

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

^۱استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

^۲کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

^۳دانشجوی 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 داستیلاز 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، 3/0HI+SB، 6/0HI+SB 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+Saline به 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.

یافته ها: 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 وجود کاهش معنی دار سطح BDNF در هیپوکامپ گروه HI+Saline، سطح این فاکتور در گروه های دریافت کننده سدیم بوتیرات افزایش معنی داری نشان داد.

نتیجه گیری: سدیم بوتیرات باعث بهبود حافظه و یادگیری فضایی در مدل آسیب مغزی ایسکمی هایپوکسیک می شود.

واژگان کلیدی: ایسکمی هایپوکسیک، مهار کننده 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 سکنه مغزی ایسکمی سبب کاتالیز لیپولیز و پراکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره های غیر اشباع متعدد می شود (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 می شود (۳). در جوندگان و پریمات ها، حافظه فضایی به حیوانات کمک می کند تا به خاطر بیاورند که اطلاعات کسب

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 می‌شوند 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 می‌شوند و ممکن است حافظه آنها دچار اختلال شود (۷). مطالعه بر روی بوتیرات سدیم نشان داد که این ماده میزان بیان آگزون ۷ حاوی پروتئین SMN (عامل بقای نورونی حرکتی) را در بیماری آتروفی عضلانی افزایش می‌دهد. بنابراین، مصرف خوراکی بوتیرات سدیم به منظور بهبود بیماری آتروفی عضلانی توصیه می‌شود (۸). آنالیزهای میکروسکوپی نشان داد که سدیم بوتیرات باعث بهبود فسفوریلاسیون اکسیداتیو و رونویسی پروتئین‌های دخیل در پاتوژن 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 داوولی، با محدوده وزنی 180 ± 25 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 ۱۴ روز دریافت کردند، ۳. گروه HI+SB ۰/۱ (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 ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هر روز (0.1 mg/kg/day)، ۲۴ ساعت پس از القاء مدل و به مدت ۱۴ روز دریافت کردند، ۴. گروه HI+SB ۰/۳ (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 (0.3 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): حیوانات این گروه پس از جراحی القاء مدل، سدیم بوتیرات را با دوز ۰/۶ میلی گرم بر کیلوگرم در هر روز (0.6 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 جراحی ۴-۰ مسدود شد. سپس حیوانات در محفظه القاء هایپوکسی، حاوی ۸٪ اکسیژن به مدت یک ساعت قرار داده شدند (۱۳). آنگاه حیوانات به قفس ریکواری منتقل شدند. ۲۴ ساعت پس از القاء مدل و ارزیابی های نورولوژیک اولیه، تجویز سدیم بوتیرات آغاز شد.

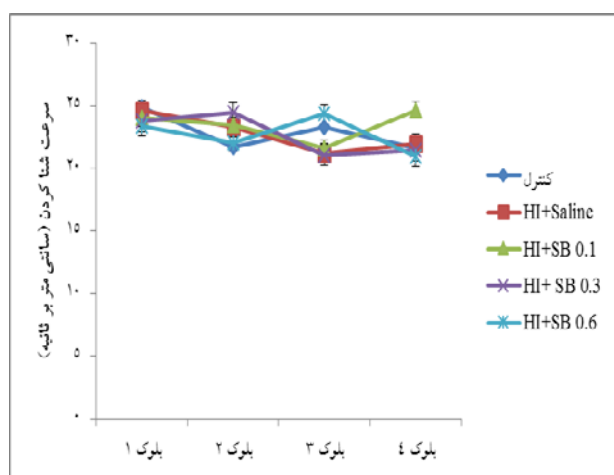
تحلیل آماری

تحلیل آماری بین گروه های مختلف با استفاده از نرم افزارهای آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی دار 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 $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

ارزیابی سرعت شنا

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



نمودار ۱. سرعت پیمایش مسیر در مرحله آزمایش در گروه های مختلف طی ماز آبی موریس. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر بود. موش های صحرایی در گروه HI+Saline به مدت ۱۴ روز پس از جراحی نرمال سالیین را دریافت کردند و در گروه های 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 ($p < 0.001$).

