

اثرات ویتامین B12 بر یادگیری و حافظه‌ی فضایی در مدل بیماری آلزایمر موش‌های صحرایی نر بالغ

نسترن زمانی^۱، احمدعلی معاضدی^۲، آزاده اسکندری^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویتامین B12 یک ویتامین محلول در آب می‌باشد که اثرات مثبت آن بر شناخت، به تأیید رسیده است. مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی تأثیر ویتامین B12 بر اختلال یادگیری و حافظه‌ی فضایی در مدل بیماری آلزایمر با تخریب الکتریکی هسته‌ی قاعده‌ای مگنوسلولاریس (Nucleus basalis magnocellularis) یا NBM انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۴۹ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد Wistar به هفت گروه کنترل، شاهد تخریب (ورود الکتروکود به NBM بدون القای جریان الکتریکی)، تخریب (تخریب الکتریکی دو طرفه‌ی NBM)، حلال (تخریب + سالین ۰/۲ میلی‌لیتر) و تخریب + ویتامین B12 در مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم تقسیم شدند. یک هفته بعد، موش‌های صحرایی به مدت ۵ روز با دستگاه ماز Y شکل آموزش دیدند. ۲۵ 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 ($P < ۰/۰۰۱$). در گروه حلال در مقایسه با گروه تخریب، هیچ تغییری در یادگیری فضایی مشاهده نگردید. همچنین، درمان با ویتامین B12 در گروه‌های تخریب + ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین B12 ($P < ۰/۰۵۰$) و تخریب + ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین B12 ($P < ۰/۰۱۰$)، موجب افزایش معنی‌دار در یادگیری فضایی گردید. علاوه بر این، بین نتایج روز ۵ آموزش و آزمون فراخوانی حافظه‌ی روز ۳۰ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: تخریب دو طرفه‌ی NBM موجب اختلال یادگیری فضایی در موش‌های صحرایی می‌گردد، اما ویتامین B12 موجب بهبود یادگیری در این حیوانات گردید.

واژگان کلیدی: ویتامین B12، یادگیری فضایی، هسته‌ی قاعده‌ای مگنوسلولاریس، بیماری آلزایمر

ارجاع: زمانی نسترن، معاضدی احمدعلی، اسکندری آزاده. اثرات ویتامین B12 بر یادگیری و حافظه‌ی فضایی در مدل بیماری آلزایمر موش‌های

صحرایی نر بالغ. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۶۳): ۱۹۵۵-۱۹۴۹

مقدمه

بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease یا AD)، شایع‌ترین نوع دمانس است که علائم آن شامل تغییر در خلق و خوی و شخصیت، اختلال حافظه، اختلال در برنامه ریزی و حل مشکلات متداول و اشتباه در مورد مکان و زمان می‌باشد (۱). مطالعات انجام شده، نشان می‌دهند که تغییرات پاتولوژیک در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر شامل رسوب خارج سلولی پپتید آمیلوئید بتا (Beta-amyloid یا AB) به صورت پلاک‌های منتشر، هیپرفسفوریلاسیون پروتئین تاو و تجمع داخل سلولی آن به صورت کلافه‌های نروفیبریلاری

(Neurofibrillary tangles یا NFTs)، کاهش استیل کولین، کاهش نورونی و التهاب می‌باشند (۲). همچنین، نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو القا شده به وسیله‌ی یون‌های فلزی نظیر آلومینیوم موجب افزایش تجمع AB و NFTs می‌گردد (۳). استیل کولین، نوروترانسمیتری است که توسط نورون‌های کولینرژیک ترشح می‌شود. سیستم کولینرژیک نقش مهمی در یادگیری و حافظه دارد. اهمیت تأثیر نورون‌های کولینرژیک هسته‌ی قاعده‌ای مینرت (Nucleus basalis of Meynert یا NBM) بر حافظه با توجه به این واقعیت که دژنراسیون این نورون‌ها در بیماری آلزایمر صورت

۱- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه پیام‌نور، تهران و دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: na_zamani2000@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤؤل: نسترن زمانی

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی، از موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد Wistar با محدوده‌ی وزنی 20 ± 200 گرم استفاده گردید. موش‌ها در گروه‌های چهارتایی در هر قفس، در خانه‌ی حیوانات با درجه‌ی حرارت کنترل شده (۲۴-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) و تحت چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و آب و غذا به مقدار کافی در دسترس داشتند. در انجام این آزمایش‌ها، منشور و موازین اخلاق در پژوهش (کمیته‌ی اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فن‌آوری ۱۳۰۹/۳۲۵۰ مورخ ۹۰/۱۲/۳ (ش ۱۳۹۰ الف ج/۵۵/۱۸۰/Q)) مبنای کار قرار گرفت. آزمایش‌های رفتاری در دوره‌ی روشنایی و با استفاده از دستگاه ماز Y شکل انجام گرفت. ماده‌ی مورد استفاده ویتامین B12 (Cyanocobalamin CAS Number 68-19-9) بود که از شرکت Sigma تهیه گردید.

