مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v14i3.2266

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تجویز ابستاتین بر بهبود حافظه فضایی و مرگ سلولی ناحیه هیپوکامپ بر اثر ایسکمی جریان مجدد مغزی

الهه میرعرب‌رضی[۱]، مهدی خاکساری*[۲]، ویدا حجتی[۳]، غلامحسن واعظی[۴]، عبدالحسین شیروی[۵]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی- گروه زیست‌شناسی- واحد دامغان- دانشگاه آزاد اسلامی- دامغان- ایران.
۲- دانشیار- گروه فیزیولوژی- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- شاهرود- ایران.
۳- استادیار- گروه زیست‌شناسی- واحد دامغان- دانشگاه آزاد اسلامی- دامغان- ایران.
۴- استاد- گروه زیست‌شناسی- واحد دامغان- دانشگاه آزاد اسلامی- دامغان- ایران.
۵- دانشیار- گروه زیست‌شناسی- واحد دامغان- دانشگاه آزاد اسلامی- دامغان- ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۴، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۹/۰۳

چکیده

مقدمه: *ابستاتین یک پپتید تازه کشف شده با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در مدل‌های حیوانی مختلف است. مطالعات اخیر نشان داده است که ابستاتین از آپوپتوز پس از آسیب ایسکمی قلبی/ ریپرفیوژن جلوگیری می‌کند. ایسکمی مغز/ ریپرفیوژن باعث آسیب غیرقابل برگشت به‌ویژه در ناحیه هیپوکامپ می‌شود. هدف اصلی در این مطالعه ارزیابی تأثیر نوروپروتکتیو ابستاتین بر درمان اختلالات شناختی و مرگ سلولی ناشی از ایسکمی در موش‌های صحرایی بود.*

مواد و روش‌ها: *روی ۲۸ موش صحرایی نر نژاد ویستار، ایسکمی ناشی از انسداد هر دو شریان کاروتید مشترک به مدت ۲۰ دقیقه ایجاد گردید و ابستاتین ۱ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی در شروع دوره ریپرفیوژن و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تجویز دوباره تزریق شد. آزمون حافظه فضایی توسط ماز آب موریس مورد بررسی قرار گرفت و سپس به جهت ارزیابی میزان مرگ سلولی نکروزیس از تکنیک رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل) استفاده شد.*

نتایج: *داده‌های رفتاری نشان داد که در گروه‌های تیمار شده با ابستاتین میزان یادگیری نسبت‌به گروه ایسکمی مغزی افزایش‌یافته و در آزمون پروب درصد حضور حیوانات در ربع دایره هدف در گروه‌های تیمار شده با ابستاتین به‌طور معناداری از گروه ایسکمی مغزی بیشتر بود که نشان‌دهنده بهبود عملکرد حافظه می‌باشد ($P<۰/۰۵$). به‌علاوه در گروه ایسکمی مغزی افزایش مرگ سلولی نکروز در ناحیه CA1 هیپوکامپ مشاهده گردید که تیمار با ابستاتین کاهش معناداری در میزان سلول‌های نکروتیک نشان داد ($P<۰/۰۱$).*

نتیجه‌گیری: *یافته‌ها نشان داد که درمان با ابستاتین به‌طور قابل توجهی آسیب ناحیه هیپوکامپ و اختلالات حافظه و یادگیری فضایی ناشی از ایسکمی را بهبود می‌بخشد. به‌نظر می‌رسد که این اثرات حفاظتی ابستاتین از مکانیسم‌های بسیاری مانند مهار مرگ سلولی نکروزیس و آپوپتوزیس به‌واسطه سرکوب رادیکال‌های آزاد ناشی می‌شود.*

واژه‌های کلیدی: ابستاتین، آپوپتوزیس، آستروسیت، هیپوکامپ، ایسکمی مغزی، اختلالات حافظه و یادگیری، مرگ سلولی.

نویسنده مسئول: شاهرود-میدان هفت تیر-دانشگاه علوم پزشکی-دانشکده پزشکی. **تلفن:** ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴، **نمابر:** ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴، **Email:** khaksari417@yahoo.com

ارجاع: میرعرب‌رضی الهه، خاکساری مهدی، حجتی ویدا، واعظی غلامحسن، شیروی عبدالحسین. بررسی اثر تجویز ابستاتین بر بهبود حافظه فضایی و مرگ سلولی ناحیه هیپوکامپ بر اثر ایسکمی جریان مجدد مغزی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۸؛۱۴(۳):۲۳-۳۰.

مقدمه

سکته مغزی و ایسکمی ناشی از آن سومین علت مرگ و میر در جوامع پیشرفته می‌باشد و هزینه بالایی صرف مراقبت از این بیماران می‌شود (۱). درمان‌های کمی برای ایسکمی وجود دارد. یکی از این موارد استفاده از فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن بافتی (از قبیل استرپتوکیناز) می‌باشد که موجب باز شدن عروق مسدود می‌شود. اگرچه به علت برخی محدودیت‌ها استفاده از این دارو هم بسیار کم می‌باشد (۲). از این محدودیت‌ها می‌توان به محدودیت زمانی استفاده از این داروها اشاره کرد چرا که هرچه سن لخته بیشتر باشد می‌تواند اثربخشی دارو را در بازگشایی عروق کم کند، به این علت که هرچه لخته قدیمی‌تر باشد ارتباطات فیبرین بیشتری دارد و به عوامل ترومبولیتک مقاوم‌تر است. از عوامل محدودکننده دیگر می‌توان به میزان اختصاصی بودن لیتیک‌ها برای فیبرین و نیمه عمر آنها اشاره کرد (۳).

