

ВЛИЯНИЕ НА ROSUVASTATIN ВЪРХУ АКТИВНО ОБУЧЕНИЕ НА ПЛЪХОВЕ С ИНДУЦИРАНА ХИПОКСИЯ

Мария Георгиева-Котетарова, Иванка Костадинова

*Катедра Фармакология и Клинична фармакология, Медицински Факултет,
Медицински Университет-Пловдив, Бул. Васил Априлов 15А, 4002 Пловдив, България
Кореспонденция: mariatgeorgieva@yahoo.com*

EFFECT OF ROSUVASTATIN ON ACTIVE AVOIDANCE TEST IN RATS WITH INDUCED HYPOXIA

Maria Georgieva-Kotetarova, Ivanka Kostadinova

*Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Medical Faculty,
Medical University-Plovdiv, Bul. Vasil Aprilov 15A, 4002 Plovdiv, Bulgaria
Correspondence to: mariatgeorgieva@yahoo.com*

ABSTRACT

Statins are widely used cholesterol-lowering agents that act by inhibiting 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. They have been shown to possess pleiotropic effects— anti-inflammatory, immunomodulatory, neuroprotective. The aim of the present study was to investigate the effect of rosuvastatin on the processes of memory and learning in rats with hypoxia, induced with NaNO₂. Materials and methods: Male Wistar rats were treated orally for 14 days with rosuvastatin in dose 10 mg/kg and 20 mg/kgbw. Control group was treated with saline 1 ml/100 g bw. After that period hypoxia was induced by applying NaNO₂ subcutaneously. Learning ability and memory retention were evaluated using autonomic reflex conditioner (shuttle box) (Ugo Basile, Italy). The following behavioral reactions were investigated with the active avoidance test: conditioned responses (avoidance), unconditioned responses (escapes) and intertrial crossings.. Results: In the active avoidance test both statin-treated groups showed no difference in the number of the conditioned responses during the experiment compared to the same day control group. There was no difference in the number of unconditioned responses of the animals treated with 10 and 20 mg/kg bwrosuvastatin compared to the same day control group. Conclusion: Our results suggest thatrosuvastatin treatment does not reverse the cognitive impairment in rats with hypoxia, induced with NaNO₂.

Key words: statins, neuroprotection, active avoidance, hypoxia, NaNO₂

Въведение

Статините са група лекарствени препарати с широко приложение в клиничната практика. Те са едни от най-често изписваните лекарствени средства при терапията на сърдечно-съдовите заболявания (ССЗ), поради добрата си ефикасност и намаляване на риска от усложнения на ССЗ. Освен липидопонижаващо действие те притежават и плейотропни ефекти като противовъзпалителен, антитромботичен, имуномодулиращ. През последното десетилетие се появяват данни и за невропротективно действие на статините.

При клинични проучвания е установено, че приложението на статини забавя развитието на когнитивен дефицит при пациенти с болестта на Алцхаймер [8] и намалява риска от деменция при възрастни пациенти [3]. Експериментални проучвания доказват благоприятния ефект на статините върху когнитивните функции при модели на съдова деменция, амнезия и травматично мозъчно увреждане[15].

Важна роля в механизма на невропротективното действие на статините играе увеличаването на азотния окис (NO). При формирането на паметта NO се явява ретрограден месинджър, модулира синаптичната функция и засяга както кратко- така и дълготрайната

памят [11]. NO играе съществена роля в няколко мозъчни области, включително церебелума и хипокампа, въввлечени в процесите на обучение и памет [13]. Статините увеличават първоначалната благоприятна продукция на NO от ендотелната азотен окис синтетаза (eNOS) като в същото време намаляват свръхпродукцията на NO от индуцируемата азотен окис синтетаза (iNOS) [4]. Статините могат да увеличат активността на eNOS чрез увеличаване експресията на информационна РНК за eNOS [7], както и да активират протеин киназа В (PKB/Akt), което води до активиране на eNOS [7].

Цел на настоящото проучване е изследване повлияването на процесите на обучение и памет след двуседмичен прием на rosuvastatin при плъхове с модел на хипоксия, индуцирана с NaNO_2 .

Материал и методи

В изследването са използвани 24 бели мъжки плъха порода Wistar със средно тегло 180-200 гр, отглеждани при стандартни лабораторни условия с достъп до храна и вода *ad libitum*. Изследването е одобрено на заседание на етичната комисия при МУ-Пловдив от Българската Агенция по Безопасност на Храните. Животните ежедневно се третират в продължение на две седмици. Разделени са в 3 групи (една контролна и 2 опитни) при $n=8$.