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

به منظور بررسی میزان یادگیری فضایی حیوانات، تست ماز آبی موریس و پروب در حیوانات مورد پژوهش، انجام گرفت. ماز آبی شامل یک استخر استوانه ای 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 می گیرد.

استخر در اتفاقی قرار گرفته است که اشکالی در خارج از ماز بر روی دیوار نصب شده است و موقعیت فرد آزمون گیرنده در کل مدت آزمایش ثابت است. میزان تأخیر در 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 می شود که بر روی سکو بماند، تا موقعیت خود را شناسایی کند. این تست در چهار روز (بلوک) تکرار می شود. در روز پنجم آزمون پروب انجام می شود، سکو برداشته می شود و حیوان به مدت ۶۰ ثانیه در استخر رها می شود. مدت زمانی که رت ها در ربع سکو شنا می کنند و به جستجوی سکو می پردازند، محاسبه می شود. 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 می گیرد. حیوان طوری وارد استخر می شود که صورتش به سمت دیواره استخر باشد و به حیوان اجازه داده می شود تا در مدت زمان یک دقیقه، موقعیت سکو را یافته و بر روی آن قرار گیرد. در هر مرحله فاکتورهای چون، تأخیر در یافتن سکو، مدت زمان شنا کردن در هر ربع، سرعت شنا کردن و مسافت پیموده شده بررسی می شود (۱۴).

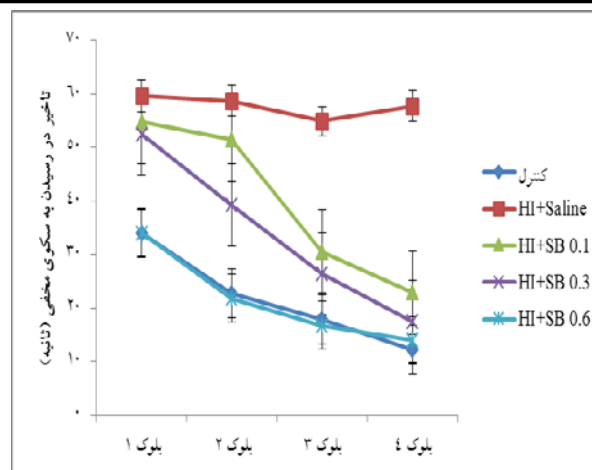
سنجش میزان هیپوکامپی BDNF

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 سالیین (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).