برقراری مجدد جریان خون به‌دنبال ایسکمی مغزی تشکیل رادیکال‌های آزاد همچون گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تسریع کرده و سبب اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها، آسیب DNA و مرگ سلول می‌شود (۴). رادیکال‌های آزاد ایجاد شده بسیار فعال بوده و با سایر مولکول‌ها مانندDNA و لیپیدها وارد واکنش می‌شوند و با الکترون‌های منفرد آنها جفت شده و انواع مولکول‌های اکسیداتیو ایجاد می‌کنند. چندین رادیکال آزاد اکسیژن و مشتقات آنها که پس از ایسکمی ایجاد می‌شوند شامل آنیون‌های سوپراکسید ($O2^-$)، پراکسید هیدروژن ($H2O2$) و رادیکال‌های هیدروکسیل هستند (OH). آنیون‌های سوپراکسید می‌توانند با نیتریک اکساید (NO) واکنش داده و پروکسی نیتریت ($ONOO^-$)تولید کنند که یک رادیکال اکسیداتیو قوی است و باعث نیتراسیون پروتئین‌ها و اختلال در عملکرد آنها می‌شود (۵).

مطالعات نشان می‌دهند که عوامل ROS مانند سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل، در پیشبرد ادم مغزی و ضایعات مغزی نقش مهمی دارند (۶). مکانیسم‌های دقیقی که آنیون سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل در تشکیل ادم شرکت می‌کنند، ناشناخته باقی مانده است. تشکیل رادیکال‌های آزاد به‌ویژه سوپراکسیدان‌ها و پروتئازها به‌دنبال ایسکمی مغزی باعث تغییر سد خونی مغزی و تشکیل ادم و مرگ سلول‌ها می‌شود، برقراری مجدد جریان خون مغز بعد از ایسکمی موضعی موقتی، نفوذپذیری عروق مغز را افزایش داده و وضعیت ادم ایجاد شده پس از ایسکمی را وخیم‌تر می‌سازد (۷). علت مرگ تدریجی نورون در ناحیه ایسکمیک و ایجاد ضایعات ثانویه پس از ایسکمی مغزی دقیقاً مشخص نیست، اما احتمال می‌رود فعال شدن مسیرهای آبشاری نورتوکسیک بسیار پیچیده از جمله افزایش بیش از حد کلسیم داخل سلولی، رادیکال‌های آزاد، آزادشدن اسید آمینه تحریکی گلوتامات، اسید آراشیدونیک و متابولیت‌های آن، سیتوکاین‌ها، التهاب، آپوپتوز و تشکیل ادم و در این ناحیه باعث گسترش آسیب و بروز ضایعات ثانویه می‌شود (۸). شناخت مسیر مرگ سلولی در ایسکمی مغزی برای مداخله دارویی از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد. نکروز به‌عنوان مهمترین مسیر مرگ سلولی پذیرفته شده است. در طی سالیان اخیر محققین دریافته‌اند که آپوپتوزیس به همان اندازه نکروز در مرگ سلولی ناشی از ایسکمی مغزی می‌تواند نقش و سهم داشته باشد. آپوپتوزیس به‌عنوان مسیر مرگ سلولی در طی تغییرات پاتولوژیکی عصبی مرتبط با ایسکمی مغزی گلوبال و فوکال به‌عنوان یک حقیقت پذیرفته شده است و تغییرات آپوپتوزیس در مناطق مختلف مغز از قبیل نئوکورتکس، استریاتوم و تالاموس، بعد از انسداد دایمی و گذرا گزارش شده است و توالی زمانی این حوادث (آپوپتوزیس) ۶ ساعت بعد از شروع ایسکمی شروع شده و تا ۴۸-۲۴ ساعت بعد از ایسکمی به پیک خود می‌رسد (۹).

ایسکمی مغزی تغییرات مولکولی و عملکردی پیچیده‌ای در مغز ایجاد می کند که یکی از آن‌ها، فعال‌سازی قوی آستروسیت‌ها و میکروگلیاها می‌باشد. آستروسیت‌ها فراوان‌ترین نوع سلول‌های گلیا می‌باشند که برای عملکرد عادی به‌دنبال ایسکمی مناطق مختلف مغز دچار آسیب می‌شوند. هیپوکامپ یکی از نواحی مغز است که حساسیت بسیار بالایی به ایسکمی دارد و به‌دنبال ایسکمی مغزی بسیار آسیب‌پذیر خواهد بود (۱۶). بنابراین یکی از نواحی مهم مغزی مورد بررسی در این تحقیق می‌باشد. تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از ایسکمی مغزی موجب آسیب‌های ساختاری و عملکردی برگشت‌ناپذیری در هیپوکامپ خواهد شد (۱۷)، این تغییرات منجر به آسیب گسترده نورونی در هیپوکامپ می‌شود که اختلالات رفتاری از جمله اختلال در حافظه و یادگیری را به‌دنبال دارد (۱۸).

به نظر می‌رسد جلوگیری از التهاب، مهار آپوپتوز و کاهش تولید رادیکال‌های ازاد از جمله عواملی هستند که می توانند به ترمیم بافت عصبی پس از ایسکمی کمک کنند و عوارض ناشی از آن را کاهش دهند. از این‌رو، عاملی که بتواند برخی از این مکانیسم‌ها را بکار گیرد به ترمیم ناحیه آسیب دیده مغزی کمک زیادی خواهد کرد (۱۹). یکی از این عوامل احتمالی پپتید «آبستاتین» (Nesfatin-1) می‌باشد.

