



The Effect of Cholesterol and Simvastatin on Passive Avoidance Memory of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Zeinab Farasati¹, Seyed Reza Fatemi Tabatabaei^{1*}, Ali Shahriari², Ali Reza Sarkaki³

1. Dept. Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Dept. Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3. Physiology Research Center, Ahvaz Jondishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: 30 Jan 2012

Accepted: 10 June 2012

Abstract

Introduction: Cholesterol has different effects on memory, and diabetes caused adverse effect on cognition. Since there is not enough evidence regarding the effect of cholesterol on memory of diabetic animals, the effects of cholesterol and simvastatin on the passive avoidance memory of diabetic rat were studied.

Methods: The study was done on 60 male Wistar rats (180 ± 20 g). Diabetes was induced by i.p. injection of 65 mg/kg streptozotocin. The animals in diabetic cholesterol, diabetic simvastatin and diabetic cholesterol-simvastatin groups, were treated by 2% cholesterol in diet, daily gavage of 5 mg/kg simvastatin, and concomitant treatment of cholesterol and simvastatin, respectively. The avoidance memory of the rats of each group was measured using shuttle box apparatus 4 weeks later. Also, the cholesterol level of hippocampus was measured.

Results: Diabetes had no effects on working memory, but reduced step through latency time during test session. Treatment by cholesterol, simvastatin and cholesterol-simvastatin improved passive avoidance memory in diabetic rats, especially in cholesterol-simvastatin group compared to non-treated diabetic control group. The cholesterol level of hippocampus increased in diabetic cholesterol-simvastatin group compared to other groups ($p < 0.05$).

Conclusion: Administration of cholesterol and simvastatin for four weeks protected the diabetic rats against diabetes-induced cognition impairment, yet their combination produced more improvement. Our data suggest that inhibition of endogenous cholesterol synthesis may improve memory of diabetic rats.

Key words: diabetes, cholesterol, simvastatin, avoidance memory, rat

* Corresponding author e-mail: fatemi_r@scu.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر مصرف خوراکی کلسترول و سیمواستاتین بر حافظه‌ی اجتنابی غیر فعال موش‌های سفید بزرگ دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

زینب فراستی^۱، سیدرضا فاطمی طباطبایی^{۱*}، علی شهریاری^۲، علیرضا سرکاک^۳

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۳. مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز

پذیرش: ۲۱ خرداد ۹۱

دریافت: ۱۰ بهمن ۹۰

چکیده

مقدمه: کلسترول دارای اثرات متفاوتی بر حافظه است ولی دیابت بر یادگیری و حافظه اثر سوء دارد. از آنجایی که مطالعه کافی در خصوص اثر کلسترول بر حافظه حیوانات دیابتی صورت نگرفته است، لذا در این مطالعه اثر مصرف خوراکی کلسترول و سیمواستاتین بر یادگیری و حافظه احترازی غیرفعال در موش‌های سفید بزرگ دیابتی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: مطالعه روی ۶۰ سر موش سفید بزرگ نر بالغ نژاد ویستار (۱۸۰±۲۰ گرم) انجام شد. دیابت با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۶۵ mg/kg) القا شد. حیوانات گروه‌های دیابتی کلسترول، دیابتی سیمواستاتین و دیابتی کلسترول-سیمواستاتین به ترتیب توسط ۲٪ کلسترول در جیره، گاواژ ۵ mg/kg سیمواستاتین و تجویز هر دو مورد به مدت ۴ هفته تحت تیمار قرار گرفتند. سپس حافظه احترازی حیوانات توسط دستگاه شاتل باکس مورد ارزیابی قرار گرفت و مقدار کلسترول هیپوکامپ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: دیابت تأثیر معنی‌داری بر حافظه کارکردی حیوانات نداشت ولی سبب اختلال در حافظه احترازی غیرفعال آنها گردید. تیمار با کلسترول، سیمواستاتین و کلسترول-سیمواستاتین سبب بهبود حافظه احترازی غیرفعال در موش‌های سفید بزرگ دیابتی تحت تیمار خصوصاً گروه دیابتی کلسترول-سیمواستاتین نسبت به گروه‌های دیابتی درمان نشده گردید. مقدار کلسترول در هیپوکامپ حیوانات دیابتی تیمار شده با کلسترول و سیمواستاتین به صورت توأم، بیشتر از گروه‌های دیگر بود ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تجویز کلسترول و سیمواستاتین به مدت ۴ هفته در حیوانات دیابتی سبب حفاظت از اختلالات شناختی ناشی از دیابت می‌شود و تجویز توأم آنها باعث بهبود بیشتر می‌شود. بر اساس نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌شود که کاهش تولید کلسترول آندوژن در کل بدن باعث بهبود حافظه حیوانات دیابتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: دیابت، کلسترول، سیمواستاتین، حافظه احترازی، موش سفید بزرگ

مقدمه

مرکزی و محیطی رخ می‌دهد [۲، ۲۱]. در افراد دیابتی حافظه و یادگیری، توانایی حل مسائل، سرعت انجام حرکات مهارتی، ذهنی و حرکات پیچیده فیزیکی، استنباط و درک فرد درباره مسائل دچار صدمه می‌شود [۲۶]. دیابت همچنین با عوارض متعددی از جمله دیس لیپیدمی و افزایش کلسترول همراه است [۳۴].

دیابت (Diabetes) یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیکی است که با عوارض متعددی در اندام‌های گوناگون همراه است. عوارض نورولوژیک متعددی ناشی از دیابت در دستگاه عصبی

لیپیدها شامل کلسترول، اسفنگولیپیدها، و فسفولیپیدها از جمله اجزای مهم تشکیل دهنده ساختمان مغز هستند. مغز

fatemi_r@scu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

روش اصلی برای درمان کلسترول بالا در بیماری‌های قلبی-عروقی، استفاده از استاتین‌های مهارکننده ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوکوتاریل-کوآنزیم A (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A: HMG-CoA) ردوکتاز است. استاتین‌ها مهم‌ترین عواملی هستند که در درمان هیپرلیپیدمی بکار می‌روند و در پایین آوردن کلسترول بسیار موفق بوده‌اند [۱۶، ۲۴] و در چندین مورد کاهش سطح کلسترول با استفاده از استاتین‌ها در بهبود یادگیری و حافظه مؤثر بوده است [۳۵]. سیمواستاتین مهار کننده فعالیت HMG-CoA ردوکتاز است و استاتینی است که توانایی عبور از سد خونی- مغزی را دارد [۲۵].

