IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۱ (۳)، ۱۷۵- ۱٦٦ پاییز ۱۳۹٦

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات محافظت عصبی مینوسیکلین بر آسیب حافظه متعاقب ایسکمی مغزی ناشی از انسداد گذرای دو طرفه شریان کاروتید مشترک در موش صحرایی

یزدان نادری، سیاوش پرورده، ترانه معینی زنجانی، معصومه ثابت‌کسایی*

گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۱۰ خرداد ۹۴ پذیرش: ۳۰ آذر ۹۴

چکیده

مقدمه: اختلال در حافظه فضایی و یادگیری اغلب به دنبال ایسکمی مغزی مشاهده می شود. هیپوکامپ و کورتکس حساس ترین قسمت های مغز در برابر ایسکمی هستند. استرس اکسیداتیو و التهاب پس از ایسکمی مغزی باعث آسیب به نورون های هیپوکامپ و کورتکس و در نتیجه اختلال در حافظه فضایی و یادگیری می‌شوند. مینوسیکلین دارای اثرات ضد التهاب و آنتی اکسیدان می باشد و در این مطالعه اثرات محافظتی آن در برابر آسیب حافظه ناشی از ایسکمی مغزی درموش صحرایی بررسی شد.

روش‌ها: برای ایجاد ایسکمی مغزی از انسداد موقت ۲۰ دقیقه ای در شریان های کاروتید مشترک موش صحرایی استفاده شد. ۶۰ سر موش صحرایی از نژاد ویستار به ۶ گروه (در هر گروه ۱۰ موش) تقسیم شدند. برای هر روش تجویز دارو (قبل و بعد از ایسکمی) ۳ گروه حیوان بررسی گردید: ۱- گروه sham: تمام مراحل جراحی به جز انسداد شریان کاروتید مشترک انجام شد و سالین (حلال دارو) ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی یا روز های صفر تا ۶ بعد از جراحی (دو بار در روز ، هر ۱۲ ساعت) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۲- گروه کنترل: انسداد گذرای شریان کاروتید مشترک و تزریق سالین به صورت داخل صفاقی ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی یا روزهای صفر تا ۶ بعد از ایسکمی (دو بار در روز ، هر ۱۲ ساعت)، انجام شد. ۳- گروه مینوسیکلین: انسداد گذرای شریان کاروتید مشترک انجام شد. مینوسیکلین (۴۰ mg/kg)، به صورت تک دوز ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی/ ریپرفیوژن یا دو بار در روز (هر ۱۲ ساعت) درروزهای صفر تا ۶ بعد از ایسکمی/ ریپرفیوژن به صورت داخل صفاقی تزریق شد. حافظه فضایی و یادگیری حیوانات ۳ گروه با استفاده از آزمون Morris water maze ارزیابی شد.

یافته‌ها: تجویز مینوسیکلین (قبل و بعد از ایسکمی/ ریپرفیوژن)، زمان تاخیر فرار (Scape latency time) و مسافت طی شده تا رسیدن به سکوی پنهان را در مقایسه با گروه کنترل به میزان قابل ملاحظه ای کاهش داد . همچنین زمان سپری شده در ربع هدف (Time spent in target quadrant)، در مقایسه با گروه کنترل به میزان قابل ملاحظه ای افزایش پیدا کرد. ایسکمی/ ریپرفیوژن در گروه کنترل و تجویز مینوسیکلین (قبل و بعد از ایسکمی/ ریپرفیوژن) تغییر قابل ملاحظه ای در سرعت حرکت حیوان در روزهای اول تا چهارم (trial) و روز پنجم (آزمون Probe) ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: مینوسیکلین در کاهش آسیب حافظه فضایی و یادگیری ناشی از ایسکمی مغزی گذرا در موش صحرایی موثر است.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی مغزی، حافظه فضایی، ماز آبی موریس، مینوسیکلین

مقدمه

سکته مغزی شایع‌ترین بیماری نورولوژیک تهدیدکننده زندگی و سومین علت مرگ و میر بعد از بیماری‌های قلبی و سرطان در آمریکا است [۱، ۲] . به طور کلی می‌توان علل بروز سکته مغزی را به دو گروه ایسکمیک و هموراژیک تقسیم‌بندی کرد [۳-۱]. برای بررسی اثرات ایسکمی از مدل‌های مختلف مانند انسداد گذرای دو طرفه شریان‌های کاروتید مشترک در رت استفاده می‌شود [۳، ۴] . اختلال در یادگیری و حافظه فضایی در اغلب بیمارانی که دچار ایسکمی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: fkasaei@yahoo.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

مغزی می‌شوند مشاهده می‌گردد [۴، ۵]. هیپوکامپ و کورتکس که در حافظه نقش دارند حساس‌ترین قسمت های مغز در برابر ایسکمی هستند [۲، ۳]. در واقع به دنبال ایسکمی مغزی نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ که در حافظه نقش دارند دچار آسیب می‌شوند [۵]. در مورد علت آسیب حافظه به دنبال ایسکمی مغزی مکانیسم‌های متعددی بیان شده است که از مهمترین آن‌ها می توان به التهاب، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز اشاره کرد [۷-۵]. آزادسازی سیتوکین های التهابی و رادیکال‌های آزاد اکسیژن در آسیب نورون های هیپوکامپ و اختلال در حافظه پس از ایسکمی مغزی نقش مهمی دارند [۱۱-۸]. بنابراین استفاده از عوامل آنتی اکسیدان و ضد التهاب برای پیشگیری و بهبود حافظه پس از ایسکمی مغزی مطرح می باشد [۱۲، ۱۳]. مینوسیکلین یک مشتق نیمه سنتتیک تتراسیکلین است که به عنوان آنتی بیوتیک در برخی بیماری‌های عفونی تجویز شده [۱۴] و دارای اثرات آنتی اکسیدان [۱۶-۱۴]. و ضد التهاب [۱۹-۱۷] می‌باشد.

در این مطالعه اثرات محافظتی مینوسیکلین در برابر آسیب حافظه فضایی و یادگیری به دنبال ایسکمی/ریپرفیوژن در رت بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات و داروها

تعداد ۶۰ سر موش صحرایی از نژاد ویستار با محدوده وزنی بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم تهیه شد. حیوانات قبل و بعد از مراحل آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی داشته و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مینوسیکلین، کتامین و زایلازین از شرکت سیگما خریداری شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه شهید بهشتی انجام شد.