آبستاتین، هورمونی است که در سال ۲۰۰۵ کشف گردید. این هورمون پپتیدی که حاوی ۲۳ آمینو اسید می باشد در ابتدا از معده موش‌ها استخراج شد اما مشخص گردید در دوازدهه، مخاط معده، روده بزرگ، ته روده، طحال، پانکراس، شیر مادر، غده‌های پستانی، پلاسما، بزاق، و بیضه نیز وجود دارد (۲۰). هورمون پپتیدی آبستاتین توسط ژن گرلین بهمراه گرلین آسیل‌دار و بدون آسیل کدگذاری می‌شود و به‌واسطه فعل و انفعال با گیرنده جدا افتاده جفت پروتئین GPR39(G39) در نقش فیزیولوژیکی متضادی نسبت‌به گرلین عمل می‌کند (۲۱).

آبستاتین به‌وسیله وصل شدن به گیرنده‌هایی که هنوز ماهیت آنها مشخص نگردیده، دارای هم واکنش جانبی و هم مرکزی است که شامل تنظیم هوموستاز انرژی، ترشح هورمون، بهبود حافظه، تنظیم خواب، و بازداری از نوشیدن آب می‌باشد (۲۰). آبستاتین هم تحت شرایط فیزیولوژیکی و هم آسیب‌شناختی نقشی مهم در عملکرد قلبی انسان ایفا می‌کند. آبستاتین با بهبود بخشیدن عملکرد بافت ماهیچه‌ای قلب، موجب کاهش مرگ سلول‌ها و همچنین کاهش محدودیت ژنتیکی مرگ سلول‌های عضلانی قلب بعد از ایسکمی/خون‌رسانی مجدد (I/R) در قلب ایزوله رت می‌شود. این تأثیرات احتمالاً تحت تأثیر گیرنده‌های آبستاتین موجود در سلول‌های قلبی و با فعال‌سازی راه‌های سیگنال‌دهی موجود در نجات صدمات خون‌رسانی توسط پروتئین کیناز (RISK)، از قبیل فسفواینوسیتید کیناز۳(PI3K)، پروتئین کیناز C و کینازهای تنظیم سیگنال برون یاخته‌ای (ERK 1/2) انجام می گیرند (۲۱). مطالعات نشان می‌دهد که آبستاتین کاهش آپوپتوز سلولی را در مدل ایسکمی- ریپرفیوژن کلیوی با کاهش فعالیت پروتئین پیش‌آپوپتوزی کاسپاز-۳ و افزایش نسبت پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 به پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax (Bcl-2/Bax) انجام می‌دهد. به‌علاوه، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد آبستاتین آسیب حاد ایسکمی- ریپرفیوژن کلیوی را با سرکوب استرس اکسیداتیو و آپوپتوز سلولی کاهش خواهد داد. آبستاتین سرکوب استرس اکسیداتیو را با کاهش سطح مالون دی‌آلدهید (MDA) (به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی) و افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) انجام می‌دهد (۲۲) همچنین نشان داده شده است که آبستاتین، از قلب در برابر آسیب ایسکمی- ریپرفیوژن محافظت می‌کند. آبستاتین از طریق کاهش اندازه ناحیه انفارکت و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز در برابر ایسکمی- ریپرفیوژن قلبی اثر محافظتی دارد (۲۳).

مطالعات گذشته نشان داده است که آبستاتین از طریق کاهش مالون دی الدهید و افزایش گلوتاتیون باعث اثرات حفاظتی در مدل تشنجی موش صحرایی نر شده و تعداد دفعات تشنج و مرگ سلولی را کاهش می‌دهد (۲۳).

در این مقاله تأثیر نوروپروتکتیو آبستاتین بر بهبود حافظه فضایی از طریق مهار مرگ سلول‌های نکروز در برابر آسیب ناشی از ایسکمی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۸ رأس موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار و inbreed با وزن تقریبی ۲۶۰-۳۰۰ گرم از پژوهشکده رویان تهران خریداری و تحت شرایط استاندارد با دوره معکوس روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (۸ صبح تا ۸ شب) و دمای ۳ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد و دسترسی به آب آشامیدنی و غذای کافی نگهداری شدند. حیوانات برای سازگاری با محیط حداقل ۱۰ روز قبل از مطالعه به حیوانخانه منتقل شدند. رت‌ها سه بار در هفته وزن و با بررسی لازم اطمینان حاصل گردید که هیچکدام از حیوانات واجد بیماری یا دارای شواهدی دال بر بیماری نباشند. سپس رت‌ها به‌طور تصادفی در ۴ گروه ۷ تایی (گروه اول: ۱-گروه شم (n=۷): در این گروه نمونه‌ها فقط تحت عمل جراحی قرار گرفته ولی شریان‌های کاروتید مشترک آنها بسته نمی‌شود.

گروه دوم: گروه ایسکیمی (n=۷): در این گروه، با جراحی و انسداد موقتی با استفاده از میکرو کلمپ و بستن شریان‌های کاروتید مشترک به مدت بیست دقیقه ایسکیمی القاء شده و بلافاصله بعد از آن، سالین به‌عنوان حلال دارو در حجم ۱ میلی‌لیتر به نمونه‌ها تزریق می‌شود گروه سوم: گروه ایسکیمی-آبستاتین (n=۷): در این گروه، بلافاصله بعد از برقراری جریان مجدد و ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ایسکمی، آبستاتین با دوز ۱ میکروگرم/ به ازای کیلوگرم وزن بدن به نمونه‌ها تزریق می‌شود.

