Original Paper

Protective effect of Adenosine A1 receptor and ascorbic acid on hippocampal neuronal density and memory disorder in ischemia reperfusion induced Rats

Zamani M (MSc)[1], Rasooli H (PhD)[2], Mehdizadeh M (PhD)[3], Nobakht M (PhD)[3] Zamani F (BSc)[4], Soleimani M (PhD)*[5]

[1]PhD Candidate in Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [4]Nurse, School of Nursing and Midwifery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. [5]Assistant Professor, Department of Anatomy, Cellular and Molecular Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Brain ischemia is one of the most important factor of morbidity and mortality and leaving many people with mental and physical disabilities. Until now there are no appropriate medications to prevent and cure ischemic injury. This study was done to evaluate the protective effect of Adenosine A1 receptor and ascorbic acid on hippocampal neuronal density and memory disorder in ischemia reperfusion induced Rats.

Materials and Methods: This experimental study was performed on the hippocampus pyramidal neurons on 56 male BALB/c mice. Animals randmly allocated into 8 groups (N=7) including: 1) intact, 2) ischemic control group, 3) ischemic, plus agonist and adenosine of A1 receptor, 4) ascorbic acid (100 mg/daily), 5) ischemic plus agonist adenosine receptor (1 mg/1 kg) one week after ischemia, 6) ischemia, ascorbic acid befor and after ischemia and A1 receptor (1 mg/1 kg) agonist after ischemia, 7) A1 receptor, antagonist (2.25 / 1 kg), one weed after ischemia, 8) Ascorbic acid (100 mg/1kg) before and after ischemia plus A1 receptor antagonist (2.25 / 1 kg) after ischemia. Ischemia induced by clamping of common carotid artery and the drugs was injected subsequently into peritoneum after reduction of inflammation of ischemic zone. The Y-maze memory test performed after completing the treatment period, afterward brains fixed and prepared for microscopic nissl staining method. The counting of pyramidal cells were performed at 53500 square micrometer of CA1. Data were analyzed using SPSS-15 and ANOVA test.

Results: The Y-maze test showed extensive deficit in short-term memory in ischemic group (PA=200) but in treatment groups this deficit significantly reduced (PA=243, 248 and 265). The normal neuronal cell in ischemic group was significantly lowered (n=87) than treatment groups (n=111, 105 and 125) including ascorbic acid group (125), adenosine receptor agonist (105) and ascorbic acid plus agonist adenosine receptor (111). The number of normal neuronal cell in ischemic groups significantly is reduced compared to treatment group ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed that concurrent treatment of ascorbic acid and Adenosine A1 receptor agonist can significantly reduce the complications caused by brain ischemia in CA1 area of hippocampus.

Keywords: A1 receptor, Agonist, Ascorbic acid, Ischemia, Neuroprotective

*** Corresponding Author: Soleimani M (PhD), E-mail: mansourehsoleimani@gmail.com**

Received 31 Oct 2011 **Revised** 28 Dec 2011 **Accepted** 11 Jan 2012

This paper should be cited as: Zamani M, Rasooli H, Mehdizadeh M, Nobakht M, Zamani F, Soleimani M. [Protective effect of Adenosine A1 receptor and ascorbic acid on hippocampal neuronal density and memory disorder in ischemia reperfusion induced Rats]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 14(4):52-59. [Article in Persian]

تحقیقی

اثر حفاظتی آگونیست گیرنده A1 و ویتامین C بر تراکم سلولی و اختلالات حافظه ناشی از ایسکمی مغزی در هیپوکامپ موش نر بالغ نژاد BALB/c

دکتر محمد زمانی[۱]، دکتر هما رسولی[۲]، دکتر مهدی مهدیزاده[۳]، دکتر ملیحه نوبخت[۳]، فهیمه زمانی[۴]، دکتر منصوره سلیمانی*[۵]

۱- دانشجوی دکتری علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۲- استادیار گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳- استاد گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۴- کارشناس پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۵- استادیار گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

