Arshive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۱، بهار ۹۷، صفحات ۱۶ تا ۲۳

Original Article

بررسی اثر سدیم بوتیرات، مهار کننده هیستون داستیلاز بر روند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی در مدل ایسکمی هایپوکسیک مغزی

محمد امین عدالت منش[۱]، سمیرا صحرائیان[۲]، سمانه رفیعی[۳]

[۱]استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
[۲]کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
[۳]دانشجوی دکتری بیوشیمی و متابولیسم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، پردیس بین المللی کیش، دانشگاه تهران، کیش، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *ایسکمی مغزی، سومین علت مرگ و میر در کشورهای پیشرفته و یکی از علل اصلی معلولیت های درازمدت است. پژوهش حاضر، اثر سدیم بوتیرات را به عنوان مهار کننده هیستون داستیلازی بر یادگیری و حافظه فضایی در مدل ایسکمی مغزی هایپوکسیک بررسی کرد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، پنجاه سر موش صحرایی نر به ۵ گروه کنترل، HI+Saline، HI+SB 1/0، HI+SB 3/0، HI+SB 6/0 تقسیم شدند. جهت القاء مدل HI، پس از انسداد کامل شریان کاروتید چپ، حیوانات یک ساعت در محفظه القاء هیپوکسی (۸٪ اکسیژن) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از جراحی، سدیم بوتیرات به صورت درون صفاقی با دوزهای ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان و نرمال سالین به گروه HI+Salineبه مدت ۱۴ روز تزریق گردید. به منظور سنجش حافظه فضایی از آزمون ماز موریس آبی استفاده شد. سپس، سنجش سطح هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) به روش الایزا انجام شد.*

یافته‌ها: *هرچند، گروه HI+Saline مدت زمان بیشتری را برای پیدا کردن سکوی مخفی در آزمون ماز موریس آبی طی کردند، نتایج نشان دهنده بهبود حافظه فضایی یا کاهش زمان تاخیر تا یافتن سکوی مخفی طی ماز آبی موریس در حیوانات دریافت کننده سدیم بوتیرات بود. با وجودکاهش معنی‌دار سطح BDNF در هیپوکامپ گروه HI+Saline، سطح این فاکتور در گروههای دریافت کننده سدیم بوتیرات افزایش معنی‌داری نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *سدیم بوتیرات باعث بهبود حافظه و یادگیری فضایی در مدل آسیب مغزی ایسکمی هایپوکسیک می‌شود.*

واژگان کلیدی: *ایسکمی هایپوکسیک، مهارکننده هیستون داستیلاز، حافظه فضایی، ماز آبی موریس، موش صحرایی.*

مقدمه

ایسکمی مغزی معضلی است که در جریان آن ساختمان غشای سلولی آسیب می بیند. کمبود اکسیژن و سوبسترا در طول ایسکمی، آغازگر اثرات تخریبی ایسکمی در غشاء سلولی غنی از چربی و سبب آسیب هومئوستاز یونی و لیپولیز آنزیماتیک و در نتیجه تولید گونه های فعال اکسیژن می شود (۱). همچنین، افزایش بیشتر فسفولیپازها در سکته مغزی ایسکمیک سبب کاتالیز لیپولیز و پراکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره های غیر اشباع متعدد می‌شود (۲). محصولات نهایی پراکسیداسیون چربی توانایی واکنش با تیوباریتوریک اسید را دارند. این عوامل به شدت سمی و واکنشگر هستند و گسترش پراکسیداسیون چربی توسط این عوامل نهایی منجر به اختلال در عملکرد غشاء سلولی در نقاط غنی از چربی مغز می‌شود (۳). در جوندگان و پریمات‌ها، حافظه فضایی به حیوانات کمک می‌کند تا به خاطر بیاورند که اطلاعات کسب

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران ، محمد امین عدالت منش
(**email**: amin.edalatmanesh@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۲۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۱/۲۱