با توجه به اینکه دیابت و کلسترول بر عملکرد سیستم عصبی، یادگیری و حافظه اثر می‌گذارند، و گزارشات موجود در خصوص اثرات کلسترول در موارد متعددی متناقض هستند و با در نظر گرفتن تأثیر دیابت بر متابولیسم کلسترول، در این مطالعه اثر استفاده خوراکی از کلسترول و سیمواستاتین (به عنوان مهار کننده‌های تولید کلسترول) بر یادگیری و حافظه‌ی اخترازی موش‌های سفید بزرگ دیابتی شده، و مقدار کلسترول هیپوکامپ مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از موش‌های سفید بزرگ نر نژاد ویستار در محدوده وزنی (180 ± 20) خریداری شده از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز استفاده شد. حیوانات در شرایط محیط حیوان خانه با دسترسی کافی به آب و غذا، دمای 22 ± 2 درجه سانتیگراد و سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته قرار گرفتند. حیوانات به مدت یک هفته قبل از شروع کار در شرایط استراحت قرار گرفتند. در هر گروه ۱۰ حیوان قرار گرفت و در کل ۶۰ موش سفید بزرگ برای این مطالعه استفاده شد. در این مطالعه از استرپتوزوتوسین (STZ) و سیمواستاتین ساخت شرکت سیگما (Sigma chemical, st louis, MO, USA) و کلسترول ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد. موش‌های سفید بزرگ پس از القای دیابت، در گروه‌های کنترل (سالم)، دیابتی، گاوژ دیابتی، کلسترول دیابتی، سیمواستاتین دیابتی و کلسترول-

دارای غلظت بالایی از کلسترول در مقایسه با سایر اعضای بدن است [۷]. کلسترول جزئی ضروری از غشای سلولی است که از سد خونی مغزی عبور نمی‌کند و کلسترول مغز از تولید آن در این عضو ناشی می‌شود [۳۵]. در موش‌های نوزاد میزان تولید و به کارگیری کلسترول مغزی با هم برابرند و بر اساس شواهد کلسترولی از لیپوپروتئین‌های پلاسما دریافت نمی‌شود ولی از سن سه هفتگی به بعد، میزان تولید از میزان به کار گیری پیشی می‌گیرد، بنابراین در این مرحله کلسترول اضافی باید به طریقی از سد خونی- مغزی خارج شود [۳۲]. در نوروها با تبدیل کلسترول به ۲۴-هیدروکسی کلسترول، این ماده وارد مسیری می‌شود که بیشتر کلسترول مغزی از طریق آن دفع می‌شود [۵]. در مغز ۲۴-هیدروکسی کلسترول همانند پیامی باعث القای ترشح یک ذره لیپوپروتئین مانند از آستروسیت‌ها می‌شود که دارای apo E است [۱]. خروج وابسته به apo E کلسترول از سلول‌های آستروسیتوما احتمالاً توسط ناقل A1 و G1 کاست متصل به ATP (ABCA1 و ABCG1) کنترل می‌شود، چرا که بیان این ناقل‌ها نیز توسط ۲۴-هیدروکسی کلسترول افزایش می‌یابد [۱]. چگونگی خروج ۲۴-هیدروکسی کلسترول از نوروها هنوز درک نشده است ولی این متابولیت در سلول‌های نوروبلاستوما باعث تنظیم افزایشی ABCG4 می‌شود که بیان کننده نقش احتمالی آن در این انتقال است [۱].

یکی از عملکردهای کلسترول تنظیم سیالیت غشا است، چرا که سیالیت غشاء را کاهش داده و باعث افزایش استحکام غشا می‌شود [۱۴]. گزارشات متعددی در خصوص تأثیر سطح کلسترول محیطی بر حافظه و یادگیری تاکید دارند، که معمولاً این اثرات را به انعکاس سیگنال‌های محیطی در CNS نسبت می‌دهند. در خصوص تأثیر کلسترول بر یادگیری و حافظه اختلاف نظرهای فراوانی وجود دارد، به طوری که برخی از گزارش‌ها آن را مخل دانسته ولی سایرین بر تأثیر مثبت و یا بی اثر بودن آن بر یادگیری و حافظه تاکید دارند [۳۵]. در خصوص تأثیر کلسترول بر مغز دیابتی اطلاعات کافی در دسترس نیست. ویدونگ و همکاران نشان دادند جیره دارای کلسترول بالا در کوتاه مدت به عملکرد شناختی موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان آسیب می‌رساند و باعث افزایش کلسترول هیپوکامپ می‌شود [۴۳].

قسمت بسته شده و ۳۰ ثانیه بعد حیوان از قسمت تاریک خارج شد. دو دقیقه بعد این کار تکرار شد. در مرحله اکتساب (Acquisition)، که ۳۰ دقیقه بعد انجام شد، موش‌های سفید بزرگ در قسمت روشن قرار گرفتند و پس از ۵ ثانیه درب بین دو قسمت باز شد، سپس مدت زمان تأخیر تا ورود کامل به قسمت تاریک ثبت شد. بعد از ورود کامل (عبور اندام خلفی از درب گیوتینی)، درب بین دو قسمت بسته شد و یک شوک الکتریکی با شدت ۱ میلی آمپر به مدت ۲ ثانیه به میله‌های فلزی کف محفظه وارد شد. حیوان ۳۰ ثانیه بعد، از قسمت تاریک خارج و مجدداً این روند پس از ۲ دقیقه تکرار شد. در صورتی که موش تا ۱۲۰ ثانیه از ورود به قسمت تاریک اجتناب می‌کرد، آموزش به پایان می‌رسید. به این ترتیب، تعداد شوک‌هایی که هر حیوان قبل از اجتناب به ورود به محفظه تاریک دریافت می‌کرد به عنوان شاخصی از حافظه کارکردی محسوب شد. جهت انجام آزمون حافظه (Retention)، ۲۴ ساعت پس از آزمون یادگیری، هر موش سفید بزرگ در قسمت روشن قرار گرفت و پس از ۵ ثانیه درب بین دو قسمت باز و زمان تأخیر در ورود کامل به قسمت تاریک، و زمان باقی ماندن در محفظه تاریک اندازه‌گیری و بین گروه‌ها مقایسه شد. در صورتی که حیوانی تا ۳۰۰ ثانیه از ورود به قسمت تاریک اجتناب می‌کرد، آزمون خاتمه می‌پذیرفت. همچنین اگر بیش از ۳۰۰ ثانیه در قسمت تاریک باقی می‌ماند از قسمت تاریک خارج شده و به قفس منتقل می‌شد [۲۲، ۳۸].

نمونه‌گیری و اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی:

پس از آسان‌کشی حیوانات با استشمام کلروفرم، ابتدا خون‌گیری از قلب انجام شد و پس از خارج نمودن مغز از جمجمه، تا زمان اندازه‌گیری کلسترول در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. برای اندازه‌گیری کلسترول، استخراج لیپید به روش Hara & Radin انجام شد [۴] و سپس کلسترول به روش آنزیمی اندازه‌گیری شد [۴۳] در این مطالعه مقدار گلوکز خون در پایان توسط کیت گلوکز (شرکت پارس آزمون) اندازه‌گیری شد. جذب‌های نوری به منظور اندازه‌گیری مقادیر کلسترول و قند خون توسط دستگاه فتومتر (Convergys 100) قرائت شدند.