روش انجام آزمایش

در این مطالعه مینوسیکلین از نظر زمان و مدت تجویز به دو روش تجویز شد: ۱- تزریق داخل صفاقی مینوسیکلین (۴۰ mg/kg, i.p.) به صورت تک دوز، ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی/ریپرفیوژن [۱۶]، ۲- تزریق داخل صفاقی مینوسیکلین (۴۰ mg/kg, i.p.) دو بار در روز (هر ۱۲ ساعت) در روزهای صفر تا ۶ پس از ایسکمی [۱۶]. در هر یک از دو روش تجویز، ۳ گروه آزمایشی شامل sham، کنترل و مینوسیکلین و ۱۰ موش در هر گروه وجود داشت. ۱- گروه sham: تمام مراحل جراحی به جز انسداد شریان کاروتید انجام شد. سالین (حلال دارو)، ۲۴ ساعت قبل یا روز های صفر تا ۶ بعد از ایسکمی (دو بار در روز، هر ۱۲ ساعت) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۲- گروه کنترل: ایسکمی مغزی گذرا به مدت ۲۰ دقیقه به روش انسداد دو طرفه شریان کاروتید مشترک اعمال شد. سالین (حلال دارو)، ۲۴ ساعت قبل یا روز های صفر تا ۶ پس از ایسکمی (دو بار در روز، هر ۱۲ ساعت) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۳-گروه مینوسیکلین: ایسکمی مغزی گذرا به مدت ۲۰ دقیقه به روش انسداد دو طرفه شریان کاروتید مشترک، اعمال شد. مینوسیکلین (۴۰ mg/kg, i.p.)، به صورت تک دوز ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی یا دو بار در روز (هر ۱۲ ساعت)، در روزهای صفر تا ۶ پس از ایسکمی به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۱۶] .

ایسکمی مغزی گذرا به روش انسداد دو طرفه شریان های کاروتید مشترک

موش‌های صحرایی توسط کتامین (۱۰۰ mg/kg, i.p.) و زایلازین (۱۰ mg/kg, i.p.) بی هوش شدند. سپس از طریق یک برش در ناحیه قدامی گردن شریان های کاروتید مشترک در دو طرف پیدا و به دقت از اعصاب واگ جدا شد. این شریان ها به مدت ۲۰ دقیقه توسط کلامپ میکروسرجری بسته شدند. بعد از ۲۰ دقیقه کلامپ ها باز شده و جریان خون دوباره برقرار شد. پس از جراحی حیوانات در قفس های جداگانه نگه داری شدند [۲۰].

ماز آبی موریس

هفت روز پس از ایسکمی/ریپرفیوژن، حافظه فضایی و یادگیری حیوان توسط ماز آبی موریس ارزیابی شد. ماز آبی، شامل مخزن آب به قطر۱۲۰ و ارتفاع ۶۰ سانتیمتر بود که تا ارتفاع ۵۰ سانتی متری از آب پر شد. سطح آب در مخزن ۱/۵ سانتیمتر بالاتر از سطح سکوی فرار بود. موقعیت سکو در تمام روز های آزمایش و روز آزمون ثابت بود. دمای آب برابر با ۲۵ درجه سانتی گراد بود و برای ممانعت از دیده شدن سکو، آب مخزن با شیر، کدر شد. در طول آزمایش، شنا کردن رت ها توسط دوربین تعبیه شده در قسمت بالای ناحیه مرکزی مخزن،

ردیابی می شد. ماز آبی به چهار ربع فرضی با چهار نقطه به آب‌اندازی حیوان به نام های شمال (N) شرق (E) جنوب (S) و غرب (W) تقسیم شد.

کل آزمایش شامل ۴ روز آموزش (trial days) و یک probe trial در روز پنجم بود. هر موش به مدت ۴ روز تحت آموزش قرار می گرفت. هر روز شامل یک بلوک و هر بلوک شامل ۴ تجربه بود. در هر تجربه حیوان به طوری که صورتش رو به طرف دیوار حوضچه باشد از یکی از چهار نقطه شروع در آب رها می شد. هر یک از چهار نقطه شروع (S, N, E, W) در هر بلاک یک بار استفاده می شد و ترتیب آن در هر روز به صورت تصادفی تعیین می شد. به هر موش ۶۰ ثانیه فرصت داده می شد که با شنا کردن محل سکوی زیر آب را پیدا کند. موش ها پس از پیدا کردن سکو و قرار گرفتن بر روی آن اجازه می یافتند که۳۰ ثانیه روی سکو بمانند. اگر موش ها در طی ۶۰ ثانیه محل سکو را پیدا نمی کردند به آرامی روی سکو هدایت شده و ۳۰ ثانیه روی آن می ماندند. با این کار محل قرار گرفتن سکوی پنهان در زیر آب به موش ها آموزش داده می شد. مدت زمان سپری شده تا پیدا کردن سکوی پنهان، مسافت طی شده تا رسیدن به سکوی پنهان و سرعت حرکت حیوان در روز های ۱ تا ۴ با استفاده از نرم افزار Ethovision 3.1 اندازه گیری شد.

در روز پنجم یک مرحله Probe trial انجام شد. به این صورت که بعد از برداشتن سکو حیوان به صورت تصادفی از یکی از جهات درون ماز رها شد. به حیوان ۶۰ ثانیه زمان داده شد که درون مخزن شنا کند. مدت زمان ماندن در ربع محل قرار گیری سکو (ربع هدف یا ربع صحیح) و سرعت حرکت حیوان در روز پنجم با استفاده از نرم افزار Ethovision 3.1 اندازه گیری شد.

آنالیز آماری

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. تجزیه و تحلیل داده و رسم نمودار در روزهای ۱ تا ۴ trial توسط نرم افزار Graphpad prism 5 و آزمون Repeated measures ANOVA برای مقایسه بین گروه ها در روز های مختلف انجام شد. مقایسه بین گروه ها در یک روز و مقایسه بین گروه ها در روز پروب با استفاده از آزمون One way ANOVA انجام شد. $p < ۰/۰۵$ سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