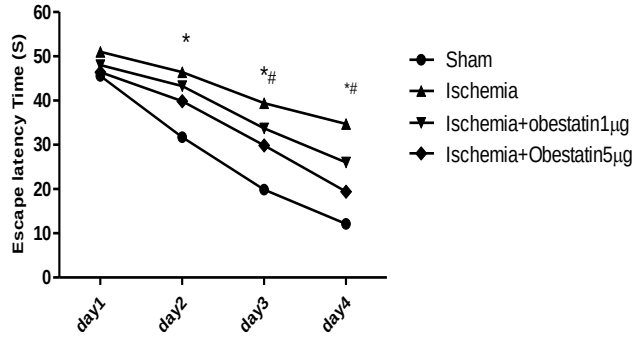
گروه چهارم: گروه ایسکیمی-آبستاتین (n=۷): در این گروه، بلافاصله بعد از برقراری جریان مجدد و ۲۴ و۴۸ ساعت بعد از ایسکمی، آبستاتین با دوز ۵ میکروگرم/ به ازای کیلوگرم وزن بدن به نمونه‌ها تزریق می‌شود. سه روز پس از تزریق ابستاتین، آزمون حافظه فضایی توسط ماز آب موریس مورد بررسی قرار گرفت و سپس به جهت ارزیابی میزان مرگ سلولی نکروزیس از تکنیک رنگ‌آمیزی کریزل ویوله (نیسل) استفاده شد. رنگ‌آمیزی نیسل معمولاً برای شناسایی ساختار پایه‌ای نورون‌های سالم از نورون‌های نکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌شود در این تحقیق از سلول‌های ناحیه هیپوکمپ CA1 برداشت شد. بعد از انجام پرفیوژن از نمونه‌های فیکس شده قالب پارافینه تهیه شد وپس از قالب‌گیری با پارافین، با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاتوری مقاطع کرونال با ضخامت ۷ میکرون تهیه و سپس برش‌ها برروی لام‌های آلبومینه قرار داده شدند. بعد از شفاف‌سازی و آبدهی، لام‌ها با استفاده از کریزل ویوله یک درصد رنگ شدند و در نهایت مقاطع به‌وسیله چسب انتلان و لامل پوشانده شدند. لام‌های رنگ شده به روش نیسل توسط میکروسکوپ OLYMPUS, AX70 با بزرگنمایی X۴۰ بررسی و بعد از تهیه عکس توسط نرم‌افزار Image Tool 2 شمارش سلولی انجام شد. برای شمارش سلولی، ناحیه CA1 هیپوکامپ نیمکره راست در برش‌های کرونال انتخاب شد و تعداد نورون‌ها در این منطقه مشخص شده؛ شمارش گردید. دو مقطع ۳/۳ و ۴/۲ نسبت‌به برگما باتوجه به اطلس Paxinos انتخاب و شمارش برای هر مقطع در ۳ برش با حداقل فاصله ۷ میکرومتر انجام شد. برای شمارش نورون‌ها در هر گروه سطحی برابر با ۴۰۰ میکرومترمربع در نظر گرفته شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون‌های تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج به‌صورت معنی خطای معیار میانگین ± میانگین بیان می‌شوند و سـطح معنـی‌داری کمتر از۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج آزمایش ماز آبی موریس نشان داد که در طول روزهای آزمایش اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها در زمان تأخیر فرار و فاصله کل عبور برای رسیدن به سکو وجود داشت اما تفاوت معنی‌داری در سرعت حرکت پلت فرم بین گروه‌ها مشاهده نشد. حیوانات در گروه ایسکمی زمان و فاصله بیشتری را برای رسیدن به سکوی پنهان در تمام روزهای آزمایشی نسبت‌به گروه شاهد (P≤۰/۰۵) صرف کردند. همچنین در موش‌های صحرایی گروه تحت درمان با آبستاتین با دوز ۵ میکروگرم، زمان و فاصله برای رسیدن به سکوی پنهان در تمام روزهای آزمایش نسبت‌به گروه آبستاتین با دوز ۱ میکروگرم کاهش یافت؛ اما این کاهش معنادار نبود (نمودار ۱).



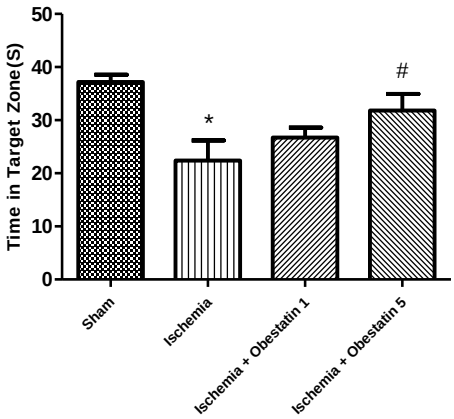
نمودار ۱- زمان تأخیر فرار، فاصله کل جابجایی و سرعت برای رسیدن به پلت فرم در طول روزهای آزمایشی در ماز آبی موریس برای گروه‌های مختلف.

* تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵).

تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آبستاتین (P<۰/۰۵).

نتیجه آزمایش پروب (نمودار ۲) نشان داد که موش‌های صحرایی در گروه ایسکمی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کمتر در منطقه ربع هدف حضور داشتند (P≤۰/۰۵). افزایش قابل توجهی در زمان صرف شده در ربع هدف در گروه درمانی با ۵ میکروگرم آبستاتین مشاهده شد (P≤۰/۰۵).