روش آماری: تمام داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین (SEM) نشان داده شده است. برای تعیین

سیمواسستاتین دیابتی، قرار گرفتند. حیوانات گروه‌های دیابتی با تزریق داخل صفاقی ۶۵ mg/kg داروی استرپتوزوتوسین حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با PH برابر با ۴/۵ دیابتی شدند و یک هفته بعد از آن با سنجش گلوکز خون توسط دستگاه گلوکومتر، آنهایی که میزان گلوکز خونشان بیشتر از ۳۰۰ mg/dl بود، به عنوان حیوانات دیابتی در مطالعه استفاده شدند. حیوانات گروه‌های سیمواسستاتین دیابتی و کلسترول-سیمواسستاتین دیابتی، توسط لوله معدی (گاواژ) به مدت ۴ هفته با ۵ mg/kg سیمواسستاتین [۳۱] تحت تیمار قرار گرفتند. موش‌های سفید بزرگ گروه گاواژ دیابتی، در طی این مدت حجم مشابهی از سرم فیزیولوژی را مورد استفاده قرار دادند. به خوراک موش‌های سفید بزرگ گروه‌های کلسترول دیابتی و کلسترول-سیمواسستاتین دیابتی، در طی این مدت ۲٪ کلسترول [۸] اضافه شد. به این منظور ابتدا غذای مورد استفاده در تمامی گروه‌ها آسیاب شد و به هر ۹۸ گرم غذای آسیاب شده در گروه‌های کلسترول دیابتی و کلسترول-سیمواسستاتین دیابتی دو گرم کلسترول اضافه و به خوبی مخلوط گردید. غذا به صورت پودر در ظرف‌های شیشه‌ای مخصوصی که به منظور کاهش هدر رفتن غذای آسیاب شده طراحی شده بود در تمامی گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در انتهای چهار هفته، موش‌های سفید بزرگ تمامی گروه‌ها به منظور یادگیری در دستگاه شاتل باکس آموزش داده شدند و پس از ۲۴ ساعت، حافظه اجتنابی غیر فعال در آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت پس از آسان‌کشی حیوانات و خارج نمودن هیپوکامپ، مقدار کلسترول در بافت هیپوکامپ اندازه‌گیری شد.

آزمون یادگیری و حافظه احترازی غیرفعال:

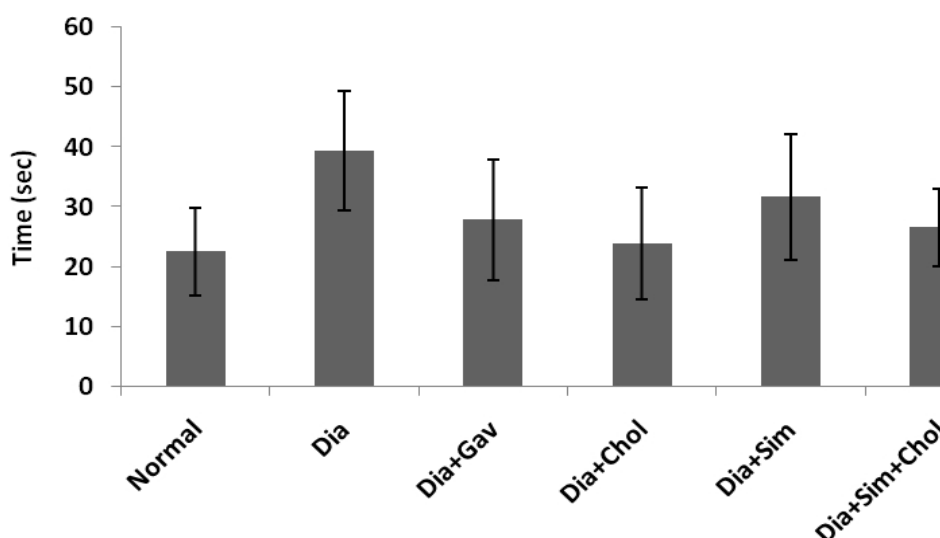
دستگاه مورد استفاده، دستگاه شاتل باکس (شرکت برج صنعت) بود. وسیله مورد استفاده از یک جعبه پلکسی گلاس شامل دو قسمت روشن و تاریک هر یک به ابعاد ۳۰×۲۰×۲۰ سانتی متر ساخته شده بود. این دو بخش توسط یک درب گیوتینی به هم مرتبط هستند. کف دو بخش از میله‌های فلزی پوشیده شده که شوک الکتریکی از طریق این میله‌ها به پای حیوان اعمال می‌شود. در ابتدا برای آشنایی حیوان با دستگاه، هر حیوان در قسمت روشن قرار گرفت و پس از ۵ ثانیه درب بین دو قسمت باز شد، طبق تمایل طبیعی به محیط تاریک در موش سفید بزرگ، حیوان به قسمت تاریک می‌رود که سریعاً درب بین دو

تفاوت بین گروه‌ها از آزمون آماری ANOVA یک طرفه و به دنبال آن از تست Tukey استفاده شد. به منظور مقایسه هفتگی وزن در درون هر گروه، از آزمون اندازه گیری تکراری استفاده شد. در تمامی موارد $P < 0.05$ به عنوان سطح آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