چکیده

زمینه و هدف : *سکته مغزی یکی از علل مهم مرگ و میر در جهان است و سالیانه عده زیادی را با انواع ناتوانی‌های ذهنی و جسمی مبتلا می‌کند. تاکنون داروی مناسبی برای پیشگیری و درمان آن معرفی نشده است. این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی آگونیست گیرنده A1 و ویتامین C بر تراکم سلولی و اختلالات حافظه ناشی از ایسکمی مغزی در هیپوکامپ موش سوری انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی نورون‌های هرمی هیپوکامپ ۵۶ سر موش نر بالغ سوری نژاد BALB/c با وزن تقریبی ۴۰-۳۵ گرم انجام شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به هشت گروه هفت‌تایی تقسیم شدند. گروه اول intact ، گروه دوم کنترل ایسکمی بود. گروه سوم ایسکمی (DMSO) ، حامل آگونیست و آنتاگونیست گیرنده A1 را دریافت نمود. گروه چهارم (AA)، از یک هفته قبل از ایسکمی و یک هفته بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز، اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کرد. گروه پنجم (CPA)، آگونیست گیرنده آدنوزین را به میزان یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه از روز هفتم بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز دریافت کرد. گروه ششم (CPA+AA)، علاوه بر دریافت اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قبل و بعد از ایسکمی، آگونیست گیرنده A1 (یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه) را هم بعد از ایسکمی دریافت کرد. گروه هفتم (DPCPX)، آنتاگونیست گیرنده A1 را به میزان ۲/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از روز هفتم بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز دریافت کرد. گروه هشتم (DPCPX+AA)، علاوه بر دریافت اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قبل و بعد از ایسکمی، آنتاگونیست گیرنده A1 (۲/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه) را هم بعد از ایسکمی دریافت کرد. ایسکمی با بستن شریان کاروتید مشترک القا شد و پس از آن با کاهش التهاب ناحیه ایسکمیک داروها به‌صورت تزریق داخل صفاقی تجویز شد. بعد از تکمیل دوره درمان تست حافظه Y-maze انجام شد و سپس مغز نمونه‌ها فیکس و خارج شد و برای مطالعات بافت‌شناسی (رنگ آمیزی نیسل) آماده گردید. شمارش سلول‌های هرمی در سطح ۵۳۵۰۰ میکرومتر مربع در ناحیه CA1 هیپوکامپ انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-15 و test ANOVA تجزیه و تحلیل گردید.*

یافته‌ها : *آزمون Y-maze در گروه ایسکمیک اختلال وسیعی را در حافظه کوتاه‌مدت نشان داد (PA=۲۰۰)؛ ولی این اختلال در گروه‌های درمان به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد (۲۶۵،۲۴۸ و PA=۲۴۳). تعداد نورون‌های هرمی سالم در گروه ایسکمیک (تعداد : ۸۷) و گروه‌های اسیداسکوربیک، اگونیست رسپتور آدنوزین و گروه ترکیب اسکوربیک و آگونیست رسپتور آدنوزین به ترتیب ۱۲۵، ۱۰۵ و ۱۱۱ تعیین گردید که این تعداد در گروه ایسکمیک به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه‌های درمانی بود (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه نشان داد که استفاده از ویتامین C و آگونیست گیرنده آدنوزین سبب افزایش معنی‌داری در حافظه کوتاه‌مدت و نورون‌های هرمی هیپوکامپ در ناحیه CA1 موش‌های دچار ایسکمی مغزی می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *ایسکمی، اسکوربیک اسید ، آگونیست، نوروپروتکتیو ، گیرنده آدنوزین*

* نویسنده مسؤول : دکتر منصوره سلیمانی ، پست الکترونیکی mansourehsoleimani@gmail.com

نشانی : تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی، تلفن ۸۶۷۰۳۲۰۲-۰۲۱ ، نمابر ۸۸۶۲۲۶۸۹

وصول مقاله : ۹۰/۸/۹ ، اصلاح نهایی : ۹۰/۱۰/۷ ، پذیرش مقاله : ۹۰/۱۰/۲۱

مقدمه

هیپوکامپ ناحیه‌ای از مغز است که در کف شاخ تحتانی بطن طرفی قرار گرفته و به‌دلیل شباهت ظاهری به اسب‌دریایی، هیپوکامپ نامیده شده است. این ساختار در تشکیل حافظه جدید و پردازش اطلاعات فضایی نقش دارد و جزء اولین مناطقی از مغز است که تحت اثر بیماری‌های دژنراتیو مثل آلزایمر، هانتینگتون، پارکینسون و ضایعات ترومایی و همچنین ایسکمی قرار می‌گیرد (۵-۱).

