



بررسی اثر نوروتروفیک ریفامپیسین بر اختلال حافظه در مدل ایسکمی / رپرفیوژن مغزی موش صحرائی نروستار

سوگل شکیبانی^۱، زهرانادیا شریفی^۲، شبنم موثقی^{۲*}

^۱ گروه پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران

* Email: sm_movassaghi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۲۴

چکیده

اختلال در حافظه فضایی اغلب به دنبال ایسکمی مغزی مشاهده می‌شود. هیپوکامپ و کورتکس حساس‌ترین قسمت‌های مغز در برابر ایسکمی هستند. استرس اکسیداتیو و التهاب پس از ایسکمی مغزی باعث آسیب به نورون‌های هیپوکامپ و کورتکس و اختلال در حافظه فضایی می‌شوند. ریفامپیسین دارای اثرات ضد التهاب و آنتی اکسیدانی می‌باشد. در این بررسی به اثرات نوروتروفیک دارو در برابر آسیب حافظه ناشی از ایسکمی مغزی در موش صحرائی می‌پردازیم. ۳۲ راس موش صحرائی نر نژاد ویستار به ۴ گروه ۸ تایی کنترل، ایسکمی، حامل و آزمایشی تقسیم شدند. در گروه آزمایشی، 20 mg/kg ریفامپیسین در ابتدای رپرفیوژن و ۲۴ ساعت پس از رپرفیوژن بصورت داخل صفاقی تزریق شد. ایسکمی / رپرفیوژن از طریق بستن دو طرفه شریان کاروتید مشترک به مدت ۲۰ دقیقه و سپس باز کردن آن القاء گردید. از ماز آبی موریس برای بررسی حافظه فضایی و رنگ آمیزی نیسل برای بررسی بافتی استفاده گردید. نتایج نشان داد تزریق ریفامپیسین به میزان 20mg/kg باعث کاهش زمان و مسافت لازم برای یافتن سکو در ماز آبی موریس می‌گردد و تعداد سلول‌های هرمی سالم را بطور معنی‌داری متعاقب ایسکمی رپرفیوژن فراگیر افزایش می‌دهد به طوریکه بین گروه کنترل، ایسکمی و حامل تفاوت آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) و بین گروه کنترل و دارویی تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد که ریفامپیسین می‌تواند بعنوان یکی از راهکارهای مناسب جهت درمان ضایعات ناشی از ایسکمی مغزی در نظر گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: ایسکمی، حافظه فضایی، ریفامپیسین، هیپوکامپ.

مقدمه

اثر تغییر ارتباطات ساده بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به دنبال اختلال جریان خون ایجاد می‌شود. [۱]

آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی که سومین عامل مرگ و میر در کشورهای غربی محسوب می‌گردد، در

بیماری‌های آسیب عصب چشمی موثر است [۱۴]. و هم چنین با فعال کردن گیرنده‌ی گلوکوکورتیکوئیدی باعث مهار اپوپتوز و فعال کردن کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ می‌شود علاوه بر این از طریق پروتئین‌های پیش و ضد (آنتی) اپوپتوز باعث بلوک مرگ برنامه‌ریزی سلولی می‌شود. [۸]

با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی اثر ریفامپیسین بر روی حافظه‌ی فضایی و ضایعات بافتی هیپوکامپ انجام نشده، ما به بررسی اثر ریفامپیسین بر روی اختلالات حافظه‌ی فضایی متعاقب ایسکمی / رپرفیوژن فراگیر در موش صحرایی نروستار پرداختیم، تا مشخص شود که آیا ریفامپیسین می‌تواند به بهبود این اختلالات کمک کند یا خیر.