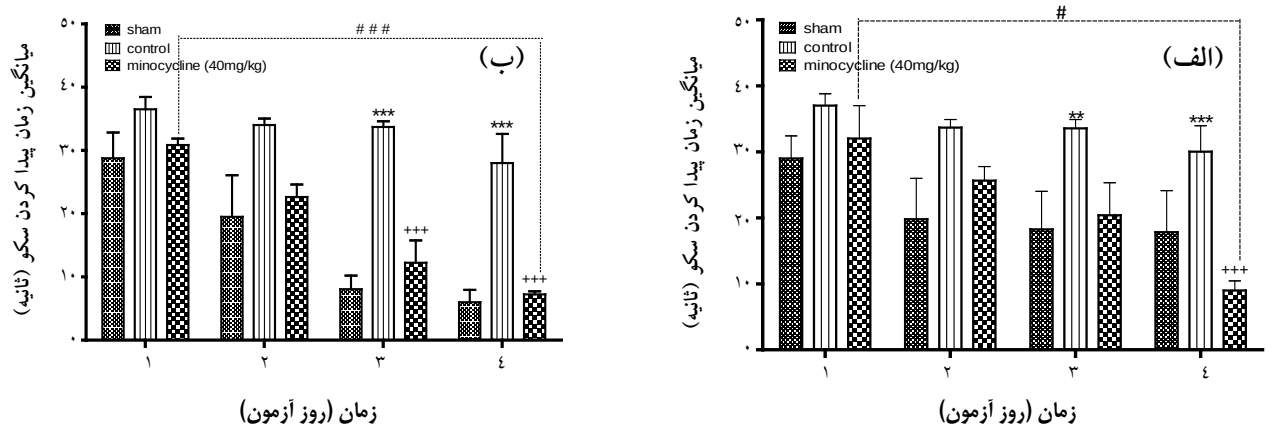
اثر مینوسیکلین (۴۰ mg/kg, i.p.) در تجویز تک دوز، ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی مغزی، برمیانگین مدت زمان سپری شده برای پیدا کردن سکوی پنهان: در روزهای سوم ($p < ۰/۰۱$) و چهارم ($p < ۰/۰۰۱$) آزمون، در گروه کنترل ایسکمی مغزی باعث افزایش معنی دار زمان سپری شده در یافتن سکوی پنهان نسبت به گروه sham گردید (نمودار ۱الف). میانگین زمان یافتن سکو در روز چهارم در گروه مینوسیکلین در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنادار ($p < ۰/۰۰۱$) دارد. همچنین میانگین زمان سپری شده برای پیدا کردن سکوی پنهان برای گروه مینوسیکلین در روز چهارم در مقایسه با روز اول به طور معناداری کاهش پیدا کرد ($p< ۰/۰۵$، نمودار ۱الف).

اثر مینوسیکلین (۴۰ mg/kg, i.p.، هر ۱۲ ساعت) در تجویز بعد از ایسکمی مغزی (روز صفر تا ٦)، برمیانگین مدت زمان سپری شده برای پیدا کردن سکوی پنهان

ایسکمی مغزی در گروه کنترل باعث افزایش معنا دار زمان سپری شده در یافتن سکوی پنهان در روزهای سوم و چهارم نسبت به گروه sham ($p < ۰/۰۰۱$، نمودار ۱ب) شد. این در حالی است که تجویز مینوسیکلین در روزهای صفر تا ۶ بعد از ایسکمی باعث کاهش زمان سپری شده در یافتن سکوی پنهان در روز های سوم و چهارم آزمون در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < ۰/۰۰۱$، نمودار ۱ب). همچنین میانگین زمان یافتن سکو در روز چهارم در مقایسه با روز اول در گروه مینوسیکلین ($p < ۰/۰۰۱$) به طور معناداری کاهش پیدا کرد (نمودار ۱ب).

اثر مینوسیکلین (۴۰ mg/kg, i.p.) در تجویز تک دوز، ٢٤ ساعت قبل از ایسکمی مغزی، بر میانگین مسافت طی شده برای پیدا کردن سکوی پنهان

در روزهای اول تا چهارم در گروه کنترل ایسکمی مغزی باعث افزایش معنا دار در مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان نسبت به گروه sham ($p < ۰/۰۰۱$، نمودار ۲الف) گردید. این در حالی است که تجویز مینوسیکلین ۲۴ ساعت قبل



نمودار ۱– اثرات ایسکمی/ریپرفیوژن و تجویز مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ۴۰) تک دوز، ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی/ ریپرفیوژن (الف)، یا دو بار در روز هر ۱۲ ساعت، در روزهای صفر تا ۶ پس از ایسکمی/ریپرفیوژن (ب)، بر میانگین زمان پیدا کردن سکوی پنهان (ثانیه) در روزهای اول تا چهارم در موش صحرایی. در تجویز تک دوز دارو ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی/ریپرفیوژن، در روزهای سوم ($p < ۰/۰۱$: **) و چهارم ($p < ۰/۰۰۱$: ***) میانگین زمان پیدا کردن سکو در گروه کنترل در مقایسه با sham اختلاف معنادار دارد. میانگین زمان یافتن سکو در روز چهارم در گروه مینوسیکلین ($p < ۰/۰۰۱$: +++) در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنادار دارد. همچنین میانگین زمان سپری شده برای پیدا کردن سکوی فرار برای گروه مینوسیکلین ($p < ۰/۰۵$, #) در روز ۴ در مقایسه با روز ۱ به طور معناداری کاهش پیدا کرد. در تجویز دارو پس از ایسکمی/ریپرفیوژن (ب)، در روزهای سوم و چهارم، میانگین زمان برای پیدا کردن سکو در گروه sham در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۰۱$: ***). میانگین زمان یافتن سکو در روز سوم و چهارم در گروه مینوسیکلین در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۰۱$: +++). همچنین میانگین زمان سپری شده برای پیدا کردن سکوی پنهان برای گروه مینوسیکلین ($p < ۰/۰۰۱$:###) در روز ۴ در مقایسه با روز ۱ به طور معناداری کاهش پیدا کرد. n = ۱۰ ، داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است و $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