www.SID.ir

Arshive of SID

شده را در کجا به دست آورده‌اند و اینکه این اطلاعات را در کجا به کار ببرند (۴). آسیب به هیپوکامپ باعث ایجاد فراموشی بعدی و ضعف حافظه کوتاه مدت و حافظه فضایی می‌شود، ولی اطلاعات قبلی حفظ می شوند و بیمار دچار این ضایعه می‌تواند آنها را به خاطر آورد (۵). این که چگونه حافظه شکل می‌گیرد، هنوز نامعلوم است؛ بر این اساس، تشکیل حافظه بر فعالیت مجموعه‌ای از آبشارهای مولکولی در نورون‌ها تکیه دارد که در نهایت، به تغییرات دراز مدت در ساختمان و عمل سیناپس منجر می‌شود (۶). از دیگر مشکلات بیماران سکته مغزی می‌توان به اختلالات شناختی مانند اختلال در حافظه اشاره کرد که در ۴۳ تا ۷۸ درصد از بیماران سکته مغزی اتفاق می‌افتد، شناخت، یک مفهوم کلی است که تمامی اشکال آگاهی را در بر می‌گیرد و شامل ادراک، تفکر، تصور، استدلال، قضاوت و غیره می‌شود. بعد از سکته، افراد با توجه کمتری مواجه می شوند و ممکن است حافظه آنها دچار اختلال شود (۷). مطالعه بر روی بوتیرات سدیم نشان داد که این ماده میزان بیان اگزون ۷ حاوی پروتیئن SMN (عامل بقای نورونی حرکتی) را در بیماری آتروفی عضلانی افزایش می‌دهد. بنابراین، مصرف خوراکی بوتیرات سدیم به منظور بهبود بیماری آتروفی عضلانی توصیه می شود (۸). آنالیزهای میکروسکوپی نشان داد که سدیم بوتیرات باعث بهبود فسفوریلاسیون اکسیداتیو و رونویسی پروتئین های دخیل در پاتوژنز بیماری هانگتینتون می‌شود. بنابراین، استفاده از این ماده به منظور بهبود این بیماری نیز توصیه شده است (۹). نوروتروفین‌ها در مغز مسئول هدفمندی آکسون‌ها، رشد نورون‌ها، بلوغ سیناپس‌ها و انعطاف‌پذیری سیناپسی هستند (۱۰). فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF) و نوروتروفین-۳ (NT-3) عمدتاً بر روی نورون‌های هیپوکامپ تأثیر می‌گذارند. در آسیب‌های مغزی سطح بیان BDNF در هیپوکامپ (۱۱)، لوب گیجگاهی، پیشانی و آهیانه کورتکس کم می‌شود (۱۲). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تجویز مزمن سدیم بوتیرات بر تثبیت یادگیری و حافظه فضایی و سطح بیان هیپوکامپی BDNF در مدل ایسکمی هایپوکسیک با انسداد کامل یک طرفه مغزی بود.

مواد و روشها

حیوانات و گروه‌های آزمایشی

در این مطالعه تجربی، از ۵۰ سر موش صحرایی ماده، نژاد اسپراگ داولی، با محدوده وزنی ۲۵±۱۸۰ گرم و سن ۸ هفته استفاده شد. حیوانات در طول مدت آزمایش در شرایط استاندارد زندگی و چرخه روشنایی و تاریکی (۱۲ ساعت به ۱۲ ساعت) نگهداری شدند و آب و غذا آزادانه در دسترس حیوانات قرار داده شد. تمام مراحل کار طبق اصول اخلاقی، قوانین بین المللی و ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز انجام شده است. حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شدند: ۱. گروه کنترل: حیوانات این گروه تحت هیچ گونه تیماری قرار نگرفتند و از آنها به منظور بررسی و مقایسه با سایر گروهها استفاده شد، ۲. گروه HI+Saline (هایپوکسی ایسکمیک+ نرمال سالین): این حیوانات تحت عمل جراحی ایسکمی هایپوکسیک یک طرفه مغزی قرار گرفتند و سپس نرمال سالین را به مدت ۱۴روز دریافت کردند، ۳. گروه HI+SB۰/۱ (هایپوکسی ایسکمیک + سدیم بوتیرات ۰/۱): موش‌های صحرایی این گروه پس از قرار گرفتن تحت عمل جراحی برای القاء مدل، سدیم بوتیرات (Sigma) را با دوز ۰/۱میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هر روز (۰/۱ mg/kg/day)، ۲۴ ساعت پس از القاء مدل و به مدت ۱۴ روز دریافت کردند، ۴. گروهHI+SB۰/۳ (هایپوکسی ایسکمیک + سدیم بوتیرات ۰/۳): این حیوانات پس از قرار گرفتن تحت عمل جراحی القاء مدل، سدیم بوتیرات با دوز ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم در هر روز (۰/۳ mg/kg/day)، ۲۴ ساعت پس از القاء مدل و به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. گروه ۰/۶ (هایپوکسی ایسکمیک + سدیم بوتیرات ۰/۶)HI+SB: حیوانات این گروه پس از جراحی القاء مدل، سدیم بوتیرات را با دوز ۰/۶ میلی گرم بر کیلوگرم در هر روز (۰/۶ mg/kg/day)، ۲۴ ساعت پس از القاء مدل و به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. تجویز سدیم بوتیرات به صورت درون صفاقی (*i.p.*) انجام شد.

القا مدل ایسکمی هایپوکسیک

به منظور القاء ایسکمی، شریان کاروتید چپ به طور کامل بسته شد. برای این کار ابتدا حیوانات با تزریق درون صفاقی مخلوطی از دو داروی کتامین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. در حین جراحی باید توجه کرد که عصب واگ دچار آسیب نشود. شریان کاروتید چپ با ابریشم جراحی۰-۴ مسدود شد. سپس حیوانات در محفظه القاء هایپوکسی، حاوی ٪۸ اکسیژن به مدت یک ساعت قرار داده شدند (۱۳). آنگاه حیوانات به قفس ریکاوری منتقل شدند. ۲۴ ساعت پس از القاء مدل و ارزیابی های نورولوژیک اولیه، تجویز سدیم بوتیرات آغاز شد.

www.SID.ir

Arshive of SID

روش عملی آزمون ماز موریس و پروپ (ارزیابی حافظه فضایی)

به منظور بررسی میزان یادگیری فضایی حیوانات، تست ماز آبی موریس و پروپ در حیوانات مورد پژوهش، انجام گرفت. ماز آبی شامل یک استخر استوانه‌ای سیاه رنگ پر شده از آب است. دمای آب ۲۵ درجه سانتی گراد می باشد، هم چنین یک سکوی قابل تغییر و مخفی با قطر حدود ۱۱ سانتی متر که حدوداً ۲ سانتی متر زیر آب قرار می‌گیرد.