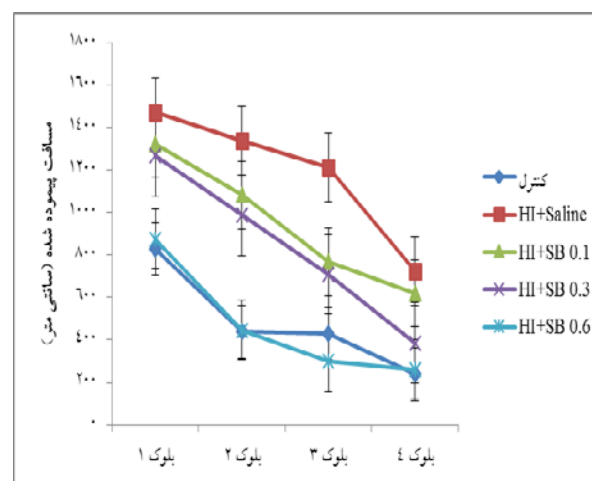
($p < 0.01$). در بلوک ۲، بین گروه کنترل با گروه‌های HI+SB 0/1 و HI+SB 0/3 اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0.0001$). بین گروه HI+Saline با گروه‌های HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 اختلاف معنی دار دارد ($p < 0.0001$). بین گروه HI+SB 0/1 با گروه‌های HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 اختلاف معنی دار دیده شد (به ترتیب: $p < 0.0001$ و $p < 0.0001$). همچنین، بین گروه HI+SB 0/3 با گروه HI+SB 0/6 اختلاف معنی داری در سطح $p < 0.0001$ مشاهده شد. در بلوک ۳، بین گروه کنترل با گروه HI+SB 0/3 اختلاف معنی دار مشاهده شد ($p < 0.05$). بین گروه HI+Saline با گروه‌های مختلف تیمار با سدیم بوتیرات اختلاف معنی داری دیده شد ($p < 0.0001$). در بررسی بین گروه‌های تیمار بین گروه HI+SB 0/1 با گروه HI+SB 0/6 اختلاف معنی داری وجود داشت ($p < 0.0001$). همچنین، بین گروه بین گروه HI+SB 0/3 با گروه HI+SB 0/6 اختلاف معنی داری دیده شد ($p < 0.01$). در بلوک ۴، بین گروه کنترل با گروه HI+SB 0/1 و گروه HI+SB 0/3 اختلاف معنی داری مشاهده شد (به ترتیب: $p < 0.0001$ و $p < 0.01$). بین گروه HI+Saline با همه گروه‌های تیمار اختلاف معنی دار آماری در سطح $p < 0.0001$ مشاهده شد. بین گروه HI+SB 0/1 با گروه HI+SB 0/3 و گروه HI+SB 0/6 اختلاف معنی داری به ترتیب در سطح $p < 0.01$ و $p < 0.0001$ مشاهده شد. همچنین، بین گروه HI+SB 0/3 با گروه HI+SB 0/6 اختلاف معنی دار آماری وجود داشت ($p < 0.05$).

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 ($p < 0.0001$) و کاهش معنی داری در مسافت پیموده شده تا رسیدن به سکوی مخفی طی مرحله آموزش نشان دادند ($p < 0.0001$).

در بلوک ۱، بین گروه کنترل با گروه‌های HI+SB 0/1 و HI+SB 0/3 نیز اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0.0001$). همچنین، بین گروه HI+Saline تنها با گروه HI+SB 0/6 اختلاف معنی داری وجود داشت ($p < 0.0001$). بین گروه‌های HI+SB 0/1 و HI+SB 0/6 و بین گروه‌های HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 اختلاف معنی دار دیده شد (هر دو $p < 0.01$). در دومین بلوک، بین گروه کنترل با گروه‌های HI+Saline و HI+SB 0/1 اختلاف معنی داری در سطح $p < 0.0001$ مشاهده شد. همچنین، بین گروه کنترل و گروه HI+SB 0/3 اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0.01$). بین گروه HI+Saline با گروه‌های HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 اختلاف معنی داری وجود داشت.



نمودار ۲. مقایسه زمان سپری شده برحسب ثانیه برای رسیدن به سکو در ۴ بلوک آزمایش بین گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین \pm 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 سالیان 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.

