University of Mosul
College of Veterin ary Medicine

# Assessment of neurobehavior, oxidative stress status and cholinesterase activity in male mice treated with some statins

**Rawnaq Faris Abdulqader Hasan**

**Ph.D. Dissertation**

**Veterinary Medicine / Veterinary Pharmacology**

**Supervised by**

**Professor**

**Dr. Fouad Kasim Mohammad**

**2024 A.D.** **1446 A.H.**

# Abstract

The hypolipidemic statins have been associated with various side effects in humans and laboratory animals. There is limited information on the neurobehavioral cholinergic oxidant/pro-oxidant effects of statins in mice. The present study aimed to examine changes in neurobehavioral performance, cholinesterase (ChE) activity and oxidative stress in mice treated with atorvastatin, simvastatin, and rosuvastatin.

**Materials and Methods:** Male mice were treated orally with various doses of statins (atorvastatin, simvastatin, and rosuvastatin). Control mice were treated with distilled water. Section1: Two hours after vehicle (control) or statin dosing at 250, 500, 750, or 1000 mg/kg, each mouse was subjected to 5 min open-field activity, negative geotaxis at an angle of 45°/60 s, 5 min head pocking, and forced swimming endurance. Plasma, erythrocyte, and brain ChE activities were determined spectrophotometrically at 2 and 24 h after oral dosing of statins at 500 and 1000 mg/kg. Section 2: Mice were dosed with statin single doses at 500 or 1000 mg/kg. Mice were also dosed with repeated daily doses of each statin at 200 mg/kg/day for 14 or 28 days. Brain and plasma glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels, alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), were determined. Section 3: Mice were treated with each statin (200 mg/kg/day) for 28 days. 24 h after the last statin or control dosing, mice were subjected to a pharmacological challenge with propofol at 100 mg/kg, intraperitoneally or to a toxicological challenge with dichlorvos at 150 mg /kg, orally. Propofol anesthesia and dichlorvos cholinergic toxidrome and brain ChE activity were monitored. Section 4: Mice were dosed with each statin at 200 mg/kg/day for 14- and 28 days. 24 h after the last 14- or 28-day dosing, each mouse was tested for neurobehavioral performance and ChE

determination mentioned above. Section 5: In vitro aqueous concentrations of each statin were used on the plasma and whole brain homogenate at concentrations of 0 (baseline-control), 10, 25, 50 or 100 μM. The inhibition of plasma and brain ChE activity was determined electrometrically and spectrophotometrically in the brain together with the determination of generation of oxidative stress (brain MDA).

**Results:** section 1: The statins variably, but dose-dependently and significantly delayed the latency to move in the open-field area, decreased locomotion and rearing, reduced head pocking, and delayed negative geotaxis performance. Statins significantly increased the duration of forced swimming and reduced the duration of swimming immobility.

Statins significantly and dose-dependently decreased plasma, erythrocyte, and brain ChE activity 2 and 24 h after dosing. Section 2: Single statin doses at 500 or 1000 mg/kg significantly and dose-dependently reduced the GSH level in the plasma and the whole brain. Statins at 200 mg/kg/day for 14 or 28 days significantly and time-dependently reduced plasma and brain GSH levels. MDA levels significantly increased in the plasma and brain following single or repetitive dosing. Activities of ALT and AST were also increased in the plasma. Section 3: Statins significantly decreased the onset of propofol sleep and reduced its duration. Statins significantly increased the onset of signs of poisoning, delayed the onset of death and decreased signs of poisoning, toxicity score and death. Statins significantly reduced whole brain ChE activity. Section 4: Repeated statin treatments significantly decreased open-field activities and head pocking, and increased the durations of negative geotaxis and forced swimming endurance with reduction of immobility duration. Plasma, erythrocyte and whole brain ChE activities were significantly reduced. Section 5: Statins at 10 to 100

μM in vitro significantly inhibited plasma and brain ChE activity (determined electrometrically) in a concentration-dependent manner.

Hydrogen peroxide significantly increased brain MDA level In Vitro. Statins at 25 to 100 μM significantly increased MDA level in whole brain homogenates in a concentration-dependent manner. Brain ChE activity, determined spectrophotometrically, by in vitro statins (25 to 100 μM) was significantly inhibited. Hydrogen peroxide also decreased brain homogenate ChE activity by 66.3, 68.7 and 69.8%, respectively.

**Conclusion:** Single and repeated doses of statins differentially modulate neurobehavioral outcomes in mice in association with reduced plasma, erythrocyte, and brain ChE activity. Plasma or erythrocyte ChE may be used for biomonitoring of the adverse/therapeutic effects of statins. Statins induced oxidative stress as adverse effects on the brain and plasma of mice, which suffered from the additional burden of liver injury. The results support pharmacological and toxicological challenges in statin-treated mice to uncover changes in responses to propofol anesthesia and dichlorvos intoxication. These effects could be the basis of in-depth explorations of statin adverse effects in experimental animals and to find an animal model, probably the mice, for the induction of adverse effects of statins that target the brain, as well as to shed light on potential statin intolerance outcomes in this species. As in vitro results complemented the in vivo effects, anti-ChE and oxidative stress effects of statins may be involved in their adverse/pleiotropic actions.