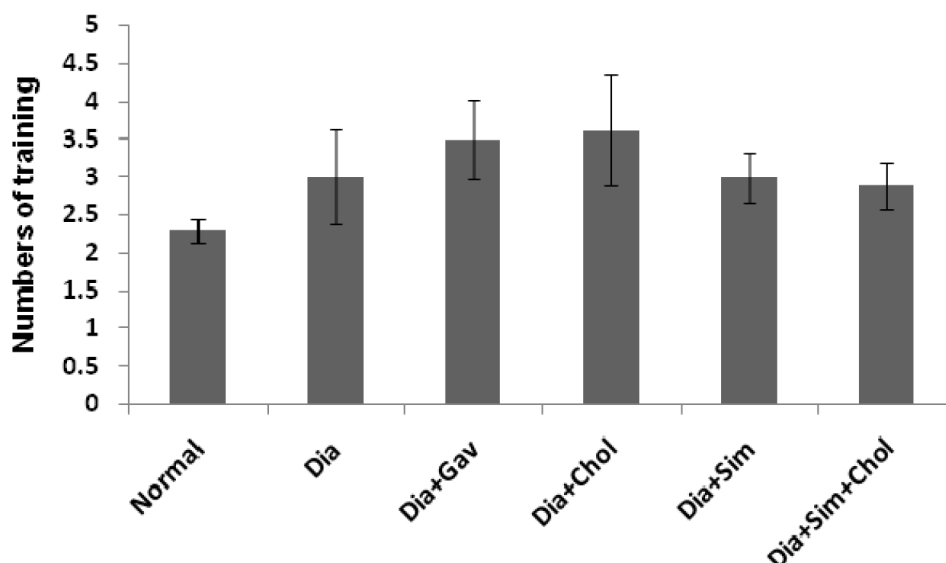
یافته ها

اثر دیابت و تیمارهای صورت گرفته بر آزمون یادگیری و

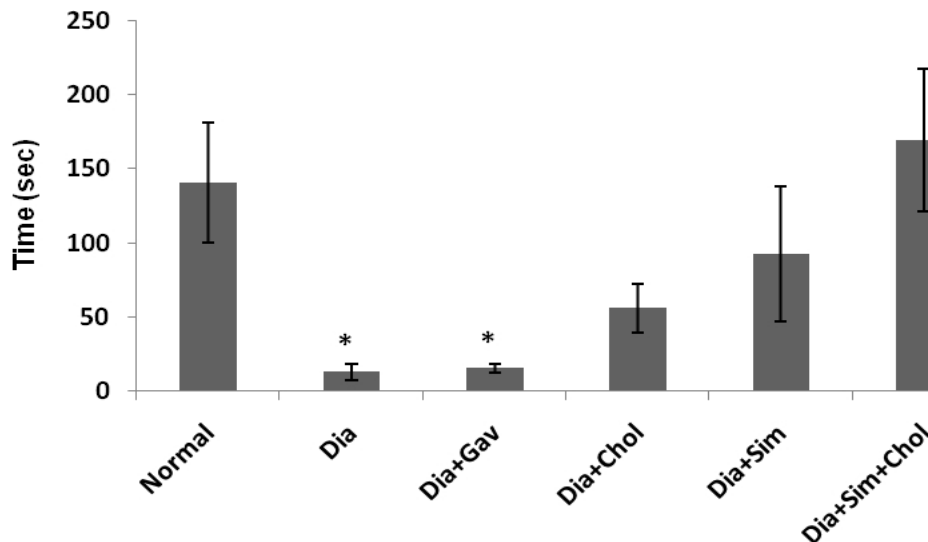
حافظه اجتنابی غیر فعال: قبل از دریافت شوک، مدت زمان تأخیر در ورود به محفظه تاریک بین گروه‌های دیابتی و کنترل سالم تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$) (شکل ۱). تعداد دفعات آموزش (شوک) جهت یادگیری برای اجتناب از ورود به محفظه تاریک، در گروه سالم کمتر از سایر گروه‌ها بود ولی اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) (شکل ۲). جلسه آزمون، مدت زمان تأخیر در ورود به تاریکی در زمان به یاد آوری در گروه‌های دیابتی ($12/29 \pm 5/65$) و گاوژ دیابتی ($14/89 \pm 3/03$) در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم



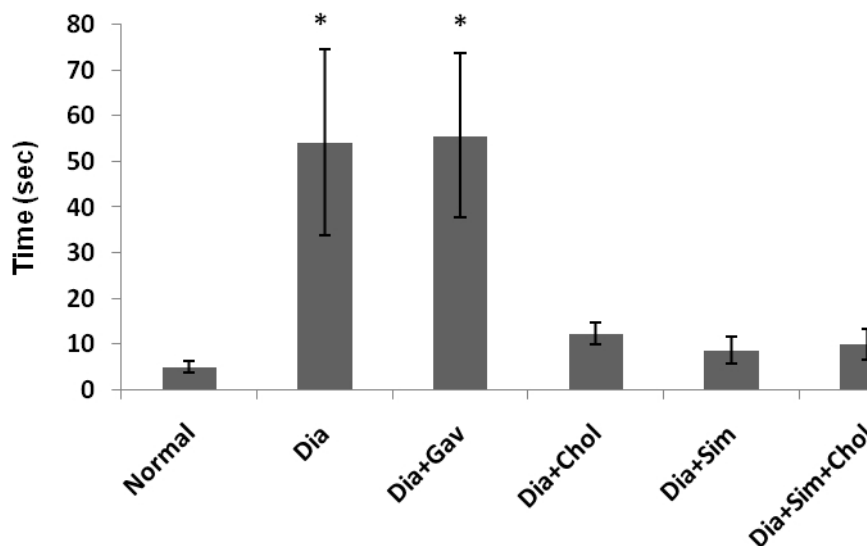
شکل ۱- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار مدت زمان تأخیر در ورود به تاریکی قبل از اعمال شوک. Normal: گروه سالم؛ Dia: گروه دیابتی؛ Dia+Gav: گروه گاوژ دیابتی؛ Dia+Chol: گروه کلسترول دیابتی؛ Dia+Sim: گروه سیمواستاتین دیابتی؛ Dia+Sim+Chol: گروه کلسترول- سیمواستاتین دیابتی. در آزمون آماری ANOVA اختلاف گروه‌های مورد مطالعه با یکدیگر معنی‌دار نشد.



شکل ۲- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار تعداد دفعات آموزش جهت یادگیری. Normal: گروه سالم؛ Dia: گروه دیابتی؛ Dia+Gav: گروه گاوژ دیابتی؛ Dia+Chol: گروه کلسترول دیابتی؛ Dia+Sim: گروه سیمواستاتین دیابتی؛ Dia+Sim+Chol: گروه کلسترول- سیمواستاتین دیابتی. در آزمون آماری ANOVA اختلاف گروه‌های مورد مطالعه با یکدیگر معنی‌دار نشده است.



شکل ۳- مقایسه میانگین±خطای معیار مدت زمان تأخیر در ورود به تاریکی در زمان به یادآوری. Normal: گروه سالم؛ Dia: گروه دیابتی؛ Dia+Gav: گروه گاوژ دیابتی؛ Dia+Chol: گروه کلسترول دیابتی؛ Dia+Sim: گروه سیمواستاتین دیابتی؛ Dia+Sim+Chol: گروه کلسترول- سیمواستاتین دیابتی. بر اساس آزمون آماری ANOVA و پس آزمون توکی بین گروه‌های ستاره‌دار و بدون ستاره اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.05$).

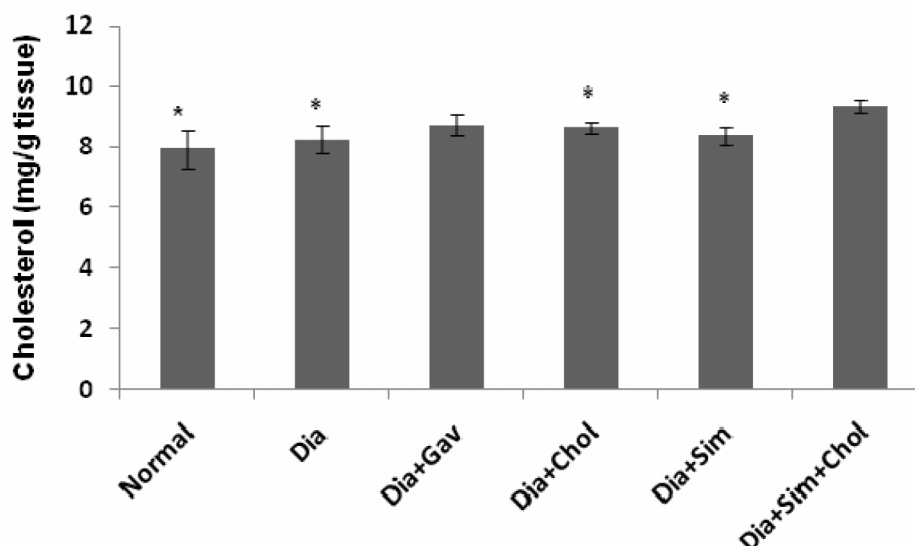


شکل ۴- مقایسه میانگین±خطای معیار مدت زمان ماندن در تاریکی در زمان به یاد آوری. Normal: گروه سالم؛ Dia: گروه دیابتی؛ Dia+Gav: گروه گاوژ دیابتی؛ Dia+Chol: گروه کلسترول دیابتی؛ Dia+Sim: گروه سیمواستاتین دیابتی؛ Dia+Sim+Chol: گروه کلسترول- سیمواستاتین دیابتی. بر اساس آزمون آماری ANOVA و پس آزمون توکی بین گروه‌های ستاره‌دار و بدون ستاره اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.05$).