Група I – животни, третирани перорално с физиологичен р-р 1 ml/ 100 g bw

Група II – животни, третирани перорално с rosuvastatin 10 mg/kg bw

Група III – животни, третирани перорално с rosuvastatin 20 mg/kg bw

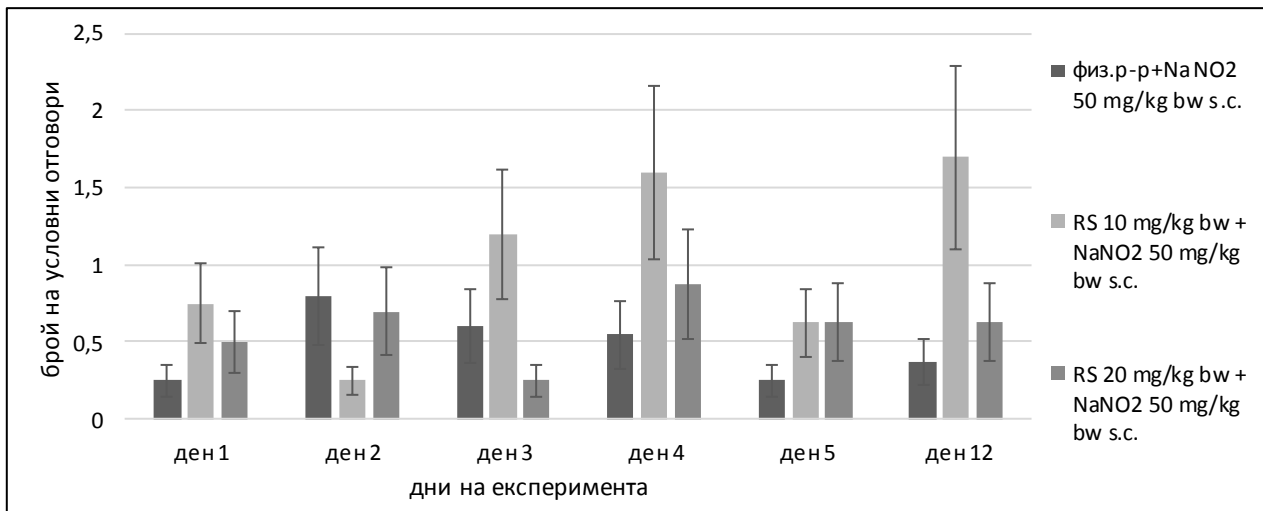
След двуседмичния период започва изследване на когнитивните способности на животните. Ежедневно освен приложението на изследваните вещества, на животните се инжектира субкутанно NaNO_2 в доза 50 mg/kg bw за предизвикване на химична хипоксия.

След 60 минути започва изследване на процесите на обучение и памет на животните чрез стандартен автоматичен апарат за двупосочно избягване (autonomic reflex conditioner) (shuttle box) (Ugo Basile, Italy). Обучителната сесия е с времетраене 5 дни, провеждат се ежедневно по 30 тренировки, всяко от които е съпроводена с 6 секунди светлинен и звуков стимул (670 Hz и 70 dB), като в последните 3 секунди се включва и електростимулация по решетъчния под на клетката (0.4 mA). След всяка тренировка следва 12 секунди междутренировъчна пауза. Седем дни след тази обучителна сесия (на 12^{тия} ден) се провежда едnodневен ретест, за да се проследи съхранението на паметовите следи. Отчетени са следните параметри: брой на условни отговори, брой на безусловните отговори (избягвания), брой на междутренировъчни преминавания [1].

За обработка на данните е използвана статистическа програма SPSS 17.0. За всеки от показателите се определя средна аритметична стойност и стандартно отклонение при степен на достоверност $p \leq 0,05$. За определяне на разпределението е използван непараметричен анализ Komogorov-Smirnov. При равномерно разпределение за анализ на данните е използван параметричен анализ Independent sample T-test. При наличие на неравномерно разпределение е предпочетен непараметричния Two-independent-samples test (Mann-Whitney).