ایسکمی مغزی بعد از سرطان و سکته قلبی، سومین دلیل مرگ و میر در جهان است و نیز اولین عامل ازکارافتادگی افراد بالاتر از ۶۵ سال را تشکیل می‌دهد. برای سکته مغزی هنوز درمان قطعی و قابل قبولی حاصل نشده است. هیپوکامپ به ایسکمی و هیپوکسی بسیار حساس بوده و هیپوکسی در این قسمت باعث مهار پتانسیل سیناپسی می‌گردد که مکانیسمی برای کاهش انرژی مصرفی سلول در حالت هیپوکسی است (۶و۷). ایسکمی باعث کاهش غلظت اکسیژن سلول و در نتیجه کاهش ATP می‌شود. در این حالت سلول برای بقای خود از تنفس بی‌هوازی برای تولید ATP استفاده می‌کند که باعث تجمع لاکتات و سپس اسیدوز و مرگ سلول می‌شود. در حین ریپرفیوژن، رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر اکسیداتیوها تشکیل می‌شوند که سب تخریب سلول با شدت بیشتری نسبت به ایسکمی می‌شود. کاهش اثرات ایسکمی به مداخلات سریع پزشکی برای کاهش نکروز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) بستگی دارد. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند با کاهش آسیب‌های سلولی از مرگ و میر سلولی بکاهد (۸و۹). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با حذف رادیکال‌های آزاد و ترکیبات ناشی از صدمات سلولی، مانع آسیب به سلول‌های سالم به‌خصوص در قسمت‌هایی مثل غشای سلولی و نیز DNA می‌شوند و با این مکانیسم مانع مرگ سلول‌ها می‌گردند. رادیکال‌های آزاد به‌طور طبیعی در بدن تولید می‌شوند؛ ولی عوامل محیطی نیز مانند دود سیگار، آلودگی هوا و اشعه‌های یونیزه کننده از منابع مهم تولید این مواد در بدن هستند. بیماری‌های قلبی و سرطان و حتی فرایند پیری نیز با این مواد در ارتباط هستند. ویتامین C از جمله آنتی‌اکسیدان‌های قوی و دردسترس است که با یک رژیم غذایی مناسب می‌توان میزان آن را در بدن در حد مورد نیاز حفظ کرد (۱۲-۱۰).

رسپتور A1 از خانواده رسپتورهای پورینرژیک است که توزیع گسترده‌ای در سراسر بدن دارد. این رسپتورهای گلیکوپروتئینی فعالیت‌های مختلفی را روی سلول انجام می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فعال‌کردن آدنوزین سیکلاز، فسفولیپاز c ، جابجایی سدیم و کلسیم و نیز اثر بر روی کانال‌های کلسیم و کلر و پتاسیم اشاره کرد (۱۸-۱۳). یکی از عملکردهای مهم این رسپتور، افزایش مقاومت سلول در برابر انواع استرس‌های محیطی است که به‌دنبال فعال‌شدن آن آپوپتوز به‌تاخیر افتاده و به سلول فرصت ترمیم داده می‌شود (۲۴-۱۹).

با توجه به این که استفاده از ویتامین C در درمان انواع ایسکمی مورد آزمایش قرار گرفته؛ ولی درمان کامل و قطعی نبوده و نیز از آنجایی که آگونیست گیرنده آدنوزین بر روی مدل تایید شده ایسکمی (موش سوری) به‌ندرت آزمون شده است؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی آگونیست گیرنده A1 و ویتامین C بر تراکم سلولی و اختلالات حافظه ناشی از ایسکمی مغزی در هیپوکامپ موش سوری انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی نورون‌های هرمی هیپوکامپ ۵۶ سر موش نر بالغ سوری نژاد BALB/c با وزن تقریبی ۴۰-۳۵ گرم خریداری شده از مؤسسه رازی در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی پردیس همت دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۹ انجام شد.

همه موارد اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی در حین انجام این مطالعه به‌دقت رعایت شد. موش‌ها در یک اتاق مخصوص در دمای ۱±۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۱۰±۵۰ درصد، سیکل ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و با دسترسی به آب و غذای مناسب نگهداری شدند.

موش‌ها به‌طور تصادفی به هشت گروه هفت‌تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

الف) گروه intact

ب) گروه کنترل ایسکمی

ج) گروه ایسکمی (DMSO) که حامل آگونیست و آنتاگونیست گیرنده A1 را دریافت نمود.

د) گروه چهارم (AA)، از یک هفته قبل از ایسکمی و یک هفته بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز، اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کرد.

ه) گروه پنجم (CPA)، آگونیست گیرنده آدنوزین را به میزان یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه از روز هفتم بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز دریافت کرد.

و) گروه ششم (CPA+AA)، علاوه بر دریافت اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قبل و بعد از ایسکمی، آگونیست گیرنده A1 (یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه)

را هم بعد از ایسکمی دریافت کرد.

ز) گروه هفتم (DPCPX)، آنتاگونیست گیرنده A1 را به میزان ۲/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از روز هفتم بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز دریافت کرد.

ح) گروه هشتم (DPCPX+AA)، علاوه بر دریافت اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قبل و بعد از ایسکمی، آنتاگونیست گیرنده A1 (۲/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه) را هم بعد از ایسکمی دریافت کرد.

ایسکمی با جراحی ناحیه قدامی- طرفی گردن متعاقب بیهوشی با کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلوزین (۱۰mg/kg) و مشخص شدن غلاف کاروتید و بستن شریان کاروتید مشترک توسط کلمپ میکروبولداگ به مدت ۱۵ دقیقه القا شد.