گروه‌های مورد مطالعه: موش‌ها به طور تصادفی به هفت گروه ($n = 7$) تقسیم شدند. گروه اول (کنترل) تحت هیچ گونه تزریق یا جراحی قرار نگرفتند. گروه دوم (شاهد تخریب)، تحت جراحی و ورود الکتروود به NBM بدون تخریب این هسته قرار گرفتند. گروه سوم (ضایعه دیده یا مبتلا به بیماری آلزایمر)، که در آنان تحت عمل جراحی استرئوتاکسیک، الکتروود تخریب به صورت دو طرفه وارد NBM شد و با عبور جریان الکتریکی عمل تخریب انجام گردید. گروه چهارم (تخریب + حلال) که تحت عمل جراحی تخریب دو طرفه‌ی NBM قرار گرفتند و بلافاصله بعد از جراحی حلال دارو (سالین) را به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر به مدت ۱۰ روز به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. گروه‌های پنجم، ششم و هفتم (تخریب + مقادیر مختلف ویتامین B12) که تحت عمل جراحی تخریب دو طرفه‌ی NBM قرار گرفتند و بلافاصله بعد از جراحی هر گروه یکی از مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم (۱۰) را به صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۱۰ روز، روزی یک بار، دریافت کردند (۱۱). 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/کیلوگرم کلروهیدرات کتامین ۱۰ درصد و ۳ میلی‌گرم/کیلوگرم زایلازین ۲ درصد قرار گرفتند (۱۲) و سپس در دستگاه استرئوتاکسی (Stoelting, USA) ثابت شدند. میله‌ی دندانی ۳/۳ میلی‌متر زیر صفر افقی قرار گرفت تا مطابق اطلس، وضعیت مناسب جامعه حاصل گردد. سپس، موهای پشت سر حیوان از ناحیه‌ی بین چشم‌ها تا گوش‌ها تراشیده و پوست این ناحیه ضد

می‌گیرد و موجب از دست رفتن حافظه در این بیماران می‌گردد، مشاهده شده است (۴).

دستجات نورون‌های کولینرژیک قاعده‌ی مغز جلویی در مغز جوندگان به عنوان هسته‌ی قاعده‌ای مگنوسولولاریس (Nucleus basalis magnocellularis یا NBM) شناخته می‌شوند که معادل هسته‌ی قاعده‌ای مینرت در انسان می‌باشند. مدل‌های حیوانی با تخریب NBM، کاهش در نشانگرهای 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 جلویی را نشان داده اند (۵). از این رو، مدل‌های تخریب هسته‌ی NBM برای مطالعه‌ی نقش سیستم کولینرژیک در هوشیاری و ادراک به کار می‌روند و بر نقص‌های ادراکی ایجاد شده در بیماری آلزایمر دلالت دارند.

مواد مغذی در مسیرهای متابولیکی متفاوتی نقش دارند که اثرات مثبت برخی از آن‌ها شامل ویتامین‌های گروه B بر شناخت، نشان داده شده است. ویتامین B12، ویتامینی محلول در آب می‌باشد که کمبود آن منجر به تجمع هموسیستین (Homocysteine یا Hcy) - یک اسید آمینه‌ی غیر ضروری - می‌گردد (۶).

بررسی‌های انجام شده، نشان می‌دهند که Hcy موجب آسیب DNA و آپوپتوز در سلول‌های عصبی و افزایش تولید $A\beta$ می‌گردد. همچنین، نشان داده شده است که آسیب نورونی القا شده توسط Hcy در نواحی خاصی از مغز نظیر هیپوکامپ که در فرایند یادگیری و حافظه نقش دارند، صورت می‌گیرد (۷). علاوه بر این، ارتباط بین غلظت بالای Hcy و غلظت پایین ویتامین B12 با نقص شناختی و آتروفی قشر مغز و هیپوکامپ نشان داده شده است (۸). سطوح بالای Hcy در گردش خون هیپرهومیوسیستینمی (Hyperhomocysteinemia) یا HHcy نامیده می‌شود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که HHcy در پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو نظیر آلزایمر نقش دارد (۹).