مواد و روش‌ها

حیوانات

تحقیق حاضر به صورت تجربی- پژوهشی در دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران بر روی ۳۲ سر موش نر نژاد ویستار تهیه شده از موسسه تحقیقات پاستور با وزن (۲۵۰-۳۰۰g) انجام گرفت. حیوانات در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و با ۱۲ ساعت سیکل روشنایی- تاریکی نگهداری شدند و آب و غذا به مقدار کافی در دسترس حیوانات قرار گرفت.

گروه‌ها

حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند:

گروه کنترل: رت‌ها فقط توسط پنتوباریتال سدیم (40 mg/kg) بیهوش شدند.

آسیب‌های رپرفیوژن به آسیب‌هایی گفته می‌شود که در اثر بازگشت مجدد خون در بافت پس از یک دوره ایسکمی ایجاد می‌شود. فقدان اکسیژن و مواد مغذی وضعیتی را ایجاد می‌کند که در آن بازگشت جریان خون به جای بازگشت فعالیت نرمال بافت باعث التهاب و آسیب‌های اکسیداتیو از طریق القای استرس اکسیداتیو می‌شود [۹]. بعد از برقراری جریان خون مغزی، جریان بازگشتی به دنبال انسداد باعث بازگشت اکسیژن در سلول‌ها و آسیب‌های ناشی از تولید و تهاجم رادیکال‌های سوپرا اکسید می‌شود. این موضوع می‌تواند روی سلول‌ها تأثیر گذاشته و باعث نکروز و آپوپتوز بافتی شود [۱۲].

نواحی مشخصی از مغز و انواع خاصی از نورون‌ها نسبت به ایسکمی مغزی حساس‌تر می‌باشند که سلول‌های هرمی هیپوکامپ جایگاه اصلی یادگیری و حافظه‌ی فضایی از آن جمله می‌باشند [۶]

باتوجه به افزایش دانش بشری در مورد عوارض ناشی از ایسکمی / رپرفیوژن، نیاز برای یافتن داروی موثر با عوارض جانبی کمتر در جلوگیری و یا درمان ضایعات ناشی از این عارضه شدیداً احساس می‌گردد. ریفامپیسین یک ماده ضد باکتریال است که به طور گسترده در درمان سل و جذام استفاده می‌شود. [۱۴] این دارو RNA پلی‌مرآز وابسته به DNA و در نتیجه پروتئین سازی باکتری را مهار می‌کند. باکتری‌های مقاوم توان تولید RNA پلی‌مرآزهایی با تفاوت جزئی در زیر واحد بتا که توسط ریفامپیسین مهار نمی‌شوند را دارند. داروی فوق با تأثیر بر زیر واحد B از RNA polymerase موجب مهار این آنزیم می‌شود [۱۱].

مطالعات نشان می‌دهد که این ماده در کاهش صدمات مغزی بعد از ایسکمی ثابت و گذرای منطقه‌ای در موش و در ای پارکینسون، مننژیت، الزایمر، و

دستگاه مورد استفاده از یک حوضچه استوانه ای شکل سیاه رنگ با قطر ۱۳۶ سانتی متر و ارتفاع ۶۰ سانتی متر تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتی متر از آب $2 \pm 23^{\circ}\text{C}$ پر می شود.

حوضچه به طور فرضی به چهار ربع دایره با چهار نقطه به آب اندازی حیوان به نام های شمال (N)، شرق (E)، جنوب (S) و غرب (W) تقسیم شد. سکوی از جنس پلکسی گلاس با قطر ۱۰ cm در مرکز ربع دایره فرضی شمال غرب حوضچه قرار داده شد، ارتفاع آب به گونه ای بود که سکو ۱ cm زیر سطح آب قرار می گرفت. سکو پنهان از دید حیوانات قرار داشت و چون هدف از تحقیق، بررسی حافظه مرجع حیوانات بود، موقعیت آن در تمام روزهای آموزش و روز آزمون ثابت می ماند. به دیوارهای اتاق آزمایش سه راهنمای دیداری (Visual Cue or Landmark) به اشکال دایره، مربع و مثلث چسبانده شده بود که حیوان می بایست با استفاده از این علائم موقعیت سکوی پنهان را پیدا کند.