**جامعة الموصل**

**كلية الطب البيطري**

# تقييم السلوك العصبي وحالة الكرب التأكسدي ونشاط إنزيم الكولين إستريز في ذكور الفئران المعاملة ببعض أدوية الاستاتين

**رونق فارس عبدالقادر حسن**

**أطروحة دكتوراه**

**الطب البيطري / الأدوية البيطرية**

بإشراف

**الأستاذ الدكتور**

**فؤاد قاسم محمد**

---

**جمادي الأول/ 1446هـ** **تشرين الثاني/ 2024م**

## الخلاصة

إن أدوية الإستاتينات الخافضة للدهون لها آثار جانبية مختلفة، كما لها تأثيرات متعددة في سلوك البشر وحيوانات المختبر. بالإضافة الى تأثيراتها المؤكسدة/ الأكسدة الكولينية العصبية السلوكية في الفئران. الهدف من هذه الدراسة هو فحص التغيرات السلوكية العصبية ونشاط الكولين إستريز (ChE) والإجهاد التأكسدي في نموذج الفئران المعاملة بالأتورفاستاتين، والسيمفاستاتين، والروزوفاستاتين.

أستخدمت ذكور فئران من أصل سويسري، وتم معاملتها عن طريق الفم بجرع مختلفة من الإستاتينات (أتورفاستاتين، سيمفاستاتين، وروزوفاستاتين). أعطيت فئران السيطرة ماء مقطر.

**القسم 1:** بعد ساعتين من إعطاء جرعة الماء المقطر أو الإستاتينات بجرع 250 أو 500 أو 750 أو 1000 ملغم / كغم، أخذ كل فأر لوحده لأداء السلوك العصبي والذي تمثل أدائه في الميدان المفتوح لمدة 5 دقائق، إختبارالإنتحاء الأرضي السالب بزاوية 45 درجة / لمدة60 ثانية، إختبارإدخال الرأس في الثقوب لمدة 5 دقائق ، و إختبار تحمل السباحة القسري.

تم تحديد نشاط إنزيم الكولين إستريز في البلازما وكريات الدم الحمراء والدماغ باستخدام جهاز المطياف الضوئي بعد 2 و 24 ساعة بعد أخذ جرع الإستاتينات 500 و 1000 ملغم / كغم عن طريق الفم.

**القسم 2:** أعطيت الفئران جرع مفردة من الإستاتينات 500 أو 1000 ملغم / كغم. كما تم إعطاء الفئران جرع يومية متكررة من كل إستاتين بمقدار 200 ملغم / كغم / يوم لمدة 14 أو 28 يومًا. حددت مستويات الكلوتاثيون (GSH) والمالونديالديهايد (MDA) في الدماغ والبلازما، بالإضافة إلى قياس مستوى إنزيمات الكبد ألانين امينوترانسفيريز (ALT) وأسبارتات امينوترانسفيريز (AST) .

**القسم3:** عوملت الفئران بالإستاتينات (200 ملغم / كغم / يوم) لمدة 28 يومًا، وبعد 24 ساعة من آخر جرعة إستاتين أو الماء المقطر خضعت الفئران للتحدي الدوائي بعد حقنها بالبروبوفول بجرعة 100 ملغم / كغم في الخلب، أو للتحدي السمي باستخدام الدايكلوروفوس بجرعة 150 ملغم / 10 مل ماء مقطر / كغم، عن طريق الفم. تمت مراقبة تخدير البروبوفول والتسمم الكوليني ونشاط إنزيم الكولين استريز في الدماغ الناجم عن الدايكلوروفوس.

**القسم 4:** جرعت الفئران كل إستاتين بمقدار 200 ملغم / كغم /يوم لمدة 14 و28 يومًا، وبعد 24 ساعة من آخر جرعة تم اختبار كل فأر لوحده لأداء السلوك العصبي وقياس نشاط إنزيم الكولين استريز المذكور أعلاه.

**القسم 5:** أُستخدمت تراكيز مائية في المختبر لكل إستاتين على البلازما وجانسة الدماغ بتراكيز تراوحت 0 (السيطرة) أو 10 أو 25 أو 50 أو 100 مايكرومولار. حُدد تثبيط نشاط إنزيم الكولين استريز في البلازما والدماغ بالطريقة الكهرومترية بالإضافة إلى الطريقة اللونية بإستخدام جهاز المطياف الضوئي جنبًا إلى جنب ، فضلا عن معرفة أمكانية الإستاتينات في إحداث الإجهاد التأكسدي من خلال قياس تركيز المالونديالديهايد (MDA) في الدماغ.