با توجه به تأثیر HHcy در پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو و همچنین، با در نظر گرفتن ارتباط بین غلظت بالای Hcy و غلظت پایین ویتامین B12 با نقص شناختی و آتروفی قشر مغز و هیپوکامپ و اثرات Hcy بر آسیب نورونی نواحی خاصی از مغز مانند هیپوکامپ و نیز با توجه به این که تأثیر تزریق داخل صفاقی ویتامین B12 بلافاصله بعد از القای مدل آلزایمر بر یادگیری فضایی بررسی نشده بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تأثیر ویتامین B12 بر یادگیری و حافظه‌ی فضایی موش‌های صحرایی نر بالغ پس از القای مدل آلزایمر از طریق تخریب الکتریکی دو طرفه‌ی NBM انجام شد.

یک فاصله‌ی زمانی کوتاه (۵ ثانیه) موش فرصت داشت تا از محل تاریک خارج و وارد بازوی روشن شود؛ در این صورت، ورود موش به بازوی روشن به عنوان انتخاب صحیح محسوب می‌شد. در غیر این صورت، بعد از ۵ ثانیه به پاهای موش شوکی داده می‌شد که در این صورت ورود به بازوی روشن به عنوان انتخاب صحیح و ورود به بازوی تاریک به عنوان انتخاب غلط محسوب می‌گردید. بر اساس جدول تصادفی در هر روز به هر موش ۳۰ بار آموزش داده می‌شد و در پایان هر جلسه، تعداد پاسخ صحیح محاسبه می‌گردید. جلسات آموزش به مدت ۵ روز متوالی ادامه می‌یافت تا موش‌ها به معیار پاسخ صحیح برسند؛ یعنی از ۳۰ بار آموزش در روز حداقل ۲۶ بار انتخاب صحیحی داشته باشند.

آزمون: ۲۵ روز بعد از آموزش، آزمون فراخوانی حافظه برای ارزیابی حافظه‌ی بلند مدت انجام گرفت. در این آزمون، حافظه‌ی هر کدام از حیوانات در روز ۳۰ به صورت یک جلسه در دستگاه ماز Y شکل مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن با نتایج روز ۵ آموزش مقایسه گردید (۱۳).

آنالیز آماری: نتایج حاصل از این پژوهش به صورت توصیفی و تحلیلی با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) بررسی گردید. به منظور مقایسه‌ی میانگین تعداد پاسخ صحیح در گروه‌های مختلف و تعیین این که آیا گروه‌ها با یکدیگر اختلاف دارند یا نه، از آزمون Repeated measures ANOVA و آزمون تکمیلی Tukey استفاده گردید. مقایسه‌ی گروه‌های مختلف در ۵ روز متوالی آموزش با آزمون One-way ANOVA، آزمون تکمیلی Tukey و آزمون Independent t انجام شد. در این بررسی، $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

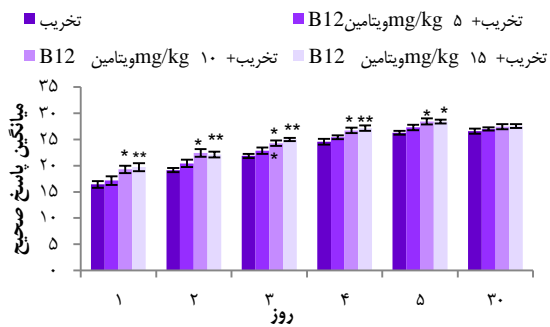
یافته‌ها

در این مطالعه، نتایج حاصل از آزمون Repeated measures ANOVA نشان داد که گروه، زمان و اثر متقابل گروه و زمان، تأثیر معنی‌داری بر یادگیری فضایی دارد ($P < 0/001$). در مقایسه‌ی گروه‌های مختلف در ۵ روز متوالی آموزش با روش One-way ANOVA، نشان داده شد که میزان یادگیری فضایی بین گروه کنترل و شاهد تخریب در هیچ کدام از روزها تفاوت معنی‌داری نداشت. از طرف دیگر، میزان یادگیری فضایی بین گروه‌های کنترل و تخریب در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم ($P < 0/001$) تفاوت معنی‌داری داشت که بیانگر این مسأله است که تخریب دوطرفه‌ی NBM منجر به کاهش یادگیری فضایی نسبت به گروه کنترل می‌شود. علاوه بر این، بین میانگین پاسخ صحیح روز پنجم آموزش و آزمون فراخوانی حافظه‌ی روز ۳۰، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱).

