فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال نهم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۶

بررسی اثر نوروتروفیک ریفامپیسین بر اختلال حافظه در مدل ایسکمی/ رپرفیوژن مغزی موش صحرایی نرویستار

سوگل شکیبانیا[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 دریافت: ۹۶/۰۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۱/۲۰

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 درموش صحرایی می‌پردازیم. ۳۲ راس موش صحرایی نر نژاد ویستار به ۴ گروه ۸ تایی کنترل، ایسکمی، حامل و آزمایشی تقسیم شدند. درگروه آزمایشی، 20 mg/kg ریفامپیسین در ابتدای ریپرفیوژن و ۲۴ ساعت پس از ریپرفیوژن 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 بَرای یافتن سکو در ماز آبی موریس می‌گردد و تعداد سلول‌های هرمی سالم را بطور معنی‌داری متعاقب ایسکمی ریپرفیوژن فراگیر افزایش می‌دهد به طوریکه بین گروه کنترل، ایسکمی و حامل تفاوت اماری معنی‌دار ($p<0.05$) وبین 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

آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی که سومین عامل مرگ و میر در کشورهای غربی محسوب می‌گردد، در اثر تغییر ارتباطات ساده بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به دنبال اختلال جریان خون ایجاد می‌شود. [۱]

آسیب‌های ریپرفیوژن 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 خـون بـه جـای بازگشت فعالیت نرمال بافت باعث التهاب و آسیب‌های اکسیداتیو از طریق القای استرس اکسیداتیو می‌شود [۹]. بعد از برقراری جربان خون مغزی، جریان بازگشتی به دنبال انسداد باعث بازگشت اکسیژن در سلول‌ها و آسیب‌های ناشـی 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 هیپو کامپ جایگاه اصلی یـادگیری و حافظه 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 شدیدا احساس می‌گردد.

ریفاپیسین یک ماده ضد باکتریال است که به طور گسترده در درمان سل و جذام استفاده می‌شود. [۱۴] این دارو RNA پلی مرآز وابسته به DNA و در نتیجه پروتئین سازی باکتری را مهار می‌کند. باکتری‌های مقاوم توان تولید RNA پلی مرآزهایی با تفاوت جزیی در زیر واحد بتا که توسط ریفامپیسین مهار نمی‌شوند را دارند. داروی فوق با تاثیر بر زیرواحد 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، منتژیت، الزایمر، و 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 براین از طریق پروتئین‌های پیش وضد (آنتی) اپوپتوز باعث بلوک مرگ برنامه‌ریزی سلولی می‌شود.[۸]

با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی اثر ریفامپیسین بر روی حافظه ی فضایی وضایعات بافتی هیپوکامپ انجام نشده، ما به بررسی اثر ریفاپیسین بر روی اختلالات حافظه فضایی متعاقب ایسکمی/ رپرفیوژن فراگیر در موش صحرایی نر ویستار پرداختیم، تا مشخص شود که ایا 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 ویستارتهیه شده از موسسه تحقیقات پاستور با وزن (۳۰۰-۲۵۰g) انجام گرفت. حیوانات در دمای۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و با ۱۲ ساعت سیکل روشنایی- تاریکی نگهداری شدند وآب و غذا به مقدار کافی در دسترس حیوانات قرار گرفت.

گروه‌ها

حیوانات به طور تصادفی به ٤ گروه ۸ تایی تقسیم شدند:

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

گروه ایسکمی: بعد از بیهوش کردن رت‌ها، شریان‌های کاروتید مشترک دو طرف به مدت ۲۰ دقیقه بسته وسپس بازگشت مجدد خون انجام شد.

گروه آزمایشی:داروی ریفامپیسین با دوز انتخابی 20 mg/kg بصورت داخل صفاقی در شروع ریپرفیوژن و ٢٤ 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، رت‌ها در تمامی گروه‌ها به منظور بررسی حافظه فضایی توسط ماز آبی موریس به مدت چهار روز متوالی، ارزیابی شدند. پس ازاتمام تست ماز آبی موریس، مغز رت‌ها از طریق پرفیوژن قلبی بصورت اولیه ثابت شده و پس از قطع سر حیوان توسط گیوتین، از جمجمه خارج و جهت رنگ‌آمیزی نیسل آماده گردید.