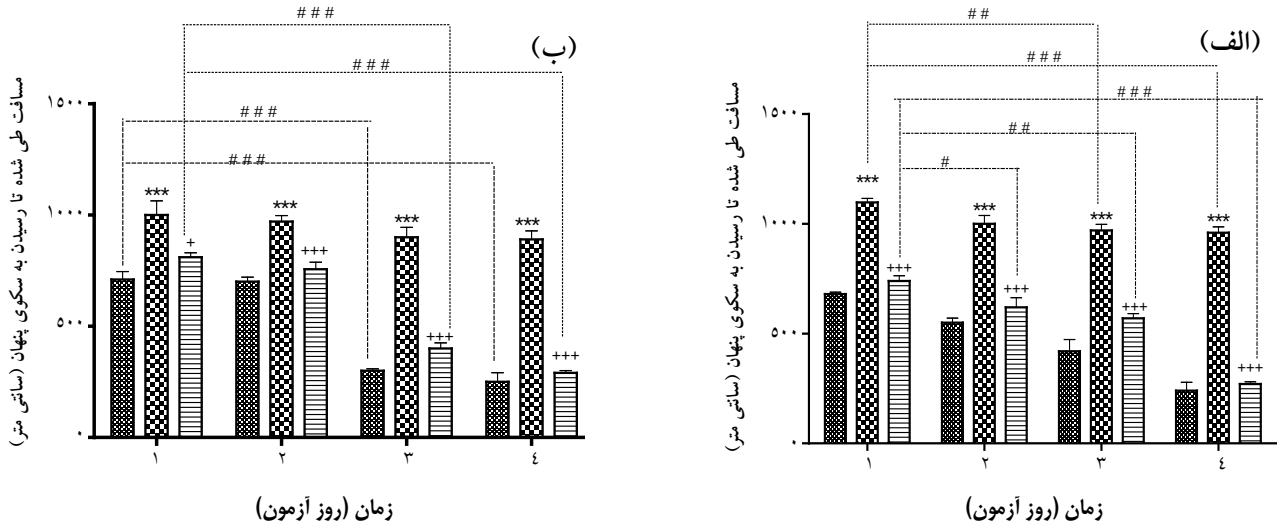
از ایسکمی باعث کاهش مسافت طی شده برای پیدا کردن سکوی پنهان در روز های اول تا چهارم آزمون (روزهای trial) در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < ۰/۰۰۱$، نمودار ۲الف). همچنین میانگین مسافت طی شده در روز دوم در گروه مینوسیکلین ($p < ۰/۰۵$) و روز سوم در گروه های sham ($p < ۰/۰۱$) و مینوسیکلین ($p < ۰/۰۱$) و روز چهارم در گروه های sham و مینوسیکلین ($p < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با روز اول به طور معناداری کاهش پیدا کرد (نمودار ۲الف).

اثر مینوسیکلین (.mg/kg, i.p۴۰، هر ۱۲ ساعت) در تجویز بعد از ایسکمی مغزی (روزهای صفر تا ٦)، بر میانگین مسافت طی شده برای پیدا کردن سکوی پنهان

در روزهای اول تا چهارم ایسکمی مغزی در گروه کنترل باعث افزایش معنا دار در مسافت طی شده برای یافتن سکوی پنهان نسبت به گروه sham گردید ($p < ۰/۰۰۱$) (نمودار ۲ب). این در حالی است که تجویز مینوسیکلین در روزهای صفر تا ۶ پس از ایسکمی باعث کاهش مسافت طی شده برای پیدا کردن سکوی پنهان در روزهای اول ($p < ۰/۰۵$)، دوم ($p < ۰/۰۰۱$)، سوم ($p < ۰/۰۰۱$)، و چهارم ($p < ۰/۰۰۱$) آزمون در مقایسه با گروه کنترل شد (نمودار ۲ب) . همچنین میانگین مسافت طی شده در روز سوم و چهارم در مقایسه با روز اول در گروه sham و مینوسیکلین به طور معناداری کاهش پیدا کرد ($p < ۰/۰۰۱$، نمودار ۲ب).

اثر مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ٤۰) در تجویز تک دوز، ٢٤ ساعت قبل از ایسکمی مغزی، برمیانگین سرعت حرکت حیوان تا رسیدن به سکوی پنهان در روز های ۱ تا ٤ (روزهای trial) و روز پنجم (روز پروب)

ایسکمی مغزی در روزهای اول و دوم باعث افزایش معنادار درمیانگین سرعت حرکت حیوان در گروه کنترل در مقایسه با گروه sham شد ($p < ۰/۰۱$، نمودار ۳الف) اما در روزهای سوم و چهارم ایسکمی مغزی در گروه کنترل تغییر معناداری در میانگین سرعت حرکت حیوان در مقایسه با گروه sham ایجاد نکرد ($p > ۰/۰۵$). در روز پنجم (روز پروب) ایسکمی مغزی در گروه کنترل تغییر معناداری در میانگین سرعت حرکت حیوان در مقایسه با گروه sham ایجاد نکرد ($p > ۰/۰۵$، نمودار ۳الف). تجویز مینوسیکلین ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی باعث افزایش معنادار در میانگین سرعت حرکت حیوان در روز اول ($p < ۰/۰۱$) در مقایسه با گروه کنترل شد (نمودار ۳الف). این در حالی است که تجویز مینوسیکلین تاثیر معناداری در میانگین



نمودار ۲– اثرات ایسکمی/ریپرفیوژن و تجویز مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ۴۰) تک دوز، ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی/ریپرفیوژن (الف)، یا دو بار در روز هر ۱۲ ساعت، در روزهای صفر تا ۶ پس از ایسکمی/ریپرفیوژن (ب)، بر میانگین مسافت طی شده برای پیدا کردن سکوی پنهان (بر حسب سانتی متر) در روزهای اول تا چهارم در موش صحرایی. در تجویز تک دوز دارو ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی / ریپرفیوژن (الف)، در روزهای اول تا چهارم میانگین مسافت طی شده در گروه کنترل در مقایسه با گروه sham اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۰۱$: ***). میانگین مسافت طی شده در گروه مینوسیکلین در مقایسه با گروه کنترل در روزهای اول تا چهارم اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۰۱$: +++) . میانگین مسافت طی شده در روز دوم در مقایسه با روز اول در گروه مینوسیکلین ($p < ۰/۰۵$:#) اختلاف معنادار دارد. میانگین مسافت طی شده در روز سوم در مقایسه با روز اول در گروه sham ($p <۰/۰۱$:# #) و گروه مینوسیکلین ($p < ۰/۰۱$: # #) اختلاف معنادار دارد. در روز چهارم در مقایسه با روز اول میانگین مسافت طی شده در گروه sham و مینوسیکلین اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۰۱$: # # #). در تجویز دارو پس از ایسکمی/ریپرفیوژن (ب)، در روزهای اول تا چهارم میانگین مسافت طی شده در گروه کنترل در مقایسه با گروه sham اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۰۱$: ***). میانگین مسافت طی شده در گروه مینوسیکلین در مقایسه با گروه کنترل در روز اول ($p <۰/۰۵$:+) و در روزهای دوم تا چهارم ($p <۰/۰۰۱$: +++) اختلاف معنادار دارد. در روز دوم در مقایسه با روز اول اختلاف معناداری در گروه sham و مینوسیکلین مشاهده نشد. میانگین مسافت طی شده در روز سوم و چهارم در مقایسه با روز اول در گروه sham و مینوسیکلین اختلاف معناداری دارد ($p <۰/۰۰۱$: # # #). n=۱۰ ، داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد. sham، control، (mg/kg ۴۰ مینوسیکلین).