استخر در اتاقی قرار گرفته است که اشکالی در خارج از ماز بر روی دیوارنصب شده است و موقعیت فرد آزمون گیرنده در کل مدت آزمایش ثابت است. میزان تأخیردر یافتن سکو در این تست بررسی می شود. اگر رت در مدت ۶۰ ثانیه، نتواند سکو را بیابد، باید به سمت آن هدایت شود. به هر رت برای مدت ۱۵ ثانیه اجازه داده می‌شود که بر روی سکو بماند، تا موقعیت خود راشناسایی کند. این تست در چهار روز (بلوک) تکرار می‌شود. در روز پنجم آزمون پروپ انجام می شود، سکو برداشته می‌شود و حیوان به مدت ۶۰ ثانیه در استخر رها می-شود. مدت زمانی که رت ها در ربع سکو شنا می‌کنند و به جستجوی سکو می‌پردازند، محاسبه می‌شود. کل آزمایش، شامل چهار روز (بلوک) آموزش و یک روز آزمون (پروب) است. هر بار آزمایش شامل رها کردن حیوان در آب در چهار موقعیت شمال (N)، جنوب (S)، شرق (E) و غرب (W) است که به صورت اتفاقی انجام می‌گیرد. حیوان طوری وارد استخر می‌شود که صورتش به سمت دیواره استخر باشد و به حیوان اجازه داده می‌شود تا در مدت زمان یک دقیقه، موقعیت سکو را یافته و بر روی آن قرار گیرد. در هر مرحله فاکتورهایی چون، تأخیر در یافتن سکو، مدت زمان شنا کردن در هر ربع، سرعت شنا کردن و مسافت پیموده شده بررسی می‌شود (۱۴).

سنجش میزان هیپوکامپی BDNF

در پایان آزمایشات رفتاری حیوانات در دسیکاتور با استنشاق اتر بیهوش شدند و سپس به وسیله گیوتین سر آنها جدا شد. مغز به طور کامل از جمجمه خارج و بر روی یخ قرار داده شد. سپس، هیپوکامپ با دقت در زیر استریوسکوپ از بقیه قسمتهای مغز جدا شده و به سرعت با استفاده از ازت مایع در هاون چینی منجمد شد. آنگاه به سرعت با ضربه زدن به بافت به صورت پودر در آمد و با افزودن ۱ میلی لیتر از فسفات بافر سالین (PBS) و سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ و زمان ۵ دقیقه، محلول رویی جدا شد و جهت سنجش BDNF به روش الایزا توسط کیت شرکت باستر چین مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

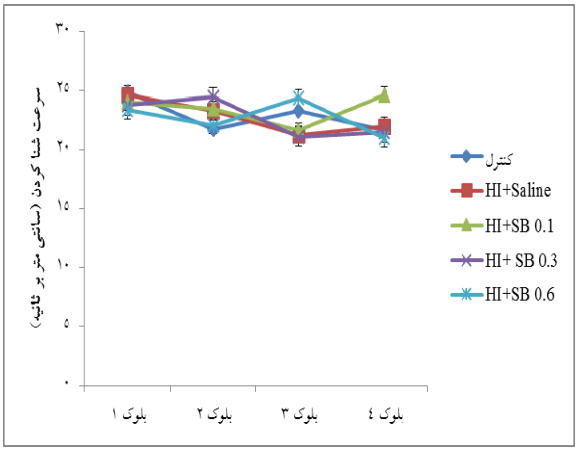
تحلیل آماری

تحلیل آماری بین گروه های مختلف با استفاده از نرم افزارهای آماری SPSS ویرایش۲۲ انجام شد. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه های مورد نظر در آزمون پروب و سنجش BDNF از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و جهت سنجش آزمون آموزش از Repeated Measure ANOVA و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. از نظر آماری، مقادیر P< ۰۵/ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی سرعت شنا

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که تمام گروه‌های مورد مطالعه در مرحله آموزش (چهار بلوک یادگیری) تفاوت معنی‌داری از نظر سرعت پیمایش مسیر نداشتند (نمودار ۱).