هر موش به مدت چهار روز تحت آموزش قرار می گرفت. هر روز شامل یک بلوک و هر بلوک شامل چهار تجربه می باشد. در هر تجربه حیوان به طوری که صورتش رو به طرف دیوار حوضچه باشد از یکی از چهار نقطه شروع در آب رها می شود. هر یک از چهار نقطه شروع در هر بلوک یک بار استفاده می شد و ترتیب آن به صورت تصادفی تعیین می گردید.

به هر یک از موش ها ۶۰ ثانیه زمان داده می شد که با شنا کردن محل سکوی پنهان زیر آب را پیدا کنند. اگر در کمتر از این زمان موفق به یافتن سکو می شدند، اجازه می یافتند ۲۰ ثانیه روی سکو بمانند و بعد از حوضچه خارج می شدند. موش هایی که در طی زمان ۶۰ ثانیه محل سکو را پیدا نمی کردند، به آرامی به

گروه ایسکمی: بعد از بیهوش کردن رت ها، شریان های کاروتید مشترک دو طرف به مدت ۲۰ دقیقه بسته و سپس بازگشت مجدد خون انجام شد.

گروه آزمایشی: داروی ریفامپیسین با دوز انتخابی 20 mg/kg بصورت داخل صفاقی در شروع ریپرفیوژن و ۲۴ ساعت بعد از اتمام ریپرفیوژن تزریق شد.

گروه حامل: نرمال سالین (حلال ریفامپیسین) در رت ایسکمی شده بصورت IP تزریق شد.

یک هفته پس از ایسکمی، رت ها در تمامی گروه ها به منظور بررسی حافظه فضایی توسط ماز آبی موریس به مدت چهار روز متوالی، ارزیابی شدند. پس از اتمام تست ماز آبی موریس، مغز رت ها از طریق پرفیوژن قلبی بصورت اولیه ثابت شده و پس از قطع سر حیوان توسط گیوتین، از جمجمه خارج و جهت رنگ آمیزی نیسل آماده گردید.

روش جراحی

پس از بیهوشی، برشی عمودی در ناحیه قدامی گردن حیوان (کمی پایین تر از آرواره تحتانی تا بالای جناغ) ایجاد شد و با کنار زدن عضله جناغی - چنبری - پستانی، شریان های کاروتید مشترک در هر دو سمت در معرض دید قرار گرفت و پس از جدا کردن عصب واگ، شریان ها توسط کلامپ میکروسرجری به مدت ۲۰ دقیقه بسته شدند سپس کلامپ ها برداشته شده و گردش خون مجدداً برقرار گردید.

ماز آبی موریس

ماز آبی موریس یکی از انواع آزمون های رفتاری علوم اعصاب است که به منظور حافظه و یادگیری فضایی توسط تشکیلات هیپوکامپ صورت می گیرد [۷].

فتومیکروگراف تهیه شد که سه فتومیکروگراف بطور تصادفی انتخاب و سلول‌های هر می نواحی CA1 هیپوکامپ توسط نرم‌افزار image tools^۲ شمارش شدند.

رعایت اصول اخلاقی

تمامی روش‌های مورد استفاده در این مطالعه بر اساس پروتکل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بوده و تمامی حیوانات در بیهوشی کامل و بدون درد جراحی و ذبح شدند.

روش آماری

داده‌ها توسط نرم افزار آماری SPSS19 و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون tukey انجام شد و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در بررسی میانگین زمان لازم برای یافتن سکو در طی ۴ روز اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه ایسکمی دیده شد ($p < 0.05$). این تفاوت بین گروه کنترل و حلال نیز معنی‌دار بود ($p < 0.05$) در صورتی‌که این تفاوت بین گروه کنترل و گروه آزمایشی دارو دریافت کرده، معنی‌دار نبود. ($P = 0.735$) (نمودار ۱) این یافته‌ها نشان داد که تزریق ریفامپیسین به میزان 20 mg/kg باعث کاهش زمان لازم برای یافتن سکو می‌گردد.