پس از ایسکمی و اتمام تزریق داروها، آزمون ارزیابی حافظه کوتاه مدت (Y-Maze) در روز ۱۵ بعد از ایسکمی انجام شد.

آزمون رفتاری y-maze حافظه کوتاه مدت را مورد ارزیابی قرار می‌دهد و شامل دستگاهی با سه بازوی Y شکل است که هر بازو نام خاصی دارد. حیوان در یک بازو رها شد و با حرکت به هر بازو نام آن بازو ثبت شد. برای هر سه حرکت که بدون تکرار بازویی ثبت شد؛ یک نمره مثبت ثبت شد. اگر یک بازو تکراری بود؛ نمره منفی تعلق گرفت. این آزمون در ۴۸۰ثانیه انجام شد و اطلاعات آن با فرمول زیر برای هر موش محاسبه گردید (۲۵).

$$PA= \frac{x \times 3}{y-2} \times 100$$

PA: Percent Alternation, x: number of correct y: correct + wrong number

در روز ۱۶ مغز موش‌ها در طی یک بیهوشی عمیق توسط پرفیوژن با پارافرمالدئید فیکس شد. ابتدا حیوان را با استفاده از دوز بالای کتامین (۱۵۰ mg/kg) و زایلوزین (۱۵mg/kg) به‌طور عمیق بیهوش نمودیم و بلافاصله با برش میانی پوست و جدار قدامی شکم، برش دیافراگم و کناره خارجی دنده‌ها، قلب نمایان شد. ابتدا هپارین (۲۰units/ml) را به داخل بطن چپ تزریق کردیم و با کنار زدن ریه چپ، شریان آئورت نزولی را پیدا نموده و آن را مسدود نمودیم. بطن چپ را در طرف نوک قلب برش دادیم و از این طریق لوله مخصوص پرفیوژن را وارد ابتدای شریان آئورت صعودی نمودیم. ابتدا حدود ۷۵-۵۰ سی‌سی محلول نرمال‌سالین برای خارج کردن خون از درون رگ‌ها در مدت زمان حدود ۱۰-۵ دقیقه از رگ‌ها عبور دادیم. سپس ۱۰۰-۷۵ سی‌سی از محلول فیکساتیو پارافرمالدئید ۴ درصد حل‌شده در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۴) را با استفاده از نیروی جاذبه (ارتفاع یک متر) و در مدت زمان ۴۵-۳۰ دقیقه از رگ‌ها عبور دادیم. پس از پایان پرفیوژن، مغز را با دقت خارج کرده و در محلول postfix که همان فیکساتیو است قرار دادیم. بعد از ۴ روز مغزها برای بررسی میکروسکوپی و بافت‌شناسی آماده شدند. رنگ‌آمیزی بافتی با استفاده از رنگ کرزیل ویوله (نیسل) بر روی برش‌های ۷ میکرومتری انجام شد. برش‌ها از فاصله ۷۵۰ میکرومتر از قطب اکسیپیتال مغز موش‌ها انتخاب شدند. رنگ‌آمیزی نیسل مخصوص نورون‌ها بوده و هسته را به رنگ ارغوانی و سیتوپلاسم را به رنگ آبی روشن درمی‌آورد. سلول‌های نکروز شده با این رنگ‌آمیزی با هسته‌های آبی تیره و مچاله شده دیده می‌شوند (۲۶). شمارش سلول‌های هرمی ناحیه CA1 در سطح ۵۳۵۰۰ میکرومتر مربع پس از تصویربرداری با میکروسکوپ المپوس (UM Plan FI 50X) با استفاده از نرم‌افزار olysia bio report انجام شد.