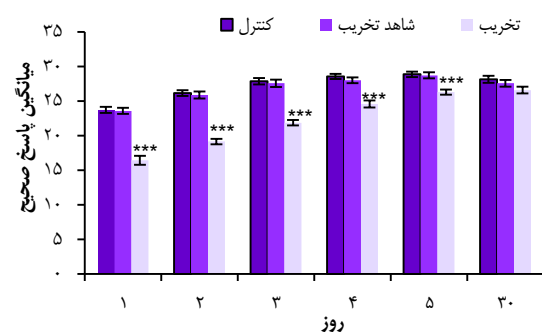
عفونی شد. با کمک اسکالپل، یک برش طولی در پوست ناحیه‌ی پشت سر حیوان داده شد و بعد از کنار زدن بافت‌های پیوندی محل مورد نظر با نرمال‌سالین تمیز گردید تا درزهای جمجمه نمایان گردد. مختصات مورد استفاده برای NBM طبق اطلس Paxinos و Watson عبارت از $AP = -1/3$ از برگما، $ML = \pm 2/8$ از خط وسط و $DV = -7/6$ از سطح سخت شامه بودند. با استفاده از دستگاه ایجاد کننده‌ی ضایعه (Lesion Making Device, UGO Basile) پس از قرار گرفتن الکتروود در نقطه‌ی مورد نظر با عبور جریان الکتریکی مستقیم با شدت ۰/۵ میلی‌آمپر به مدت ۳ ثانیه (۱۲)، NBM در هر دو نیمکره‌ی مغزی به صورت الکتریکی تخریب گردید. پس از دوره‌ی 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 تأثیر داروها بر روند یادگیری، روش تنبیه مناسب‌تر می‌باشد و با توجه به این که هیپوکامپ در حافظه‌ی فضایی نقش عمده‌ای دارد، در این تحقیق از دستگاه ماز Y شکل برای بررسی یادگیری و حافظه‌ی فضایی استفاده گردید (۱۳). این دستگاه به شکل Y است و دارای سه بازوی بسیار مشابه به ابعاد $17/5 \times 60$ سانتی‌متر مربع و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و از جنس شیشه‌ی شفاف است. کف هر شاخه، میله‌های آب‌کاری کروم-نیکل به فواصل ۱ سانتی‌متر از هم قرار گرفته‌اند که به دو طرف دیواره نصب شده‌اند. 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 کنترلی، مشخصات تحریک نظیر طول تحریک، فرکانس تحریک، فاصله‌ی زمانی بین روشن شدن لامپ و اعمال تحریک، فاصله‌ی زمانی بعد از عمل تحریک و شمارش تعداد دفعات تحریک قابل تنظیم است. دستگاه باید در یک محیط تاریک، آرام و بدون سر و صدا قرار گیرد.

آموزش: در روز اول آموزش، ابتدا حیوان درون ماز قرار می‌گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه اجازه داده می‌شد تا آزادانه درون ماز حرکت کند و با شکل ظاهری ماز آشنا شود. سپس، از بازویی که حیوان در آن قرار داشت، آموزش آغاز می‌گردید. انتخاب بازوها بر اساس جدول تصادفی صورت می‌گرفت. با فشار دادن یک دکمه روی دستگاه کنترلی، چراغ یکی از بازوهای ماز روشن می‌شد که در

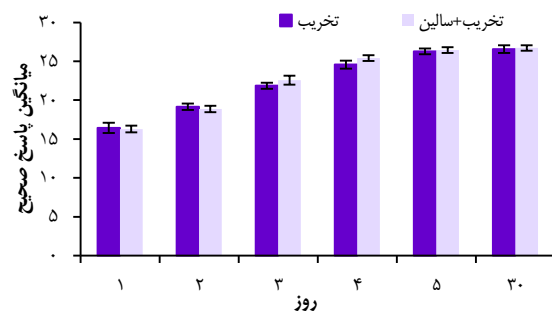


شکل ۳. مقایسه میانگین پاسخ صحیح بین گروه تخریب با گروه‌های تخریب + ویتامین B12 در مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم در روزهای ۱-۵ و روز ۳۰ با روز ۵ آموزش در موش‌های صحرایی نر بالغ (*n = ۷, P < ۰/۰۵۰)