در بررسی میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو در طی ۴ روز اختلاف آماری بین گروه کنترل و گروه ایسکمی معنی‌دار بود. این تفاوت بین گروه کنترل و حلال نیز معنی‌دار بود ($p < 0.05$) در

روی سکو منتقل شده و آنها نیز قبل از خروج از حوضچه، ۲۰ ثانیه روی آن می‌ماندند. فاصله زمانی بین هر تجربه در هر بلوک همواره ۳۰ ثانیه بود.

حرکات حیوان در ماز توسط دوربین مخصوص تصویربرداری که به یک رایانه متصل بود، ضبط می‌شد. این تصاویر بعداً توسط نرم‌افزار Ethovision 3.1 محصول شرکت Noldus هلند، مورد بررسی و پردازش قرار می‌گرفت.

سه فاکتور مهم زمان سپری شده تا پیدا کردن سکو توسط حیوان (Escape Latency)، طول کل مسیر پیموده شده در هر تجربه (Traveled Distance)، و سرعت شنای حیوان در هر تجربه (Swimming Speed) که مبنای ارزیابی عملکرد موش‌ها در این آزمایش بود، برای هر حیوان محاسبه شد.

بررسی بافتی

تمامی حیوانات روز بعد از اتمام ماز آبی موریس مجدداً بیهوش شده و مغز آنها با روش پرفیوژن توسط پارافرمالدئید ۴٪ فیکس و سپس از جمجمه خارج شد و برای ثبوت بهتر در محلول پارافرمالدئید ۴٪ قرار داده شد و پس از آماده سازی بافتی بلوک‌های پارافینی در مقاطع کروئال به منظور رنگ آمیزی نیسل برش داده شدند.

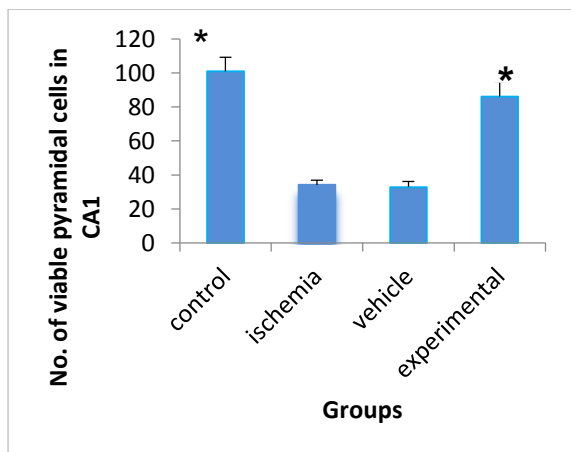
رنگ آمیزی نیسل

پس از ثبوت و آماده‌سازی، مقاطع کروئال به ضخامت 10μ در فاصله 2.3-5mm از خلف برگما تهیه و توسط روش نیسل رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ بررسی شدند. در این روش فقط سلول‌هایی که هسته و هستک واضح و مشخص داشتند بعنوان سلول‌های زنده و سالم در نظر گرفته شدند. از هر نمونه ۸

گروه‌ها بیانگر این است که سیستم حرکتی حیوانات تحت تاثیر قرار نگرفته است.

بررسی داده‌ها نشان داد که بستن شریان‌های کاروتید مشترک با زمان ۲۰ دقیقه باعث کاهش شدید تعداد سلول‌های هرمی سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ گردیده است به این ترتیب که میانگین تعداد سلول‌های سالم و زنده از ۳۹ عدد به ۱۲ عدد تنزل پیدا کرده بود که با تزریق دارو این تعداد افزایش یافت. اختلاف آماری بین گروه کنترل و گروه ایسکمی، معنی‌دار بود ($p < 0.05$) همچنین بین گروه کنترل و گروه حامل، اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ولی این اختلاف با گروهی که دارو گرفته بودند معنی‌دار نبود. ($P = 0.560$) (شکل ۱ و نمودار ۳).