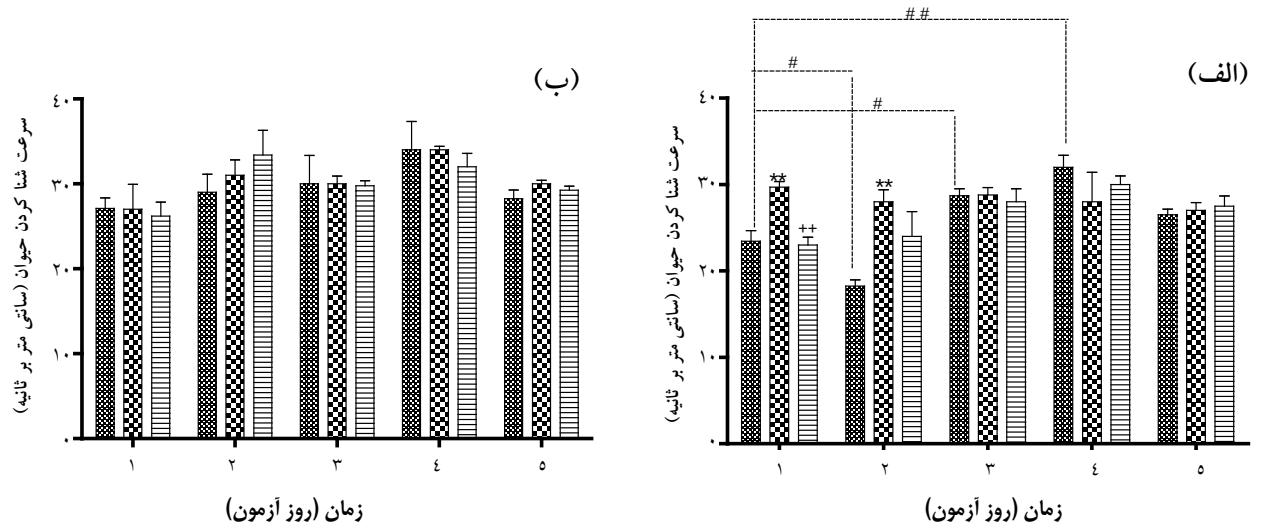
سرعت حرکت حیوان در روزهای دوم تا چهارم و روز پنجم آزمون پروب) در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد (نمودار ۳الف). همچنین میانگین سرعت حرکت حیوان در گروه sham در روزهای دوم ($p < ۰/۰۵$) و سوم ($p < ۰/۰۵$) و چهارم ($p < ۰/۰۱$) در مقایسه با روز اول اختلاف معنادار داشت. اما در سایر گروه ها در روزهای دوم تا چهارم و روز پنجم اختلاف معناداری با روز اول نداشت ($p > ۰/۰۵$، نمودار ۳الف).

اثر مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ٤٠، هر ١٢ ساعت) در تجویز بعد از ایسکمی مغزی (روزهای صفر تا ٦)، بر میانگین سرعت حرکت حیوان تا رسیدن به سکوی پنهان در روز های ١ تا ٤ (روزهای trial) و روز پنجم (روز پروب)

ایسکمی مغزی تغییر معناداری در میانگین سرعت حرکت حیوان در گروه کنترل در مقایسه با گروه sham در روز های اول تا چهارم (روزهای trial) و روز پنجم (آزمون پروب) ایجاد نکرد ($p > ۰/۰۵$، نمودار ۳ب). همچنین تجویز مینوسیکلین بعد از ایسکمی مغزی در مقایسه با گروه کنترل تغییر معناداری در میانگین سرعت حرکت حیوان در روز های اول تا چهارم (روزهای trial) و روز پنجم (آزمون پروب) ایجاد نکرد ($p > ۰/۰۵$، نمودار ۳ب). همچنین در روز های دوم، سوم و چهارم (روزهای trial) و روز پنجم (آزمون پروب) در مقایسه با روز اول تغییر معناداری در میانگین سرعت حرکت حیوان در هیچ یک از گروه ها ایجاد نشد ($p > ۰/۰۵$، نمودار ۳ب).

اثر مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ٤٠) در تجویز تک دوز، ٢٤ ساعت قبل از ایسکمی مغزی، بر مدت زمان حضور در ربع هدف یا ربع صحیح (یک چهارم مخزن که سکوی فرار در روز های ١ تا ٤ در آن قرار داشت

ایسکمی گذرای شریان کاروتید مشترک باعث کاهش معنی دار مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه کنترل نسبت به گروه sham شد ($p < ۰/۰۱$، نمودار ۴الف). در حالی که تجویز تک دوز مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ۴۰)، ۲۴ ساعت



نمودار ۳– اثرات ایسکمی/ریپرفیوژن و تجویز مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ۴۰) تک دوز، ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی/ریپرفیوژن (الف)، یا دو بار در روز هر ۱۲ ساعت، در روزهای صفر تا ۶ پس از ایسکمی/ریپرفیوژن (ب)، بر میانگین سرعت شنا کردن حیوان برای پیدا کردن سکوی پنهان (بر حسب سانتی متر بر ثانیه) در روزهای trial (روزهای اول تا چهارم) و آزمون پروب (روز پنجم) در موش صحرایی. در تجویز تک دوز دارو ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی/ ریپرفیوژن (الف)، میانگین سرعت حرکت حیوان در روزهای اول و دوم در گروه کنترل در مقایسه با گروه sham افزایش معناداری داشت ($p < ۰/۰۱$: **). در روزهای سوم و چهارم گروه کنترل با گروه sham اختلاف معناداری نداشت. میانگین سرعت حرکت در گروه مینوسیکلین در مقایسه با گروه کنترل در روز اول اختلاف معنادار داشت ($p < ۰/۰۱$: ++). میانگین سرعت حرکت حیوان در روزهای دوم ($p < ۰/۰۵$: #) ، سوم ($p < ۰/۰۵$: #) و چهارم ($p < ۰/۰۱$: # #) در مقایسه با روز اول در گروه sham اختلاف معناداری داشت. در روز پنجم (آزمون پروب) در مقایسه با روزهای اول تا چهارم اختلاف معنادار در هیچ یک از گروه ها مشاهده نشد. همچنین بین گروه های مختلف در روز پنجم اختلاف معناداری مشاهده نشد. در تجویز دارو پس از ایسکمی/ریپرفیوژن (ب)، در روزهای اول تا چهارم (روزهای trial) و روز پنجم (آزمون پروب) میانگین سرعت شنا کردن حیوان در گروه کنترل در مقایسه با گروه sham اختلاف معناداری نداشت. همچنین میانگین سرعت شنا کردن حیوان در روز های دوم، سوم و چهارم (روزهای trial) و روز پنجم (آزمون پروب) در مقایسه با روز اول در گروه های sham، کنترل و مینوسیکلین اختلاف معناداری نداشت. همچنین بین گروه های مختلف در روز پنجم اختلاف معناداری مشاهده نشد. n = ۱۰ ، داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد. ▩ sham، ▨ control، ▤ (۴۰ mg/kg مینوسیکلین).