روش جراحی

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

ماز آبی موریس

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

دستگاه مورد استفاده از یک حوضچه استوانه ای شکل سیاه رنگ با قطر ١٣٦ سانتی‌متر و ارتفاع ٦٠ سانتی‌متر تشکیل شده که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر از آب $۲۳ \pm ۲\ ^{o}C$ پر می‌شود.

حوضچه به طور فرضی به چهار ربع دایره با چهار نقطهٔ به آب‌اندازی حیوان به نام‌های شمال (N) ، شرق (E) جنوب (S) و غرب (W) تقسیم شد. سکویی از جنس پلکسی گلاس با قطر ۱۰ cm در مرکز ربع دایرهٔ فرضی شمال غرب حوضچه قرار داده شد، ارتفاع آب به گونه‌ای بود که سکو ۱ cm زیر سطح آب قرار می‌گرفت. 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 می‌ماند. به دیوارهای اتاق آزمایش سه راهنمای دیداری (Visual Cue or Landmark) به اشکال دایره، مربع و مثلث چسبانده شده بود که حیوان می‌بایست با استفاده از این علایم موقعیت سکوی پنهان را پیدا کند.

هر موش به مدت چهار روز تحت آموزش قرار می‌گرفت. هر روز شامل یک بلوک و هر بلوک شامل چهار تجربه می‌باشد. در هر تجربه حیوان به طوری که صورتش رو به طرف دیوار حوضچه باشد از یکی از چهار نقطه شروع در آب رها می‌شود. هر یک از چهار نقطه شروع در هر بلوک یک بار استفاده می‌شد و ترتیب آن به صورت تصادفی تعیین می‌گردید.

به هر یک از موش‌ها ٦٠ ثانیه زمان داده می‌شد که با شنا کردن محل سکوی پنهان زیر آب را پیدا کنند. اگر در کمتر از این زمان موفق به یافتن سکو می‌شدند، اجازه می‌یافتند ۲۰ ثانیه روی سکو بمانند و بعد از حوضچه خارج می‌شدند. موش‌هایی که در طی زمان ٦٠ ثانیه محل سکو را پیدا نمی‌کردند، به آرامی به

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

حرکات حیوان در ماز توسط دوربین مخصوص تصویربرداری که به‌یک 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 درهر 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 ٤٪ فیکس و سپس از جمجمه خارج شد و برای ثبوت بهتر در محلول پارافرمالدئید ٤٪ قرار داده شد وپس از آماده سازی بافتی بلوک های پارافینی در مقاطع کرونال به منظور رنگ آمیزی نیسل برش داده شدند.

رنگ‌آمیزی نیسل

پس از ثبوت و آماده‌سازی، مقاطع کرونال به ضخامت ۱۰µ در فاصله 2.3-5mm از خلف برگما تهیه و توسط روش نیسل رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤۰۰× 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 فتومیکروگراف تهیه شد که سه فتومیکروگراف بطور تصادفی انتخاب و سلول‌های هرمی نواحی CA1 هیپوکامپ توسط نرم‌افزار image tools۲ 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

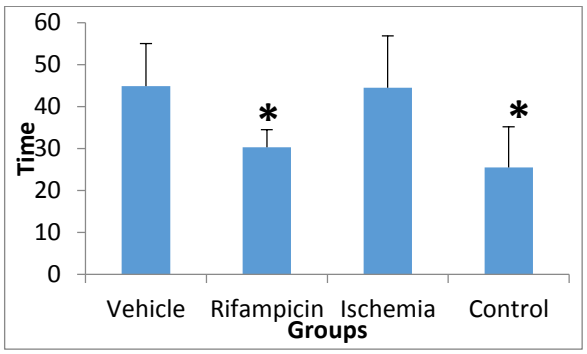
داده‌ها توسط نرم افزارآماری SPSS19 و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون tukey انجام شد و سطح معنی‌داری P<0.05 در نظر گرفته شد.

نتایج

در بررسی میانگین زمان لازم برای یافتن سکو در طی ٤ 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 می گردد.