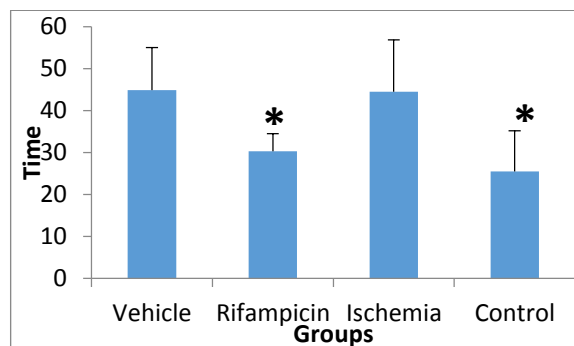
این نتایج نشان داد که تزریق ریفامپیسین با دوز ۲۰ mg/kg در شروع ریپرفیوژن و ۲۴ ساعت بعد از اتمام ریپرفیوژن تعداد سلول‌های هرمی زنده و سالم را بطور معنی‌داری افزایش می‌دهد.



نمودار ۳- تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA1 در گروه‌های مختلف آزمایشی

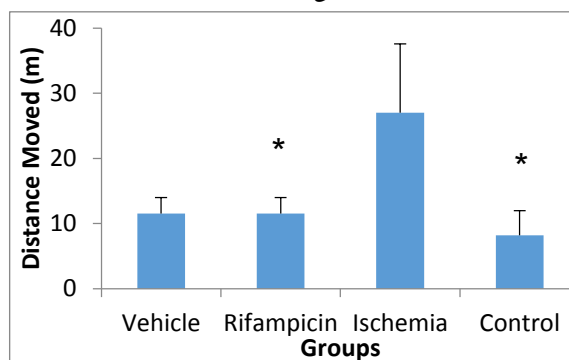
* این علامت نمایانگر اختلاف معنی‌دار با گروه‌های ایسکمی و حامل می‌باشد.

صورتیکه این تفاوت بین گروه کنترل و گروه آزمایشی که دارو دریافت کرده بودند معنی‌دار نبود. ($P = 0.795$) (نمودار ۲) این یافته‌ها نشان داد که تزریق ریفامپیسین به میزان 20mg/kg باعث کاهش مسافت لازم برای یافتن سکو می‌گردد.