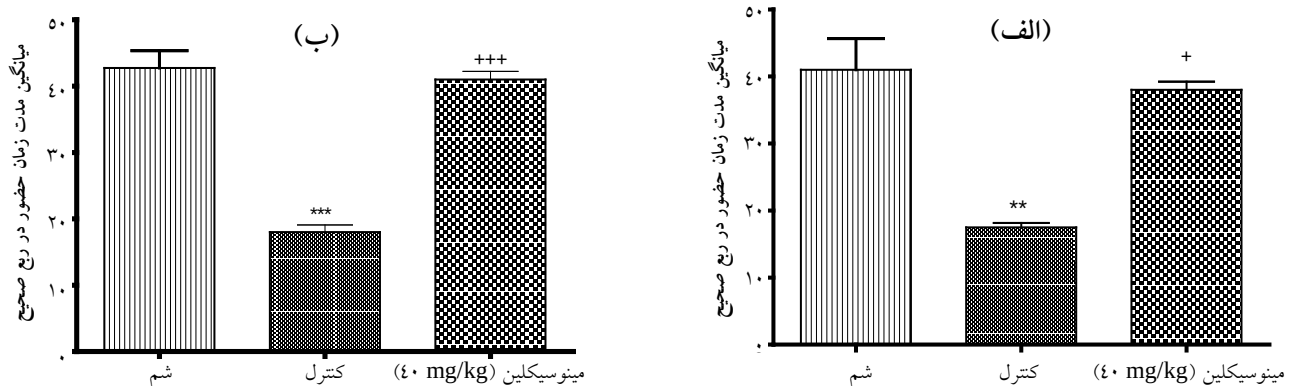
قبل از ایسکمی باعث افزایش مدت زمان حضور در این ربع نسبت به گروه sham می‌گردد ($p < ۰/۰۵$، نمودار ۴الف).

اثر مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ٤٠، هر ١٢ ساعت) در تجویز بعد از ایسکمی مغزی (روز صفر تا ٦) بر مدت زمان حضور در ربع هدف یا ربع صحیح

ایسکمی گذرای شریان کاروتید مشترک باعث کاهش معنی دار مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه کنترل نسبت به گروه sham شد ($p < ۰/۰۰۱$، نمودار ۴ب). در حالی که تجویز مینوسیکلین (.mg/kg, i.p ۴۰، هر ۱۲ ساعت)، در روز های صفر تا ۶ بعد از ایسکمی باعث افزایش مدت زمان حضور در این ربع در مقایسه با گروه sham گردید ($p < ۰/۰۰۱$، نمودار ۴ب).

بحث

مطالعات گذشته نشان داده است که هیپوکامپ و کورتکس حساس ترین قسمت های مغز در برابر ایسکمی هستند [۲، ۳] و آسیب به آن‌ها باعث اختلالات شناختی به خصوص آسیب به حافظه و یادگیری می‌شود [۵]. با توجه به نقش التهاب و استرس اکسیداتیو در آسیب به هیپوکامپ پس از ایسکمی مغزی مطالعات متعدد در گذشته نشان داده است که داروهایی که دارای اثرات آنتی اکسیدان و ضد التهاب می باشند باعث پیشگیری از آسیب حافظه ناشی از ایسکمی مغزی در موش صحرایی می شوند [۷–۵]. با توجه به اثرات آنتی اکسیدان و ضد التهاب مینوسیکلین در این مطالعه اثرات آن در پیشگیری از آسیب حافظه و یادگیری ناشی از ایسکمی مغزی از روز ۷ بعد از آسیب (ایسکی/ریپرفیوژن) با استفاده از روش ماز آبی موریس در موش صحرایی بررسی شد [۷، ۱۶]. مدت زمان لازم برای پیدا کردن سکوی پنهان (Scape latency time) و مسافت طی شده برای پیدا کردن سکوی پنهان در روز اول تا چهارم آزمون و مدت زمان سپری شده در ربع هدف (Time spent in target quadrant) در روز پنجم آزمون (Probe trial) برای بررسی حافظه و یادگیری در حیوانات اندازه گیری شد. همچنین برای ارزیابی عملکرد حرکتی حیوانات سرعت حرکت رت ها از روز اول تا پنجم اندازه گیری شد. مطالعات



نمودار ٤– اثرات ایسکمی/ریپرفیوژن و تجویز مینوسیکلین (.i.p ,mg/kg ۴۰) تک دوز، ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی/ ریپرفیوژن (الف)، یا دو بار در روز هر ۱۲ ساعت، در روزهای صفر تا ۶ پس از ایسکمی/ریپرفیوژن (ب)، بر میانگین زمان حضور در ربع صحیح یا ربع هدف (ثانیه) در روز پنجم (آزمون پروب) در موش صحرایی. در تجویز تک دوز دارو ۲۴ ساعت قبل از ایسکمی / ریپرفیوژن (A)، میانگین مدت زمان حضور در ربع صحیح یا ربع هدف در گروه کنترل در مقایسه با گروه sham اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۱$: **). میانگین زمان حضور در ربع صحیح در گروه مینوسیکلین ($p < ۰/۰۵$: +) در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنادار داشت. در تجویز دارو پس از ایسکمی/ریپرفیوژن (ب)، میانگین مدت زمان حضور در ربع صحیح در گروه کنترل در مقایسه با گروه sham اختلاف معنادار دارد ($p<۰/۰۰۱$: ***). میانگین زمان حضور در ربع صحیح در گروه مینوسیکلین در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۰۱$: +++. n=۱۰ ، داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است و $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