شکل ۱. مقایسه میانگین پاسخ صحیح بین گروه کنترل با گروه‌های شاهد تخریب و تخریب در روزهای ۱-۵ و روز ۳۰ با روز ۵ آموزش در موش‌های صحرایی نر بالغ (**n = ۷, P < ۰/۰۰۱)

همچنین، مقایسه‌ی میزان یادگیری فضایی بین گروه‌های تخریب و تخریب + حلال در هیچ کدام از روزها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. علاوه بر این، در این گروه‌ها بین میانگین پاسخ صحیح روز ۵ آموزش و آزمون فراخوانی حافظه‌ی روز ۳۰ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه میانگین پاسخ صحیح بین گروه تخریب با گروه تخریب + حلال در روزهای ۱-۵ و روز ۳۰ با روز ۵ آموزش در موش‌های صحرایی نر بالغ (n = ۷)

همچنین، مقایسه‌ی میزان یادگیری فضایی بین گروه‌های تخریب و تخریب + ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین B12 در روزهای ۱-۵، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، اما بین گروه‌های تخریب و تخریب + ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین B12 در روزهای اول، سوم، چهارم، پنجم ($P < ۰/۰۵۰$) و دوم ($P < ۰/۰۱۰$) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین، بین گروه‌های تخریب و تخریب + ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین B12 در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم ($P < ۰/۰۱۰$) و پنجم ($P < ۰/۰۵۰$) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. علاوه بر این، در این گروه‌ها بین میانگین پاسخ صحیح روز ۵ آموزش و آزمون فراخوانی حافظه‌ی روز ۳۰، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳).

بحث

این مطالعه به بررسی تأثیر تزریق داخل صفاقی ویتامین B12، پس از تخریب الکتریکی دو طرفه‌ی NBM و القای مدل آلزایمر، بر فرایند یادگیری و حافظه‌ی فضایی پرداخته است. سیستم کولینرژیک مغز، یک سیستم حیاتی برای پردازش اطلاعات و اعمال شناختی می‌باشد. در مغز پستانداران دستجات سلول‌های کولینرژیک NBM و نواحی سپتوم میانی، انشعابات خود را به هیپوکامپ آمیگدال و قشر می‌فرستند (۱۴). تخریب نورون‌های کولینرژیک NBM در بیماران مبتلا به آلزایمر به عنوان علت اصلی کاهش حافظه در این بیماران شناخته شده است (۱۵). علاوه بر این، نشان داده شده است که فعالیت کولین استیل ترانسفراز (Choline acetyltransferase یا ChAT) با غلظت $A\beta$ در بیماران مبتلا به آلزایمر به طور معنی‌داری رابطه‌ی معکوس دارد (۱۶). در این پژوهش، مقایسه‌ی نتایج بین گروه کنترل و تخریب دو طرفه‌ی NBM نشان داد که تخریب دو طرفه‌ی این هسته، باعث کاهش معنی‌دار در فرایند یادگیری فضایی می‌گردد (شکل ۱). در مطالعات دبیر و همکاران نیز تخریب الکتریکی دو طرفه‌ی NBM، موجب کاهش پاسخ‌های درست در آزمون اکتساب در ماز شعاعی هشت بازویی گردید (۱۷).

همچنین، در مطالعه‌ی هویدا و همکاران نشان داده شد که تزریق ایبوتونیک اسید در NBM موجب کاهش حافظه‌ی فضایی در آزمون ماز آبی موریس می‌گردد (۱۸). مطالعه‌ی حسینی و همکاران نیز نشان می‌دهند که تزریق ایبوتونیک اسید در NBM موجب نقص در آزمون اکتساب و فراخوانی در یادگیری احترازی غیر فعال می‌گردد (۱۹) که این نتایج هم‌راستا با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر می‌باشند. از طرف دیگر، مقایسه‌ی نتایج بین گروه کنترل و شاهد تخریب نشان داد که ورود الکتروود به NBM بدون تخریب این هسته، اثری بر یادگیری فضایی ندارد و این نشان می‌دهد که مراحل مختلف

می‌یابد (۲۵). این در حالی است که مطالعه‌ی Ellinson و همکاران در افراد بالای ۶۰ سال ارتباطی را بین سطوح سرمی ویتامین B12 و اختلال شناختی نشان نمی‌دهد (۲۶). نتایج حاصل از مطالعه‌ی Ho و همکاران نشان می‌دهد که Hcy موجب افزایش اثرات A β در ورود کلسیم به سیتوزول و آپوپتوز نورونی می‌گردد (۲۷).