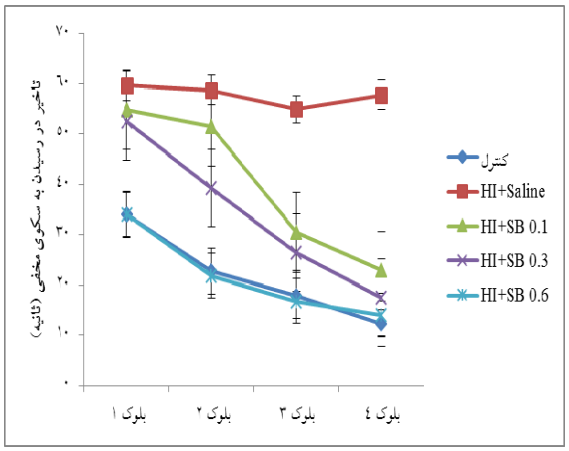
نمودار ۱. سرعت پیمایش مسیر در مرحله آزمایش در گروه‌های مختلف طی ماز آبی موریس. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر بود. موش-های صحرایی در گروه HI+Saline به مدت ۱۴ روز پس از جراحی نرمال سالین را دریافت کردند و در گروه‌های تیمار، دوزهای ۰/۱ ، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن را به مدت ۱۴ روز سدیم بوتیرات دریافت کردند.

ارزیابی مدت زمان تاخیر و مسافت پیموده شده تا رسیدن به سکوی مخفی در مرحله آموزش

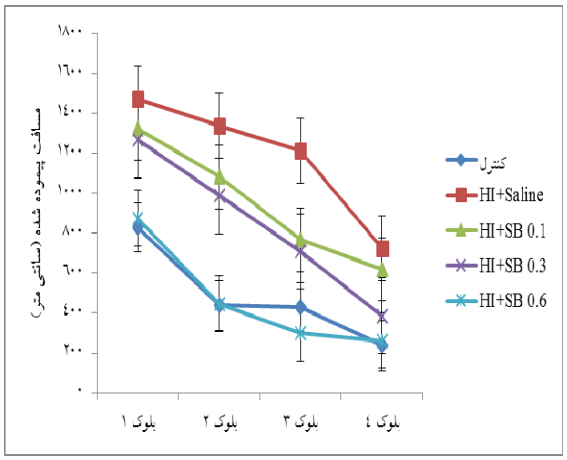
نتایج حاصل نشان داد که مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی (نمودار ۲) و مسافت پیموده شده (نمودار ۳) در مرحله یادگیری اختلاف معنی داری بین گروه کنترل و HI+Saline در هر چهار بلوک یادگیری وجود دارد (p<۰/۰۰۰۱).

www.SID.ir

Arshive of SID



نمودار۲. مقایسه زمان سپری شده برحسب ثانیه برای رسیدن به سکو در ۴ بلوک آزمایش بین گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر بود. موش‌های صحرایی در گروه HI+Saline به مدت ۱۴ روز پس از جراحی نرمال سالین را دریافت کردند و در گروه‌های تیمار، دوزهای ۰/۱ ، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن را به مدت ۱۴ روز سدیم بوتیرات دریافت کردند.



نمودار۳. مقایسه مسافت پیموده شده برحسب سانتی‌متر برای رسیدن به سکو در ۴ بلوک آزمایش بین گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر بود. موش‌های صحرایی در گروه HI+Saline به مدت ۱۴ روز پس از جراحی نرمال سالین را دریافت کردند و در گروه‌های تیمار، دوزهای ۰/۱ ، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن را به مدت ۱۴ روز سدیم بوتیرات دریافت کردند.

در بلوک ۱ و در مدت زمان رسیدن به سکو بین گروه کنترل با گروه‌های HI+SB ۰/۱ و HI+SB۰/۳ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < ۰/۰۰۱$). بین حیوانات گروه HI+Saline و گروه HI+SB۰/۶ اختلاف آماری معنی‌دار دیده شد ($p<۰/۰۰۰۱$). در مقایسه بین گروههای تیمار بین گروه HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < ۰/۰۱$). در بلوک ۲، بین گروه کنترل با گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۳ اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < ۰/۰۰۰۱$). بین گروه HI+Saline با گروه‌های HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶ اختلاف معنی دار دارد ($p < ۰/۰۰۰۱$). بین گروه HI+SB۰/۱ با گروه‌های HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌دار دیده شد (به ترتیب: $p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۰۰۱$). همچنین، بین گروه HI+SB۰/۳ با گروه HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۰۰۱$ مشاهده شد. در بلوک ۳، بین گروه کنترل با گروه HI+SB۰/۳ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بین گروه HI+Saline با گروه‌های مختلف تیمار با سدیم بوتیرات اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p<۰/۰۰۰۱$). در بررسی بین گروه‌های تیمار بین گروه HI+SB۰/۱ با گروه HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < ۰/۰۰۰۱$). همچنین، بین گروه HI+SB۰/۳ با گروه HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p<۰/۰۱$). در بلوک ۴، بین گروه کنترل با گروه HI+SB۰/۱ و گروه HI+SB۰/۳ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (به ترتیب $p<۰/۰۰۰۱$ و $p<۰/۰۱$). بین گروه HI+Saline با همه گروه‌های تیمار اختلاف معنی‌دار آماری در سطح $p<۰/۰۰۰۱$ مشاهده شد. بین گروه HI+SB۰/۱ با گروه HI+SB۰/۳ و گروه HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌داری به ترتیب در سطح $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۰۱$ مشاهده شد. همچنین، بین گروه HI+SB۰/۳ با گروه HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ($p<۰/۰۵$).