گذشته نشان داده است که ایسکمی گذرای مغزی باعث آسیب به نورون های هیپوکامپ و کورتکس و در نتیجه اختلال در یادگیری و حافظه می شود [۳، ۴]. در این مطالعه ایسکمی گذرای شریان کاروتید مشترک و ریپرفیوژن متعاقب آن باعث افزایش میانگین زمان لازم در پیدا کردن سکوی پنهان (Scape latency time) و افزایش مسافت طی شده در پیدا کردن سکوی پنهان (Swimming path length) در روز های اول تا چهارم (Trial days) و کاهش مدت زمان سپری شده در ربع هدف (Time spent in target quadrant) در روز پنجم (Probe test) در موش ها شد. این نتایج نشان دهنده آن است که ایسکمی/ریپرفیوژن باعث آسیب حافظه و یادگیری در رت ها می شود و این نتایج با مطالعات گذشته در مورد نقش ایسکمی/ریپرفیوژن در آسیب حافظه و یادگیری سازگاری دارد. مطالعات گذشته نشان می دهد که مینوسیکلین باعث محافظت عصبی نورون‌ها در برابر آسیب های مختلف از جمله التهاب، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز می شود [۱۴، ۱۶، ۱۸، ۱۹]. در این مطالعه مینوسیکلین باعث کاهش میانگین زمان لازم در پیدا کردن سکوی پنهان (Scape latency time) و کاهش مسافت طی شده در پیدا کردن سکوی پنهان (Swimming path length) در روز های اول تا چهارم (Trial days) و افزایش مدت زمان سپری شده در ربع هدف (Time spent in target quadrant) در روز پنجم (Probe test) در رت ها شد و این نتایج نشان دهنده آن است که مینوسیکلین آسیب حافظه و یادگیری ناشی از ایسکمی/ریپرفیوژن در رت ها را کاهش می دهد. با توجه به این که مینوسیکلین هم در تجویز قبل از ایسکمی (.i.p ,mg/kg ۴۰، .i.p، ۲۴ ساعت قبل) و هم در تجویز بعد از ایسکمی (.i.p ,mg/kg ۴۰، روز های صفر تا ۶) باعث بهبود حافظه و یادگیری در موشها می شود احتمالا دارای نقش پیشگیری‌کننده و محافظتی (Neuroprotective) در آسیب نورون های هیپوکامپ و کورتکس در برابر ایسکمی/ ریپرفیوژن می باشد . مطالعات گذشته نشان داده است که ایسکمی گذرای شریان کاروتید و همچنین تجویز مینوسیکلین اختلالی در عملکرد حرکتی حیوان ایجاد نمی‌کند [۳، ۴، ۱۴، ۱۶]. نتایج این مطالعه نشان داد که سرعت حرکت حیوانات پس از ایسکمی مغزی تغییر معناداری پیدا نمی کند بنابراین ایسکمی مغزی اختلالی در عملکرد حرکت حیوان ایجاد نمی کند و کاهش زمان حضور حیوان در روز پنجم در ربع هدف ناشی از اختلال در عملکرد حرکتی حیوان نیست بلکه ناشی از اختلال در حافظه فضایی و یادگیری حیوان می باشد. همچنین در این مطالعه تجویز مینوسیکلین (.i.p ,mg/kg ۴۰، قبل و بعد از ایسکمی) تغییر معناداری در سرعت حرکت حیوان ایجاد نکرد و این نتایج نشان دهنده این است که مینوسیکلین اختلالی در عملکرد حرکتی حیوانات ایجاد نمی کند و افزایش مدت زمان حضور حیوان در ربع هدف پس از تجویز مینوسیکلین به دلیل اثر این دارو در بهبود حافظه و یادگیری است.

هیپوکامپ به خصوص نورون های پیرامیدال ناحیه CA1 به میزان بالایی در برابر آسیب های ناشی از ایسکمی مغزی حساس هستند و به دنبال ایسکمی/ریپرفیوژن دچار آسیب می‌شوند [۵]. مکانیسم هایی که باعث این آسیب می‌شوند متعدد هستند که از جمله آن می توان به التهاب ، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز اشاره کرد [۷-۵]. نورون های CA1 هیپوکامپ بعد از ایسکمی مغزی دچار دژنراسیون و آپوپتوز می‌شوند و این آسیب در روز ۷ بعد از ایسکمی مغزی به حداکثر می‌رسد [۵]. مطالعات اخیر نشان داده است که پاسخ‌های التهابی که بعد از ایسکمی/ریپرفیوژن رخ می‌دهد یکی از علت‌های عمده مرگ نورون ها می‌باشد [۱۰-۸]. سلول‌های میکروگلیا نقش مهمی در مغز دارند و در پاسخ به آسیب نورونی فعال می شوند و با فعال شدن آنها چندین ماده نوروتوکسیک قدرتمند از قبیل رادیکال های آزاد اکسیژن و سیتوکین های التهابی تولید می‌شوند [۱۱-۹]. یکی دیگر از مکانیسم های مهم مسبب آسیب به نورون ها و اختلال حافظه فضایی و یادگیری پس از ایسکمی استرس اکسیداتیو است. در واقع به دنبال ایسکمی مغزی تولید رادیکال های آزاد اکسیژن افزایش می یابد و این رادیکال های آزاد باعث آسیب به نورون های هیپوکامپ و در نتیجه آسیب حافظه و یادگیری می‌شوند [۲، ۳]. مطالعات گذشته نشان داده است که مینوسیکلین دارای اثرات آنتی اکسیدان و ضد التهاب است [۱۶-۱۴]. مینوسیکلین که یک آنتی بیوتیک مشتق از تتراسیکلین است که دارای اثرات آنتی اکسیدان، ضد التهاب و ضد آپوپتوز می باشد و باعث محافظت عصبی در بیماری های نورودژنراتیو از جمله آلزایمر و ایسکمی مغزی می شود. همچنین از طریق مهار فعالیت سلول های میکروگلیا باعث کاهش التهاب در مغز و ایجاد اثرات نوروپروتکتیو می شود [۱۹-۱۷]. در این مطالعه با استفاده از انسداد دو طرفه موقت شریان کاروتید مشترک در رت، آسیب حافظه فضایی ایجاد شد [۲۰] و مشخص شد که مینوسیکلین دارای اثرات محافظت عصبی (Neuroprotective) قابل ملاحظه در برابر آسیب حافظه فضایی و یادگیری ناشی از ایسکمی/ریپرفیوژن در موش صحرایی می باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع مینوسیکلین دارای اثرات محافظت عصبی در برابر ایسکمی مغزی گذرا می باشد و در تجویز قبل و بعد از ایسکمی مغزی باعث کاهش آسیب حافظه ناشی از ایسکمی/ ریپرفیوژن در رت می شود.

سپاسگزاری

هزینه این تحقیق از محل اعتبارات پایان نامه دکترای فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی پرداخت شده است. بدینوسیله از تمامی افرادی که در اجرای این کار پژوهشی با ما همکاری داشته اند تشکر و قدردانی می‌کنیم.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

ی.ن: انجام مطالعه و نگارش مقاله; س.پ: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; ت.م.ز: مشاوره; م.ث.ک: اجرای بخشی از مطالعه.

فهرست منابع

[1] Ginsberg MD, Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. ***Neuropharmacol*** 55 (2008) 363–389.