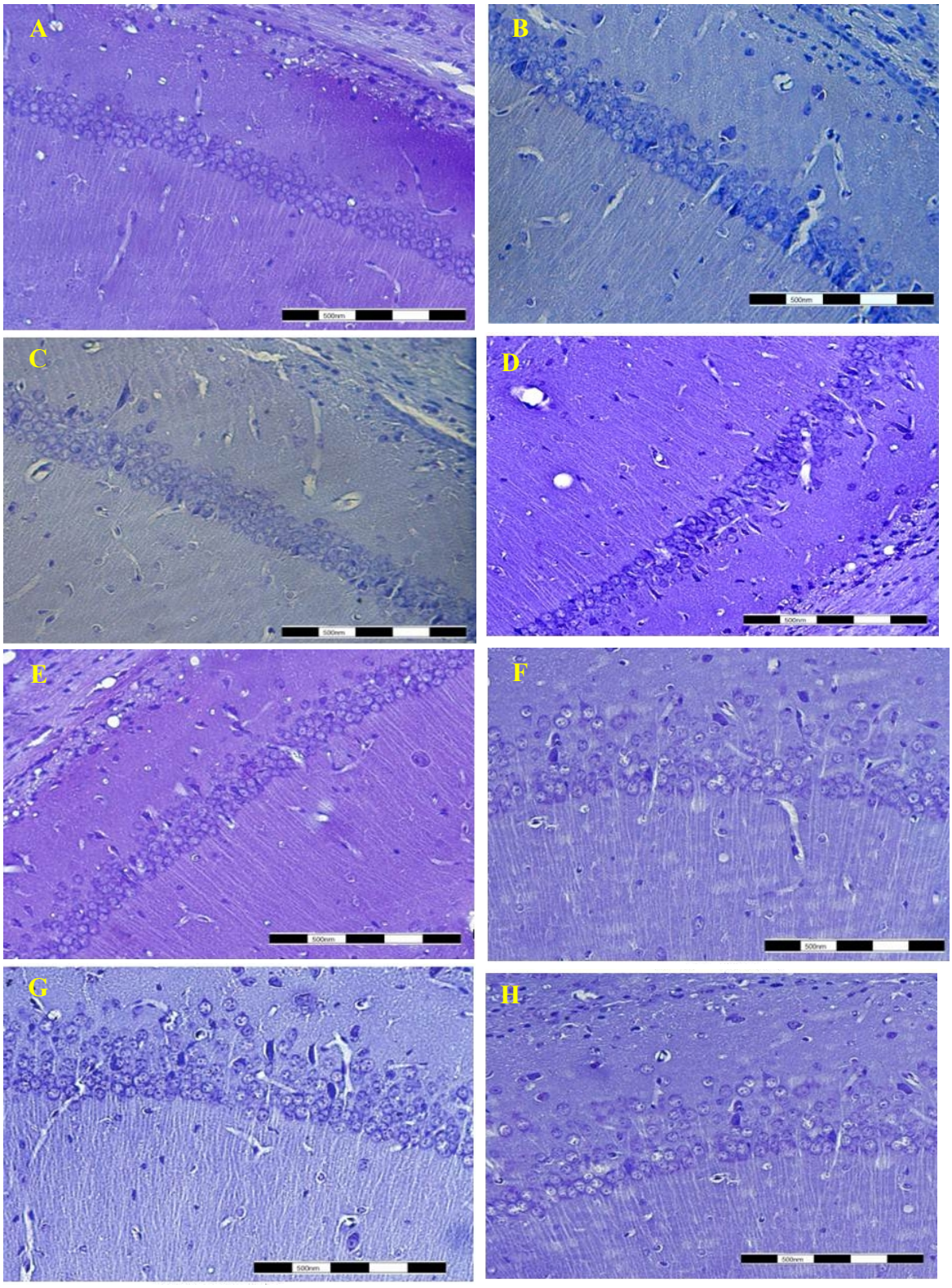
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-15 و ANOVA test تجزیه و تحلیل گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نسبت سلول‌های سالم به سلول‌های نکروتیک در مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی بافتی نیسل در شکل یک و جدول یک نشان داده شده است.

در گروه‌های درمانی CPA و AA (آگونیست، اسکوربیک اسید) سلول نکروتیک به‌طور چشمگیری کمتر و تراکم سلولی بیشتر از گروه ایسکمی کنترل بود. در گروه CPA + AA سلول نکروتیک باز هم کمتر مشاهده شد. استفاده از آنتاگونیست گیرنده A1 سبب مرگ و میر شمار زیادتری از نورون‌ها شد؛ حتی در گروه ایسکمیک هم سلول های نکروتیک بیشتری دیده شد و تراکم سلولی به‌طورچشمگیری کاهش یافت. در گروه intact سلول نکروتیکی دیده نشد (شکل یک).

با توجه به آزمون رفتاری y-maze حافظه کوتاه‌مدت موش‌های ایسکمی کنترل دچار اختلال شدید شد؛ ولی این اختلال در گروه‌های درمانی CPA و AA (آگونیست، اسکوربیک اسید) به‌مراتب کمتر بود. با تلفیق دو دارو نتایج بهتری حاصل شد. در گروه intact اختلالی در حافظه کوتاه‌مدت به ثبت نرسید. اختلال حافظه در مقایسه دو گروه intact و ایسکمی به‌وضوح دیده شد (جدول ۲). اختلال در حافظه کوتاه‌مدت در گروه حامل و نیز گروه آنتاگونیست در مقایسه با گروه ایسکمی از نظر آماری معنی‌دار نبود؛ ولی در سایر موارد از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$).