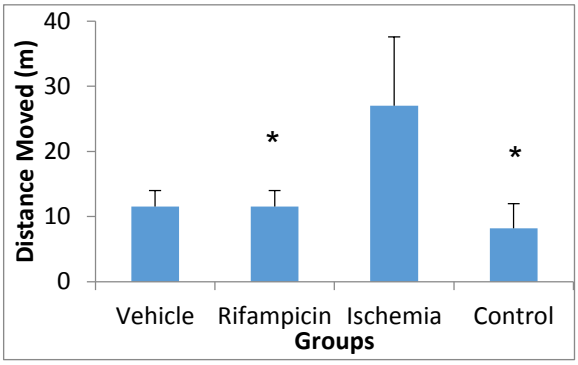
در بررسی میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو در طی ٤ روز اختلاف آماری بین گروه کنترل و گروه ایسکمی معنی دار بود.این تفاوت بین گروه کنترل و حلال نیز معنی دار بود (p< 0.05) در

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 گروه های ایسکمی و حامل می‌باشد.



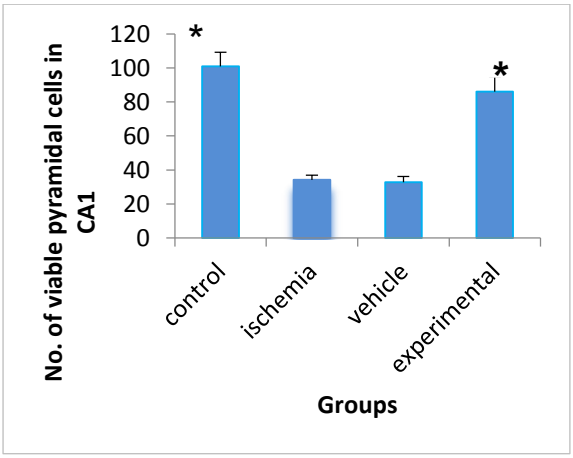
نمودار ۲۲- ۲ میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو در گروه‌های مختلف آزمایشی

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

از آنجائی‌که 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 گروه‌ها بیانگر این است که سیستم حرکتی حیوانات تحت ثاثیر قرار نگرفته است.

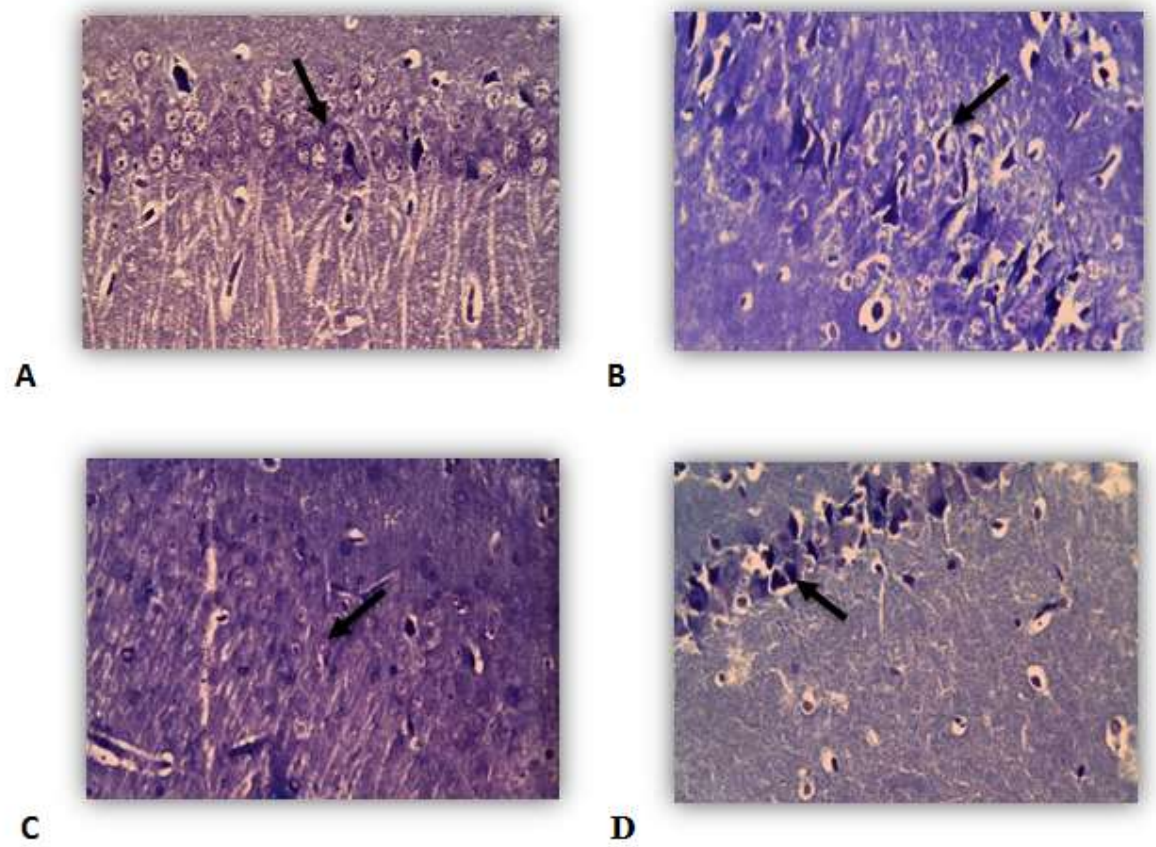
بررسی داده‌ها نشان داد که بستن شریان‌های کاروتید مشترک با زمان ۲۰ دقیقه باعث کاهش شدید تعداد سلول‌های هرمی سالم ناحیه CA1 هیپوکامپ گردیده است به‌این ترتیب که میانگین تعداد سلول‌های سالم و زنده از ۳۹ عدد به ۱۲ عدد تنزل پیدا کرده بود که با تزریق دارو این تعداد افزایش یافت. اختلاف آماری بین گروه کنترل و 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 ۱و نمودار ۳).