نشان داده شده است که مکمل‌های رژیمی فولات، ویتامین B12 و B6 سطوح Hcy را کاهش می‌دهند و به طور معکوس کمبود آن‌ها منجر به HHcy می‌گردد. چندین مکانیسم برای توضیح ارتباط بیولوژیکی بین پاتوژن AD و HHcy پیشنهاد شده است که از آن جمله تأثیر HHcy در ایجاد سمیت تحریکی از طریق گیرنده‌های گلوتامات، افزایش استرس اکسیداتیو و تغییر در متیلاسیون DNA از طریق مداخله در بازسازی DNA و ایجاد آپوپتوز می‌باشد. همچنین، نشان داده شده است که HHcy در موش‌های مدل آلزایمر، موجب افزایش تولید آمیلوئید می‌گردد (۲۸). علاوه بر این، فعالیت تاو کینازهایی مثل Cdk5 که منجر به رسوب کلافه‌های نروفیبریلاری می‌گردند نیز از جمله اثرات سوء هموسیستئین می‌باشد (۲۹). نتایج پیش‌گفته، همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌باشند. بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر 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، ویتامین B12 به احتمال زیاد از طریق کاهش TNF- α ، افزایش سطح استیل‌کولین، کاهش سمیت تحریکی، کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش آپوپتوز، موجب افزایش یادگیری فضایی می‌گردد.

در این مطالعه، سطح هموسیستئین و استیل‌کولین و همچنین، میزان استرس اکسیداتیو در بافت مغزی بررسی نشده است که پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود.

نتیجه‌گیری نهایی این که ویتامین B12 یک مکمل رژیمی است که از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، کاهش تولید آمیلوئید و کلافه‌های نروفیبریلاری و همچنین، کاهش TNF- α موجب محافظت عصبی در بسیاری از مدل‌ها می‌گردد. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهند که تزریق داخل صفاقی ویتامین B12 به مدت ۱۰ روز پس از القای مدل آلزایمر به صورت وابسته به مقدار در موش‌های صحرایی نر بالغ موجب بهبود یادگیری فضایی در دستگاه ماز Y شکل می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت همکاری و مساعدت در انجام این مطالعه اعلام می‌دارند.

بیهوشی، جراحی و ورود الکتروود به NBM بدون ایجاد تخریب، اثری بر یادگیری فضایی در موش‌های صحرایی ندارد. همچنین، مقایسه‌ی نتایج بین دو گروه تخریب و تخریب + سالین نشان داد که سالین (حلال دارو) هیچ‌گونه تأثیری بر یادگیری فضایی ندارد.

در مقایسه‌ی بین گروه تخریب با گروه‌های تخریب + مقادیر مختلف ویتامین B12 با آزمون One-way ANOVA نشان داده شد که ویتامین B12 در مقادیر ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، موجب افزایش معنی‌داری در یادگیری فضایی در مدل بیماری آلزایمر با تخریب NBM می‌گردد. مقادیر ویتامین B12 بر اساس مطالعات انجام شده‌ی پیشین (۱۰) انتخاب شدند. در مطالعه‌ی موسوی و همکاران، نشان داده شد که تیمار ویتامین B12 با مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت وابسته به مقدار، موجب کاهش عامل نکروز تومور آلفا (Tumor necrosis factor-alpha یا TNF- α) در موش‌های صحرایی آنسفالیت آلرژیک تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis یا EAE)، مدلی حیوانی برای بیماری (MS) multiple sclerosis، می‌گردد (۱۰).

همچنین، در برخی مطالعات نشان داده شده است که کمبود ویتامین B12 منجر به تولید بیش از حد TNF- α در موش‌های صحرایی و انسان می‌گردد (۲۱-۲۰). علاوه بر این، در یک بررسی نشان داده شد که در افراد با تولید بیشتر اینترلوکین ۱ (Interleukin-1 یا IL-1) و TNF- α در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مقایسه با افراد با کمترین درصد تولید سیتوکاین، خطر ابتلا به آلزایمر بیشتر است (۲۲). در بررسی‌های Hung و همکاران، نشان داده شد که تخریب سپتوم میانی با تزریق ایبوتونیک اسید، موجب کاهش سطح استیل‌کولین و افزایش فعالیت پروتئین کیناز C (Protein kinase C یا PKC) در هیپوکامپ می‌گردد که در این بررسی، مکمل رژیمی فسفاتیدیل کولین + ویتامین B12 موجب غلبه بر این شرایط پاتوفیزیولوژیک گردید (۲۳).