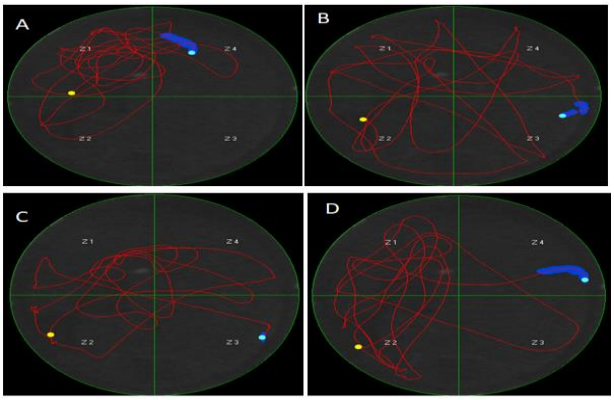
طبق نمودار ۳ در گروه ایسکمی افزایش معنی‌داری در میزان نکروزیس نسبت‌به گروه شاهد وجود داشته است (P<۰/۰۵) در گروه ایسکمی + آبستاتین با دوز ۵ میکروگرم کاهش معنی‌دار در میزان نکروزیس نسبت‌به گروه ایسکمی مشاهده گردید (P<۰/۰۵). ولی تزریق ابستاتین با دوز ۱ میکروگرم باعث کاهش معنی‌داری در میزان مرگ سلولی نکروز نداشت (P>۰/۰۵). درنتیجه می‌توان چنین بیان کرد که درمان با آبستاتین با دوز ۵ میکروگرم می‌تواند میزان نکروزیس را کاهش دهد.



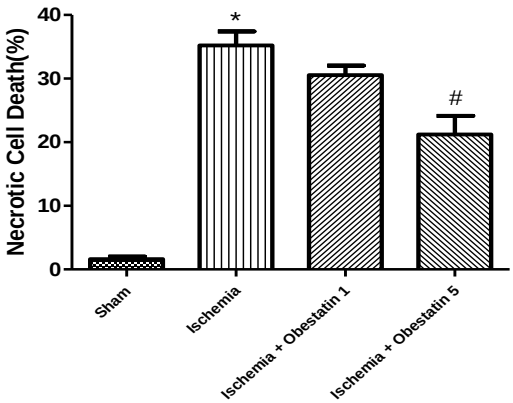
نمودار ۲- زمان صرف شده در منطقه هدف (چپ) و سرعت در روز پروب (راست)

* به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵)

تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه ایسکمی (P<۰/۰۵).



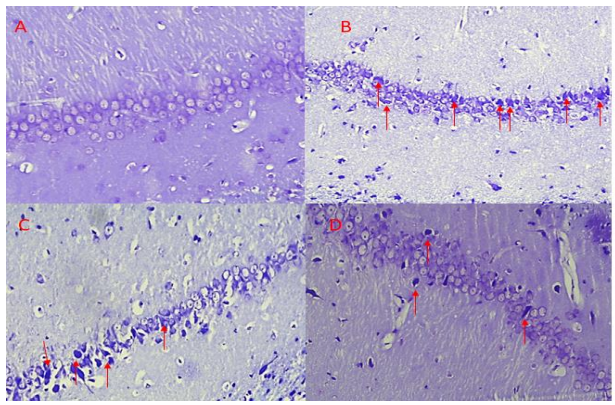
شکل ۱- نمایش مسیرهای شنا و جستجوی روزانه (روز پنجم) در ماز آب موریس برای گروه‌های مختلف.



نمودار ۳- اثرات آبستاتین بر میزان مرگ سلولی نکروزیس

* تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد (P≤۰/۰۰۱).

تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه ایسکمی (P≤۰/۰۵).



شکل ۲- اثرات آبستاتین بر میزان مرگ سلولی نکروزیس در نا حیه هیپوکامپ، A: گروه کنترل، B: گروه ایسکیمی. C: گروه ایسکیمی-آبستاتین با دوز ۱ میکروگرم D: گروه ایسکیمی-آبستاتین با دوز ۵ میکروگرم

بحث

این مطالعه با عنوان بررسی اثر تجویز آبستاتین بر اختلالات حافظه و یادگیری، مرگ سلولی و سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ناحیه هیپوکامپ در مدل نوروتکسیسیته ناشی از ایسکمی انجام شد هدف اصلی در این مطالعه ارزیابی تأثیر نوروپروتکتیو ابستاتین بر درمان اختلالات شناختی و مرگ سلولی ناشی از ایسکمی در موش‌های صحرایی بود.

در این مطالعه با استفاده از ماز آبی موریس اثرات درمانی آبستاتین بر اختلال یادگیری فضایی و حافظه ناشی از ایسکمی مورد بررسی قرار گرفت. همانند مطالعات گذشته ایسکمی موجب اختلال در یادگیری و حافظه فضایی گردید. ایسکمی موجب افزایش میانگین زمان و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در ماز آبی موریس شد که نشان دهند اختلال در یادگیری فضایی در رت‌ها می‌باشد. در آزمایشات ما تجویز آبستاتین موجب بهبود در عملکرد یادگیری شد. همچنین ارزیابی درصد حضور حیوان در ربع دایره هدف در مرحله probe trial نشان داد که گروه‌های آبستاتین زمان بیشتری را در ربع دایره هدف سپری نمودند که نشان‌دهنده بهبود حافظه فضایی در این گروه‌ها می‌باشد.

اثرات آبستاتین بر مرگ سلول‌های نکروتیک ناشی از ایسکمی در ناحیه هیپوکامپ CA1 موش صحرایی با استفاده از رنگ‌آمیزی Nissl نشان داد که آبستاتین به‌طور قابل توجهی کاهش مرگ سلولی نکروتیک ناشی از ایسکمی در ناحیه CA1 می‌گردد.