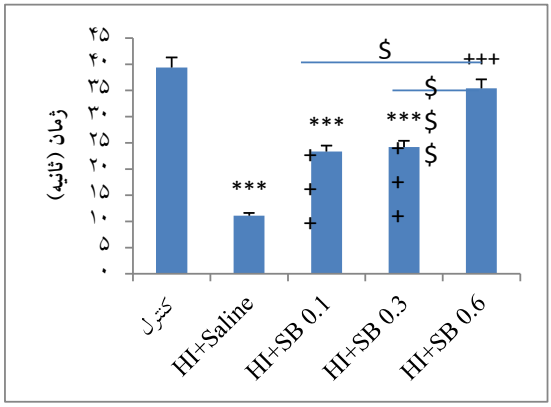
همچنین، گروه‌های دریافت کننده دوزهای متفاوت سدیم بوتیرات نسبت به حیوانات گروه HI+Saline کاهش معنی داری را در مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی ($p<۰/۰۰۰۱$) و کاهش معنی‌داری در مسافت پیموده شده تا رسیدن به سکوی مخفی طی مرحله آموزش نشان دادند ($p<۰/۰۰۰۱$).

در بلوک ۱، بین گروه کنترل با گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۳ نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۰۱$). همچنین، بین گروه HI+Saline تنها با گروه HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۰۰۱$). بین گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۶ و بین گروه‌های HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌دار دیده شد (هر دو $p<۰/۰۱$). در دومین بلوک، بین گروه کنترل با گروه‌های HI+Saline و HI+SB۰/۱ اختلاف معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۰۰۱$ مشاهده شد. همچنین، بین گروه کنترل و گروه HI+SB۰/۳ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$). بین گروه HI+Saline با گروه‌های HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶

www.SID.ir

Arshive of SID

اختلاف معنی‌داری به ترتیب در سطح $p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۰۰۱$ دیده شد.



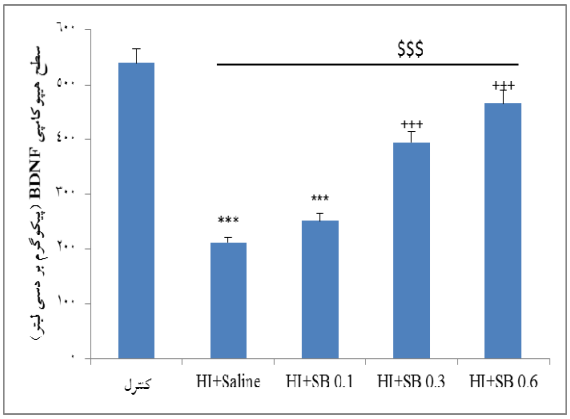
نمودار۴. مقایسه مدت زمان شنا کردن حیوانات در ربع هدف در گروه‌های مورد آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر بود. موش‌های صحرایی در گروه HI+Saline به مدت ۱۴ روز پس از جراحی نرمال سالین را دریافت کردند و در گروه‌های تیمار دوزهای ۰/۱ ، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن را به مدت ۱۴ روز سدیم بوتیرات دریافت کردند. *** یا +++ یا $$$: اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ *: اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ، + : اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شم و $: اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار.

بین گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۶ و بین گروه‌های HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌داری دیده شد (به ترتیب $p<۰/۰۰۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$). در بلوک ۳ بین گروه کنترل با گروه HI+Saline اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۰۱$). بین گروه کنترل با گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۳ نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p < ۰/۰۵$). بین گروه HI+Saline با همه گروه‌های تیمار اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۰۰۱$). بین گروههای HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶ اختلاف معنی دار ($p < ۰/۰۰۰۱$) مشاهده شد. در بلوک ۴ یادگیری نتایج نشان داد که بین گروه کنترل با گروه HI+Saline اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < ۰/۰۱$). بین گروه HI+Saline و گروه HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌دار مشاهده شدی ($p < ۰/۰۵$). بین گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۶ اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p<۰/۰۵$).

در واقع مدت زمان (نمودار ۲) و مسافت پیموده شده (نمودار ۳) تا رسیدن به سکوی مخفی در گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده سدیم بوتیرات به طور پیشرونده‌ای کاهش می‌یابد. در مقابل، موش‌های صحرایی گروه HI+Saline طی ۴ بلوک مختلف یادگیری مدت زمان و مسافت بیشتری را برای یافتن سکوی مخفی سپری کردند.

نتایج مرحله آزمون (پروب) در ربع هدف

نتایج نشان داد که مدت زمان باقی ماندن در ربع هدف بین حیوانات گروه کنترل و گروه HI+Saline و گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۳ اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < ۰/۰۰۰۱$). همچنین، بین گروه HI+Saline با همه گروه‌های تیمار اختلاف معنی دار دیده شد ($p<۰/۰۰۰۱$). بین گروه HI+SB۰/۱ با گروه‌های HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶ نیز اختلاف معنی دار بود ($p<۰/۰۰۰۱$) (نمودار ۴).