این نتایج نشان داد که تزریق ریفامپیسین با دوز ۲۰mg/kg در شروع ریپرفیوژن و ۲٤ ساعت بعد از اتمام ریپرفیوژن تعداد سلول های هرمی زنده و سالم را بطور معنی داری افزایش می دهد.



نمودار ۳- تعداد سلول های هرمی ناحیه CA1 در گروه های مختلف آزمایشی

*** این علامت نمایانگر اختلاف معنی دار با گروه های ایسکمی و حامل می باشد.**



شکل۱: فتومیکروگراف ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی نر در گروه ها.پیکان A: نوک پیکان سلول زنده را درگروه کنترل نشان می‌دهد. پیکان B: نوک پیکان سلول دژنره رادرگروه ایسکمی نشان می‌دهد. پیکان C: نوک پیکان سلول زنده را در گروه آزمایشی (دارو گرفته) نشان می‌دهد. پیکان D: نوک پیکان سلول دژنره را در گروه حامل نشان می‌دهد. رنگ آمیزی نیسل، بزرگنمایی ٤٠٠×.

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 طرح‌های رفتاری می‌گردد [۴].

یافته‌های ما در این بررسی نشان داد که ایسکمی/ رپرفیوژن فراگیر گذرا در مغز به مدت ۲۰ دقیقه باعث کاهش تعداد سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌گردد.

سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ بسیار حساس بوده و سریعاً نسبت به ایسکمی فراگیر عکس العمل نشان می‌دهند [۵،۱۰]. این سلول‌های هرمی در یادگیری و حافظه فضایی نقش کلیدی داشته و تخریب آنها می‌تواند باعث اختلالاتی در این زمینه گردد [۳].

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

در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد عملکردی مشابه با آنچه که شرح داده شد توانسته موجب کاهش سلول‌های هرمی ناحیه CA1 گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد که داروی ریفامپیسین

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 ضدالتهابی، کاهش سیتوکین‌های التهابی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارو می‌داند، مطابقت دارد. [۱۳، ۸]

یافته‌های ما همچنین نشان داد که تزریق ریفامپیسین به میزان ۲۰ mg/kg قبل از شروع رپرفیوژن و ۲٤ 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 برتأیید 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 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 withmedial 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-signalinginsuf-ficiencyin Alzheimer's disease initiationand 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 phospholipiddegradation 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.