**النتائج:**

**القسم 1:** أدت الإستاتينات اعتمادًا على الجرعة بشكل متفاوت ، إلى تأخير زمن الحركة في إختبار الميدان المفتوح، وقلة الحركة وعدد مرات الوقوف على القوائم الخلفية، وقلة عدد مرات إدخال الرأس في الثقوب ، والتأخير في أداء إختبار الإنتحاء الأرضي السالب . كما زادت الإستاتينات من مدة السباحة القسرية وقللت من مدة عدم الحركة في حوض السباحة. وبالإعتماد على الجرعة قللت الإستاتينات نشاط إنزيم الكولين إستريز في البلازما وكريات الدم الحمراء والدماغ للفئران بعد ساعتين و24 ساعة من تناول الجرعة.

**القسم 2:** أدت جرع الإستاتينات المفردة بجرعة 500 أو 1000 ملغم/كغم وبالإعتماد على الجرعة إلى تقليل تركيز الكلوتاثيون في البلازما والدماغ. أدى الإعطاء المتكرر لكل إستاتين بجرعة 200 ملغم/كغم / يوم لمدة 14 أو 28 يومًا وبالإعتماد على الوقت إلى تقليل مستويات GSH في البلازما والدماغ . بينما أدت إلى زيادة تركيز MDA بشكل كبير في البلازما والدماغ بعد جرعة واحدة أو متكررة من الإستاتينات، . كما أدت إلى زيادة في تركيز ALT و ASTفي البلازما.

**القسم 3:** عملت الإستاتينات على تقليل وقت بدء النوم الناتج عن تناول البروبوفول بشكل واضح وخفضت مدته، كما عملت الإستاتينات على زيادة ظهور علامات التسمم بشكل واضح، وأخرت ظهور الموت وقللت من علامات التسمم ودرجة السمية والموت. كما عملت الإستاتينات على تقليل نشاط إنزيم الكولين استريز في الدماغ .

**القسم 4:** أدت المعاملة المتكررة لكل إستاتين إلى قلة نشاط الفئران المعاملة في إختبار الميدان المفتوح و قلة عدد مرات إدخال الرأس في الثقوب ، والتأخير في وقت أداء إختبار الإنتحاء الأرضي السالب وزيادة المدة الزمنية لإختبار تحمل السباحة القسري مع التقليل في وقت عدم الحركة، كما أدت إلى نقصان في نشاط إنزيم الكولين إستريز في البلازما وكريات الدم الحمراء والدماغ .

**القسم 5:** أدت الإستاتينات بتركيز 10- 100 مايكرومول في المختبر بالإعتماد على التركيز إلى تثبيط نشاط إنزيم الكولين إستريز في البلازما والدماغ (الطريقة الكهرومترية). زاد بيروكسيد الهيدروجين بشكل ملحوظ من تركيز MDA في الدماغ. كما زادت الإستاتينات بتركيز 25 - 100 مايكرومول بالإعتماد على تركيز MDA في جانسات الدماغ، ثبط نشاط إنزيم الكولين إستريز ولوحظ زيادة كبيرة في تركيزMDA في الدماغ، باستخدام الإستاتينات عند التراكيز من 25 إلى 100 مايكرومول في المختبر وبالإعتماد على التركيز باستخدام جهازالمطياف الضوئي وتقنية الاليزا. كما قلل بيروكسيد الهيدروجين من نشاط إنزيم الكولين إستريز في الدماغ بالنسب (66.3٪و 68.7٪و 69.8٪) على التوالي.

نستنتج إن الجرع المفردة والمتكررة من الإستاتينات تعمل على تغيير نتائج السلوك العصبي بشكل مختلف في الفئران بالتزامن مع انخفاض نشاط إنزيم الكولين إستريز في البلازما وكريات الدم الحمراء والدماغ. ويمكن الإستفادة من نشاط إنزيم الكولين إستريز في البلازما أو كريات الدم الحمراء في المراقبة الحيوية للآثار الجانبية/العلاجية للإستاتينات. وقد تسببت الإستاتينات في إحداث إجهاد تأكسدي كآثار ضارة في الدماغ وبلازما الفئران، فضلا عن تأثيرها الضار على الكبد. وتدعم النتائج التحديات الدوائية والسمية في الفئران المعاملة بالإستاتينات للكشف عن التغيرات في الاستجابة للتخدير بالبروبوفول والتسمم بالدايكلوروفوس. وبشكل عام، تعتبر هذه التأثيرات أساسًا لاستكشافات واسعة للآثار الضارة للإستاتينات في الحيوانات التجريبية ولإيجاد نموذج حيواني، ربما الفئران، لتحريض الآثار الضارة للإستاتينات التي تستهدف الدماغ، فضلاً عن تسليط الضوء على نتائج إحتمالية عدم تحمل الإستاتينات المستخدمة في هذه الدراسة في هذا النوع من الحيوانات المختبرية. كما أن النتائج المختبرية تدعم تأثيرات الإستاتينات في الجسم الحي، فإن التأثيرات المضادة لإنزيم الكولين إستريز والإجهاد التأكسدي للإستاتينات قد تكون لها علاقة بتأثيراتها الضارة أوالسمية.