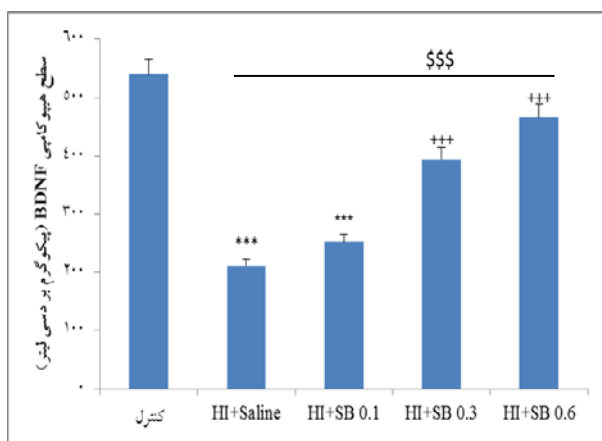


نمودار ۳. مقایسه مسافت پیموده شده برحسب سانتی‌متر برای رسیدن به سکو در ۴ بلوک آزمایش بین گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر بود. موش‌های صحرایی در گروه HI+Saline به مدت ۱۴ روز پس از جراحی نرمال سالیان را دریافت کردند و در گروه‌های 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 0/1 و HI+SB 0/3 اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0.0001$). بین حیوانات گروه HI+Saline و گروه HI+SB 0/6 اختلاف آماری معنی دار دیده شد ($p < 0.0001$). در مقایسه بین گروه‌های تیمار بین گروه HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 اختلاف معنی داری وجود داشت.

نتایج مرحله آزمون (پروپ) در ربع هدف

نتایج نشان داد که مدت زمان باقی ماندن در ربع هدف بین حیوانات گروه کنترل و گروه HI+Saline و گروه های HI+SB 0/1 و HI+SB 0/3 اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < 0/0001$). همچنین، بین گروه HI+Saline با همه گروه های تیمار اختلاف معنی دار دیده شد ($p < 0/0001$). بین گروه HI+SB 0/1 با گروه های HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 نیز اختلاف معنی دار بود ($p < 0/0001$) (نمودار ۴).

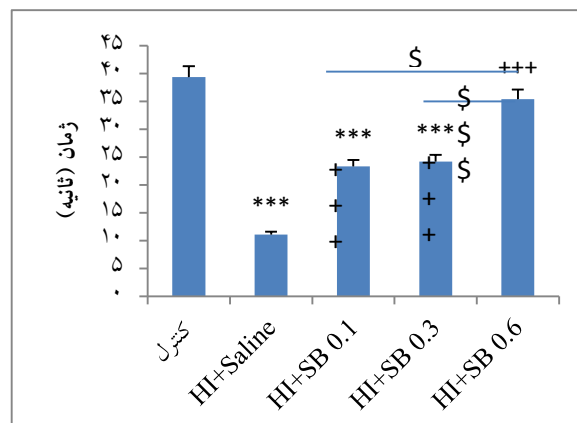


نمودار ۵. مقایسه سطح بیان هیپوکامپی BDNF در گروه های مورد آزمایش. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر بود. موش های صحرایی در گروه HI+Saline به مدت ۱۴ روز پس از جراحی نرمال سالین را دریافت کردند و در گروه های تیمار دوزهای ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن را به مدت ۱۴ روز سدیم بوتیرات دریافت کردند. *** یا \$\$\$\$: اختلاف معنی دار در سطح $p < 0/0001$; *: اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل، +: اختلاف معنی دار نسبت به گروه شم و \$: اختلاف معنی دار بین گروه های تیمار.

سنجش سطح بیان هیپوکامپی فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز

نتایج حاصل نشان داد که ايسکمی هایپوکسیک مغزی سبب کاهش معنی داری در سطح هیپوکامپی BDNF می شود، به گونه ای که میزان BDNF در عصاره هیپوکامپ گروه HI+Saline به میزان قابل توجهی کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0/0001$) (نمودار ۵). این در حالی است که تیمار با سدیم بوتیرات سبب افزایش قابل توجهی در سطح هیپوکامپی BDNF در گروه های آزمون نسبت به گروه HI+Saline شد. بدین ترتیب که بین گروه های HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 با گروه HI+Saline اختلاف معنی داری دیده شد ($p < 0/0001$). همچنین، بین گروه HI+SB 0/1 با گروه کنترل نیز اختلاف معنی داری دیده شد ($p < 0/0001$). از طرف دیگر طبق نمودار

اختلاف معنی داری به ترتیب در سطح $p < 0/0001$ و $p < 0/05$ دیده شد.



نمودار ۴. مقایسه مدت زمان شنا کردن حیوانات در ربع هدف در گروه های مورد آزمایش. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند. 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 گروه های 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 معنی دار در سطح $p < 0/0001$; *: اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل، +: اختلاف معنی دار نسبت به گروه شم و \$: اختلاف معنی دار بین گروه های تیمار.