در مطالعه‌ی دیگری Hung و همکاران نشان دادند که در موش‌هایی که فرایند پیری در آن‌ها تسریع شده است (Senescence-accelerated mouse یا SAM)، مکمل رژیمی فسفاتیدیل کولین + ویتامین B12 موجب افزایش فعالیت PKC در هیپوکامپ و افزایش دوکوزاهگزانوئیک اسید (Docosahexaenoic acid یا DHA) در مغز می‌گردد که در این مطالعه، اثرات مفید مکمل رژیمی فسفاتیدیل کولین + ویتامین B12 به فعال شدن سیستم کولینرژیک نسبت داده شد (۲۴). در یک بررسی نشان داده شد که آتروفی مغزی در افراد مسن با اختلال شناختی خفیف که منجر به بیماری آلزایمر می‌گردد، طی درمان با ویتامین B و کاهش Hcy بهبود

References

- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2011; 7(3): 137-52.
- Nisbet RM, Polanco JC, Ittner LM, Gotz J. Tau aggregation and its interplay with amyloid-beta. *Acta Neuropathol* 2015; 129(2): 207-20.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Abeta physiology. *Neuroscience* 2015; 307: 26-36.
- Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuroparmacol* 2016; 14(1): 101-15.
- Rabiei Z, Asgharzadeh S, Bigdeli M. Medicinal herbs effective in the treatment of the alzheimer's disease. *J Babol Univ Med Sci* 2015; 17(3): 51-9. [In Persian].
- Oulhaj A, Jermeren F, Refsum H, Smith AD, de Jager CA. Omega-3 fatty acid status enhances the prevention of cognitive decline by B vitamins in mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 2016; 50(2): 547-57.
- Thomas P, Fenech M. Buccal Cytome Biomarkers and their association with plasma folate, vitamin B12 and homocysteine in Alzheimer's disease. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2015; 8(2): 57-69.
- Lee YM, Ha JK, Park JM, Lee BD, Moon E, Chung YI, et al. Apolipoprotein E genotype modulates effects of vitamin B12 and homocysteine on grey matter volume in Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 2016; 16(1): 3-11.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346(7): 476-83.
- Mousavi M, Karimi A, Goroie M. Effect of protective of vitamin B12 on Lewiss rats with experimental allergic encephalomyelitis a model for multiple sclerosis. *Journal of Animal Physiology and Development* 2018; 4(3): 49-54. [In Persian].
- Karimi A, Goroie M. Effect alcoholic extract of *Kellussia odoratissima* and B12 on markers of inflammation in rats induced experimental auto immune encephalomyelitis. *Journal of Animal Physiology and Development* 2015; 8(2): 43-50. [In Persian].
- Ashkavandi S, Moazedi A A, Semnani S, Eshagh-Harooni H, Mohammadi T, Pourmehdi-Brojeni 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(2): 102-10. [In Persian].
- Hoveida RI, Moazedi AA, Rasekh A. The Effect of intrahippocampal CA1 area injection of estradiol benzoate on the spatial learning and memory in adult male rats. *Modares J Med Sci Pathol* 2005; 7(2): 115-24. [In Persian].
- Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PG. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid-beta42 with memantine. *Behav Brain Res* 2011; 221(2): 594-603.
- Bales KR, Tzavara ET, Wu S, Wade MR, Bymaster FP, Paul SM, et al. Cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer disease is reversed by an anti-A beta antibody. *J Clin Invest* 2006; 116(3): 825-32.
- Laursen B, Mork A, Plath N, Kristiansen U, Bastlund JF. Cholinergic degeneration is associated with increased plaque deposition and cognitive impairment in APP^{swe}/PS1^{de9} mice. *Behav Brain Res* 2013; 240: 146-52.
- Dabir N, Moazedi A, 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(370): 64-73. [In Persian].
- Hoveida R, Alaei H, Oryan S, Ghavipankeh H. Effects of exercise on spatial memory deficits induced by nucleus basalis magnocellularis lesions. *Physiol Pharmacol* 2009; 13(3): 319-27.
- Hosseini N, Alaei H, Reisi P, Radahmadi M. The effect of treadmill running on passive avoidance learning in animal model of Alzheimer disease. *Int J Prev Med* 2013; 4(2): 187-92.
- Peracchi M, Bamonti CF, Pomati M, De Francesch M, Scalabrino G. Human cobalamin deficiency: alterations in serum tumour necrosis factor-alpha and epidermal growth factor. *Eur J Haematol* 2001; 67(2): 123-7.
- Scalabrino G, Carpo M, Bamonti F, Pizzinelli S, D'Avino C, Bresolin N, et al. High tumor necrosis factor-alpha [corrected] levels in cerebrospinal fluid of cobalamin-deficient patients. *Ann Neurol* 2004; 56(6): 886-90.
- Tan ZS, Beiser AS, Vasan RS, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris TB, et al. Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: The Framingham Study. *Neurology* 2007; 68(22): 1902-8.
- Hung MC, Shibasaki K, Nishizono S, Sato M, Ikeda I, Masuda Y, et al. Ibotenic acid-induced lesions of the medial septum increase hippocampal membrane associated protein kinase c activity and reduce acetylcholine synthesis: prevention by a phosphatidylcholine/vitamin B12 diet. *J Nutr Biochem* 2000; 11(3): 159-64.
- Hung MC, Shibasaki K, Yoshida R, Sato M, Imaizumi K. Learning behaviour and cerebral protein kinase C, antioxidant status, lipid composition in senescence-accelerated mouse: influence of a phosphatidylcholine-vitamin B12 diet. *Br J Nutr* 2001; 86(2): 163-71.
- Smith AD, Smith SM, de Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G, et al. Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2010; 5(9): e12244.
- Ellinson M, Thomas J, Patterson A. A critical evaluation of the relationship between serum vitamin B, folate and total homocysteine with cognitive impairment in the elderly. *J Hum Nutr Diet* 2004; 17(4): 371-83.
- Ho PI, Collins SC, Dhritavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, et al. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 2001; 78(2): 249-53.
- Zhuo JM, Pratico D. Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate, vitamin B6 and B12-deficient diet. *Exp Gerontol* 2010; 45(3): 195-201.
- Smith AD, Refsum H. Homocysteine, B Vitamins, and cognitive impairment. *Annu Rev Nutr* 2016; 36: 211-39.