نمودار ۱- میانگین زمان طی شده برای یافتن سکو در گروه‌های مختلف آزمایشی

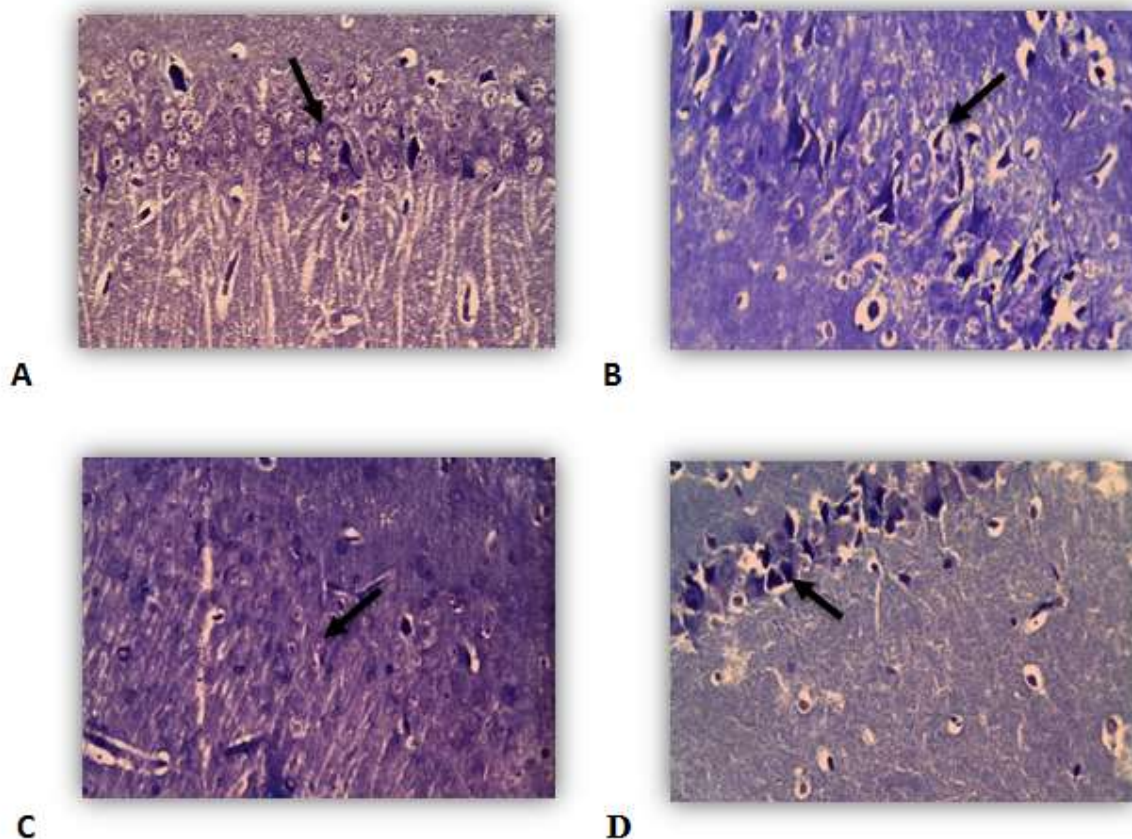
* این علامت نمایانگر اختلاف معنی‌دار با گروه‌های ایسکمی و حامل می‌باشد.



نمودار ۲- ۲ میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو در گروه‌های مختلف آزمایشی

* این علامت نمایانگر اختلاف معنی‌دار با گروه‌های ایسکمی و حامل می‌باشد.

از آنجائی که بر اساس نتایج بدست آمده از سرعت شنای حیوان هیچ تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود نداشت از ذکر نتایج صرف نظر شد. عدم تغییر در سرعت شنای حیوانات در این



شکل ۱: فتومیکروگراف ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی نر در گروه ها. پیکان A: نوک پیکان سلول زنده را در گروه کنترل نشان می دهد. پیکان B: نوک پیکان سلول دژنره رادر گروه ایسکمی نشان می دهد. پیکان C: نوک پیکان سلول زنده را در گروه آزمایشی (دارو گرفته) نشان می دهد. پیکان D: نوک پیکان سلول دژنره را در گروه حامل نشان می دهد. رنگ آمیزی نیسل، بزرگنمایی ۴۰۰×.

یادگیری و حافظه فضایی نقش کلیدی داشته و تخریب آنها می تواند باعث اختلالاتی در این زمینه گردد [۳].

ضایعات بافتی که در اثر ایسکمی بوقوع می پیوندند نتیجه یکسری وقایع پاتوفیزیولوژی است که افزایش غلظت گلوتامات را به همراه داشته و متعاقباً گیرنده های گلوتامات بخصوص NMDA را تحریک کرده که این امر می تواند منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی و نتیجتاً مرگ سلولی گردد [۲].

در تحقیق حاضر به نظر می رسد عملکردی مشابه با آنچه که شرح داده شد توانسته موجب کاهش سلول های هرمی ناحیه CA1 گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد که داروی ریفامپیسین

بحث

صدمه به هیپوکامپ بعد از ایسکمی رپرفیوژن باعث اختلالات فراوانی در عملکرد این عضو از جمله اختلالات حافظه فضایی و اشکالات یادگیری و به وجود آمدن انواع اختلالات در طرح های رفتاری می گردد [۴].