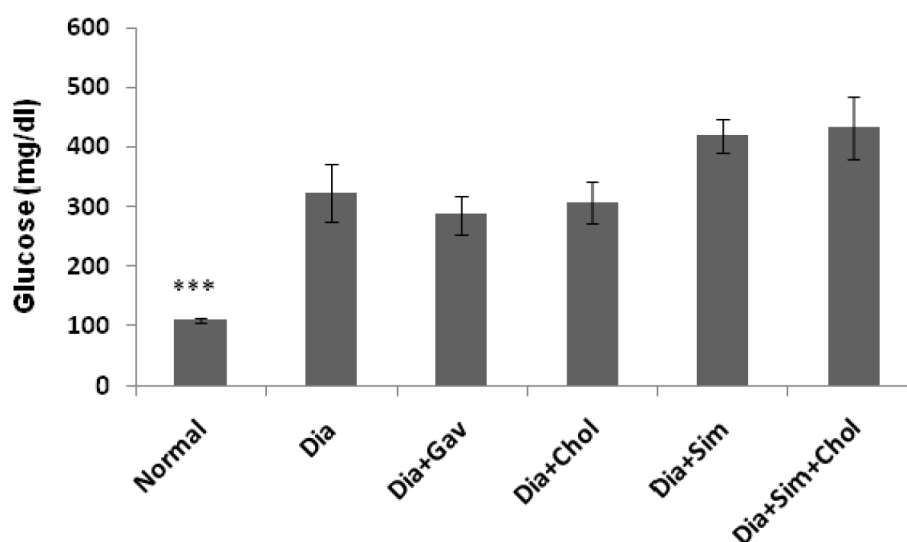
زمان تأخیر در ورود به تاریکی و مدت زمان ماندن در تاریکی در زمان به یادآوری بین گروه سالم و گروه‌های دیابتی تیمار شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، که نشان دهنده اثر بهبود دهنده‌ی تیمارهای صورت گرفته بر اختلالات حافظه ناشی از دیابت می‌باشد (اشکال ۳ و ۴).

اثر دیابت و تیمارهای صورت گرفته بر وزن بدن و مقدار کلسترول هیپوکامپ و گلوکز پلاسما: میزان کلسترول هیپوکامپ در گروه دیابتی کلسترول-سیمواستاتین به صورت

(140.7 ± 40.7)، کلسترول دیابتی (56 ± 16.5)، سیمواستاتین دیابتی (92.12 ± 45.6) و کلسترول-سیمواستاتین دیابتی (169.4 ± 47.8) کاهش ($P < 0.05$)، و همچنین مدت زمان باقی ماندن در تاریکی آنها (دیابتی: 54.14 ± 20.41)، گاوژ دیابتی: 55.7 ± 18) در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم (5 ± 1.3)، کلسترول دیابتی (12.43 ± 2.4)، سیمواستاتین دیابتی (8.62 ± 2.9) و کلسترول-سیمواستاتین دیابتی (10.3 ± 3.3) افزایش یافت ($P < 0.05$) (اشکال ۳ و ۴). همچنین در مدت



شکل ۵- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار مقدار کلسترول در هر گرم از هیپوکامپ. Normal: گروه سالم؛ Dia: گروه دیابتی؛ Dia+Gav: گروه گاواژ دیابتی؛ Dia+Chol: گروه کلسترول دیابتی؛ Dia+Sim: گروه سیمواستاتین دیابتی؛ Dia+Sim+Chol: گروه کلسترول-سیمواستاتین دیابتی. بر اساس آزمون آماری ANOVA و پس آزمون توکی بین گروه‌های ستاره‌دار و گروه کلسترول-سیمواستاتین دیابتی اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.05$).



شکل ۶- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار غلظت گلوکز ناشتا در پایان مطالعه. Normal: گروه سالم؛ Dia: گروه دیابتی؛ Dia+Gav: گروه گاواژ دیابتی؛ Dia+Chol: گروه کلسترول دیابتی؛ Dia+Sim: گروه سیمواستاتین دیابتی؛ Dia+Sim+Chol: گروه کلسترول-سیمواستاتین دیابتی. بر اساس آزمون آماری ANOVA و پس آزمون توکی بین گروه ستاره‌دار و گروه‌های بدون ستاره اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.001$).

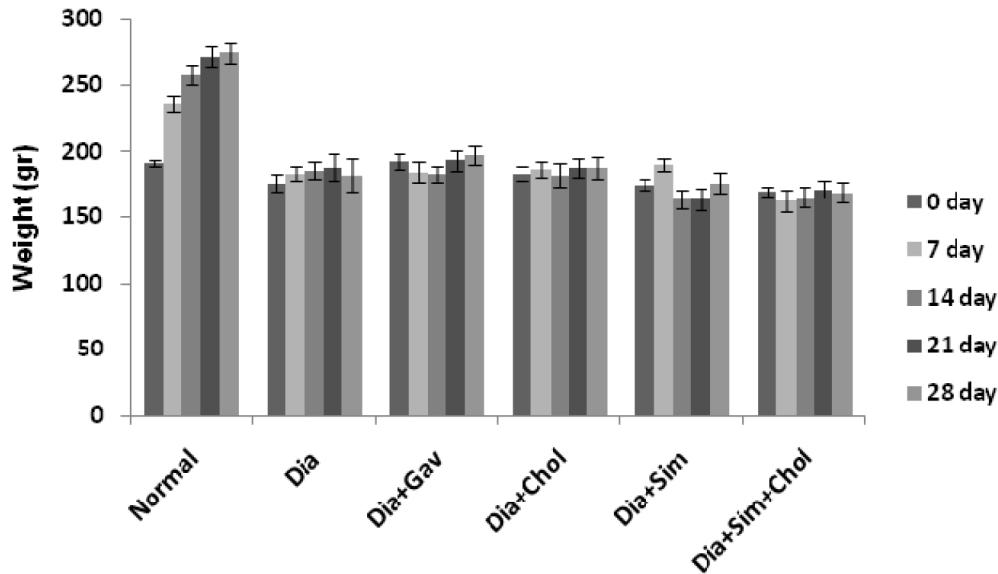
دیابتی مشاهده نشد (شکل ۷).