The Effects of Vitamin B12 on Spatial Learning and Memory in Adult Male Rats Model of Alzheimer's Disease

Nastaran Zamani¹, Ahmad Ali Moazedi², Azadeh Eskandary³

Original Article

Abstract

Background: Vitamin B12 is a water-soluble vitamin shown to have a positive effect on cognition. This study aimed to examine the effect of Vitamin B12 on spatial learning and memory in electrical lesion model of nucleus basalis magnocellularis (NBM) of Alzheimer's disease.

Methods: 49 adult male Wistar rats were divided into seven groups of control, sham (the electrode was entered into the nucleus basalis magnocellularis with no lesion), lesion (which received bilateral electric lesions of nucleus basalis magnocellularis), vehicle (lesion + 0.2 ml saline), and lesion + vitamin B12 (5, 10, and 15 mg/kg intraperitoneally). After one week, the rats were trained to perform the Y-maze task for five days. 25 days after training, a retention test was performed to determine long-term memory.

Findings: Bilateral nucleus basalis magnocellularis lesion reduced spatial learning in comparison with control and sham groups ($P < 0.001$ for both). There was no effect on spatial learning in vehicle group compared with the lesion group. Treatment with vitamin B12 in groups of lesion + 10 mg/kg vitamin B12 ($P < 0.05$), and lesion + 15 mg/kg vitamin B12 ($P < 0.010$) significantly improved spatial learning. Moreover, no significant difference was observed between the results in the 5th day of training, and memory retention of the 30th day.

Conclusion: Our findings indicated that the bilateral nucleus basalis magnocellularis lesion impaired spatial learning in rats, but vitamin B12 improved the learning in them.

Keywords: Vitamin B12, Spatial learning, Nucleus basalis magnocellularis, Alzheimer's disease

Citation: Zamani N, Moazedi AA, Eskandary A. **The Effects of Vitamin B12 on Spatial Learning and Memory in Adult Male Rats Model of Alzheimer's Disease.** J Isfahan Med Sch 2018; 35(463): 1949-55.

1- Lecturer, Department of Biology, School of Science, Payame Noor University, Tehran AND PhD Student, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Professor, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- PhD Student, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Nastaran Zamani, Email: na_zamani2000@yahoo.com