurons of rat cerebral cortex. *J Physiol*. 1994; 475: 83-93.
- 33- Hamano H, Nabekura J, Nishikawa M, Ogawa T. Docosahexaenoic acid reduces GABA response in substantia nigra neuron of rat. *J Neurophysiol*. 1996; 75: 1264-70.

The Effect of Docosahexaenoic Acid on Spatial Learning and Memory in Adult Male Rats Model of Alzheimer's Disease

Zamani N¹, Moazedi AA¹, Afarinesh Khaki MR², Pourmehdi Boroujeni M³

¹Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

²Cognitive Research Center, Kerman University of Medical Sciences Sciences, Kerman, Iran.

³Dept. of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Corresponding Author: Zamani N, Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

E-mail: Na_zamani2000@yahoo.com

Received: 19 Jun 2017 **Accepted:** 27 Aug 2017

Background and Objective: Docosahexaenoic acid (DHA) is the major polyunsaturated fatty acid in the brain and a structural component of neuronal membranes. The present study aimed to examine the effect of DHA on spatial learning and memory in an electrical obliteration of nucleus basalis magnocellularis (NBM) model of Alzheimer's disease.

Materials and Methods: In this study 56 adult male Wistar rats were divided into eight groups: control, lesion (which received bilateral electrical lesions of the NBM), sham (the electrode was entered into the NBM with no lesion), lesion + DHA (0.1, 1, 2.5 and 5 mg/kg; ip) and Vehicle (lesion + Sesame Oil 0.2mL). After one week, the rats were trained to perform the Y-maze task for five days. Twenty-five days after training, a retention test was performed to determine long-term memory.

Results: Bilateral NBM lesion reduced spatial learning in comparison with control and sham groups ($P<0.001$). No effect on spatial learning was seen in the vehicle group compared with the lesion group. Treatment with DHA in the following groups; lesion + DHA 1mg/kg ($P<0.05$), lesion + DHA 2.5mg/kg ($P<0.01$), lesion + DHA 5mg/kg ($P<0.01$), significantly improved spatial learning. Moreover, no significant difference was observed between the results on the 5th day of training and memory retention on the 30th day.

Conclusion: From the results of this study, it can be concluded that Docosahexaenoic acid improves spatial learning defects in an electrical lesion of NBM model of Alzheimer's disease in a dose-dependent manner.

Keywords: Docosahexaenoic acid, Spatial learning, Nucleus basalis of magnocellularis, Alzheimer's disease