یافته های ما در این بررسی نشان داد که ایسکمی / رپرفیوژن فراگیر گذرا در مغز به مدت ۲۰ دقیقه باعث کاهش تعداد سلول های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ می گردد.

سلول های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ بسیار حساس بوده و سریعاً نسبت به ایسکمی فراگیر عکس العمل نشان می دهند [۵،۱۰]. این سلول های هرمی در

- span of the rhesus monkey. *J Neurosci*; 8 (8): 2729- 47.
- [4]. Kesner RP, Adelstein T, Crutcher KA. 1989. Equivalent spatial location memory deficits in rats with medial septum or hippocampal formation lesions and patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn*; 9: 289-300.
- [5]. Kirino T. 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Prog Brain Res*; 239 (1): 57-69.
- [6]. Lynch M A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev. Jan*; 84(1): 87-136.
- [7]. Morris, R. G. M. 1981. Spatial localisation does not depend on the presence of local cues. *Learn Motiv*; 12:239-260.
- [8]. Notarianni E, 2013. Hypercortisolemia and glucocorticoid receptor-signaling insufficiency in Alzheimer's disease initiation and development. *Curr. Alzheimer Res.*; 10: 714-731.
- [9]. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. 1987. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology*; 37: 1281 - 6.
- [10]. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F . 1982. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*; 11(5):491-8.
- [11]. Rifampicin, 2009." Wikipedia The Free Encyclopedia, <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Rifampicin&oldid=325236530> (accessed December, 2009, 10).
- [12]. Weglicki WB, Dickens BF, Mak IT. 1984. Enhanced lysosomal phospholipid degradation and lysosphospholipid production 1984 due to free radicals. *Biochem Biophys Res Commun*; 124: 229 -35.
- [13]. Yulug B, Hanoglu L, Kilic E, Schabitz WR. 2014. Rifampicin an antibiotic with brain protective function. *Brain Res Bull.*; 107:37-42.
- [14]. Yulug B, Kilic U, Kilic E, Bahr M. 2004. Rifampicin attenuates brain damage in focal ischemia. *Brain Research*; 996:76-8.

دارای خاصیت نوروتروفیک بوده و قادر است تغییرات دژنراتیو را کاهش داده و باعث بهبود بافت گردد. این یافته‌ها با مطالعات قبلی که تزریق ریفامپیسین را عامل کاهش ضایعات مغزی بعد از ایسکمی از طریق خاصیت ضد التهابی، کاهش سیتوکین‌های التهابی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارو می‌داند، مطابقت دارد. [۸، ۱۳]

یافته‌های ما همچنین نشان داد که تزریق ریفامپیسین به میزان ۲۰ mg/kg قبل از شروع رپرفیوژن و ۲۴ ساعت بعد از رپرفیوژن علاوه بر داشتن اثر نوروتروفیک و بهبود ساختار بافتی، باعث بهبود حافظه فضایی متعاقب ایسکمی / رپرفیوژن فراگیر گذرا می‌شود.

این نتایج علاوه بر تأیید مطالعات گذشته مبنی بر بهبود ساختار بافتی متعاقب استفاده از ریفامپیسین، نشان می‌دهد که داروی فوق می‌تواند اختلالات حافظه متعاقب ایسکمی فراگیر گذرا را بهبود بخشد.

نتیجه‌گیری

بنظر می‌رسد که ریفامپیسین می‌تواند بعنوان یکی از راهکارهای مناسب جهت درمان ضایعات ناشی از ایسکمی مغزی در نظر گرفته شود.

منابع

- [1]. Bokura H, Robinson RG. 1997. Long term cognitive impairment associated with caudate stroke. *Stroke*; 28:970-5.
- [2]. Choi DW. 1992. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*; 23(9):1261-76.
- [3]. Eckenhoff MF, Rakic P. 1988. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life