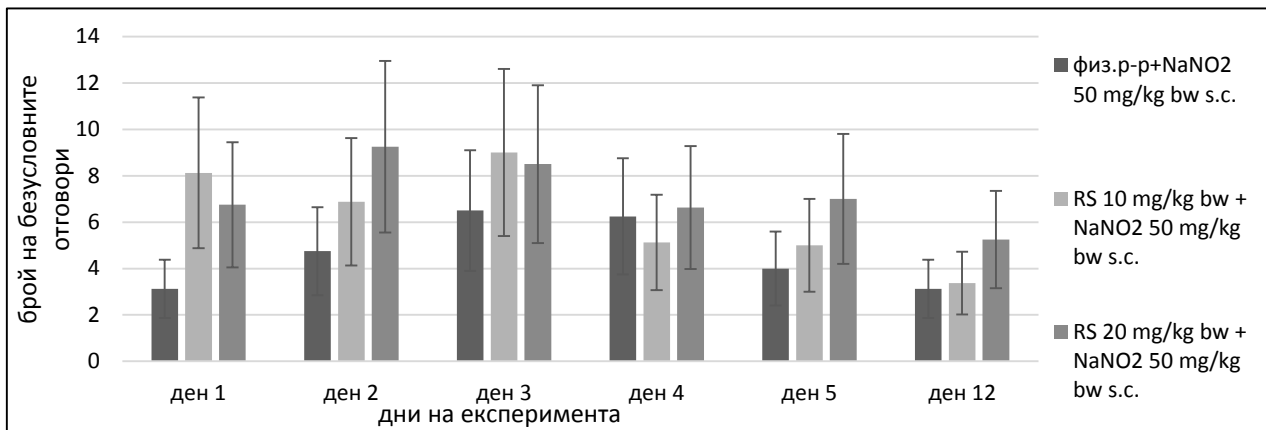
Резултати

При теста за активно обучение при отчитане на показателя брой на условните отговори при контролната група не се наблюдава сигнификантно различие по дни на изследването спрямо първи ден на същата група. Не се установява сигнификантна разлика при групите приемали rosuvastatin 10 и 20 mg/kg bw спрямо контролата по време на обучителната сесия и при теста за наличие на дълготрайна памет (фиг. 1).



Фиг.1 – Ефект на rosuvastatin върху броя на условните отговори при плъхове с химична хипоксия при активно обучение shuttle box

При отчитане на показателя брой на безусловните отговори при контролната група не се наблюдава сигнификантна разлика по дни на изследването спрямо първи ден на същата група. При животните, приемали rosuvastatin в доза 10 и 20 mg/kg bw не се отчита сигнификантна разлика спрямо контролната група по дни на изследването (фиг.2).



Фиг.2 – Ефект на rosuvastatin върху броя на безусловните отговори при плъхове с химична хипоксия при активно обучение shuttle box

При отчитане на броя на междутренировъчните преминавания при третираните животни с rosuvastatin не се установява съществено увеличаване на двигателната активност, което е основание да приемем данните от показателите брой на условните и безусловните отговори за достоверни.

Обсъждане

В достъпната ни литература редица експериментални изследвания установяват подобрене на процесите на обучение и памет при третиране със статини при различни модели на мозъчно увреждане. При предварително третиране със simvastatin 20 mg/kgbw от постнатален ден 1 до постнатален ден 7 при модел на индуцирана хипоксия/исхемия се подобряват когнитивните функции, изследвани при възрастни плъхове с watermaze и radialarmmaze [2Error! Reference source not found.]. При животните с исхемия, третирани със simvastatin се наблюдават и по-малки лезии, както и запазване на невроните във хипокампа[2].

Luetal регистрират намаление на неврологичния дефицит с увеличение на синаптогенезата и ангионезезата след 14-дневно приложение на atorvastatin след травматично мозъчно увреждане (ТБИ)[9]. Наблюдавано е редуциране на невроналната смърт и загубата на невронални процеси в хипокампа в област СА3, която участва при процесите на обучение и памет, както и увеличение на неврогенезата в gyrusdentatus [10]. Намаление на увредата на хипокампа е регистрирана и при мишки, третирани със статини след травматично мозъчно увреждане [16]. Регистрирано е намаление на неврологичния дефицит при животни, третирани със simvastatin и atorvastatin 20 mg/kgbw в продължение на 3 дни след ТБИ, изследвани чрез watermaze тест. Наблюдава се запазване на кратко- и дълготрайната памет [16].

Zhaoetal. изследват повлияването на когнитивните функции от lovastatin при експериментални животни с лезии на nucleusbasalis magnocellularis [17]. Lovastatin предпазва клетките от апоптоза и предпазва невроните от увреждане след четири седмично претретиране в доза 5 mg/kgbw. При watermazetest се установява подобрене в заучаването и възпроизвеждането на задачата [17].

Процесите на обучение и памет са изследвани и при модел на плъхове с пентилтетразоловкиндинг [14]. Субконвулсивни дози pentyltetrazole предизвикват паметов дефицит и по-специално нарушават дълготрайната памет [14]. Atorvastatin след 4-седмично приложение значително е подобрило запазването на дълготрайната памет при пасивно обучение step-through.

При изследване повлияването на когнитивните способности от atorvastatin при мишки със скополамин-индуцирано мозъчно нарушение е установено подобряване на пространственото обучение, както и запазване на краткотрайната памет при пасивно обучение step-through[6].