شکل یک: سلول‌های نکروتیک ناحیه CA1 هیپوکامپ با هسته‌های آبی تیره و سلول‌های سالم با هسته‌های آبی روشن دیده می‌شوند (رنگ‌آمیزی نیسل، بزرگ‌نمایی ۴۰۰). A) در گروه intact سلول نکروتیکی دیده نشد. B) در گروه ایسکمی تعداد زیادی سلول نکروتیک دیده شد. C) در گروه DMSO حامل آگونیست و آنتاگونیست اثری بر مرگ و میر سلولی نداشت. D) در گروه DPCPX با مهار گیرنده‌های A1 مرگ و میر سلولی افزایش یافت. E) در گروه DPCPX+AA تعداد سلول نکروتیک در مهار رسپتور آدنوزین با استفاده از اسکوربیک اسید تعدیل شد. F) در گروه CPA آگونیست گیرنده A1 مانع مرگ سلول‌های زیادی در هنگام ایسکمی شدند. G) ویتامین C اثر زیادی در جلوگیری از مرگ و میر سلولی داشت. H) در گروه CPA+AA تلفیق دو دارو مرگ سلولی را به حداقل رساند.

DMSO (Dimethyl sulfoxide), DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine), CPA(N6-Cyclopentyladenosine), AA(ascorbic acid)

جدول ۱ : میانگین و انحراف معیار تعداد نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار	فاصله اطمینان ۹۵ درصد		t	df	p-value ❖
		حد پایین	حد بالا			
intact	۴/۷۱۲۵E۱±۱۲/۹۰	۳۶/۳۴	۵۷/۹	۱۰/۳۳۳	۷	۰/۰۰۱ *
کنترل ایسکمی	-۴/۷۲E۱±۱۲/۱۵	-۵۷/۴	-۳۷/۰۹	-۱۰/۹۹۹	۷	۰/۰۰۱ *
ایسکمی DMSO	۱/۳۷۵±۱۵/۶۷	-۱۱/۷۲	۱۴/۴۷	۰/۲۴۸	۷	۰/۸۱۱
چهارم	-۱/۸۳E۱±۴/۵	-۲۲/۱۳	-۱۴/۶۱	-۱۱/۵۴۴	۷	۰/۰۰۱ *
پنجم	-۲/۷E۱±۷/۷۲	-۳۳/۴۶	-۲۰/۵۳	-۹/۸۸۳	۷	۰/۰۰۱ *
ششم	-۳/۸۲E۱±۶/۷۵	-۴۳/۸۹	-۳۲/۶	-۱۶/۰۱۷	۷	۰/۰۰۱ *
هفتم	۶/۶۲±۴/۶۲	۲/۷۵	۱۰/۴۹	۴/۰۵۰	۷	۰/۰۰۵ *
هشتم	E-۱/۱۱۲±۸/۰۶	-۱۷/۸۶	-۴/۳۸	-۳/۹۰۳	۷	۰/۰۰۶ *

❖ مقایسه با گروه ایسکمی ، * P<۰/۰۵

گروه ایسکمی (DMSO) دریافت کننده حامل آگونیست و آنتاگونیست گیرنده A1 ، گروه چهارم از یک هفته قبل از ایسکمی و یک هفته بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز، اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کرد. گروه پنجم، آگونیست گیرنده آدنوزین را به میزان یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه از روز هفتم بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز دریافت کرد. گروه ششم، علاوه بر دریافت اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قبل و بعد از ایسکمی، آگونیست گیرنده A1 (یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه) را هم بعد از ایسکمی دریافت کرد. گروه هفتم، آنتاگونیست گیرنده A1 را به میزان ۲/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از روز هفتم بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز دریافت کرد. گروه هشتم، علاوه بر دریافت اسکوربیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قبل و بعد از ایسکمی، آنتاگونیست گیرنده A1 (۲/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه) را هم بعد از ایسکمی دریافت کرد.

جدول ۲ : میانگین و انحراف معیار حافظه کوتاه‌مدت اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون y-maze در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار	فاصله اطمینان ۹۵ درصد		t	df	p-value ❖
		حد پایین	حد بالا			
intact	۱/۰۵۲۲E۲±۲۸/۹۳	۷۸/۴۶۷۴۸	۱۳۱/۹۸۴۵۳	۹/۶۲۲	۶	۰/۰۰۱ *
کنترل ایسکمی	-۱/۰۵۱E۲±۲۵/۳۲	-۱۲۸/۵۳۱۳۴	-۸۱/۶۹۲۰۹	۱۰/۹۸۲	۶	۰/۰۰۱ *
ایسکمی DMSO	۱/۷۲۵E۱±۳۷/۱۵	-۵۱/۶۱۶۵۵	۱۷/۱۰۷۴۱	-۱/۲۲۹	۶	۰/۲۶۵
چهارم	۷/۷۲۰E۱±۳۵/۱۳	-۱۰۹/۷۰۶۸۸	-۴۴/۱۲۹۷	-۵/۸۱۴	۶	۰/۰۰۱ *
پنجم	-۵/۶۱۱E۱±۴۴/۴	-۹۷/۱۸۵۶۱	-۱۵/۰۴۳۰۶	-۳/۳۴۳	۶	۰/۱۶
ششم	-۹/۱۷۸E۱±۶۷/۸۳	-۱۵۴/۵۱۹۷۵	-۲۹/۰۵۲۲۱	-۳/۵۸۰	۶	۰/۰۱۲ *
هفتم	۴/۱۷۴۰۰±۲۱/۸۳	-۱۶/۰۱۸۱۵	۲۴/۳۶۶۱۵	۰/۵۰۶	۶	۰/۶۳۱
هشتم	-۳/۰۸۴E۱±۲۰/۱۸	۴۹/۵۰۸۹۲	-۱۲/۱۷۵۴۶	-۴/۰۴۳	۶	۰/۰۰۷ *