نمودار۵. مقایسه سطح بیان هیپوکامپی BDNF در گروههای مورد آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر بود. موش‌های صحرایی در گروه HI+Saline به مدت ۱۴ روز پس از جراحی نرمال سالین را دریافت کردند و در گروه‌های تیمار دوزهای ۰/۱ ، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن را به مدت ۱۴ روز سدیم بوتیرات دریافت کردند. *** یا +++ یا $$$: اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ *: اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ، + : اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شم و $: اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار.

سنجش سطح بیان هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز

نتایج حاصل نشان داد که ایسکمی هایپوکسیک مغزی سبب کاهش معنی‌داری در سطح هیپوکامپی BDNF می‌شود، به گونه‌ای که میزان BDNF در عصاره هیپوکامپ گروه HI+Saline به میزان قابل توجهی کمتر از گروه کنترل بود ($p <۰/۰۰۱$ ، نمودار۵). این در حالی است که تیمار با سدیم بوتیرات سبب افزایش قابل توجهی در سطح هیپوکامپی BDNF در گروه‌های آزمون نسبت به گروه HI+Saline شد. بدین ترتیب که بین گروه های HI+SB۰/۳ و HI+SB۰/۶ با گروه HI+Saline اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p<۰/۰۰۱$). همچنین، بین گروه HI+SB۰/۱ با گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p<۰/۰۰۱$). از طرف دیگر طبق نمودار

www.SID.ir

Arshive of SID

۵، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۶ دیده شد ($p<۰/۰۰۱$).

بحث

در این مطالعه پس از بستن شریان کاروتید چپ و قرار دادن حیوان در محفظه هیپوکسی که حاوی ۸٪ اکسیژن بود، ایسکمی هایپوکسیک القاء گردید و آثار ایسکمی بر حافظه و یادگیری مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین، در این مطالعه از تاثیر درمانی یک مهارگر هسیتون داستیلازی یعنی سدیم بوتیرات به منظور درمان اختلال حافظه استفاده شد. به منظور بررسی اثرات ناشی از ایسکمی و خاصیت درمانی سدیم بوتیرات از آزمون ماز آبی موریس و پروب جهت ارزیابی حافظه فضایی استفاده شد. همان گونه که نتایج نشان می‌دهد مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی در گروههایی که تحت جراحی القاء ایسکمی قرار گرفته بودند، نسبت به گروه کنترل سالم کاهش محسوسی نشان داد ، هر چند تیمار با سدیم بوتیرات توانست سبب بهبود فرایند یادگیری و حافظه شود. مسافت طی شده تا رسیدن به سکوی مخفی که در گروه‌های آسیب دیده افزایش داشت، در گروه‌های تیمار شده با سدیم بوتیرات کاهش یافت. این در حالی است که تفاوتی از نظر سرعت شنا کردن بین گروه‌های مختلف دیده نشد. این امر نشان می‌دهد که ایسکمی مغزی تاثیری بر فرایند حرکت حیوان نداشته و هیچ گونه اختلال حرکتی در این مدل از بیماری دیده نشد. بنابراین، مدت زمان رسیدن به سکوی مخفی و تغییر این زمان به حافظه فضایی حیوان مرتبط است و عدم وجود اختلال حرکتی را می‌توان با عدم اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف در سرعت شنا کردن توجیه کرد. از طرفی هم‌زمان با بهبود حافظه فضایی سطح بیان هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در گروههای دریافت کننده سدیم بوتیرات به میزان قابل توجهی نسبت به گروه ضایعه دیده افزایش نشان داد.