Невропротективното действие на статините е изследвано и при експериментален модел на невродегенеративно увреждане, предизвикано от пренатално приложение на желязо, което води до когнитивно нарушение при възрастните плъхове. Rechetal. (2010) установяват, че триседмично приложение на rosuvastatin подобрява краткотрайната памет при тест за разпознаване на нови предмети при животните, приемали пренатално желязо и подобрява дълготрайната памет при плъхове с възрастово обусловен когнитивен дефицит [12].

Резултатите от нашето проучване се различават съществено от посочените изследвания. Избраният от нас модел на химична хипоксия, индуцирана с NaNO_2 води до биохимични промени в мозъка, които са близки по процеса на стареенето. Въпреки че в клинични проучвания статините оказват благоприятен ефект върху когнитивните способности на възрастни пациенти, при нашето изследване rosuvastatin в различни дози не подобрява процесите на обучение и памет, проучени чрез активно обучение shuttle box.

Подобни на резултатите, получени при нашето изследване са данните, установени от Douma и сътрудници. Те регистрират, че simvastatin не подобрява поведението при тестовите открито поле, пасивно обучение step-through и търсене на непознати обекти при олфакторнобулбектомирани мишки с когнитивна дисфункция[5].

Моделите за когнитивни нарушения при опитни животни могат да се разглеждат като израз на различна степен на когнитивна дисфункция при пациенти с дементни прояви. Моделът с хипоксия, предизвикана с натриев нитрит и олфакторнобулбектомия могат да се съпоставят с тежки форми на деменция. Върху тези модели статините не подобряват процесите на обучение и памет. Ефект на статините върху когнитивните функции се регистрира при начални форми на деменция със забавяне на проявата на когнитивен дефицит.

Изводи

Rosuvastatin в доза 10 и 20 mg/kg bw след двуседмично приложение не повлиява когнитивната дисфункция при модел на химична хипоксия, индуцирана с NaNO_2

Библиография

1. Делев Д., Костадинов И., Ранни промени в клиничколабораторните показатели, обучението и паметта при изкуствено предизвикана андропауза на мъжки плъхове. Научни трудове на съюза на учените – Пловдив, Секция Медицина, Фармация и Стоматология.
2. Balduino W, De Angelis V, Mazzoni E et al. Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke*. 2001; 32(9):2185-91
3. Bernick, C., Katz, R., Smith, N.L., Rapp, S., Bhadelia, R., Carlson, M. and Kuller, L., Statins and cognitive function in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Neurolog*, 65:1388-1394, 2005.
4. Cimino M, Gelosa P, Gianella A et al. Statins: Multiple mechanisms of action in the ischemic brain. *Neuroscientist*. 2007; 13(3):208-13.
5. Douma TN, Borre Y, Hendriksen H et al. Simvastatin improves learning and memory in control but not in olfactory bulbectomized rats. *Psychopharmacology*. 2011; 216(4):537-544.
6. Javadi-Paydar M, Rayatnia F, Fakhraei N et al. Atorvastatin improved scopolamine-induced impairment in memory acquisition in mice: Involvement of nitric oxide. *Brain Res*. 2011;1386:89-99.
7. Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ. Vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2001; 49(2):281-7.
8. Li, G., Larson, E.B., Sonnen, J.A., Shofer, J.B., Petrie, E.C., Schantz, A., Reskind, E.R., Raskind, M.A., Breitner, J.C. and Montine, T.J., Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. *Neurology*, 69:878-885, 2007.
9. Lu D, Goussev A, Chen J et al. Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis and neuronal survival in rat subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2004; 21:21-32.
10. Lu D, Qu C, Goussev A et al. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region and improve spatial memory learning in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2007; 24(7):1132-46.
11. Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation - a decade of progress? *Science*. 1999; 285(5435):1870-4.
12. Rech RL, de Lima MNM, Dornelles A, et al. Reversal of age-associated memory impairment by rosuvastatin in rats. *Exp Gerontol*. 2010;45(5):351-356.
13. Susswein AJ, Katzoff A, Miller N et al. Nitric oxide and memory. *Neuroscientist*. 2004; 10(2):153-62.
14. Üzümlü G, Akgün-Dar K, Aksu U. The effect of atorvastatin on memory deficit and seizure susceptibility in pentylenetetrazole-kindled rats. *Epilepsy Behav*. 2010; 19(3):284-9.
15. van der Most, P., Dolga, A., Nijholt, I., Luiten, P. and Eisel U., Statins: Mechanisms of neuroprotection. *Prog. Neurobiol*, 88:64-75, 2009.
16. Wang H, Lynch JR, Song P et al. Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2007;206(1):59-69.
17. Zhao Z, Zhao S, Xu N et al. Lovastatin improves neurological outcome after nucleus basalis magnocellularis lesion in rats. *Neuroscience*. 2010; 167(3):954-63.