❖ مقایسه با گروه ایسکمی ، * P<۰/۰۵

بحث

این مطالعه نشان داد که استفاده از آنتی‌اکسیدان ویتامین C به‌صورت یک عامل پیشگیرانه و نیز یک عامل درمانی آسیب‌های وارده به نورون‌ها را کاهش و در نتیجه بقای نورون‌های ناحیه هیپوکامپ را در مغز افزایش داد. استفاده توام از ویتامین C و آگونیست گیرنده آدنوزین اثرات مطلوب‌تری نسبت به مصرف هر کدام به‌تنهایی داشت.

در مطالعه‌ای مدل ایسکیمی گلوبال مغزی موجب نورودژنراسیون وسیع ناحیه CA1 هایپوکامپ، استریاتوم و نئوکورتکس گردید (۲۷). در مطالعه Puurunen ایسکمی گلوبال مغزی سبب مرگ نورون‌های پیرامیدال CA1 هایپوکامپ و کاهش قدرت یادگیری و حافظه فضایی در موش صحرایی گردید و مشخص گردید که نورون‌های پیرامیدال جزو اولین نورون‌های سیستم عصبی هستند که در انواع شرایط استرس‌زا آسیب می‌بینند (۲۸). مطالعات با کمک روش اتورادیوگرافی تجمع رسپتورهای A1 در ناحیه CA1 هیپوکامپ را نشان داده‌اند و مشخص گردیده است که فعال کردن این رسپتورها می‌تواند از آپوپتوز سلولی جلوگیری کند و فرایندهای ترمیمی را تسریع بخشد. همچنین نقش نوروپروتکتیو آن در بیماری‌های مخرب مغزی هم تایید شده است (۲۹و۳۰). مطالعات زیادی روی نقش نوروپروتکتیو ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در دسترس انجام شده و اثر حفاظتی آن حتی روی حیوانات دیابتی که دچار ایسکمی شدند؛ به اثبات رسیده است. حتی در مغز حیوانات تازه متولد شده در زمان هیپوکسی، می‌تواند باعث کاهش مرگ و میر نورون‌ها شود. رژیم غذایی مناسب با فراهم آوردن میزان کافی از این آنتی‌اکسیدان می‌تواند ذخیره مناسبی از آن را برای شرایط بحرانی در کبد فراهم آورد. ذخیره کبدی می‌تواند از ۴۰۰-۱۵۰ میکروگرم در هر گرم بافت کبد، متغیر باشد (۱۰و۱۱و۳۱-۲۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ویتامین C بعد از بروز ایسکمی، باعث کاهش تخریب نورون‌ها می‌شود. همچنین آگونیست گیرنده آدنوزین می‌تواند به‌عنوان یک داروی ارزشمند در کاهش عوارض ایسکمی مغزی مورد استفاده قرار گیرد. درمان تلفیقی با این دو ماده اثرات بسیار مناسبی در مقایسه با درمان با یک دارو بر ایسکمی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۴۹۳ م ت) معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران بود. بدین‌وسیله از همه اساتید محترم گروه علوم تشریحی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی به‌خصوص جناب آقای دکتر محمدتقی جغتایی و نیز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. 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 Dec;284(52):36109-17.

2. World Health Organization. The World Health Report: changing history. Geneva: Switzerland. 2004.

3. Good MA. Spatial memory and hippocampal function: Where are we now? Psicologica. 2002; 23(1): 109-38.

4. Deckert J, Jorgensen MB. Evidence for pre- and postsynaptic localization of adenosine A1 receptors in the CA1 region of rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. Brain Res. 1988 Apr;446(1):161-4.

5. Zhang J, Piantadosi CA. Prolonged production of hydroxyl radical in rat hippocampus after brain ischemia-reperfusion is decreased by 21-aminosteroids. Neurosci Lett. 1994 Aug; 177(1-2):127-30.

6. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. Nature. 2001 Dec;414(6866):916-20.

7. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. Front Biosci. 2000 Nov 1;5:E103-9.

8. Wells PG, McCallum GP, Lam KC, Henderson JT, Ondovcik SL. Oxidative DNA damage and repair in teratogenesis and neurodevelopmental deficits. Birth Defects Res C Embryo Today. 2010 Jun;90(2):103-9.

9. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huyc Ch. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 2008;4(2): 89-96.

10. Miura S, Ishida-Nakajima W, Ishida A, Kawamura M, Ohmura A, Oguma R, et al. Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia. Brain Dev. 2009 Apr;31(4):307-17.

11. Naohiro I, Mario O, Shinya K, Yasuhide H. Protective effects of oral administrated ascorbic acid against oxidative stress and neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in diabetic rats. J Health Sci. 2010;56(1): 20-30.

12. Fiore G, Capasso A. Effects of vitamin E and C on placental oxidative stress: an in vitro evidence for the potential therapeutic or prophylactic treatment of preeclampsia. Med Chem. 2008 Nov; 4(6):526-30.

13. Hatfield S, Belikoff B, Lukashev D, Sitkovsky M, Ohta A. The antihypoxia-adenosinergic pathogenesis as a result of collateral damage by overactive immune cells. J Leukoc Biol. 2009 Sep; 86(3):545-8.

14. Becker OM, Marantz Y, Shacham S, Inbal B, Heifetz A, Kalid O, et al. G protein-coupled receptors: in silico drug discovery in 3D. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug;101(31):11304-9.

15. Zimmermann H. Nucleotide signaling in nervous system development. Pflugers Arch. 2006 Aug;452(5):573-88.

16. Londos C, Cooper DM, Wolff J. Subclasses of external adenosine receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 May; 77(5):2551-4.

17. Burnstock G, Verkhratsky A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. Cell Death Dis. 2010 Jan; 1(1):e9.

18. Kulinsky VI, Minakina LN, Usov LA. Role of adenosine receptors in neuroprotective effect during global cerebral ischemia. Bull Exp Biol Med. 2001 May;131(5):454-6.

19. Regan SE, Broad M, Byford AM, Lankford AR, Cerniway RJ, Mayo MW, et al. A1 adenosine receptor overexpression attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and caspase 3 activity. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Mar;284(3):H859-66.

20. Jiang-Ning Yang, Jiang-Fan Chen, Bertil B. Fredholm. Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors in regulating heart rate, body temperature, and locomotion as revealed using knockout mice and caffeine Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 Apr; 296(4): H1141–H1149.

21. Stone TW, Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Darlington LG. Tryptophan, adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. Metab Brain Dis. 2007 Dec;22(3-4):337-52.

22. Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, McCarley RW. Adenosine and sleep-wake regulation. Prog Neurobiol. 2004 Aug; 73(6):379-96.

23. Liu AM, Wong YH. G16-mediated activation of nuclear factor kappaB by the adenosine A1 receptor involves c-Src, protein kinase C, and ERK signaling. J Biol Chem. 2004 Dec; 279(51):53196-204.

24. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. Cell Signal. 2003 Sep; 15(9):813-27.

25. Hritcu L, Ciobica A, Artenie V. Effects of right-unilateral 6-hydroxydopamine infusion-induced memory impairment and oxidative stress: relevance for Parkinson's disease. Cent Eur J Biol. 2008;3(3):250-7.

26. Pilati N, Barker M, Panteleimonitis S, Donga R, Hamann M. A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. J Histochem Cytochem. 2008 Jun; 56(6):539-50.

27. Bacigaluppi M, Comi G, Hermann. DM. Animal models of ischemic stroke. part two: modeling cerebral ischemia. Open

Neurol J. 2010;4:34-8.

28. Puurunen K. The effects of pharmacotherapy and training on functional recovery after global and focal cerebral ischemia in rats. Doctoral dissertation. Faculty of Pharmacology, University of Kuopio, Finland. 2001. Available at: https://www.uef.fi/c/document_library/get_file?uuid=c781b8e4-a2c0-4028-a534-54d3e8ab05cd&groupId=47283

29. Park UJ, Lee YA, Won SM, Lee JH, Kang SH, Springer JE, et al. Blood-derived iron mediates free radical production and neuronal death in the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia in rat. Acta Neuropathol. 2011 Apr;121(4):459-73.

30. Jackson C, Crossland L, Dennis M, Wardlaw JM, Sudlow C. Assessing the impact of the requirement for explicit consent in a hospital-based stroke study. QJM. 2008;101(4):281-9.

31. Waterlow J. Disorders of the liver in tropical nutritional diseases. P Nurt Soc. 1954 Sep; 13(2): 135-9.