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که تجویز خوراکی کلسترول و سیمواستاتین به تفکیک و یا به طور همزمان، سبب بهبود حافظه احترازی غیرفعال در موش‌های سفید بزرگ دیابتی تحت درمان گردید. در واقع افزایش تأخیر در ورود به محفظه

معنی‌داری بیشتر از گروه‌های کنترل سالم، دیابتی، سیمواستاتین دیابتی و کلسترول دیابتی بود ($P < 0.05$)، ولی با گروه گاواژ دیابتی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۵).

گلوکز پلاسمایی پایان دوره در گروه سالم ($108/5 \pm 4/65$) به صورت معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌های دیابتی ($352/58 \pm 39/31$) بود ($P < 0.001$) (شکل ۶). وزن بدن در گروه سالم به صورت هفتگی یک روند رو به افزایش داشت ($P < 0.05$)، در حالی که این روند در هیچ یک از گروه‌های



شکل ۷- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار وزن هفتگی موش‌های سفید بزرگ در گروه‌های تحت مطالعه. Normal: گروه سالم؛ Dia: گروه دیابتی؛ Dia+Gav: گروه گاوژ دیابتی؛ Dia+Chol: گروه کلسترول دیابتی؛ Dia+Sim: گروه سیمواستاتین دیابتی؛ Dia+Sim+Chol: گروه کلسترول - سیمواستاتین دیابتی. آزمون آماری اندازه‌گیری تکراری نشان داد که تغییرات وزن در هفته‌های متوالی فقط در گروه کنترل سالم معنی دار است و در سایر گروه‌ها دارای اهمیت آماری نمی‌باشد ($P < 0.05$).

پیرتر افزایش دهد [۲۰].

در خصوص اثر کلسترول بر یادگیری و حافظه اطلاعات متناقضی وجود دارد و به نظر می‌رسد اثرات کلسترول پیچیده باشد [۲۹]. تقریباً تمامی کلسترول مغز، در داخل این عضو تولید می‌شود و مقدار بسیار اندک و یا هیچ کلسترولی از سد خونی مغزی وارد آن نمی‌شود. بنابراین مشخص نیست که کلسترول خوراکی تا چه حد می‌تواند کلسترول مغز را افزایش دهد [۲۹]. بر اساس برخی مطالعات یک جیره داری کلسترول بالا باعث بهبود حافظه در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود [۲۹]. جیره دارای کلسترول بالا حافظه را در خرگوش [۳۹] و موش‌های سفید بزرگ جوان افزایش داد [۲۹]. وست و همکاران نشان دادند که در افراد دارای سطوح بالاتر لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL-C) و کلسترول تام، عملکرد حافظه بهتر است [۴۲].

تجربیات انسانی به منظور بررسی اثر استاتین‌ها در کاهش پیشرفت خطر آلزایمر در حال انجام است، ولی به هر حال مشخص شده است که فواید استفاده بالینی از استاتین‌ها بیشتر از حدی است که فقط با کاهش کلسترول مورد انتظار باشد. پس این احتمال مطرح شده است که شاید فواید استاتین‌ها توسط سایر اثرات از قبیل بهبود فعالیت آندوتلیال، کاهش التهاب عروقی یا آنتی اکسیدان‌ها میانجیگری شود [۲۹].

تاریک و کاهش ماندن در آن نشان دهنده اثرات مثبت این تیمارها بر فرآیند حافظه می‌باشند [۳۷]. بهبود یادگیری و حافظه در اثر کلسترول و سیمواستاتین در چندین مورد گزارش شده است [۴۲، ۱۵]. در مطالعه‌ی ما موش‌های سفید بزرگ دیابتی دارای اختلال در حافظه اجتنابی نسبت به گروه سالم و گروه‌های کلسترول دیابتی، سیمواستاتین دیابتی و کلسترول - سیمواستاتین دیابتی بودند.

دیابت قندی بیماری مزمنی است که عوارض وسیع آن در نوروپاتی‌های محیطی و مرکزی در مدل‌های انسانی و حیوانی شناخته شده است [۳۶، ۱۳]. در مطالعه اخیر که از نوع اجتنابی غیرفعال بود میزان حافظه در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه سالم با کاهش همراه بود. البته در برخی مطالعات با استفاده از مدل اجتنابی غیر فعال [۱۰] همچنین با استفاده از روش‌های پیچیده‌تر مثل حافظه اجتنابی فعال، ماز T، و ماز آبی کاهش حافظه حیوانات دیابتی مورد تایید قرار گرفته است [۱۰]. یکی از پیامدهای بیماری دیابت افزایش استرس اکسیداتیو است که این موضوع با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی نشان داده شده است [۳۳]. استرس اکسیداتیو سطح کلسترول مغز را افزایش می‌دهد [۱۸، ۱۹]. نشان داده شده است که در موش‌های سفید بزرگ جوان استرس اکسیداتیو می‌تواند سطح کلسترول مغز را نسبت به موش‌های سفید بزرگ

به میزان ۱۰۰ mg/kg به مدت ۳ روز در موش سوری باعث تغییری در سطح کلسترول و ۲۴-هیدروکسی کلسترول قشر نشد ولی از میزان پیش سازهای کلسترول در مغز کاست [۴۰]. مقدار کلسترول مغزی به دنبال استفاده از ۵۰ mg/kg سیمواستاتین به مدت ۲۱ روز در موش سوری به میزان اندکی کاهش یافت ولی بیان ژن‌های متعددی از جمله گروهی از ژن-ها که در آپوپتوز نقش داشتند تحت تأثیر قرار گرفت، لذا گروهی از محققین اثرات ضد آلیزیمری استاتین‌ها را بیشتر ناشی از آثار دیگر آنها می‌دانند [۱۷]. همان‌گونه که مشخص است در مطالعه حاضر دوز مورد استفاده سیمواستاتین کمتر از مطالعات فوق بوده است. بنابراین هر چند دوز مورد استفاده در این مطالعه نتوانسته است مقدار کلسترول هیپوکامپ را در حد معنی داری کاهش دهد ولی همانند برخی مطالعات دیگر استفاده از این دوز دارای اثرات مثبت بر حافظه بوده است [۳۱]. بنا بر مطالعه‌ای که در موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان صورت گرفت مقدار کلسترول هیپوکامپ در اثر دیابت افزایش یافت [۴۳] ولی در مطالعه ما هرچند مقدار کلسترول گروه گاواژ دیابتی اندکی بالاتر از گروه کنترل بود ولی در مجموع دیابت تأثیر معنی‌داری بر آن نداشت.