اغلب مطالعاتی که روی ایسکمی مغزی با بستن شریان کاروتید صورت گرفته‌اند، به عنوان ابزاری در مطالعات نوروژنراسیون مغز استفاده می‌شوند. سپس به درمان‌های متناسب با آن جهت بهبود اختلال در حافظه فضایی پرداخته‌اند. در مطالعات بیان شده که حافظه فضایی توسط نورون‌های هیپوکامپ کنترل می‌شود و نوروژنز در مغز انسان سالم در هیپوکامپ روی می‌دهد. نورون‌های عصبی در ایسکمی مغزی به ویژه در ناحیه CA1 و DG یا ژیروس دندانه‌ای هیپوکامپ از بین می‌روند (۱۶). این تخریب نورونی منجر به اختلال در حافظه فضایی در افراد بیمار می‌شود. ثابت شده است که در طول ایسکمی مقادیر بالایی از RNS/ROS تولید می‌شود که سبب آسیب سلولی می‌شود. امروزه نقش آسیب رسان ایسکمی مغزی بر حافظه فضایی و اعمال مختلف یادگیری به اثبات رسیده است (۱۷). ایسکمی مغزی باعث اختلال در حافظه فضایی می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که درمان با سدیم بوتیرات باعث افزایش در تعداد سلول‌های عصبی و تنظیم BDNF می‌شود (۱۸). نوروتروفین‌ها تنظیم کننده‌های اصلی تکوین، رشد و تمایز بخش های مختلف سیستم عصبی مرکزی و محیطی هستند (۱۹). BDNF یکی از نوروتروفین-های اصلی است که در سرتاسر زندگی در قشر انتورینال تولید می‌شود و دارای اثرات تروفیک در رشد و تکوین سیستم عصبی است. علاوه بر اثرات تروفیک در نورون‌های هدف، BDNF بخشی از مکانیزم تعدیل وابسته به فعالیت سیناپسی محسوب می‌شود. این مکانیزم پتانسیل طولانی مدت عملکرد سیناپسی را در هیپوکامپ و قشر مغز ساماندهی می‌کند (۲۰). مطالعه حاضر نیز نشان داد که BDNF به دنبال تیمار با سدیم بوتیرات در هیپوکامپ موش‌های صحرایی ایسکمی شده افزایش می‌یابد. با القاء ایسکمی حافظه فضایی دچار نقص شده و مهار کننده‌های هیستون داستیلازی با فعال ساختن نورون-های قشری مغز و با بیان ژن‌های خاص می‌توانند آنزیم سیتوکروم $p_{۴۵۰}$ را رمز گذاری و پشتیبانی کنند که در بهبود حافظه فضایی نقش دارند (۲۱).

هیستون داستیلازها نقش کلیدی در هموستاز پروتئین استیله در هستیون‌ها و پروتئین‌های دیگر در تنظیم فعالیت اساسی سلولی مانند رونویسی بازی می‌کنند. طیف گسترده‌ای از اختلالات مغزی با عدم تعادل در سطح پروتئین استیله و اختلالات رونویسی همراه است. درمان با مهار کننده‌های هیستون استیلازی می‌تواند این کمبودها را اصلاح کند (۲۲). تریکوستاتین نیز به عنوان یک مهار کننده هیستون داستیلازی، یادگیری را در دوران بزرگسالی بهبود می‌بخشد، اما در محافظت از حافظه بلند مدت تاثیری ندارد. چندین بررسی اثرات حفاظت کننده عصبی کوتاه مدتی را برای مهار کننده هیستون داستیلازی پس از کم خونی موضعی مغزی یافته‌اند (۲۳). هیپوکامپ جزء اولین مناطقی از مغز است که تحت اثر بیماری‌های دژنراتیو مثل بیماری آلزایمر، بیماری هانتینگتون، بیماری پارکینسون و ضایعات ترومایی و همچنین ایسکمی قرار می‌گیرد (۲۴). مهار کننده‌های هیستون داستیلازی مانند سدیم بوتیرات و والپرات سدیم بر درمان حیواناتی که دچار این نوع بیماری بودند، آزمایش شد و

www.SID.ir

Arshive of SID

مشخص شد که تزریق مزمن هیستون داستیلازها باعث بازسازی حافظه می‌شود. سدیم بوتیرات می‌تواند در بهبود اختلالات حافظه در پیری نیز موثر باشد (۲۵).

کاهش حجم ناحیه اینفارکت در موش‌های صحرایی ماده پیر به همراه کاهش اختلالات حسی-حرکتی به دنبال تجویز درون صفاقی کوتاه مدت (حداکثر ۵ روز) و دوز ۳۰۰ میلی گرمی سدیم بوتیرات در مدل ایسکمی فوکال دیده شده است (۲۶). هرچند در مطالعه ما مشخص شد که دوز بسیار کمتر سدیم بوتیرات نیز اثرات نوروپروتکتیو دارد و ضعف شناختی را در مدل ایسکمی هایپوکسیک در موش‌های صحرایی بالغ کاهش می‌دهد و از طرفی، سطح بیان هیپوکامپی BDNF را به عنوان فاکتور بسیار مهمی در حافظه و شناخت افزایش می‌دهد. استفاده از این دوز بالا (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن سدیم بوتیرات) در مدل ایسکمی هایپوکسیک نوزادی (نوزادان ۷ روزه) با کاهش آسیب‌های سلولی در ناحیه ژیروس دندانه‌ای هیپوکامپ و القاء نوروژنز همراه بوده است (۲۷). هر چند Ziemka-Nalecz و همکارانش نشان دادند که تک دوز بالای سدیم بوتیرات به مدت ۵ روز اثرات نوروپروتکتیو دارد و سبب افزایش BDNF در کل نیمکره آسیب دیده می‌شود ، مطالعه ما ضمن استفاده از دوزهای کمتر، به بررسی ارتباط بین BDNF هیپوکامپی و حافظه و احتمال اثرگذاری سدیم بوتیرات از طریق افزایش سطح نوروتروفینی هیپوکامپ در مدل ایسکمی هیپوکسیک در موشهای صحرایی بالغ پرداخت.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز درون صفاقی سدیم بوتیرات می‌تواند به صورت وابسته به دوز (به ویژه در دوز ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان) به مدت ۱۴ روز متعاقب القاء هیپوکسی ایسکمیک، نقش موثری در بهبود حافظه و یادگیری فضایی ایفا کند. نتایج حاصل از این مطالعه به نقش مهارکننده‌های هیستون داستیلازی در بهبود آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی و اثرات آن بر تثبیت حافظه و یادگیری اشاره دارد. هرچند، نیاز به مطالعات بیشتری در این مدل وجود دارد.