ایسکمی مغزی می‌تواند منجر به اختلالات حرکتی، حسی و بینایی، اختلال تکلم، نقایص عصبی-روانی همچون کاهش ادراک، ناتوانی در انجام تکالیفی که فرد قبلاً فرا گرفته است، اختلالات شناختی، فراموشی آنتروگراد و اختلال یادگیری فضایی گردد ضایعه ریپرفیوژن (جریان مجدد) که در اثر بازگشت جریان خون به بافت بعد از مدتی ایسکمی ایجاد می‌شود. فقدان اکسیژن و مواد غذایی وضعیت خاصی را ایجاد می‌کند، در نتیجه بازگشت دوباره گردش خون می‌تواند منجر به التهاب و ضایعات اکسیداتیو در اثر ایجاد استرس اکسیداتیو گردد. آسیب‌هایی که در اثر ریپرفیوژن ایجاد می‌شود درنتیجه عملکرد التهابی بافت ضایعه دیده است. گلبول‌های سفید خون توسط بازگشت مجدد جریان خون، باعث آزادسازی فاکتورهای التهابی مانند اینترلوکین و رادیکال‌های آزاد در بافت ضایعه دیده می‌گردند. جریان خون برگشتی موجب بازگشت اکسیژن به سلول‌ها و آسیب‌های ناشی از آزاد شدن رادیکال‌های آزاد می‌شود. این امر می‌تواند بر روی پیام‌رسانی سلولی تأثیر گذاشته و باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی گردد. نواحی مشخصی از مغز و انواع خاصی از نورون‌ها نسبت‌به ایسکمی مغزی حساس‌تر هستند که نورون‌های هرمی ناحیه هیپوکامپ مغز و اجسام مخطط از آن جمله می‌باشند. در این نواحی آسیب اختصاصی به سلول‌های گلیال نیز مشاهده می‌گردد که منجر به تشدید آسیب نورون‌ها می‌شود. مهمترین وقایع آسیب‌شناسی در جریان ایسکمی عبارتند از: عکس‌العمل التهابی بیش از اندازه، تخلیه ذخایر انرژی، آپوپتوز، کاهش جریان خون مغز که منجر به تخلیه ذخایر انرژی سلولی و سایر ترکیبات حاوی اتصالات فسفات پر انرژی می‌گردد، اختلال در فعالیت پمپ‌های یونی، دپلاریزاسیون هیپوکسیک و اسیدوز داخل سلولی به علت متابولیسم بی‌هوازی، افزایش سدیم و کلسیم و آزادسازی اسیدهای آمینه، فعال شدن آنزیم‌های کاتالیتیک، تحریک تولید اکسید نیتروژن، افزایش سدیم و کلسیم، آزادسازی سایر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تغییر در بیان ژن. نشان داده شده است که آبستاتین دارای اثرات ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی در مغز موش صحرایی مبتلا به خون‌ریزی ساب‌آراکنوئید (Subarachnoid hemorrhage) می‌باشد (۲۴). نتایج مطالعه قبل همچنین نشان می‌دهد که آبستاتین ممکن است فاکتور هسته‌ای کاپا-B (NF-κB) (Nuclear factor-κB) که وابسته‌به پاسخ‌های التهابی می‌باشد را مهار کند و به‌واسطه کاهش کاسپاز-۳ آپوپتوز سلول‌های عصبی را بعد از آسیب‌های مغزی در موش کاهش دهد (۲۵).

در گروه‌های دریافت‌کننده آبستاتین سرعت رسیدن به سکو افزایش یافت و زمان رسیدن به سکو نیز کاهش معنی‌داری نسبت‌به سایر گروه ها نشان داد و هرچه دوز دارو افزایش یافت سرعت رسیدن به سکو نیز افزایش یافت و درنتیجه اثر آنتی‌اکسیدانی ایفا کرده است.

نتایج نشان داد که مصرف آبستاتین منجر به بهبود توانایی حافظه و یادگیری گردید همچنین در گروه‌های دریافت‌کننده آبستاتین نیز هر چه دوز دارو افزایش یافت، زمان یافتن سکو کاهش و سرعت یافتن سکو افزایش یافت.

مطالعه‌ای که در گذشته انجام شده نشان می‌دهد که آبستاتین کاهش آپوپتوز سلولی را در مدل ایسکمی- ریپرفیوژن کلیوی با کاهش فعالیت

پروتئین پیش‌آپوپتوزی کاسپاز-۳ و افزایش نسبت پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 به پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax (Bcl-2/Bax) انجام می‌دهد. به‌علاوه، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد آبستاتین آسیب حاد ایسکمی- ریپرفیوژن کلیوی را با سرکوب استرس اکسیداتیو و آپوپتوز سلولی کاهش خواهد داد. آبستاتین سرکوب استرس اکسیداتیو را با کاهش سطح مالون دی‌آلدهید (MDA) (به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی) و افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) انجام می‌دهد (۲۲) همچنین نشان داده شده است که آبستاتین، از قلب در برابر آسیب ایسکمی- ریپرفیوژن محافظت می‌کند. آبستاتین از طریق کاهش اندازه ناحیه انفارکت و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز در برابر ایسکمی- ریپرفیوژن قلبی اثر محافظتی دارد (۲۳).

مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که آبسستاتین می‌تواند به‌طور قابل توجهی کاهش مرگ سلولی نکروزیس در سلول‌های هرمی CA1 پس از ایسکمی / رتروپوفیز مغز در هیپوکامپ موش صحرایی شود.