یکی از نکات قابل توجه در مطالعه اخیر افزایش مقدار کلسترول هیپوکامپ در موش‌های سفید بزرگ گروه دیابتی است که به طور همزمان تحت تیمار با کلسترول و سیمواستاتین قرار گرفتند. در این خصوص لازم به ذکر است که استاتین‌ها مخصوصاً لواستاتین و سیمواستاتین از جمله موادی هستند که مستقیماً گلیکوپروتئین P (گروهی از ناقلین کاست متصل به ABC) را مهار می‌کنند [۴۱]. گلیکوپروتئین-های P برای اولین بار در سلول‌های تومور توصیف شدند که به عوامل مختلف ضد سرطان مقاوم بودند. گلیکوپروتئین P فقط در سلول‌های سرطانی بیان نمی‌شود، بلکه در طیف گسترده‌ای از بافت‌های طبیعی با عملکرد دفع (روده کوچک، کبد و کلیه) و در سدهای خونی همانند سد خونی-مغزی و جفت وجود دارد [۱۱]. گلیکوپروتئین P ممکن است به صورت فعال کلسترول را در غشاء سلول جابجا کند و مسئول توزیع مجدد کلسترول در غشاء سلول است، لذا به نظر می‌رسد که در تثبیت میکرو دومین‌های غنی از کلسترول و تنظیم جابجایی کلسترول در سلول نقش داشته باشد [۱۲]. متابولیسم و جابجایی

گزارشات قدیمی‌تر و آزمایشات بالینی وجود دارند که نشان می‌دهند استاتین تأثیر منفی بر روی شناخت دارد [۵، ۲۲]. همچنین شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد پایین آوردن کلسترول با استاتین، میزان کاهش شناخت در بیماران آلزایمری را کم می‌کند [۳، ۱۵]. Hagg و همکاران گزارش کردند که استاتین‌ها خطر بیماری آلزایمر را بدون توجه به اینکه آیا از سد خونی-مغزی عبور کرده‌اند یا نه کاهش می‌دهند [۱۵]. تعدادی از مطالعات حیوانی نشان دادند که استاتین‌ها می‌توانند یادگیری و حافظه را در جوندگان تسهیل کنند [۲۳]. Li نشان داد که سیمواستاتین می‌تواند یادگیری در ماز آبی را بهبود بخشد [۲۳]. کاهش سطح کلسترول با استفاده از استاتین‌ها در موارد چندی در بهبود یادگیری و حافظه مؤثر بوده است ولی همیشه مؤثر نبوده است. آن چیزی که از تمام این آزمایشات مشخص است اینست که کلسترول نقش اساسی در یادگیری و حافظه دارد و اختلال در سطح کلسترول، سنتز یا متابولیسم آن نتایج مشخصی را در بر دارد [۳۵]. مطالعات نشان داده‌اند که مقدار ۲۴-هیدروکسی کلسترول که در مغز از کلسترول تولید می‌شود، در بیماران آلزایمری افزایش می‌یابد [۳۰].

نکته حائز اهمیت در مطالعه ما اینست که هم کلسترول و هم سیمواستاتین باعث بهبود حافظه در حیوانات دیابتی شدند و استفاده توأم از آنها، بهبود حافظه را تقویت کرد. بنابراین به نظر می‌رسد شاید در روند طبیعی که کلسترول در بدن تولید می‌شود، در مسیر تولید، مولکول‌ها یا واسطه‌هایی آزاد شوند که باعث اختلال در فرآیندهای شناختی شوند و در این شرایط هم با تجویز کلسترول که منجر به کاهش تولید کلسترول آندوژن در کبد می‌شود، و هم با تجویز سیمواستاتین که تولید کلسترول را در این عضو کاهش می‌دهد، حافظه بهبود یافته است. هر چند ممکن است با توجه به عدم ورود کلسترول محیطی به CNS چنین وضعیتی فقط در محیط پیرامون CNS صادق باشد ولی به هر حال گزارشات متعددی بر تأثیر کلسترول محیطی بر حافظه و یادگیری تأکید دارند [۲۹، ۳۵، ۳۹، ۴۲، ۴۳].

در مطالعه حاضر استفاده از سیمواستاتین و کلسترول به تنهایی باعث تأثیر بر سطح کلسترول هیپوکامپ نشد، ولی استفاده توأم آنها سطح کلسترول را در مغز افزایش داد. در مطالعه تلی و همکاران (۲۰۰۶) استفاده خوراکی از سیمواستاتین

مطالعات سایر محققین به نظر می‌رسد اثرات کلسترول بر یادگیری و حافظه بسیار پیچیده باشد و هنوز نکات مبهم بسیار زیادی دارد. در این مطالعه استفاده از کلسترول، سیمواستاتین، و ترکیب آنها باعث بهبود حافظه در حیوانات دیابتی شد. با توجه به اینکه استفاده از تمامی این ترکیبات احتمالاً تولید کلسترول آندوژن را کم می‌کند، و با در نظر گرفتن اینکه به طور کلی تولید کلسترول در حیوانات دیابتی بالاتر از حیوانات سالم است، شاید در روند تولید کلسترول در بدن ترکیباتی تولید شود که منجر به این اختلالات شده است. به هر حال جهت تایید یا رد این نظر مطالعات تکمیلی ضروری است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه انجام این تحقیق را تقبل نمود اعلام می‌دارند.

کلسترول در مغز و خروج کلسترول اضافی از مغز تحت تأثیر اعضای مختلف خانواده ناقلین کاست متصل به ABC مثل ABCG1 و ABCA1 قرار می‌گیرد [۱]. دوز بالای سیمواستاتین در طی سه روز باعث تنظیم افزایشی بیان RNA پیامبر ABCA1 و HMG-CoA ردکناز در قشر مغز موش‌های سالم شد [۴۰]. نشان داده شده است که مهار ABCA1 توسط پروبوکول باعث افزایش کلسترول مغز می‌شود، بنابراین احتمالاً این ناقل ترشح مجدد کلسترول از مغز را میانجیگری کند [۶، ۲۷]. بر اساس مطالعات مذکور ABCA1 و گلیکوپروتئین P که در جابجایی کلسترول مغز دارای نقش اساسی هستند، تحت تأثیر سیمواستاتین قرار می‌گیرند. پس شاید افزایش کلسترول خون به دنبال مصرف خوراکی کلسترول و تأثیر سیمواستاتین بر ABCA1 و مهار گلیکوپروتئین P توسط سیمواستاتین، مسئول افزایش کلسترول در هیپوکامپ حیوانات گروه دیابتی کلسترول- سیمواستاتین باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و با مد نظر قرار دادن