بین گروه های HI+SB 0/1 و HI+SB 0/6 و بین گروه های HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 اختلاف معنی داری دیده شد (به ترتیب $p < 0/0001$ و $p < 0/0001$). در بلوک ۳ بین گروه کنترل با گروه HI+Saline اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0/0001$). بین گروه کنترل با گروه های HI+SB 0/1 و HI+SB 0/3 نیز اختلاف معنی داری دیده شد ($p < 0/05$). بین گروه HI+Saline با همه گروه های تیمار اختلاف معنی داری وجود داشت ($p < 0/0001$). بین گروه های HI+SB 0/3 و HI+SB 0/6 اختلاف معنی دار ($p < 0/0001$) مشاهده شد. در بلوک ۴ یادگیری نتایج نشان داد که بین گروه کنترل با گروه HI+Saline اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < 0/01$). بین گروه HI+Saline و گروه HI+SB 0/6 اختلاف معنی دار مشاهده شد ($p < 0/05$). بین گروه های HI+SB 0/1 و HI+SB 0/6 اختلاف معنی دار دیده شد ($p < 0/05$).

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

۵، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های HI+SB۰/۱ و HI+SB۰/۶ دیده شد ($p < 0.01$).

بحث

در این مطالعه پس از بستن شریان کاروتید چپ و قرار دادن حیوان در محفظه هیپوکسی که حاوی ۸٪ اکسیژن بود، ایسکمی هیپوکسیک 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 نوروتراسیون 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 نورون‌ها در مغز انسان سالم در هیپوکامپ روی می‌دهد. نورون‌های عصبی در ایسکمی مغزی به ویژه در ناحیه CA1 و DG یا ژيروس 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 بخش‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی و محیطی هستند (۱۹). BDNF یکی از نوروتروفین‌های 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 هسیتون داستیلازی با فعال ساختن نورون‌های قشری مغز و با بیان ژن‌های خاص می‌توانند آنزیم سیتوکروم P4۵۰ را رمز گذاری و پشتیبانی کنند که در بهبود حافظه فضایی نقش دارند (۲۱).

هسیتون داستیلازها نقش کلیدی در هموستاز پروتئین استیل‌هستون‌ها و پروتئین‌های دیگر در تنظیم فعالیت اساسی سلولی مانند رونویسی بازی می‌کنند. طیف گسترده‌ای از اختلالات مغزی با عدم تعادل در سطح پروتئین استیل‌هستون اختلالات رونویسی همراه است. درمان با مهار کننده‌های هسیتون داستیلازی می‌تواند این کمبودها را اصلاح کند (۲۲). تریکوستاتین نیز به عنوان یک مهار کننده هسیتون 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 هسیتون 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 هسیتون داستیلازی مانند سدیم بوتیرات و والپرات سدیم بر درمان حیواناتی که دچار این نوع بیماری بودند، آزمایش شد و

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 ژيروس دندانه‌ای هایپوکامپ و القاء نورونز 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 هایپوکامپی و حافظه و احتمال اثرگذاری سدیم بوتیرات از طریق افزایش سطح نوروتروفینی هایپوکامپ در مدل ایسکمی هایپوکسیک 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 هایپوکسی 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

- 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.
- 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.
- Ułamek-Kozioł M, Pluta R, Bogucka-Kocka A, Januszewski S, Kocki J, Czuczwar SJ. Brain ischemia with Alzheimer phenotype dysregulates Alzheimer's disease-related proteins. *Pharmacol Rep* 2016;68:582-91.
- Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J* 2014;55:310-32.
- 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.
- Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 2008;55:1081-94.
- 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.
- 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.
- 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.
- Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 2012;64:238-58.
- 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.
- 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.
- 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.

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-3 β . *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, Clausning 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. Multiple 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, Sypek 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.