مکانسیمی که آبستاتین باعث کاهش مرگ سلولی نکروزیس می‌شود به‌طور دقیق مشخص نمی‌باشد. ولی باتوجه به مطالعه قبلی که نشان داده‌اند به‌دنبال ایسکمی مغزی عوامل مختلفی باعث مرگ نورونی می شوند که عبارتند از تولید رادیکال‌های آزاد، تحریک بیش از حد گیرنده‌های NMDA توسط گلوتامات، ادم مغزی و واکنش‌های التهابی (۲۹). به‌نظر می‌رسد مواد یا داروهایی که باعث کاهش عوامل فوق شوند می‌توانند از طریق کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول اثرات حفاظتی خود را در مقابل ایسکمی مغزی اعمال کنند. باتوجه به یافته‌های قبلی نشان داده شده که به‌دنبال ایسکمی مغزی افزایش سطح کلسیم از طریق گیرنده‌های NMDA و AMPA منجر به فعال شدن ملکول‌های Calpains و Caspase-8 در سلول می‌شود و به‌دنبال آن مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول فعال می‌شود.

پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند استرس‌های اکسیداتیو در پاتوژنزیس مرحله حاد سکته مغزی نقش محوری دارند. ایجاد ایسکمی مغزی موضعی- موقتی باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، نیتریک اکساید و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل سوپراکساید دیسموتاز، گلوتاتیون و کاتالاز می‌شود (۳۰). مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که افزایش سطح رادیکال‌های آزاد از طریق اثر مستقیم و تخریب پروتئین‌ها و لیپیدهای سلول و همچنین تخریب DNA منجر به فعال شدن مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود. همچنین از طریق اثر غیرمستقیم باعث اختلال در مسیر سیگنالینگ و تنظیم ژنی سلول و نهایتاً مرگ سلول می‌شود (۳۰). پژوهش‌های قبلی گزارش کرده‌اند، مهارکننده پراکسیداسیون چربی‌های غشاء و یا از بین برنده‌های رادیکال‌های آزاد اثر محافظتی در مقابل سکته مغزی دارند (۳۱ و ۳۲).

نشان داده شده است که تجویز مزمن محیطی آبستاتین می‌تواند سطح نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) و شاخص استرس اکسیداتیو را در مرحله حاد ایسکمی- ریپرفیوژن روده‌ای کاهش دهد. پیشنهاد شده است که این اثر حفاظتی با ایجاد توازن در ظرفیت اکسیدانی پس از آسیب ایسکمی- ریپرفیوژن ایجاد می‌شود (۲۸).

در این مطالعه، ما دریافتیم که درمان با ابستاتین به‌طور قابل توجهی آسیب ناحیه CA1 هیپوکامپ و اختلالات حافظه و یادگیری فضایی ناشی از ایسکمی را بهبود می‌بخشد. به‌نظر می‌رسد که این اثرات نوروپروتکتیو ایسکمی از مکانیسم‌های بسیاری مانند مهار مرگ سلولی نکروزیس و آپوپتوزیس به‌واسطه سرکوب رادیکال‌های آزاد و کاهش بیان پروتئین‌های پروآپوپتوزی Caspase-3 و همچنین کاهش پاسخ‌های التهابی به‌واسطه مهار فعال‌سازی آستروسیت‌ها و میکروگلیاها ناشی می‌شود. درنتیجه، باتوجه به این اثرات حفاظتی ابستاتین در شرایط پاتولوژیک، می‌توان آن را به‌عنوان یک عامل درمانی برای بیماری‌های مختلف معرفی کرد، هرچند که تحقیقات بیشتر در آینده مورد نیاز است.

References

1. Fisher M, Bogousslavsky J. Further evolution toward effective therapy for acute ischemic stroke. JAMA 1998;279:1298-303 . doi:10.1001/jama.279.16.1298
2. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. Neuropharmacology.2008;55:310-8 doi:10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.
3. Barreto AD. Intravenous thrombolytics for ischemic stroke. Neurotherapeutics 2011;8:388-99. doi: 10.1007/s13311-011-0049-x
4. Murakami K, Kondo T, Chan PH. Reperfusion following focal cerebral ischemia alters distribution of neuronal cells with DNA fragmentation in mice. Brain Research 1997;751:160-4. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00029-2
5. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. Antioxidants & Redox Signaling 2011;14:1505-17. doi: 10.1089/ars.2010.3576
6. Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. Proceedings of the National Academy of Sciences 1991;88:11158-62. doi: 10.1073/pnas.88.24.11158
7. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. Trends in Neurosciences 1995;18:83-8 . doi: 10.1016/0166-2236(95)93890-A
8. Siesjö BK. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 1981;1:155-85 .doi: 10.1038/jcbfm.1981.18
9. Britton M, Rafols J, Alousi S, Dunbar JC. The effects of middle cerebral artery occlusion on central nervous system apoptotic events in normal and diabetic rats. Experimental Diabetes Research 2003;4:13-20. doi: 10.1080/15438600303727
10. Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, et al. Quantitative Real-Time RT—PCR Analysis of Inflammatory Gene Expression Associated with Ischemia—Reperfusion Brain Injury. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2002;22:1068-79. doi: 10.1097/00004647-200209000-00004

11. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. Journal of Neuroimmunology 2007;184:53-68. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.014

12. Rodríguez-Yáñez M, Castillo J. Role of inflammatory markers in brain ischemia. Current Opinion in Neurology 2008;21:353-7.doi: 10.1097/WCO.0b013e3282ffafbf

13. Nowicka D, Rogozinska K, Aleksy M, Witte OW, Skangiel-Kramska J. Spatiotemporal dynamics of astroglial and microglial responses after photothrombotic stroke in the rat brain. Acta Neurobiologiae Experimentalis 2008;68:155.

14. Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Combating innate inflammation: a new paradigm for acute treatment of stroke? Annals of the New York Academy of Sciences. 2010;1207:149-54 .doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05730.x

15. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. Journal of Translational Medicine 2009;7:1 .doi: 10.1186/1479-5876-7-97

16. Netto C, Hodges H, Sinden J, Le Peillet E, Kershaw T, Sowinski P, et al. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. Neuroscience 1993;54:69-92 .doi: 10.1016/S0166-4328(96)00167-2

17. Wang Y, Qin Z-h. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. Apoptosis 2010;15:1382-402 .doi: 10.1007/s10495-010-0481-0

18. Albasser MM, Amin E, Lin T-CE, Iordanova MD, Aggleton JP. Evidence that the rat hippocampus has contrasting roles in object recognition memory and object recency memory. Behav Neurosci 2012;126:659-69 .doi: 10.1037/a0029754

19. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. Journal of the Neurological Sciences 2000;179:1-33 .doi: 10.1016/s0022-510x(00)00386-5

20. Li Shen X, Ju Jia F, Song N, Xia Xie J, Jiang H. Protection of MES23.5 dopaminergic cells by obestatin is mediated by proliferative rather than anti-apoptotic action. Neurosci Bull 2014;30:118-24. doi: 10.1007/s12264-013-1405-0

21. Aragno M, Mastrocola M, Ghé C, Arnoletti E, Bassino E, Alloatti G, Muccioli G. Obestatin induced recovery of myocardial dysfunction in type 1 diabetic rats: underlying mechanisms. Cardiovascular Diabetology 2012;11:129. doi: 10.1186/1475-2840-11-129

22. Pan W, Hsuchou H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood–brain barrier without saturation. Peptides 2007;28:2223-8. doi: 10.1016/j.peptides.2007.09.005

23. Angelone T, Filice E, Pasqua T, Amodio N, Galluccio M, Montesanti G, et al. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. Cellular and Molecular Life Sciences 2013;70:495-509 .doi: 10.1007/s00018-012-1138-7

24. Özsavcí D, Ersahin M, Sener A, Özakpinar ÖB, Toklu HZ, Akakín D, et al. The Novel Function of Nesfatin-1 as an Anti-inflammatory and Antiapoptotic Peptide in Subarachnoid Hemorrhage–Induced Oxidative Brain Damage in Rats. Neurosurgery 2011;68:1699-708.doi: 10.1227/NEU.0b013e318210f258

25. Tang C-H, Fu X-J, Xu X-L, Wei X-J, Pan H-S. The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of nesfatin-1 in the traumatic rat brain. Peptides 2012;36:39-45 .doi: 10.1016/j.peptides.2012.04.014

26. Victor M, Ropper AH. Disturbances of cerebrospinal fluid and its circulation including hydrocephalus, pseudotumor cerebri, and low-pressure syndromes. Adams and Victor's principles of neurology 7 ed New York: McGraw-Hill. 2001:655-75.

27. Murakami K, Kondo T, Chan PH. Reperfusion following focal cerebral ischemia alters distribution of neuronal cells with DNA fragmentation in mice. Brain Research 1997;751:160-4. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00029-2

28. Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. J Exp Biol 2004;207:3221-31. doi: 10.1242/jeb.01022

29. Calabresi P, Centonze D, Cupini LM, Costa C, Pisani F, Bernardi G. Ionotropic glutamate receptors: still a target for neuroprotection in brain ischemia? Insights from in vitro studies. Neurobiology of Disease 2003;12:82-8 .PMID 14505584

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2018; Vol 14, No 3

DOI: 10.22100/jkh.v14i3.2266

Original Article

The Evaluation Effect of Obestatin on Improvmnt of Learning and Memory and Necrosis Cell Death on Hippocampus Following Brain Ischemia Reperfusion

Elahe Mirarab-Razi (Ph.D.)[1], Mehdi Khaksari (Ph.D.)[2*], Vida Hojati (Ph.D.)[1], Golamhassan Vaezi (Ph.D.)[1], Abdolhossein Shiravi (Ph.D.)[1]

1- Dept. of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2- Dept. of Phisology, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 5 July 2019**, Accepted:** 24 November 2019

Abstract:

Introduction: *Obastatin is a newly discovered peptide with antioxidant activities in various animal models. Recent studies have shown that obastatin prevents apoptosis after ischemic heart disease/ reperfusion.Brain ischemia reperfusion can cause irreversible damage especially in the area of the hippocampus. The purpose of this study was evaluation the effect of obestatin on cognitive function and neuronal cell death following brain ischemia-reperfusion in male rats.*

Methods: *On 28 wistar male rats, Ischemia caused by obstruction of both normal carotid arteries for 20 minutes and abestatin 1 and 5* μg/kg *injected Intraperitoneally at the beginning of the reperfusion period and 24 and 48 hours after re-administration. Spatial memory test was evaluated by Morris water maze then the brains were removed for Nissl staining to assess necrosis neuronal death within the hippocampal CA1 area.*

Results: *Based on the results of this study behavioral tests shows that obestatin treatment could significantly improve spatial memory deficits and learning ($P<0.05$) versus the ischemia group. Moreover, obestatin could significantly reduce necrosis cell death ($P<0.01$) in CA1 area of hippocampus*

Conclusion: *The findings showed that treatment with obestatin significantly ameliorated hippocampal injury and spatial learning and memory impairments after brain ischemic. These protective effects of obestatin appear to be mediated by many mechanisms such as necrosis and apoptosis cell death by suppression of free radicals formation.*

Keywords: Obestatin, Apoptosis, Hippocampus, Brain ischemia, Cognitive function, Neuronal cell death.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author**: M. Khaksari, **Email:** khaksari417@yahoo.com*

Citation: Mirarab-Razi E, Khaksari M, Hojati V, Vaezi Gh, Shiravi A. The evaluation effect of obestatin on improvmnt of learning and memory and necrosis cell death on hippocampus following brain ischemia reperfusion. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2019;14(3):23-30.