References

- [1] Abildayeva K, Jansen PJ, Hirsch-Reinshagen V, Bloks VW, Bakker AH, Ramaekers FC, de Vente J, Groen AK, Wellington CL, Kuipers F, Mulder M, 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 281 (2006) 12799-12808.
- [2] Artola A, Kamal A, Ramakers GM, Biessels GJ, Gispen WH, Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long-term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus. *Eur J Neurosci* 22 (2005) 169-178.
- [3] Arvanitakis Z, Schneider JA, Wilson R.S, Bienias JL, Kelly JF, Evans DA, Bennett DA, Statins, Incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and neuropathology. *Neurology* 70 (2008) 1795-1802.
- [4] Atsushi H, Norman S, Radin, Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. *Anal Biochem* 90 (1978) 420-426.
- [5] Björkhem I, Meaney S, Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004) 806-815.
- [6] Cattelotte J, André P, Ouellet M, Bourasset F, Scherrmann JM, Cisternino S. In situ mouse carotid perfusion model: glucose and cholesterol transport in the eye and brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 28 (2008) 1449-1459.
- [7] Dietschy JM, Turley SD, Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidology* 12 (2001) 105-112.
- [8] Dufour F, Liu QY, Gusev P, Alkon D, Atzori M, Cholesterol-enriched diet affects spatial learning and synaptic function in hippocampal synapses. *Brain Res* 1103 (2006) 88-98.
- [9] Evans MA, Golomb BA, Statin-associated adverse cognitive effects: survey results from 171 patients. *Pharmacotherapy* 29 (2009) 800-811.
- [10] Flood JF, Characteristics of learning and memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 39 (1990) 1391-1398.
- [11] Fromm MF, Importance of P-glycoprotein at blood-

- tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 25 (2004) 423-429.
- [12] Garrigues A, Escargueil AE, Orlowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* (2002) 10347-10352.
- [13] Gipsen WH, Biessels J, Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23 (2000) 542-549.
- [14] Guo J, Chi S, Xu H, Jin G, Qi Z, Effects of cholesterol levels on the excitability of rat hippocampal neurons. *Mol Membr Biol* 25 (2008) 216-223.
- [15] Haag MDH, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BHC, Breteler MMB, Statins as associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. *J Neurol Neurosurg Psych* 80 (2009) 13-17.
- [16] Jasinska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D, Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 59 (2007) 483-499.
- [17] Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Keller JH, Igbavboa U, Franke C, Fechner T, Schubert-Zsilavecz M, Karas M, Müller WE, Wood WG, Chronic Administration of Statins Alters Multiple Gene Expression Patterns in Mouse Cerebral Cortex *J Pharmacol Exp Ther* 312 (2005) 786-93.
- [18] Joseph JA, Denisova NA, Bielinski D, Fisher, DR, Shukitt-Hale B, Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. *Mech Ageing Dev* 116 (2000) 141-53.
- [19] Joseph JA, Villalobos-Molinas R, Denisova NA, Erat S, Strain J, Cholesterol: a two-edged sword in brain aging. *Free Radic Biol* 22 (1997) 455-462.
- [20] Kolsch H, Ludwig M, Lutjohann D, Rao ML, Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17beta. *J Neural Transm* 108 (2001) 475-488.
- [21] Kucukatay V, Açar A, Gumuslu S, Yargıçoğlu P. Effect of sulfur dioxide on active and passive avoidance in experimental diabetes mellitus: relation to oxidant stress and antioxidant enzymes. *Int J Neurosci* 117 (2007) 1091-1107.
- [22] Lashgari R, Motamedi F, Zahedi Asl S, Shahidi S, Komaki A, Behavioral and electrophysiological studies of chronic oral administration of L-type calcium channel blocker verapamil on learning and memory in rats. *Behav Brain Res* 171 (2006) 324-328.
- [23] Li L, Cao D, Kim, Lester R, Fukuchi K, Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Ann Neurol* 60 (2006) 729-739.
- [24] Liao JK, Laufs U, Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45 (2005) 89-118.
- [25] Lu D, Qu C, Goussev A, Jiang H, Lu C, Schallert T, Mahmood A, Chen J, Chopp M, Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 24 (2007) 1132-1146.
- [26] McCarthy AM, Lindgren S, Menkeking MA, Tsalikian E, Engvall JC, Effects of diabetes on learning in children. *Pediatrics* 109 (2002) E91-E110.
- [27] Mulder M, Sterols in the central nervous system. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12(2009) 152-158.
- [28] Muldoon M.F, Barger SD, Ryan CM, Flory JD, Lehoczy JP, Matthews KA, Manuck SB, Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being, *AM J Med* 108 (2000) 538-546.
- [29] Nelson1 TJ, Alkon DL, Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory a neurodegeneration. *Biochem Soc Trans* 33 (2005) 1033-1036.
- [30] Papassotiropoulos A, Lutjohann D, Baglia M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, Ptok U, Bjorkhem I, Bergmann K.von, Heun R, 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *Psychiatr Res* 36 (2002) 27-32.
- [31] Parle M, Singh N, Reversal of Memory Deficits by Atorvastatin and Simvastatin in Rats. *Yakugaku Zasshi* 127(2007) 1125-1137.
- [32] Quan G, Xie C, Dietschy JM, Turley SD. Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 146(2003) 87-98.
- [33] Rodriguez RA, Taberno A, Velasci A, The neurotrophic effect of oleic acid induces dentritic differentiation and expression of the neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD2. *J Neurochem* 88 (2004) 1041-1051.

- [34] Ryan CM, Geckle M, Why is learning and memory dysfunction in Type 2 diabetes limited to older adults? *Diabetes Metabo Res Rev* 16 (2000) 308-315.
- [35] Schreurs BG, The effects of cholesterol on learning and memory. *Neuroscience and Neurosci Biobehav Rev* 34 (2010) 1366-1379.
- [36] Selvarajah D, Tesfay S, Central nervous system involvement in diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 6 (2006) 431-438.
- [37] Shahidi S, Komaki A, Mahmoodi M, Atrvash N, Ghodrati M, Ascorbic acid supplementation could effect passive avoidance learning and memory in rat. *Brain Res Bull* 76 (2008) 109-113.
- [38] Shahidi S, Motamedi F, Bakeshloo SA, Taleghani BK, The effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on passive avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 152 (2004) 81-87.
- [39] Sparks DL, Schreurs BG, Trace amounts of copper in water induce-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 11065-11069.
- [40] Thelen KM, Rentsch KM, Gutteck U, Heverin M, Olin M, Andersson U, von Eckardstein A, Björkhem I, Lütjohann D, Brain Cholesterol Synthesis in Mice Is Affected by High Dose of Simvastatin but Not of Pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 316 (2006) 1146-52.
- [41] Wang Er-jia, Casciano C N, Clement R P, Johnson W W, HMG-CoA Reductase Inhibitors (Statins) Characterized as Direct Inhibitors of P-Glycoprotein. *Pharm Res* 18 (2001) 800-806.
- [42] West R, Beeri MS, Schmeidler J, Hannigan CM, Angelo G, Grossman HT, Rosendorff, C, Silverman JM, Better memory functioning associated with higher total and low-density lipoprotein cholesterol levels in very elderly subjects without the apolipoprotein e4 allele. *Am J Geriatr Psychiatry* 16 (2008) 781-785.
- [43] Xie W, Du L, High-cholesterol diets impair short-term retention of memory in alloxan-induced diabetic mice, but not acquisition of memory nor retention of memory in prediabetic mice. *Life sci* 77 (2005) 481-495.