[2] Neumar RW, Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. ***Ann Emerg Med*** 36 (2000) 483–506.

[3] Oumei C, Zhenhua L, Yu H, Qingsong J, Yong Y, Ke CH, Baicalin improved the spatial learning ability of global ischemia/reperfusion rats by reducing hippocampal apoptosis. ***Brain Res*** 1470 (2012) 111-118.

[4] Benetoli A, Dutra AM, Paganelli RA, Senda DM, Franzin S, Milani H, Tacrolimus (FK506) reduces hippocampal damage but fails to prevent learning and memory deficits after transient, global cerebral ischemia in rats. ***Pharmacol Biochem Behav*** 88 (2007) 28-38.

[5] Chan PH, Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. ***Neurochem Res*** 29 (2004) 1943–1949.

[6] Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M, Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic

approaches. ***J Transl Med*** 7 (2009) 97-104.

[7] Lim CM, Kim SW, Park JY, Kim C, Yoon SH, Lee JK, Fluoxetine affords robust neuroprotection in the postischemic brain via its anti-inflammatory effect. ***J Neurosci Res*** 87 (2009) 1037–1045.

[8] Chung YC, Kim SR, Jin BK, Paroxetine Prevents Loss of Nigrostriatal dopaminergic neurons by inhibiting brain inflammation and oxidative stress in an experimental model of Parkinson's disease. ***J Immunol*** 185 (2010) 1230-1237.

[9] Kaur C, Rathnasamy G, Ling EA, Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina. ***J Neuroimmune Pharmacol*** 8 (2013) 66-67.

[10] Li F, Wang L, Gong M, He L, Feng R, Dai Z, Li SQ, Hypoxia induced amoeboid micraglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. ***BMC Neurosci*** 12 (2011) 111-118.

[11] Wang HB, Guo WT, Liu HL, Zeng R, Lu MN, Chen ZQ, Xiao QX, Inhibition of inflammatory mediator release from microglia can treat ischemic/hypoxic brain injury. ***Neural Regen Res*** 8 (2013) 1157-1168.

[12] Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA, Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. ***J Neurosci*** 18(1998) 3659-3668.

[13] Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI, Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. ***J Neurosci*** 17 (1997) 7415-7424.

[14] Chen SD, Yin JH, Hwang CS, Tang CM, Yang DI, Anti-apoptotic and anti-oxidative mechanisms of minocycline against sphingomyelinase/ceramide neurotoxicity: implication in Alzheimer's disease and cerebral ischemia. ***Free Radic Res*** 46(8) (2012) 940-950.

[15] Bhatt LK, Addepalli V, Potentiation of aspirin-induced cerebroprotection by minocycline: A therapeutic approach to attenuate exacerbation of transient focal cerebral ischaemia. ***Diab Vasc Dis Res*** 9 (2011) 25-34.

[16] Liaury K, Miyaoka T, Tsumori T, Furuya M, Hashioka S, Wake R, Tsuchie K, Fukushima M, Limoa E, Tanra AJ, Horiguchi J, Minocycline improves recognition memory and attenuates microglial activation in Gunn rat: A possible hyperbilirubinemia-induced animal model of schizophrenia. ***Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*** 9 (2014) 345-349.

[17] Cai ZY, Yan Y, Chen R, Minocycline reduces astrocytic reactivation and neuroinflammation in the hippocampus of a vascular cognitive impairment rat model. ***Neurosci Bull*** 26 (2010) 28–36.

[18] Cai Z, Yang Y, Wang Y, Minocycline alleviates beta-amyloid protein and tau pathology via restraining neuroinflammation induced by diabetic metabolic disorder. ***Clin Interv Aging*** 8 (2013) 1089–1095.

[19] Jin X, Liu J, Lin KJ, Rosenberg GA, Yang Y, Normobaric hyperoxia combined with minocycline provides greater neuroprotection than either alone in transient focal cerebral ischemia. ***Exp Neurol*** 240 (2013) 9-16.

[20] Hossman KA, Experimantal models for the investigation of brain ischemia. ***CardioVasc Res*** 39 (1998) 106-120.

Research paper

Study on protective effects of minocycline on memory deficits after cerebral ischemia due to transient bilateral occlusion of common carotid arteries in rat

Yazdan Naderi, Siavash Parvardeh, Taraneh Moini Zanjani, Masoumeh Sabetkasaei*

Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 31 May 2015 Accepted: 21 December 2015

Abstract

Introduction: Spatial memory and learning deficits are the most visible symptoms of transient cerebral ischemia. Cortex and hippocampus are sensitive against cerebral ischemia. Oxidative stress and inflammation are involved in the pathological process after cerebral ischemic injury. Evidence indicates that minocycline has antioxidant and anti-inflammation effects. In this study the effect of minocycline on memory deficit after transient cerebral ischemia in rat was investigated.

Methods: Cerebral ischemia was induced by a transient 20 min bilateral occlusion of common carotid artery (BOCCA) of rat. A total of 60 male Wistar rats weighing 250-300 g were divided into 6 groups. Three groups of rats were evaluated for each drug administration method (pre- or post-ischemic administration of drug or vehicle). 1. Sham group: rats were subjected to the surgical procedure except for occlusion of common carotid artery and received saline (vehicle) 24 h before, or twice daily (every 12 hours) for 7 days after surgery; 2. Control group: rats underwent transient BOCCA and saline was injected 24 h before or twice daily for 7 days after ischemia; 3. Minocycline group: minocycline (40 mg/kg, i.p.) was injected 24 h before I/R (single dose), or twice daily, for 7 days after I/R. The spatial memory and learning were evaluated using the Morris water maze task.

Results: Pre- or post-ischemic administration of minocycline significantly shortened the escape latency time and the distance traversed to reach the hidden platform. It also significantly increased the time spent in target quadrant compared with the control group. There was no significant change in the swimming speed of rats after I/R in the control and minocycline groups (either pre- or post-ischemic administration) during the first 4 days (trial) and the fifth day (probe test).

Conclusion: This study demonstrated the effectiveness of minocycline in preventing spatial memory and learning deficits induced by cerebral ischemia.

Keywords: Cerebral ischemia, Minocycline, Morris water maze, Spatial memory

Please cite this article as follows:
Naderi Y, Parvardeh S, Moini Zanjani T, Sabetkasaei M, Study on protective effects of minocycline on memory deficits after cerebral ischemia due to transient bilateral occlusion of common carotid arteries in rat. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 1 (2017) 166-175.

*Corresponding author e-mail: fkasaei@yahoo.com
Available online at: http://ijpp.phypha.ir
E-mail: ijpp@phypha.ir