REFERENCES

1. Dröse S, Stepanova A, Galkin A. Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation. Biochim Biophys Acta 2016;1857:946-57.

2. Altug EM, Melek IM, Erdoğan S, Düzgüner V, Öztürk A, Küçükgül A. The Neuroprotective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Global Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Brains. Kafkas Uni Vet Fak Derg 2014;20:877-84.

3. Ułamek-Kozioł M, Pluta R, Bogucka-Kocka A, Januszewski S, Kocki J, Czuczwar SJ. Brain ischemia with Alzheimer phenotype dysregulates Alzheimer'sdisease-related proteins. Pharmacol Rep 2016;68:582-91.

4. Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. ILAR J 2014;55:310-32.

5. Ahmadiasl N, Alaei H, Hänninen O. Effect of exercise on learning, memory and levels of epinephrine in rats' hippocampus. J Sports Sci Med 2003;2:106-9.

6. Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. Neuropharmacology 2008;55:1081-94.

7. Claesson L, Lindén T, Skoog I, Blomstrand C. Cognitive impairment after stroke- impact on activities of daily living and costs of care for elderly people. The Göteborg 70+ Stroke Study. Cerebrovasc Dis 2005;19:102-9.

8. Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:9808-13.

9. Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, et al. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. J Neurosci 2003;23:9418-27.

10. Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. Pharmacol Rev 2012;64:238-58.

11. Rafiei S, Bazyar Y, Edalatmanesh MA. Effect of Gallic Acid and Endurance Exercise Training on BDNF in a Model of Hippocampal Degeneration. Shefaye Khatam 2016;4:1-6.

12. Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. Eur J Neurosci 2004;20:2580-90.

13. Hosono T, Kamo A, Hakotani S, Minato K, Akeno H, Taguchi Y, et al. Effect of hypothermia on motor function of adult rats after neonatal hyperthermic hypoxic-ischemic brain insult. Eur J Appl Physiol 2010;109:35-9.

www.SID.ir

Arshive of SID

14. Golestani S, Edalatmanesh MA, Hosseini M. The Effects of Sodium Valproate on Learning and Memory Processes in Trimethyltin Model of Alzheimer's Disease. Shefaye Khatam 2014;2:19-26.

15. Moghadas M, Edalatmanesh MA. The Lithium Chloride Effect on Anxiety, Exploratory Activity, and Brain Derived Neurotrophic Factor Levels of the Hippocampus in a Rat Model of TMT Intoxication. Shefaye Khatam 2015;3:1-10.

16. Tian L, Nie H, Zhang Y, Chen Y, Peng Z, Cai M, et al. Recombinant human thioredoxin-1 promotes neurogenesis and facilitates cognitive recovery following cerebral ischemia in mice. Neuropharmacology 2014;77:453-64.

17. Squire LR, Wixted JT. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. Annu Rev Neurosci 2011;34:259-88.

18. Taliyan R, Ramagiri S. Delayed neuroprotection against cerebral ischemia reperfusion injury: putative role of BDNF and GSK-3β. J Recept Signal Transduct Res 2016;36:402-10.

19. Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75NTR--live or let die. Curr Opin Neurobiol 2005;15:49-57

20. Yano H, Chao MV. Mechanisms of neurotrophin receptor vesicular transport. J Neurobiol 2004;58:244-57.

21. Opitz B, Mothes HK, Clausing P. Effects of prenatal ethanol exposure and early experience on radial maze performance and conditioned taste aversion in mice. Neurotoxicol Teratol 1997;19:185-90.

22. Forrest MD. The sodium-potassium pump is an information processing element in brain computation. Front Physiol 2014;5:472.

23. Chand DM, Leng Y, Mariova Z, Kim HJ, Chiu CT. Multipe roles of HDAC hippocampal neurodegenerative conditions. Science Direct 2009;11:591-601.

24. Liu RR, Murphy TH. Reversible cyclosporin A-sensitive mitochondrial depolarization occurs within minutes of stroke onset in mouse somatosensory cortex in vivo: a two-photon imaging study. J Biol Chem 2009;284:36109-17.

25. Fathallah H, Atweh GF. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006:58-62.

26. Park MJ, Sohrabji F. The histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, exhibits neuroprotective effects for ischemic stroke in middle-aged female rats. J Neuroinflammation 2016;13:300.

27. Ziemka-Nalecz M, Jaworska J, Sypecka J, Polowy R, Filipkowski RK, Zalewska T. Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Exhibits Neuroprotective/Neurogenic Effects in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia. Mol Neurobiol 2017;54:5300-18.

www.SID.ir